



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

ELISANGELA CHRISTHIANNE BARBOSA DA SILVA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE SUBCRÔNICA E DA
ATIVIDADE ANTITUMORAL E ANTIANGIOGÊNICA DE
Caesalpinia echinata Lam.

RECIFE

2014

ELISANGELA CHRISTHIANNE BARBOSA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE SUBCRÔNICA E DA
ATIVIDADE ANTITUMORAL E ANTIANGIOGÊNICA DE
Caesalpinia echinata Lam.**

Tese 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 Doutor em Ciências Farmacêuticas.

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

Orientador: Profa. Dra. Ivone Antônia de Souza

RECIFE

2014

Catálogo na Publicação (CIP)
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S586a Silva, Elisangela Christianne Barbosa da.
Avaliação da toxicidade subcrônica e da atividade antitumoral e antiangiogênica de *Caesalpinia echinata* Lam / Elisangela Christianne Barbosa da Silva. – 2014.
189 f.: il.; tab.; gráf.; 30 cm.

Orientador: Ivone Antônia de Souza.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2014.
Inclui referências e apêndices.

1. *Caesalpinia echinata*. 2. Carcinoma de Ehrlich. 3. Angiogênese. 4. Antioxidante. I. Souza, Ivone Antônia de (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2016-109)



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, 20 de Janeiro de 2014.

Defesa de Tese de Doutorado de **Elisangela Christianne Barbosa da Silva** defendida nesta data e **APROVADA**, por decisão unânime, pela Banca Examinadora composta pelos seguintes professores:

Prof.^a Dr.^a Ivone Antônia de Souza

(Depto de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: _____.

Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Alves de Lima

(Depto de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: _____.

Prof.^a Dr.^a Fálba Bernadete Ramos dos Anjos

(Depto de Histologia da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: _____.

Prof.^a Dr.^a Suzene Izídio da Silva

(Depto de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE).

Assinatura: _____.

Prof. Dr. Fernando Leandro dos Santos

(Depto de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE).

Assinatura: _____.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Reitor

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

Vice-Reitor

Silvio Romero de Barros Marques

Pró-Reitor para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação

Francisco de Sousa Ramos

Diretor do Centro de Ciências da Saúde

Nicodemos Teles de Pontes Filho

Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Antonio Rodolfo de Faria

Vice-Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Dalci José Brondani

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Almir Gonçalves Wanderley

Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Ana Cristina Lima Leite

Dedico esta tese minha família por todo apoio,
meus maiores incentivadores.

Ao meu esposo, Joabe Gomes,
pelo apoio incondicional

E ao meu filho, Benjamin Barbosa Gomes,
que me inspira e me motiva.

São as pessoas mais importantes da minha vida.

Agradecimentos

A Deus, por sua infinita bondade e misericórdia, por ter me amparado sempre e por me permitir concluir mais um objetivo.

Aos queridos amigos que fiz durante estes anos de pesquisa Karem, Luis Cláudio, Ivana, Daniele Lordão, Gerson, Laurimar, Aldo César e Ana Pavla. A estes, registro minha mais sincera gratidão pela paciência, colaboração e, principalmente, pelo empenho que fizeram e fazem seu trabalho.

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha,
é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra.

Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha
e não nos deixa só,
porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós.

Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova
de que as pessoas não se encontram por acaso.”

Charlie Chaplin.

Ao professor Dr. Fernando Leandro dos Santos por sua paciência, maestria, perspicácia e dedicação com que empenhou seus esforços nesse trabalho.

Gostaria de agradecer especialmente a professora, idealizadora e entusiasta desse projeto, Dra. Ivone Antônia de Souza. Obrigada pelo crédito que, pela segunda vez, depositou em mim. A ela o meu enlevado agradecimento.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Agradecimentos

De uma forma destacada, quero demonstrar meus sentimentos de gratidão ao mestre Dr. George Chaves Jimenez

Obrigada, professor, pela oportunidade.

Obrigada, pelo compartilhamento do seu conhecimento.

Obrigada, pelo direcionamento do meu trabalho.

Obrigada, pelo convívio sempre amistoso.

Obrigada, pelo exemplo de ética e dedicação.

Obrigada, pela confiança e amizade.

Muito obrigada!

Minha imensa admiração

*“Eu aprendi que para se crescer como
pessoa é preciso me cercar de gente mais
inteligente do que eu.”*

William Shakespeare

*“Não te mandei eu? Esforça-te e tem bom
ânimo; não te atemorizes,
nem te espantes;
porque o Senhor teu Deus está
contigo, por onde quer que andares.”*

(Josué 1:9)

RESUMO

O presente trabalho teve como principal objetivo averiguar os efeitos da toxicidade subcrônica, potencial de inibição tumoral, atividade antiangiogênica além de potencial citotóxico e antioxidante do extrato etanólico (EE) do cerne de *Caesalpinia echinata*. Os ensaios de toxicidade subcrônica foram efetuados em ratos Wistar (*Ratus norvegicus*), adultos de ambos os sexos. Os animais foram tratados durante 28 dias com o referido extrato nas doses de 75, 150 e 300 mg/Kg administrado por via oral, e verificou-se o consumo de água e de alimento, a variação temporal de peso corpóreo, além de parâmetros hematológicos e bioquímicos. A inibição tumoral foi avaliada através da inoculação de suspensão de células de carcinoma de Ehrlich (CE) tratadas durante uma hora com diferentes concentrações de EE (6,25 mg/mL, 12,5mg/mL e 25mg/mL) ou Metotrexado (0,5mg/mL), em camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*). A viabilidade das células do CE foi avaliada antes e após o tratamento e em seguida foram inoculadas nos animais, na concentração de 2×10^6 células viáveis. No teste de avaliação do efeito do EE de *C. echinata* sobre o crescimento tumoral em animais pré-tratados com inibidores da cascata do ácido araquidônico, os camundongos foram tratados previamente com Dexametasona (3,9mg/Kg) ou Indometacina (3,6mg/Kg), por quatro dias, e em seguida receberam uma suspensão de células do CE, sendo posteriormente tratados com o EE. A taxa de crescimento tumoral foi avaliada, assim como a biometria do pulmão, fígado, rins e baço; seguida de avaliações histopatológicas, assim como análise hematológica e bioquímica. A atividade antiangiogênica foi processada em modelo de angiogênese em córnea de ratos na dose de 100mg/mL do EE. A atividade antioxidante foi avaliada sobre os radicais DPPH e Óxido Nítrico, a ação citotóxica através de ensaio colorimétrico com sal de tetrazólio e efeito protetor frente ao peróxido de hidrogênio. Nos resultados verificou-se que em ambos os sexos houve variação em relação ao ganho de peso, onde ficou demonstrado, nas fêmeas, diminuição do índice de massa corpórea dose não-dependente. Em relação ao consumo de água e alimento houve diminuição com o tempo em todos os tratamentos. Quanto à análise dos parâmetros hematológicos houve discrepância entre fêmeas e machos com acentuação para células brancas e plaquetas. Na análise bioquímica as maiores discrepâncias ocorreram quanto aos triglicérides, e as transaminases AST e ALT. Uma relação positiva entre a concentração de EE e o percentual de inibição tumoral foi obtida, alcançando-se 100% de inibição com 25mg/mL de EE no pré-tratamento das células do CE. Animais pré-tratados com dexametasona inoculados com suspensão de células do CE, apresentaram menor taxa de crescimento tumoral, sugerindo a participação de componentes da cascata do ácido araquidônico no processo inibitório. EE também apresentou efeito inibitório (77,49%) em modelo de angiogênese inflamatória. Uma atividade antioxidante satisfatória na captura do radical DPPH com $IC_{50} = 42,4 \mu\text{g/mL}$, correspondendo a uma redução de 74,3%. Quanto ao Óxido nítrico obteve-se $IC_{50} = 234,2 \mu\text{g/mL}$ que correspondeu a uma redução de 25,49%. Verificou-se que o EE foi capaz de proteger a cultura de células expostas ao stress oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio. Estes resultados sugerem que EE de *C. echinata* apresenta grandes potencialidades na inibição tumoral, provavelmente, envolvendo a participação de mediadores da cascata do ácido araquidônico.

Palavras-chave: *Caesalpinia echinata*, carcinoma de Ehrlich, angiogênese, antioxidante.

ABSTRACT

The main aim of the present study was to investigate the subchronic toxic effects of ethanolic extract (EE) of the heartwood of *C. echinata*, its capacity to inhibit tumors and antiangiogenic, cytotoxic and antioxidant properties. The subchronic toxicity assays were carried out in adult Wistar rats (*Ratus norvegicus*) of both sexes. The animals were treated for 28 days with orally administered doses of the 75, 150 and 300 mg/Kg of the extract and their consumption of food and water, variations in body weight over time, and hematological and biochemical parameters were noted. The ability to inhibit tumors was examined by way of inoculation of Swiss albino mice (*Mus musculus*) with a suspension of Ehrlich's carcinoma (EC) cells, treated for one hour with different concentrations of EE (6.25 mg/mL, 12.5mg/mL and 25mg/mL) or Methotrexate (0.5mg/mL). The viability of the EC cells was assessed before and after treatment and then the animals were inoculated with it at a concentration of 2×10^6 viable cells. In the test to evaluate the effect of the EE of *C. echinata* on tumor growth in animals pretreated with inhibitors from the arachidonic acid cascade, the mice were previously treated with Dexamethasone (3.9mg/Kg) or Indomethacin (3.6mg/Kg), for four days and then received a suspension of EC cells, followed by treatment with EE. The tumor growth rate was measured, along with the size of the lungs, liver, kidneys and spleen. Histopathological evaluations and hematological and biochemical analyses were subsequently carried out. Antioangiogenic activity was evaluated using a model involving angiogenesis in the corneas of rats at a dose of 100mg/mL of EE. Antioxidant activity was assessed in relation to the DPPH and nitric oxide radicals and cytotoxic properties by way of a colorimetric assay using tetrazolium salt and the protector effect against hydrogen peroxide. The results showed that in both sexes there was variation in weight gain and the reduction in body mass index was found not to be dose-dependent in the females. There was a reduction in consumption of food and water over time with all treatments. There was a discrepancy between males and females in terms of hematological parameters, with an increase in the numbers of white blood cells and platelets. In the biochemical analysis, the greatest discrepancies were found in the triglycerides and the AST and ALT transaminase enzymes. A positive association was found between the concentration of EE and the percentage tumor inhibition obtained, achieving 100% tumor inhibition with 25mg/mL of EE during pretreatment of EC cells. Animals pretreated with dexamethasone and inoculated with a suspension of EC cells exhibited a lower tumor growth rate, suggesting the involvement of components of the arachidonic acid cascade in the inhibition process. The EE also had an inhibitory effect (77.49%) in the inflammatory angiogenesis model. Satisfactory antioxidant activity was found capable of capturing the DPPH radical with $IC_{50} = 42.4 \mu\text{g/mL}$, representing a reduction of 74.3%. With nitric oxide an IC_{50} of $234.2 \mu\text{g/mL}$ was obtained, representing a reduction of 25.49%. The EE was found to be capable of protecting the culture of cells exposed to oxidative stress induced by hydrogen peroxide. These results suggest that the EE of *C. echinata* has great potential for inhibiting tumors, very possibly involving mediation by the arachidonic acid cascade.

Key-words: *Caesalpinia echinata*, Ehrlich's carcinoma, angiogenesis, antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

FIGURA 2.1 –	Formula estrutural da brasilina (A) e da brasileína (B).....	37
FIGURA 2.2 –	<i>Caesalpinia echinata</i> Lam. - vista parcial de um individuo adulto.....	38
FIGURA 2.3 –	<i>Caesalpinia echinata</i> Lam. A: detalhe de um ramo mostrando folhas e fruto; B: Corte transversal mostrando o cerne vermelho, aos 12 (B1) e aos 25 (B2) anos; C: detalhe contendo flor em vista frontal, com sépala abaxial, que é verde e pétala adaxial, que possui uma mancha vermelha escura.....	39
FIGURA 2.4 –	Inter-relação entre anormalidades no ciclo celular e a iniciação do câncer.....	47
FIGURA 2.5 –	Desequilíbrio observado no processo neoplásico.....	50
FIGURA 2.6 –	Esquema representativo dos processos de vasculogênese e angiogênese.....	51
FIGURA 2.7 –	Esquema representativo dos processos de vasculogênese e angiogênese.....	57

METODOLOGIA

FIGURA 3.1 –	Esquema de tratamentos das células do carcinoma ascético de Ehrlich.....	72
FIGURA 3.2 –	Ilustração do esquema de medição dos diâmetros do tumor.....	73

RESULTADOS E DISCUSSÃO

FIGURA 4.1 -	Variação temporal do peso corpóreo de ratos machos adultos submetidos a diferentes tratamentos com EE de <i>C. echinata</i> . C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/Kg ; T2 – animais tratados com 150mg/Kg; T3 – animais tratados com 300mg/Kg.....	78
FIGURA 4.2 -	Razão entre as taxas de variação de peso em ratos conforme o tipo de tratamento empregado, tomando-se como referência a taxa de variação de peso dos animais do grupo controle. C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/Kg ; T2 – animais tratados com 150mg/Kg; T3 – animais tratados com 300mg/Kg. Coeficiente angular (a); coeficiente linear (b); coeficiente de determinação (R^2).....	79
FIGURA 4.3 -	Variação temporal do peso corpóreo de ratas adultas	

	submetidas a diferentes tratamentos com EE de <i>C. echinata</i> . C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/Kg ; T2 – animais tratados com 150mg/Kg; T3 – animais tratados com 300mg/Kg.....	81
FIGURA 4.4 -	Razão entre as taxas de variação de peso em ratas conforme o tipo de tratamento empregado, tomando-se como referência a taxa de variação de peso dos animais do grupo controle. C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/Kg ; T2 – animais tratados com 150mg/Kg; T3 – animais tratados com 300mg/Kg. Coeficiente angular (a); coeficiente linear (b); coeficiente de determinação (R^2).	82
FIGURA 4.5 -	Razão entre as taxas de variação de peso em ratas conforme o tipo de tratamento empregado, tomando-se como referência a taxa de variação de peso dos ratos sob mesma condição de tratamento. C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/Kg; T2 – animais tratados com 150mg/Kg; T3 – animais tratados com 300mg/Kg. Coeficiente angular (a); coeficiente linear (b); coeficiente de determinação (R^2).....	83
FIGURA 4.6 -	Variação temporal da diferença de peso em ratos submetidos a diferentes condições de tratamento EE <i>C. echinata</i> . C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/Kg; T2 – animais tratados com 150mg/Kg; T3 – animais tratados com 300mg/Kg.....	85
FIGURA 4.7 -	Variação temporal da diferença de peso em ratas submetidas a diferentes condições de tratamento com EE <i>C. echinata</i> . C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/Kg ; T2 – animais tratados com 150mg/Kg; T3 – animais tratados com 300mg/Kg.....	87
FIGURA 4.8 -	Consumo medio de água em ratos submetidos a diferentes tratamentos com EE de <i>C. echinata</i> , ao longo de 28 dias. C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/Kg ; T2 – animais tratados com 150mg/Kg; T3 – animais tratados com 300mg/Kg.....	91
FIGURA 4.9 -	Consumo medio de alimento em ratos submetidos a diferentes tratamentos com EE de <i>C. echinata</i> , ao longo de 28 dias. C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/Kg ; T2 – animais tratados com 150mg/Kg; T3 – animais tratados com 300mg/Kg.....	91
FIGURA 4.10 -	Consumo medio de água em ratas submetidas a diferentes tratamentos com EE de <i>C. echinata</i> , ao longo de 28 dias. C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/Kg ; T2 – animais tratados com 150mg/Kg; T3 – animais tratados com 300mg/Kg.....	92
FIGURA 4.11 -	Consumo medio de alimento em ratas submetidas a	

	diferentes tratamentos com EE de <i>C. echinata</i> , ao longo de 28 dias. C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/Kg; T2 – animais tratados com 150mg/Kg; T3 – animais tratados com 300mg/Kg.....	93
FIGURA 4.12 -	Razão entre consumo medio de água e alimento em ratos submetidos a diferentes tratamentos com EE de <i>C. echinata</i> , ao longo de 28 dias. C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/Kg ; T2 – animais tratados com 150mg/Kg; T3 – animais tratados com 300mg/Kg.....	95
FIGURA 4.13 -	Razão entre consumo medio de água e alimento em ratas submetidas a diferentes tratamentos com EE de <i>C. echinata</i> , ao longo de 28 dias. C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/Kg ; T2 – animais tratados com 150mg/Kg; T3 – animais tratados com 300mg/Kg.....	95
FIGURA 4.14 -	Linhas de tendência da razão entre consumo medio de água e alimento em ratos submetidos a diferentes tratamentos com EE de <i>C. echinata</i> , ao longo de 28 dias. C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/Kg ; T2 – animais tratados com 150mg/Kg; T3 – animais tratados com 300mg/Kg.....	96
FIGURA 4.15 -	Linhas de tendência da razão entre consumo medio de água e alimento em ratas submetidas a diferentes tratamentos com EE de <i>C. echinata</i> , ao longo de 28 dias. C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/Kg ; T2 – animais tratados com 150mg/Kg; T3 – animais tratados com 300mg/Kg.....	97
FIGURA 4.16 -	Parâmetros hematológicos: Relação entre os valores de ratas/ratos tratados com diferentes doses de EE de <i>C. echinata</i> , ao longo de 28 dias. Condição de tratamentos (Trat.): C – controle; T1 – tratamento com 75 mg/Kg; T2 – tratamento com 150mg/Kg e T3 – tratamento com 300 mg/Kg.....	101
FIGURA 4.17 -	Parâmetros bioquímicos: relação entre os valores de ratas/ratos tratados com diferentes doses de EE de <i>C. echinata</i> , ao longo de 28 dias. Condição de tratamentos (Trat.): C – controle; T1 – tratamento com 75 mg/Kg; T2 – tratamento com 150mg/Kg e T3 – tratamento com 300 mg/Kg.....	105
FIGURA 4.18 -	a) Visão da cristalino em rato wistar estimulado com NaOH, não tratado (controle); b) cristalino de rato wistar tratado com EECe.....	110
FIGURA 4.19 -	Número de vasos contados na superfície do cristalino em ratos wistar tratados com EECe.....	110
FIGURA 4.20 -	Célula tumoral não viável corada em azul, célula viável sem coloração.....	113

FIGURA 4.21 -	Percentual de animais tumorados, após 23 dias de inoculação de células ascíticas do tumor de Ehrlich sob diferentes condições de tratamento com EE <i>C. echinata</i> e Metotrexato – MTX.....	115
FIGURA 4.22 -	Percentual de Inibição tumoral em função da concentração de EE <i>C. echinata</i> empregado no tratamento de células ascíticas do tumor de Ehrlich, por uma hora, antes da inoculação nos animais.....	117
FIGURA 4.23 -	Variação temporal de peso corpóreo em camundongos sob diferentes condições de tratamento com EE <i>C. echinata</i> e Metotrexato – MTX.....	118
FIGURA 4.24 -	Variação do volume do tumor de Ehrlich conforme a concentração de EE <i>C. echinata</i> e Metotrexato – MTX empregado nas preparações celulares por uma hora, antes da inoculação nos animais. Na concentração de 25mg/mL não ocorreu crescimento de tumor nos animais.....	121
FIGURA 4.25 -	Variação temporal do volume do tumor de Ehrlich em camundongos do grupo controle, que receberam células ascíticas tratadas com polietileno glicol em solução salina por uma hora antes da inoculação nos animais.....	123
FIGURA 4.26 -	Variação temporal do volume do tumor de Ehrlich em camundongos do grupo controle que receberam células ascíticas tratadas com 0,5mg/mL de Metotrexato – MTX por uma hora, antes da inoculação nos animais.....	124
FIGURA 4.27 -	Variação temporal do volume do tumor de Ehrlich em camundongos do grupo controle que receberam células ascíticas tratadas com 12,5mg/mL de EE <i>C. echinata</i> por uma hora, antes da inoculação nos animais.....	125
FIGURA 4.28 -	Variação temporal do volume do tumor de Ehrlich em camundongos do grupo controle que receberam células ascíticas tratadas com 6,25 mg/mL de EE <i>C. echinata</i> por uma hora antes da inoculação nos animais.....	126
FIGURA 4.29 -	Taxa de crescimento do tumor de Ehrlich em camundongos inoculados com células ascíticas tratadas com diferentes concentrações de EE <i>C. echinata</i> ou Metotrexato – MTX por uma hora antes da inoculação nos animais. * Diferença significativa em relação ao controle para um valor de $p < 0,05$	127
FIGURA 4.30 -	Peso relativo do pulmão (g/g de peso corpóreo), de camundongos que receberam células ascíticas do tumor de Ehrlich tratadas com diferentes concentrações de EE de <i>C. echinata</i> e Metotrexato – MTX.* Diferença significativa para um valor de $p < 0,05$	130
FIGURA 4.31 -	Peso relativo do Fígado (g/g de peso corpóreo), de camundongos que receberam células ascíticas do tumor	

	de Ehrlich tratadas com diferentes concentrações de EE de <i>C. echinata</i> e Metotrexato – MTX.....	130
FIGURA 4.32 -	Peso relativo do Rim (g/g de peso corpóreo), de camundongos que receberam células ascíticas do tumor de Ehrlich tratadas com diferentes concentrações de EE de <i>C. echinata</i> e Metotrexato – MTX. * Diferença significativa para um valor de $p < 0,05$	131
FIGURA 4.33 -	Peso relativo do baço (g/g de peso corpóreo), de camundongos que receberam células ascíticas do tumor de Ehrlich tratadas com diferentes concentrações de EE de <i>C. echinata</i> e Metotrexato – MTX. * Diferença significativa para um valor de $p < 0,05$	131
FIGURA 4.34 -	Variação temporal do peso corpóreo (g), em camundongos pré-tratados com dexametasona (3,93 mg/Kg) ou indometacina (3,58 mg/Kg) conjuntamente com EE de <i>C. echinata</i> (25mg/Kg), ou soro fisiológico, induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.....	137
FIGURA 4.35 -	Taxa de ganho de massa em função do tempo, em camundongos pré-tratados com dexametazona (3,93 mg/Kg) ou indometacina (3,58 mg/Kg) conjuntamente com EE <i>C. echinata</i> (25mg/Kg), ou soro fisiológico (SF), induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.....	138
FIGURA 4.36 -	Variação temporal do volume do tumor (mm^3) em camundongos do grupo controle, induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.....	139
FIGURA 4.37 -	Variação temporal do volume do tumor (mm^3) em camundongos tratados com DEXA (3,93 mg/Kg) + EE de <i>C. echinata</i> (25 mg/Kg), induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.....	141
FIGURA 4.38 -	Variação temporal do volume do tumor (mm^3) em camundongos tratados com INDO (3,58 mg/Kg) + EE <i>C. echinata</i> (25 mg/Kg), induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.....	143
FIGURA 4.39 -	Variação temporal do volume do tumor (mm^3) em camundongos tratados com soro fisiológico (SF) + EE <i>C. echinata</i> (25 mg/Kg), induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.....	145
FIGURA 4.40 -	Taxa de variação temporal de volume do tumor em camundongos pré-tratados com dexametasona (3,93 mg/Kg) ou indometacina (3,58 mg/Kg) conjuntamente com EE <i>C. echinata</i> (25mg/Kg), ou soro fisiológico (SF) induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.* Diferença significativa em relação ao controle para um valor de $p < 0,05$	147

FIGURA 4.41 -	Peso relativo do pulmão em camundongos pré-tratados com dexametasona (3,93 mg/Kg) ou indometacina (3,58 mg/Kg) conjuntamente com EE <i>C. echinata</i> (25mg/Kg), ou soro fisiológico (SF) induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich. * Diferença significativa em relação ao controle para um valor de $p < 0,05$	148
FIGURA 4.42 -	Peso relativo do fígado em camundongos pré-tratados com dexametazona (3,93 mg/Kg) ou indometacina (3,58 mg/Kg) conjuntamente com EE <i>C. echinata</i> (25mg/Kg), ou soro fisiológico (SF) induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich. * Diferença significativa em relação ao controle para um valor de $p < 0,05$	149
FIGURA 4.43 -	Peso relativo do rim em camundongos pré-tratados com dexametazona (3,93 mg/Kg) ou indometacina (3,58 mg/Kg) conjuntamente com EE <i>C. echinata</i> (25mg/Kg), ou soro fisiológico (SF) induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich. * Diferença significativa em relação ao controle para um valor de $p < 0,05$	150
FIGURA 4.44 -	Peso relativo do baço em camundongos pré-tratados com dexametazona (3,93 mg/Kg) ou indometacina (3,58 mg/Kg) conjuntamente com EE <i>C. echinata</i> (25mg/Kg), ou soro fisiológico (SF) induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich. * Diferença significativa em relação ao controle para um valor de $p < 0,05$	151
FIGURA 4.45 -	Densidade do tumor de Ehrlich ao final de 23 dias, em camundongos sob diferentes condições de tratamento: Dexametasona (3,93 mg/Kg) ou indometacina (3,58 mg/Kg) conjuntamente com EE <i>C. echinata</i> (25mg/Kg), ou soro fisiológico (SF). * Diferença significativa em relação ao grupo controle para um valor de $p < 0,05$	153

LISTA DE GRÁFICOS148

RESULTADOS E DISCUSSÃO

GRÁFICO 4.1 – Inibição do radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) pelo extrato etanólico de <i>Caesalpinia echinata</i> . Valores significativos \pm S.D. (n= 3).....	106
GRÁFICO 4.2 – Inibição do radical NO pelo extrato etanólico de <i>Caesalpinia echinata</i> . Valores significativos \pm S.D. (n= 3)...	108
GRÁFICO 4.3- Viabilidade da cultura de células VERO submetidas às diferentes concentrações do extrato etanólico de <i>Caesalpinia echinata</i>	111

LISTA DE TABELAS

RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 4.1 -	Peso corpóreo de ratos machos (g), tratados com diferentes doses de EE de <i>C. echinata</i> por 28 dias consecutivos.....	77
TABELA 4.2 -	Parâmetros de regressão das linhas de tendência que descrevem a variação de peso corpóreo em ratos machos sob diferentes condições de tratamento com EE <i>C. echinata</i>	78
TABELA 4.3 -	Peso corpóreo de ratas adultas (g), tratadas com diferentes doses de EE de <i>C. echinata</i> por 28 dias consecutivos.....	80
TABELA 4.4 -	Parâmetros de regressão das linhas de tendência que descrevem a variação de peso corpóreo em ratas sob diferentes condições de tratamento com EE <i>C. echinata</i>	81
TABELA 4.5 -	Variação temporal da diferença de peso corpóreo de ratos machos (g), tratados com diferentes doses de EE de <i>C. echinata</i> por 28 dias consecutivos.....	84
TABELA 4.6 -	Parâmetros de regressão das linhas de tendência que descrevem a variação da diferença de peso corpóreo em ratos sob diferentes condições de tratamento com EE <i>C. echinata</i>	86
TABELA 4.7 -	Variação temporal da diferença de peso corpóreo de ratas (g), tratadas com diferentes doses de EE de <i>C. echinata</i> por 28 dias consecutivos.....	86
TABELA 4.8. -	Parâmetros de regressão das linhas de tendência que descrevem a variação da diferença de peso corpóreo em ratas sob diferentes condições de tratamento com EE <i>C. echinata</i>	87
TABELA 4.9 -	Parâmetros de derivação das expressões matemáticas que descrevem as linhas de tendência da variação temporal da diferença de peso corpóreo em ratos e ratas submetidos a diferentes tipos de tratamentos com EE <i>C. echinata</i>	88
TABELA 4.10 -	Consumo médio de água e alimento, e peso corpóreo em ratos e ratas submetidos a diferentes tipos de tratamentos com EE <i>C. echinata</i> por 28 dias.....	90
TABELA 4.11 -	Relação entre consumo de água e alimento em ratos adultos (mL/g), tratados com diferentes doses de EE de <i>C. echinata</i> por 28 dias consecutivos.....	94

TABELA 4.12 -	Relação entre consumo de água e alimento em ratas adultas (mL/g), tratadas com diferentes doses de EE de <i>C. echinata</i> por 28 dias consecutivos.....	94
TABELA 4.13 -	Parâmetros de regressão das expressões matemáticas que descrevem as linhas de tendência da variação temporal da razão entre consumo de água/alimento em ratos e ratas submetidos a diferentes tipos de tratamentos com EE <i>C. echinata</i> ...	97
TABELA 4.14 -	Parâmetros hematológicos (Média e Desvio Padrão), em ratos tratados com EE de <i>C. echinata</i> , por 28 dias.....	98
TABELA 4.15 -	Parâmetros hematológicos (Média e Desvio Padrão), em ratos tratados com EE de <i>C. echinata</i> , por 28 dias. WBC e PLT.....	99
TABELA 4.16 -	Parâmetros hematológicos (Média e Desvio Padrão), em ratas tratadas com EE de <i>C. echinata</i> , por 28 dias.....	99
TABELA 4.17 -	Parâmetros hematológicos (Média e Desvio Padrão), em ratas tratadas com EE de <i>C. echinata</i> , por 28 dias. WBC e PLT.....	99
TABELA 4.18 -	Parâmetros hematológicos: Relação entre os valores de ratas/ratos tratados com diferentes doses de EE de <i>C. echinata</i> , ao longo de 28 dias.....	100
TABELA 4.19 -	Parâmetros séricos bioquímicos (Média e Desvio Padrão), em ratos machos tratados com diferentes doses de EE de <i>C. echinata</i> , em 28 dias.....	102
TABELA 4.20 -	As transaminases (Média e Desvio Padrão), em ratos machos tratados com diferentes doses de EE de <i>C. echinata</i> , em 28 dias.....	102
TABELA 4.21 -	Parâmetros séricos bioquímicos (Média e Desvio Padrão), em ratas tratadas com diferentes doses de EE de <i>C. echinata</i> , em 28 dias.....	102
TABELA 4.22 -	As transaminases (Média e Desvio Padrão), em ratas tratadas com diferentes doses de EE de <i>C. echinata</i> , em 28 dias.....	103
TABELA 4.23 -	Parâmetros bioquímicos: Relação entre os valores de ratas/ratos tratados com diferentes doses de EE de <i>C. echinata</i> , ao longo de 28 dias.....	103
TABELA 4.24 -	Valores de IC ₅₀ concentração que inibe 50% do radical em questão em µg/mL, utilizado nos métodos de sequestro do radical DPPH e Óxido nítrico (NO), comparando os resultados com o padrão Ácido gálico.	106
TABELA 4.25 -	Número de camundongos que desenvolveram tumor de Ehrlich após administração de células ascíticas do	

	tumor de Ehrlich tratadas por 1 hora com diferentes concentrações de EE <i>C. echinata</i> e Metotrexato – MTX.....	113
TABELA 4.26 -	Variação do peso corpóreo (g) em função do tempo (Dias) em camundongos que receberam suspensão de células o carcinoma de Ehrlich sob diferentes condições de tratamento com EE de <i>C. echinata</i> e Metotrexato – MTX.....	114
TABELA 4.27 -	Parâmetros de regressão das funções matemáticas que descrevem a variação temporal de peso corpóreo em camundongos sob diferentes condições de tratamento com EE de <i>C. echinata</i> + Metotrexato – MTX.....	119
TABELA 4.28 -	Volume (mm ³), massa (g) e densidade (g/mm ³) do tumor de Ehrlich em 23 dias após a inoculação de células ascíticas tratadas com diferentes concentrações de EE <i>C. echinata</i> e Metotrexato – MTX.....	120
TABELA 4.29 -	Volume do tumor de Ehrlich após 23 dias de inoculação e percentual de inibição tumoral, em camundongos que receberam células ascíticas prétratadas com diferentes concentrações de EE <i>C. echinata</i> e Metotrexato – MTX.....	120
TABELA 4.30 -	Parâmetros de regressão das funções matemáticas que descrevem a variação temporal do volume do tumor de Ehrlich em camundongos do grupo controle, que receberam células ascíticas tratadas com propilenoglicol em solução salina por uma hora antes da inoculação nos animais.....	123
TABELA 4.31 -	Parâmetros de regressão das funções matemáticas que descrevem a variação temporal do volume do tumor de Ehrlich em camundongos do grupo controle que receberam células ascíticas tratadas com 0,5mg/mL de Metotrexato – MTX por uma hora, antes da inoculação nos animais.....	124
TABELA 4.32 -	Parâmetros de regressão das funções matemáticas que descrevem a variação temporal do volume do tumor de Ehrlich em camundongos do grupo controle que rarcinomaeceram células ascíticas tratadas com 12,5mg/mL de EE de <i>C. echinata</i> por uma hora, antes da inoculação nos animais.....	125
TABELA 4.33 -	Parâmetros de regressão das funções matemáticas que descrevem a variação temporal do volume do tumor de Ehrlich em camundongos do grupo controle que receberam suspensão de células do carcinoma de Ehrlich tratadas com 6,25 mg/mL de EE de <i>C. echinata</i>	

	por uma hora antes da inoculação nos animais.....	126
TABELA 4.34 -	Coeficientes angulares (a) das funções matemáticas que descrevem a variação temporal do volume do tumor de Ehrlich em camundongos inoculados com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich tratadas com diferentes concentrações de EE de <i>C. echinata</i> ou Metotrexato – MTX por uma hora antes da inoculação nos animais.....	127
TABELA 4.35 -	Peso relativo dos órgãos (g/g de peso corpóreo), de camundongos que receberam suspensão de células do carcinoma de Ehrlich tratadas com diferentes concentrações de EE <i>C. echinata</i> e Metotrexato – MTX.....	129
TABELA 4.36 -	Parâmetros hematológicos, de camundongos que receberam suspensão de células do carcinoma de Ehrlich tratadas com diferentes concentrações de EE <i>C. echinata</i> e Metotrexato – MTX.....	132
TABELA 4.37 -	Parâmetros hematológicos, de camundongos que receberam suspensão de células do carcinoma de Ehrlich tratadas com diferentes concentrações de EE <i>C. echinata</i> e Metotrexato – MTX.....	132
TABELA 4.38 -	Parâmetros bioquímicos, de camundongos que receberam suspensão de células do carcinoma de Ehrlich tratadas com diferentes concentrações de EE de <i>C. echinata</i> e Metotrexato – MTX.....	132
TABELA 4.39 -	Parâmetros bioquímicos, de camundongos que receberam suspensão de células do carcinoma de Ehrlich tratadas com diferentes concentrações de EE de <i>C. echinata</i> e Metotrexato – MTX.....	132
TABELA 4.40 -	Parâmetros bioquímicos, de camundongos que receberam suspensão de células do carcinoma de Ehrlich tratadas com diferentes concentrações de EE de <i>C. echinata</i> e Metotrexato – MTX.....	135
TABELA 4.41 -	Parâmetros bioquímicos, de camundongos que receberam suspensão de células do carcinoma de Ehrlich tratadas com diferentes concentrações de EE de <i>C. echinata</i> e Metotrexato – MTX.....	135
TABELA 4.42 -	Media de peso corpóreo (g) ao longo do tempo, de camundongos pré-tratados com dexametasona (3,93 mg/Kg) e indometacina (3,58 mg/Kg) conjuntamente com EE de <i>C. echinata</i> (25mg/Kg), induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.....	136
TABELA 4.43 -	Parâmetros de regressão das funções matemáticas que descrevem a variação temporal do peso corpóreo	

	(g), em camundongos pré-tratados com dexametazona (3,93 mg/Kg) ou indometacina (3,58 mg/Kg) conjuntamente com EE <i>C. echinata</i> (25mg/Kg), ou soro fisiológico (SF), induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.....	137
TABELA 4.44 -	Variação temporal do volume do tumor (mm ³) em camundongos do grupo controle, induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.....	138
TABELA 4.45 -	Parâmetros de regressão das funções matemáticas que descrevem a variação temporal do volume do tumor (mm ³) em camundongos do grupo controle, induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.....	139
TABELA 4.46 -	Variação temporal do volume do tumor (mm ³) em camundongos que recebia tratamento com DEXA (3,93 mg/Kg) + EE <i>C. echinata</i> (25 mg/Kg), e posteriormente induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.....	140
TABELA 4.47 -	Parâmetros de regressão das funções matemáticas que descrevem a variação temporal do volume do tumor (mm ³) em camundongos tratados com DEXA (3,93 mg/Kg) + EE <i>C. echinata</i> (25 mg/Kg), induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.....	141
TABELA 4.48 -	Variação temporal do volume do tumor (mm ³) em camundongos que recebia tratamento com INDO (3,58 mg/Kg) +EE <i>C. echinata</i> (25 mg/Kg), e posteriormente induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.....	142
TABELA 4.49 -	Parâmetros de regressão das funções matemáticas que descrevem a variação temporal do volume do tumor (mm ³) em camundongos tratados com INDO (3,58 mg/Kg) + EE <i>C. echinata</i> (25 mg/Kg), induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.....	144
TABELA 4.50 -	Variação temporal do volume do tumor (mm ³) em camundongos que recebia tratamento com solução fisiológica (SF) +EE <i>C. echinata</i> (25 mg/Kg), e posteriormente induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.....	144
TABELA 4.51 -	Parâmetros de regressão das funções matemáticas que descrevem a variação temporal do volume do tumor (mm ³) em camundongos tratados com soro fisiológico (SF) + EE <i>C. echinata</i> (25 mg/Kg), induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.....	145
TABELA 4.52 -	Peso relativo (g/g de peso corpóreo) dos órgãos de camundongos pré-tratados com dexametazona (3,93 mg/Kg) ou indometacina (3,58 mg/Kg) conjuntamente	

	com EE <i>C. echinata</i> (25mg/Kg), ou soro fisiológico (SF) induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.	147
TABELA 4.53 -	Peso (g) e densidade (g/mm ³) do tumor em 8 dias, de camundongos pré-tratados com dexametazona (3,93 mg/Kg) ou indometacina (3,58 mg/Kg) conjuntamente com EE <i>C. echinata</i> (25mg/Kg), ou soro fisiológico (SF) induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.....	152

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	-	Ácido Araquidônico
ADV-8	-	Adenovírus
AINES	-	Antiinflamatórios não esteroidais
ALT	-	Alanina amino transferase
Ang	-	Angiopietina
ANOVA	-	Análise de variância
AST	-	Aspartato amino transferase
bFGF	-	Fator de crescimento fibroblástico básico
BHA	-	Butil-hidroxianisol
BHT	-	Hidroxitolueno
BrCCl3	-	Tetracloroeto de Bromo.
BSA	-	Albumina sérica bovina
CAT	-	Catalase
CA4	-	Combretastatina A-4 fosfato
CCDA	-	Cromatografia de Camada delgada Analítica.
CCEA	-	Comitê de Ética em Experimentação Animal.
CE	-	Carcinoma de Ehrlich
CHCM	-	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CL₅₀	-	Concentração letal 50%
COX	-	Ciclooxigenases
COX₁	-	Ciclooxigenases 1
COX₂	-	Ciclooxigenases 2
DEXA	-	Dexametasona
DL₅₀	-	Dose letal 50%
EBV	-	Epstein-Barr
EE	-	Extrato Etanólico
EEB	-	Extrato Etanólico Bruto
EMCb	-	Extrato Metanólico de <i>C. bonducella</i>
EECe	-	Extrato Etanólico de <i>C. echinata</i>
ER	-	Espécies reativas
ERN	-	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	-	Espécies reativas de oxigênio
GPx	-	Glutationa peroxidase

GSH	-	Glutationa
HBV	-	Hepatite B
HCM	-	Hemoglobina corpuscular média
HPV	-	Papilomavírus humano
HSV	-	Herpesvírus
HTLV 1	-	Retrovírus
IACR	-	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
IFNs	-	Interferons
IL	-	Interleucinas
IM	-	Intramuscular
INCA	-	Instituto Nacional do Câncer
INDO	-	Indometacina
LIPOX	-	Lipoxigenases
L-NAME	-	N ^G -nitro-L-arginina metil éster
LT	-	Leucotrienos
MMPs	-	Metaloproteinases de matriz
MRSA	-	<i>Staphylococcus aureus</i> metilicina-resistentes
MTT	-	Sal de tetrazólio [3-(4,5- dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil brometo de tetrazolium
MTX	-	Metotrexato
NCI	-	Instituto Nacional do Câncer
NO	-	Óxido nítrico
OD	-	Densidade óptica
OMS	-	Organização Mundial da Saúde
PG	-	Propil Galato
PDGF	-	Fator de crescimento derivado de plaqueta
PGs	-	Prostaglandinas
PLA₂	-	Fosfolipases A ₂
PLGF	-	Fator de crescimento placentário -
PXD	-	Fenoxodiol
SNC	-	Sistema Nervoso Central
SOD	-	Superóxido dismutase
t-BHP	-	Terc-butil-hidroperóxido
TBHQ	-	Terc-butilhidroquinona
TNF-α	-	Fator de necrose tumoral α

TSPs	-	Trombospondinas
TSTA	-	Antígenos de transplante específicos de tumor
TXA	-	Tromboxanos
VASH1	-	Vasoibina 1
VCM	-	Volume corpuscular médio
VEGF	-	Fator de crescimento do endotélio vascular
VIP	-	Via Intraperitoneal
VO	-	Via Oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	32
2 REVISÃO DA LITERATURA	36
2.1 Estudos sobre <i>Caesalpinia echinata</i> Lam.....	36
2.1.1 Aspectos Históricos.....	36
2.1.2 Aspectos Botânicos.....	37
2.1.3 Aspectos Fitoquímicos	39
2.1.4 Aspectos Farmacológicos	40
2.1.5 Aspectos Toxicológicos.....	44
2.2 Estudos toxicológicos pré-clínicos de plantas medicinais.....	44
2.3 Produtos Naturais e a Terapia Anticâncer	46
2.4 Câncer	49
2.4.1 Influência da cascata inflamatória na carcinogênese.....	52
2.5. Angiogênese.....	54
2.6 Radicais livres e Antioxidantes naturais.....	58
3.0 METODOLOGIA	64
3.1. Extrato etanólico de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam	64
3.2 Estudo da Toxicidade subcrônica	64
3.2.1 Animais	64
3.2.2. Tratamento dos animais.....	65
3.2.3 Parâmetros Bioquímicos	65
3.2.4 Parâmetros Hematológicos	65
3.2.5 Análise histopatológica.....	66
3.2.6. Análise Estatística	66
3.3. Atividade antioxidante do radical livre DPPH.....	66
3.4. Análise do sequestro do óxido nítrico (NO) in vitro	67
3.5 Atividade Antiangiogênica.....	68
3.5.1 Animais	68

3.5.2 Tratamento dos animais.....	68
3.6. Teste MTT	69
3.7. Efeito protetor contra os danos causados pelo peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂)	70
3.8. Atividade de inibição tumoral.....	70
3.8.1. Linhagem tumoral.....	70
3.8.2 Contagem e viabilidade das células tumorais	71
3.8.3 Tratamento das células	72
3.8.4 Avaliação <i>in vivo</i>	73
3.8.4.1 Animais	73
3.8.4.2 Inoculação das células tumorais	73
3.8.4.3 Acompanhamento dos animais	73
3.8.4.4 Parâmetros Hematológicos	74
3.8.4.5 Parâmetros Bioquímicos	74
3.8.4.6 Análise morfológica macroscópica	74
3.9 Avaliação da influência da cascata do ácido araquidônico na atividade antitumoral do extrato etanólico de <i>C. echinata</i>	75
3.9.1 Acompanhamento dos animais	75
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
4.1 Estudo da Toxicidade subcrônica	77
4.1.1 Variação de peso corpóreo em machos e fêmeas de ratos Wistar tratados com diferentes doses de EE de <i>C. echinata</i>	77
4.2 Atividade antioxidante do radical livre DPPH.....	105
4.3. Análise do sequestro do óxido nítrico (NO) in vitro.	107
4.4 Atividade Antiangiogênica.....	109
4.5 Teste MTT	111
4.6 Efeito protetor contra os danos causados pelo peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂)	112
4.7 Atividade de inibição tumoral	112

4.7.1 Inoculação de células ascíticas do tumor de Ehrlich pré-tratadas com diferentes concentrações de EE de <i>C echinata</i>	112
4.7.2 Efeitos do EE <i>C. echinata</i> sobre o crescimento tumoral em animais pré-tratados com inibidores da cascata do ácido araquidônico.....	135
5 CONCLUSÃO	155
REFERÊNCIAS	158
APENDICE A – Achados histopatológicos dos órgãos de animais (ratos machos e fêmeas) tratados com extrato etanólico de <i>Caesalpinia echinata</i> em diferentes doses durante 28 dias.....	176
APENDICE B - Análise histopatológica dos animais submetidos ao teste de avaliação da Atividade tumoricida de <i>C. echinata</i>	178
APENDICE C - Análise histopatológica dos animais submetidos ao teste para avaliação do efeito do EE <i>C. echinata</i> sobre o crescimento tumoral em animais pré-tratados com inibidores da cascata do ácido araquidônico.	180
APENDICE D – Artigo publicado no <i>Journal of Cancer</i> vol. 5, nº 2, p. 143-150, 2014.	182



1. Introdução

1 INTRODUÇÃO

Estimativas apresentadas pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IACR) apontaram uma incidência de 14,1 milhões novos casos de câncer e 8,2 milhões de mortes relacionadas a doença no ano de 2012, em todo o mundo (IACR, 2013).

As projeções da IACR, baseadas no projeto GLOBOCAN 2012, estimam um aumento de 19,3 milhões novos casos por ano até 2025, devido ao crescimento e envelhecimento da população mundial. No Brasil, as estimativas para 2012, válidas também para 2013, calcularam a ocorrência de 518.510 casos novos de câncer (BRASIL, 2009; INCA, 2011).

Dado o impacto para a população, é de fundamental importância que mais recursos sejam direcionados a fim de fortalecer as medidas de prevenção e controle desta doença. As principais linhas de combate ao avanço da incidência de câncer são: fornecer à população melhor compreensão sobre a doença e seus determinantes; métodos diagnósticos mais precisos, facilitar a detecção da patologia em estágio inicial; e, novas formas de tratamento, mais eficazes e menos agressivos (INCA, 2008).

A busca por novas formas de tratamento ainda encontra nos produtos de origem natural sua maior fonte de moléculas bioativas. Chin et al. (2006) relatam que, entre os anos de 1981 e 2002, os produtos naturais ou drogas derivadas de produtos naturais representaram 28% das novas drogas lançadas no mercado. Além disso, dentre os novos produtos sintéticos lançados, 24% se tratam de estruturas análogas a moléculas naturais. Dentre os fármacos aplicados no tratamento do câncer, 60% das novas drogas são de origem natural (COSTA-LOTUFO et al., 2010; GULLO et al., 2006).

Segundo Gräfe (1999) as fontes de metabólitos secundários encontradas na natureza parecem ser inesgotáveis em relação às possibilidades de se encontrar novas e diferentes estruturas de extrema importância para a química medicinal.

Não obstante cerca de 140 mil metabólitos intermediários, oriundos, sobretudo de plantas superiores e de microrganismos, já estarem isolados e caracterizados, os mesmos ainda não foram avaliados biologicamente (CALIXTO, 2003). Nesse contexto, a avaliação do potencial toxicológico e farmacológico das plantas medicinais e de seus metabólitos secundários mostra-se de fundamental

importância para obtenção de novos fármacos que apresentem eficácia associada a uma margem de segurança satisfatória.

O Brasil possui um dos maiores potenciais para descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos, porquanto é detentor de uma das maiores biodiversidades do planeta, aqui se encontra cerca de 20% do número total de espécies do mundo. Além de possuir diversidade de fauna e flora, o país ainda detém ampla sociodiversidade, e grande conhecimento tradicional vinculado ao uso de plantas medicinais, além de possuir tecnologia para validar cientificamente este conhecimento (BRASIL, 2009; CALIXTO; SIQUEIRA JR, 2008).

Dentre as inúmeras espécies da flora brasileira, uma em especial, nos chamou a atenção, trata-se de *Caesalpinia echinata*, conhecida popularmente como Pau-brasil, árvore símbolo de nosso país. No passado, *C. echinata*, foi alvo de intensa exploração pelos colonizadores, que buscavam um corante vermelho extraído de seu cerne. Além de sua importância econômica, esta espécie também foi popularmente empregada na medicina popular como adstringente, cicatrizante, odontoanalgésico e tônico, sendo a casca do caule também utilizada no tratamento de diarreias, disenterias e no fortalecimento das gengivas (RAMALHO, 1978; XAVIER; RAMOS, XAVIER, 1995; SILVA, 2001).

Apesar de ser um vegetal bastante conhecido no Brasil, do ponto de vista histórico, econômico e botânico, nos deparamos com uma completa escassez de pesquisas que avaliassem suas propriedades farmacológicas. Através de uma revisão da literatura detalhada, evidenciamos que a substância corante encontrada no seu cerne (brasilina/brasileína), encontrada também na madeira de outras espécies do gênero *Caesalpinia*, como a *C. sappan*, foram assinaladas por possuírem grande potencial farmacológico (ZANIN et al., 2012). Em um ensaio preliminar, foi verificado que o extrato deste vegetal apresentava atividade anticancerígena, e a partir deste ensaio inicial foram realizados inúmeros protocolos de pesquisa os quais evidenciaram que *C. echinata* apresenta baixa toxicidade, marcante atividade antitumoral e anti-inflamatória (SILVA, 2006a). Entretanto, o conhecimento acerca de como este extrato vegetal atua no organismo ainda se mostrava insuficiente.

Dentro deste contexto, julgamos imprescindível a realização de estudos mais abrangentes acerca do modo de ação do extrato de *C. echinata*. O presente trabalho foi desenvolvido com o propósito de esclarecer uma série de indagações acerca da

sua ação no organismo. O primeiro questionamento a ser respondido referiu-se a segurança do uso da droga vegetal quando utilizado em doses repetidas, e como um organismo vivo se comportaria diante de uma exposição prolongada ao vegetal. Para avaliar este parâmetro foi realizado um teste de toxicidade oral pré-clínica após doses repetidas durante 28 dias.

Subsequentemente, investigamos algumas hipóteses na tentativa de elucidar o mecanismo através do qual o extrato reduz o desenvolvimento tumoral. Inicialmente verificamos a sua capacidade em inibir o processo de angiogênese, através de um modelo de angiogênese inflamatória provocada pela cauterização pontual da córnea de rato com NaOH (1M). Em seguida avaliamos a capacidade do extrato de induzir a morte das células tumorais por meio de testes de citotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, e por fim avaliamos se um bloqueio na cascata do ácido araquidônico, através da inibição da atividade da ciclooxigenase (COX) e da fosfolipase A₂ (PLA₂), influenciaria a capacidade da droga vegetal em inibir o crescimento do tumor.



2. Revisão da literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estudos sobre *Caesalpinia echinata* Lam.

2.1.1 Aspectos Históricos

Caesalpinia echinata Lam. é uma espécie arbórea nativa da Mata Atlântica brasileira, ocorrendo desde o Rio de Janeiro, até o estado do Rio Grande do Norte. Desde dezembro de 1978, conforme a Lei 6.607, esta espécie é reconhecida como árvore nacional, devido à importância histórica que representa para nação (BRASIL, 1978; CARVALHO, 1994).

Sua denominação botânica foi derivada do latim e trata-se de uma homenagem a um grande médico e botânico do século XVI – Andréa Cesalpino. A palavra “echinata” é a forma latina do adjetivo “equinado”, que nada mais quer dizer do que “vegetal cheio de espinhos” (FONTES, 1995).

No Brasil, a planta é conhecida popularmente como pau-brasil, ibirapitanga, ibirapiranga, ibirapita, muirapiranga, orabutã, brasileto, paurosado e pau-de-pernambuco (LORENZI, 1992; REZENDE et al., 2004).

O nome brasilium ou brasyll foi a denominação empregada para um tipo de corante vermelho-púrpura brilhante, extraído de uma espécie arbórea asiática, *Caesalpinia sappan* (DEPHILIPS, 1998; MANHITA et al., 2012), este corante, extraído durante a idade média foi considerado exótico e muito caro, e seu transporte da Ásia para Europa muito difícil (ARMSTRONG, 1994). A descoberta da nova espécie de madeira vermelha na América do Sul, “árvore brasiliana”, provocou uma intensa exploração, e entre os anos de 1501 e 1652 as florestas brasileiras foram devastadas, acabando por levar a espécie para lista de plantas sob alto risco de extinção (D’AGOSTINI et al., 2013; BRASIL, 1992).

Já no mercado europeu sua madeira de grande resistência foi utilizada na construção de móveis e de navios (FAUSTO, 2002), e na produção de arcos para instrumentos de corda (RIZZINI, 1971), porém, sua principal utilidade foi, sem dúvida, na fabricação de tinta de escrever e para tingimento de tecidos (MANHITA et al., 2012; D’AGOSTINI et al., 2013).

Esta coloração deve-se a brasilina (Figura 2.1.A) o precursor do verdadeiro pigmento de coloração vermelha, conhecido como brasileína (Figura 2.1.B), obtido após a oxidação da brasilina (REZENDE et al., 2004).

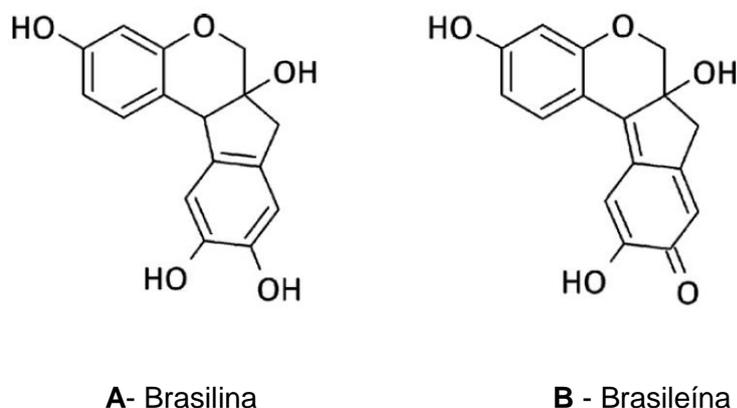


FIGURA 2.1 – Formula estrutural da brasilina (A) e da brasileína (B). Fonte: MANHITA et al., 2012

Muitos químicos importantes se debruçaram sobre a matéria corante do lenho de *C. echinata*. Mas, coube a Robert Robinson, Prêmio Nobel de Química de 1947, o privilégio de chegar à estrutura química da substância responsável pela cor vermelha do pau-brasil (PINTO, 2002).

2.1.2 Aspectos Botânicos

A família Fabaceae, também conhecida como Leguminosae, pertence à ordem das Fabales, que contém aproximadamente 650 gêneros e cerca de 18.860 espécies, distribuídas em três famílias: Poligalaceae, Surinaceae e Fabaceae (JUDD et al., 1999; OLIVEIRA; PAIVA, 2005). Trata-se da terceira maior família das angiospermas (CHAPPILL, 1995), muitas delas possuindo importância econômica (TUCKER, 2003).

Sistematicamente, o gênero *Caesalpinia* pertence à família Fabaceae, subfamília Caesalpinioideae, tribo Caesalpineae. Este gênero consiste em uma fonte inesgotável de metabólitos bioativos dentro das mais de 500 espécies distribuídas em todo o mundo. A maior parte destas espécies é endêmica de alguma Região, como a *C. echinata* que só ocorre no Brasil ou *C. pulcherrima* nativa da América

Central, e são de grande importância devido ao seu alto interesse histórico, econômico, ecológico e biológico (ZAIA, 2004; ZANIN et al., 2012).

Do ponto de vista fitoquímico, muitas classes de compostos foram extraídas de plantas do gênero estudado, sendo os principais: flavonoides, diterpenos e esteroides. Do ponto de vista farmacológico, espécies de *Caesalpinia* exibem atividade antiulcerativa, anti-helmíntica, antibacteriana, antifúngica, antiviral, inseticida, antiinflamatória, antipirética, analgésica, antioxidante, adaptógena, antiproliferativa, anticancerígena, imunomodulatória e imunossupressora (ZANIN et al., 2012).

A espécie *C. echinata* Lam. (Figura 2.2), possui estatura que varia de mediana até 30 metros de altura; possui tronco de 40 a 70 cm de diâmetro. Sua copa é irregular; os ramos mais novos e as cascas de espécimes mais jovens são repletos de acúleos. Seu cerne muito duro e pesado varia de coloração castanha alaranjado ao vermelho escuro e foi alvo da primeira grande exploração econômica de recurso natural em território brasileiro desde a colonização portuguesa (WERNER, 2009).



FIGURA 2.2 – *Caesalpinia echinata* Lam. - vista parcial de um indivíduo adulto. Fonte: CEPLAC, 2010.

O albúrnio é amarelo-claro. Suas folhas são compostas, bipinadas, de 10 a 15 cm de comprimento (CORREA, 1984). Suas inflorescências localizam-se nos ramos terminais, com flores amarelas muito perfumadas. Seus frutos são do tipo vagem, possuindo deiscência explosiva e são totalmente recobertos por acúleos que se formam logo após a floração (CARVALHO, 1994) (Figura 2.3).

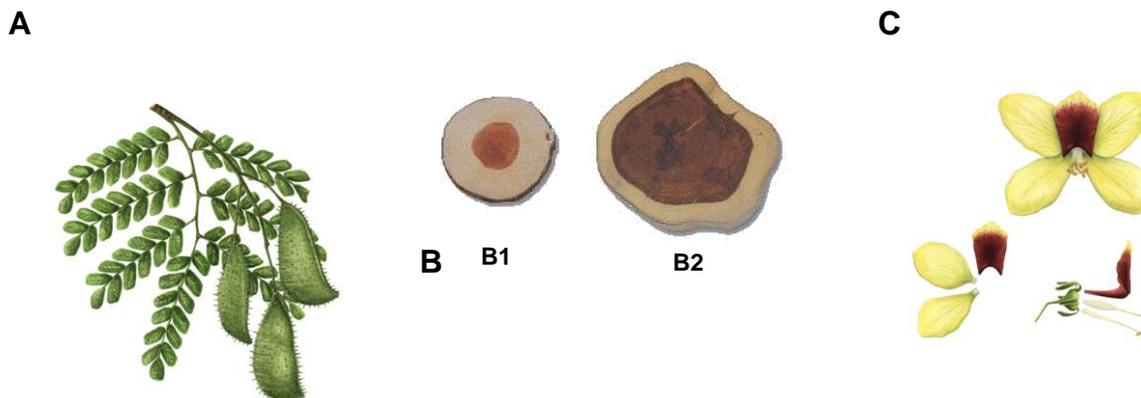


FIGURA 2.3 – *Caesalpinia echinata* Lam. **A:** detalhe de um ramo mostrando folhas e fruto. **B:** Corte transversal mostrando o cerne vermelho (B1 - aos 12 anos B2 - aos 25 anos). **C:** detalhe contendo flor em vista frontal, com sépala abaxial, que é verde e pétala adaxial, que possui uma mancha vermelha escura. Fonte: THOMAS; AMORIM, 2005.

2.1.3 Aspectos Fitoquímicos

Rezende et al. (2004) em estudo de identificação dos componentes químicos das flores e folhas do pau-brasil encontraram o *E-beta*-ocimeno como constituinte majoritário (57,2%). O segundo composto com maior área relativa foi o β -ionol. Dessa forma a classe de metabólitos melhor representada foi a dos compostos fenólicos (REZENDE et al, 2004).

Isoprenóides são frequentemente encontrados na composição do aroma floral de diversas espécies, inclusive como constituintes majoritários, este fato pode estar ligado à presença de sinalizadores químicos específicos no processo de polinização. Derivados fenólicos C6-C3 e furanoditerpenos são os metabólitos secundários mais observados em espécies do gênero *Caesalpinia* (REZENDE et al, 2004).

A análise dos componentes das sementes do pau-brasil realizada por Oliveira et al. (2002) evidenciou a presença de pelo menos dois inibidores de tripsina com massas moleculares de 19,5 e 10 kDa. A extração dos ramos do vegetal revelou a presença de um diterpeno com esqueleto labdânico, denominado ácido daniélico, esta molécula havia sido anteriormente isolada de uma espécie de *Caesalpinia* africana.

O estudo fitoquímico da casca do vegetal demonstrou elevada concentração de taninos (SILVA, 2001). A investigação do lenho demonstrou a presença de

ligninas, polímero de três álcoois: p-coumaril, siringil e sinapil. Este polímero está presente em 20-30% da parede celular da madeira e lhe confere rigidez e durabilidade, e pode ser responsável pelas propriedades vibracionais da madeira, explicando seu emprego na fabricação de arcos de violino (FUKUSHIMA; FUZETO, 2003).

Cota et al. (2011) identificaram diterpenos furânicos e butenólídeos de esqueleto cassano a partir do extrato da casca do pau-brasil.

O estudo fitoquímico realizado por Silva (2006a), com utilização do extrato metanólico (EM) do cerne de *C. echinata* Lam., apresentou cumarinas e taninos catéquicos em pequena quantidade, por outro lado, observou-se grande concentração de flavonoides. A presença de polifenóis está de acordo com os dados obtidos na literatura, que aponta os derivados fenólicos C₆-C₃ como os metabólitos mais observados em espécies do gênero *Caesalpinia* (REZENDE et al., 2004).

Oliveira et al. (2002) apontaram a brasilina e seu derivado brasileína, como constituintes majoritários do cerne de *C. echinata*. Ambas pertencem ao grupo dos homoisoflavonoides (XU; YADAN 1996), compostos tetracíclicos com dois anéis aromáticos, uma pirona, provavelmente originada da via do acetato, e um anel de cinco membros procedente da via do ácido shiquímico (OLIVEIRA et al., 2002). Homoisoflavonoides de ocorrência natural (3-benzilideno-4-cromanonas) são estruturalmente relacionados aos flavonoides, e apresentam várias atividades biológicas (YEN et al., 2010).

O grupo dos flavonoides é composta por mais de 4.000 diferentes compostos fenólicos, que apresentam uma estrutura comum caracterizada por dois anéis aromáticos e um heterociclo oxigenado. Os flavonoides existem naturalmente numa grande variedade de alimentos de origem vegetal, abundante no grupo das angiospermas, fazendo parte integral da dieta humana (YUNES; CALIXTO, 2001). Esta classe de metabólito secundário é conhecida por possuir várias atividades biológicas, incluindo ação antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória e anticancerígena (KIM et al., 1999; MATSUDA et al., 2003; SRINIVAS et al., 2003).

2.1.4 Aspectos Farmacológicos

Alguns dados da literatura relatam que a planta possui propriedades medicinais, sendo popularmente empregadas como adstringente, cicatrizante, odontoanalgésico e tônico, a casca do caule é também utilizada no tratamento de diarreias, disenterias e no fortalecimento das gengivas (RAMALHO, 1978; SILVA, 2001; XAVIER; RAMOS; XAVIER, 1995).

Freire (2004) avaliou a capacidade antitumoral e antimicrobiana do extrato do cerne de *C. echinata*, e verificou que o mesmo foi capaz de inibir o desenvolvimento do câncer em 75,37% dos camundongos portadores de sarcoma 180. Bem como impediu o desenvolvimento de microrganismos patogênicos, tais como: *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris* e *B. cereus*.

A espécie também apresentou potencial antifúngico, o extrato de seus ramos reduziu o crescimento de colônias de fungos da espécie *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (SOUZA et al, 2004).

Várias outras espécies do gênero *Caesalpinia* têm sido descritas por apresentarem ações medicinais, muito embora, no Brasil seu uso não seja difundido, em outros países já se conhece há bastante tempo suas atividades e empregos no uso medicinal.

Em 2005, Rao, Shih-Hua e Yew-Min isolaram cinco novos flavonoides da *C. pulcherrima* com significativa capacidade de inibir mediadores da inflamação. Gupta et al. (2003) demonstraram que o extrato metanólico das folhas da *C. bonducella* (EMCb) possui atividades anti-inflamatória, analgésica e antipirética. Um ano depois foi apontado o potencial antitumoral do mesmo extrato (EMCb) contra o carcinoma ascítico de Ehrlich em camundongos albinos Swiss, também demonstrando seu potencial como antioxidante (GUPTA, et al., 2004).

A comunidade chinesa, conhecida pela sua medicina milenar, relata a espécie *C. sappan* por possuir atividade antioxidante (PAN YINGMING, et al., 2004), além disso, foi utilizada como agente anti-inflamatório (HIKINO, et al., 1977), hipocolestêmico (SAITOH et al, 1986) imunomodulatório (CHOI; MOON, 1977).

Kim et al (2004) e Pu et al (2013) avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato do lenho da *C. sappan* contra cepas isoladas de *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes (MRSA) obtendo inibição do crescimento bacteriano.

Chiang et al. (2003) revelaram que diferentes partes da *C. pulcherrima* apresentam forte atividade contra o adenovírus (ADV-8) e herpesvírus (HSV).

Carvalho et al. (1996) analisando o extrato do fruto de *Caesalpinia ferrea*, comprovaram que ele possui atividade analgésica e anti-inflamatória. Esta espécie também agiu como regulador positivo da hematopoiese foi o que apontou os estudos realizados por Queiroz et al. em 2001.

Nakamura et al (2002), isolaram o ácido gálico e metil galato, extraídos do fruto de *C. ferrea*, os cnstituintes demonstraram possuir ação quimiopreventiva do câncer ao inibir a ativação do vírus Epstein-Barr e o desenvolvimento do carcinoma epitelial.

Grangeiro (2009) relatou que o extrato bruto das folhas de *C. echinata* apresenta significativa atividade analgésica. Contudo, o mesmo extrato não demonstrou atividade anti-inflamatória. Nesta mesma pesquisa, foi comprovado que o extrato bruto das folhas de *C. echinata* impediu o crescimento do Sarcoma 180, em 99,4%.

Segundo a investigação realizada por Silva (2006a), o extrato etanólico (EE) do cerne de *C. echinata* apresentou um expressivo potencial anti-inflamatório, inibindo o edema em 84,1%, mostrando-se superior a atividade apresentada pela indometacina (I%= 56,83%), fármaco padrão para esta atividade. Quando testado frente a duas linhagens tumorais de camundongo, o extrato etanólico bruto (EEB) de *C. echinata* inibiu em 90,40% o crescimento do carcinoma de Ehrlich e em 73,65% o crescimento do sarcoma 180.

Cota et al. (2011) em estudo preliminar sobre a atividade leishmanicida demonstraram que alguns dos diterpenos encontrados no extrato da casca do pau-brasil (*C. echinata*) foram capazes de inibir o crescimento de formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*, sem afetar as células mononucleares do sangue periférico humano. A melhor atividade leishmanicida foi observada para o extrato bruto em comparação aos compostos isolados, evidenciando que esta ação deve ser derivada de uma atuação sinérgica dos vários componentes do extrato bruto.

A brasilina [7,11b-dihydrobenz[b]indeno[1,2-d]pyran-3,6a,9,10(6h)-tetrol], isolada da *C. sappan*, e também o maior constituinte da *C. echinata* (OLIVEIRA et al., 2002), foi apontada por sua ação hipoglicemiante em animais de experimentação portadores de diabetes, efeito este decorrente do aumento no metabolismo de glicose (MOON et al, 1993).

Dentre os efeitos farmacológicos relatados para a brasilina estão: atividade antimicrobiana *in vitro* (XU; LEE, 2004), inibição da proteína quinase C e do receptor

da insulina em estômago de rato (KIM, et al., 1998); proteção da cultura de hepatócitos, da toxicidade induzida por BrCCl_3 (MOON et al., 1992).

Xie et al. (2000) demonstraram que a vasodilatação induzida pela brasilina poderia ser inibida pela N^G -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), sugerindo que o mecanismo de ação pelo qual o composto causa o relaxamento dos vasos pode ser endotélio-dependente. Três anos após este o estudo, Hu, et al. (2003) ratificaram o mecanismo de ação proposto.

A brasilina também pode ser muito eficaz no tratamento de danos provocados pelo stress oxidativo. Choi et al. (2007) relataram que a brasilina foi capaz de proteger a morte celular induzida pelo terc-butil-hidroperóxido (t-BHP), em células HEI-OC1.

Para os efeitos biológicos da brasileína (6a, 7-dihydro-3,6a, 10-trihydroxy-benz[b]indeno[1,2-d]pyran-9(6H)-one), produto de oxidação da brasilina, Yan et al. (2005) reportaram que a mesma exibiu uma ação inotrópica positiva em tecido cardíaco isolado, inibindo a atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase *in vitro*, além de ter apresentado atividade antioxidante tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

Zhao et al. (2006), baseados em sua pesquisa onde perceberam que o eletrocardiograma dos animais tratados com a substância não evidenciava arritmias ventriculares, efeito comum do deslanosídeo. Desta forma, propuseram que a brasileína apresentava um menor efeito adverso e um índice terapêutico mais elevado, quando comparado aos glicosídeos cardíacos. Por conseguinte, a brasileína, uma molécula com esqueleto não-esteroidal, produziu aumento da contração do músculo cardíaco, através da inibição da Na^+, K^+ -ATPase, servindo como paradigma para o desenvolvimento de novas drogas.

Além destes efeitos, a molécula constitui um importante imunossupressor, sendo modulando a resposta humoral, bem como, a resposta celular, provavelmente, através da indução da apoptose dos linfócito do timo e do baço dos camundongos, e da inibição da proliferação linfocítica (MIN YE et al, 2005).

Shen et al (2007) demonstraram em seu estudo que a brasileína pode proteger o cérebro de ratos tratados contra injúrias isquêmicas. Este fenômeno parece estar correlacionado com a capacidade da brasileína de suprimir a inflamação, por inibir a ativação de citocinas pró-inflamatórias.

Além de seu comprovado efeito anti-inflamatório, a brasileína exibiu significativa atividade citotóxica contra linhagens de células de tumorais humanas,

referentes aos seguintes tipos de câncer: fígado (HepG2 e Hep3B), mama (MDA-MB-231 e MCF-7), pulmão (A549) e gengiva (Ca9-22) (YEN et al, 2010).

2.1.5 Aspectos Toxicológicos

Desde tempos remotos as plantas vêm sendo utilizadas pela medicina popular para o tratamento de várias doenças (REBECCA et al., 2002), e ao longo deste tempo desenvolveu-se a ideia de são eficazes e seguras, isentas de efeitos colaterais, ou qualquer tipo de toxicidade. Porém a planta medicinal é um xenobiótico e, como todo corpo estranho, os produtos de sua biotransformação são potencialmente tóxicos (LAPA et al., 2004). Destarte, a ideia geral de que as drogas vegetais são seguras e livre de efeitos colaterais é falsa (DIMECH, 2003).

De fato, não há razão para crer na inocuidade dos vegetais, uma vez que desse reino são obtidas substâncias extremamente tóxicas como a estricnina, a digoxina, os curares e os heterosídeos cianogênicos (LAPA et al., 2004). Por outro lado, segundo estudos clínicos controlados, a incidência de efeitos colaterais é menor com produtos fitoterápicos do que com drogas sintéticas (DREW; MYERS, 1997).

O estudo da toxicidade aguda do extrato etanólico das folhas de *C. echinata* Lam. apresentou baixa toxicidade por via oral (GRANGEIRO, et al., 2009). Silva et al. (2006a), avaliou a toxicidade aguda do extrato bruto do cerne do vegetal, no estudo com camundongos foi observado que administração por via oral apresentou baixa toxicidade. Já administração do extrato por via intraperitoneal apresentou moderada toxicidade (DL₅₀ de 995,57 mg/kg). A. No bioensaio frente *Artemia salina* Leach. também foi observado toxicidade moderada (CL₅₀ de 705,6 µg/mL) (SILVA, et al., 2006a).

2.2 Estudos toxicológicos pré-clínicos de plantas medicinais

A toxicidade de uma substância pode ser definida como a capacidade de causar dano ou morte a um dado organismo (EATON; GILBERT, 2008).

De fato, toda substância pode ser considerada um agente tóxico, esta condição irá depender das condições nas quais ocorrerá a interação do agente químico com o organismo, tempo e frequência de exposição, dose administrada ou absorvida, e via de administração (OGA, 2008).

Como discutido anteriormente a ideia de inocuidade dos fitoterápicos é amplamente difundida, esta concepção tem resultado numa série de acidentes por intoxicação ocasionados pela ingestão de plantas como alimento ou como terapia para alguma doença. Nestes casos, a toxicidade pode ser resultante de altas doses ingeridas ou do estado de conservação das plantas e formas de uso (SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008; TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Deve-se ter em mente que uma planta medicinal ou fitoterápico não tem somente efeitos imediatos relacionados à sua ingestão, mas que estes podem se instalar a longo prazo e de forma assintomática, como os carcinogênicos (OLIVEIRA; GONÇALVES, 2006).

Os testes toxicológicos são realizados para se ter dados sobre as condições em que as moléculas químicas produzem efeitos tóxicos, qual a natureza desses efeitos e quais os níveis seguros de exposição (OGA, 2008; LOOMIS; HAYES, 1996).

Devido a questões legais e éticas os dados toxicológicos obtidos na espécie humana são muito limitados (WHO, 1993). Desse modo os testes que visam indicar o grau de segurança a ser atribuído para um medicamento devem ser efetuados em uma etapa pré-clínica, quando são utilizadas três espécies de mamíferos, uma delas não roedora (LAPA et al., 2004).

No Brasil, as plantas medicinais são utilizadas em ambas as áreas: rural e urbana. Muitas são utilizadas de acordo com a tradição popular, na forma de chás, decoctos, tinturas, etc., e menos frequentemente como cápsulas e pílulas (ARNOUS; SANTOS; BEINNE, 2005). Por considerar crítica a situação do mercado de fitoterápicos no Brasil, a Secretária Nacional de Vigilância Sanitária, em 1995, estabeleceu uma série de regras para o registro dos fitomedicamentos (Portaria nº 6 de 24.01.95, SVS-MS, Brasil, 1995a) e para regulamentar a avaliação da toxicidade destes produtos (Portaria nº 116 de 08.08.96, SVS-MS, Brasil, 1996).

Atualmente, a RDC nº 14/10 norteia os registros dos fitoterápicos no país, enquanto a Resolução nº 90/04 estabelece as regras para os ensaios de toxicidade aguda, subcrônica e crônica com medicamentos fitoterápicos. Recentemente, foi promulgado o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos que contempla todas as etapas de produção de um fitoterápico, objetivando garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, assim como o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (BRASIL, 2010b; BRASIL 2009; BRASIL, 2004).

2.3 Produtos Naturais e a Terapia Anticâncer

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, sendo responsável por 7,6 milhões de óbitos a cada ano. Segundo a estimativa da Organização mundial de Saúde (OMS), este número deverá aumentar em 45% até o ano de 2030 (IACR*b*, 2013; INCA, 2011).

Embora exista hoje um vasto arsenal terapêutico somado a novas técnicas cirúrgicas que tem aumentado a expectativa de vida dos pacientes, ainda existe a clara necessidade de continuar o desenvolvimento de novas drogas anticâncer, principalmente quando se leva em consideração a alta toxicidade destas drogas (UNNATI et al., 2013).

A fitoterapia tem desenvolvido, frequentemente, importante papel na terapia anticâncer e os mecanismos de interação entre fitocompostos e células neoplásicas vem sendo extensivamente estudado. Newman, Cragg e Snader (2003) relataram que entre os anos de 1940 e 2002, 40% das novas drogas anticancerígenas possuíam alguma relação com moléculas naturais, destas, 8% correspondem a compostos desenvolvidos a partir de modificações realizadas em produtos extraídos de vegetais.

Desde 1955 o Instituto Nacional do Câncer (NCI) dos Estados Unidos vem realizando triagens pré-clínicas, para avaliar atividade anticâncer, de compostos e materiais, que incluem extratos de origem natural. Mais de 400.000 compostos, de

origem sintética e natural foram analisados, incluindo 180.000 derivados de microorganismos e 114.000 extratos vegetais (MUKHERJEE et al., 2001).

Os agentes anticâncer em uso atualmente incluem drogas de origem microbiana como Doxorubicina, Dactomicina, Bleomicina (MUKHERJEE 2001), e um grande número de moléculas retiradas de vegetais, entre estas se encontram os alcaloides da vinca: vimblastina e vincristina, obtidos da *Catharanthus roseus*, o paclitaxel (Taxol[®]) diterpenoide retirado da *Taxus brevifolia*, o alcaloide camptotecina, da árvore ornamental chinesa *Camptotheca acuminata*, e muitos outros (MONGELLI et al, 2005).

Vincristina, vimblastina são agentes antimitóticos que atuam ligando-se às β -tubulinas inibindo a polimerização dos microtúbulos. O paclitaxel age estabilizando os microtúbulos, e, por conseguinte, inibe a despolimerização dos mesmos, causando a morte celular. Já a camptotecina atua inibindo a topoisomerase I, principalmente na etapa intermediária da clivagem (Figura 2.4) (BRANDÃO et al., 2013).

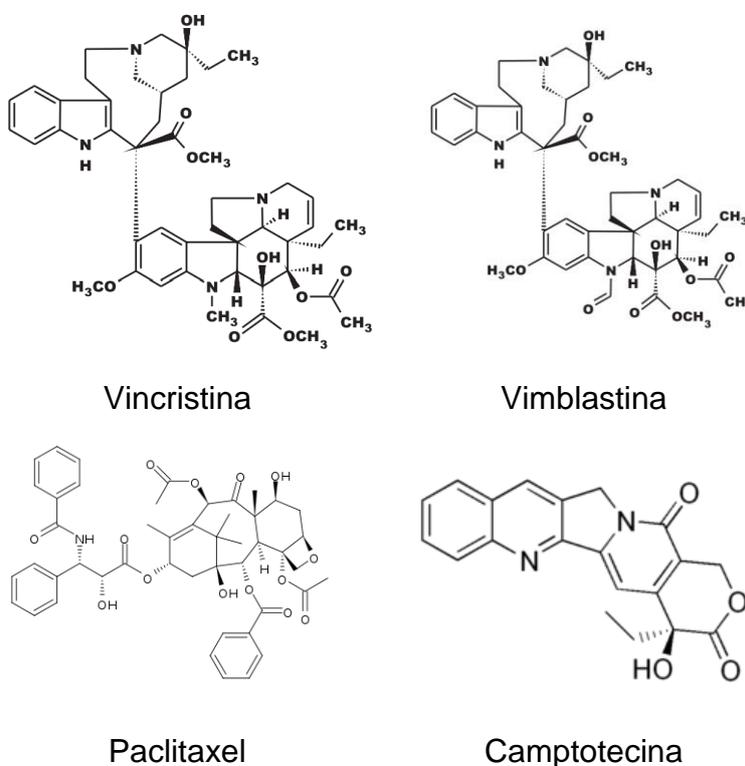


FIGURA 2.4 – Estruturas químicas de substâncias anticancerígenas derivadas de plantas (HUBER, MARUIAMA; ALMEIDA, 2010; BRANDÃO et al., 2013).

Entre os anos de 1990 e 1996, aproximadamente, vinte agentes anticancerígenos, os quais incluem produtos naturais puros ou modificações semi-sintéticas de material natural, foram aprovados para o mercado. Entre eles estão o Docetaxel/Taxotere (1995), Idarubicina (1990), Paclitaxel/Taxol (1993), Topotecan (1996), Formestano (1993), Fosfato de Fludarabina (1991), Porfimer sodium (1993), Raltitrexed (1996), muitos destes de origem vegetal (MUKHERJEE et al., 2001).

Uma grande quantidade de laboratórios internacionais se encontram engajados na tarefa de buscar novos agentes terapêuticos anticancerígenos a partir de fontes naturais. Muitas destas moléculas são encontradas em testes clínicos, tais como o flavopiridol, molécula sintética análoga a rohitukine, extraída de *Dysoxylum binectariferum* Hook. F. (Meliaceae), esta possui atividade tirosina quinase e é capaz de inibir o crescimento de linhagens tumorais malignas de mama, pulmão e fígado, e quando associado a outros agentes anticancerígenos, também mostrou-se eficaz contra linfomas, leucemias e tumores sólidos (SHOEB, 2006).

Neste contexto, a molécula hidrossolúvel combretastatina A-4 fosfato (CA4), ativa contra câncer de cólon, pulmão e leucemia, é análoga a combretastatina extraída da planta sul africana *Combretum caffrum* (Combretaceae). As combretastatinas são estilbenos com ação antiangiogênica, capazes de suprimir a neovascularização nos tumores induzindo a necrose tumoral. Fenoxodiol (PXD) é um análogo sintético da isoflavona genisteína com uma melhor eficácia anticancerígena. O desenvolvimento deste agente como um fármaco antitumoral foi baseado, em larga medida, da sua baixa toxicidade nos tecidos normais, atrelado ao potente efeito inibidor da topoisomerase-II em células de rápida divisão (GEORGAKI et al., 2009).

Também estão sendo desenvolvidas novas formulações farmacêuticas, bem como novos análogos a partir de moléculas já consagradas clinicamente, como o Rubitecano, derivado da camptotecina, potente inibidor da topoisomerase-I. O Paclitaxel poliglumex é um taxano macromolecular inovador concebido para aumentar o índice terapêutico do paclitaxel. Consiste numa macromolécula formada a partir da conjugação do paclitaxel e do ácido poli-L-glutâmico, capaz de se acumular no tecido tumoral, tirando partido da permeabilidade aumentada da vasculatura tumoral e da ausência de drenagem linfática. Deste modo a exposição do tecido tumoral à droga ativa é prolongada, enquanto os outros tecidos saudáveis do organismo tem exposição reduzida (SINGER et al., 2005; UNNATI et al., 2013).

2.4 Câncer

Câncer é a denominação genérica para neoplasias malignas, um conjunto de doenças que abrange mais de uma centena de diferentes tipos de enfermidades, e que apresentam como característica comum o surgimento de novos tecidos em determinado órgão ou região, e cujas células apresentam elevada atividade proliferativa e capacidade de invasão de outros tecidos (INCA, 2014).

Em um tecido normal existe um determinado estado de integridade volumétrica, no qual o surgimento de novas células é contrabalanceado por mecanismos biológicos que levam a sua destruição, em geral através do processo de morte celular programada, mantendo o equilíbrio da massa tecidual (PINHO, 2005a).

Deste modo, o que marca a diferença entre uma célula normal e uma célula neoplásica é a sua capacidade da célula normal em responder a estímulos inibitórios que determinam a sua saída do ciclo celular. No caso de neoplasias malignas, somado a incapacidade de responder aos estímulos inibitórios, suas células apresentam um comportamento descontrolado que é marcado por várias mutações celulares que permitem que apresentem menor integração célula-célula (redução dos mecanismos de adesividade celular), capacidade de invadir a matriz extracelular, migrar ativamente pelo estroma intersticial, alcançar os vasos sanguíneos, e manter-se viáveis na circulação, interagir e extravasar o endotélio e por fim aderir e proliferar (MELO; JUNQUEIRA; CHAMMAS, 2003; PINHO, 2005a; PONTES JUNIOR, 2009).

O processo de formação do câncer, carcinogênese, é composto por múltiplas etapas, e tem como ponto inicial uma mutação genética sofrida pela célula. Esta mutação pode surgir de modo espontâneo ou ser provocada pela ação de agentes carcinogênicos, que podem ser físicos (ex.: radiação ultravioleta e ionizante), químicos (ex.: cigarro, aflatoxinas, nitrosaminas) ou biológicos (diversos vírus já são reconhecido por sua ação oncogênica, como o Papilomavírus humano (HPV), vírus de Epstein-Barr (EBV), da hepatite B (HBV) e o retrovírus (HTLV 1) (PINHO, 2005a).

Em geral, os danos sofridos pelo DNA através da ação dos agentes carcinogênicos são reparados pelos mecanismos de defesa do organismo, caso contrário, o dano ao DNA produz uma mutação genética. A maior parte das mutações genéticas é irrelevante, levando em consideração o risco de provocar um

câncer, contudo, se esta ocorrer em genes críticos pode levar a célula à morte ou formação de um tumor (Figura 2.5). Para que a oncogênese ocorra é necessário que a mutação sofrida pela célula confira algum benefício (ex.: vantagem proliferativa) e que não seja letal (JAKÓBISIAK; LASEK; GOLAB, 2003).

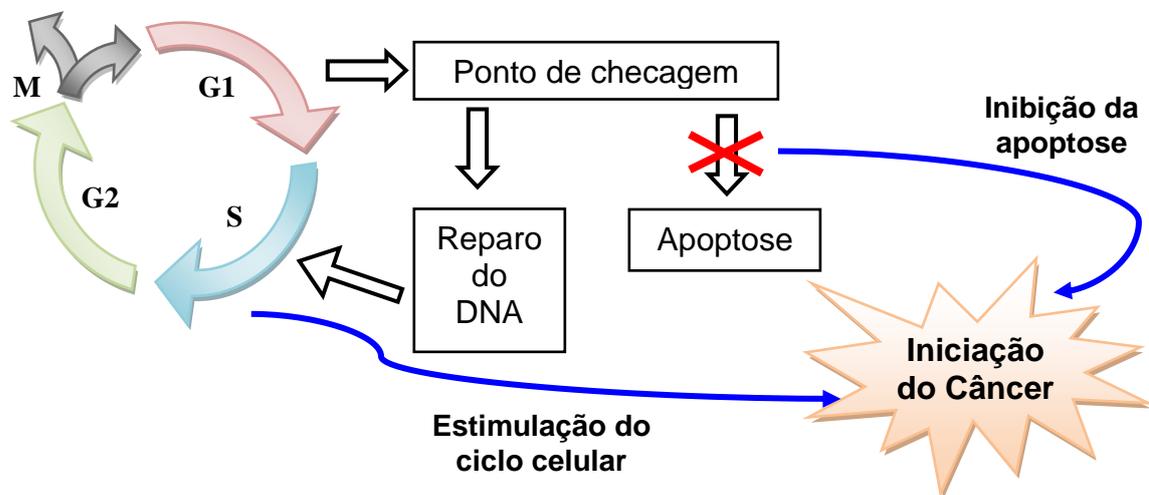


FIGURA 2.5 – Inter-relação entre anormalidades no ciclo celular e a iniciação do câncer. (Fonte: Pinho, 2005a; NEBERT, 2002).

Duas classes de genes têm papel chave no desenvolvimento do câncer: são os proto-oncogenes, responsáveis pela codificação de proteínas que controlam o crescimento celular (ex.: Gene RAS; Genes ABL / BCR; Gene MYC; Gene HER2; Gene BCL2; Genes MET e RET; Genes que codificam a telomerase); e os genes supressores de tumor, que regulam negativamente a proliferação celular (Gene p53; Gene RB1; Gene APC; Genes BRCA1 e BRCA2; Genes MMR). Quando sofrem mutação os proto-oncogenes tornam-se oncogenes e passam a expressar em excesso sua proteína estimuladora do crescimento, estimulando a multiplicação celular de modo descontrolado. Por outro lado, a inibição dos genes supressores de tumor impede que a célula disponha de mecanismos cruciais para inibição de crescimento inapropriado (Figura 2.6) (NEBERT, 2002; PINHO, 2005a; RIVOIRE et al., 2006).

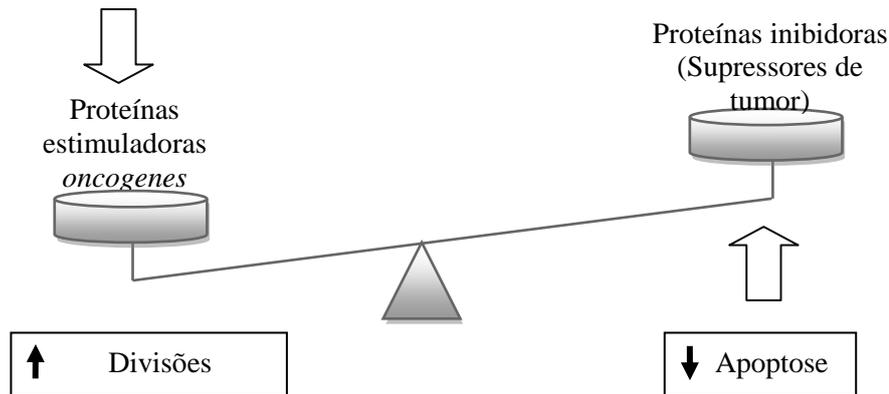


FIGURA 2.6 – Desequilíbrio observado no processo neoplásico (Fonte: Pinho, 2005a).

Uma vez instalada a mutação e iniciado o distúrbio proliferativo, o tecido neoplásico anômalo irá desencadear uma série de reações locais que irão estimular a formação de novos vasos, para suprir a necessidade nutricional exigida pelo tumor em expansão. A etapa subsequente envolve a invasão dos tecidos adjacentes e disseminação das células tumorais. Este estágio é marcado por uma série de alterações bioquímicas e estruturais do microambiente da célula tumoral. Um mecanismo muito comum na oncogênese, diz respeito às mudanças na expressão de glicoproteínas de superfície celular responsáveis por manter a adesão intercelular, especialmente as integrinas e as moléculas do complexo caderinas-cateninas. Alterações nestas moléculas diminuem a adesão entre as células e facilitam o desprendimento do tumor primário e invasão dos tecidos vizinhos (JAKÓBISIAK; LASEK; GOLAB, 2003; PONTES JUNIOR, 2009).

Para migrar através do tecido conjuntivo e atravessar a membrana basal até chegar a corrente circulatória, a célula deverá secretar enzimas proteolíticas e collagenases, que desintegram as membranas extracelular e basal, permitindo passagem da célula metastática para a corrente circulatória. Ao adentrar nos vasos, as células tumorais deverão manter-se viáveis na corrente sanguínea, onde são alvos dos mecanismos de defesa próprios do sistema imune (WARD, 2002; PIACENTINI, 2012).

Algumas células tumorais são capazes de se aderir às plaquetas circulantes, este mecanismo as esconde do sistema imunológico, além de prover um rico suprimento de fatores de crescimento que ajudarão na sobrevivência delas na circulação. Subsequentemente, as células neoplásicas ficarão retidas nos leitos

capilares de órgãos distantes, as plaquetas podem formar pequenos trombos que ocluem aqueles pequenos vasos sanguíneos, dando origem a focos metastáticos (WARD, 2002; PIACENTINI, 2012).

Além da via hematogênica, as neoplasias malignas também podem se disseminar através da corrente linfática, característica dos carcinomas, ou através da disseminação transcavitária na qual ocorre a invasão das cavidades corporais naturais (STRICKER; KUMAR, 2008).

2.4.1 Influência da cascata inflamatória na carcinogênese

Além dos agentes oncogênicos já conhecidos e referendados, hoje se discute a participação de outros mecanismos no processo de carcinogênese, como é o caso da influência da resposta inflamatória no desenvolvimento e progressão tumoral (PINHO, 2005*b*).

A inflamação é uma resposta protetora cujo objetivo final é livrar o organismo da causa inicial da lesão celular e das consequências dessa lesão. A capacidade de gerar uma inflamação é fundamental para sobrevivência e consiste na primeira linha de defesa do organismo (SILVA; CARVALHO, 2004).

Para cumprir o seu papel na defesa celular, os componentes do sistema imune liberam mediadores que, se por um lado são capazes de destruir o agente agressor, por outro podem induzir mutação que originará uma célula cancerígena, além de favorecer a proliferação, sobrevivência e migração das células tumorais (WILSON; GEORGE, 2013).

As células tumorais e do microambiente tumoral respondem a hipóxia e a necrose tumoral, secundária a proliferação excessiva de células de tumor, liberando inúmeros fatores de crescimento e várias citocinas quimiotáticas capazes de recrutar leucócitos (especialmente monócitos e macrófagos) para o local da lesão. Estes leucócitos são capazes de produzir um conjunto variado de citocinas, mediadores citotóxicos incluindo as espécies reativas de oxigênio, serina e cisteína proteases, as metaloproteinases de matriz (MMPs) e mediadores da morte celular, tais como fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucinas (IL) e interferons (IFNs) (COUSSENS; WERB, 2002; EIRÓ; VIZOSO, 2012).

A infiltração leucocitária é considerada uma manifestação intrínseca do sistema imune contra o desenvolvimento do tumor. Efetivamente, os leucócitos podem representar até 50% do total da massa do tumor em carcinomas da mama invasivos. Entretanto, evidências indicam que este evento favoreça a formação de um microambiente favorável ao desenvolvimento tumoral, uma vez que facilita a instabilidade genômica, promovem angiogênese e favorecem a proliferação e a invasividade das células cancerígenas (PRESCOTT; FITZPATRICK, 2000; EIRÓ; VIZOSO, 2012).

Além disso, a interação das células de tumor com os macrófagos conduz à liberação de uma série de potentes fatores de crescimento angiogênicos e linfangiogênicos, citocinas, proteases, quimiocinas, fatores de crescimento e motilidade, tais como a IL-8 e fator de crescimento de fibroblastos, os quais, promovem o recrutamento de células inflamatórias adicionais. Os macrófagos associados ao tumor também produzem IL-10 que impede a ação antitumoral das células T citotóxicas (COUSSENS; WERB, 2002; MARQUES, 2013).

Vale assinalar que as células mononucleares inflamatórias são responsáveis pela maior parte da ciclooxigenase-2 (COX-2) presente no microambiente tumoral. É também pela presença da COX-2 e consequente produção de prostaglandinas, que o microambiente tumoral torna-se favorável à proliferação e viabilidade das células cancerígenas, como também a formação de novos vasos sanguíneos (COUSSENS; WERB, 2002; MARQUES, 2013).

Está claro que muitos mediadores inflamatórios são expressos em vários cânceres e mediam a sua progressão, conseqüentemente, agentes que inibem esses mediadores e/ou suas vias de ativação são alvos em potencial para intervenções terapêuticas na prevenção e no tratamento do câncer. Muitas evidências indicam que a baixa expressão das ciclooxigenases (COX-1 E COX-2) representa uma importante estratégia para o controle do câncer (EIRÓ; VIZOSO, 2012).

Inibidores de COX (por exemplo, antiinflamatórios não esteroidais - AINES) são quimioprotetores; também foi observado que a oncogênese é inibida em camundongos que não expressam a COX-2. Apesar do aparecimento de efeitos colaterais induzidos por estas substâncias (por exemplo, úlceras provocadas por inibidores da COX-1 ou complicações cardiovasculares induzidas por inibidores da COX-2) ter diminuído o entusiasmo e o emprego destes fármacos na

quimioprevenção do câncer, moléculas que apresentem a capacidade de inibir a COX ainda estão sendo estudadas e empregadas em associação a agentes citotóxicos. É importante assinalar que muitos desses novos agentes em estudo são procedentes de fontes vegetais. (SUBBARAMAIAH et al., 1998; MASFERRER et al., 2000; EIRÓ; VIZOSO, 2012).

2.5. Angiogênese

O processo de carcinogênese ocorre através de uma sequência de ações celulares que envolvem mutações e modificações epigenéticas em genes específicos que controlam o ciclo celular e que conduzem a transformação de uma célula normal em uma célula tumoral; esta célula modificada apresentará um descontrole proliferativo em relação às demais, tornando-se insensível aos estímulos apoptóticos. Contudo, o tumor não pode se desenvolver para além do tamanho de 1-2 mm de diâmetro, sem a indução da angiogênese, que fornecerá o suprimento sanguíneo necessário ao crescimento sustentado do tecido tumoral (JAKÓBISIAK; LASEK; GOLAB, 2003).

A palavra angiogênese foi mencionada pela primeira vez por Hertig em 1935, e seu mecanismo foi desvendado por Folkman ao estudar a angiogênese tumoral. Trata-se de um processo complexo de múltiplas etapas que conduz a formação de novos vasos sanguíneos a partir de capilares preexistentes. Sua ocorrência é essencial em vários processos fisiológicos, tais como: crescimento e desenvolvimento de órgãos, crescimento capilar, ciclo reprodutivo e cicatrização de ferimentos. Por outro lado, também pode contribuir para o desenvolvimento de diversos processos patológicos, como a artrite reumatoide, retinopatia diabética, progressão tumoral e formação de metástase (GONZÁLEZ et al., 2000; GUPTA.; ZHANG, 2005; DAMICO, 2007).

São dois os processos envolvidos na neovascularização, a saber, vasculogênese e angiogênese. Enquanto na angiogênese os novos capilares surgem de vasos pré-existentes; na vasculogênese, os vasos se originam da diferenciação de células endoteliais a partir de um progenitor comum, o angioblasto. Ainda no saco vitelino, hemangioblastos formam agregados que irão desenvolver

precursores de células hematopoiéticas e outros irão se diferenciar em células endoteliais. No embrião, vasos sanguíneos são formados por ambos os processos vasculogênese e angiogênese. Já no adulto, a formação de novos vasos sanguíneos só é observada em certas condições fisiológicas, e ocorre principalmente através da angiogênese (CARMELIET, 2000; VAILHÉ; VITTET; FEIGE; 2001; BERNARDINI et al., 2003).

O surgimento de novos vasos sanguíneos é regulado através de um delicado equilíbrio entre moléculas sinalizadoras de natureza pró e anti angiogênica. Em tecidos normais, a taxa de crescimento dos vasos sanguíneos é reduzida ao mínimo através do equilíbrio destes fatores. Fatores angiogênicos estão representados principalmente por polipeptídios que induzem um ou todos os passos do processo angiogênico, agem através da interação com receptores específicos nas células endoteliais e / ou recrutamento e ativação de células, como macrófagos, que por sua vez podem produzir fatores angiogênicos (BERNARDINI et al., 2003; USHIO-FUKAI, 2006).

Estudos realizados indicaram o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) como o principal mediador do início do processo de angiogênese, esta citosina é capaz de induzir vasodilatação via produção de óxido nítrico (NO), como também de aumentar a permeabilidade das células endoteliais, ou mesmo estimular a proliferação, sobrevivência, migração e diferenciação destas células. O receptor de VEGF é expresso quase exclusivamente pelas células endoteliais (DUARTE; FILHO; SCHMITT, 2007; CAPP et al., 2009).

Entretanto, hoje, sabemos que além dos membros da família VEGF (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e o fator de crescimento placentário - PLGF), existem vários outros mediadores capazes de induzir a neovascularização. Pesquisas utilizando o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) demonstraram que, além de uma elevada ação oncogênica, esta proteína apresentava uma grande capacidade de estimular o processo de angiogênese (DIAS et al., 2002; PINHO, 2005b).

Pesquisas sugerem que o bFGF estimula mitose nas células vasculares endoteliais através de um mecanismo que envolve a formação intracelular de ácido araquidônico e a formação de eicosanoides. FGFb não é um mitógeno endotelial específico, mas também atua sobre fibroblastos, células musculares lisas e neurônios. Do mesmo modo que a família FGF, outros fatores não específicos para

o sistema vascular estão envolvidos nos processos de vascularização, como membros das famílias PDGF - fator de crescimento derivado de plaquetas e de fatores de transcrição. Ainda estão incluídos entre os fatores angiogênicos: a família da angiopoietina (Ang-1, Ang-2, Ang-3 e Ang-4) e a ciclooxigenase-2 (COX-2) (DIAS et al., 2002; PINHO, 2005b).

Os fatores angiogênicos atuam de modo integrado, sendo controlados a partir de receptores de membrana. Os receptores de VEGFs – designados atualmente como VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR ou Flk-1) e VEGFR-3 (Flt-4) – e os de Angs (Tie1, Tie2, Tie3 e Tie4), estão relacionados à atividade da enzima tirosina quinase, uma classe que forma dímeros em resposta à ligação dos sinais angiogênicos. Os quatro subtipos de Angiopoetinas ligam-se primariamente ao receptor Tie2; observa-se que os ligantes Ang1 e Ang4 são agonistas do receptor Tie2, enquanto Ang2 e a Ang3 agem como antagonistas competitivos. As ligações entre Ang1 e o receptor Tie2 promove a compactação dos brotos neovasculares nascentes, através das moléculas de ligação, provoca a interação entre as células endoteliais (CEn) das paredes como um adesivo de proteínas e facilita a contração de pericitos. O receptor VEGFR-2 parece mediar a maior parte das respostas angiogênicas do VEGF-A - inicialização da tubulogênese, sobrevivência, alongamento e permeabilidade de vasos sanguíneos, enquanto o VEGFR-1 exerceria uma ação antagonista, ligando-se ao VEGF-A, sem efetivar qualquer resposta positiva sobre a vascularização (DIAS et al., 2002; DIAS, 2005; LORIER; TOURIÑO; KALIL, 2011).

Subsequente à ativação das células endoteliais por um estímulo pro angiogênico, os novos vasos são formados por meio de uma série de eventos morfológicos e bioquímicos complexos, que envolvem diferentes etapas (Figura 2.7). Como consequência, verificam-se eventos como a degradação da membrana basal, remodelamento da matriz extracelular; onde as ações de proteases secretadas pelas células endoteliais promovem modificações importantes nos mecanismos de adesão celular, que culminam em migração e proliferação das células endoteliais e formação do tubo capilar endotelial (CASTRO, 2012; USHIO-FUKAI, 2006; DIAS et al., 2002).

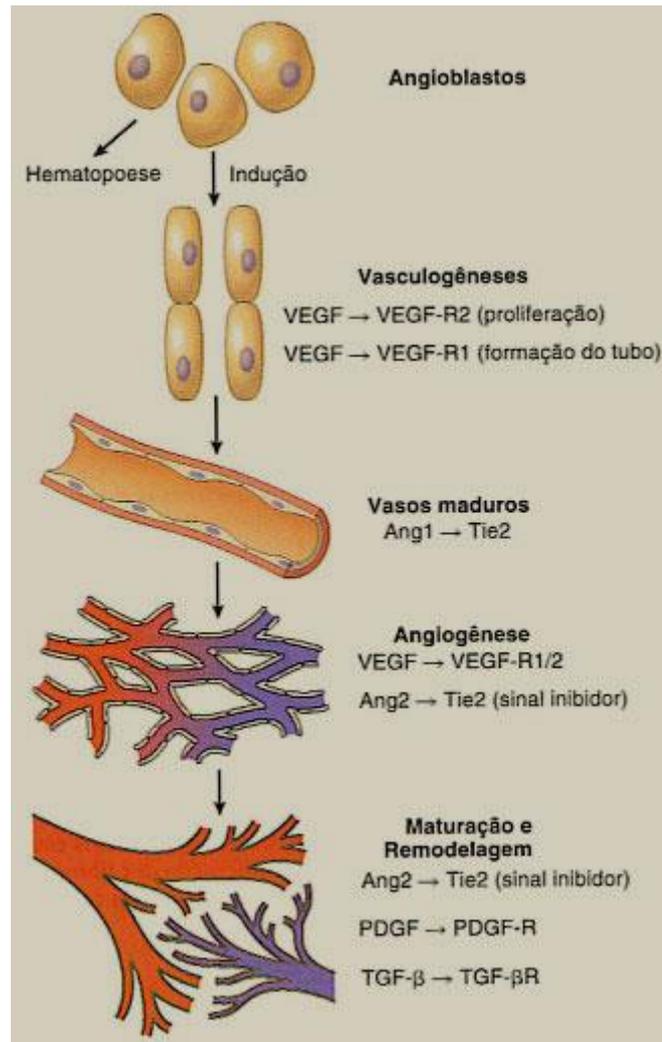


FIGURA 2.7 – Esquema representativo dos processos de vasculogênese e angiogênese. (Fonte: sistemanervoso.com, 2005).

Posteriormente a identificação destes agentes considerados angiogênicos, foram detectadas inúmeras proteínas capazes de exercer ação oposta, ou seja, inibir a angiogênese, entre elas angiostatina, endostatina, trombospondinas (TSPs)-1 e 2, vasoibina-1 e inibidores da COX-2. A angiostatina é um fragmento interno do plasminogênio, produzido por uma clivagem catalítica. Trata-se de um potente inibidor da angiogênese, capaz de aumentar os níveis de apoptose das células tumorais. Sua capacidade de provocar regressão tumoral é potenciada com radioterapia concomitante. A endostatina é um produto da clivagem proteolítica do colágeno tipo XVIII, capaz de interagir com várias moléculas da superfície celular. Endostatina leva à regressão do tumor primitivo, enquanto mantém as metástases em latência. TSPs-1 e 2 são proteínas pleiotrópicas envolvidas na cicatrização de feridas, na progressão do tumor, na remodelação de tecidos e na regulação da

angiogênese. O efeito antiangiogênico das TSPs também parece estar relacionado com os seus efeitos sobre a migração e a apoptose em células endoteliais, bem como seu efeito sobre a expressão e biodisponibilidade de VEGF (FOLKMAN, 1995; GRAÇA et al., 2004).

A expressão de TSP1 está correlacionada positivamente com a expressão de p53 em alguns tipos de tumor. Vasoibina 1 (VASH1) é um inibidor endógeno da angiogênese, que foi originalmente identificado como um gene de VEGF-indutível em células endoteliais. Em ratinhos, a supressão genética deste fator resulta num aumento do crescimento tumoral, sugerindo que VASH1 endógeno participa na inibição do tumor. A administração exógena de VASH1 inibe germinação angiogênese e melhora a eficácia da quimioterapia, iniciando a maturação dos restantes vasos tumorais (FOLKMAN, 1995; GRAÇA et al., 2004; PINHO, 2005b; HOFF; MACHADO, 2012).

A descoberta de inibidores da angiogênese veio colocar a hipótese da sua utilização como arma terapêutica contra várias doenças, especialmente contra o câncer, considerando a potencial capacidade que estes fatores possuem de parar ou diminuir o crescimento do tumor ou a formação de metástases. Além disso, os resultados sobre a ação moduladora da angiogênese, obtidos a partir de princípios naturais, ampliam os horizontes dos tratamentos e as perspectivas de obtenção de novas moléculas bioativas com atividade antiangiogênica (PINHO, 2005b; MACHADO, 2012;).

2.6 Radicais livres e Antioxidantes naturais

Existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre os efeitos dos radicais livres no organismo. Esses radicais livres são, normalmente, gerados a partir do metabolismo orgânico. As moléculas orgânicas, inorgânicas e os átomos que contêm um ou mais elétrons não emparelhados, podem ser classificados como radicais livres. Essa configuração torna estas moléculas altamente instáveis, muito reativas e com meia-vida curtíssima. Os radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados, respectivamente, espécies

reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; VEDANA, 2008).

Os seres humanos dependem da oxidação biológica como fonte de energia para a sobrevivência. A oxidação é um processo metabólico que gera energia para o desenvolvimento da função das células. No nosso organismo, 95% do oxigênio consumido são reduzidos à água e 5% são convertidos em espécies reativas do oxigênio (ERO). Já as espécies reativas do nitrogênio (ERN) são provenientes do metabolismo do óxido nítrico (NO) (BOUEIZ; HASSOUN, 2009; CONDESSA, 2011; DROGE, 2002).

Os radicais livres desempenham funções fisiológicas importantes, que incluem: a regulação do tônus vascular, atuação com sensores da tensão de oxigênio, regulação das funções que controlam a concentração de oxigênio, o aumento da transdução de sinal de receptores de membrana, incluindo o receptor de antígeno de linfócitos, detoxificação e respostas ao estresse oxidativo garantindo a manutenção da homeostase dos mecanismos de oxirredução. Contudo, quando produzidas em excesso podem romper ligações covalentes prejudicando assim o DNA, proteínas e organelas celulares. Esse stress oxidativo é um dos responsáveis pelo desenvolvimento de várias doenças como, aterosclerose, isquemia cardíaca e cerebral, câncer, diabetes e doenças neurodegenerativa, reumáticas e pulmonares (ALI et al., 2008; ALVES et al., 2010; ANIYA et al., 2002; DROGE, 2002; TAVARES; RAMOS, 2008).

Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana, e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação. A produção das espécies reativas (ER) ocorre como consequência dos diversos processos biológicos que acontecem no organismo, tais como a respiração celular (metais de transição no interior da célula e de sistemas de transporte de elétrons), o processo de detoxificação (redução de flavinas e tióis) e reações inflamatórias (resultado da atividade de oxidases, cicloxigenases, lipoxigenases, desidrogenases e peroxidases). Por outro lado, temos também as fontes exógenas de radicais que envolvem tabaco, poluição do ar, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas e radiações (BIANCHI; ANTUNES, 1999; SOARES, 2002).

O organismo humano sofre ação constante de ERO e ERN geradas em processos inflamatórios, por alguma disfunção biológica ou proveniente dos

alimentos ou meio ambiente. ERO's são encontradas em todos os sistemas biológicos e se dividem em dois grupos, os radicalares (que apresentam elétrons desemparelhados): hidroxila (HO^{\bullet}), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila (ROO^{\bullet}) e alcoxila (RO^{\bullet}); e os não radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso; que apesar de não se caracterizarem como um radical livre, devido a ausência de elétrons desemparelhados na última camada, podem ser extremamente lesivos, pois participam da reação que produz a OH^{\bullet} , considerado o radical mais deletério ao organismo, uma vez que a sua meia-vida muito curta dificulta sua captura pelos agentes antioxidantes *in vivo*. As ERN incluem o óxido nítrico (NO^{\bullet}), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; DROGE, 2002; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; VASCONCELOS; et al., 2007).

Em sistemas biológicos, a membrana celular constitui um dos focos de atuação dos radicais livres (ERO, ERN, entre outros), os quais agem diretamente sobre alguns componentes celulares, e desencadeiam reações de oxidação nos ácidos graxos poliinsaturados da membrana lipoproteica, denominadas de lipoperoxidação. A lipoperoxidação afeta a integridade estrutural e funcional da membrana celular, alterando sua fluidez e permeabilidade. Além da membrana que envolve a célula, as membranas de organelas intracelulares, tais como mitocôndria, retículo endoplasmático, núcleo, entre outras, apresentam uma estrutura bilipídica e uma variedade de proteínas e açúcares. O dano celular resulta basicamente de ataque destas espécies reativas sobre estas macromoléculas: açúcares (CHOH)_n, DNA, proteínas e lipídios (BIANCHI; ANTUNES, 1999; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; VASCONCELOS; et al., 2007; VENDANA, 2008).

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena (glutathiona, ácido dihidrolipóico, peptídeos de histidina), ou serem provenientes da dieta alimentar (a-tocoferol, β -caroteno, ácido ascórbico). Estes compostos auxiliam o organismo a lidar com o estresse oxidativo provocado pelos radicais livres. O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres tem sido chamado de estresse oxidativo. O estresse oxidativo tem importância crucial nos processos de envelhecimento, transformação e morte celular, com consequências diretas em muitos processos patológicos, incluindo as doenças degenerativas tais como: as cardiopatias, aterosclerose, alterações no

sistema nervoso, catarata e problemas pulmonares, bem como a indução do câncer (ALI; et al., 2008; BIANCHI; ANTUNES, 1999; SOUSA; et al., 2007).

De forma geral, denominam-se antioxidantes as substâncias que presentes em concentrações baixas, quando comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato (SIES; STAHL, 1995). Os antioxidantes atuam de diversas formas impedindo a formação de radicais livres e exercem uma importante função no controle de algumas doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Seus efeitos consistem na inativação dos radicais livres, na complexação de íons metálicos ou na redução dos hidroperóxidos para produtos incapazes de formar radicais livres e produtos de decomposição (BIANCHI; ANTUNES, 1999; SANTA-CECILIA et al., 2010).

Os antioxidantes são divididos em dois sistemas, classificados como enzimático e não enzimático. O sistema enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas antioxidantes: a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx). O componente antioxidante não enzimático é formado por muitas substâncias que incluem a glutathione (GSH), principal composto antioxidante intracelular, tocoferóis, ascorbato, ácido úrico e β -caroteno, além de proteínas de transporte de metais de transição, como a transferrina (transporte do ferro) e ceruloplasmina (transporte do cobre e oxidação do ferro para ser captado pela transferrina) (VASCONCELOS et al., 2007).

A origem das substâncias antioxidantes pode ser sintética ou natural. O uso dos antioxidantes sintéticos é limitado por serem muito voláteis, se decompõem facilmente em altas temperaturas e apresentarem risco à saúde quando consumidos de forma crônica. Neste grupo estão incluídos o Butil-hidroxianisol (BHA), o Butil-hidroxitolueno (BHT), o Terc-butilhidroquinona (TBHQ) e o Propil Galato (PG). Os antioxidantes naturais podem ser extraídos de várias espécies do reino vegetais, neste grupo destacam-se ácido ascórbico (vitamina C), β -caroteno, α -tocoferol (vitamina E) e compostos fenólicos, tais como flavonoides, ácidos fenólicos, antocianinas e taninos. Os compostos naturais têm sido preferidos em detrimento dos sintéticos devido a sua maior segurança para o uso em humanos e animais atrelada a sua eficácia em modular a ação dos agentes oxidantes. Além disso, contribuem para reduzir, significativamente as doenças crônicas e degenerativas, inclusive estando associadas à quimioproteção (ANDREO; JORGE, 2006; MORAIS et al., 2009).

O crescente interesse na busca por novas moléculas capazes de evitar os efeitos deletérios provenientes da oxidação no organismo tem levado pesquisadores a analisar detalhadamente os mecanismos de proteção de legumes, frutas e plantas medicinais. Esta procura por antioxidantes naturais deve-se a sua baixa toxicidade e forte atividade em comparação aos antioxidantes sintéticos. Além disso, são úteis na indústria, para a proteção de cosméticos, fármacos e alimentos, prevenindo a decomposição oxidativa desses pela ação da luz, temperatura e umidade. (TAVARES; RAMOS, 2008; CONDESSA, 2011).



3. Metodologia

3.0 METODOLOGIA

3.1. Extrato etanólico de *Caesalpinia echinata* Lam

O material botânico (cerne) de *C. echinata* foi coletado em dezembro de 2008, no município de São Lourenço da Mata, Pernambuco, Brasil. A exsicata deste espécime foi submetida a um procedimento de identificação mediante a contribuição da botânica Marlene Barbosa, sendo o material devidamente catalogado e alocado no herbário Geraldo Mariz, da Universidade Federal de Pernambuco, sob o número de identificação 41.764.

Para obtenção do extrato, após os devidos procedimentos de limpeza e acondicionamento do material, o cerne triturado de *C. echinata* Lam. foi submetido à maceração em etanol 98,2° GL, por um período de 72 horas, e em seguida concentrado até a secura em rota evaporador do tipo Heizbed OB da Heidolph 30-180°C 1300W. O material obtido foi ressuspenso em solução salina a 0,9%, para posterior administração.

3.2 Estudo da Toxicidade subcrônica

Todos os procedimentos foram realizados conforme guia internacional para teste de substâncias químicas específico para estudo de dose repetida em roedores (OECD, 1995).

3.2.1 Animais

Foram utilizados ratos, *Rattus norvegicus* var. *Wistar albinos*, de ambos os sexos, adultos, com peso aproximado de 280 ± 30 g. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, em condições controladas de iluminação (ciclo 12h claro/escuro) e temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). A alimentação foi efetuada pelo fornecimento de ração em “pelets” e água ad libitum.

Os ensaios foram realizados com animais previamente selecionados e avaliados para procedimento, tendo-se como critério de exclusão a presença de sinais clínicos desfavoráveis. A etapa seguinte constou da separação de 6 animais por grupos de machos e fêmeas em gaiolas identificadas. Os animais foram diferenciados pela seguinte marcação: CM= cabeça marcada; RM= rabo marcado; LM= lombo marcado; CR= cabeça e rabo marcados; SM= sem marcação; CRL= cabeça, rabo e lombo marcados.

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da UFPE, processo nº 23076.056746/2012.

3.2.2. Tratamento dos animais

Quarenta e oito ratos correspondendo a oito grupos (n=6/grupo) foram tratados durante 28 dias consecutivos por via oral com o extrato etanólico (EE) de *C. echinata*, veiculado em solução salina 0,9% e propilenoglicol, nas doses de 75; 150 e 300 mg/Kg (grupo tratado). Ao grupo controle foi administrado o veículo utilizado na dissolução do extrato (soro fisiológico 0,9% e propilenoglicol). As doses utilizadas neste protocolo foram respectivamente 3,75%, 7,5% e 15% da DL₅₀ previamente determinada.

Todos os animais foram pesados diariamente. As medições do consumo de alimento foram realizadas uma vez ao dia. Ao final do tratamento, os animais foram submetidos a jejum de 12h e anestesiados com associação de ketamina/xilazina, por via intramuscular na dose de 1 mg/kg. Em seguida, procedeu-se a coleta de sangue por punção cardíaca (WEISS, et al., 2000). O conteúdo foi separado em dois tipos de tubo: um com EDTA (parâmetros hematológicos) e o outro sem anticoagulante (parâmetros bioquímicos).

3.2.3 Parâmetros Bioquímicos

Para análise bioquímica, o sangue foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos para obtenção do soro e em seguida determinados os parâmetros: glicose, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), colesterol total e triglicerídeos. Os ensaios foram realizados em analisador semi automático Bioplus Bio-200 com kits da Labtest®.

3.2.4 Parâmetros Hematológicos

Os parâmetros eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócritos e os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados através do analisador automático de células hematológicas ABX Micros 60. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada pelo método de May-Grunwald-Giemsa, em cada caso, 100 células foram contadas.

As análises bioquímicas e hematológicas foram realizadas em parceria com o

Dr. Samuel Daniel S. Filho, Professor do Departamento de análises Clínicas da UFPE.

3.2.5 Análise histopatológica

Após a eutanásia, foi realizada a análise macroscópica dos órgãos. Em seguida foram retiradas amostras de fígado, pulmão, coração, rim, baço, intestino, estômago, testículo e cérebro dos animais para exame histopatológico. As amostras foram fixadas em formol tamponado 10% por 24h, e posteriormente embutidas em blocos de parafina, seccionadas à 5µm, corados com hematoxilina e eosina, e observadas em microscopia óptica (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983; TIMM, 2005).

A principal finalidade da análise histopatológica foi avaliar a integridade tecidual dos órgãos extirpados. Dentre os principais parâmetros investigados estão lesões celulares reversíveis (degenerações) e irreversíveis (necrose e apoptose), infiltração de leucócitos, congestão, extravasamento de sangue e fibrose (CUNHA, et al., 2009).

A análise histopatológica foi realizada em parceria com o Dr. Fernando Leandro dos Santos, Professor do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE.

3.2.6. Análise Estatística

Os resultados foram expressos através de média \pm desvio padrão (Média \pm DP). O tratamento estatístico foi realizado através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni, com software validado (GraphPad Prism5.0[®]). Considerou-se um nível de significância de 95%.

As análises estatísticas foram realizadas em parceria com o Dr. George Chaves Jimenez, professor do Departamento de Morfologia e Fisiologia animal da UFRPE.

3.3. Atividade antioxidante do radical livre DPPH

A atividade antioxidante foi determinada através de reações de sequestro do radical estável DPPH^{*} (2,2-difenil-1-picril-hidrazile), por componentes moleculares presentes no extrato de *C. echinata* conforme metodologia sugerida por Blois (1958).

Foi preparada uma solução metanólica de DPPH^{*} a 20 mg/mL, de forma a apresentar absorvância em 517 nm entre 0,6 e 0,7. Uma alíquota de 250 µL, desta solução foi misturada com 40 µL das diferentes concentrações dos extratos. Trinta minutos depois, a absorvância foi avaliada em 517 nm. O Ácido Gálico foi usado como composto de referência para este ensaio; as análises foram realizadas em triplicatas.

3.4. Análise do sequestro do óxido nítrico (NO) *in vitro*

O óxido Nítrico foi gerado a partir nitroprussiato de sódio e quantificado pela reação de Greiss segundo metodologia descrita em Marcocci, Maguire e Droy (1994). O Nitroprussiato de sódio em solução aquosa pH 7,4, gera espontaneamente oxido nítrico, que por sua vez interage com o oxigênio para formar íons nitrito, os quais podem ser aferidos utilizando o reagente de Greiss. Os extratores moleculares do oxido nítrico competem com oxigênio reduzindo a produção de íons nitrito. Para o experimento, nitroprussiato de sódio (10 mM) em tampão fosfato (PBS - pH 7.4) foi acrescentado a diferentes preparações nas concentrações de 10, 25, 50, 100 e 200µg/mL do extrato de *C. echinata*, sendo ambas colocadas sob incubação a 25° C por 150 min. Em seguida, 0,5 mL do reagente Griess (1% sulfanilamida, 2% H₃PO₄ e 0.1% Dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina) foi adicionado a cada amostra. A absorvância do cromóforo formado foi lida em 540 nm, sendo o Ácido Gálico usado como controle positivo.

Os resultados foram expressos em termos de concentração inibitória mínima (I_c), sendo o percentual de inibição estabelecido pela expressão $I\% = [(A_c - A_s) / A_c] \cdot 100$ onde A_c é o valor da absorvância do controle, A_s a absorvância em presença do extrato. Uma relação foi estabelecida entre as concentrações do extrato e o valor de I_c por análise de regressão, mediante planilha estatística do programa Grafic Pad da Prism versão 5.0.

As análises da atividade antioxidante do radical livre DPPH e análise do sequestro do óxido nítrico (NO) *in vitro* foram realizadas em parceria com o Dr. Luis Claudio Nascimento da Silva, tutor dos laboratórios de análise clínicas da Faculdade Pernambucana de Saúde (FPS).

3.5 Atividade Antiangiogênica

A capacidade de inibição da angiogênese mediada pelo extrato de *C. echinata* foi avaliada empregando-se o modelo de angiogênese inflamatória em córnea de ratos, segundo metodologia descrita no trabalho de Fachine-Jamacaru, Fachine Júnior e Moraes Filho (2005), embora adaptando-se a metodologia para ratos wistar.

A análise da atividade antiangiogênica foi realizada em parceria com o Dr. George Chaves Jimenez e do Dr. Fabrício Bezerra de Sá, Professores do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE.

3.5.1 Animais

Foram utilizados ratos albinos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, adultos. Os animais ficaram mantidos em gaiolas de polipropileno, em condições controladas de iluminação (ciclo 12h claro/escuro) e temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). A alimentação foi efetuada pelo fornecimento de ração em “pelets” e água ad libitum. Para a formação dos grupos experimentais, os animais passaram por um período de aclimação de cinco dias e em seguida, submetidos a uma avaliação clínica, tendo-se como critério de exclusão a presença de sinais clínicos e de reações oftálmicas desfavoráveis, posteriormente foram subdivididos em dois grupos, um tratado (n=9) e outro controle (n = 8).

3.5.2 Tratamento dos animais

Para a realização do protocolo experimental, os ratos foram previamente anestesiados com a associação de Ketamina (50mg/Kg) e xilazina (20mg/Kg) (im), complementada no momento da manipulação dos animais com a instilação, no saco conjuntival, com 2 gotas do anestésico tópico cloridrato de proximetacaína 0,5% (FIOCRUZ, 2008; KOHN et al., 1997).

Uma vez anestesiados, cada animal foi submetido a um procedimento de afastamento das pálpebras, expondo quase toda a superfície da córnea e a região limbar superior. Assim, cada um recebeu cauterização pontual na periferia superior da córnea direita, com o auxílio de um microscópio cirúrgico com aumento de 16 vezes. Para tanto, foi utilizada uma peça circular de papel filtro com 3 mm de diâmetro, previamente embebida em uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1M por 1 minuto. A peça de papel filtro foi então posicionada a aproximadamente 1 mm

do limbo córneo-conjuntival, aí permaneceu por 30s. Logo após, o olho foi irrigado com 10 ml de solução salina a 0,9%, para remoção do excesso de NaOH. Tal técnica resultou em um sítio de cauterização circular, homogêneo e de bordas bem definidas, com cerca de 3,5 mm de diâmetro (FECHINE-JAMACARU; FECHINE JÚNIOR; MORAES FILHO, 2005).

Após um período de 18 horas, os animais do grupo tratado receberam em dose única, tratamento específico de 10 µL de solução de extrato alcoólico mais Tween 80, numa concentração final de 100 mg/mL. Os animais do grupo controle receberam 10 µL de solução salina. Após 18 dias, todos foram anestesiados seguindo-se o protocolo acima descrito, e mediante o acoplamento de câmara digital à ocular do microscópio cirúrgico foram obtidas imagens da região ocular tratada, e considerou-se um aumento de magnificação de 16X.

As imagens foram transferidas para um banco de dados informatizado, sendo disponibilizadas no Paint da Microsoft para ampliação das imagens e avaliação da densidade de vasos numa área circular disposta frontalmente em relação à pupila. O cálculo da extensão de superfície A foi efetuado pela relação $A = 4/3\pi r^3$, onde r é o raio.

3.6. Teste MTT

A cultura celular escolhida para os testes de citotoxicidade (teste MTT) e avaliação do efeito protetor contra os danos causados pelo H₂O₂, foi a linhagem celular Vero (ATCC CCL 81), uma cultura celular fibroblástica estabelecida a partir de células renais de macaco verde africano *Cercopithecus aethiops*.

A ação citotóxica do extrato etanólico de *C. echinata* foi investigada através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazólio [3-(4,5- dimetilazol-2-il) 2,5-difenil brometo de tetrazolium] (MTT; Sigma-Aldrich). Esse ensaio objetivou quantificar a redução dos sais amarelos de tetrazólio a um composto denominado formazan, por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas.

Células Vero (1×10⁵/mL) foram incubadas em placa de 96 poços em quadruplicata por 24 horas. Após este período foram tratadas com o extrato (10, 25, 50, 100, 200 µg/mL) por 24 horas. Ao final da incubação, o meio foi removido e a solução de MTT (5mg/mL em RPMI) foi adicionada em todas as cavidades das placas, e essas foram incubadas a 37°C por 3 h. Após incubação, o meio com o MTT foi removido e em seguida adicionou-se DMSO para solubilizar o formazan

produzido dentro da célula. A densidade óptica (OD) foi mensurada a 595 nm em um leitor de microplacas (Benchmark plus, Bio-Rad, Califórnia, EUA). A viabilidade celular foi calculada em comparação ao OD obtido pelas células do grupo controle, consideradas com 100%.

3.7. Efeito protetor contra os danos causados pelo peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

Células Vero (1×10⁵/mL) foram incubadas em placa de 96 poços em quadruplicata por 24 horas. E foram então tratadas com o extrato (10, 25, 50, 100, 200 µg/mL) por 30 minutos e subsequentemente com H₂O₂ (1 mM) por 24 horas. Ao final da incubação, o meio foi removido e a solução de MTT (5mg/mL em RPMI) foi adicionada em todas as cavidades das placas, e essas foram incubadas a 37°C por 3 h. Após incubação, o meio com o MTT foi removido e em seguida adicionou-se DMSO para solubilizar o formazan produzido dentro da célula. . A densidade óptica (OD) foi mensurada a 595 nm em um leitor de microplacas (Benchmark plus, Bio-Rad, Califórnia, EUA). A viabilidade celular foi calculada em comparação ao OD obtido pelas células do grupo controle, consideradas com 100%.

3.8. Atividade de inibição tumoral

3.8.1. Linhagem tumoral

Foi utilizado o Carcinoma de Ehrlich, um adenocarcinoma mamário transplantável de camundongo fêmea. Este se apresenta sob duas formas: a ascítica, obtida através da inoculação de suspensão de células tumorais do peritônio, e a forma sólida, através da inoculação dessa mesma suspensão no subcutâneo dos camundongos.

O carcinoma de Ehrlich (CE), introduzido por Paul Ehrlich em 1896, e descrito em 1906, trata-se de uma neoplasia experimental transplantável de origem epitelial maligna, espécie-específica e corresponde ao adenocarcinoma mamário do camundongo fêmea. Inicialmente, o tumor foi desenvolvido experimentalmente sob a forma sólida, sendo transplantado em animais da mesma espécie. Somente em 1932, com Lowenthal e Jahn, foi convertido para forma ascítica, através da passagem seriada de fluído ascítico de animais inoculados intraperitonealmente com células tumorais (DAGLI, 1989).

Este tumor tem sido referido como um carcinoma indiferenciado, hiperdiploide, com alta capacidade para transplante, não regressivo, de rápida proliferação, 100% de malignidade e que também não apresentam antígenos de transplante específicos de tumor (TSTA), que são antígenos próprios de células tumorais e não são expressados em células normais, normalmente responsáveis pela rejeição do tumor (OZASLAN et al., 2011).

CE é um dos tipos de câncer mais extensamente utilizados para experimentação, além das características favoráveis que o tornaram um dos primeiros tumores transplantáveis conhecido, esta linhagem se assemelha a tumores humanos, que são os mais sensíveis à quimioterapia, devido ao fato de que eles são indiferenciadas e têm uma taxa de crescimento rápido (DAGLI, 1989; OZASLAN et al., 2011).

As células do tumor de Ehrlich foram mantidas in vivo por repiques semanais em camundongos, através da inoculação de 0,5-1mL de ascite por via intraperitoneal (ip), que continha em média 10^6 células/mL. Os inóculos foram obtidos por punção do fluido ascítico

3.8.2 Contagem e viabilidade das células tumorais

Para a contagem de células tumorais foi coletado 1mL do fluido ascítico da cavidade peritoneal dos animais com tumor ascítico de Ehrlich. Esta solução foi centrifugada durante 5 minutos a 1500 rotações/minuto. O sobrenadante foi descartado e o precipitado que continha células tumorais foi lavado três vezes com ringer lactato e novamente centrifugada. Após a última lavagem acrescentou-se ao precipitado 1mL de ringer lactato tamponado e BSA (albumina sérica bovina) na razão de 10% em relação ao volume total. Desta suspensão foram retirados 20 μ L que foram diluídos 200 vezes com solução de Azul de Trypan a 0,025% (DAGLI, 1989).

As células coradas em azul, por apresentarem lesões de membrana celular ou incapacidade de regular seu conteúdo intracelular, foram consideradas inviáveis. As células translúcidas (não coradas) foram consideradas viáveis. O número de células tumorais foi obtido mediante metodologia descrita por Peres e Curi (2005) e Dagli (1989), ou seja, através de contagem direta na câmara de Neubauer, usando objetiva de 10X. Foram contadas as células viáveis nos quatro quadrantes externos da câmara. O número de células contadas é igual à soma de células dos quatro

quadrantes externos superiores e dos quatro inferiores dividido por dois. O nº de células por mL foi obtido usando a fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ células/mL} = (\text{n}^\circ \text{ células contadas} \times \text{diluição} \times 104) \div 4$$

O total de células foi expresso em números de células tumorais/mL (GUERRA, 1983).

O percentual de viabilidade celular foi obtido com a fórmula:

$$\text{Percentual de viabilidade celular} = (\text{total de células viáveis} \div \text{total de células viáveis} + \text{total de células não viáveis}) \times 100$$

3.8.3 Tratamento das células

Nos estudos *in vitro* foram utilizadas células ascíticas do tumor de Ehrlich, acondicionadas em tubos de falcon na concentração de 2×10^6 cels/mL/tubo e mantidas durante 1 hora em solução fisiológica de ringer lactato (pH 7,2) e BSA (10%), mais estímulo químico derivado da presença do extrato alcoólico de *C. echinata*. Considerou-se diferentes ensaios com diferentes concentrações do extrato alcoólico, a saber: 50 / 25 / 12,5 / 6,25 / 3,125 mg/mL. As amostras foram comparadas com a preparação controle que continha células tumorais em solução fisiológica, mas livre de estimulação química; assim como de um controle positivo onde as células tumorais, em solução fisiológica, receberam metotrexato na concentração de 0,5 mg/mL.

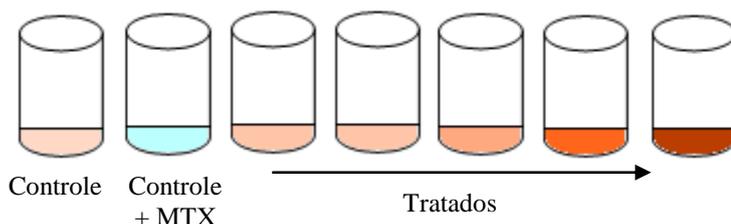


FIGURA 3.1 – Esquema de tratamentos das células do carcinoma ascítico de Ehrlich.

Após 1 hora de estímulo químico foi avaliada a viabilidade celular em todas as preparações.

3.8.4 Avaliação *in vivo*

3.8.4.1 Animais

Foram utilizados 30 camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), adultos, fêmeas, com peso igual a 30 ± 5 g. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, 6 por grupo, sob condições controladas de iluminação (ciclo 12 horas claro/escuro) e temperatura ($22 \pm 2^\circ$ C), e livre acesso à água e alimento.

3.8.4.2 Inoculação das células tumorais

Os animais foram pesados e em seguida receberam 0,4 mL de suspensão com $2,65 \times 10^6$ células tumorais viáveis, previamente tratadas com o extrato, diretamente no tecido subcutâneo da região axilar direita. No 21º dia os animais foram eutanasiados, mediante aplicação de cloridrato de xilazina (100mg/kg) e cloridrato de cetamina (100mg/kg), segundo metodologia descrita em Fiocruz. (2008).

3.8.4.3 Acompanhamento dos animais

Os animais foram acompanhados durante 21 dias de acordo com os seguintes parâmetros:

- Avaliação clínica das condições gerais do animal,
- Variação da massa corporal (pesagem diária),
- Crescimento tumoral, através da medição dos diâmetros da superfície de projeção externa do tumor na altura da superfície do corpo (Figura 3.2).

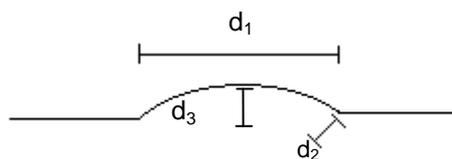


FIGURA 3.2 – Ilustração do esquema de medição dos diâmetros do tumor.

O volume tumoral foi estimado diariamente, considerando-se o tumor como o formato semelhante a um elipsoide, mediante a fórmula: $V_t = 4/6 \times \pi \times d1 \times d2 \times d3$, Onde: d1, d2 e d3 são os diâmetros do tumor.

Ao final do vigésimo primeiro dia, os animais foram submetidos a um jejum de 12h e anestesiados com cetamina (12 mg/kg de peso) e xilazina (4 mg/kg de peso). Em seguida, foi realizada a coleta de sangue por rompimento do plexo retro-orbital com auxílio de capilar de vidro (FIOCRUZ, 2008; WAYNFORTH, 1980). O conteúdo foi dividido em dois tipos de tubo: um com EDTA (parâmetros hematológicos) e o outro sem anticoagulante (parâmetros bioquímicos).

3.8.4.4 Parâmetros Hematológicos

Os parâmetros eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócritos e os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados através do analisador automático de células hematológicas Coulter STKS. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada com May-Grünwald-Giemsa.

3.8.4.5 Parâmetros Bioquímicos

Para análise bioquímica, o sangue foi centrifugado a 3500rpm durante 10 minutos para obtenção do soro e em seguida determinados os parâmetros: glicose, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), colesterol total, triglicerídeos, fosfatase alcalina (ALP), bilirrubina total e direta, proteínas totais, albumina e globulinas.

3.8.4.6 Análise morfológica macroscópica

Após a coleta do sangue, foi realizada a eutanásia por deslocamento cervical, e procedeu-se à necropsia para avaliação da morfologia macroscópica externa dos órgãos. Os órgãos pulmão, fígado, rins e baço foram cuidadosamente removidos, dissecados e tiveram sua massa úmida determinada em balança analítica. Fragmentos destes órgãos foram fixados em formol 10% tamponado para exame histopatológico.

O tumor foi extirpado pesado e suas dimensões medidas, em seguida foi fixado em formol 10% tamponado para exame histopatológico.

3.9 Avaliação da influência da cascata do ácido araquidônico na atividade antitumoral do extrato etanólico de *C. echinata*

Os camundongos foram divididos em quatro grupos (6 animais/grupo), e receberam pré-tratamento durante quatro dias, da seguinte forma: o grupo 1 foi tratado por via intraperitoneal com solução salina, os animais do grupo 2 receberam pré-tratamento com o anti-inflamatório indometacina 10^{-5} M (3,6 mg/kg) (Liometacen[®] Promedica Parma), no grupo 3, os camundongos foram pré tratados com dexametasona 10^{-5} M (3,9 mg/kg) (Decadron[®] Aché) e no grupo 4 o animais também foram pré-tratados por via intraperitoneal com solução salina.

No quinto dia todos receberam 0,4 ml de suspensão contendo $2,65 \times 10^6$ células tumorais viáveis, diretamente no tecido subcutâneo da região axilar direita. Após quarenta e oito horas da inoculação iniciou-se o tratamento dos grupos 2, 3 e 4 com extrato etanólico de *C. echinata* (EECe) na dose de 25mg/kg, ao animais do grupo 1 receberam soro fisiológico 0,9%.

3.9.1 Acompanhamento dos animais

O animais foram acompanhados durante 8 dias de acordo com os seguintes parâmetros:

- a) Avaliação clínica das condições gerais do animal
- b) Variação da massa corporal (pesagem diária)
- c) Crescimento tumoral, através da medição dos diâmetros (maior λ_1 e menor λ_2) da superfície de projeção externa do tumor na altura da superfície do corpo (Figura 3.2).

Ao final do oitavo dia, os animais foram submetidos a um jejum de 12h e em seguida anestesiados com quetamina e xilazina. O sangue por rompimento do plexo retro-orbital com auxílio de capilar de vidro (FIOCRUZ, 2008; WAYNFORTH, 1980). O sangue foi dividido em dois tipos de tubo: um com EDTA (parâmetros hematológicos) e o outro sem anticoagulante (parâmetros bioquímicos).

As análises hematológica, bioquímica e histopatológica foram realizadas conforme metodologia descrita nos itens 3.8.4.4, 3.8.4.5 e 3.8.4.6.



4. Resultados e Discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo da Toxicidade subcrônica

4.1.1 Variação de peso corpóreo em machos e fêmeas de ratos Wistar tratados com diferentes doses de EE de *C. echinata*

Na tabela 4.1 podem ser visualizados os valores médios e os respectivos desvios padrões do peso corpóreo de ratos machos adultos de diferentes grupos de tratamento, com ou sem EE de *C. echinata*. Na figura 4.1 podem ser visualizadas as linhas de tendência da variação temporal do peso corpóreo dos animais acima mencionados. Os parâmetros de regressão referentes às respectivas linhas de tendência podem ser visualizados na tabela 4.2, considerando-se uma função matemática do tipo $y = a.x + b$, onde “y” representa o peso corpóreo (g), “x” representa o tempo (dias), “a” representa o coeficiente angular e “b” representa o coeficiente linear. O parâmetro “R²” representa o coeficiente de determinação da função, ou seja, trata-se do parâmetro que assinala a fidedignidade da expressão em descrever a relação entre as variáveis em destaque.

TABELA 4.1 - Peso corpóreo de ratos machos (g), tratados com diferentes doses de EE de *C. echinata* por 28 dias consecutivos.

Dias	C	T1	T2	T3
0	307±35,51	317±28,26	298±35,11	299±26,49
7	304±30,26	332±29,22	313±41,64	307±19,68
14	331±34,23	344±32,54	325±42,29	324±26,08
21	340±36,42	356±33,73	332±43,75	330±20,45
28	344±33,67	364±32,68	321±22,25	331±26,06

OBS: C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/kg ; T2 – animais tratados com 150mg/kg; T3 – animais tratados com 300mg/kg.

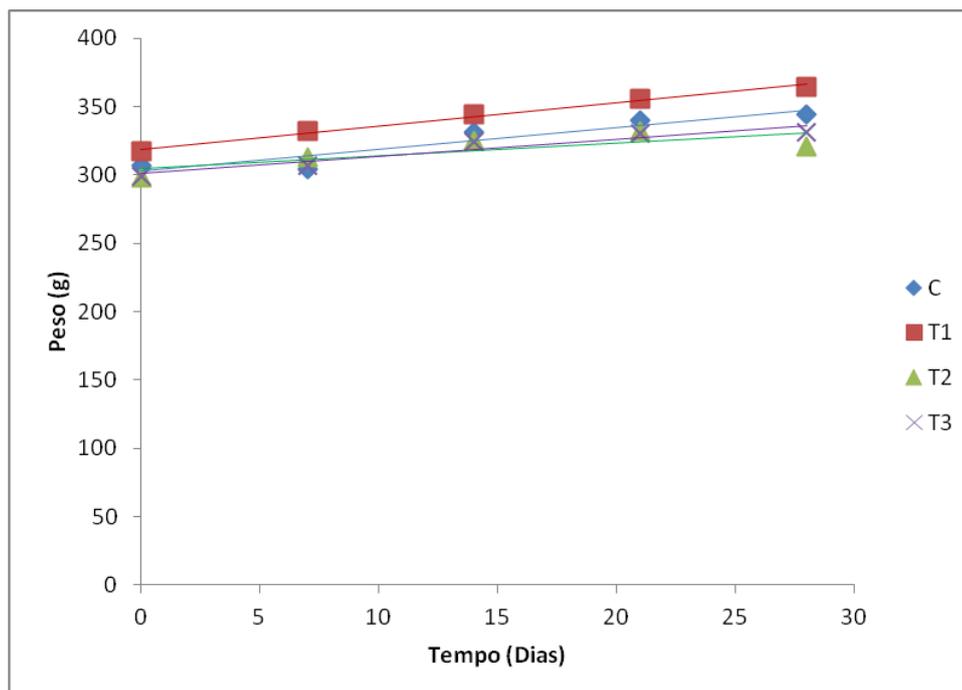


FIGURA 4.1 - Variação temporal do peso corpóreo de ratos machos adultos submetidos a diferentes tratamentos com EE de *C. echinata*. C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/kg ; T2 – animais tratados com 150mg/kg; T3 – animais tratados com 300mg/kg.

TABELA 4.2 - Parâmetros de regressão das linhas de tendência que descrevem a variação de peso corpóreo em ratos machos sob diferentes condições de tratamento com EE *C. echinata*.

Parâmetros/Tratamentos	C	T1	T2	T3
a	1,57	1,69	0,93	1,24
b	303,20	319,00	304,80	300,80
R ²	0,873	0,990	0,622	0,911

OBS: C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/kg ; T2 – animais tratados com 150mg/kg; T3 – animais tratados com 300mg/kg. Coeficiente angular (a); coeficiente linear (b); coeficiente de determinação (R²). Coeficiente angular – a; coeficiente linear – b; coeficiente de determinação - R².

Ainda tabela 4.2 observou-se que os coeficientes angulares variaram conforme o tipo de tratamento aplicados. Aqui, entretanto, é importante assinalar que o coeficiente angular representa a taxa de variação do peso em função do tempo, por sua vez significando que os animais apresentaram taxas de variação de peso diferentes conforme o tratamento, caracterizando os impactos que o EE de *C. echinata* proporcionou sobre o metabolismo destes animais, conforme a dose

utilizada. Efetuando-se, contudo, a razão das respectivas taxas encontradas (Figura 4.2), tomando-se como referência os animais do grupo controle, verificou-se que o ganho de massa apresentado pelos animais do grupo T1 foi praticamente igual ao ganho de massa dos animais do grupo controle, uma vez que a razão obtida para T1 = 1,08.

Observou-se observar que para a dose de 150mg/kg (grupo T2) de EE de *C. echinata* causa uma redução na taxa de ganho de peso da ordem de 41% em relação ao grupo controle. Trata-se, portanto, de uma redução importante do ponto de vista metabólico.

É curioso o fato de que a razão para T3 seja igual a 0,79, equivalente a um decréscimo do ganho de massa corpórea de 21%, apesar de ter sido administrada uma dose maior em relação a T2. Com relação a este resultado, pode-se deduzir a possibilidade de um efeito não necessariamente dose-dependente, provavelmente por haver restrições metabólicas do organismo quanto à presença de substratos moleculares provenientes do EE de *C. echinata*, da dose empregada, que venham a interferir em mecanismos importantes em alguma dimensão deste mesmo processo metabólico.

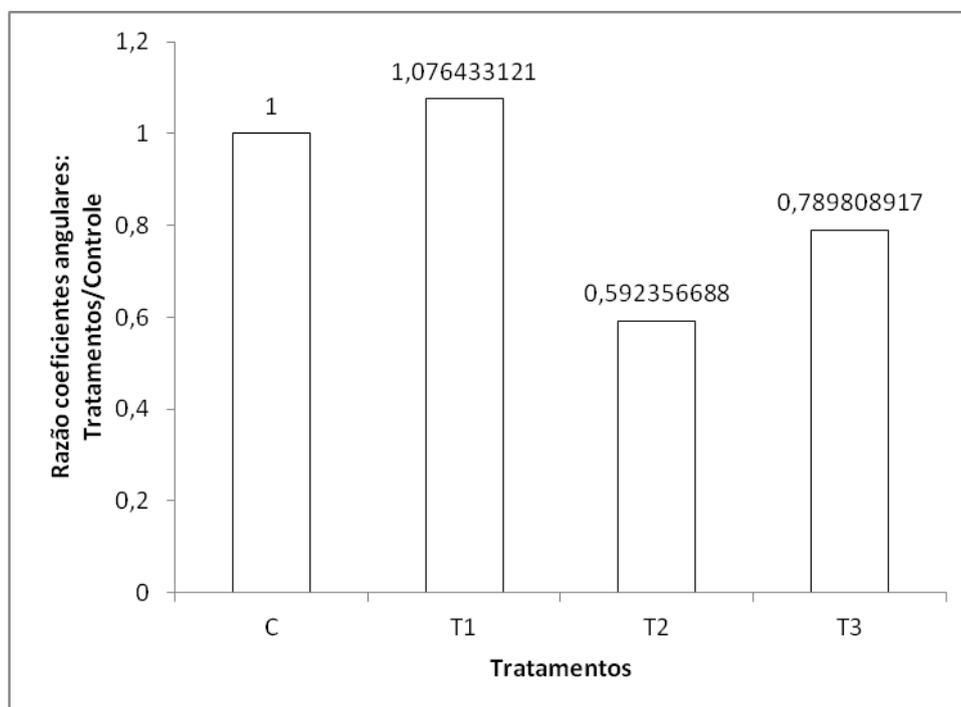


FIGURA 4.2 - Razão entre as taxas de variação de peso em ratos conforme o tipo de tratamento empregado, tomando-se como referência a taxa de variação de peso dos animais do grupo controle. C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/kg ; T2 – animais tratados com 150mg/kg; T3 – animais tratados com 300mg/kg. Coeficiente angular (a); coeficiente linear (b); coeficiente de determinação (R^2).

Na tabela 4.3 podem ser visualizados os valores de peso corpóreo e os respectivos desvios padrões de ratas adultas sob diferentes condições de tratamento com EE de *C. echinata*. Estes dados podem ser melhor visualizados graficamente na figura 4.3.

Uma visão atenta nesta figura 4.3 nos permite observar que o comportamento das curvas que descrevem a variação temporal do peso corpóreo foi diferente, ou seja; as curvas apresentaram-se decrescentes. Isto pode ser confirmado pelo sinal do coeficiente angular negativo, como mostram os dados da tabela 4.4. Considerando-se o coeficiente angular das funções matemáticas obtidas como taxas de variação do ganho de massa em função de tempo, pode ser observado que os valores do coeficiente angular foram característicos em relação à dose de EE Ce utilizada, embora decrescentes; em outras palavras, a taxa de ganho de massa foi afetada pelo tipo de tratamento aplicado de forma dose não-dependente.

Na figura 4.4 podem ser visualizadas as razões entre as respectivas taxas tomando-se como referência os animais do grupo controle. Nesta figura pode ser observado que nas fêmeas do grupo T1 verificou-se a maior taxa de perda de massa em relação aos demais tratamentos, o que por si só demonstra um comportamento diferente em relação aos grupos dos machos. De certo modo, isto demonstra diferenças importantes do ponto de vista metabólico, uma vez que fêmeas parecem ser mais sensíveis ao tratamento efetuado com EE Ce, com provável consequências estruturais e operacionais sobre diferentes aspectos do metabolismo desta espécie de animal.

TABELA 4.3 - Peso corpóreo de ratas adultas (g), tratadas com diferentes doses de EE de *C. echinata* por 28 dias consecutivos.

Dias	C	T1	T2	T3
0	247,17±12,14	248,50±33,20	232,67±18,40	273,00±7,64
7	240,92±12,70	253,17±21,62	241,50±17,32	273,50±7,56
14	246,50±15,35	240,83±25,06	235,00±24,51	260,17±9,95
21	241,42±13,42	244,33±20,95	226,20±16,53	264,33±6,56
28	252,83±17,01	230,80±17,22	226,80±17,48	263,17±7,83

OBS: C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/kg; T2 – animais tratados com 150mg/kg; T3 – animais tratados com 300mg/kg.

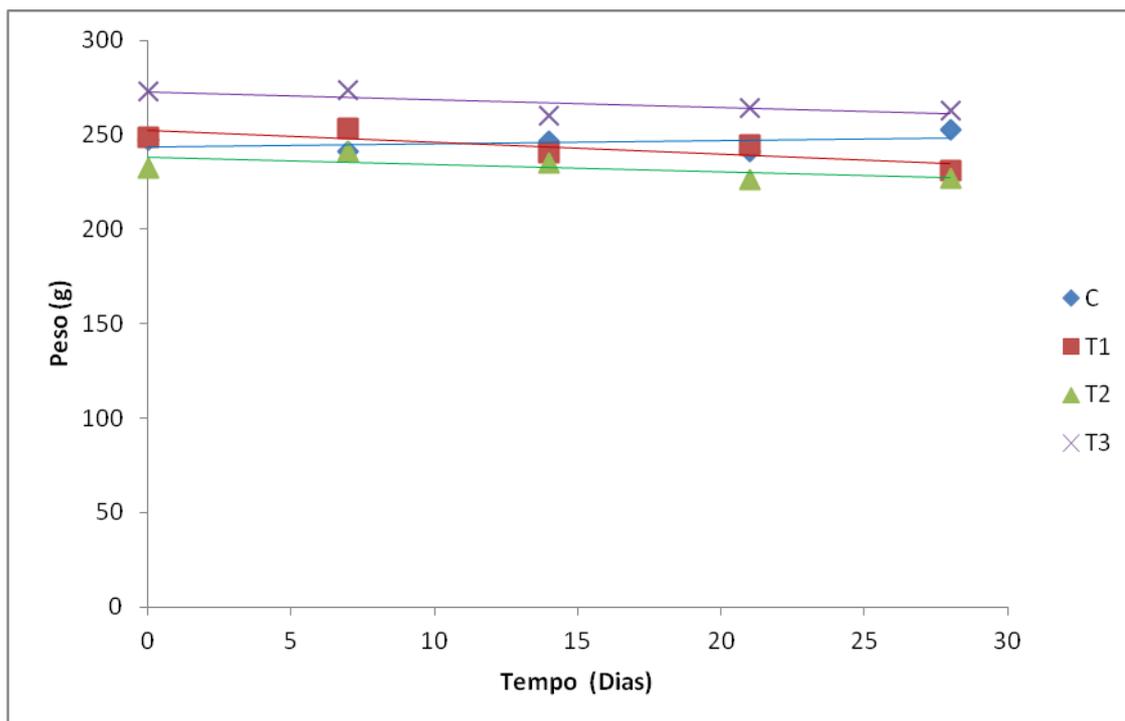


FIGURA 4.3 - Variação temporal do peso corpóreo de ratas adultas submetidas a diferentes tratamentos com EE de *C. echinata*. C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/kg ; T2 – animais tratados com 150mg/kg; T3 – animais tratados com 300mg/kg.

TABELA 4.4 - Parâmetros de regressão das linhas de tendência que descrevem a variação de peso corpóreo em ratas sob diferentes condições de tratamento com EE *C. echinata*.

Parâmetros/Tratamentos	C	T1	T2	T3
a	0,169	-0,632	-0,386	-0,412
b	243,40	252,37	237,84	272,60
R ²	0,148	0,681	0,458	0,567

OBS: C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/kg ; T2 – animais tratados com 150mg/kg; T3 – animais tratados com 300mg/kg. Coeficiente angular (a); coeficiente linear (b); coeficiente de determinação (R²). Coeficiente angular – a; coeficiente linear – b; coeficiente de determinação - R².

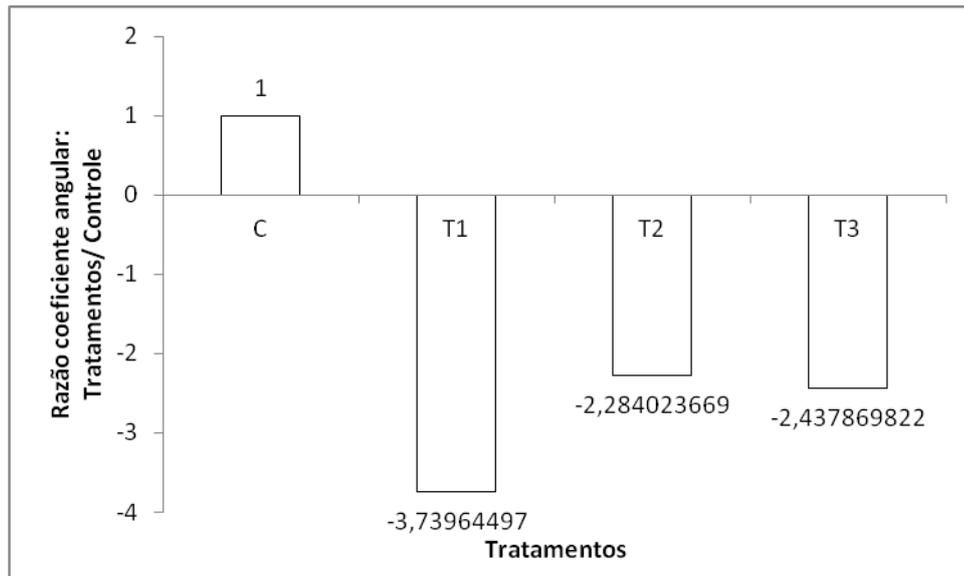


FIGURA 4.4 - Razão entre as taxas de variação de peso em ratas conforme o tipo de tratamento empregado, tomando-se como referência a taxa de variação de peso dos animais do grupo controle. C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/kg ; T2 – animais tratados com 150mg/kg; T3 – animais tratados com 300mg/kg. Coeficiente angular (a); coeficiente linear (b); coeficiente de determinação (R^2).

Uma razão entre as taxas obtidas para as fêmeas tratadas em relação aos machos tratados, ambos com diferentes doses de EE de *C. echinata* pode ser observada na figura 4.5. Nesta figura pode-se observar que o comportamento inibitório prevalece, caracterizando um maior impacto dos tratamentos sobre as fêmeas do que em relação ao machos, com valores de razão inferiores a 0,5 ou seja as taxas obtidas para as fêmeas foram inferiores a 50% em relação às taxas de crescimento corpóreo obtidas para os machos, no geral.

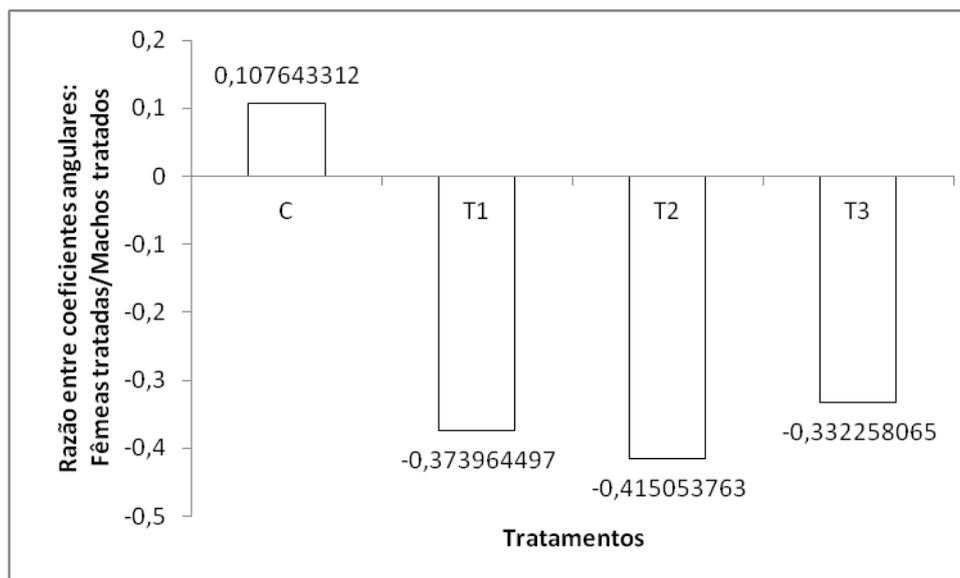


FIGURA 4.5. - Razão entre as taxas de variação de peso em ratas conforme o tipo de tratamento empregado, tomando-se como referência a taxa de variação de peso dos ratos sob mesma condição de tratamento. C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/kg; T2 – animais tratados com 150mg/kg; T3 – animais tratados com 300mg/kg. Coeficiente angular (a); coeficiente linear (b); coeficiente de determinação (R^2).

Possivelmente, na composição destes extratos existe pelo menos uma substância que interfere sobre os mecanismos de atividade metabólica dos organismos avaliados, atuando tanto sobre o anabolismo, reduzindo-o; como no catabolismo, aumentando o processo de conversão molecular em energia metabólica; vale lembrar que grande parte dessa energia pode estar sendo perdida na forma de calor, aumentando, portanto, a entropia do sistema.

Uma hipótese para a alteração do processo metabólico dos ratos, seria em relação às propriedades dos polifenóis presentes no extrato em interferir no metabolismo (LUNA et al., 2005; REZENDE et al., 2004; SILVA, 2006), seja alterando a competência frente a digestibilidade dos macronutrientes, uma vez que são capazes de formar complexos com proteínas e alguns minerais, evitando a sua absorção; ou através da alteração do metabolismo celular ativando a via glicolítica (MOON, et al. 1993) e/ou estimulando a oxidação lipídica (LAMARÃO; FIALHO, 2009; SÖHLE et al., 2009;).

YOU et al. (2005). mencionaram a capacidade da brasilina em interferir na oxidação da glicose e na lipogênese. Sabe-se que esta molécula é capaz de aumentar a atividade da fosfofrutoquinase 2 (PFK-2) além de elevar os níveis de frutose-6-fosfato (F-6-P)/hexose-6-fosfato(H-6-P), contribuindo para a produção de frutose 2,6- bisfosfato, levando à inibição da gliconeogênese nos hepatócitos. Além

disso, a brasilina também aumenta a glicólise, uma vez que se observa elevação da atividade da piruvato quinase.

A fim de analisar as variações de peso de forma mais detalhada, procurou-se avaliar as variações de massa por período temporal. Na tabela 4.5 podem ser observados os valores correspondentes à variação temporal da diferença de peso corpóreo de ratos machos tratados com diferentes doses de EE de *C. echinata* por 28 dias. Estes dados podem ser melhor visualizados na figura 4.6. Nesta figura observa-se que todos os animais, independente do tratamento apresentaram um ganho de massa “real” descrito por uma função do tipo quadrática, cujos parâmetros de regressão podem ser visualizados na tabela 4.6.

TABELA 4.5 - Variação temporal da diferença de peso corpóreo de ratos machos (g), tratados com diferentes doses de EE de *C. echinata* por 28 dias consecutivos.

Dias	C	T1	T2	T3
0	0	0	0	0
7	-3	15	15	9
14	27	12	7	6
21	9	12	7	6
28	4	8	-11	1
Media	9,25	11,75	5,75	8,25
Dp	12,82	2,87	11,64	6,70
Σ	37	47	23	33

OBS: C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/kg ; T2 – animais tratados com 150mg/kg; T3 – animais tratados com 300mg/kg. Dp – Desvio padrão. Σ – Somatório.

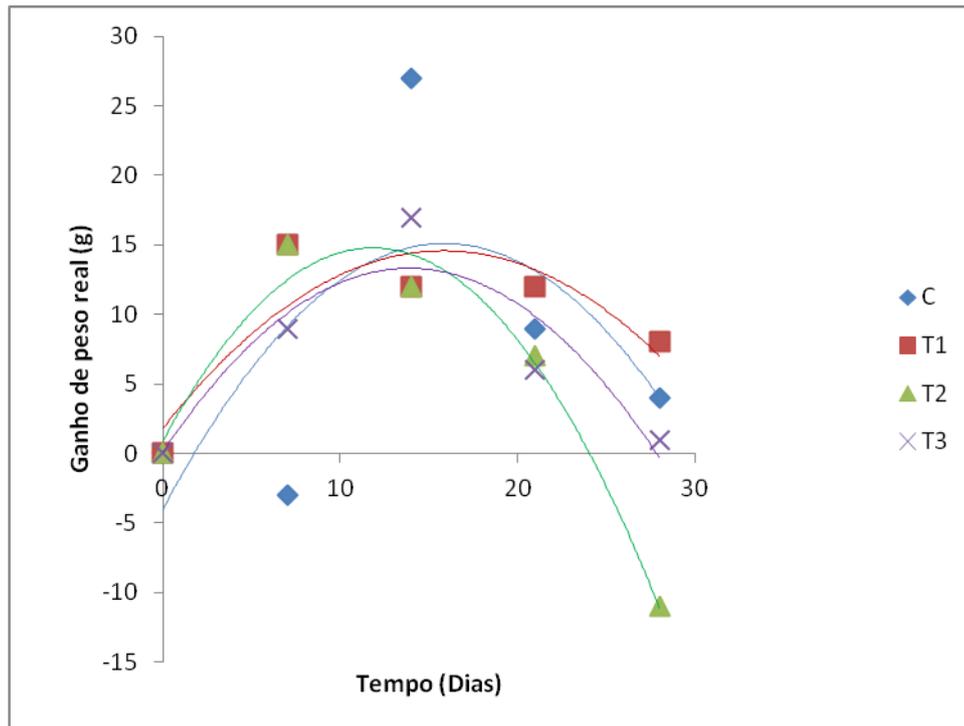


FIGURA 4.6 - Variação temporal da diferença de peso em ratos submetidos a diferentes condições de tratamento EE *C. echinata*. C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/kg; T2 – animais tratados com 150mg/kg; T3 – animais tratados com 300mg/kg.

Um primeiro aspecto que pode ser chamado à atenção é que a variação de ganho de peso “real” descrita por uma função do tipo quadrática, admite uma derivada de primeira ordem do tipo linear, que em outras palavras significa que em relação a taxa “real”, varia, em função do tempo. Sendo assim, observando-se o valor do coeficiente “a” da função, pode-se verificar que independente do tratamento, o seu valor foi negativo, significando que os gráficos apresentavam concavidade voltada para baixo. Um significado importante disto é que em todas as funções pode-se admitir um valor máximo, que para todos os tratamentos ficou dentro de intervalo de 11 a 16 dias, muito embora em T2 e T3 pareça ocorrer uma antecipação do ponto de efeito máximo em relação ao controle, embora este efeito tenha melhor sido observado em T2, conforme pode-se observar na tabela 9. Após este período, para todos os tratamentos, ocorreu diminuição gradual do ganho “real” de massa.

O que está caracterizado acima denuncia um importante efeito dos tratamentos sobre a atividade metabólica dos animais avaliados, embora este ponto de atividade máxima não tenha se afastado muito do valor obtido para os animais do grupo controle. Estes resultados também mostram que os organismos parecem exibir um ritmo de variação de atividade metabólica, que é ajustado conforme as

necessidades fisiológicas do organismo levando-se em consideração o contexto de estímulos sob o qual estes organismos estão submetidos (ARAUJO; MARQUES, 2002; MOURA; SILVA, 2010).

TABELA 4.6 - Parâmetros de regressão das linhas de tendência que descrevem a variação da diferença de peso corpóreo em ratos sob diferentes condições de tratamento com EE *C. echinata*.

Parâmetros/Tratamentos	C	T1	T2	T3
a	-0,076	-0,051	-0,099	-0,069
b	2,408	1,614	2,347	1,904
c	-4,029	1,800	0,886	0,086
R ²	0,415	0,772	0,970	0,835

OBS: C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/Kg ; T2 – animais tratados com 150mg/Kg; T3 – animais tratados com 300mg/Kg. Coeficientes – a, b, c de uma função quadrática do tipo $Y = a \cdot X^2 + b \cdot X + c$; coeficiente de determinação - R².

Na tabela 4.7 podem ser visualizados os valores correspondentes à variação temporal da diferença de peso corpóreo de ratas tratadas com diferentes doses de EE de *C. echinata* por 28 dias. Estes dados podem ser adequadamente visualizados na figura 4.7. Nesta figura observa-se que todos os animais, independente do tratamento também, a exemplo dos machos, apresentaram um ganho de massa “real” descrito por uma função do tipo quadrática, cujos parâmetros de regressão podem ser visualizados na tabela 4.8.

TABELA 4.7 - Variação temporal da diferença de peso corpóreo de ratas (g), tratadas com diferentes doses de EE de *C. echinata* por 28 dias consecutivos.

Dias	C	T1	T2	T3
0	0	0	0	0
7	-6,250	4,667	8,833	0,500
14	5,583	-12,333	-6,500	-13,333
21	-5,083	3,500	-8,800	4,166
28	11,417	-13,533	0,600	-1,167
Media	1,417	-4,425	-1,467	-2,458
Dp	8,532	9,848	7,947	7,584
Σ	5,667	-17,700	-5,867	-9,834

OBS: C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/Kg ; T2 – animais tratados com 150mg/Kg; T3 – animais tratados com 300mg/Kg. Dp – Desvio padrão. Σ – Somatório.

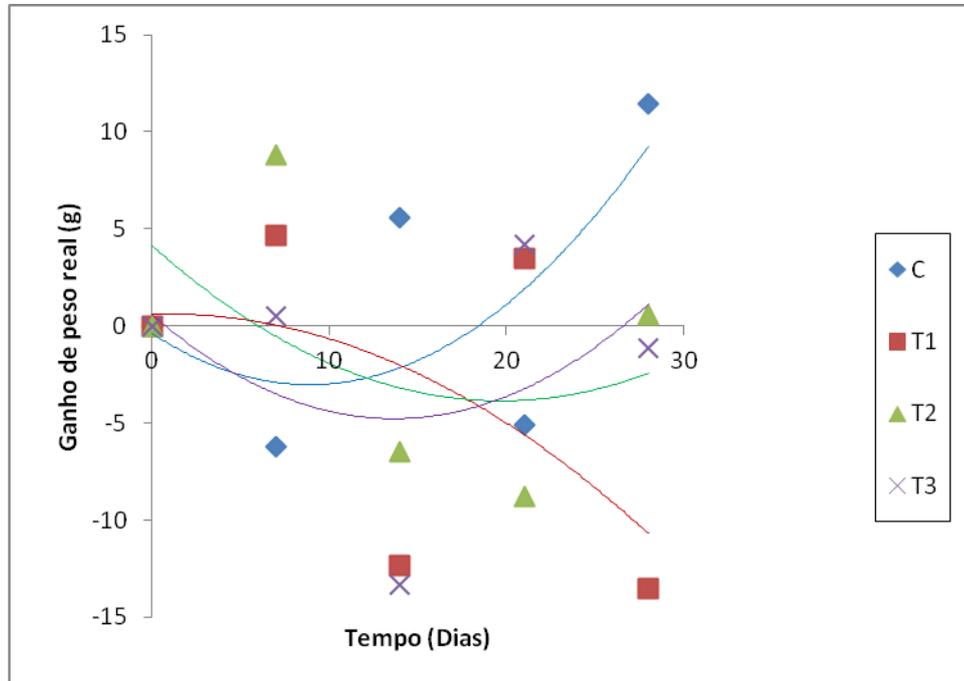


FIGURA 4.7 - Variação temporal da diferença de peso em ratos submetidas a diferentes condições de tratamento com EE *C. echinata*. C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/Kg ; T2 – animais tratados com 150mg/Kg; T3 – animais tratados com 300mg/Kg.

TABELA 4.8. - Parâmetros de regressão das linhas de tendência que descrevem a variação da diferença de peso corpóreo em ratos sob diferentes condições de tratamento com EE *C. echinata*.

Parâmetros/Tratamentos	C	T1	T2	T3
a	0,034	-0,015	0,021	0,029
b	-0,596	0,028	-0,813	-0,784
c	-0,381	0,597	4,137	0,576
R ²	0,434	0,286	0,216	0,157

OBS: C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/Kg ; T2 – animais tratados com 150mg/Kg; T3 – animais tratados com 300mg/Kg. Coeficientes – a, b, c de uma função quadrática do tipo $Y = a.X^2 + b.X + c$; coeficiente de determinação - R².

Um primeiro aspecto é que o comportamento observado para as fêmeas foi diferente em relação àquele observado para os machos. A começar pelas concavidades. Em T1 verificou-se uma concavidade para baixo, enquanto que para os demais grupos visualizou-se uma concavidade para cima, como pode ser verificado na expressão do sinal do coeficiente “a” das funções obtidas, conforme os dados na tabela 4.8. Em T1 vemos a presença de um ponto máximo próximo do início do tratamento (tempo zero), cujo acréscimo de massa decaiu até o final do experimento. Com relação aos animais do grupo controle, verificou-se que estes também apresentaram não um ponto de máximo, mas de mínimo, ou seja, um ponto onde a taxa de perda de peso era a maior possível.

Quanto a T2 e T3 verificou-se que doses maiores de EE *C. echinata* parecem deslocar o ponto de mínimo, em relação ao que se observou para o grupo controle, como se houvesse uma espécie de retardo na reação do metabolismo em protagonizar ações que redundem em acréscimo de massa nos organismos avaliados, de acordo com os dados da tabela 4.9. O maior deslocamento temporal do ponto de mínimo foi observado para os animais do tratamento T2. Nos grupos que apresentaram um ponto de mínimo, inclusive os animais do grupo controle, destaca-se que a partir deste ponto, os animais apresentaram um ganho de massa, mas de forma pouco expressiva em relação ao que se observou para os machos submetidos às mesmas condições de tratamento.

TABELA 4.9 - Parâmetros de derivação das expressões matemáticas que descrevem as linhas de tendência da variação temporal da diferença de peso corpóreo em ratos e ratas submetidos a diferentes tipos de tratamentos com EE *C. echinata*.

Tratamentos	Ratos			Ratas		
	a	b	P	a	b	P
C	-0,152	2,408	15,885 _M	0,067	-0,596	8,894 _m
T1	-0,102	1,614	15,827 _M	-0,031	0,028	0,909 _M
T2	-0,198	2,347	11,841 _M	0,041	-0,813	19,638 _m
T3	-0,137	1,904	13,899 _M	0,057	-0,784	13,653 _m

OBS: C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/Kg ; T2 – animais tratados com 150mg/Kg; T3 – animais tratados com 300mg/Kg. Parâmetros de derivação: Coeficiente angular – a; coeficiente linear – b; P ponto onde a função é máxima ou mínima, conforme o sinal do coeficiente angular da função derivada. Máximo – M; mínimo – m.

O que está assinalado acima também denuncia um importante efeito dos tratamentos sobre a atividade metabólica das fêmeas avaliadas, assinalando um comportamento característico conforme a dose empregada, não conservando-se sinais de efeito do tipo dose-dependente. Estes resultados também assinalam que as fêmeas apresentaram um ritmo de variação de atividade metabólica diferente dos machos, sendo afetados com mais ênfase conforme as doses de EE de *C. echinata* empregadas.

O aumento ou diminuição do peso corporal dos animais pode representar alterações fisiológicas importantes, tais como: hepática, hormonais ou até mesmo no prejuízo de absorção de proteínas, aminoácido entre outros. Em nosso estudo observou-se alteração do ganho de massa corporal tanto nos machos quanto nas fêmeas, sendo que nestas o efeito foi mais intenso. Este resultado é indicativo de toxicidade sistêmica provocada pela administração oral repetida de EE de *C. echinata*. A maior sensibilidade de fêmeas aos efeitos tóxicos de vários xenobióticos é relatada para esta espécie de animal, provavelmente devido à diferença de metabolismo entre os sexos (OSWEILER, 1998, USHIROBIRA, 2003).

4.1.2 Consumo de água e alimento de ratos e ratas tratados com EE de *C. echinata*.

O monitoramento da massa corporal e do consumo de água e alimentos pelo animal é um importante indicador para a avaliação da toxicidade de uma substância (JAHN; GÜNZEL, 1997; HAMMOND; et al.; 2006).

Os dados referentes ao consumo médio de água e de alimento em ratos e ratas, ambos tratados com diferentes doses de EE de *C. echinata* podem ser visualizados na tabela 4.10. Nas figuras 4.8 e 4.9 visualizam-se as variações temporais de consumo de água e de alimento para ratos machos, respectivamente. Nestas figuras, pode-se verificar que ambos os tipos de consumo variavam ritmicamente, conforme o tratamento. Nos animais tratados com as doses de EE de *C. echinata* de 75mg/Kg e de 150mg/Kg parece ter diminuído a amplitude de variação do consumo de água, entre os diferentes períodos observados. Mas na

dose de 300mg/Kg houve um aumento de amplitude do consumo de água pelos animais. De certo modo, isto assinala que EECe tem impacto importante nos mecanismos fisiológicos que controlam os parâmetros de hidratação de organismo, sugerindo ações sobre os compartimentos neurológicos associados centralmente (CAMBRAIA, 2004).

Com relação ao consumo de alimento, verificou-se que diferenças significativas em relação ao grupo controle só foram visualizadas quando os animais recebiam EE de *C. echinata* na dose de 75mg/Kg, não sendo observado um comportamento rítmico, e os animais elevaram o consumo de alimento até a fase final do experimento. É interessante assinalar que neste mesmo período, os animais deste grupo apresentaram um consumo de água crescente até o sétimo dia, mas decaindo continuamente até a fase final.

De certo modo, isto pode significar mudanças fisiológicas importantes não só quanto às características metabólicas assumidas, como também quanto às condições cardiocirculatórias; uma vez que menor volume de líquido ingerido, pode significar redução da competência metabólica de alguns tecidos, em especial o sistema renal (SOUZA, 2012).

TABELA 4.10 - Consumo médio de água e alimento, e peso corpóreo em ratos e ratas submetidos a diferentes tipos de tratamentos com EE *C. echinata* por 28 dias.

Trat.	Ratos			Ratas		
	Água (mL)	Ração (g)	Peso (g)	Água (mL)	Ração (g)	Peso (g)
C	274,6±102,0	114,8±45,5	325,2±18,6	215,0±65,0	102,0±24,1	245,8±4,9
T1	254,0±46,3	139,9±96,6	342,6±18,7	427,2±130,2	338,2±104,9	243,5±8,5
T2	242,4±58,2	108,7±39,1	317,8±13,0	348,0±184,6	324,0±92,0	232,4±6,3
T3	221,4±108,9	106,9±40,1	318,2±14,4	292,0±204,6	274,8±125,2	266,8±6,1

OBS: Trat. – tratamentos; C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/Kg ; T2 – animais tratados com 150mg/Kg; T3 – animais tratados com 300mg/Kg. Total de animais por grupo n = 6.

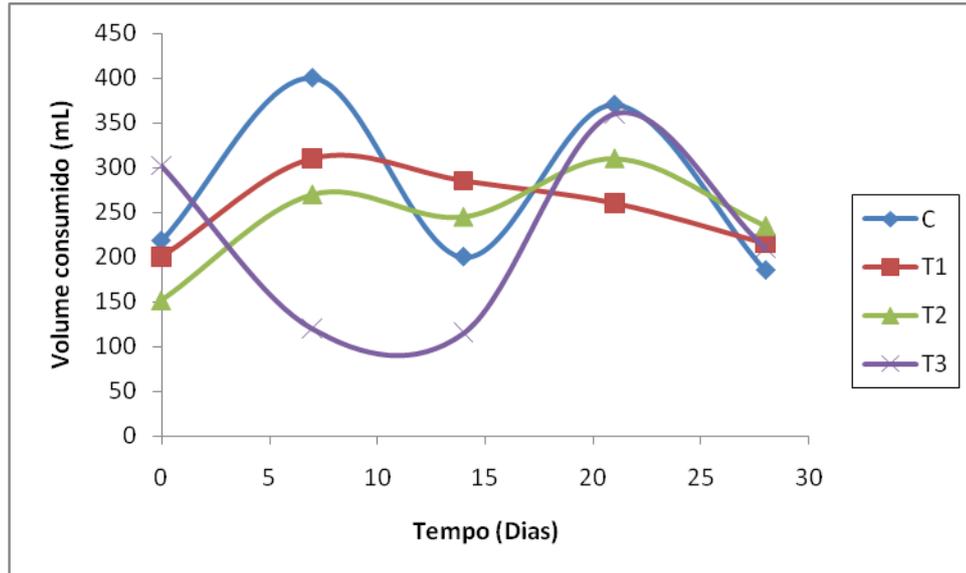


FIGURA 4.8 - Consumo médio de água em ratos submetidos a diferentes tratamentos com EE de *C. echinata*, ao longo de 28 dias. C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/kg ; T2 – animais tratados com 150mg/kg; T3 – animais tratados com 300mg/kg.

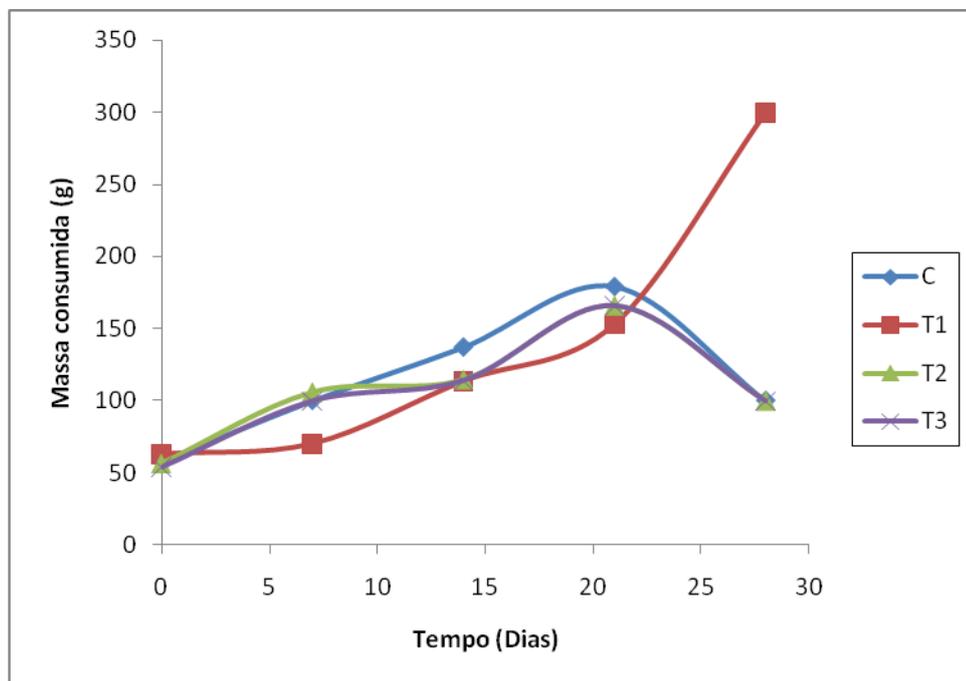


FIGURA 4.9 - Consumo médio de alimento em ratos submetidos a diferentes tratamentos com EE de *C. echinata*, ao longo de 28 dias. C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/kg ; T2 – animais tratados com 150mg/kg; T3 – animais tratados com 300mg/kg.

Na figuras 4.10 e 4.11 podem ser verificadas as variações de consumo de água e de alimento para ratas sob diferentes condições de tratamento com EE de *C. echinata*. Nestas figuras pode ser observado que tanto em relação ao

consumo de água como de alimento, os padrões rítmicos foram alterados de modo diferente em relação às variações encontradas para machos. O consumo de água pelas fêmeas parece ter sido estimulado pela presença de EE de *C. echinata*, uma vez que a amplitude de consumo foi aumentada em todos os casos. Já com relação ao consumo de alimento verificou-se que em fêmeas tratadas os ritmos foram relativamente semelhantes, embora diferentes em relação ao consumo observado para as fêmeas quando comparado ao grupo controle.

De certo modo, estes dados assinalam que o comportamento metabólico das fêmeas parece apresentar características peculiares em relação ao metabolismo dos machos, sendo muito mais sensíveis aos efeitos proporcionados por EE de *C. echinata*.

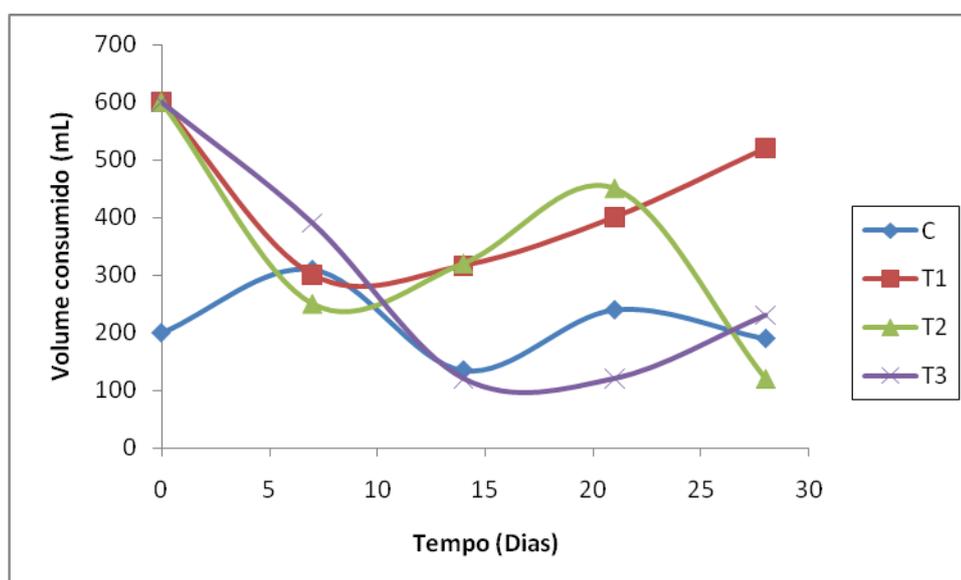


FIGURA 4.10 - Consumo médio de água em ratas submetidas a diferentes tratamentos com EE de *C. echinata*, ao longo de 28 dias. C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/kg ; T2 – animais tratados com 150mg/kg; T3 – animais tratados com 300mg/kg.

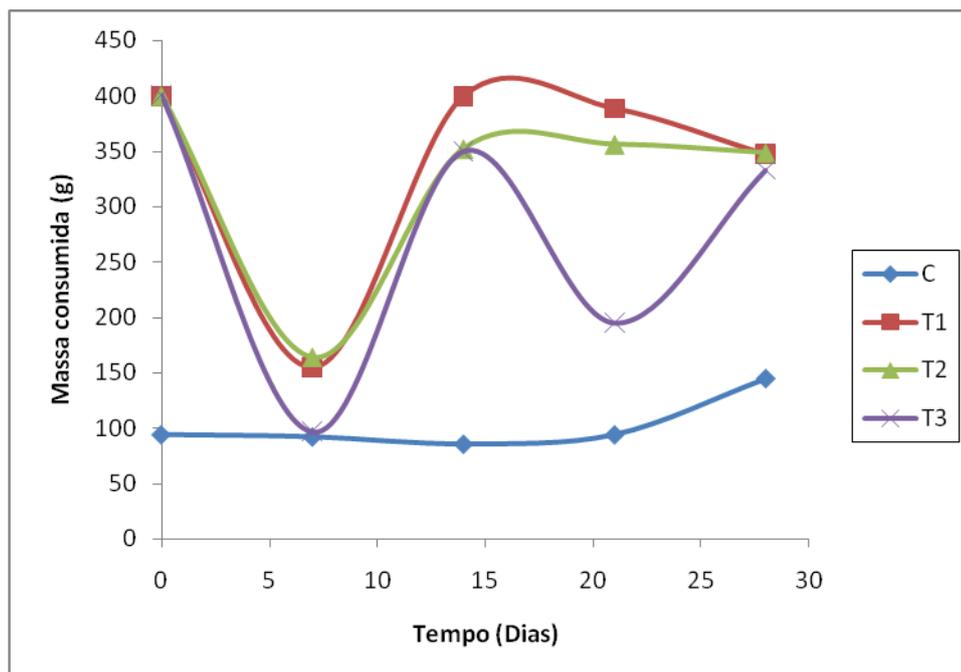


FIGURA 4.11 - Consumo médio de alimento em ratas submetidas a diferentes tratamentos com EE de *C. echinata*, ao longo de 28 dias. C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/kg; T2 – animais tratados com 150mg/kg; T3 – animais tratados com 300mg/kg.

Com a necessidade de se verificar de modo integrado o consumo de água e de alimento conforme a dose empregada de EE de *C. echinata*, foram construídas as tabelas 4.11 e 4.12 respectivamente para ratos e ratas. A ilustração dos comportamentos integrados pode ser observada respectivamente nas figuras 4.12 e 4.13. Em ambas as figuras, ficou caracterizado que a relação de consumo água e alimento apresenta um ritmo característico, como se pode observar no traçado gráfico para os animais do grupo controle em ambas as figuras. Mas com o aumento na dose de EE *C. echinata* tanto em machos como em fêmeas a relação de consumo água/alimento foi afetada de modo acentuado de acordo com o aumento da dose; o que revela um efeito importante sobre os centros neurológicos que coordenam os padrões de atividade fisiológica que estes organismos normalmente deveriam cumprir (CAMBRAIA, 2004). Possivelmente, este decréscimo na ingestão de água e alimento se relacione com as alterações, mencionadas anteriormente, quando nos reportamos às mudanças nos padrões de ganho de massa corpórea.

TABELA 4.11 - Relação entre consumo de água e alimento em ratos adultos (mL/g), tratados com diferentes doses de EE de *C. echinata* por 28 dias consecutivos.

Dias	C	T1	T2	T3
0	3,77	3,18	2,68	5,58
7	4,00	4,43	2,55	1,20
14	1,46	2,51	2,14	1,01
21	2,07	1,70	1,87	2,17
28	1,85	0,72	2,35	2,10

OBS: C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/kg; T2 – animais tratados com 150mg/kg; T3 – animais tratados com 300mg/kg.

TABELA 4.12 - Relação entre consumo de água e alimento em ratas adultas (mL/g), tratadas com diferentes doses de EE de *C. echinata* por 28 dias consecutivos.

Dias	C	T1	T2	T3
0	2,13	1,50	1,50	1,50
7	3,37	1,94	1,53	4,03
14	1,58	0,79	0,91	0,34
21	2,55	1,03	1,26	0,62
28	1,31	1,50	0,34	0,69

OBS: C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/kg; T2 – animais tratados com 150mg/kg; T3 – animais tratados com 300mg/kg.

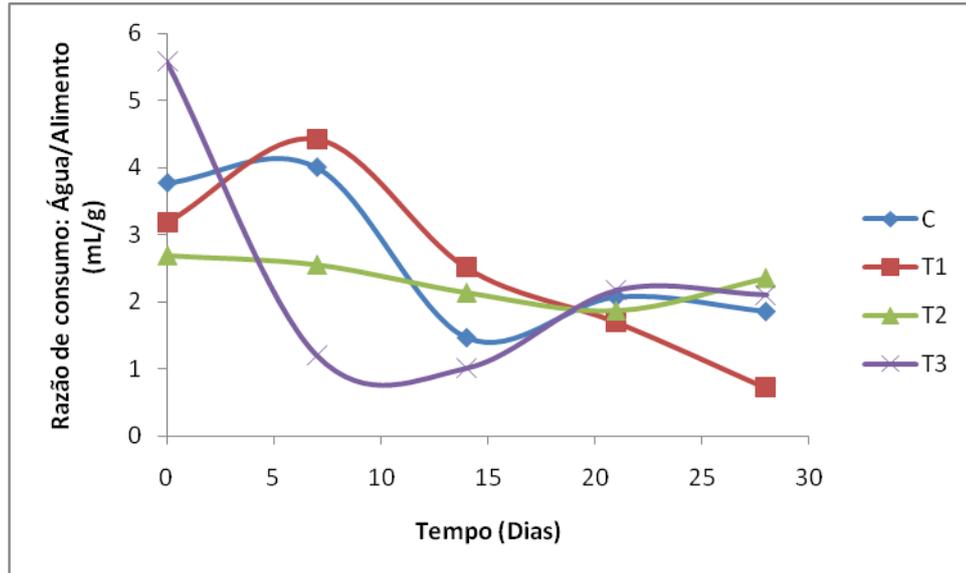


FIGURA 4.12 - Razão entre consumo médio de água e alimento em ratos submetidos a diferentes tratamentos com EE de *C. echinata*, ao longo de 28 dias. C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/kg ; T2 – animais tratados com 150mg/kg; T3 – animais tratados com 300mg/kg.

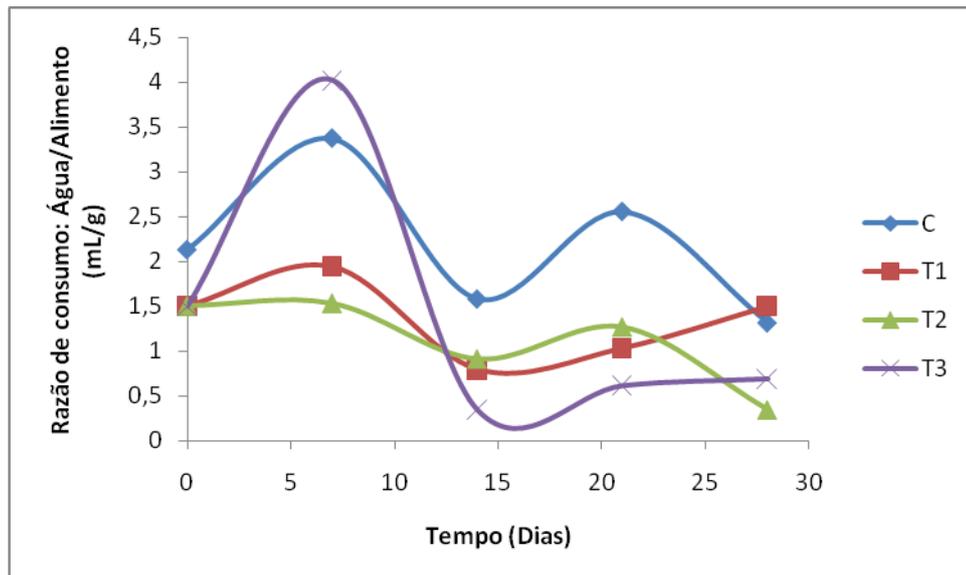


FIGURA 4.13 - Razão entre consumo médio de água e alimento em ratos submetidas a diferentes tratamentos com EE de *C. echinata*, ao longo de 28 dias. C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/kg ; T2 – animais tratados com 150mg/kg; T3 – animais tratados com 300mg/kg.

Na tentativa de se buscar um modo mais simples de se avaliar as tendências de variação dos rítmicos de consumo de água e de alimento apresentados acima, foram construídas as figuras 4.14 e 4.15 referentes às linhas de tendência do consumo assinalado tanto para machos como para fêmeas tratadas com EE de *C. echinata*. Nestas figuras pode-se observar que a inclinação das curvas obtidas foi decrescente, fato confirmado pelo sinal negativo do coeficiente angular das funções

matemáticas que descrevem estas linhas de tendência como assinalam os dados mostrados na tabela 4.13. Em linhas gerais, significa que em ambas as condições existiu uma tendência geral de redução da relação consumo de água/alimento, mesmo para os animais do grupo controle. Mas um fato interessante a ser notado foi que em machos tratados com 75mg/kg de EE de *C. echinata* o decaimento da relação de consumo água/alimento foi mais pronunciado (maior inclinação), embora, com relação às fêmeas tratadas com a mesma dose, tenha ocorrido o menor decaimento em relação aos demais tratamentos, acentuando, uma vez mais a diferença de comportamento dos animais quanto ao gênero frente a dosagens específicas de EE de *C. echinata*.

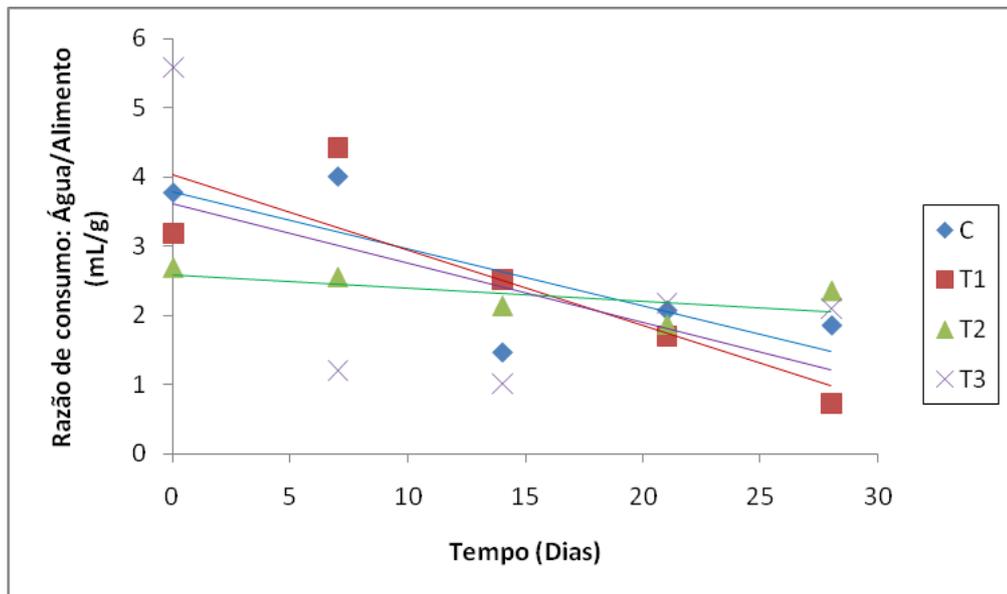


FIGURA 4.14 - Linhas de tendência da razão entre consumo médio de água e alimento em ratos submetidos a diferentes tratamentos com EE de *C. echinata*, ao longo de 28 dias. C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/kg ; T2 – animais tratados com 150mg/kg; T3 – animais tratados com 300mg/kg.

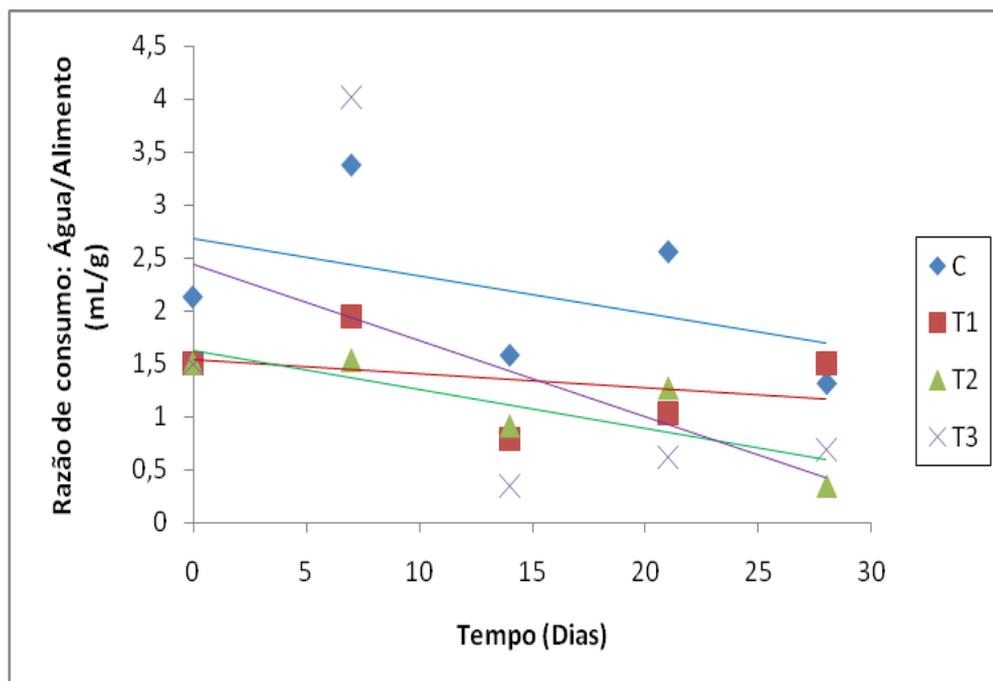


FIGURA 4.15 - Linhas de tendência da razão entre consumo médio de água e alimento em ratas submetidas a diferentes tratamentos com EE de *C. echinata*, ao longo de 28 dias. C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/kg ; T2 – animais tratados com 150mg/kg; T3 – animais tratados com 300mg/kg.

TABELA 4.13 - Parâmetros de regressão das expressões matemáticas que descrevem as linhas de tendência da variação temporal da razão entre consumo de água/alimento em ratas e ratas submetidos a diferentes tipos de tratamentos com EE *C. echinata*.

Tratamentos	Ratos			Ratas		
	a	b	R ²	a	b	R ²
C	-0,082	3,782	0,608	-0,034	2,677	0,224
T1	-0,109	4,040	0,733	-0,013	1,535	0,104
T2	-0,019	2,585	0,428	-0,036	1,623	0,678
T3	-0,085	3,610	0,263	-0,071	2,440	0,276

OBS: C – controle; T1 – animais tratados com 75mg/kg ; T2 – animais tratados com 150mg/kg; T3 – animais tratados com 300mg/kg. Coeficiente angular (a); coeficiente linear (b). Coeficiente de determinação – R².

4.1.3 Parâmetros hematológicos e bioquímicos

As análises hematológicas são descritas na literatura por ter alta correlação em prever toxicidade humana, em outras palavras, as alterações provocadas por determinadas substâncias no organismo nos animais, podem ser percebidas nos humanos na maior parte das vezes (OLSON et al., 2000).

Nas tabelas 4.14 e 4.15 podem ser visualizados alguns parâmetros hematológicos obtidos para ratos machos sob as diferentes condições de tratamento com EE de *C. echinata* e nas tabelas 4.16 e 4.17 os mesmos parâmetros para ratas. Na tabela 4.18 podem ser visualizadas as razões entre os valores de fêmeas/machos conforme o tipo de tratamento. Nesta tabela, pode-se verificar alterações importantes quanto ao número reduzido de leucócitos e plaquetas na presença de EE de *C. echinata*, de forma dose-não-dependente, em comparação com os dados obtidos para o grupo controle.

TABELA 4.14 - Parâmetros hematológicos (Média e Desvio Padrão,) em ratos tratados com EE de *C. echinata*, por 28 dias.

Trat.	RBC ($10^6/\text{mm}^3$)	HGB (g/dL)	HTC (%)	VCM (μm^3)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)
C	8,3 ± 0,8	14,9 ± 1,3	43,4 ± 3,6	52,6 ± 1,9	18,03 ± 0,5	34,3 ± 0,4
T1	8,2 ± 0,6	13,4 ± 1,0	40,1 ± 2,4	48,8 ± 1,4	16,3 ± 0,4	33,3 ± 0,7
T2	6,9 ± 1,0	12,2 ± 1,8	36,9 ± 4,6	53,3 ± 3,9	17,6 ± 1,1	32,9 ± 0,8
T3	8,4 ± 1,0	14,3 ± 1,4	43,0 ± 4,7	51,5 ± 6,0	17,1 ± 1,4	33,3 ± 1,3

OBS: Condição de tratamentos (Trat.): C – controle; T1 – tratamento com 0,075 g/Kg; T2 – tratamento com 0,15 g/Kg e T3 – tratamento com 0,30 g/Kg. RBC: hemácias; HGB: hemoglobina; ; HTC: hematócrito; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média.

TABELA 4.15 - Parâmetros hematológicos (Média e Desvio Padrão), em ratos tratados com EE de *C. echinata*, por 28 dias. WBC e PLT.

Trat.	WBC ($10^6/\text{mm}^3$)	PLT ($10^3/\text{mm}^3$)
C	7172,0 \pm 943,6	608,0 \pm 360,7
T1	12086,0 \pm 4087,0	638,0 \pm 120,8
T2	8978,0 \pm 3650,5	581,4 \pm 283,9
T3	8840,0 \pm 1468,7	704,3 \pm 178,0

OBS: Condição de tratamentos (Trat.): C – controle; T1 – tratamento com 0,075 g/Kg; T2 – tratamento com 0,15 g/Kg e T3 – tratamento com 0,30 g/Kg. WBC: leucócitos; PLT: plaquetas.

TABELA 4.16 - Parâmetros hematológicos (Média e Desvio Padrão), em ratas tratadas com EE de *C. echinata*, por 28 dias.

Trat.	RBC ($10^6/\text{mm}^3$)	HGB (g/dL)	HTC (%)	VCM (μm^3)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)
C	7,8 \pm 1,3	14,4 \pm 1,9	42,2 \pm 4,6	54,3 \pm 3,4	18,4 \pm 0,7	33,9 \pm 1,1
T1	6,3 \pm 0,4	11,9 \pm 0,8	35,3 \pm 2,9	56,3 \pm 0,9	18,9 \pm 0,5	33,6 \pm 1,0
T2	6,6 \pm 0,9	12,9 \pm 1,5	39,2 \pm 5,4	59,5 \pm 0,4	19,6 \pm 0,3	32,9 \pm 0,8
T3	6,6 \pm 0,3	13,3 \pm 0,1	38,1 \pm 0,8	57,3 \pm 1,3	20,1 \pm 0,7	35,0 \pm 0,6

OBS: Condição de tratamentos (Trat.): C – controle; T1 – tratamento com 0,075 g/Kg; T2 – tratamento com 0,15 g/Kg e T3 – tratamento com 0,30 g/Kg. RBC: hemácias; HGB: hemoglobina; ; HTC: hematócrito; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média.

TABELA 4.17 - Parâmetros hematológicos (Média e Desvio Padrão), em ratas tratadas com EE de *C. echinata*, por 28 dias. WBC e PLT.

Trat.	WBC ($10^6/\text{mm}^3$)	PLT ($10^3/\text{mm}^3$)
C	6692,0 \pm 2572,0	745,2 \pm 411,1
T1	6733,3 \pm 1530,8	156,6 \pm 85,4
T2	6000,0 \pm 3252,7	521,0 \pm 316,1
T3	4400,0 \pm 1100,0	120,0 \pm 38,7

OBS: Condição de tratamentos (Trat.): C – controle; T1 – tratamento com 0,075 g/Kg; T2 – tratamento com 0,15 g/Kg e T3 – tratamento com 0,30 g/Kg. WBC leucócitos; PLT: plaquetas.

TABELA 4.18 - Parâmetros hematológicos: Relação entre os valores de ratas/ratos tratados com diferentes doses de EE de *C. echinata*, ao longo de 28 dias.

Trat.	RBC	HGB	HTC	VCM	HCM	CHCM	WBC	PLT
C	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,9	1,2
T1	0,8	0,9	0,9	1,2	1,2	1,0	0,6	0,2
T2	0,9	1,1	1,0	1,1	1,1	1,0	0,7	0,9
T3	0,8	0,9	0,9	1,1	1,2	1,1	0,5	0,2

OBS: Condição de tratamentos (Trat.): C – controle; T1 – tratamento com 75 mg/Kg; T2 – tratamento com 150mg/Kg e T3 – tratamento com 300 mg/Kg. RBC: hemácias; HGB: hemoglobina; ; HTC: hematócrito; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média; WBC: leucócitos; PLT: plaquetas.

As alterações acima observadas demonstraram que a presença de EE de *C. echinata* afetou de maneira contundente os componentes celulares do sistema imunológico no organismo de fêmeas tratadas, significando também alterações importantes quanto ao aspecto metabólico. Segundo Brunetto et al. (2007) e Costa (2000) alguns leucócitos, principalmente os do tipo linfócitos CD-4, tem participação efetiva na modulação de fatores, como as citocinas, que atuam de diferentes formas, sobre diferentes dimensões do metabolismo celular. Talvez isto possa justificar as alterações visualizadas anteriormente quanto às mudanças nos padrões de ganho de massa corpórea, como também quanto ao consumo de água e de alimento.

A redução na contagem leucócitos possivelmente se relacionou à composição química de *C. echinata*, especialmente a presença do homoisoflavonoide brasileína, e à ação desta como agente imunossupressor. De acordo com os estudos realizados por Min Ye et al. (2005), a brasileína é capaz de eliminar a resposta humoral, bem como a resposta celular, provavelmente, através da indução da apoptose dos linfócito do timo e do baço dos camundongos, além de inibir a proliferação linfocítica.

Quanto à redução no número de plaquetas nas fêmeas em relação aos machos tratados com EE de *C. echinata*, isto pode ter um significado importante quanto a questões de estabilidade do fluxo sanguíneo no interior dos vasos, mas acima de tudo pelo papel modulador dos mediadores metabólicos encontrados nas plaquetas como PAF, TNF- α , IL1- β , serotonina, entre outros (ASSUMPÇÃO, 2010; CASTRO; et al., 2006; MUCK-SELER et al., 2009). Isto, de certo modo, também

pode ter um impacto importante sobre o metabolismo, principalmente com relação ao fator ritmicidade, uma vez que a serotonina, também liberada pelas plaquetas, está relacionada aos controles dos ciclos circadianos e ultradianos implicados nos padrões sono/vigília e apetite (ARAUJO; MARQUES, 2002; BERNARDI et al.; 2009; MOURA; SILVA, 2010). Na figura 4.16 pode ser visualizada a variação conjunta dos parâmetros hematológicos com relação aos tratamentos empregados, onde se assinala as alterações acima descritas quanto aos leucócitos e plaquetas.

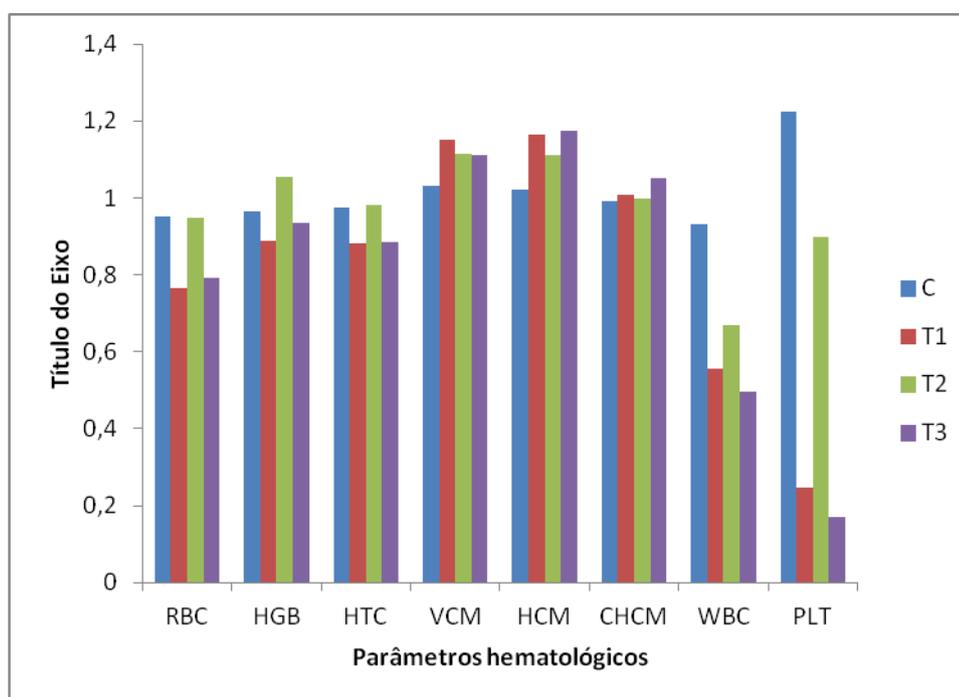


FIGURA 4.16 - Parâmetros hematológicos: Relação entre os valores de ratas/ratos tratados com diferentes doses de EE de *C. echinata*, ao longo de 28 dias. Condição de tratamentos (Trat.): C – controle; T1 – tratamento com 75 mg/Kg; T2 – tratamento com 150mg/Kg e T3 – tratamento com 300 mg/Kg.

Quanto aos parâmetros bioquímicos, observados nas tabelas 4.19 e 4.20 estão representados os valores obtidos para ratos machos tratados com EE de *C. echinata* e nas tabelas 4.21 e 4.22 estão assinalados os mesmos parâmetros referentes às fêmeas. Já na tabela 4.23 podem ser visualizadas as razões entre os parâmetros bioquímicos fêmeas/machos. Na mesma observou-se que as fêmeas apresentaram uma taxa de glicose sérica 30% inferior aos machos quando tratadas com 75mg/Kg de EE *C. echinata*. Esta redução da concentração de glicose pode estar relacionada com as alterações no ganho de peso e no consumo de água e de alimento assinalados acima. É importante também destacar que em relação ao

grupo controle o valor da razão encontrada para este grupo de animais tenha sido inferior a cerca de 50%.

TABELA 4.19 - Parâmetros séricos bioquímicos (Média e Desvio Padrão), em ratos machos tratados com diferentes doses de EE de *C. echinata*, em 28 dias.

Trat.	Glicose (mg/dL)	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Colesterol total (mg/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)
C	98,3 ± 4,6	67,0 ± 18,9	0,76 ± 0,32	40,2 ± 5,9	39 ± 11,0
T1	127,6 ± 9,4	52,4 ± 6,2	0,66 ± 0,11	58 ± 13,3	89,8 ± 29,2
T2	130,6 ± 26,2	54,6 ± 13,1	0,64 ± 0,2	55,8 ± 7,0	52,0 ± 17,1
T3	80,8 ± 2,6	61,3 ± 11,9	0,97 ± 0,28	54,5 ± 6,7	48,2 ± 11,1

OBS: Condição de tratamentos (Trat.): C – controle; T1 – tratamento com 75 mg/Kg; T2 – tratamento com 150mg/Kg e T3 – tratamento com 300 mg/Kg

TABELA 4.20 - As transaminases (Média e Desvio Padrão), em ratos machos tratados com diferentes doses de EE de *C. echinata*, em 28 dias.

Trat.	AST (U/L)	ALT (U/L)
C	139,0 ± 25,0	53,5 ± 12,5
T1	127,6 ± 10,8	55,6 ± 8,0
T2	166,3 ± 51,8	57,8 ± 4,8
T3	145,3 ± 39,9	59,3 ± 27,2

OBS: Condição de tratamentos (Trat.): C – controle; T1 – tratamento com 75 mg/Kg; T2 – tratamento com 150mg/Kg e T3 – tratamento com 300 mg/Kg. TGO ~ AST e TGP ~ ALT.

TABELA 4.21 - Parâmetros séricos bioquímicos (Média e Desvio Padrão), em ratas tratadas com diferentes doses de EE de *C. echinata*, em 28 dias.

Trat.	Glicose (mg/dL)	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Colesterol total (mg/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)
C	113,8 ± 20,6	53,6 ± 13,6	0,8 ± 0,3	51,6 ± 3,7	109,6 ± 60,2
T1	93,0 ± 1,4	39,5 ± 5,0	0,7 ± 0,1	62 ± 11,3	60,5 ± 0,7
T2	122,3 ± 38,9	47,3 ± 13,6	0,7 ± 0,2	73,0 ± 3,6	163,7 ± 52,5
T3	129,7 ± 37,6	52,7 ± 5,5	0,8 ± 0,1	95,7 ± 37,7	74,7 ± 35,0

OBS: Condição de tratamentos (Trat.): C – controle; T1 – tratamento com 75 mg/Kg; T2 – tratamento com 150mg/Kg e T3 – tratamento com 300 mg/Kg

TABELA 4.22 - As transaminases (Média e Desvio Padrão), em ratas tratadas com diferentes doses de EE de *C. echinata*, em 28 dias.

Trat.	TGO (U/L)	ALT (U/L)
C	458,6± 545,9	185,6± 195,5
T1	439,0± 26,9	167,0± 17,0
T2	247,0± 222,0	113,0± 50,9
T3	304,7± 209,0	162,3± 68,2

OBS: Condição de tratamentos (Trat.): C – controle; T1 – tratamento com 75 mg/Kg; T2 – tratamento com 150mg/Kg e T3 – tratamento com 300 mg/Kg. TGO ~ AST e TGP ~ ALT.

TABELA 4.23 - Parâmetros bioquímicos: Relação entre os valores de ratas/ratos tratados com diferentes doses de EE de *C. echinata*, ao longo de 28 dias.

Trat.	Glicose	Uréia	Creatinina	Col. T.	Triglic.	TGO	TGP
C	1,2	0,8	1,1	1,3	2,8	3,3	3,5
T1	0,7	0,8	1,1	1,1	0,7	3,4	3,0
T2	0,9	0,9	1,1	1,3	3,1	1,5	2,0
T3	1,6	0,9	0,9	1,8	1,6	2,1	2,7

OBS: Condição de tratamentos (Trat.): C – controle; T1 – tratamento com 75 mg/Kg; T2 – tratamento com 150mg/Kg e T3 – tratamento com 300 mg/Kg. TGO ~ AST e TGP ~ ALT. Col. T. – Colesterol total; Triglic. = Triglicerídeos.

Com relação ao colesterol total, foi observado um aumento de cerca de 80% em relação aos machos quando os animais recebiam uma dose de 300mg/Kg de EE de *C. echinata*; embora esta relação tenha variado para mais em relação ao grupo controle. Isto denota um efeito importante sobre as reservas de lipídeos no organismo, assinalando alterações estruturais nos depósitos naturais de gordura nestes organismos, mas acima de tudo na oferta e demanda de matéria prima para a construção de mediadores esteroides.

Quanto aos triglicerídios, observou-se também que fêmeas tratadas com 75mg/Kg do extrato mostravam uma redução de 30% em relação aos machos tratados com o mesmo substrato. Esta redução conjuntamente com as alterações no conteúdo de glicose, acentuam a queda de oferta de substrato energético para a condução do catabolismo destes animais, como já assinalado acima.

Não existem relatos sobre os efeitos tóxicos provenientes da administração repetida do extrato do cerne de *C. echinata* Lam. Entretanto, outra espécie do gênero *Caesalpinia*, *C sappan*, a qual apresenta em seu cerne composição química semelhante a *C. echinata*, devido à presença de compostos polifenólicos, especialmente brasilina e brasileína (OLIVEIRA et al., 2002), apresenta atividade hipocolestêmica (SAITOH et al, 1986) e imunomodulatória (CHOI; MOON, 1977). Além disso, a brasilina é apontada por sua ação hipoglicemiante, efeito este decorrente do aumento no metabolismo de glicose (MOON et al, 1993). Khil et al. (1997) concluíram que a brasilina era capaz de promover um aumento do transporte de glicose em adipócitos através de mecanismos relacionados à concentração de Ca^{2+} intracelular e calmodulina. Posteriormente, Khil et al. (1999) demonstraram que a brasilina era capaz de aumentar transporte de glicose para dentro da célula através da mobilização de transportadores de glicose do tipo 4 (GLUT-4), por meio da ativação do fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K). Além disso, a brasilina é capaz de aumentar a atividade da fosfofrutoquinase 2 (PFK-2) além de aumentar os níveis de frutose-6-fosfato (F-6-P)/hexose-6-fosfato(H-6-P), contribuindo para a produção de frutose 2,6- bisfosfato, levando à inibição da gliconeogênese nos hepatócitos; além de estimular a glicólise, devido a elevação da atividade da piruvato quinase (YOU et al., 2005).

Nas doses de 150 e 300mg/Kg houve redução da atividade das transaminases das fêmeas em relação aos machos, significando alterações metabólicas e estruturais importantes nestes organismos.

O diagnóstico de doenças hepáticas muitas vezes é confirmado pela avaliação histopatológica e exames laboratoriais. O perfil inicial das provas de função hepática pode ser constituído pela determinação da bilirrubina sérica, das enzimas transaminases: aspartato aminotransferase (AST) e alanina-aminotransferase (ALT), entre outras. A dosagem de glicose sérica, colesterol e triglicerídios contribuem também para avaliar o dano hepatocelular (LORA, 2007). Por outro lado, a redução dos níveis de transaminases (AST e ALT) está correlacionada ao processo de regeneração hepática (MARTINO, 2010; MELO et al., 2006), circunstância que justifica o resultado histopatológico de inúmeros hepatócitos binucleados deste trabalho (APÊNDICE A). MOON, et al. (1992), relataram que a brasilina é capaz de promover proteção da cultura de hepatócitos,

da toxicidade induzida por BrCCl_3 . Análises mais específicas devem ser realizadas para verificar esta atividade.

As alterações assinaladas acima podem ser melhor visualizadas na figura 4.17.

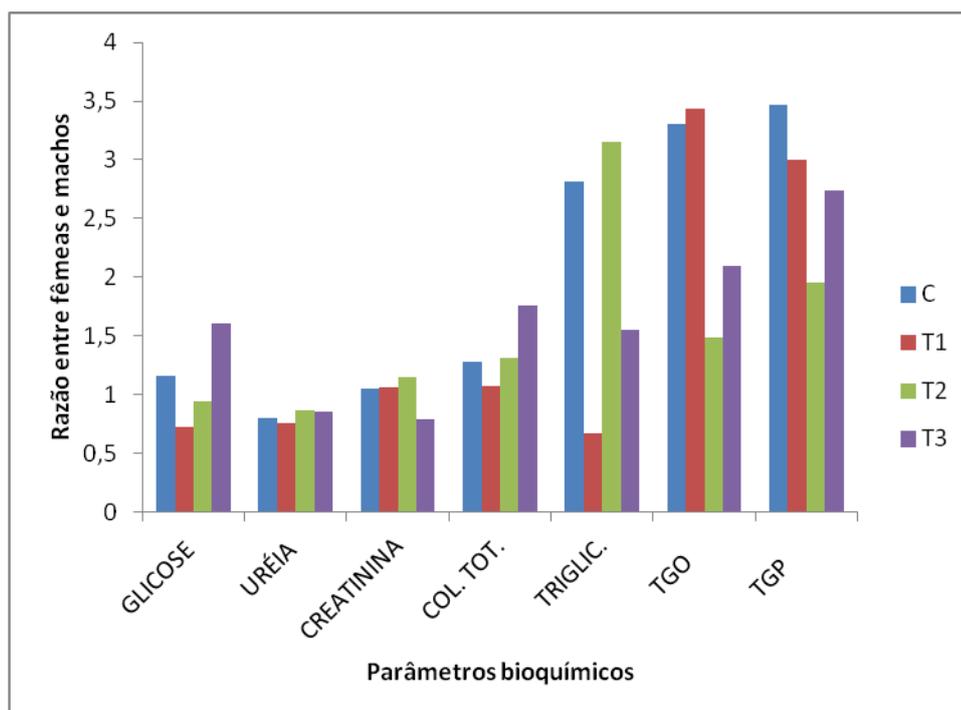


FIGURA 4.17 - Parâmetros bioquímicos: relação entre os valores de ratas/ratos tratados com diferentes doses de EE de *C. echinata*, ao longo de 28 dias. Condição de tratamentos (Trat.): C – controle; T1 – tratamento com 75 mg/Kg; T2 – tratamento com 150mg/Kg e T3 – tratamento com 300 mg/Kg.

4.2 Atividade antioxidante do radical livre DPPH

Conforme observado na tabela 4.24, o EE de *C. echinata* apresentou atividade satisfatória na captura do radical orgânico DPPH, demonstrando IC_{50} igual a 42,404 $\mu\text{g/mL}$, um desempenho superior ao apresentado pelo ácido gálico ($\text{IC}_{50} = 165,070 \mu\text{g/mL}$), que em termos percentuais representa uma diferença de 74,3%.

TABELA 4.24 - Valores de IC₅₀ concentração que inibe 50% do radical em questão em µg/mL, utilizado nos métodos de sequestro do radical DPPH e Óxido nítrico (NO), comparando os resultados com o padrão Ácido gálico.

Amostras	DPPH (IC ₅₀) µg/mL	NO (IC ₅₀) µg/mL
<i>Caesalpinia echinata</i>	42,404	234,200
Ácido Gálico	165,070	174,560

O gráfico 4.1 apresenta a performance do extrato em diferentes concentrações (10, 25, 50, 100 e 200 µg/mL) na estabilização dos radicais, onde foi possível observar que a resposta antioxidante melhora com o aumento da concentração, configurando um efeito dose-dependente na atividade antioxidante do extrato frente ao radical DPPH, assinalando que geralmente um substrato que apresenta alto potencial em sequestrar radicais livres possui baixo valor de IC₅₀. Ainda no gráfico 4.1, pode-se verificar que a partir de 50 µg/mL o percentual de inibição do radical DPPH tende a ser constante, o que sugere um ponto de saturação, considerando-se as condições experimentais empregadas nos ensaios.

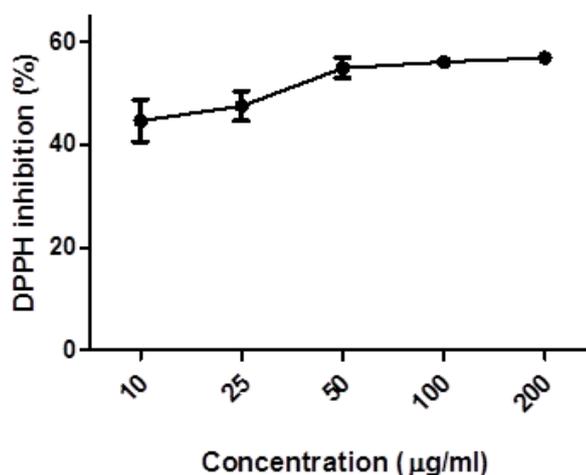


GRÁFICO 4.1 – Inibição do radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) pelo extrato etanólico de *Caesalpinia echinata*. Valores significativos ± S.D. (n= 3)

Em estudos anteriores sobre a composição fitoquímica de *C. echinata* verificou-se a presença de polifenóis (flavonoides, taninos e cumarinas) (SILVA, 2006). Já Fukushima e Fuzeto (2003) relataram a presença de ligninas, ambos os

resultados condizentes com o relato de Rezende et al. (2004), que aponta os derivados fenólicos C6-C3 como os metabólitos mais observados em espécies do gênero *Caesalpinia*.

Normalmente os compostos fenólicos podem interferir numa série de eventos fisiológicos em animais, entre estes os relacionados com processos de oxidação (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Vale ressaltar que vários autores apontam a brasilina, um homoflavonóide, como principal constituinte de interesse farmacológico do cerne de pau-brasil. Acrescenta-se ainda que a brasilina pode transformar-se em brasileína através do contato com o ar ou com a luz; isto devido a um processo de oxidação no qual a hidroxila da brasilina se converte num grupo carbonila (OLIVEIRA et al., 2002). Tanto a brasilina quanto a brasileína apresentam atividade antioxidante importante (HU et al., 2008; LIANG et al., 2013).

4.3. Análise do sequestro do óxido nítrico (NO) in vitro.

A análise do gráfico 4.2 nos permite inferir que o EE de *C. echinata* sob diferentes concentrações (10, 25, 50, 100 e 200 µg/mL), inibiu de forma dose-dependente a produção do radical NO. A IC₅₀ encontrada foi de 234,2 µg/mL, sendo que o mesmo tipo de análise efetuada com padrão de ácido gálico nos deu um valor de IC₅₀= 174,56 µg/mL (Tabela 4.24). Estes dados sugerem que EE de *C. echinata* teve um efeito inibitório de 25,49% em relação ao ácido gálico.

Aqui, observou-se que o efeito inibitório obtido sobre o radical NO foi praticamente o inverso do efeito inibitório conseguido a partir da avaliação efetuada sobre o DPPH, conforme mostram os dados da tabela 4.24. Analisando os valores de IC₅₀ para *C. echinata*, constatou-se que este parâmetro foi 81,9% maior quanto ao NO, denunciando um impacto maior sobre a identificação e captura deste tipo de radical.

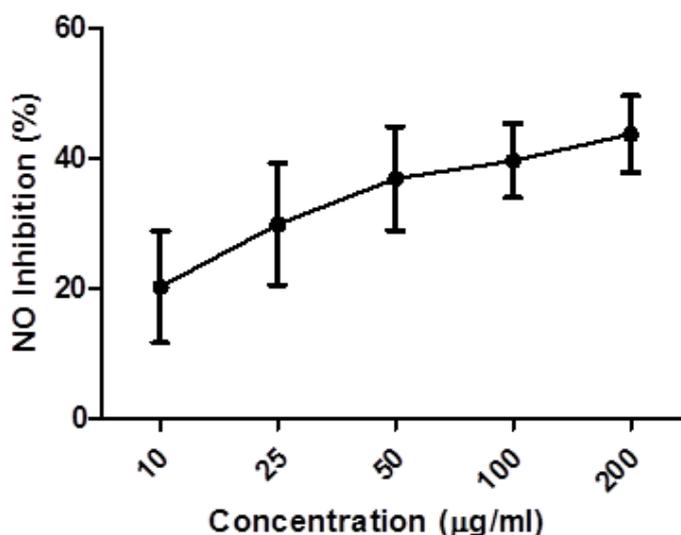


GRÁFICO 4.2 – Inibição do radical NO pelo extrato etanólico de *Caesalpinia echinata*. Valores significativos \pm S.D. (n= 3)

De acordo com Bianchi e Antunes (1999), o desempenho dos antioxidantes *in vivo* depende dos fatores: tipos de radicais livres formados; onde e como eles são gerados esses radicais; análise e métodos para a identificação dos efeitos, e doses ideais para obter proteção. Sendo assim, é possível que um antioxidante atue como protetor em determinado sistema, mas que falhe na proteção.

Jayakumar e Kanthimathi (2011), assinalaram que o óxido nítrico é um radical livre envolvido na patogênese do câncer, porquanto a sua presença modula os mecanismos associados às dinâmicas de vascularização de tumores e metástases. De fato, muitos estudos indicam a participação do óxido nítrico na neovascularização, uma vez que sua liberação normalmente associa-se a eventos ligados à cascata angiogênica (GALLO et al., 1998; ZICHE et al., 1994, ZICHE; MORBIDELLI, 2000).

Pelo menos três tipos de sistemas enzimáticos do tipo sintase do óxido nítrico – NOS podem ser associados à produção de NO e L- citrulina, dependendo da disponibilidade dos cofatores oxigênio e fosfato dinucleótido adenina nicotinamida (NADPH), além do substrato L-arginina. Dois destes sistemas são dependentes de Ca^{++} , denominados constitutivos perante os sistemas neuronal (NO-1 ou nNOS) e endotelial (NO-3 ou eNOS); e outro independente do Ca^{++} (NOS-2 ou iNOS), designado de induzido, associado a tipos celulares como os macrófagos, micróglia, ou outros tipos celulares que são responsivos a mediadores pró-inflamatórios tais

como os lipopolissacarídeos de membranas bacterianas, endotoxinas e citocinas como IL-1 β , TNF- α e INF- γ (BODGAN, 2001; LUIKING et al., 2009).

Muitos distúrbios podem ocorrer nos mecanismos reguladores da produção de NO, desde modificações nos receptores deflagradores acoplados à proteína G em membranas, induzidas por saturação de íons do tipo H⁺ em casos de isquemias, ou queda na concentração citoplasmática de Mg²⁺ associada a distúrbios de ordem metabólica (VOLPE et al., 2002). Nos casos de sepsis ou de destruição de tecidos, uma superprodução de NO pode ser mediada por macrófagos, levando a uma condição de vasodilatação generalizada e consequências cardiocirculatórias graves (LUIKING; DEUTZ, 2003). Os resultados conquistados neste trabalho sugerem que extrato de *C. echinata* pode contribuir para a diminuição de radicais do tipo NO em pacientes com distúrbios orgânicos que potencializem a produção deste tipo de radical, de maneira dose-dependente.

Como assinalado anteriormente, a presença de compostos polifenólicos no cerne de *C. echinata* pode estar associado a sua capacidade de inibição de radicais livres. Pesquisas com substâncias antioxidantes mostraram que estes tipos de compostos foram capazes de reduzir o edema inflamatório, inibir a angiogênese e a proliferação de células tumorais (BENNETT; ROJAS; SEEFELDT, 2012; HOFSETH, 2008; JAYAKUMAR; KANTHIMATHI, 2011; ZICHE; MORBIDELLI, 2000).

Em outros estudos foi verificado que o extrato etanólico do cerne de *C. echinata* reduziu o edema induzido por carragenina em pata de rato, bem como inibiu o crescimento do carcinoma de Ehrlich e do sarcoma 180 em ensaios *in vivo* (SILVA, 2006).

4.4 Atividade Antiangiogênica

Após 18 dias de tratamento, com aplicação tópica do EECe (100 mg/mL) na dose 10 μ L/olho, observou-se que *C. echinata* inibiu a resposta angiogênica inflamatória provocada pela cauterização pontual da córnea de rato com NaOH (1M), promovendo redução substancial do número de novos capilares (Fig. 4.18A e B), apresentando atividade inibitória (Fig. 4.19), equivalente à um percentual de inibição de 77,49%.

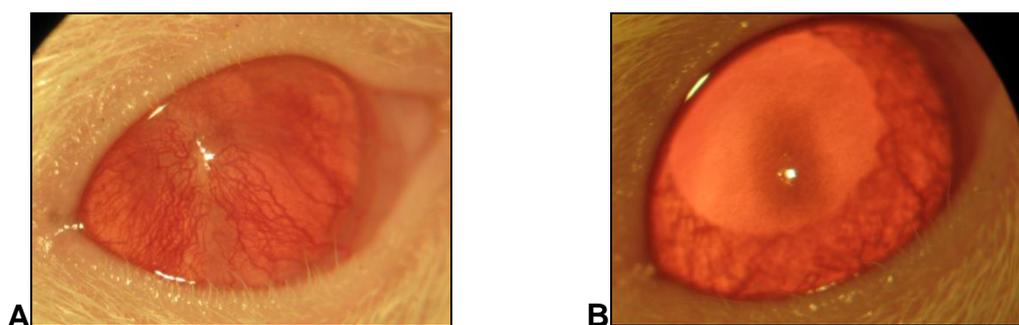


FIGURA 4.18 – a) Visão do cristalino em rato wistar estimulado com NaOH, não tratado (controle); b) cristalino de rato wistar tratado com EECe.

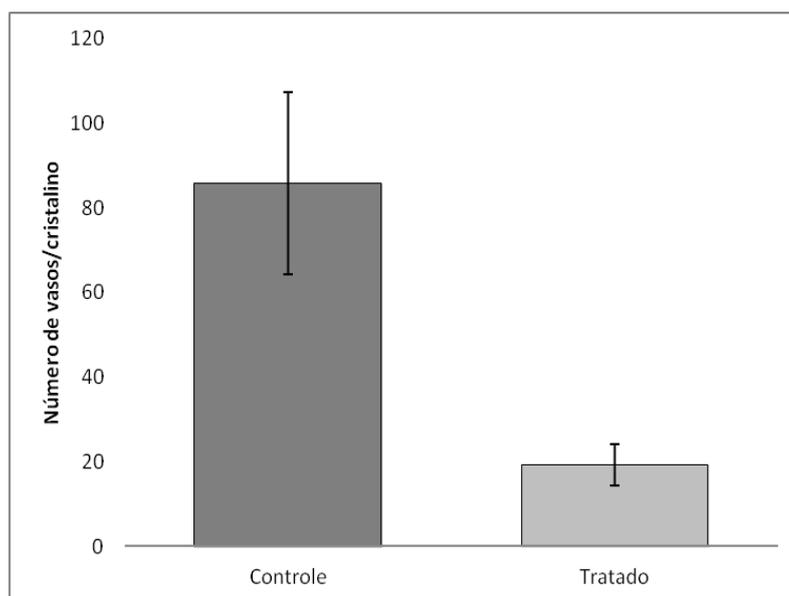


FIGURA 4.19 – Número de vasos contados na superfície do cristalino em ratos wistar tratados com EECe.

Estes dados sugerem que componentes bioquímicos pertencentes ao extrato de *C. echinata* interferem sobre os mecanismos que controlam o processo angiogênico, mediado por substratos pertencentes à cascata do ácido araquidônico; embora os dados acima descritos também sugiram que o tamponamento do NO possa ter alguma contribuição na diminuição da resposta angiogênica.

4.5 Teste MTT

O gráfico 4.3 mostra a atividade do extrato etanólico de *C. echinata* sobre a viabilidade da cultura de células Vero. A concentração tóxica para 50% das células (CC₅₀), determinada utilizando o corante MTT, foi de 168,4483 µg/mL (0,17 mg/mL). Aqui, é interessante assinalar que a resposta citotóxica se intensifica conforme o aumento da concentração do EE de *C. echinata*.

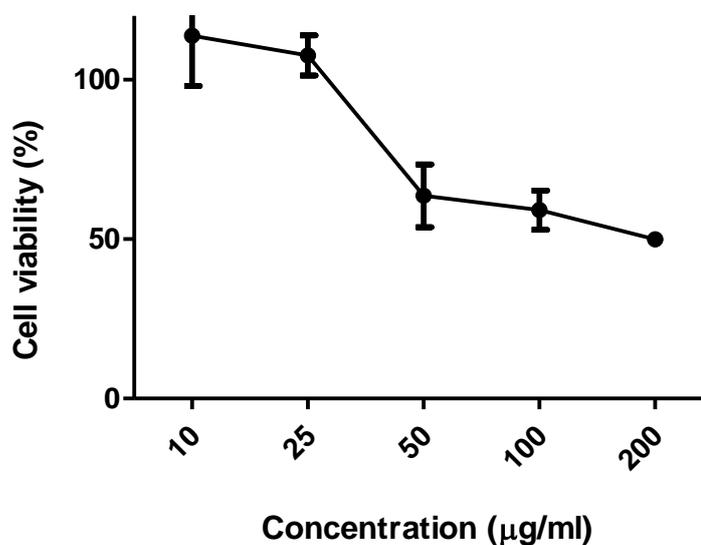


GRÁFICO 4.3- Viabilidade da cultura de células VERO submetidas às diferentes concentrações do extrato etanólico de *Caesalpinia echinata*.

Extratos de origem vegetal que contêm princípios antioxidantes geralmente apresentam potencial citotóxico e atividade antitumoral em animais de experimentação (Gupta; et al., 2004). Não existem outros estudos concernentes à atividade citotóxica de *C. echinata*, entretanto, esta atividade já foi verificada em outras espécies do gênero *Caesalpinia*, estando esta atividade relacionada a presença dos homoisoflavonoides, diterpenoides, bem como outros compostos polifenólicos presentes na composição química da madeira destes vegetais (GUPTA et al., 2004; DAS et al., 2010; SHENGQIAN et al., 2011).

4.6 Efeito protetor contra os danos causados pelo peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

As células pré-tratadas com EE de *C. echinata* apresentaram aumento significativo na viabilidade quando comparadas com as células expostas somente ao peróxido de hidrogênio, especialmente nas concentrações de 50 µg/mL (12,5 ± 4,63), 100 µg/mL (16,93 ± 3,52) e 200 µg/mL (46,52 ± 6,79). Na maior concentração testada observou-se que 46,5% das células pré-tratadas com EE de *C. echinata* sobreviveram exposição ao agente oxidante H₂O₂.

Os resultados do experimento demonstram que, em condições in vitro, o EE de *C. echinata* 200 µg/mL exerce uma importante ação protetora contra o estresse oxidativo gerado pelo H₂O₂. Conforme discussão anterior, este resultado possivelmente é decorrente da atividade antioxidante observada neste extrato, o qual provavelmente, está relacionado a capacidade dos compostos polifenólicos em atuar com antioxidante.

4.7 Atividade de inibição tumoral

4.7.1 Inoculação de células ascíticas do tumor de Ehrlich pré-tratadas com diferentes concentrações de EE de *C echinata*.

A eficácia do pré-tratamento de células ascíticas do tumor de Ehrlich com diferentes concentrações de EE *C. echinata* ou metotrexato – MTX foi avaliada pela determinação do percentual de células viáveis antes e após a estimulação com os substratos de estudo, sendo esta última condição efetuada alguns minutos antes da inoculação destas células nos animais hospedeiros. Como já foi assinalada acima, esta técnica baseava-se na visualização microscópica de células coradas com azul de Tripán a 2,5%, identificando-se a relação entre células viáveis em relação ao total de células identificadas (Figura 4.20).

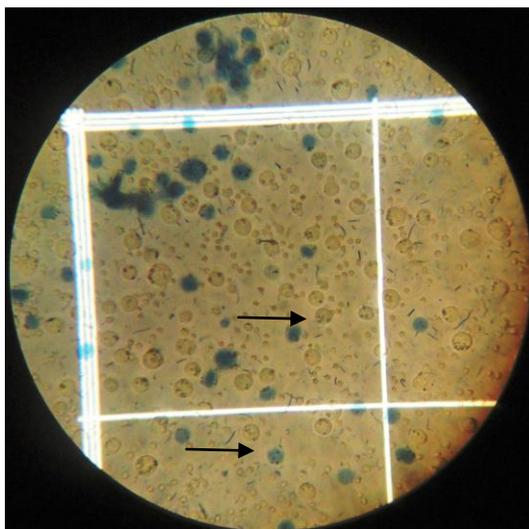


FIGURA 4.20 – Célula tumoral não viável corada em azul, célula viável sem coloração (aumento 10x).

Na tabela 4.25 podem ser visualizados os valores dos respectivos testes de viabilidade, realizados em triplicata, com os respectivos resultados do implante expressos em termos de percentual de animais responsivos, ao final de 23 dias, assim como, o percentual de inibição tumoral correspondente. Nesta tabela pode-se verificar que a viabilidade encontrada nos diferentes momentos em que foi realizada proporcionou valores percentuais acima de 70%, sinalizando a introdução de células ascíticas viáveis nos animais hospedeiros, para monitoramento do desenvolvimento tumoral a posteriori.

TABELA 4.25 - Número de camundongos que desenvolveram tumor de Ehrlich após administração de células ascíticas do tumor de Ehrlich tratadas por 1 hora com diferentes concentrações de EE C. echinata e Metotrexato – MTX.

Tratamentos	%V I	%V II	FT	% T	%IT
Controle	92	82	5/5	100	0
MTX 0,5mg/mL	92	83	5/6	83	17
EE 6,25mg/mL	92	77	4/6	67	33
EE 12,5mg/mL	92	77	2/6	33	67
EE 6,25 mg/mL	92	66	0/6	0	100

OBS: %VI – Viabilidade inicial das células do tumor de Ehrlich antes do tratamento. %VII – Viabilidade das células do tumor de Ehrlich, após o tratamento, num momento anterior á inoculação nos animais. FT – Fração de animais tumorados em relação ao total de animais no grupo. %T – Percentual de animais tumorados. %IT – Percentual de inibição tumoral.

Na tabela 4.26 pode-se observar que tanto os animais do grupo controle como aqueles que receberam células ascíticas previamente tratadas com metotrexato, desenvolveram o tumor de Ehrlich na forma sólida, embora os camundongos que receberam células ascíticas pré-tratadas com EE de *C. echinata* apresentaram uma relação inversa entre o desenvolvimento do tumor e a concentração do extrato aplicada no tratamento das células ascíticas do tumor, como pode ser melhor visualizado na figura 4.21.

TABELA 4.26 - Variação do peso corpóreo (g) em função do tempo (Dias) em camundongos que receberam células ascíticas do tumor de Ehrlich sob diferentes condições de tratamento com EE de *C. echinata* e Metotrexato – MTX.

Tratamentos	Tempo (Dias)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Controle	52,92	53,38	53,83	53,50	54,17	53,67	52,17	52,33
MTX 0,5 mg/mL	52,88	53,19	53,50	53,67	53,33	52,50	53,33	54,83
EE 25 mg/mL	53,83	54,13	54,42	54,00	54,83	54,50	54,67	55,67
EE 12,5 mg/mL	52,17	52,50	52,83	53,17	52,50	53,50	53,67	52,00
EE 6,25 mg/mL	58,04	58,82	59,58	59,67	59,5	59,5	58,33	56,00

OBS: Os animais do grupo controle recebiam propilenoglicol + salina.

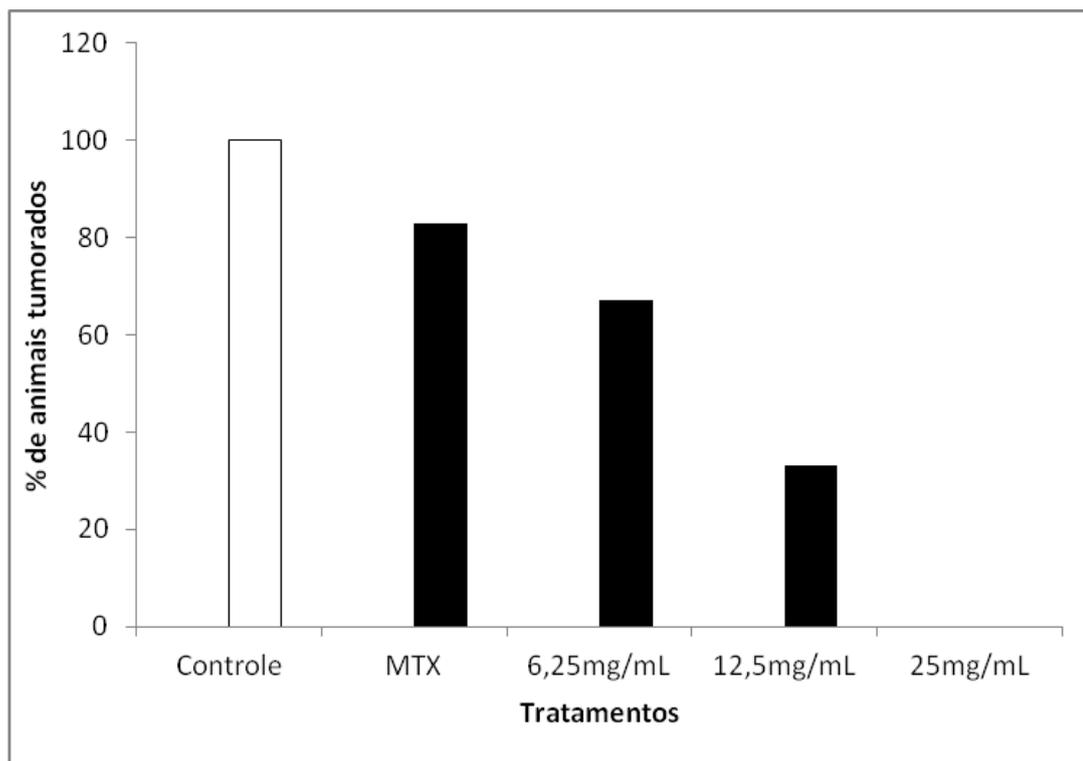


FIGURA 4.21 - Percentual de animais tumorados, após 23 dias de inoculação de células ascíticas do tumor de Ehrlich sob diferentes condições de tratamento com EE *C. echinata* e Metotrexato - MTX

Com estes dados, foi possível estabelecer uma relação entre a concentração do extrato aplicada no pré-tratamento e o percentual de inibição tumoral, obtendo-se a expressão matemática $\%IT = 3,97.C + 6,6$ para um coeficiente de determinação $R^2 = 0,97$ onde “%IT” representa o percentual de inibição tumoral e “C” a concentração de EE de *C. echinata* empregada no pré-tratamento. Esta expressão fornece uma descrição da relação entre as variáveis assinaladas, uma vez que o coeficiente de determinação foi elevado, atingindo um valor bem próximo da unidade, que representaria o valor máximo possível. Outro aspecto, é que esta relação foi positiva, ou seja o %IT aumenta com o aumento da concentração, pelo menos dentro do intervalo de concentrações empregadas neste trabalho. Também, pode-se considerar o coeficiente angular da expressão como a taxa de variação do %IT em função de C, que pela natureza da função matemática obtida é constante, pelo menos no intervalo de concentrações avaliado.

Estes dados assinalaram que EE de *C. echinata* contém substâncias, na sua composição, que possuem impacto importante sobre o metabolismo da célula ascítica do tumor de Ehrlich, inviabilizando-a quanto a sua competência em fixar-se

no hospedeiro e acionar os devidos mecanismos para promover o seu desenvolvimento na forma de um tumor sólido.

Levando-se em consideração os resultados obtidos nos ensaios de angiogênese, pode-se dizer que parte deste mecanismo inibitório pode estar associado inibição de estímulos favoráveis para o desenvolvimento da angiogênese, como também a uma ação impactante sobre sinalizadores de membrana nas células cancerígenas, de forma a afetar a sua interação com a matriz extracelular, comprometendo o desenvolvimento de um sistema de proteínas de adesão celular adequado à sua fixação. De fato, durante a análise histológica de fragmentos da massa tumoral dos grupos que passaram por tratamento com EE de *C. echinata*, observou-se que as células apresentavam-se bastante dissociadas. O extrato etanólico de *C. echinata* parece intervir tanto sobre a célula isolada do tumor, como nas diferentes dimensões de interação com a estrutura orgânica do animal hospedeiro.

É importante destacar que metotrexato não teve efeito inibitório satisfatório sobre as células ascíticas do tumor de Ehrlich, uma vez que o percentual de animais que desenvolveu tumor sólido foi elevado. De certo modo, isto denuncia que metotrexato parece interferir não necessariamente sobre a célula cancerígena diretamente, mas sim nas possíveis relações que esta desenvolve com o organismo hospedeiro, inviabilizando o seu desenvolvimento.

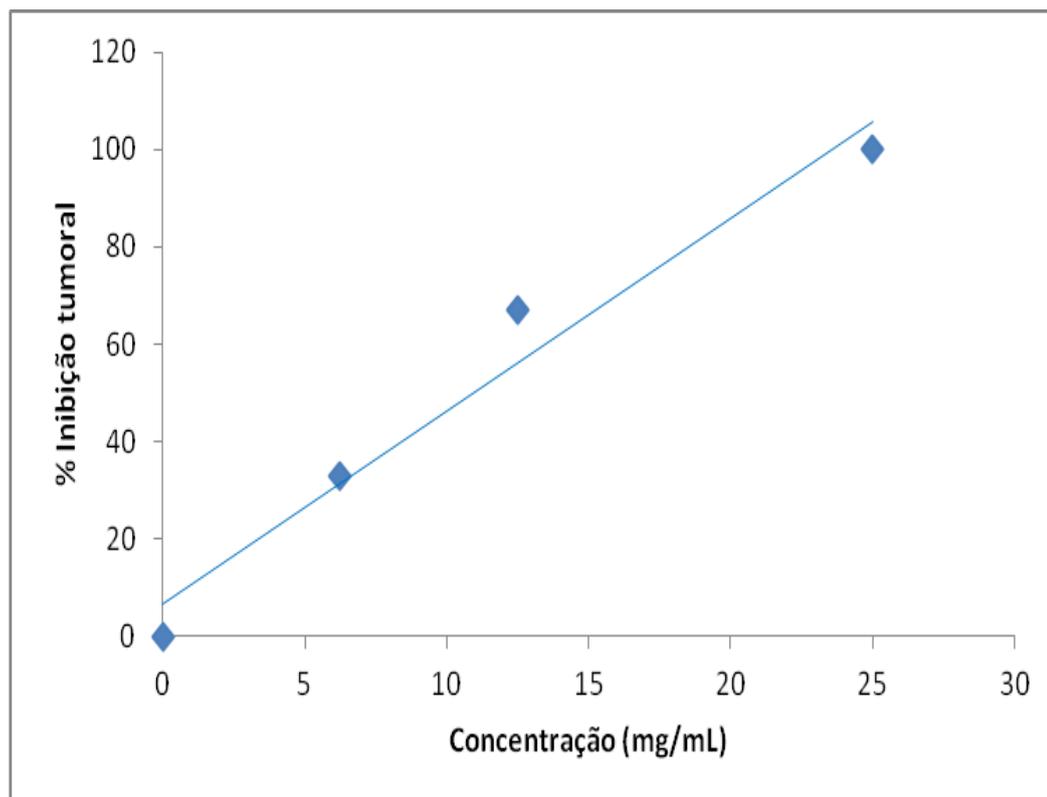


FIGURA 4.22 - Percentual de Inibição tumoral em função da concentração de EE *C. echinata* empregado no tratamento de células ascíticas do tumor de Ehrlich, por uma hora, antes da inoculação nos animais.

Os valores médios referentes ao peso corpóreo de camundongos que receberam células ascíticas do tumor de Ehrlich sob diferentes condições de tratamento com EE de *C. echinata* e Metotrexato – MTX, e que desenvolveram tecido tumoral, podem ser visualizados na tabela 4.26. É importante ressaltar que transcorreram cerca de 13 dias entre o implante e a percepção dos sinais de desenvolvimento do tumor de Ehrlich na condição sólida nos animais hospedeiros, iniciando-se portanto, o acompanhamento do crescimento do tumor por oito dias, a partir deste período.

Para explicitar melhor os dados da tabela 4.26, foi construída a figura 4.23, permitindo-se a observação de que o tumor de Ehrlich teve um crescimento característico conforme o tipo de tratamento aplicado. Na tabela 4.27 pode-se visualizar que os animais dos grupos que receberam células ascíticas tratadas com MTX ou EE 25mg/mL apresentaram a concavidade para cima, portanto apresentaram um ponto de menor ganho de massa corpórea, ao contrário dos demais tratamentos, inclusive os animais do grupo controle.

Os animais que receberam células ascíticas pré-tratadas com MTX apresentaram elevado percentual de desenvolvimento tumoral; mas os animais que receberam células ascíticas do tumor de Ehrlich pré-tratadas com EE de *C. echinata* a 25 mg/mL não desenvolveram tumor, portanto o ganho de massa é real nestes organismos, não por acréscimo da massa tumoral em desenvolvimento.

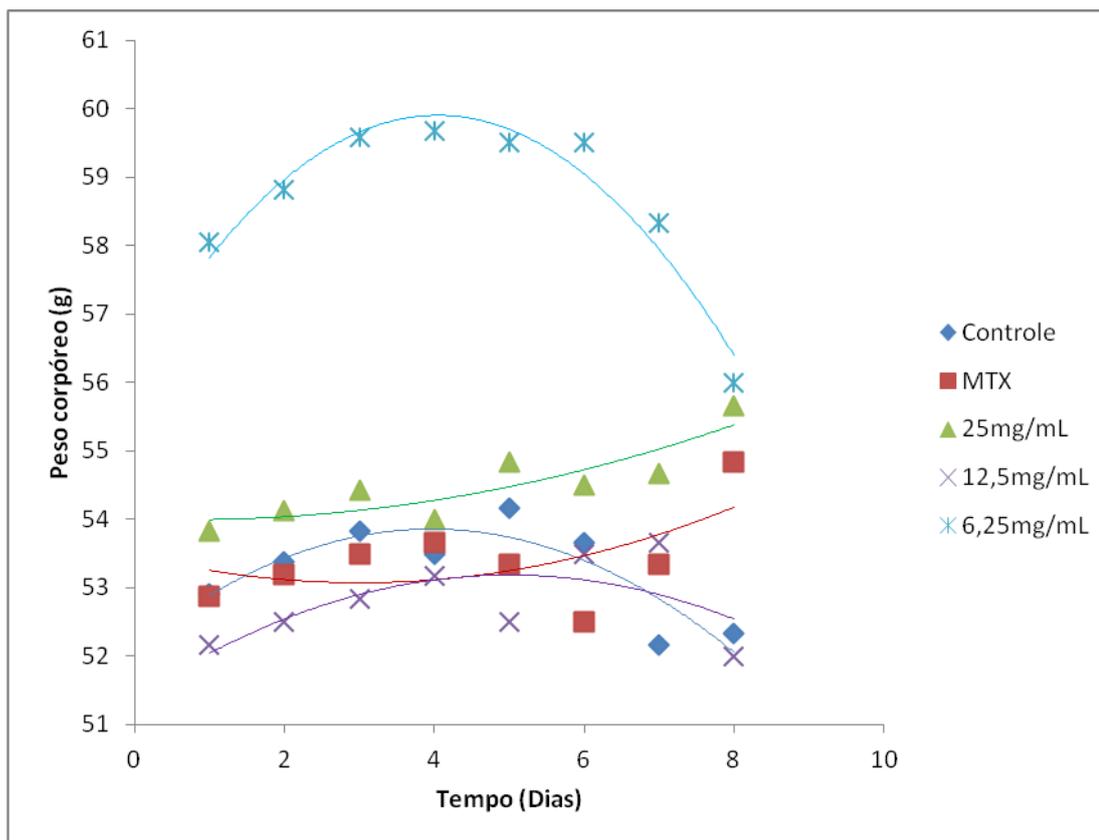


FIGURA 4.23 - Variação temporal de peso corpóreo em camundongos sob diferentes condições de tratamento com EE de *C. echinata* e Metotrexato – MTX.

TABELA 4.27 - Parâmetros de regressão das funções matemáticas que descrevem a variação temporal de peso corpóreo em camundongos sob diferentes condições de tratamento com EE de *C. echinata* + Metotrexato – MTX.

Tratamentos	a	b	c	R²
Controle	-0,11	0,87	52,12	0,74
MTX 0,5 mg/mL	0,04	-0,27	53,47	0,33
EE 25 mg/mL	0,03	-0,04	54,00	0,75
EE 12,5 mg/mL	-0,07	0,71	51,40	0,41
EE 6,25 mg/mL	-0,22	1,81	56,23	0,94

Foi realizada uma caracterização do desenvolvimento dos tumores nos animais hospedeiros que desenvolveram o tumor; os parâmetros de volume, massa e densidade dos tumores podem ser visualizados na tabela 4.28. Com os valores de volume obtidos determinou-se o percentual de inibição tumoral - %IT, agora considerando-se o crescimento do tumor nos animais responsivos, cujos valores podem ser visualizados na tabela 4.29. Nesta tabela pode-se observar um percentual de inibição tumoral elevado para as concentrações de 12,5 mg/mL e 25 mg/mL, proporcionando esta última, como ficou assinalado acima, um percentual de inibição de 100%.

Não ocorreram grandes diferenças nos tumores quanto à densidade, embora os valores obtidos tenham assinalado uma densidade baixa, provavelmente devido a um baixo conteúdo de células e de material fibroso na massa tumoral obtida, embora os volumes do tumor tenham variado conforme o tratamento. Na figura 4.24 podem ser visualizados graficamente a variação de tamanho médio dos tumores obtidos a partir dos animais responsivos, conforme o tratamento. Nesta figura, merece destaque o grande volume tumoral obtido a partir dos animais que receberam células ascíticas pré-tratadas com MTX, como também o pequeno volume médio do tumor obtido para os animais que receberam células ascíticas do tumor de Ehrlich pré-tratadas com EE de *C. echinata* na concentração de 12,5 mg/mL.

Quanto ao MTX, é possível que o estímulo efetuado diretamente sobre as células ascíticas, ao invés de tê-las inviabilizado metabolicamente, sinalizaram uma espécie de estresse metabólico, produzindo uma resposta compensatória, que

potencializou o desenvolvimento do tumor nos animais hospedeiros, o que contraria a expectativa que se tem quanto aos efeitos protagonizados pelo MTX contra o desenvolvimento de tecidos neoplásicos (SILVA, et al, 2006). Quanto ao efeito de EE de *C. echinata*, na concentração de 12,5 mg/mL verificou-se que proporcionou um reduzido desenvolvimento do tumor nos animais responsivos, portanto um efeito inibitório de 59%, como já assinalado acima.

TABELA 4.28 - Volume (mm^3), massa (g) e densidade (g/mm^3) do tumor de Ehrlich em 23 dias após a inoculação de células ascíticas tratadas com diferentes concentrações de EE *C. echinata* e Metotrexato – MTX.

Tratamentos	Volume (mm^3)	Massa (g)	Densidade (g/mm^3)
Controle	745,57±442,00	2,27±1,39	0,0032±0,0012
MTX 0,5mg/mL	1090,626±772,87	2,63±1,91	0,0024±0,0003
EE 6,25 mg/mL	1492,08±1535,96	2,48±3,31	0,0022±3E-05
EE 12,5 mg/mL	300,46±62,81	0,27±0,37	0,0023±0,0003
EE 25 mg/mL	-	-	-

TABELA 4.29 - Volume do tumor de Ehrlich após 23 dias de inoculação e percentual de inibição tumoral, em camundongos que receberam células ascíticas prétratadas com diferentes concentrações de EE *C. echinata* e Metotrexato – MTX.

Tratamentos	Volume do Tumor (mm^3)	% IT
Controle	745,57 ± 442,00	-
MTX 0,5mg/mL	1090,63 ± 772,87	-46,28
EE 6,25 mg/mL	1492,08 ± 1535,96	-100,13
EE 12,5 mg/mL	300,46 ± 62,81	59,70
EE 25 mg/mL	0	100,00

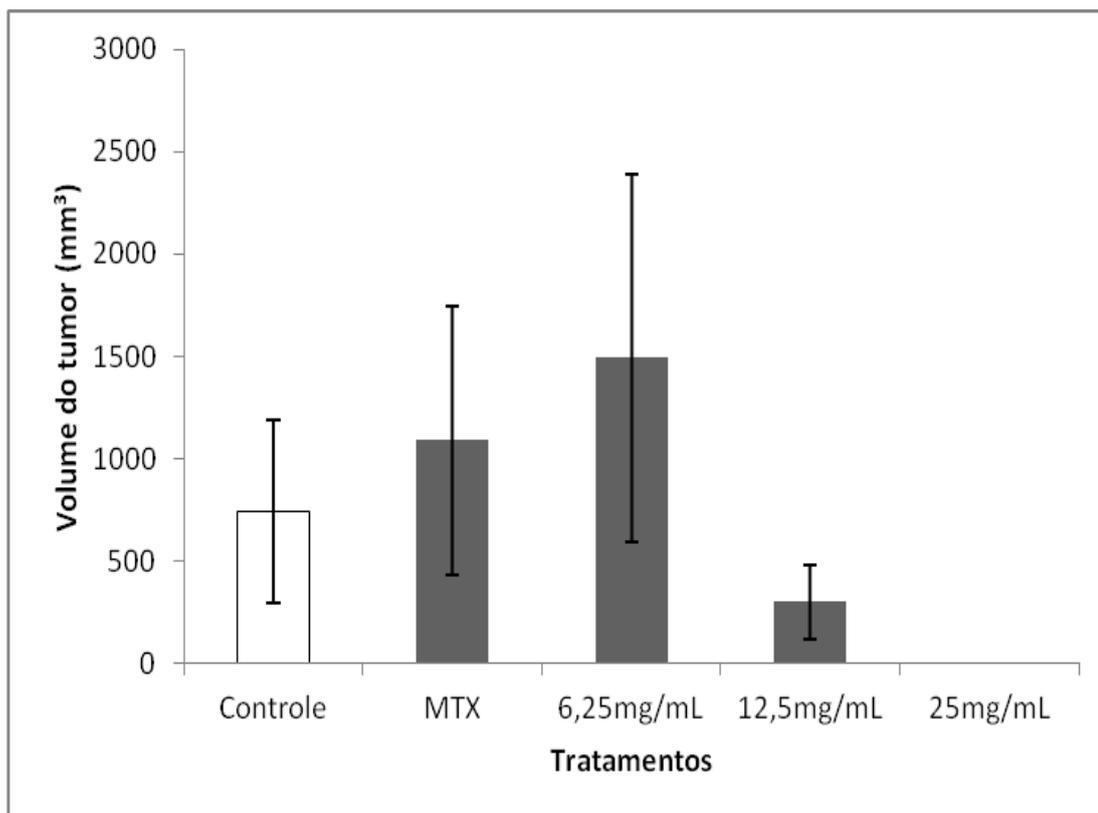


FIGURA 4.24 - Variação do volume do tumor de Ehrlich conforme a concentração de EE de *C. echinata* e Metotrexato – MTX empregado nas preparações celulares por uma hora, antes da inoculação nos animais. Na concentração de 25mg/mL não ocorreu crescimento de tumor nos animais.

Na tentativa de se verificar mais detalhadamente o perfil da variação de volume tumoral nos animais responsivos, procurou-se verificar a variação temporal de volume do tumor nos camundongos responsivos que receberam células ascíticas sob diferentes condições de pré-tratamento. Nas figuras 4.25, 4.26, 4.27 e 4.28 podem ser observadas as variações de volume do tumor de Ehrlich em animais pertencentes a todos os tratamentos, inclusive o grupo controle; sendo que os parâmetros de regressão das funções matemáticas que descrevem estas variações visualizados respectivamente nas tabelas 4.30, 4.31, 4.32 e 4.33. Em termos gerais verificou-se que os tumores cresceram nos animais responsivos de forma característica conforme o tipo de tratamento, sendo que na tabela 4.34 encontram-se resumidos os valores médios e os respectivos desvios referentes aos coeficientes angulares de todas as funções matemáticas obtidas, para cada tipo de tratamento empregado, apresentando-se graficamente representados na figura 4.29.

Considerando-se, entretanto, o coeficiente angular como um parâmetro que avalia a taxa de crescimento tumoral em relação ao tempo, pode-se dizer que a

menor taxa de crescimento observada foi referente aos tumores de animais que receberam células ascíticas pré-tratadas com EE e *C. echinata* na concentração de 12,5mg/mL, valor este significativamente diferente em relação aos resultados observados para o grupo controle, para um valor de $p < 0,05$. Lembrando-se, entretanto, que o pré-tratamento de células ascíticas com EE de *C. echinata* a 25 mg/mL proporcionou uma inibição tumoral de 100%, como já assinalado acima.

Também é interessante destacar o fato de que células ascíticas tratadas com MTX 0,5 mg/mL apresentou a maior taxa de crescimento tumoral, superando mesmo a taxa observada para os tumores dos animais do grupo controle, quando aplicada nos camundongos hospedeiros; o que reintera o fato de que MTX funcionou como um estímulo que ao invés de inibir, estimulou o desenvolvimento dos tumores nos animais responsivos.

Em termos gerais, é interessante destacar o fato de que alterações na taxa de crescimento do tumor sinalizam ações de interferências sobre os mecanismos que regulam e definem os padrões de desenvolvimento da massa tumoral em crescimento, portanto um alvo relativamente diferente dos convencionalmente abordados nos estudos da carcinogênese. Deste modo pode-se inferir que EE de *C. echinata*, de alguma forma interfere sobre estes mecanismos, e que esta interferência parece aumentar com o aumento da concentração ou da dose empregada.

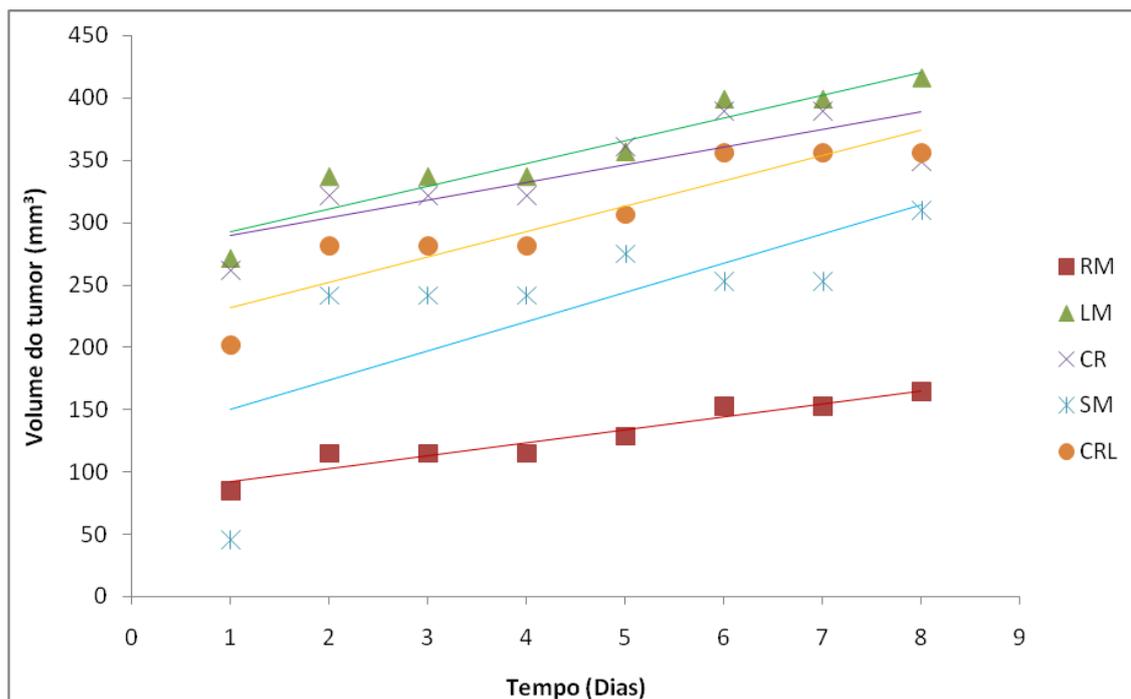


FIGURA 4.25 - Variação temporal do volume do tumor de Ehrlich em camundongos do grupo controle, que receberam células ascíticas tratadas com polietileno glicol em solução salina por uma hora antes da inoculação nos animais.

TABELA 4.30 - Parâmetros de regressão das funções matemáticas que descrevem a variação temporal do volume do tumor de Ehrlich em camundongos do grupo controle, que receberam células ascíticas tratadas com propilenoglicol em solução salina por uma hora antes da inoculação nos animais.

Animais	a	b	R ²
CM	0,03	0	1,00E-31
RM	10,40	81,53	0,92
LM	18,17	274,60	0,89
CR	14,18	275,10	0,67
SM	23,47	126,60	0,53
CRL	20,35	210,80	0,86
Media	17,314	-	-
Desvio	5,135	-	-

OBS: a – Coeficiente angular; b – Coeficiente linear; R² – Coeficiente de determinação.

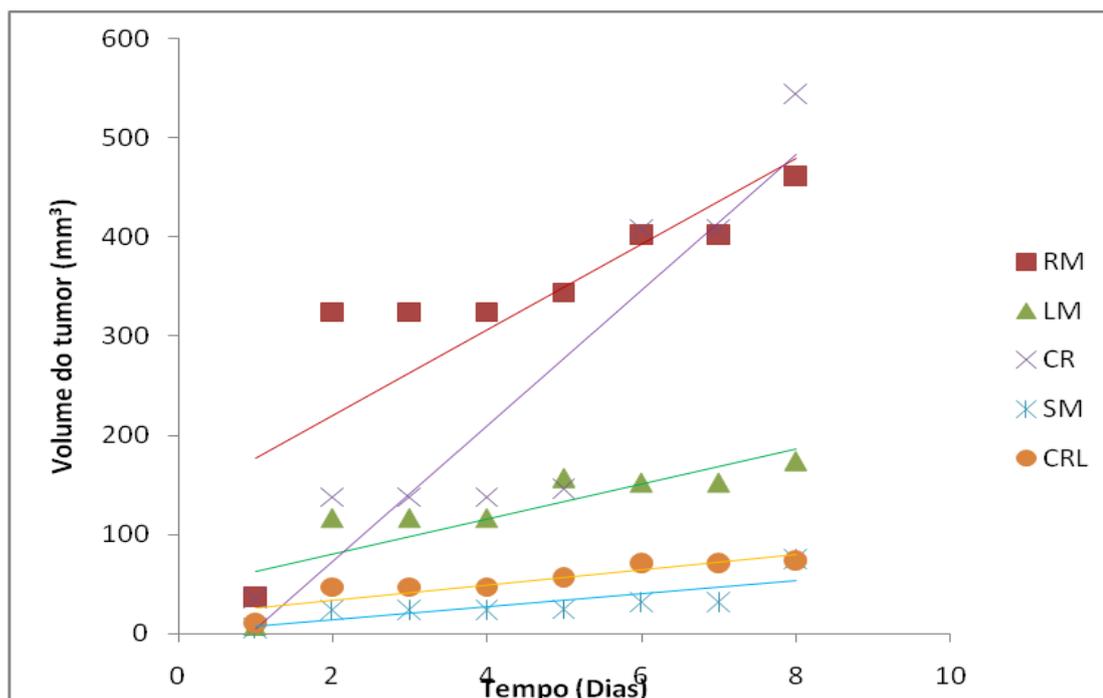


FIGURA 4.26 - Variação temporal do volume do tumor de Ehrlich em camundongos do grupo controle que receberam células ascíticas tratadas com 0,5mg/mL de Metotrexato – MTX por uma hora, antes da inoculação nos animais.

TABELA 4.31 - Parâmetros de regressão das funções matemáticas que descrevem a variação temporal do volume do tumor de Ehrlich em camundongos do grupo controle que receberam células ascíticas tratadas com 0,5mg/mL de Metotrexato – MTX por uma hora, antes da inoculação nos animais.

Animais	a	b	R ²
CM	-	-	-
RM	43,14	133,90	0,68
LM	17,78	44,39	0,70
CR	68,29	-63,28	0,85
SM	6,54	0,78	0,64
CRL	7,74	17,79	0,82
Media	28,698	-	-
Desvio	26,578	-	-

OBS: a – Coeficiente angular; b – Coeficiente linear; R² – Coeficiente de determinação.

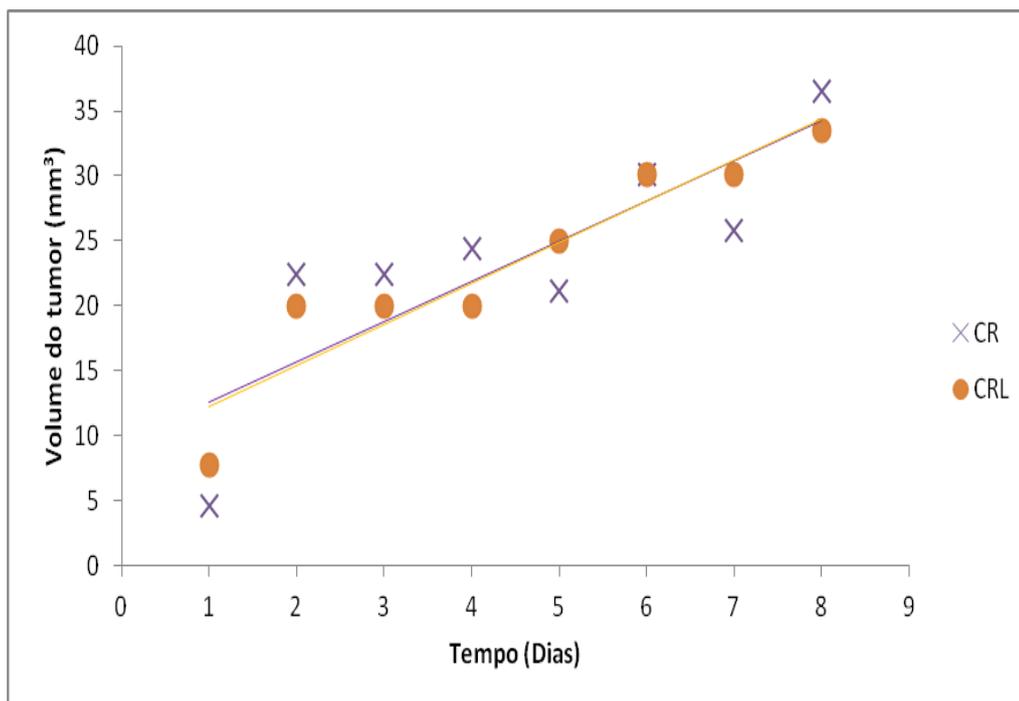


FIGURA 4.27 - Variação temporal do volume do tumor de Ehrlich em camundongos do grupo controle que receberam células ascíticas tratadas com 12,5mg/mL de EE *C. echinata* por uma hora, antes da inoculação nos animais.

TABELA 4.32 - Parâmetros de regressão das funções matemáticas que descrevem a variação temporal do volume do tumor de Ehrlich em camundongos do grupo controle que receberam células ascíticas tratadas com 12,5mg/mL de EE *C. echinata* por uma hora, antes da inoculação nos animais.

Animais	a	b	R ²
CM	-	-	-
RM	-	-	-
LM	-	-	-
CR	3,10	9,49	0,69
SM	-	-	-
CRL	3,17	9,03	0,89
Media	3,134	-	-
Desvio	0,053	-	-

OBS: a – Coeficiente angular; b – Coeficiente linear; R² – Coeficiente de determinação.

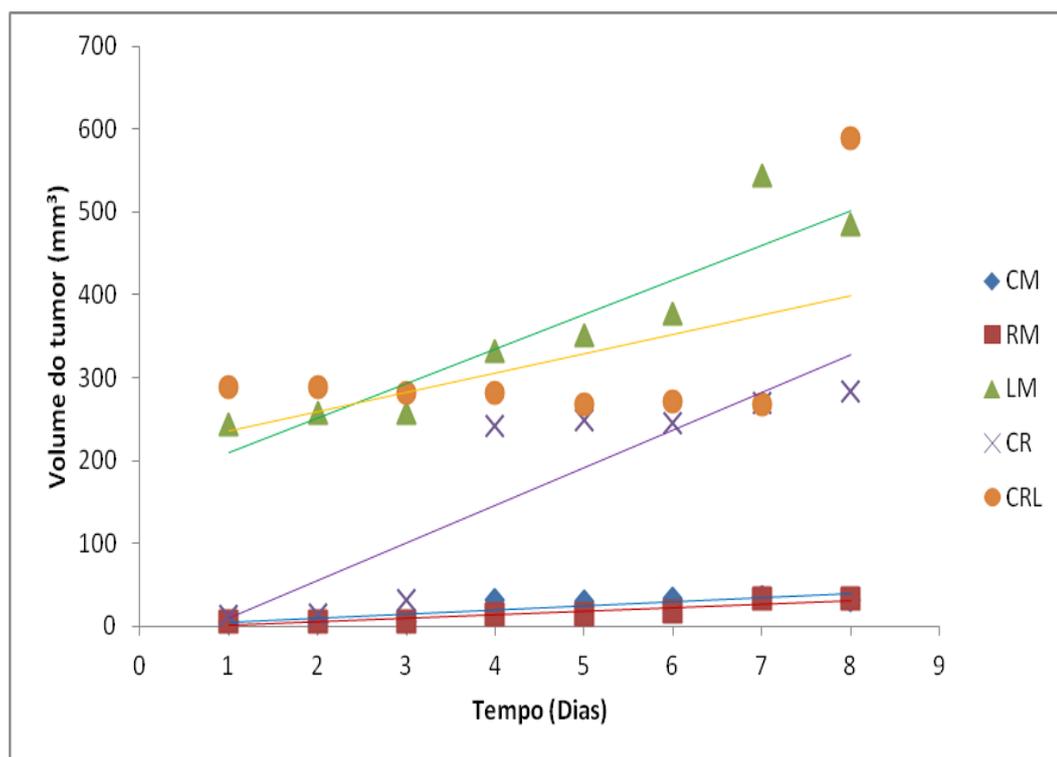


FIGURA 4.28 - Variação temporal do volume do tumor de Ehrlich em camundongos do grupo controle que receberam células ascíticas tratadas com 6,25 mg/mL de EE *C. echinata* por uma hora antes da inoculação nos animais.

TABELA 4.33 - Parâmetros de regressão das funções matemáticas que descrevem a variação temporal do volume do tumor de Ehrlich em camundongos do grupo controle que receberam células ascíticas tratadas com 6,25 mg/mL de EE de *C. echinata* por uma hora antes da inoculação nos animais.

Animais	a	b	R ²
CM	5,01	-0,35	0,74
RM	4,31	-2,91	0,86
LM	41,63	168,70	0,86
CR	45,38	-35,77	0,80
SM	23,26	212,20	0,27
CRL			
Media	23,9186	-	-
Desvio	19,47199	-	-

OBS: a – Coeficiente angular; b – Coeficiente linear; R² – Coeficiente de determinação.

TABELA 4.34 - Coeficientes angulares (a) das funções matemáticas que descrevem a variação temporal do volume do tumor de Ehrlich em camundongos inoculados com células ascíticas tratadas com diferentes concentrações de EE de *C. echinata* ou Metotrexato – MTX por uma hora antes da inoculação nos animais.

Tratamentos	Media	Desvio	CV
Controle	17,314	5,134971	29,65791
MTX 0,5 mg/mL	28,6982	26,57758	92,61062
EE 12,5 mg/mL	3,1335	0,053033	1,692453
EE 6,25 mg/mL	23,9186	19,47199	81,40941

OBS: O coeficiente angular numa função linear diz respeito à taxa de variação infinitesimal da função no intervalo temporal.

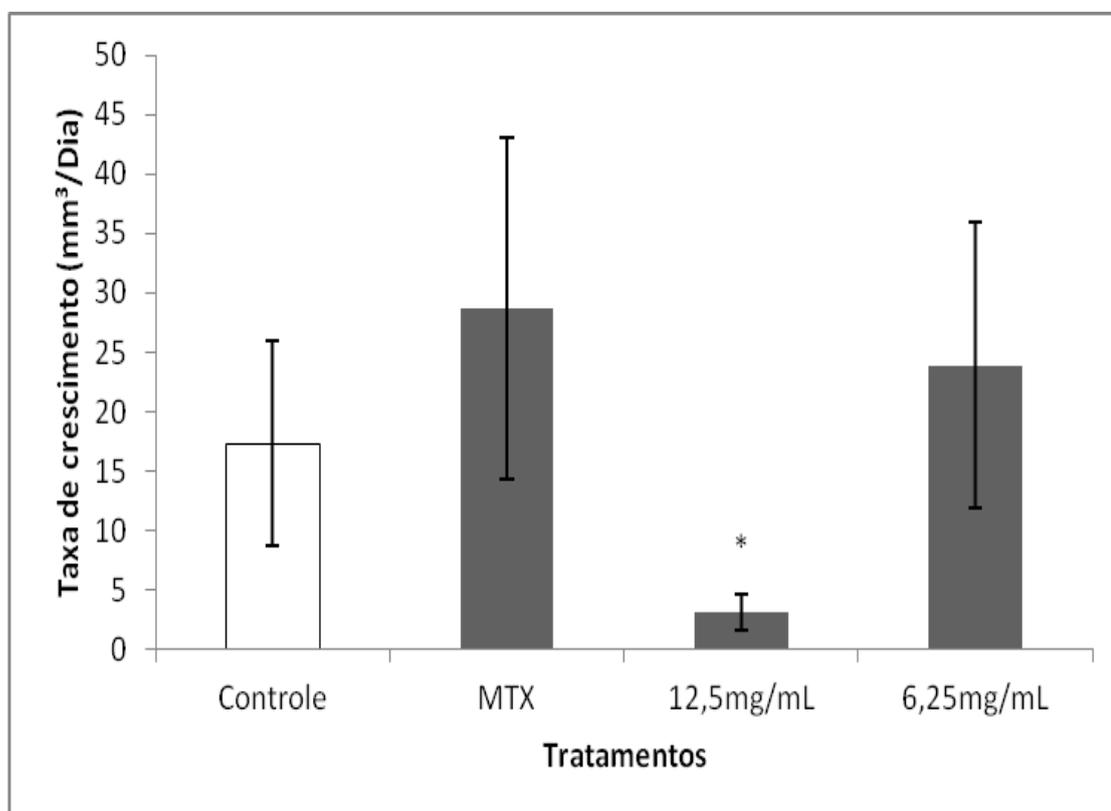


FIGURA 4.29 - Taxa de crescimento do tumor de Ehrlich em camundongos inoculados com células ascíticas tratadas com diferentes concentrações de EE *C. echinata* ou Metotrexato – MTX por uma hora antes da inoculação nos animais. * Diferença significativa em relação ao controle para um valor de $p < 0,05$.

Numa etapa subsequente, foram observados alguns órgãos dos animais responsivos aos tumores nos diferentes tratamentos, avaliando-se o peso relativo destas estruturas. É importante que se diga que o peso relativo é uma medida de normalização de dados, que permite a comparação cruzada entre estruturas

semelhantes de diferentes tipos de tratamentos, considerando-se como melhor estimativa do desenvolvimento metabólico dos animais de cada grupo, o próprio peso corpóreo.

Na tabela 4.35 podem ser observados os respectivos valores de peso relativo de órgãos como pulmão, fígado, rins e baço de camundongos que receberam células ascíticas pré-tratadas com diferentes concentrações de EE de *C. echinata*. Entretanto, na figura 4.30 podem ser visualizados os valores de peso relativo referentes ao pulmão dos animais que desenvolveram tumores. Nesta figura observou-se que em todos os tratamentos ocorreu redução do peso relativo do órgão em relação aos valores observados para os animais do grupo controle. Em princípio, as alterações observadas correlacionam-se com a presença de células ascíticas estimuladas com diferentes concentrações de mediadores, pelo menos na fase inicial quando da inoculação nos animais hospedeiros. Porém, por limitações da metodologia empregada nesta pesquisa, não é possível afirmar se estas células produziram mediadores que concorreram para a redução da massa pulmonar.

Já com relação ao fígado, não foram observadas diferenças de peso relativo quanto aos tratamentos empregados, conforme mostram os dados na figura 4.31.

Em relação aos animais do grupo controle, o rim de animais que receberam células ascíticas pré-tratadas com EE de *C. echinata* na concentração de 25 mg/mL apresentaram uma redução de peso relativo significativa para um valor de $p < 0,05$. Isto denota que possíveis metabólitos gerados a partir da interação das células ascíticas com componentes do meio interno do hospedeiro, nos diferentes momentos do desenvolvimento do tumor, interferiram sobre o metabolismo do tecido renal, conforme mostram os dados da figura 4.32. Durante análise histopatológica do tecido renal verificamos que os animais deste grupo apresentavam degeneração turva, degeneração vacuolar e retração glomerular (APÊNDICE B). Estas diferenças também foram observadas em relação aos pré-tratamentos efetuados tanto com MTX ($p = 0,025$), e EE de *C. echinata* a 12,5 mg/mL ($p = 0,021$), neste grupos foi evidenciado degeneração turva e vacuolar, durante a verificação histopatológica (APÊNDICE B) (COELHO, 2002).

Na figura 4.33 podem ser observados os valores médios de peso relativo para o baço de camundongos que receberam células ascíticas tratadas com diferentes concentrações de EE de *C. echinata*, MTX e animais do grupo controle. Nesta figura observou-se que os tratamentos com EE de *C. echinata* nas concentrações de 12,5

mg/mL e 25 mg/mL proporcionaram uma redução significativa do peso relativo deste órgão em relação aos valores observados para os animais do grupo controle, sendo que a maior concentração promoveu uma maior redução do peso relativo.

Valem também neste caso a indagação de que maneiras células ascíticas estimuladas com EE de *C. echinata* conseguiriam promover a produção de mediadores que concorressem para a redução do baço?

É importante lembrar que nos ensaios toxicológicos com EE *C. echinata* em ratos, foi observado nos exames hematológicos uma redução importante nos glóbulos brancos e nas plaquetas, protagonizadas pela possível participação de substratos ativos para com os mecanismos associados à produção de células imunológicas, como já foi discutido acima.

TABELA 4.35 - Peso relativo dos órgãos (g/g de peso corpóreo), de camundongos que receberam células ascíticas do tumor de Ehrlich tratadas com diferentes concentrações de EE *C. echinata* e Metotrexato – MTX.

Tratamentos	Pulmão	Fígado	Rins	Baço
Controle	0,009±0,002	0,047±0,006	0,012±0,002	0,009±0,001
MTX 0,5 mg/mL	0,006±0,002	0,041±0,008	0,010±0,001	0,010±0,005
EE 25 mg/mL	0,006±0,002	0,039±0,005	0,009±0,001	0,005±0,001
EE 12,5 mg/mL	0,006±0,001	0,040±0,005	0,011±0,002	0,007±0,002
EE 6,25 mg/mL	0,006±0,001	0,043±0,013	0,010±0,002	0,009±0,004

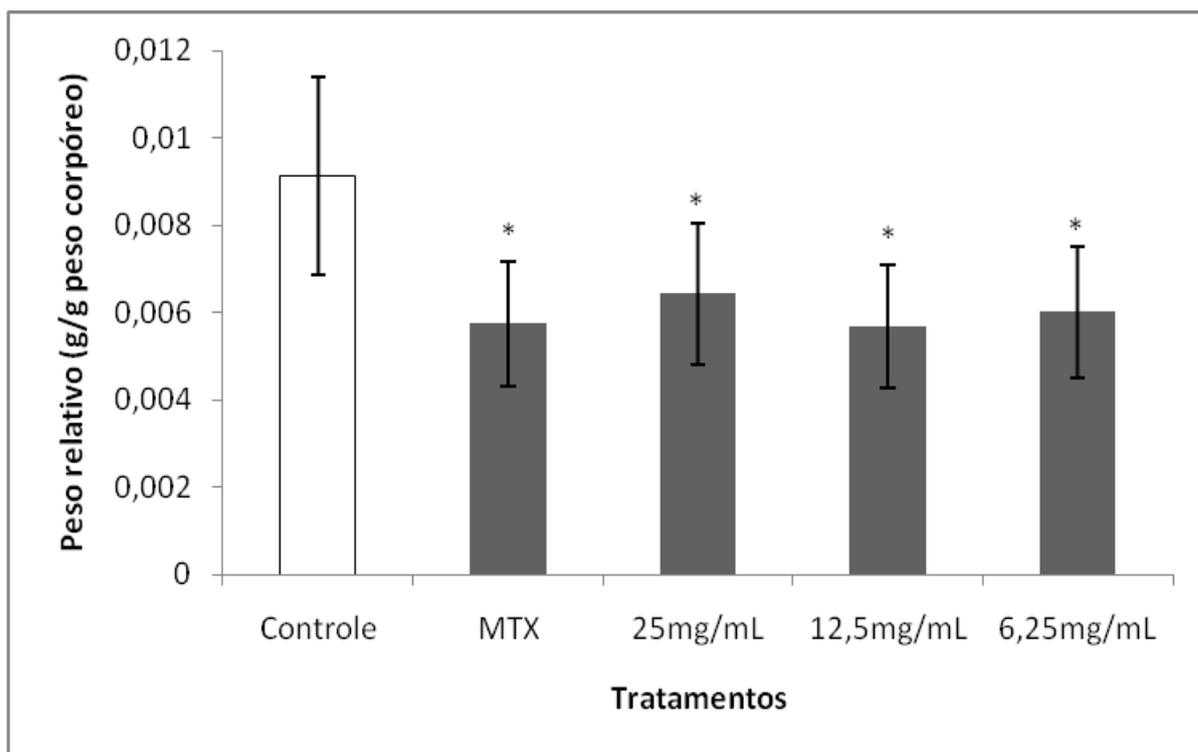


FIGURA 4.30 - Peso relativo do pulmão (g/g de peso corpóreo), de camundongos que receberam células ascíticas do tumor de Ehrlich tratadas com diferentes concentrações de EE de *C. echinata* e Metotrexato – MTX.* Diferença significativa para um valor de $p < 0,05$.

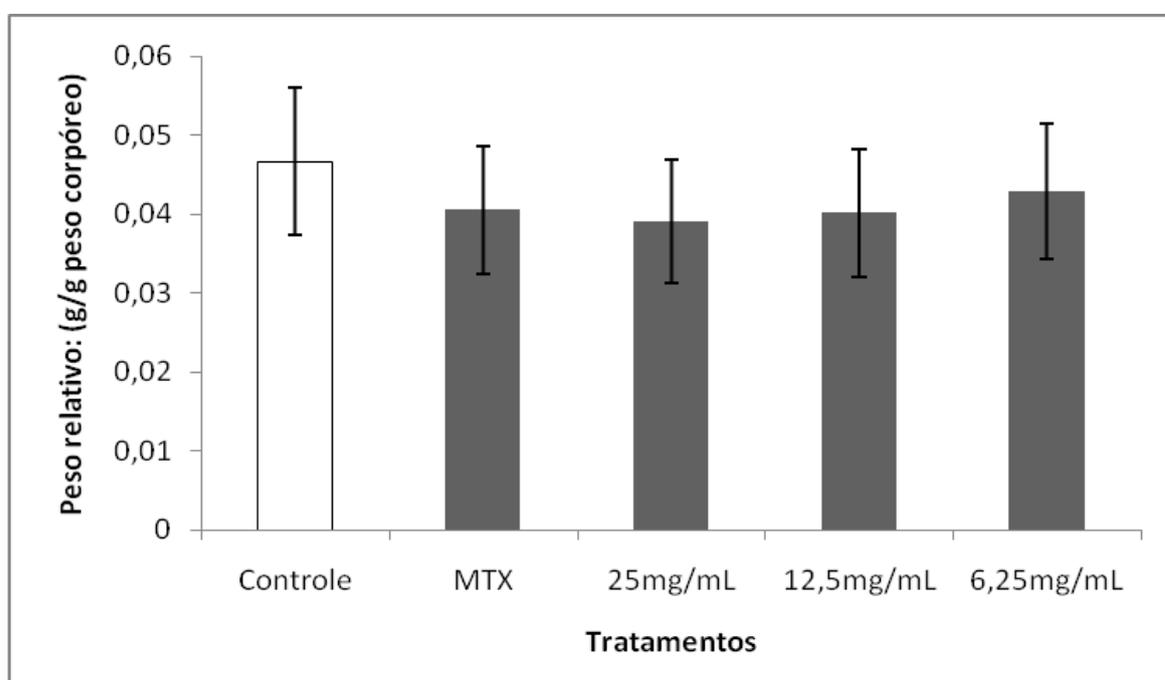


FIGURA 4.31 - Peso relativo do Fígado (g/g de peso corpóreo), de camundongos que receberam células ascíticas do tumor de Ehrlich tratadas com diferentes concentrações de EE de *C. echinata* e Metotrexato – MTX.

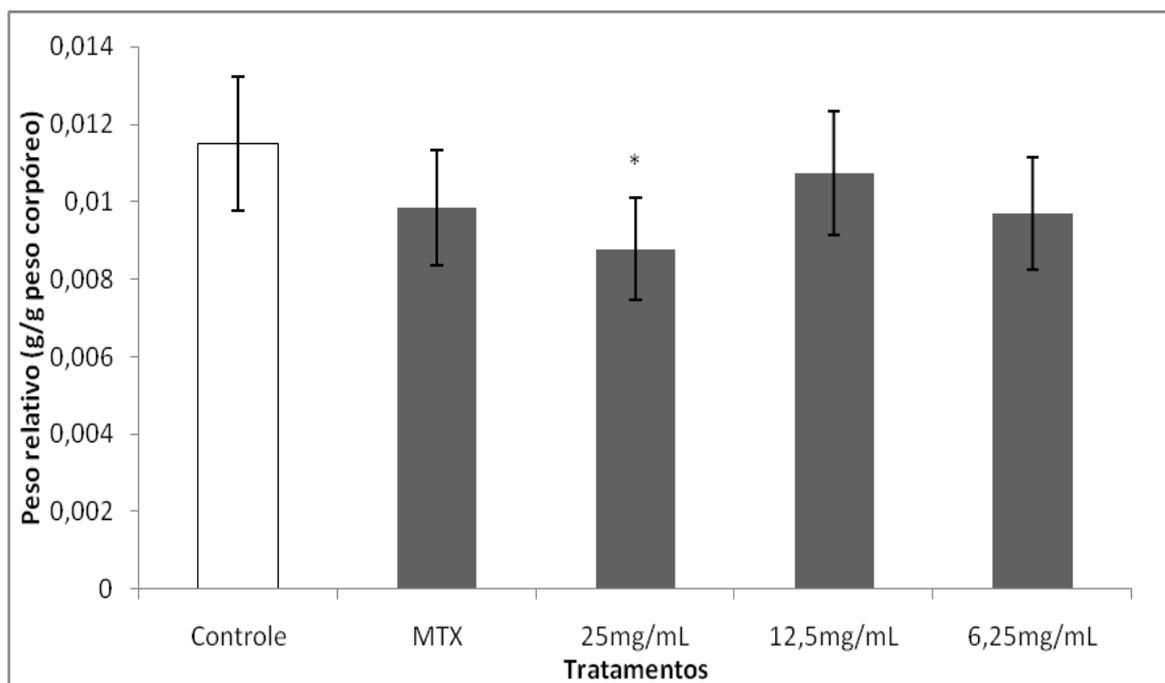


FIGURA 4.32 - Peso relativo do Rim (g/g de peso corpóreo), de camundongos que receberam células ascíticas do tumor de Ehrlich tratadas com diferentes concentrações de EE de *C. echinata* e Metotrexato – MTX. * Diferença significativa para um valor de $p < 0,05$.

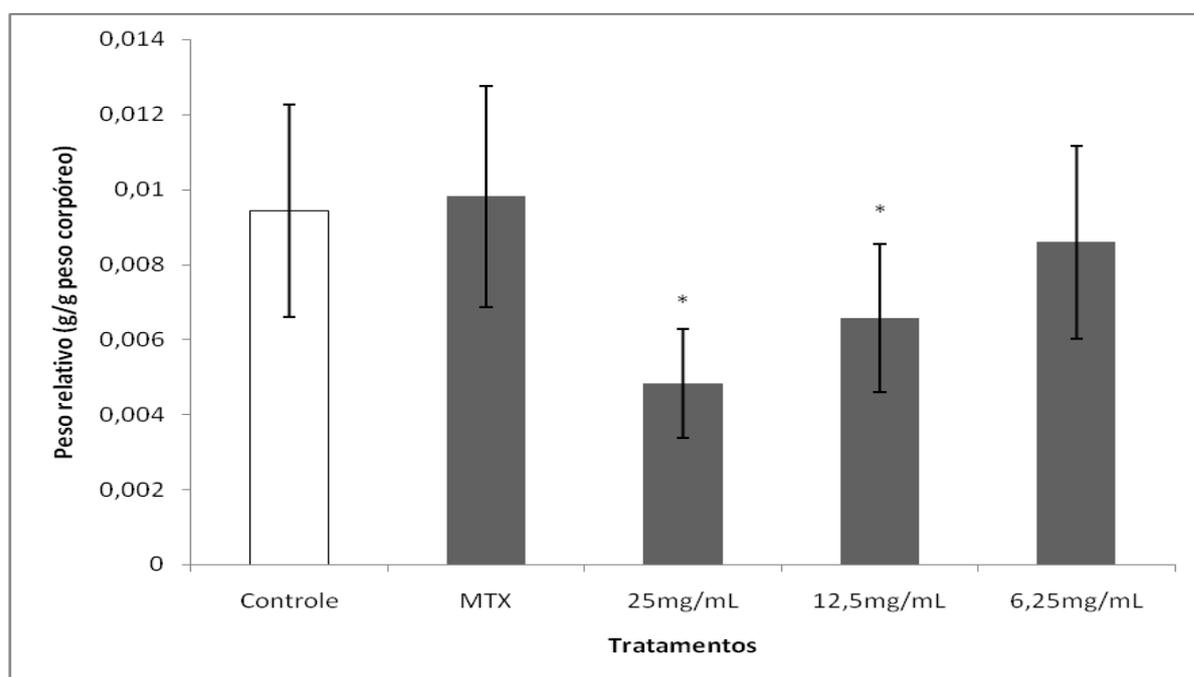


FIGURA 4.33 - Peso relativo do baço (g/g de peso corpóreo), de camundongos que receberam células ascíticas do tumor de Ehrlich tratadas com diferentes concentrações de EE de *C. echinata* e Metotrexato – MTX. * Diferença significativa para um valor de $p < 0,05$.

Quanto às análises séricas de animais que receberam células ascíticas pré-tratadas com diferentes concentrações de EE de *C. echinata*, MTX e controle, tem-se nas tabelas 4.36 e 4.37 os parâmetros hematológicos. Do ponto de vista estatístico as diferenças significativas importantes para um valor de $p < 0,05$, foram encontradas para os parâmetros RBC ($p = 0,014$), HTC ($p = 0,024$), VCM ($p = 0,044$) e WBC ($p = 0,040$), identificando-se uma redução em todos os parâmetros destacados para o tratamento das células ascíticas com a concentração de EE de *C. echinata* de 12,5 mg/mL contra 25 mg/mL.

TABELA 4.36 - Parâmetros hematológicos, de camundongos que receberam células ascíticas do tumor de Ehrlich tratadas com diferentes concentrações de EE *C. echinata* e Metotrexato – MTX.

Tratamentos	RBC ($10^6/\text{mm}^3$)	HGB (g%)	HTC (%)	VCM (μ^3)
Controle	6,85±1,26	8,62±5,15	36,20±7,26	52,72±2,06
MTX 0,5 mg/mL	6,06±1,50	11,38±1,80	35,20±5,89	61,27±21,18
EE 25 mg/mL	7,46±0,81	11,07±2,30	38,80±4,66	51,95±1,00
EE 12,5 mg/mL	5,64±1,19	9,68±1,71	30,00±6,38	53,23±0,92
EE 6,25 mg/mL	-	-	-	-

RBC: hemácias; HGB: hemoglobina; ; HTC: hematócrito; VCM: volume corpuscular médio;

TABELA 4.37 - Parâmetros hematológicos, de camundongos que receberam células ascíticas do tumor de Ehrlich tratadas com diferentes concentrações de EE *C. echinata* e Metotrexato – MTX.

Tratamentos	HCM (pg)	CHCM (%)	WBC (/mm^3)
Controle	15,58±2,51	29,60±4,95	8220±6024,70
MTX 0,5 mg/mL	19,78±6,55	32,38±0,63	9740±5220,44
EE 25 mg/mL	15,00±3,43	28,99±6,98	7500±3276,43
EE 12,5 mg/mL	17,28±0,75	32,47±1,45	4075±550,00
EE 6,25 mg/mL	-	-	-

HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média; WBC: leucócitos.

Os parâmetros bioquímicos séricos referentes aos animais inoculados com suspensão de células tumorais pré-tratadas com diferentes concentrações de EE de

C. echinata e MTX podem ser visualizados nas tabelas de 4.38 a 4.41. Como principais resultados relevantes verificou-se que ocorreu uma redução significativa de ácido úrico nos animais que receberam células tumorais pré-tratadas com EE de *C. echinata* na concentração de 25 mg/mL, principalmente em relação ao grupo controle ($p = 0,004$) e ao grupo inoculado com células tumorais que foram tratadas com MTX ($P = 0,003$). Foi verificada uma redução de creatina neste mesmo grupo ($p = 0,03$). Com relação à redução do ácido úrico, pode-se associar este fato às possíveis interferências de metabólitos gerados a partir da interação de células do carcinoma de Ehrlich pré-tratadas com EE de *C. echinata* com os diferentes domínios do metabolismo do animal hospedeiro, de forma que estas alterações, possivelmente, interferiram sobre o metabolismo de proteínas e ácidos nucleicos desses organismos. O mesmo tipo de argumento poderia ser transferido a caso da redução dos níveis de creatinina observados, o que também denuncia interferências importantes sobre os mecanismos de fosforilação e desfosforilação associados, por exemplo, às ações da creatina fosfato, reação esta associada ao metabolismo do tecido muscular.

Estas alterações metabólicas também foram reveladas em relação aos níveis de ALT, que se apresentaram reduzidos em relação ao grupo em que as células ascíticas foram tratadas com MTX ($p = 0,04$). A redução das transaminases também foi observada no ensaio de toxicidade subcrônica realizado em ratos, este resultado pode estar correlacionado ao processo de regeneração hepática, aqui também foi evidenciada a presença de inúmeros hepatócitos binucleados, durante análise histopatológica do tecido hepático (Apêndice B) (MELO et al., 2006; MARTINO, 2010).

Estes dados vão ao encontro dos resultados encontrados por autores como Lima, Oliveira e Nagem (2003) que, através de seu estudo sobre os efeitos do flavonoide quercetina e dos corantes bixina e norbixina sobre parâmetros sanguíneos de coelhos, verificaram que os compostos testados foram capazes de provocar alteração no metabolismo de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos ou minerais, promovendo a redução dos níveis de ácido úrico, creatinina e ALT nos animais.

Com o andamento da investigação há perspectivas de se encontrar com o mesmo tipo de substrato, uma nova conformação de modelagem experimental, e

verificarmos novos dados sobre os mecanismos de ação preconizados pelas substâncias presentes no EE de *C. echinata*.

TABELA 4.38 - Parâmetros bioquímicos, de camundongos que receberam suspensão de células do carcinoma de Ehrlich tratadas com diferentes concentrações de EE de *C. echinata* e Metotrexato – MTX.

Tratamentos	HDL (mg/dL)	VLDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)	Col. Total (mg/dL)
Controle	42,20±7,76	49,20±9,87	109,40±72,56	56,33±10,13
MTX 0,5 mg/mL	48,40±6,43	41,20±9,06	5,60...	60,67±23,28
EE 25 mg/mL	44,00±6,58	-	-	52,60±18,35
EE 12,5 mg/mL	38,60±10,62	-	-	83,67±60,42
EE 6,25 mg/mL	30,00±11,27	-	56,00±18,89	117,67±18,77

OBS: Col. Total – Colesterol total.

TABELA 4.39 - Parâmetros bioquímicos, de camundongos que receberam que receberam suspensão de células do carcinoma de Ehrlich tratadas com diferentes concentrações de EE de *C. echinata* e Metotrexato – MTX.

Tratamentos	Triglic. (mg/dL)	Glicose (mg/dL)	Ac. úrico (mg/dL)	Uréia (mg/dL)
Controle	213,50±53,07	236,83±103,0	5,78±1,68	52,00±6,26
		1		
MTX 0,5 mg/mL	178,83±44,87	214,80±49,39	8,90±3,01	36,50±13,37
EE 25 mg/mL	132,5±61,89	210,83±79,52	2,62±1,39	46,17±20,66
EE 12,5 mg/mL	161,00±67,77	246,8±60,81	5,28±2,27	54,50±8,76
EE 6,25 mg/mL	270,25±67,64	4,875±1,41	48,75±10,01	0,40±0,10

TABELA 4.40 - Parâmetros bioquímicos, de camundongos que receberam suspensão de células do carcinoma de Ehrlich tratadas com diferentes concentrações de EE de *C. echinata* e Metotrexato – MTX.

Tratamentos	Creatinina (mg/dL)	Proteínas Totais (mg/dL)	Albumina (g/dL)
Controle	0,60±0,21	7,00±0,10	1,87±0,10
MTX 0,5 mg/mL	0,94±0,90	7,63±0,99	1,90±0,78
EE 25 mg/mL	0,25±0,07	6,15±1,52	1,80±0,42
EE 12,5 mg/mL	0,45±0,07	7,78±0,52	2,02±0,27
EE 6,25 mg/mL	7,63±0,55	2,33±0,98	296,00±169,52

TABELA 4.41 - Parâmetros bioquímicos, de camundongos que receberam suspensão de células do carcinoma de Ehrlich tratadas com diferentes concentrações de EE de *C. echinata* e Metotrexato – MTX.

Tratamentos	AST (u/L)	ALT (u/L)	Fosfatase Alc. (u/L)
Controle	175,60±105,56	65,20±46,60	22,00
MTX 0,5 mg/mL	115,60±66,001	68,00±12,63	-
EE 25 mg/mL	184,50±100,06	51,83±13,62	61,00±37,82
EE 12,5 mg/mL	189,33±100,56	53,50±22,46	99,67±70,78
EE 6,25 mg/mL	41,50±15,33	45,00	-

4.7.2 Efeitos do EE *C. echinata* sobre o crescimento tumoral em animais pré-tratados com inibidores da cascata do ácido araquidônico.

Sabe-se que a inflamação é um componente crítico da progressão do tumor, desta forma substâncias capazes de inibir os mediadores da inflamação têm sido estudados como agentes quimioprotetores contra o câncer (LU; OUYANG; HUANG, 2006). Considerando o potencial anti-inflamatório do EE de *C. echinata* comprovado por Silva (2006), e sua capacidade de impedir progressão da angiogênese em um modelo inflamatório, além de seu desempenho na inibição de radicais livres, ambas as atividades apresentadas e discutidas neste trabalho; levantamos a seguinte

hipótese: Seria o EE de *C. echinata* capaz de inibir a progressão tumoral através de mecanismos inter-relacionados a cascata do ácido araquidônico?

Na tentativa de se elucidar possíveis caminhos para a determinação dos principais fatores associados aos mecanismos de ação protagonizados pelo extrato etanólico (EE) de *C. echinata*, realizamos ensaios com uma concentração de extrato eficiente para inibição tumoral, mas aplicando-a em animais pré-tratados com inibidores da cascata do ácido araquidônico: dexametasona – inibidor indireto da fosfolipase A₂ e indometacina – inibidor não seletivo da COX (ARRUDA, 2002).

Na tabela 4.42, visualizam-se os valores médios referentes ao peso corpóreo de camundongos pré-tratados com dexametasona (3,93 mg/Kg) e indometacina (3,58 mg/Kg) conjuntamente com EE de *C. echinata* (25mg/Kg), que receberam suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.

TABELA 4.42 - Media de peso corpóreo (g) ao longo do tempo, de camundongos pré-tratados com dexametasona (3,93 mg/Kg) e indometacina (3,58 mg/Kg) conjuntamente com EE de *C. echinata* (25mg/Kg), induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.

Tratamentos	Tempo (Dias)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Controle	41,70	41,58	42,40	45,10	44,90	45,00	46,40	47,63
DEXA+EE	40,42	40,10	39,83	39,67	39,08	39,17	39,33	40,17
INDO+EE	41,25	42,50	41,00	42,75	42,00	43,50	45,50	45,00
SF+EE	42,25	41,50	42,67	43,08	42,50	43,17	44,00	44,83

OBS: DEXA+EE – Dexametasona + EE *C. echinata*. INDO+ EE – Indometacina + EE *C. echinata*. SF+EE. Soro fisiológico + EE *C. echinata*.

Para melhor elucidação dos efeitos, construiu-se a figura 4.34, cujos parâmetros de regressão podem ser visualizados na tabela 4.43. Uma observação atenta ao sinal do coeficiente angular nos permite observar que os animais pré-tratados com dexametasona - DEXA que receberam suspensão de células do carcinoma de Ehrlich + 25mg/Kg de EE de *C. echinata* apresentaram uma redução do peso corpóreo ao longo do tempo. Nesta mesma tabela 4.43, assim como na figura 4.35 observou-se que os animais deste grupo apresentaram a menor taxa de massa corpórea, em relação aos demais tratamentos. Este fato denuncia uma importante interferência sobre o metabolismo animal, principalmente relacionado

com a participação de mediadores da cascata do ácido araquidônico neste processo.

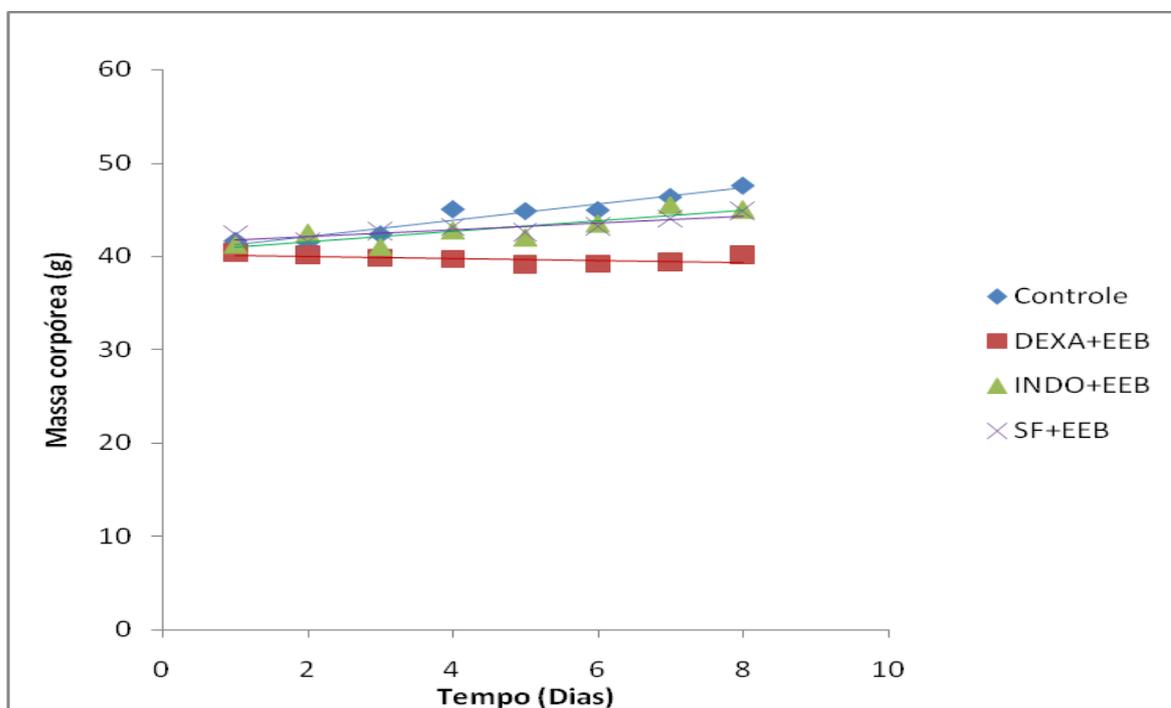


FIGURA 4.34 - Variação temporal do peso corpóreo (g), em camundongos pré-tratados com dexametazona (3,93 mg/Kg) ou indometacina (3,58 mg/Kg) conjuntamente com EE de *C. echinata* (25mg/Kg), ou soro fisiológico, induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.

TABELA 4.43 - Parâmetros de regressão das funções matemáticas que descrevem a variação temporal do peso corpóreo (g), em camundongos pré-tratados com dexametazona (3,93 mg/Kg) ou indometacina (3,58 mg/Kg) conjuntamente com EE *C. echinata* (25mg/Kg), ou soro fisiológico (SF), induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.

Tratamentos	a	b	R ²	Derivada I
Controle	0,871	40,418	0,918	0,871
DEXA+EE	-0,097	40,158	0,233	-0,097
INDO+EE	0,571	40,366	0,728	0,571
SF+EE	0,375	41,312	0,780	0,375

OBS: DEXA+EE – Dexametazona + EE *C. echinata*. INDO+ EE – Indometacina + EE *C. echinata*. SF+EE. Soro fisiológico + EE *C. echinata*. a - Coeficiente angular; b- coeficiente linear; R² Coeficiente de determinação.

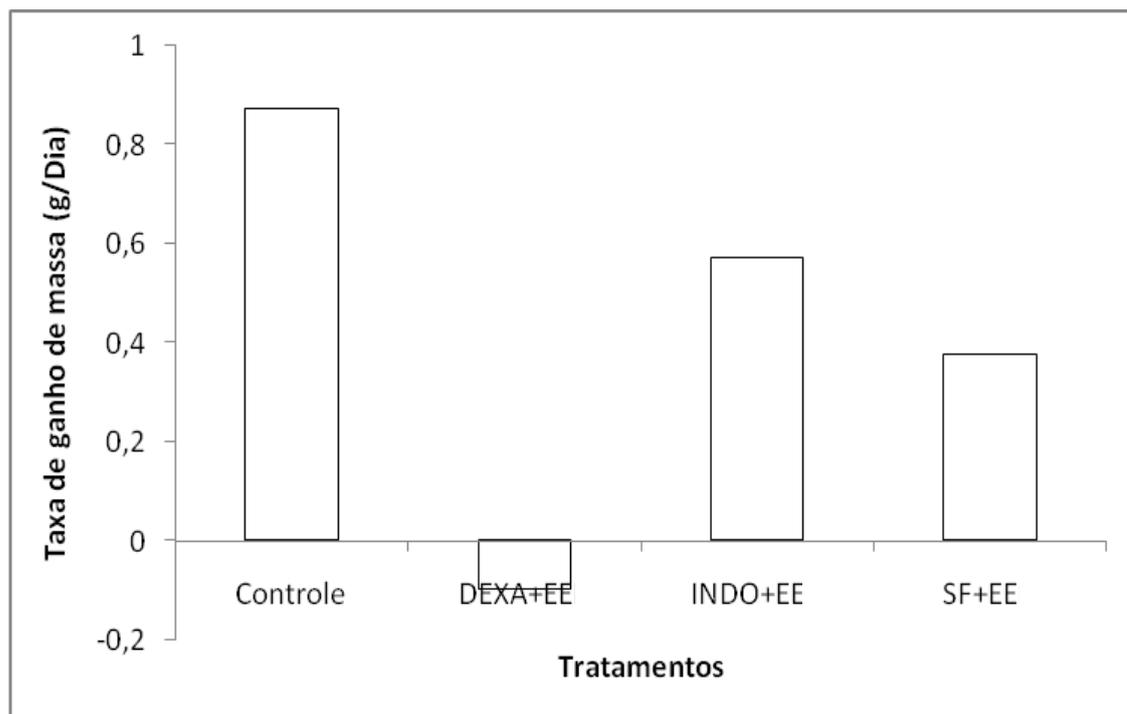


FIGURA 4.35 - Taxa de ganho de massa em função do tempo, em camundongos pré-tratados com dexametazona (3,93 mg/Kg) ou indometacina (3,58 mg/Kg) conjuntamente com EE *C. echinata* (25mg/Kg), ou soro fisiológico (SF), induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.

A análise do processo de crescimento tumoral possibilitou constatar que o volume médio do tumor variou em função do tipo de tratamento empregado. Para o grupo controle os dados sobre a variação temporal do volume do tumor podem ser visualizados na tabela 4.44 e figura 4.36.

TABELA 4.44 - Variação temporal do volume do tumor (mm³) em camundongos do grupo controle, induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.

Animais	Tempo (Dias)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
CM	0	0	0,0094	0,0094	0,1340	1,6078	2,3740	1,8575
RM	0	0,0005	0,0005	0,0335	0,0523	0,2680	1,8758	3,3915
LM	0	0,0005	0,0188	0,0188	0,1539	1,6413	3,2219	1,2059
CR	0	0,0005	0,0042	0,0005	0,0251	0,1283	0,4187	1,7418
SM	0	0,0005	0,0005	0,0005	0,0283	0,1047	0,2680	1,0614
CRL	0	0	0	0	0	0	0	0
*Media								1,8516
Desvio								0,9253

OBS: * Valor medio do volume do tumor ao 8^o dia, após inicio de desenvolvimento tumoral.

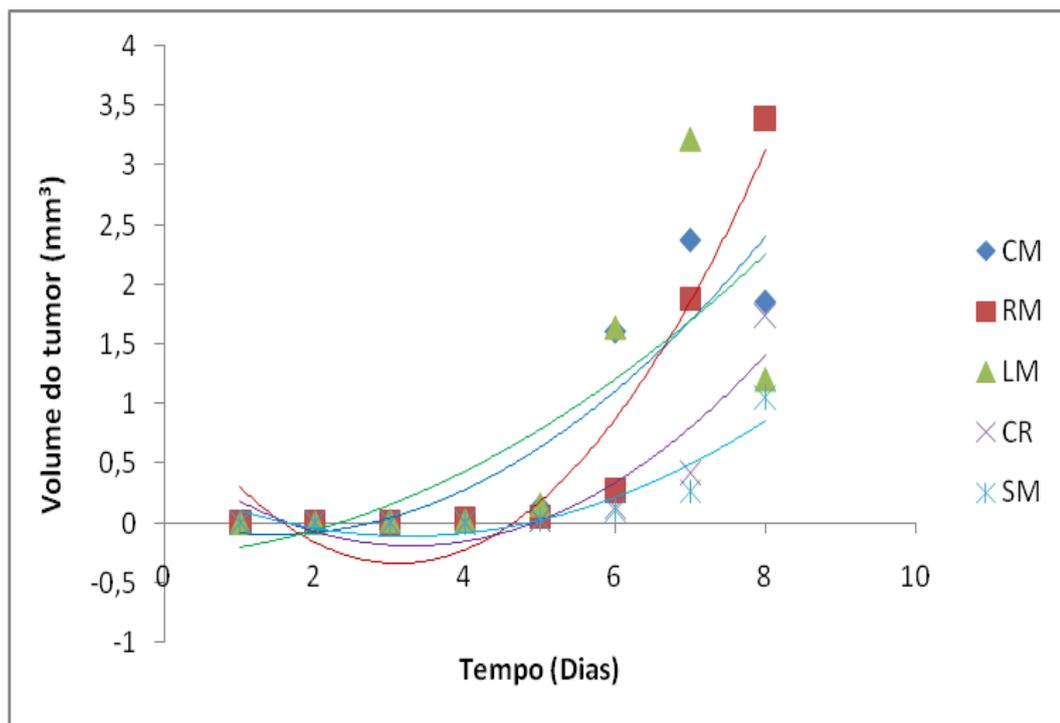


FIGURA 4.36 - Variação temporal do volume do tumor (mm^3) em camundongos do grupo controle, induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.

A variação temporal do volume do tumor pode ser descrita por uma função matemática do tipo quadrática cujos e os parâmetros de regressão podem ser visualizados na tabela 4.45. Nesta última tabela (4.45), verificou-se que o tumor teve o seu menor desenvolvimento no tempo de $2,11 \pm 1,68$ dias.

TABELA 4.45 - Parâmetros de regressão das funções matemáticas que descrevem a variação temporal do volume do tumor (mm^3) em camundongos do grupo controle, induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.

Animais	a	b	c	R^2	Derivada*	Condição	Tempo**
CM	0,058	-0,171	0,029	0,813	0,764	Mínimo	1,46
RM	0,145	-0,902	1,062	0,933	1,419	Mínimo	3,11
LM	0,035	0,040	-	0,559	0,594	Mínimo	-0,58
			0,281				
CR	0,072	-0,473	0,583	0,843	0,678	Mínimo	3,29
SM	0,043	-0,279	0,341	0,855	0,409	Mínimo	3,25
CRL	-	-	-	-	-	-	-
Media					0,773		2,11
Desvio					0,399		1,68

OBS: a, b e c são coeficientes de uma função do tipo quadrática; R^2 – Coeficiente de determinação. * Derivada de uma função quadrática no oitavo dia de crescimento tumoral.** Tempo em que a função apresenta a menor resposta de crescimento tumoral (Dias).

Na tabela 4.46 podem ser observados os valores referentes à variação temporal do volume do tumor em animais pré-tratados com DEXA e que foram induzidos, posteriormente, com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich + EE de *C. echinata* na dose de 25 mg/Kg. Nesta tabela pode ser observado que o %IT = 92,11 assinalando um importante efeito inibitório protagonizado pelo extrato em associação com o pré-tratamento com DEXA. A representação gráfica desta variação de volume tumoral pode ser melhor visualizada na figura 4.37. Os parâmetros de regressão das funções matemáticas que melhor descrevem estas variações podem ser visualizados na tabela 4.47.

TABELA 4.46 - Variação temporal do volume do tumor (mm^3) em camundongos que recebia tratamento com DEXA (3,93 mg/Kg) + EE *C. echinata* (25 mg/Kg), e posteriormente induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.

Animais	Tempo (Dias)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
CM	0	0	0	0,0005	0,0005	0,0010	0,0262	0,4239
RM	0	0	0,0005	0,0005	0,0094	0,0094	0,0141	0,2544
LM	0	0,0005	0,0011	0,0011	0,0011	0,0141	0,1282	0,0754
CR	0	0,0005	0,0005	0,0005	0,0042	0,0141	0,0393	0,0335
SM	0	0	0,0005	0,0040	0,0042	0,0094	0,1131	0,0141
CRL	0	0,0005	0,0021	0,0042	0,0042	0,0042	0,0523	0,0753
*Media								0,1462
Desvio								0,1606
%IT								92,11

OBS:* Valor medio do volume do tumor ao 8^o dia, após inicio de desenvolvimento tumoral. %IT – Percentual de inibição tumoral.

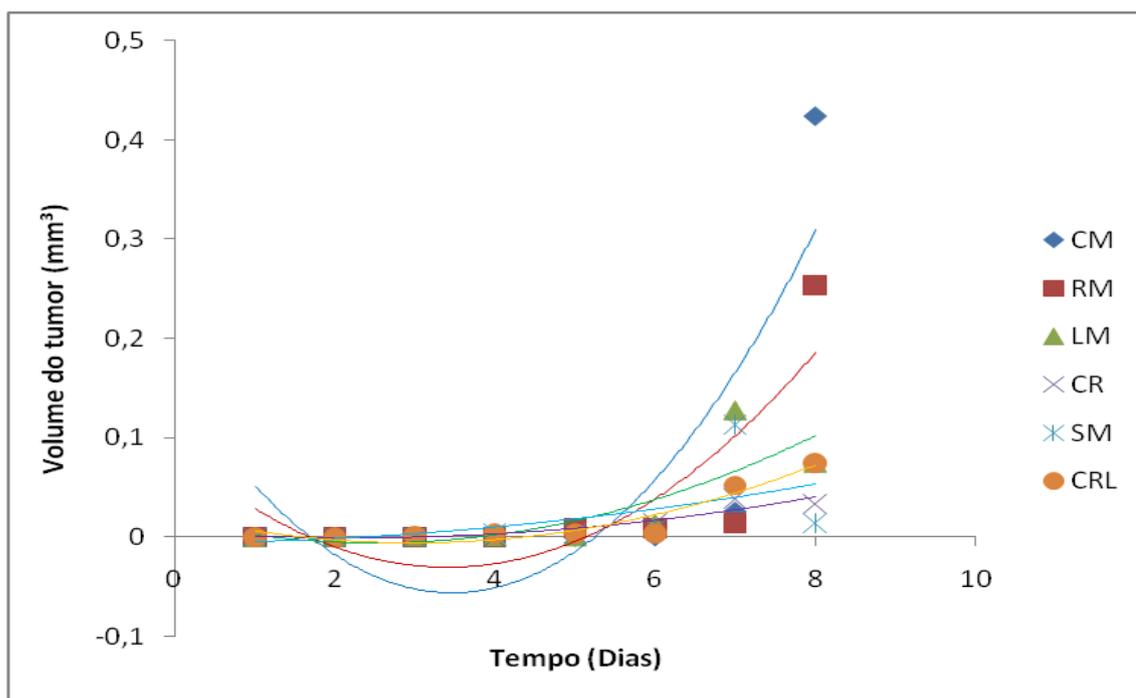


FIGURA 4.37 - Variação temporal do volume do tumor (mm^3) em camundongos tratados com DEXA (3,93 mg/Kg) + EE de *C. echinata* (25 mg/Kg), induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.

Na tabela 4.47 pode-se verificar que o tempo de resposta mínima ocorreu em $2,23 \pm 1,05$ dias. É importante frisar que este ponto tem uma grande importância principalmente considerando-se a possibilidade, em ensaios futuros, de se avaliar os efeitos de EE de *C. echinata* em tratamento crônico deste tipo de tumor; considerando-se que esta redução de efeito pode estar relacionada com a eliminação ou biotransformação das substâncias ativas presentes no extrato, neste intervalo, e a compensação da dose pode aumentar a eficácia do extrato no processo inibitório.

TABELA 4.47 - Parâmetros de regressão das funções matemáticas que descrevem a variação temporal do volume do tumor (mm^3) em camundongos tratados com DEXA (3,93 mg/Kg) + EE *C. echinata* (25 mg/Kg), induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.

Animais	a	b	c	R ²	Derivada*	Condição	Tempo**
CM	0,018	-0,123	0,157	0,712	0,162	Mínimo	3,46
RM	0,019	-0,069	0,088	0,708	0,238	Mínimo	1,81
LM	0,004	-0,018	0,017	0,666	0,040	Mínimo	2,47
CR	0,001	-0,005	0,005	0,876	0,014	Mínimo	2,25

SM	0,001	0,001	-0,006	0,283	0,012	Mínimo	0,44
CRL	0,003	-0,018	0,022	0,903	0,031	Mínimo	2,97
Media	0,08275						2,23
Desvio	0,094379						1,05

OBS: a, b e c são coeficientes de uma função do tipo quadrática; R^2 – Coeficiente de determinação. * Derivada de uma função quadrática no oitavo dia de crescimento tumoral.** Tempo em que a função apresenta a menor resposta de crescimento tumoral (Dias).

Para as condições de pré-tratamento dos animais com indometacina – INDO, na qual posteriormente os animais receberam suspensão de células do carcinoma de Ehrlich + EE de *C. echinata* na dose de 25 mg/Kg o %IT foi de 9,03, conforme os dados de variação temporal de volume do tumor assinalados na tabela 4.48 e figura 4.38.

TABELA 4.48 - Variação temporal do volume do tumor (mm^3) em camundongos que recebia tratamento com INDO (3,58 mg/Kg) +EE *C. echinata* (25 mg/Kg), e posteriormente induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.

Animais	Tempo (Dias)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
CM	0	0	0,004	0,004	0,009	0,014	0,052	2,546
RM	0	0,001	0,002	0,001	0,025	0,056	0,170	0,823
LM	0	0	0	0	0	0	0	0
CR	0	0	0	0	0	0	0	0
SM	0	0	0	0	0	0	0	0
CRL	0	0	0	0	0	0	0	0
*Media								1,684
Desvio								1,218
%IT								9,03

OBS:* Valor medio do volume do tumor ao 8^o dia, após inicio de desenvolvimento tumoral. %IT – Percentual de inibição tumoral.

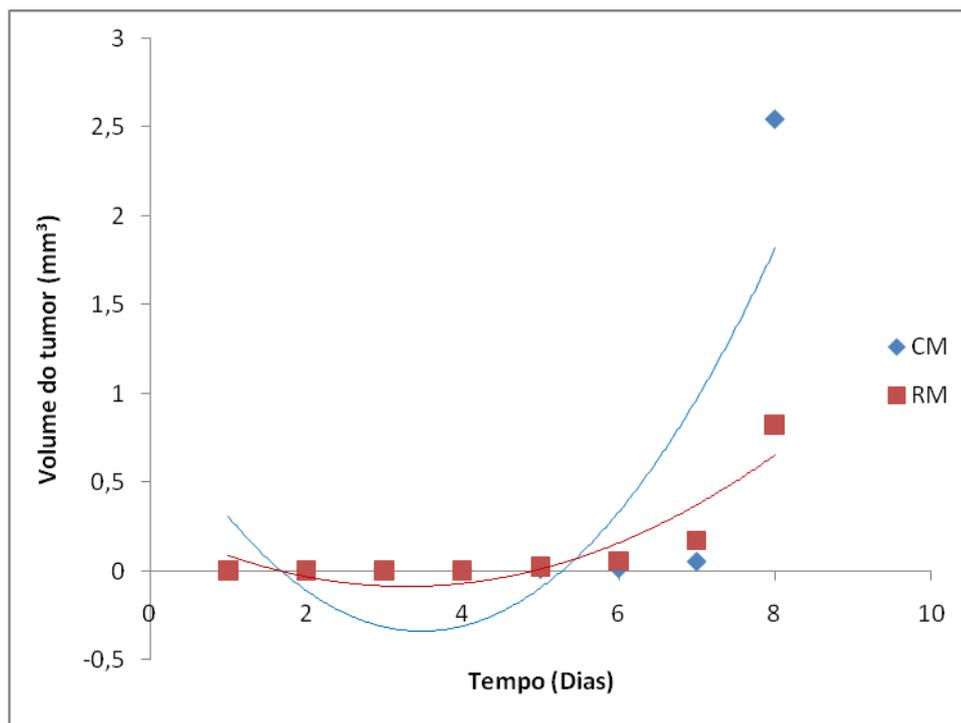


FIGURA 4.38 - Variação temporal do volume do tumor (mm^3) em camundongos tratados com INDO (3,58 mg/Kg) + EE *C. echinata* (25 mg/Kg), induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.

Os parâmetros de regressão das funções que descrevem a variação de volume tumoral em animais pré-tratados com INDO podem ser visualizados na tabela 4.49. Aqui verificou-se que o pré-tratamento com INDO não inibiu o crescimento dos tumores neste grupo de tratamento, assim como EE de *C. echinata* com soro fisiológico, onde obteve-se um %IT = -4,36 conforme mostram os dados da tabela 4.50. O EE de *C. echinata* estimulou o crescimento do tumor, ao invés de inibi-lo, para a dose empregada. Os dados referentes à variação do volume do tumor em animais com soro fisiológico + extrato podem ser observados na tabela 4.50 e figura 4.39; sendo os parâmetros de regressão das funções matemáticas obtidas, visualizados na tabela 4.51.

TABELA 4.49 - Parâmetros de regressão das funções matemáticas que descrevem a variação temporal do volume do tumor (mm^3) em camundongos tratados com INDO (3,58 mg/Kg) + EE *C. echinata* (25 mg/Kg), induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.

Animais	a	b	c	R ²	Derivada*	Condição	Tempo**
CM	0,106	-0,735	0,943	0,681	0,956	Mínimo	3,48
RM	0,034	-0,221	0,273	0,820	0,315	Mínimo	3,29
LM	0	0	0	0	0	-	-
CR	0	0	0	0	0	-	-
SM	0	0	0	0	0	-	-
CRL	0	0	0	0	0	-	-
Media					0,636		3,39
Desvio					0,453		0,13

OBS: a, b e c são coeficientes de uma função do tipo quadrática; R² – Coeficiente de determinação. * Derivada de uma função quadrática no oitavo dia de crescimento tumoral. ** Tempo em que a função apresenta a menor resposta de crescimento tumoral (Dias).

TABELA 4.50 - Variação temporal do volume do tumor (mm^3) em camundongos que recebia tratamento com solução fisiológica (SF) +EE *C. echinata* (25 mg/Kg), e posteriormente induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.

Animais	Tempo (Dias)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
CM	0	0,001	0,004	0,004	0,004	0,025	0,050	3,082
RM	0	0,001	0,004	0,004	0,006	0,014	0,033	1,150
LM	0	0	0,001	0,001	0,014	0,052	0,254	0,973
CR	0	0	0,004	0,001	0,034	0,201	0,419	1,413
SM	0	0,001	0,014	0,014	0,052	0,103	0,134	1,415
CRL	0	0	0,001	0	0,004	0,014	0,262	3,561
*Media								1,932
Desvio								1,099
%IT								-4,36

OBS:* Valor medio do volume do tumor ao 8^o dia, após inicio de desenvolvimento tumoral. %IT – Percentual de inibição tumoral.

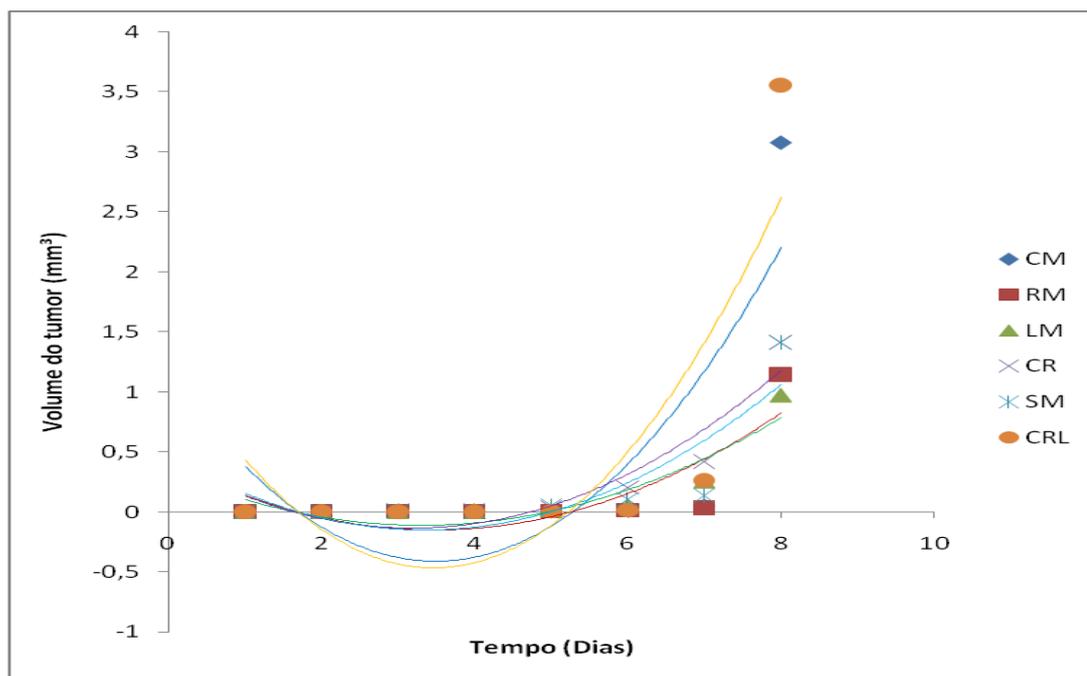


FIGURA 4.39 - Variação temporal do volume do tumor (mm^3) em camundongos tratados com soro fisiológico (SF) + EE *C. echinata* (25 mg/Kg), induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich..

TABELA 4.51 - Parâmetros de regressão das funções matemáticas que descrevem a variação temporal do volume do tumor (mm^3) em camundongos tratados com soro fisiológico (SF) + EE *C. echinata* (25 mg/Kg), induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.

Animais	a	b	c	R^2	Derivada*	Condição	Tempo**
CM	0,128	-0,891	1,143	0,679	1,156	Mínimo	3,48
RM	0,048	-0,329	0,422	0,687	0,431	Mínimo	3,46
LM	0,041	-0,268	0,330	0,849	0,383	Mínimo	3,29
CR	0,057	-0,360	0,434	0,886	0,547	Mínimo	3,18
SM	0,056	-0,372	0,470	0,739	0,519	Mínimo	3,34
CRL	0,150	-1,033	1,316	0,722	1,359	Mínimo	3,46
Media					0,733		3,37
Desvio					0,416		0,12

OBS: a, b e c são coeficientes de uma função do tipo quadrática; R^2 – Coeficiente de determinação. * Derivada de uma função quadrática no oitavo dia de crescimento tumoral.** Tempo em que a função apresenta a menor resposta de crescimento tumoral (Dias).

Na figura 4.40 podem ser comparados os respectivos valores de taxa de variação infinitesimal de volume tumoral obtidas para todas as condições de pré-tratamentos empregadas, observando-se que o pré-tratamento com DEXA e a aplicação de EE *C. echinata* ofereceu a menor taxa de crescimento tumoral. Isto de

certa forma mostra que componentes da cascata do ácido araquidônico modulam o processo de inibição tumoral protagonizado pela participação posterior de EE *C. echinata*. É também importante revelar que EE *C. echinata* não inibiu o crescimento do tumor de Ehrlich, embora tenha conseguido este intento em associação com o pré-tratamento com DEXA, embora não com INDO, indicando que, provavelmente, os mecanismos envolvidos na inibição tumoral requerem a participação de outros componentes da cascata talvez associados à expressão de COX-2. De fato, uma super expressão da enzima Cox-2 tem sido demonstrada em muitas neoplasias malignas (GREENHOUGH et al., 2009). Os altos níveis de Cox-2 estão envolvidos na angiogênese, no processo de invasão tumoral, no fenômeno de resistência à apoptose e na supressão da imunidade antitumoral (COUSSENS; WERB, 2002; SANDLER; DUBINETT, 2004).

Deste modo, as drogas anti-inflamatórias podem atuar em vários alvos impedindo a progressão tumoral através de vias Cox-dependentes e Cox-independentes (SANDLER; DUBINETT, 2004). Pesquisas sugerem que a terapia com ativos anti-inflamatórios reduz o risco de morte por câncer (BAVARESCO; BERNARDI; BATTASTINI, 2005). Várias plantas medicinais são reconhecidos por sua capacidade em atuar no combate a inflamação, e dentre os metabólitos secundários dos vegetais responsáveis por esta propriedades destacam-se os flavonoides (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009). Segundo Machado et al. (2008) “certos flavonoides podem bloquear os processos biosintéticos dos eicosanoides. Eles também são responsável pela inibição de processos mitogênicos, interações célula-célula, incluindo possíveis efeitos na adesão molecular.

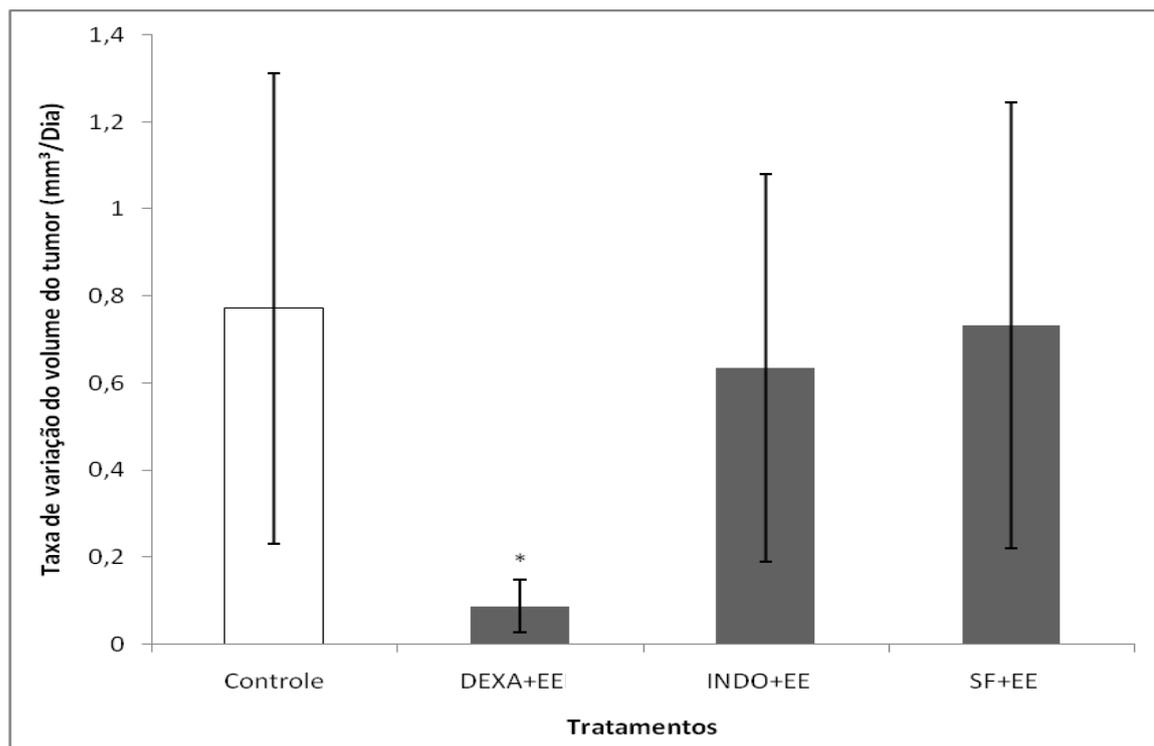


FIGURA 4.40 - Taxa de variação temporal de volume do tumor em camundongos pré-tratados com dexametasona (3,93 mg/Kg) ou indometacina (3,58 mg/Kg) conjuntamente com EE *C. echinata* (25mg/Kg), ou soro fisiológico (SF) induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.
* Diferença significativa em relação ao controle para um valor de $p < 0,05$.

Uma avaliação também foi realizada sobre as variações de peso relativo de órgãos como pulmão, fígado, rins e baço, cujos valores médios podem ser visualizados na tabela 4.52. Com o objetivo de facilitar a interpretação destes resultados, foram construídas várias figuras, onde os parâmetros de significância das possíveis diferenças estatísticas podem ser visualizados.

TABELA 4.52 - Peso relativo (g/g de peso corpóreo) dos órgãos de camundongos pré-tratados com dexametasona (3,93 mg/Kg) ou indometacina (3,58 mg/Kg) conjuntamente com EE *C. echinata* (25mg/Kg), ou soro fisiológico (SF) induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.

Tratamentos	Pulmão	Fígado	Rins	Baço
Controle	0,0058±0,0005	0,0611±0,0027	0,0118±0,0011	0,0124±0,0024
DEXA+EE	0,0126±0,0036	0,0673±0,0125	0,0154±0,0024	0,0148±0,0040
INDO+EE	0,0116±0,0012	0,0825±0,0186	0,0121±0,0048	0,0184±0,0021
SF+EE	0,0118±0,0016	0,0840±0,0127	0,0108±0,0034	0,0207±0,0043

OBS: DEXA+EE – Dexametasona + EE *C. echinata*. INDO+ EE – Indometacina + EE *C. echinata*. SF+EE. Soro fisiológico + EE *C. echinata*. a - Coeficiente angular; b- coeficiente linear; R² Coeficiente de determinação.

Na figura 4.41 podem ser visualizados os valores do peso relativo do pulmão de animais sob diferentes condições de pré-tratamento, induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich e que receberam EE *C. echinata* na dose de 25 mg/kg. Nesta figura, é possível observar um aumento significativo do peso relativo do pulmão em relação aos animais do grupo controle, em todos os tratamentos, para um valor de $p < 0,05$. Na análise histopatológica verificou-se que os animais apresentavam congestão pulmonar (APÊNDICE C). Este aumento pode estar relacionado com acúmulo de líquidos e de metabólitos gerados, como consequência do tratamento com EE da planta; aparentemente, não tendo influência do pré-tratamento dos animais com dexametasona ou indometacina, uma vez que o peso relativo do pulmão dos animais tratados não foram estatisticamente diferentes entre si.

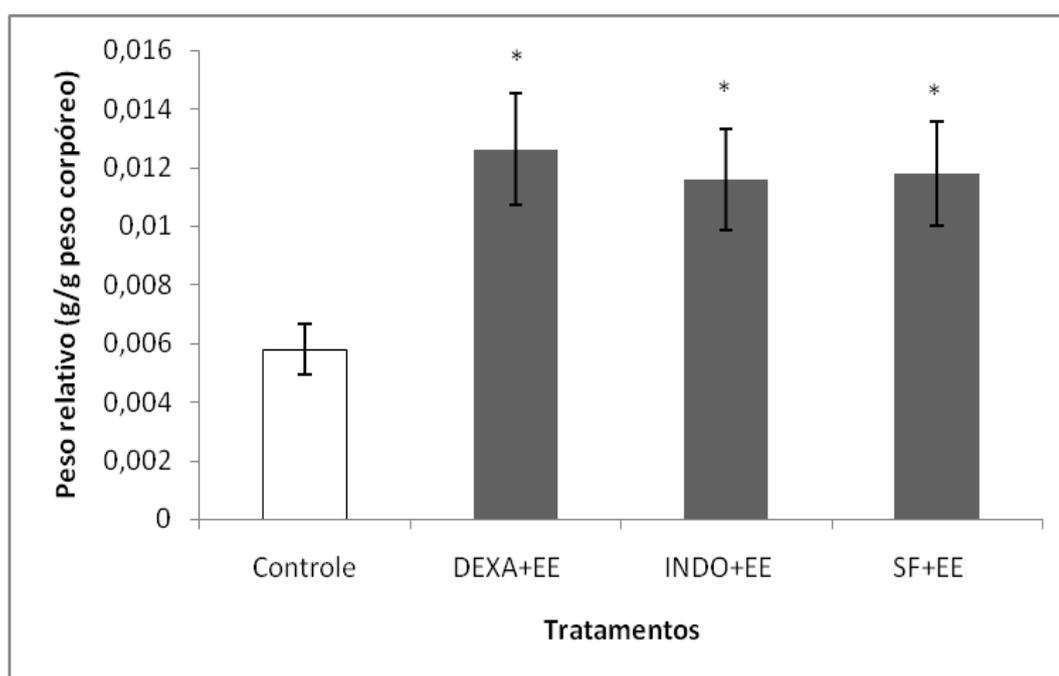


FIGURA 4.41 - Peso relativo do pulmão em camundongos pré-tratados com dexametasona (3,93 mg/kg) ou indometacina (3,58 mg/kg) conjuntamente com EE *C. echinata* (25mg/kg), ou soro fisiológico (SF) induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich. * Diferença significativa em relação ao controle para um valor de $p < 0,05$.

Na figura 4.42 podem ser visualizados os valores do peso relativo do fígado destes mesmos animais mencionados anteriormente. Nesta, pode-se observar um aumento significativo do peso relativo do fígado de animais que receberam soro

fisiológico + EE de *C. echinata*, para um valor de $p < 0,05$; sugerindo uma interferência importante dos constituintes do extrato sobre a atividade metabólica deste tipo de tecido, na análise histopatológica os animais deste grupo apresentaram degeneração turva, vacuolização citoplasmática, congestão e hepatócitos binucleados (APÊNDICE C).

Possivelmente este resultado sinalize um aumento da atividade dos sistemas microsomais, onde atuam os sistemas enzimáticos de biotransformação, tais como o sistema do citocromo P450, entre outros, estimulados devido a substâncias químicas associadas à presença do extrato avaliado. Também é possível que o pré-tratamento dos animais com DEXA ou mesmo com INDO, tenha tido um papel preventivo sobre este tecido, sinalizando que mediadores provenientes da cascata do ácido araquidônico podem potencializar este aumento de massa no tecido hepático, em presença de EE de *C. echinata*. Muito embora, uma visualização mais apurada sobre estas diferenças permitiu a verificação de que o efeito protetor de DEXA foi mais proeminente do que o de INDO na contenção do aumento de massa do tecido hepático, para um valor de $p = 0,022$.

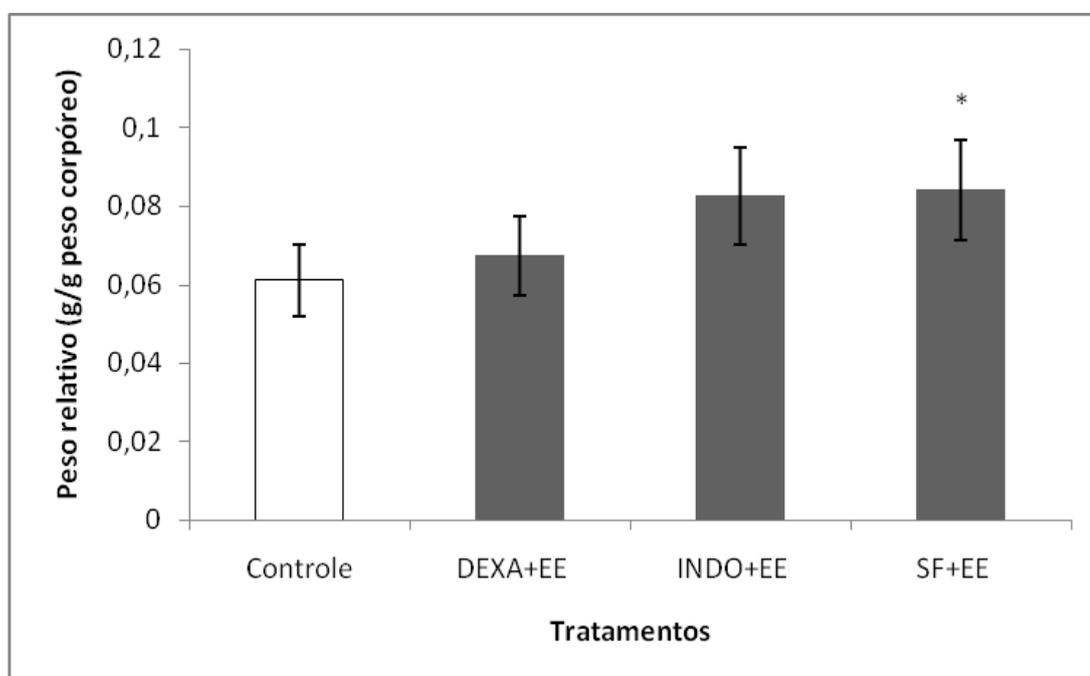


FIGURA 4.42 - Peso relativo do fígado em camundongos pré-tratados com dexametazona (3,93 mg/Kg) ou indometacina (3,58 mg/Kg) conjuntamente com EE *C. echinata* (25mg/Kg), ou soro fisiológico (SF) induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich. * Diferença significativa em relação ao controle para um valor de $p < 0,05$.

Em relação aos rins, não se observou diferenças significativas, de acordo com os dados da figura 4.43, embora em relação ao baço (figura 4.44) tenha sido encontrado um aumento significativo no órgão de camundongos que receberam somente EE de *C. echinata* na dose de 25 mg/Kg, para um valor de $p < 0,05$. Cabe para este tecido uma explicação parecida ao que foi efetuado em relação ao tecido hepático, sinalizando que os componentes presentes no extrato também, de alguma forma, estimularam respostas de aumento de massa neste tecido. Foi observado, também, o fato de que o pré-tratamento dos animais com DEXA ou INDO, de certa forma, preveniram o tecido em relação a este efeito, como se a presença de determinados componentes de EE de *C. echinata* induzisse ações semelhantes à uma resposta pró-inflamatória; considerando-se que este tecido, normalmente, exibe um aumento de massa quando aumenta a titulação de células em seus domínios, lembrando-se que estes animais continham um tecido neoplásico em expansão, embora com dinâmicas diferentes.

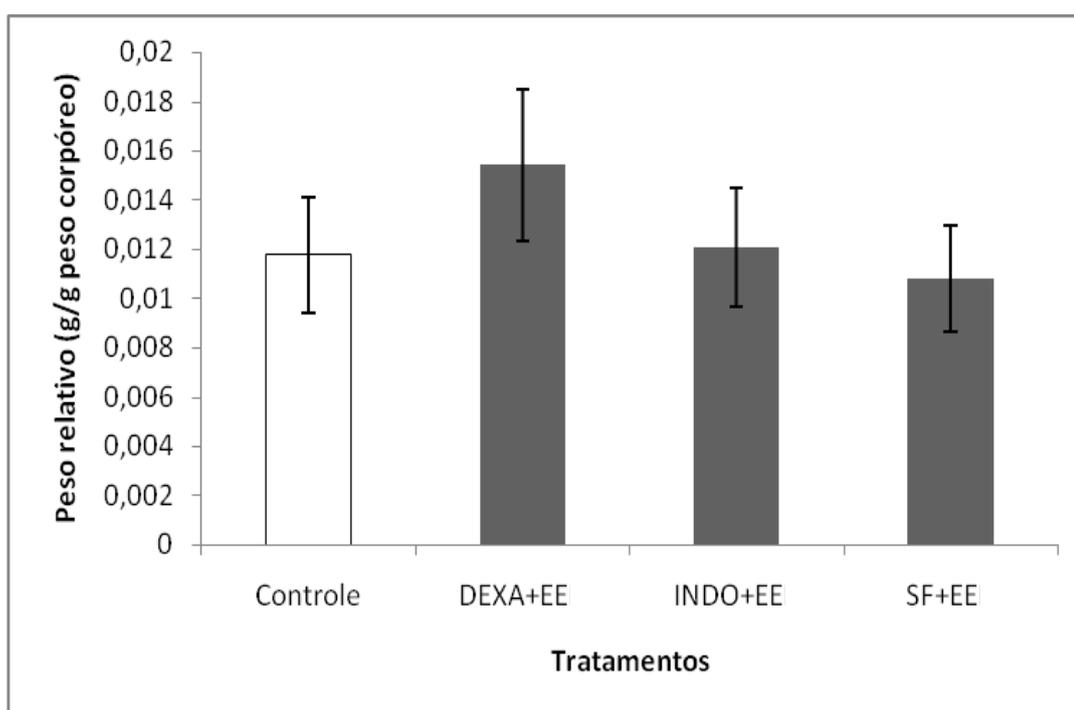


FIGURA 4.43 - Peso relativo do rim em camundongos pré-tratados com dexametazona (3,93 mg/Kg) ou indometacina (3,58 mg/Kg) conjuntamente com EE *C. echinata* (25mg/Kg), ou soro fisiológico (SF) induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich. * Diferença significativa em relação ao controle para um valor de $p < 0,05$.

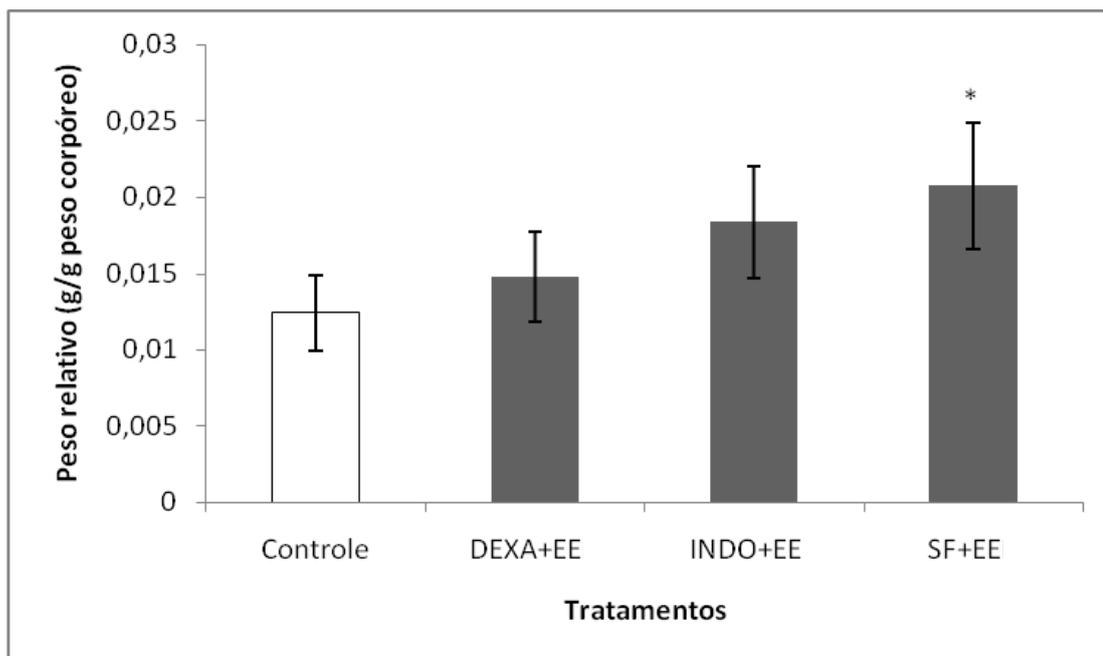


FIGURA 4.44 - Peso relativo do baço em camundongos pré-tratados com dexametasona (3,93 mg/Kg) ou indometacina (3,58 mg/Kg) conjuntamente com EE *C. echinata* (25mg/Kg), ou soro fisiológico (SF) induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich. * Diferença significativa em relação ao controle para um valor de $p < 0,05$.

Na tabela 4.53 podem ser observados os valores de massa e de densidade dos tumores para todos os tipos de tratamentos realizados. Com os valores médios de densidade do tumor construiu-se a figura 4.45. Nesta figura, observou-se que os tumores oriundos de animais que fizeram pré-tratamento com DEXA apresentavam uma densidade extremamente elevada em relação aos do grupo controle, embora os tumores de animais previamente tratados com INDO apresentaram uma densidade extremamente baixa, para um valor de $p < 0,05$.

Estas diferenças demonstram impactos diferentes dos elementos da cascata do ácido araquidônico sobre o processo de divisão celular e acúmulo de resíduos nos diferentes domínios da massa tumoral. Dexametasona, por ser responsável por um processo inibitório sobre o sistema das fosfolipase A2, tem uma amplitude maior sobre o controle do metabolismo, no caso, favorecendo um acúmulo de células e resíduos em tumores que não apresentaram uma taxa de crescimento elevado.

Já com indometacina observou-se uma densidade do tumor menor em relação aos tumores de animais do grupo controle, e bem menor em relação aos animais pré-tratados com DEXA. A baixa densidade pode estar relacionada com o

desenvolvimento de estruturas anexas ao tecido tumoral como vasos sanguíneos, e materiais diversos acumulados, na medida em que o tumor se desenvolve.

O efeito de pré-tratamento dos animais somado aos efeitos protagonizados por EE de *C. echinata* favorece ao desenvolvimento de estruturas tumorais diversas, provavelmente, com dinâmicas de crescimento diferentes, como já ficou assinalado acima; sendo estas observações importantes quando se deseja construir recursos e estratégias terapêuticas para a terapia do câncer.

TABELA 4.53 - Peso (g) e densidade (g/mm^3) do tumor em 8 dias, de camundongos pré-tratados com dexametazona (3,93 mg/Kg) ou indometacina (3,58 mg/Kg) conjuntamente com EE *C. echinata* (25mg/Kg), ou soro fisiológico (SF) induzidos com suspensão de células do carcinoma de Ehrlich.

Animais	Controle		DEXA+EE		INDO + EE		SF+EE	
	P	D	P	D	P	D	P	D
CM	-	-	0,95	2,23	2,70	1,06	3,73	1,21
RM	4,91	1,45	0,94	3,70	1,10	1,33	2,28	1,98
LM	4,68	3,88	0,80	10,67	-	-	4,56	4,69
CR	3,55	2,04	0,97	29,08	-	-	1,13	0,80
SM	2,88	2,71	0,97	68,58	-	-	0,79	0,56
CRL	-	-	0,94	12,52	-	-	1,61	0,45
Media	4,01	2,52	0,93	21,13	1,9	1,20	2,35	1,62
Desvio	0,96	1,05	0,06	25,14	1,13	0,19	1,50	1,61
CV	23,89	41,49	6,93	118,96	59,55	15,96	63,87	99,38

OBS: P – Peso. D – Densidade. Marcação dos animais: CM= cabeça marcada; RM= rabo marcado; LM= lombo marcado; CR= cabeça e rabo marcados; SM= sem marcação; CRL= cabeça, rabo e lombo marcados.

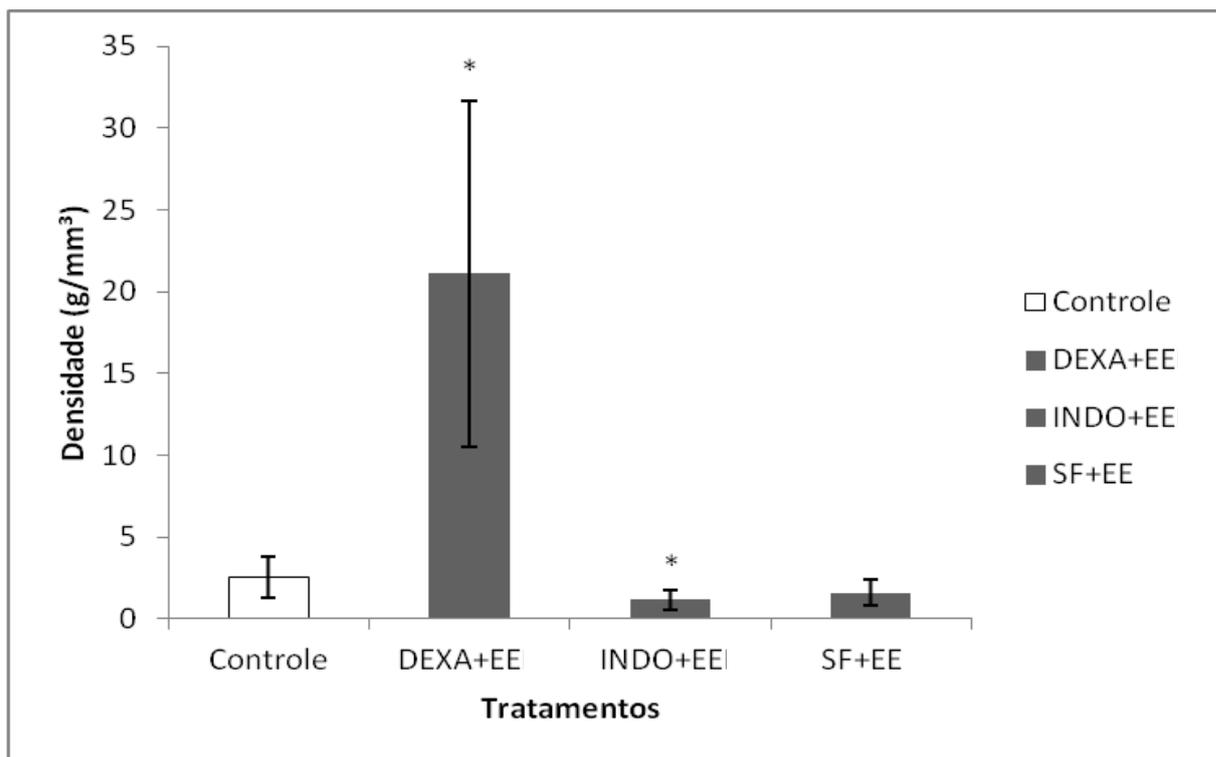


FIGURA 4.45 - Densidade do tumor de Ehrlich ao final de 23 dias, em camudongos sob diferentes condições de tratamento: Dexametasona (3,93 mg/Kg) ou indometacina (3,58 mg/Kg) conjuntamente com EE *C. echinata* (25mg/Kg), ou soro fisiológico (SF). * Diferença significativa em relação ao grupo controle para um valor de $p < 0,05$.

Espera-se que futuros ensaios com este mesmo tipo de substrato em doses mais elevadas e utilizando novos protocolos experimentais, permitam a verificação mais minuciosa sobre os mecanismos de ação produzidos pelas substâncias presentes no EE de *C. echinata*.



5. Conclusão

5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos concluímos que:

↳ Nas condições experimentais empregadas o extrato etanólico de *C. echinata* apresenta toxicidade sistêmica quando administrado de forma contínua por um período de tempo prolongado.

↳ A administração repetida do extrato de *C. echinata* influenciou na ritmicidade biológica dos animais, além de provocar uma redução no consumo de água e alimento.

↳ O EE de *C. echinata* afetou os componentes celulares do sistema imunológico no organismo de fêmeas tratadas produzindo leucopenia e plaquetopenia. As fêmeas apresentaram redução nas taxas de glicose, triglicerídeos e transaminases, bem como aumento do colesterol sérico em relação aos machos.

↳ O EE de *C. echinata* foi capaz de inibir a atividade oxidante dos radicais DPPH e NO nos ensaios *in vitro*.

↳ O EE de *C. echinata* 200 µg/mL exerce uma importante ação protetora contra o estresse oxidativo gerado pelo H₂O₂.

↳ O EE reduziu a resposta angiogênica inflamatória em córnea de ratos.

↳ O EE de *C. echinata* contém substâncias, na sua composição, que possuem impacto importante sobre o metabolismo da célula ascítica do tumor de Ehrlich, inviabilizando-a quanto a sua competência em fixar-se no hospedeiro e acionar os devidos mecanismos para promover o seu desenvolvimento na forma de um tumor sólido.

↳ O pré-tratamento com DEXA e a aplicação de EE de *C. echinata* ofereceu a menor taxa de crescimento tumoral. Isto de certa forma mostra que componentes da cascata do ácido araquidônico modulam o processo de inibição tumoral protagonizado pela participação posterior de EE de *C. echinata*.

↳ O EE de *C. echinata* não inibiu o crescimento do tumor de Ehrlich, embora tenha conseguido este intento em associação com o pré-tratamento com DEXA, embora não com INDO, indicando que, provavelmente, os mecanismos envolvidos na inibição tumoral requerem a

participação de outros componentes da cascata talvez associados à expressão de COX-2.



5. Referências bibliográficas

REFERÊNCIAS

- ALI, S.S. et al. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. **Food Research International**, v. 41, p. 1–15, 2008.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vivo* em substratos orgânicos. **Quim. Nova**, v. 33, nº. 10, p. 2202-2210., 2010.
- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **B. CEPPA**, v 24, p. 319-336; 2006.
- ANIYA, Y. et al. Free radical scavenging action of the medicinal herb *Limonium wrightii* from the Okinawa islands. **Phytomedicine**, v. 9, p. 239–244, 2002.
- ARAUJO, J. F.; MARQUES, N. Cronobiologia: uma multidisciplinaridade necessária. **Margem**, nº15, p. 95-112, 2002.
- ARMSTRONG, W.P. **Natural Dyes**. *Herbalgram*, v.32, p.30, 1994.
- ARNOUS, A. H.; SANTOS, A. S.; BEINNE, R. P. C. Plantas medicinais de uso caseiro - conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista Espaço para a Saúde**, v.6, n.2, p.1-6, 2005.
- ARRUDA, V. A. **Aspectos farmacológicos do infiltrado leucocitário induzido pelo veneno de *Bothrops lanceolatus* na cavidade peritoneal de camundongos**. 2002. 88 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) -. Faculdade de Ciências Médicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2002.
- ASSUMPÇÃO, C. R. L. **A via L-arginina-óxido nítrico em plaquetas de adolescente com obesidade e síndrome metabólica / The L-arginine-nitric oxide pathway in platelets of adolescent with obesity and metabolic syndrome**. 2010. 138f. ilustr. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, v. 99, p. 191-203, 2006.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím. Nova**, v. 29, n.1, 2006.
- BAVARESCO; L. BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O. Glicocorticoides: usos clássicos e emprego no tratamento do câncer. **Infarma**, v.17, nº 7/9, 2005.
- BENNETT, L.L.; ROJAS, S.; SEEFELDT, T. Role of Antioxidants in the Prevention of Cancer. **Journal of Experimental & Clinical Medicine**, v. 4, Issue 4, p. 215-222, 2012.

BERNARDI, F. et al. Transtornos alimentares e padrão circadiano alimentar: uma revisão. **Rev Psiquiatr RS**, v.31, nº 3, p.170-176, 2009.

BERNARDINI, G. et al. Analysis of the role of chemokines in angiogenesis. **J Immunol Methods**, v.273, nº1-2, p. 83-101, 2003.

BIANCHI, M. de L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 12, nº 2, p. 123-130, 1999.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-1200, 1958.

BODGAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nat. Immunol.**, v.2, p. 907-916, 2001.

BOUEIZ, A.; HASSOUN, P. M. Regulation of endothelial barrier function by reactive oxygen and nitrogen species. **Microvascular Research**, v. 77, nº 1, p. 26–34, 2009.

BRANDAO, H. N. et al . Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, São Paulo ,v. 33, n. 6, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000600026&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 07 Fev.2015.

BRASIL. Lei nº 6.607, de 7 de dezembro de 1978. Declara o Pau-Brasil árvore nacional, institui o Dia do Pau-Brasil, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 12 dez. 1978.

BRASIL. Portaria IBAMA nº 06-N, de 15 de janeiro de 1992. Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, v. 130, n. 16, 23 jan. 1992. Seção I.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Portaria SVS nº 6 de 31 de janeiro de 1995**. Institui e normatiza o registro de produtos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Portaria Nº 116 de 08 de agosto**. Norma para Estudo da Toxicidade e da Eficácia de Produtos Fitoterápicos, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução nº 90 de 16 de março de 2004. Determina a publicação do guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer**. – Rio de Janeiro: INCA, 2009. 98 p.: il. color. tab.; 21 cm. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/estimativa20091201.pdf>> Acesso em: 11 ago. 2010.

BRASIL. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos** / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília : Ministério da Saúde, 2009. 136 p. : il.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução nº 14 de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 05 abr. 2010b.

BRUNETTO, M. A. et al. Imunonutrição: o papel da dieta no restabelecimento das defesas naturais. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, (Supl 2), p. s230-s232, 2007.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v.55, n. 3, p. 37-39, 2003.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JR., J. M. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. **Gaz. méd. Bahia**; v.78 (Supl. 1), p. 98-106, 2008.

CAMBRAIA, R. P. B. Aspectos psicobiológicos do comportamento alimentar. **Rev. Nutr., Campinas**, v. 17, n. 2, 2004 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732004000200008&lng=en&nrm=iso>. Acessado em: 06 Ago. 2013.

CAPP, C.; ZENNIG, N.; WAJNER, S.; MAIA, A.L. Papel do fator de crescimento endotelial vascular nos carcinomas de tireoide. **Revista HCPA**, v. 29, nº 1, p. 51-59, 2009.

CARMELIET, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. **Nat Med.**, v. 6, nº 4, p. 389-95, 2000.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso de madeira**. Colombo: EMBRAPA-CNPQ; Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1994. 640 p.

CARVALHO, J.C.T. et al. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, p. 175-178, 1996.

CASTRO, H.C. et al. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **Bras Patol Med Lab.**, v. 42, n. 5, p. 321-332, 2006.

CASTRO, P.R. Cinética da angiogênese inflamatória induzida por implante de esponja na musculatura abdominal em camundongos Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas) Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

CEPLAC – Comissão executiva do Plano da lavoura cacaueteira. **Pau-brasil, exemplo de desenvolvimento sustentável**. Disponível em:

<<http://www.ceplacdf.gov.br/restrito/lerNoticia.asp?id=1578>>. Acesso em: 25 Ago. 2010.

CHAPPILL, J.A. Cladistic analysis of the Leguminosae: The development of an explicit hypothesis. In: CRISP, M.D.; DOYLE, J.J. (Ed.). *Advances in legumes systematic*. Richmond: **Royal Botanic Gardens**, Kew, pp. 1-10, 1995.

CHIANG, L. C. et al. In vitro antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonóides. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, pp. 194–198, 2003.

CHIN, Young-Won et al. Drug Discovery From Natural Sources. **The AAPS Journal**, v. 8, nº 2, p. 239-253, 2006. Disponível em: <<http://www.aapsj.org/articles/aapsj0802/aapsj080228/aapsj080228.pdf>>. Acesso em: 20 Ago. 2010.

CHOI, Byung-Min et al. Brazilin and the extract from *Caesalpinia sappan* L. protect oxidative injury through the expression of heme oxygenase-1. **BioFactors**, v. 30, p.149–157, 2007.

CHOI, S.; MOON, C. Effects of brazilin on the altered immune functions in the early phase of halothane intoxication of C57BL/6 mice. **Planta Medica**, v. 63, issue5, pp. 400-404, 1997.

COELHO, H. E. **Patologia Veterinária**. 1ª Ed. São Paulo: Editora Manole, 2002.

CONDESSA, M. B. **Avaliação da atividade antioxidante e alelopática de plantas medicinais**. Dissertação (Mestrado): Faculdade de ciências da Saúde da Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

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

CORRÊA, M. P; **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil**. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal: Rio de Janeiro, vol. 5, 1984.

COSTA, L. M. G. **O metabolismo iônico celular e linfócitos T: um estudo no ratinho**. 2000. 183f. Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas). Universidade do Porto. Porto, 2000.

COSTA-LOTUFO, L.V. et al. A Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Rev. Virtual Quim.**, v.2, p.47-58, . 2010.

COTA, Betania Barros; et al. New cassane diterpenes from *Caesalpinia echinata*. **Fitoterapia**, v. 82, p. 969–975, 2011.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**. v. 420, p. 860-867, 2002.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S.S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório **Rev. Virtual Quim.**, v. 1, nº. 3, p.241-256, 2009.

CUNHA, L. C.; et al. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, nº 2^a, 403-411, 2009.

D'AGOSTINI, S.; BACILIERI, S.; HOJO, H.; VITIELLO, N.; BILYNSKYJ, M.C.V.; BATISTA FILHO, A.; REBOUÇAS, M.M. Ciclo econômico do pau-brasil - *Caesalpinia echinata* Lam., 1785. **Revista Páginas do Instituto Biológico**, v. 9, nº 1, 2013. Disponível em: < http://www.biologico.sp.gov.br/docs/pag/v9_1/dagostini.pdf>. Acesso em 18 jun. 2013.

DAGLI, M.L.Z. **Disseminação linfática do tumor de Ehrlich: estudo experimental.** Dissertação (Mestrado) Patologia Experimental Comparada, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 1989.

DAMICO, F. M. Angiogênese e doenças da retina. **Arq Bras Oftalmol.**, v. 70(3), p. 547-53, 2007..

DAS, B. et al. New diterpenoids from *Caesalpinia* species and their cytotoxic activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 2847–2850, 2010.

DEPHILIPS, R.A. Historical connections between the discovery of Brazil and the neotropical brazilwood, *Caesalpinia echinata* Lam. **Arch. Nat. Hist.**, v. 25, nº1, p.103-108, 1998.

DIAS, P. F. **Modulação da vasculogênese, angiogênese e de desenvolvimento tumoral por derivados de *Sargassum stenophyllum* (Phaeophyceae).** 2005, 181 f. Tese (Doutorado em Farmacologia). Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

DIAS, P.F. et al. Novos moduladores da formação de vasos sanguíneos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, nº 25, 2002.

DIMECH, G.S. **Avaliação toxicológica pré-clínica do extrato bruto da *Mentha crispata*.** Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Pré-Clínica de Compostos Bioativos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

DREW, A.; MYERS, S.P. Safety issues in herbal medicine: implications for the health professions. **Med. J. Australia**, v. 166, p. 538-541, 1997.

DROGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiol Rev.**, v. 82, p. 47-95, 2002.

DUARTE, M.; FILHO, A.L.; SCHMITT, F. C. “Angiogenesis, haemostasis and cancer: new paradigms and old concerns”. **Bras Patol Med Lab**, v. 43, nº6, p. 441-449, 2007.

EATON, D. L.; GILBERT, S. G. Principles of Toxicology. In: KLAASSEN, C. D. Casarett and Doull's **Toxicology: The Basic Science of Poisons**. 7ª ed. New York: McGraw-Hill, Chapter 2, p. 11-44, 2008.

EIRÓ, N.; VIZOSO, F. J. Inflammation and cancer. **World J Gastrointest Surg**, v. 4, nº 3, p. 62-72, 2012. Acesso em 22/07/2013. Disponível em: <http://www.wjgnet.com/1948-9366/full/v4/i3/62.htm>

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

FECHINE-JAMACARU, F.V.; FECHINE JÚNIOR, J.U.; MORAES FILHO, M.O.. “Modelo de angiogênese inflamatória em córnea de coelho induzida pela cauterização alcalina pontual”. **Acta Cirúrgica Brasileira**, Vol. 20, nº 1, PP. 64-73, 2005.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S.. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 43, n. 1, 1997.

FIOCRUZ. Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. **Manual de utilização de animais/FIOCRUZ**. 1ª ED. Rio de Janeiro, 2008.

FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nature Medicine**, v. 1, p.27–31, 1995.

FONTES, R.S. **Pau Brasil, um sonho de resgate**. Recife: Funbrasil, p26; 87-97, 1995.

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) – Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

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

GALLO, O. et al. Role of Nitric Oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, nº. 8, 1998.

GEORGAKI, S. et al. Phenoxodiol, an anticancer isoflavene, induces immunomodulatory effects in vitro and in vivo. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 13, nº 9B, p. 3929-3938, 2009.

GONZÁLEZ, R. P. et al. “Método para o estudo in vivo da angiogênese: indução de neovascularização na córnea de coelho”. *Acta Cirurgica Brasileira*, vol.15, nº 3 [serial on the Internet], 2000. [cited 2013 May 12]. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502000000300006&lng=en

GRAÇA, B. et al. Angiogênese e cancro: da biopatologia à terapêutica. *Acta Médica Portuguesa*, v.17, p. 76-93, 2004.

GRÄFE, U. Secondary Metabolites: from past to present. In: GRABLEY, Susanne; THIERICKE, Ralf (Eds.) **Drug discovery from nature**, Springer, Berlin, 1999.

GRANGEIRO, Ana Ruth Sampaio. **Avaliação Biológica do potencial toxicológico e farmacológico das folhas de *Caesalpinia echinata* Lam.** 2009. 42p. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

GREENHOUGH, A. et al. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*, v.30 nº.3, p.377–386, 2009.

GUERRA, J. L. **Aspectos do processo inflamatório em camundongos portadores do tumor de Ehrlich.** 1983. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 1983.

GULLO, Vincent P.; MCALPINE, James; LAM, Kin S.; BAKER, Dwight; PETERSEN, Frank. Drug discovery from natural products. *Journal Ind Microbiol Biotechnol.*, v. 33, p. 523–531, 2006. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/786174134r72244t/fulltext.pdf>>. Acesso em: 20 Ago. 2010.

GUPTA, M.; MAZUMDER, U.K.; KUMAR, R.S.; KUMAR, T.S. Studies on Anti-inflammatory, Analgesic and Antipyretic Properties of Methanol Extract of *Caesalpinia bonducella* leaves in Experimental Animal Models. *Iranian Journal Of Pharmacology & Therapeutics*, v.2, p.30-34, 2003.

GUPTA, Malaya; MAZUMDER, Upal Kanti; KUMAR, Ramanathan Sambath; et al. Activity and Antioxidant Status of *Caesalpinia bonducella* Against Ehrlich Ascites Carcinoma in Swiss Albino Mice. *Journal of Pharmacological Sciences*, v. 94, p. 177 – 184, 2004.

GUPTA, K.; ZHANG, J. Angiogenesis: a curse or cure? *Postgrad Med J.*, v. 81, p. 236–242, 2005.

HAMMOND, B.G.; DUDEK, R.; LEMEN, J.K.; M.A. Nemeth Results of a 90-day safety assurance study with rats fed grain from corn borer-protected corn. *Food and Chemical Toxicology*, v. 44, nº 7, p. 1092–1099, 2006.

HIKINO, H. et al. Antiinflammatory principles of *Caesalpinia sappan* wood and of Haematoxylon champechianum wood. *Planta Med*, v. 31, issue 3, p. 214-220, 1977.

HOFF, P.M.; MACHADO, K.K.. Role of angiogenesis in the pathogenesis of cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, p. 825-833, 2012.

HOFSETH, L.J. Nitric oxide as a target of complementary and alternative medicines to prevent and treat inflammation and câncer. **Cancer Letters**, v. 268, Issue 1-8, p. 10–30, 2008.

HU, C. M. et al. Induction of vasorelaxation through activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by brazilin. **European Journal of Pharmacology**, v. 468, p. 37 – 45, 2003.

HU, J. et al. Antioxidant activity in vitro of three constituents from *Caesalpinia sappan* L., **Tsinghua Science and Technology**, v. 13, p. 474-479, 2008.

HUBER, P. C.; MARUIAMA, C. H.; ALMEIDA, W. P. Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010001000027&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 01 Fev. 2015.

IACRa - International Association of Cancer Registries. GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Press release nº 223 (Latest world cancer statistics), 2013. Disponível em: <http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2013/pdfs/pr223_E.pdf> Acesso em: 25 Jan. de 2014.

IARCb. **World Cancer Day 2013 - Global Press Release**. 2013. Disponível em: <http://www.worldcancerday.org/world-cancer-day-2013-global-press-release#_ednref1> Acesso em 05/07/2013.

INCA - Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço. / Instituto Nacional de Câncer. – 3. ed. atual. amp. – Rio de Janeiro: INCA, 2008. 488 p. 628 p.: il.

INCA - Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer**. José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: Inca, 2011. 118 p. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf> .> Acesso em: 27 mar. 2013.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>> Acesso em 02 Fev. 2014

JAHN, A.I.; GÜNZEL, P.K.H. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment? **Reprod Toxicol.**, v.11, p. 171-178, 1997.

JAKÓBISIAK, M.; LASEK, W.; GOLAB, J. Natural mechanisms protecting against cancer. **Immunology Letters**, v. 90, 103 – 122, 2003.

JAYAKUMAR, R.; KANTHIMATHI, M.S. Inhibitory effects of fruit extracts on nitric oxide-induced proliferation in MCF-7 cells. **Food Chem.**, v 126, p. 956–960, 2011.

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

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos, 1983.

KHIL, Lee-Yong et al. Effects of Calcium on Brazilin-Induced Glucose Transport in Isolated Rat Epididymal Adipocytes. **Biochemical Pharmacology**, v. 54, p. 97-101, 1997.

KHIL, Lee-Yong et al. Effects of Brazilin on GLUT4 Recruitment in Isolated Rat Epididymal Adipocytes. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, p. 1705–1712, 1999.

KIM, Seong-Gon et al. Brazilin inhibits activities of protein kinase C and insulin receptor serine kinase in rat liver. **Archives of Pharmacal Research**, v. 21, Issue 2, pp 140-146, April 1998.

KIM, H.K. et al. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure–activity relationships. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, p. 759–765, 1999.

KIM, Kang-Ju et al. Inhibitory effects of *Caesalpinia sappan* on growth and invasion of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, Issue 1, pp. 81–87, March 2004.

KOHN, D. F. et al. **Anesthesia and analgesia in laboratory animals**. New York: Academic Press, 1997.

LAMARÃO, R. da C.; FIALHO, E. Aspectos funcionais das catequinas do chá verde no metabolismo celular e sua relação com a redução da gordura corporal. **Rev. Nutr.**, v. 22, nº 2, p.257-269, 2009.

LAPA, A. J. et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O. (org.) **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5° ed. Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, Porto Alegre/Florianópolis:, p. 247-262, 2004.

LIANG, C.H. et al. Brazilein from *Caesalpinia sappan* L. Antioxidant Inhibits Adipocyte Differentiation and Induces Apoptosis through Caspase-3 Activity and Anthelmintic Activities against *Hymenolepis nana* and *Anisakis simplex*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 14 pages, 2013.

LIMA, Leonardo Ramos Paes; OLIVEIRA, Tânia Toledo de; NAGEM, Tanus Jorge. Efeitos do flavonoide quercetina e dos corantes bixina e norbixina sobre parâmetros sanguíneos de coelhos. **Rev. Nutr., Campinas**, 16(3):305-314, jul./set., 2003.

LOOMIS, M.D.; HAYES, A.W. **Loomis's essentials of toxicology**. 4ed. California: Academic Press, 1996.

LORA, Juliana. **Avaliação da toxicidade aguda do extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae)**. 2007.59f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais). Universidade do Extremo Sul Catarinense. Criciúma, Santa Catarina.

LORENZI, H. Árvores brasileiras. **Manual de Identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa. Ed. Plantarum. 1992. 352p.

LORIER; G.; TOURIÑO, C.; KALIL, R. A. K. Angiogênese Coronariana como Resposta Endógena da Isquemia Miocárdica no Adulto. **Arq Bras Cardiol.**, v. 97, nº 6, p.140-e148, 2011.

LU, H.; OUYANG, W.; HUANG, C. Inflammation, a key event in cancer development. **Mol Cancer Res.**, v. 4, nº 4, p. 221-33, Apr. 2006.

LUIKING, C. et al. Reduced citrulline production in sepsis is related to diminished de novo arginine and nitric oxide production. **Am J Clin Nutr.**, v. 89, p.142-152, 2009.

LUIKING, Y.V.; DEUTZ, N.E.P. Isotopic investigation of nitric oxide metabolism in disease. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v.6, p.103-108, 2003.

LUNA, J. de S. et al. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 199–206, 2005.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. **Flavonoides e seu potencial terapêutico**. Boletim do Centro de Biologia da Reprodução, Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.

MACHADO, F. G. **Efeito da administração de sunitibe como terapia anti-angiogênica em ratos submetidos à ablação renal de 5/6**. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de nefrologia. São Paulo, 2012.

MANHITA, Ana; et al. Ageing of brazilwood dye in wool – a chromatographic and spectrometric study. **Journal of Cultural Heritage**, 2012.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.culher.2012.10.016>

MARCOCCI, L.; MAGUIRE, J.J. DROY, M.T. The nitric oxide scavenging properties of *Gingo biloba* extract EGb 761. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 15, p. 748–755, 1994.

MARQUES, D. C. S. **Avaliação da expressão da cox-2 em tumores mamários de cadela**. 2013, 90 f. Dissertação (Mestrado integrado em medicina veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, 2013.

MARTINO, R. B. de. **Avaliação do emprego da pentoxifilina na regeneração hepática em ratos submetidos à hepatectomia parcial**. 2010. 75f. tese (Doutorado em Ciências) Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

MASFERRER, J. L. et al. Antiangiogenic and Antitumor Activities of Cyclooxygenase-2 Inhibitors. **Cancer Research**, v. 60, nº1, p.1306–1311, 2000.

MATSUDA, H.; et al. Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 11, 1995 – 2000, 2003.

MELO, F. H. M.; JUNQUEIRA, M. de S.; CHAMMAS, R. Mecanismos de Invasão e Metástases. In: Maria Mitzi Brentani; Luiz Paulo Kowalski; Francisco Ricardo Gualda Coelho. (Org.). **Bases da Oncologia**. 2 ed. São Paulo: Editora Marina e Tedmedd Editora, 2003, v. , p. 201-226.

MELO, G.B. et al. Efeito do extrato aquoso da *Hyptis pectinata* na regeneração hepática após hepatectomia parcial em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, (Suplemento 1), p. 33-37, 2006.

MIN YE, et al. Brazilin, an important immunosuppressive component from *Caesalpinia sappan* L. **International Immunopharmacology**, article in press, 2005.

MONGELLI, E.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. **Buscando nuevas sustancias naturales contra el cáncer**. Disponível em: <http://www.plantasmedicinales.org/etno/1htm>. Acesso em 27 de novembro de 2005.

MOON, C.K. et al. Brazilin protects cultured rat hepatocytes from BrCCl3-induced toxicity. **Drug Chem Toxicol.**, v. 15, nº1, p. 81-91, 1992.

MOON, C.K., et al. Effects of brazilin on glucose oxidation, lipogenesis and therein involved enzymes in adipose tissues from diabetic KK-mice. **Life Sci.** v. 53, p. 1291–1297, 1993.

MORAIS, S. M. et al. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, nº 1B, p. 315-320, 2009.

MOURA, L. N. de; SILVA, M. L. Fundamentos evolutivos da ritmicidade biológica. In: Grauben Assis, Regina Brito e William Lee Martin.. (Org.). **Estudos do Comportamento II**. Belém: EDUFPA, 2010, v. II, p. 157-176.

MUCK-SELER D. et al. Platelet serotonin concentration and monoamine oxidase type B activity in female patients in early, middle and late phase of Alzheimer's disease. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 33, p. 1226-31, 2009.

MUKHERJEE, A.K.; BASU, S.; SARKAR, N.; GHOSH, A.C. **Advances in Cancer Therapy with Plant Based Natural Products**. *Current Medicinal Chemistry*, v.8, p.1467-1486, 2001.

NAKAMURAA, E.S. et al. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. **Cancer Letters**, v. 177, p.119–124, 2002.

NEBERT, D.W. Transcription factors and cancer: an overview. **Toxicology**, v. 181–182, p. 131–141, 2002.

NEWMAN, D. J; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. **J Nat Prod.**, v. 66, p.1022–1037, 2003.

OECD. **OECD Guideline for the Testing of Chemicals, No. 407**: Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents. Paris, France: 1995.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 3^o edição, São Paulo: Atheneu, 2008.

OLIVEIRA, D.M.T.; PAIVA, E. A. S. Anatomy And Ontogeny OF Pterodon emarginatus SEED. **Braz. J. Biol.**, v. 65, n. 3, p. 483-494, 2005.

OLIVEIRA, F. Q.; GONÇALVES, L. A. Conhecimento sobre plantas medicinais e fitoterápicos e potencial de toxicidade por usuários de belo horizonte, Minas Gerais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v 3, nº2, p. 36-41, 2006.

OLIVEIRA, L.F.C.; EDWARDS, H.G.M.; VELOZO, E.S.; NESBITT, M. Vibrational spectroscopic study of brazilin and brazilein, the main constituents of brazilwood from Brazil. **Vibrational Spectroscopy**, v.28, p.143-249, 2002.

OLSON, Harry; BETTON, Graham; ROBINSON, Denise; et al. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 32, p. 56–67, 2000.

OSWEILER, G.D. **Toxicologia Veterinária**. Artes Médicas. Porto Alegre, 1998.

OZASLAN, M. et al. Ehrlich ascites carcinoma. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, nº 13, p. 2375-2378, 2011.

PACHER, P.; BECKMAN, J.S.; LIAUDET, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. **Physiol Rev.**, v. 87, p. 315–424, 2007.

PAN YINGMING, P., et al. Antioxidant activities of several Chinese medicine herbs. **Food Chemistry**, v. 88, Issue 3, p. 347-350, 2004.

PERES, C. M.; CURI, R. Como Cultivar Células. 1^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

PIACENTINI, A. B. Recentes aspectos sobre a biologia do câncer e das metástases. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 5, n. 3, p. 593-604, 2012. Acesso em 22 jul.2013.

Disponível em:

<<http://www.cesumar.br/pesquisa/periodicos/index.php/saudpesq/article/view/2475/1818>>

PIACENTINI, A. B. Recentes aspectos sobre a biologia do câncer e das metástases. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 5, n. 3, p. 593-604, 2012.

PINHO, M. Biologia Molecular do Câncer, Revinter, 2005a. 224f.

PINHO, M. S. L. Angiogênese: O Gatilho Proliferativo. *Rev bras Coloproct*, v. 25, nº 4, p. 396-402, 2005b.

PINTO, A.C. **O Pau-brasil e um pouco da história brasileira**. Disponível em: http://www.institutopaubrasil.org.br/conhecendo_o_pau_brasil.htm acesso: junho de 2002.

PONTES JUNIOR, J. **Análise da expressão de moléculas de adesão no tumor primário e em metástases ósseas e linfonodais de pacientes com câncer de próstata**. 2009. Tese (Doutorado em Urologia) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5153/tde-11052010-135352/>>. Acesso em: 2013-07-21.

PRESCOTT, Stephen M.; FITZPATRICK, F. A. Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1470, nº 2, p. M69-M78, 2000.

PU, Rong; et al. Study on antimicrobial activity of *Caesalpinia sappan* and active component against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Laboratory Medicine and Clinic**, v. 11, 2013.

QUEIROZ, M.L.S. et al. Evaluation of *Caesalpinia ferrea* extract on bone marrow hematopoiesis in the murine models of listeriosis and Ehrlich ascites tumor. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 23, nº. 3, p. 367 - 382, 2001.

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

RAO, Y.K.; SHIH-HUA, F.; YEW-MIN, T. Anti-inflammatory activities of flavonoids isolated from *Caesalpinia pulcherrima*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p 249–253, 2005.

REBECCA, M.A.; et al. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.83, p.101-104, 2002.

REZENDE, C. M., et al. Constituintes Químicos Voláteis das Flores e Folhas do Pau-Brasil (*Caesalpinia echinata*, Lam.). **Quím. Nova**, v. 27, n. 3, p. 414 – 416, 2004.

RIVOIRE, W. A. et al . Biologia molecular do câncer cervical. **Rev. Bras. Saude Mater. Infant.**, Recife, v. 6, n. 4, 2006 . Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-38292006000400012&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 22 jul. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-38292006000400012>.

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

ROSSELLI, M.; KELLER, P.J.; DUBEY, R.K. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. **Human Reproduction Update**, v. 4, nº 1, p. 3–24, 1998.

SAITOH, T.; et al. 3-Benzilchroman derivatives related to brazilin from *C. sappan* lignum. **Chem Pharm Bull**, v. 34, issue 6, p. 2506 - 2511, 1986.

SANDLER, A.B.; DUBINETT, S.M. COX-2 inhibition and lung cancer. *Semin Oncol*. 2004 Apr;31(2 Suppl 7):45-52.

SANTA-CECILIA, F. V. et al. Avaliação da atividade antioxidante e determinação do conteúdo total de fenóis e flavonoides das folhas de *Garcinia brasiliensis*. In: XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA. 2010, Minas Gerais. **Anais**. Lavras: UFLA, 2010. p. 1-4.

SHEN, J. et al. Brazilein protects the brain against focal cerebral ischemia reperfusion injury correlating to inflammatory response suppression. *European Journal of Pharmacology*, v. 558, p. 88–95, 2007.

SHENGQIAN, W. et al. Anti-inflammatory activity of an ethanolic *Caesalpinia sappan* extract in human chondrocytes and macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, p. 364– 372, 2011.

SHOEB, M. Anticancer agents from medicinal plants. **Bangladesh J Pharmacol**, v. 1, p. 35-41, 2006.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1315-1321, 1995.

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

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

SILVA, E. C. B. **Avaliação Biológica de *Caesalpinia echinata* Lam. Usos e Riscos**. 2006. 114p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006a.

SILVA, L. A.; HETEM, S.; DENARDIN, O.V. P. Efeito do metotrexato sobre o reparo ósseo após condilectomia unilateral em camundongos (*Mus musculus*). **Revista de Odontologia da UNESP**; 35(1): 89-96, 2006.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, nº 4, p. 618-626, 2008.

SINGER, J.W.; SHAFFER, S.; BAKER, B.; BERNAREGGI, A.; STROMATT, S.; NIENSTEDT, D.; BESMAN, M. Paclitaxel poliglumex (XYOTAX; CT-2103): an intracellularly targeted taxane. **Anticancer Drugs**, v.16, nº 3, p. 243-54, 2005.

SISTEMANERVOSO.COM. **Reparo dos tecidos: crescimento celular, fibrose e cicatrização de feridas**. 2005. Disponível em: <http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=11&materia_id=207&materiave_r=1> Acesso em 28 jul. 2013.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr., Campinas**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SÖHLE, J. et al. White Tea extract induces lipolytic activity and inhibits adipogenesis in human subcutaneous (pre)-adipocytes. **Nutrition & Metabolism**, v. 6, nº 20, 2009. Disponível em: <<http://www.nutritionandmetabolism.com/content/6/1/20>> Acesso em: 10 jul 2013.

SOUSA, C. M.de M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**, v. 30, nº. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, R.T.D.; AGRIPINO, D.G.; YOUNG, M.C.M.; MORENO, P.R.H. **Caracterização da presença de ácido daniélico em extratos de ramos de pau-brasil com atividade fungitóxica**. Disponível em: http://www.botanicasp.org.br/pau_brasil/resumos/29.htm, acesso: setembro de 2004.

SOUZA, S.I. **Alterações renais e metabólicas induzidas pela dieta hiperlipídica e hipersódica em ratas ovariectomizadas**. 2012, 98 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Vitória da Conquista, 2012.

SRINIVAS, K.V.N.S., et al. Flavonoids from *Caesalpinia pulcherrima*. **Phytochemistry**, v. 63, p. 789 – 793, 2003.

STRICKER, T. P.; KUMAR, V. Neoplasia. In: KUMAR, V. et al. **Robbins Patologia Básica**. Rio de Janeiro: Saunders, Cap.6, p.187-243, 2008.

SUBBARAMAIAH, K. et al. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 21875-2188, 1998.

TAVARES, M. S. dos S.; RAMOS, M. I. L. Atividade antioxidante de frutos do Cerrado e do Pantanal, do Estado de Mato Grosso do Sul: padronização de metodologias. 2008. Disponível em: <<http://www.propp.ufms.br/gestor/titan.php?target=openFile&fileId=490>> Acesso em: 15 jun. 2013.

- THOMAS, Wayt; AMORIM, André M. **Population Dynamics of *Caesalpinia echinata* (Brazilwood, Ibirapitanga, Pau Brasil, Pernambuco)**. 2005. Disponível em: < http://www.nybg.org/bsci/res/bahia/Pau_Brasil.htm>. Acesso em: 12 mar. 2009.
- TIMM, L. de L. Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas. **Caderno La Salle XI**, Canoas, v.2, nº 1, p. 231 - 239, 2005.
- TUCKER, S.C. Floral development in legumes. **Plant Physiology**, v.131, p. 911-926, 2003.
- TUROLLA, M. S. dos R.; NASCIMENTO, E. de S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, nº. 2, abr./jun., 2006.
- UNNATI, S. et al. Novel anticancer agents from plant sources. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 11, nº1, p. 0016–0023, 2013.
- USHIO-FUKAI, M.. “Redox signaling in angiogenesis: Role of NADPH oxidase”. **Cardiovascular Research**, v. 71, p. 226 – 235, 2006.
- USHIROBIRA, T.M. A. **Estudo químico, avaliação microbiológica e toxicológica pré-clínica (aguda e subcrônica) de extratos de sementes de *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Duche (GUARANÁ)**. 2003. 195f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual de Maringá (UEM). Maringá.
- VAILHÉ, B.; VITTET, D.; FEIGE, J. J. In Vitro Models of Vasculogenesis and Angiogenesis. **Lab Invest.**, v. 81, p. 439–452, 2001.
- VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quím. Nova**, v. 30, nº 5, p. 1323-1338, 2007.
- VEDANA, M. I. S. **Efeito do processamento na atividade antioxidante da uva**. 2008, 85 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- VOLPE, M. A. et al. Disfunção endotelial após isquemia global e reperfusão em cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea: estudo do papel do magnésio em artérias coronarianas caninas. **Rev Bras Cir Cardiovasc.**, v 17, nº 3, p. 187-200, 2002.
- WARD, L. S. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v 46, nº 4, p. 351-360, 2002. Acesso em 22 jul.2013. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/abem/v46n4/12790.pdf>>.
- WAYNFORTH, B.H. Injection techniques. In: **Experimental and Surgical Techniques in the Rat**. London: Academic Press, 1980

WEISS, J. et al. **Collection do Body Fluids, In The Laboratory Rat**. Editora Krinke, G.J., pp. 485-510. Academic Press: London. 2000.

WERNER, E.T. **Calogênese de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.- fabaceae) in vitro visando a obtenção de um banco de germoplasma.**– 2009. 98 f. : il. Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 2009.

WILSON, G. S.; GEORGE, J. Physical and chemical insults induce inflammation and gastrointestinal cancers, **Cancer Lett.** (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2013.07.011> in press

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS). International Ethical Guidelines for Biomedical Research involving Humans Subjects. Geneva, 1993.

XAVIER, M.N.; RAMOS, I.N.C. XAVIER, L.F. **A Fitoterapia no Combate as Afecções Bucais**, Editora Ideia, 1995.

XIE, YI-WU et al. Vasorelaxing effects of *Caesalpinia sappan* Involvement of endogenous nitric oxide. **Life Sciences**, v. 67, p. 1913 -1918, 2000.

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

XU, J.; YADAN, J.C. First Synthesis of (+)-Brazilane from (+)-Brazilin. **Tetrahedron Letters**, v.37, n.14, p. 2421-2424, 1996.

YAN, X., et al. Development and optimization of a method for the analysis of Brazilin by HPLC with electrochemical detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1077, p. 44 - 48, 2005.

YEN, Chiao-Ting et al. Antitumor agents. 271: Total synthesis and evaluation of brazilein and analogs as anti-inflammatory and cytotoxic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 1037–1039, 2010.

YOU, Eun-Ju et al. Effects of brazilin on the production of fructose-2,6-bisphosphate in rat hepatocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v.102, p. 53–57, 2005.

YUNES, A.R.; CALIXTO, J.B. **Plantas Mediciniais – sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Ed. Argos, Chapecó, 2001.

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

ZANIN, J. L. B. et al. The Genus *Caesalpinia* L. (Caesalpinaceae): Phytochemical and Pharmacological Characteristics. **Molecules**, v. 17, p. 7887-7902, 2012.

ZHAO, Y. N. et al. Study on Cardioactive Effects of Brazilein. **Pharmacology**, v.76, p.76-83, 2006.

ZICHE, M. et al. Nitric Oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. **J. Clin. Invest.**, v. 94, p. 2036-2044, 1994.

ZICHE, M.; MORBIDELLI, L.. Nitric Oxide and Angiogenesis. **Journal of Neuro-Oncology**, v.50, Issue 1-2, p. 139-148, 2000.

APENDICE A – Achados histopatológicos dos órgãos de animais (ratos machos e fêmeas) tratados com extrato etanólico de *Caesalpinia echinata* em diferentes doses durante 28 dias.

		GRUPOS							
ORGÃO	EFEITO	CONTROLE		TRATADO 1 75mg/kg		TRATADO 2 150 mg/kg		TRATADO 3 300 mg/kg	
		MACH O	FEME A	MACH O	FEME A	MACH O	FEME A	MACH O	FEME A
CORAÇÃO	Hemorragia	-	-	+	-	+	+	+	N
	Congestão	-	-		-	-	-	+	N
	Hiperemia	-	-	+	-	-	-	-	N
	Degeneração turva/tumefa- ção	-	-		-	-	-	-	N
	Trombose	-	-	+	-	-	-	-	N
	Endotélio reagente	-	-	+	-	-	-	-	N
	Necrose	-	-	+	-	-	-	-	N
	Degeneração vacuolar	-	-	+	-	-	-	-	N
BAÇO	Congestão	+	+	+	N	+	+	+	N
FÍGADO	Degeneração turva/tumefaç ão	+	+	+	N	+	+	-	+
	Discreta e fina vacuolização citoplasmátic a	-	-	-	N	-	-	+	-
	Núcleos grandes claros e de cromatina aparentemen te integra	-	-	-	N	+	-	+	-
	Congestão	-	-	+	N	+	-	+	-
	Hiperplasia das células de kupfer	-	-	+	N	+	-	+	-
	Focos granulomat os	+	-	-	N	-	-	-	-
	Hepatócitos	-	-	+	N	+	-	+	-

	binucleados								
RIM	Nefrose	+	-	-	-	-	-	-	N
	Degeneração turva/tumefação	+	+	+	+	+	+	+	N
	Necrose de coagulação	-	-	-	-	+	-	-	N
	Degeneração vacuolar	-	+	-	-	+	-	-	N
	Congestão	-	-	+	-	+	+	+	N
	Hemorragia	+	-	-	+	-	-	-	N
PULMÃO	Pneumonia	+	N	+	+	+	+	+	+
	Hiperplasia na parede das arteríolas pulmonares	+	N		-	-	-	-	-
	Espessamento de septo interalveolar	-	N	+	-	-	-	-	-
	Hiperemia	-	N	+	-	-	-	-	-
	Hiperplasia do BALT	-	N	+	-	+	-	-	-
	Trombose arterial e venosa	+	N	-	-	+	-	-	-
	Congestão	+	N	-	-	+	-	-	-
OVÁRIO	Degeneração vacuolar	-	-	-	+	-	+		
	Hemorragia	-	-	-	-	-			+
TESTÍCULO	Degeneração	-	-	-	-	+	-	N	
	Edema	-	-	-	-	+	-	N	

APENDICE B - Análise histopatológica dos animais submetidos ao teste de avaliação da Atividade tumoricida de *C. echinata*.

ORGÃO	EFEITO	CONTROLE	GRUPOS			
			METOTREXATO (0,5mg/mL)	TRATADO 1 (25mg/mL)	TRATADO 2 (12,5mg/m L)	TRATADO 3 (6,25mg/m L)
BAÇO	Congestão	+	+	+	+	+
	Esplenite granulomatosa	+	+	+	+	+
FÍGADO	Degeneração turva/tumefação	+	+	+	+	+
	Vacuolização citoplasmática	+	+	+	+	+
	Núcleos grandes claros e de cromatina aparentemente íntegra	-	-	-	-	-
	Núcleos claros e cromatina quebradiça (fragmentada)	-	+	-	+	+
	Anisocariose	-	+	-	-	+
	Congestão	-	-	-	-	-
	Hiperplasia das células de kupfer	+	+	+	+	+
	Proliferação das células de kupfer	+	+	+	+	+
	Infiltrado mononuclear perivascular ou isolados distribuídos aleatoriamente	-	+	+	-	-
	Necrose	-	+	-	-	-
	Focos granulomatosos	+	+	+	+	+
	Hepatócitos binucleados	+	+	+	+	+
RIM	Nefrose	-	-	-	-	-
	Degeneração turva/tumefação	+	+	+	+	+
	Necrose de coagulação	-	-	-	-	-

	Degeneração vacuolar	+	+	+	+	+
	Cilindros hialinos	+	-	-	+	+
	Infiltrado granulomatoso	+	-	-	-	-
	Retração dos glomérulos	+	-	+	-	+
	Glomérulos menos celularizados	-	-	-	+	-
	Congestão	-	-	-	-	-
	Hemorragia	-	-	-	-	-
PULMÃO	Pneumonia	+	-	+	-	-
	Hiperplasia na parede das arteríolas pulmonares	-	-	-	-	-
	Espessamento de septo interalveolar	+	-	-	-	-
	Hiperemia	-	-	-	-	-
	Hemorragia	+	+	+	+	+
	Hiperplasia do BALT	-	-	-	-	-
	Trombose arterial e venosa	-	-	-	-	-
	Congestão	-	+	+	-	-
TUMOR	Necrose	+	+	+	+	+
	Debris celulares	+	+	+	+	+
	Infiltrados tumorais no tecido adiposo (metástase) com debris celulares	+	-	+	-	+
	Células tumorais íntegras de núcleos grandes e claros	+	-	-	-	+

APENDICE C - Análise histopatológica dos animais submetidos ao teste para avaliação do efeito do EE *C. echinata* sobre o crescimento tumoral em animais pré-tratados com inibidores da cascata do ácido araquidônico.

ORGÃO	EFEITO	GRUPOS			
		CONTROLE	TRATADO 1	TRATADO 2	TRATADO 3
BAÇO	Congestão		+	+	-
	Esplenite granulomatosa	+	+	+	+
FÍGADO	Degeneração turva/tumefação	+	+	+	+
	Vacuolização citoplasmática	+	+	+	+
	Núcleos grandes claros e de cromatina aparentemente integra	-	-	-	-
	Núcleos claros e cromatina quebradiça (fragmentada)	+	+	-	+
	Anisocariose	-	+	+	
	Congestão	+	-	+	+
	Hiperplasia das células de kupfer	+	+	-	-
	Proliferação das células de kupfer	-	-	-	-
	Infiltrado mononuclear perivascular ou isolados distribuídos aleatoriamente	-	+	-	-
	Necrose	-	-	-	-
	Focos granulomatosos	+	+	+	+
	Hepatócitos binucleados	+	+	+	+
RIM	Nefrose	-	-	-	-
	Degeneração turva/tumefação	+	+	-	+
	Necrose de coagulação	-	-	-	-
	Degeneração vacuolar	+	+	-	+
	Cilindros hialinos	-	-	-	-
	Infiltrado granulomatoso	-	-	-	-
	Retração dos glomérulos	-	-	-	-
	Glomérulos menos celularizados	-	-	-	-
	Congestão	+	+	+	+
	Hemorragia	+	+	+	+
PULMÃO	Pneumonia	-	-	-	+
	Hiperplasia na parede das arteríolas pulmonares	-	-	-	-
	Espessamento de septo interalveolar	-	-	-	-
	Hiperemia	-	-	-	-
	Hemorragia	-	-	-	-

	Hiperplasia do BALT	-	-	-	-
	Trombose arterial e venosa	-	-	-	-
	Congestão	+	+	+	+
TUMOR	Necrose	+	+	+	+
	Debris celulares	+	+	+	+
	Infiltrados tumorais no tecido adiposo (metástase) com debris celulares	+	+	+	+
	Células tumorais íntegras de núcleos grandes e claros	+	-	-	+

Controle: soro fisiológico; Tratado 1: Dexametasona + EE de *C. echinata* (25 mg/kg); Tratado 2: Indometacina + EE de *C. echinata* (25 mg/kg); Tratado 3: soro fisiológico + EE de *C. echinata* (25 mg/kg).

APENDICE D – Artigo publicado no *Journal of Cancer* vol. 5, nº 2, p. 143-150, 2014.

Journal of Cancer 2014, Vol. 5

143



Journal of Cancer

2014; 5(2): 143-150. doi: 10.7150/jca.7439

Research Paper

Evaluation of Antioxidant and Antiangiogenic Properties of *Caesalpinia Echinata* Extracts

Elisângela Christhianne Barbosa da Silva Gomes¹, George Chaves Jimenez², Luis Claudio Nascimento da Silva³, Fabrício Bezerra de Sá⁴, Karen Pena Cavalcanti de Souza⁵, Gerson S. Paiva⁶, Ivone Antônia de Souza⁷

1. Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Pernambuco. Avenida Professor Moraes Rêgo, s/n Cidade Universitária, Recife, PE, 50670-420 Pernambuco, Brasil.
2. Departamento de morfologia e fisiologia animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros, S/N, Dois Irmãos, Recife, PE, 52171-900 Pernambuco, Brasil.
3. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco. Avenida Professor Moraes Rêgo, s/n Cidade Universitária, Recife, PE, 50670-420 Pernambuco, Brasil.
4. Departamento de morfologia e fisiologia animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros, S/N, Dois Irmãos, Recife, PE, 52171-900 Pernambuco, Brasil.
5. Departamento de imunopatologia Keiso Asami (LIKA), Federal de Pernambuco. Avenida Professor Moraes Rêgo, s/n Cidade Universitária, Recife, PE, 50670-420 Pernambuco, Brasil.
6. Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, Rua Dr. Xavier Sigaud, 150, Urca, RJ, 22290-180 Rio de Janeiro, Brasil.
7. Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Pernambuco. Avenida Professor Moraes Rêgo, s/n Cidade Universitária, Recife, PE, 50670-420 Pernambuco, Brasil.

✉ Corresponding author: gersonpaiva1974@gmail.com

© Ivyspring International Publisher. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>). Reproduction is permitted for personal, noncommercial use, provided that the article is in whole, unmodified, and properly cited.

Received: 2013.08.17; Accepted: 2013.11.16; Published: 2014.01.23

Abstract

Natural products contain important combinations of ingredients, which may to some extent help to modulate the effects produced by oxidation substrates in biological systems. It is known that substances capable of modulating the action of these oxidants on tissue may be important allies in the control of neovascularization in pathological processes. The aim of this study was to evaluate the antioxidant and antiangiogenic properties of an ethanol extract of *Caesalpinia echinata*. The evaluation of antioxidant properties was tested using two methods (DPPH inhibition and sequestration of nitric oxide). The antiangiogenic properties were evaluated using the inflammatory angiogenesis model in the corneas of rats. The extract of *C. echinata* demonstrated a high capacity to inhibit free radicals, with IC₅₀ equal to 42.404 µg/mL for the DPPH test and 234.2 µg/mL for nitric oxide. Moreover, it showed itself capable of inhibiting the inflammatory angiogenic response by 77.49%. These data suggest that biochemical components belonging to the extract of *C. echinata* interfere in mechanisms that control the angiogenic process, mediated by substrates belonging to the arachidonic acid cascade, although the data described above also suggest that the NO buffer may contribute to some extent to the reduction in the angiogenic response.

Key words: antioxidant, angiogenesis, *Caesalpinia echinata*, natural products

INTRODUCTION

Angiogenesis is a complex multi-stage process that leads to the formation of new blood vessels from pre-existing capillaries. It is essential for various physiological processes, such as the growth and de-

velopment of organs, capillary growth, the reproductive cycle and the healing of wounds. On the other hand, it may also contribute to the development of various pathological processes, such as rheumatoid

arthritis, diabetic retinopathy, and the growth and metastasis of tumors [1, 2].

The creation of new blood vessels is regulated by a delicate equilibrium between signaling molecules of a pro- and anti-angiogenic nature. After activation of the endothelial cells by a pro-angiogenic stimulus, the new vessels are formed by a series of complex morphological and biochemical events in various stages. As a result, one finds events such as the degradation of the base membrane and remodeling of the extracellular matrix, where the action of proteases secreted by the endothelial cells brings about important changes in the cell-adhesion mechanisms, culminating in migration and proliferation of endothelial cells and the formation of the endothelial capillary tube [3, 4, 5].

Various studies suggest that vascular endothelial growth factor (VEGF) is the main mediator of the onset of angiogenesis and that this cytosine is capable of inducing vasodilation by producing nitric oxide (NO), and also of increasing the permeability of endothelial cells, or even stimulating the proliferation, survival, migration and differentiation of these cells (CE) [4, 6, 7].

Recent research has shown that vascular cells can produce reactive oxygen species (ROS) through NADPH oxidase. In fact, free radicals may play an ambiguous role in neovascularization, if, on the one hand, high concentrations of ROS causing oxidative stress, lead to apoptosis, while low levels function as signaling molecules mediating the proliferation and migration of the CEs, which may help to spread angiogenesis in vivo [8, 9]. According to Urao [8] ROS levels may be determined by the mechanisms that control the production of oxidant species associated with the activation of enzyme systems that perform an antioxidant function.

Understanding the role of ROS in triggering the formation of new blood vessels may enable these components to be classified as potential targets for treatment of angiogenesis-dependent diseases, leading us to infer that substances capable of modulating the action of these oxidants on tissue could be important allies in the control of neovascularization in pathological processes [4, 10].

On the other hand, it is known that many natural products contain important combinations of ingredients that may to some extent help to modulate the effects produced by oxidation substrates in biological systems.

The wood of *Caesalpinia echinata* Lam. (Fabaceae), commonly known as Pau-brasil, has thus been reported to contain a wide range of polyphenols, in particular flavonoids (brazilin and its derivative brazilein), in addition to lignins and lower concentrations of tannins and coumarins [11, 12, 13]. In view of this, it

may be that this broad and diverse range of polyphenols, with known antioxidant properties [14], plays an important role in the modulation of expanding angiogenic systems, as, for example, in the local circulation of blood in the corneas of animals stimulated by irritant substances.

It is worth noting that different parts of pau-brasil are commonly used as adstringents, healing agents, oral analgesics and tonics, with the bark of the trunk also being used to treat diarrhea and dysentery and to strengthen the gums [15, 16, 17]. Studies have also shown that this species also has properties of medical interest, in particular antimicrobial, antifungal, anti-inflammatory, anti-nociceptive and anti-tumor properties [11, 18, 19, 20, 21, 22] (FREIRE, 2004; SOUZA, et al., 2004; GRANGEIRO, 2009; SHEN, et al., 2007; YEN, et al., 2010).

In view of this, the main aim of the present study was to evaluate the antioxidant and antiangiogenic properties of the ethanol extract of *Caesalpinia echinata* Lam, in a model of inflammatory angiogenesis in the corneas of albino Swiss Wistar rats.

METHODOLOGY

Ethanol extract of *Caesalpinia echinata*

The botanical material (wood) of *C. echinata* was harvested in December 2008, in the municipality of São Lourenço da Mata, Pernambuco, Brazil. The exsiccate of these specimens was identified by a botanist (Marlene Barbosa) and duly catalogued and stored in the Geraldo Mariz herbarium, at the Federal University of Pernambuco, with the identification tag 41,764.

After proper cleaning and processing of the material, the extract was obtained by shredding the wood of *Caesalpinia echinata* Lam. and marinating it in 98.2° GL ethanol for 72 hours, for subsequent desiccation in a Heizbed OB type evaporator, Heidolph 30-180C 1300W. The resulting material was re-suspended in 0.9% saline solution for future use.

Animals

Rattus norvegicus var. albino Wistar rats weighing around 180g were used. The animals were kept in polypropylene cages, in a 12h light/dark cycle at a temperature of (22 ± 2°C). Feeding was in the form of "pellets" and water ad libitum. Before division into groups, the animals underwent a clinical evaluation, the exclusion criterion being the presence of negative clinical signs or eye diseases.

The experimental protocol was approved by the Animal Experiments Ethics Committee of the UFPE, process n° 23076.056746/2012.

Antioxidant activity of the DPPH free radical

Antioxidant activity was determined by the se-

questration reactions of the stable DPPH[•] radical (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl), for molecular components present in the extract of *C. echinata* according to the methodology suggested by Blois [23].

A 20 mg/mL methanol solution of DPPH[•] was prepared, so as to present absorbance of 517 nm between 0.6 and 0.7. An aliquot of 250 μ L of this solution was mixed with 40 μ L of different concentrations of extract. Thirty minutes later, the absorbance was measured at 517 nm. Gallic acid was used as the reference compound for this assay and tests conducted in triplicate.

Analysis of Nitric Oxide (NO) Sequestration *in vitro*

Nitric oxide was produced from sodium nitroprusside and quantified using the Griess reaction following the method described by Marocci et al [24]. Sodium nitroprusside, in a pH 7.4 water solution, spontaneously generates nitric oxide, which in turn interacts with oxygen to form nitrite ions, which can be measured using the Griess reagent. The molecular extracts of nitric oxide compete with oxygen, reducing the production of nitrite ions. For the experiment, 10 mM sodium nitroprusside in a phosphate buffer (PBS - pH 7.4) as added to different preparations at concentrations of 10, 25, 50, 100 and 200 μ g/mL of extract of *C. echinata*, both incubated at 25° C for 150 min. Then, 0.5 mL of Griess reagent (1% sulfanilamide, 2% H₃PO₄ and 0.1% naphthyl ethylenediamine dihydrochloride) were added to each sample. The absorbance of the chromophore formed was read at 540 nm, using gallic acid as the positive control.

The results were expressed in terms of minimum inhibitory concentration (I_c), with the percentage inhibition given by the formula $I\% = [(A_c - A_s) / A_c] \cdot 100$ where A_c is the absorbance of the control and A_s the absorbance in the presence of the extract. A relation was established between the concentrations of the extract and the I_c given by regression analysis, using a Prism Grafic Pad Version 5.0 spreadsheet.

MTT assay

Cell viability was evaluated using the MTT assay which measures the metabolic conversion of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich) salt to the colored formazan dye. Vero cells (1 \times 10⁵/mL) were incubated in a 96-well plate in quadruplicate for 24 h. Cells were then treated with extracts (10, 25, 50, 100, 200 μ g/mL) for 24 h. At the end of the incubation, the medium was removed and a MTT solution (5 mg/mL in RPMI) was added to the cells that were further incubated for 3 h. Afterwards the medium was removed and the intracellular formed formazan product was dissolved in

DMSO. The optical density (OD) was measured at 595 nm in a microplate reader (Benchmark plus, Bio-Rad, California, EUA). Cell viability was calculated in comparison to the OD obtained by control cell, considered as 100%.

Protective effects against H₂O₂-induced damage

Vero cells (1 \times 10⁵/mL) were incubated in a 96-well plate in quadruplicate for 24 h. Cells were then treated with extracts (10, 25, 50, 100, 200 μ g/mL) for 30 min and subsequently with H₂O₂ (1 mM) for 24 h. At the end of the incubation, the medium was removed and a MTT solution (5 mg/mL in RPMI) was added to the cells that were further incubated for 3 h. Afterwards the medium was removed and the intracellular formed formazan product was dissolved in DMSO. The optical density (OD) was measured at 595 nm in a microplate reader (Benchmark plus, Bio-Rad, California, EUA). Cell viability was calculated in comparison to the OD obtained by control cell, considered as 100%.

Antiangiogenic Activity

For evaluation of antiangiogenic activity, Wistar rats were divided into two groups, one treatment group (n=9) and one control (n = 8). After a five-day acclimatization period, these animals were anesthetized with a combination of xylazine (50mg/Kg) and ketamine (50mg/Kg) (im), complemented when handling the animals with instillation into the conjunctival sac, of two drops of 0.5% proxymetacaine hydrochloride local anesthetic. Once anesthetized, each animal underwent a procedure to pull back the eyelids, exposing almost the whole surface of the cornea and the superior limbus region. Each animal was thus cauterized in the upper edge of the right cornea, with the aid of 16 \times microscopic surgery. A 3 mm diameter circular paper filter, previously soaked in a solution of sodium hydroxide (NaOH) 1M for 1 min was used for this. The paper filter was then placed about 1 mm from the corneo-conjunctival limbus, and left there for 30s. Shortly thereafter, the eye was rinsed with 10ml of 0.9% saline solution, to remove excess NaOH. This technique produced a circular, homogenous, well-defined cauterization site of about 3.5 mm in diameter [25].

After 18 hours, the animals received specific treatment with a single dose of 10 μ L alcohol extract solution plus Tween 80, at a final concentration of 100mg/mL, if in the treatment group. The animals in the control group received 10 μ L of saline solution. After 18 days, the animals were anesthetized according to the anesthesiological protocol described above, and, using a digital camera attached to the eyepiece of

the surgical microscope, images of the area of the eye treated were obtained, with magnification of 16X.

The images were transferred to a computer database and made available in Microsoft Paint format for enlargement and evaluation of the density of vessels in a circular area arranged in front of the pupils. The surface area A was obtained using the formula $A = 4/3\pi r^3$, where r is the radius.

RESULTS AND DISCUSSION

Antioxidant activity of the DPPH free radical

Oxidative processes form an essential part of biochemical mechanisms related to functions such as cell respiration and has important relations to other aspects of metabolism. Different types of free radical can thus be produced naturally in the organism. In view of their abundance and application to different aspects of the functioning of the organism, the most commonly studied types of possible physiologically administered radicals have been reactive oxygen species (ROS).

Many researchers have observed that, in low concentrations, reactive oxygen species (ROS) appear to have beneficial functions related to clear physiological responses, such as defense against infectious agents, cell growth regulation, intercellular and intracellular signaling, and synthesis of important biological substances, such as steroidal hormones [26]. However, an excess of these appears to be associated with the development of various diseases, such as those related to oxidative stress, including cancer, cardiovascular disease, cataracts, a compromised immune system and brain dysfunctions [27, 28].

Under many circumstances, the mechanisms available to certain types of organism for controlling free radicals, even against ROS, are not efficient within a certain time limit. This leads to the introduction so-called antioxidant agents, which are compounds that, even at relatively low concentrations, protect the biological system from the harmful effects of the oxidation process. Normally, exhibit an extensive capacity to stabilize these kinds of radical before they can cause cell damage [26, 29].

The 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical is normally used to evaluate the ability of antioxidant compounds to sequester free radicals. DPPH• is a stable radical that accepts the transfer of one electron from an antioxidant compound and, when undergoing electron reduction, loses its purple color, thereby affecting the absorbance of the medium [30, 31, 32].

In the present study, EECe performed satisfactorily in terms of capturing the organic DPPH radical, with an IC_{50} of 42.404 $\mu\text{g}/\text{mL}$, which was better than

the performance of gallic acid ($IC_{50} = 165.070 \mu\text{g}/\text{mL}$), with a percentage difference of 74.3%.

Figure 1 shows the performance of the extract at different concentrations (10, 25, 50, 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in terms of stabilization of radicals, where it can be seen that the antioxidant response improves with increased concentration, creating a dose-dependent effect in the antioxidant activity of the extract with regard to the DPPH radical, indicating that, in general, a substrate that exhibits great potential to sequester free radicals has a low IC_{50} . Figure 1 shows that, from 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ onwards, the percentage inhibition of the DPPH radical tends to be constant, suggesting a saturation point, under the experimental conditions used for these assays.

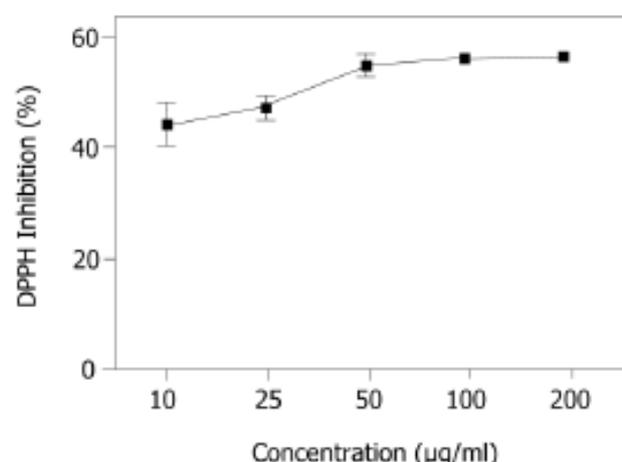


Figure 1. Inhibition of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical by ethanol extract of *Caesalpinia echinata*. Significant values \pm S.D. (n=3)

In our previous studies of the phytochemical composition of *C. echinata* we discovered the presence of polyphenols (flavonoids, tannins and coumarins) [11]. Fukushima & Fuzeto [12] have reported the presence of lignins and both results accord with the report made by Rezende et al. [33], who point to phenol derivatives C6-C3 as the most commonly observed metabolites in species of the genus *Caesalpinia*.

Phenol compounds are normally able to interfere in a series of physiological events in animals, including those relating to oxidation processes [14]. It is worth noting that various authors have suggested that brazilin, a homoflavonoid, is the main pharmacological product of interest in the wood of pau-brasil. It should be added that brazilin can be transformed into brazilein on contact with air or light, owing to an oxidation process in which the hydroxyl of brazilin is converted into a carbonyl group [13]. Both brazilin and brazilein have important antioxidant properties [34, 35]. The mechanism of action involved in the antioxidant activity of brazilin must be connected to its

ability to oxidize in the presence of radical (e.g. reactive species of oxygen and nitrogen), resulting in a more stable, less-reactive radical. This happens due to

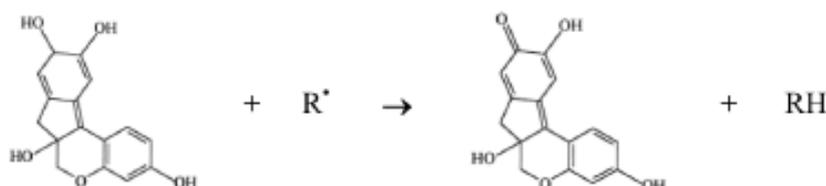


Figure 2. Antioxidant activity of brazilin

Analysis of in vitro sequestration of nitric oxide (NO)

Endogenous nitric oxide (NO) is mainly produced from its precursor, the amino acid L-arginine, in the vascular endothelium, by phagocytes and some kinds of brain cell, performing a variety of roles in various physiological systems [36, 37]. However, in excess, it may be associated with the genesis of various diseases [38, 39]. These studies evaluated the capacity of the ethanol extract of *Caesalpinia echinata* (EECe) to inhibit "in vitro" production of nitric oxide through the mediation of sodium nitroprusside. Figure 3 leads us to infer that different concentrations of EECe (10, 25, 50, 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) inhibited production of the NO radical in a dose-dependent manner. The IC_{50} was 234,200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, with the same type of analysis applied to the gallic acid standard giving a result of $\text{IC}_{50}=174.560 \mu\text{g}/\text{mL}$. These data suggest that EECe has an inhibitory effect of only 25.49% in relation to gallic acid.

It is interesting to note here that the inhibitory effect on the NO radical obtained was practically the inverse of the inhibitory effect achieved from the evaluation of DPPH, as the data in Table 1 show. A careful look at the IC_{50} figures for *C. echinata* shows that this parameter was 81.9% greater than NO, revealing a greater impact on the identification and capture of this type of radical.

In fact, at least three types of enzyme systems of the nitric oxide synthase—NOS—type can be associated with the production of NO and L-citrulline, depending on the availability of oxygen and nicotinamide dinucleotide phosphate (NADPH) as cofactors, in addition to the L-arginine substrate. Two of these systems depend on Ca^{++} and these are called constitutive with regard to neuronal (NO-1 or nNOS) or endothelial (NO-3 or eNOS) systems, while one is independent of Ca^{++} (NOS-2 or iNOS), known as induced, and associated with cell types such as macrophages, microglia, and others that are responsible for mediating inflammation, such as lipopolysaccharides

the high reactivity of hydroxyl group of the flavonoids, able to inactivate the radicals, according to the diagram in Figure 2.

in bacterial membranes, endotoxins and cytokines such as IL- 1β , TNF- α and INF- γ [40, 41].

There are many disorders of the mechanisms regulating NO production, ranging from modifications of the G-protein-coupled receptors in membranes, brought on by saturation of H^+ type ions in cases of ischemia, or a fall in levels of Mg^{2+} cytoplasm associated with metabolic disorders [42]. In cases of sepsis or tissue destruction, overproduction of NO may be mediated by macrophages, leading to generalized vasodilation and serious cardiovascular ramifications [43]. The results achieved in the present study suggest that extract of *C. echinata* may help to reduce the number of NO radicals in patients with organic disorders that make it possible to produce this type of radical, in a dose-dependent manner.

Table 1. IC_{50} concentration values that inhibit 50% of the radical in question in $\mu\text{g}/\text{mL}$, used in methods for sequestering the DPPH radical and nitric oxide (NO), comparing the results with the gallic acid standard.

Samples	DPPH (IC_{50}) $\mu\text{g}/\text{mL}$	NO (IC_{50}) $\mu\text{g}/\text{mL}$
<i>Caesalpinia echinata</i>	42.404	234.200
Gallic Acid	165.070	174.560

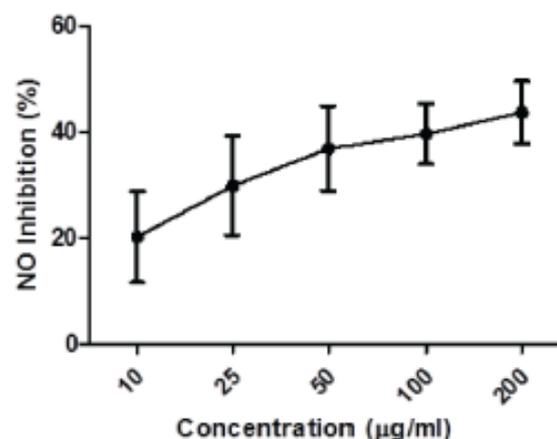


Figure 3. Inhibition of NO radical by the ethanol extract of *Caesalpinia echinata*. Significant values \pm S.D. (n= 3)

Jayakumar & Kanthimathi [44] note that nitric oxide is a free radical involved in the pathogenesis of cancer, as its presence changes the mechanisms associated with the vascularization dynamics of tumors and metastases. In fact, many studies indicate that nitric oxide plays a part in neo-vascularization, since its release is normally associated with events linked to the angiogenic cascade [45, 46, 47].

As noted above, the presence of polyphenol compounds in *C. echinata* wood may be associated with its capacity to inhibit free radicals. Research on antioxidant substances has shown that these kinds of compounds are capable of reducing inflammatory edema, inhibiting angiogenesis and the proliferation of tumor cells [44, 47, 48, 49].

In other studies carried out by this work group, it was shown that the ethanol extract of *C. echinata* was capable of reducing edema induced by carrageenan in rats' paws, and inhibiting the growth of Ehrlich's carcinoma and 180 sarcoma in "in vivo" assays [11].

MTT Test

The natural products have been an important source of antineoplastic components. It is known that many plants have significant antitumor properties [50]. *C. echinata* has demonstrated in previous studies a marked antitumoral effect in vivo, against the strains Ehrlich Carcinoma and Sarcoma 180. Knowing the possible cytotoxic potential of this vegetable we held a capacity assessment of cytotoxic ethanolic extract of *C. echinata* ahead the lineage of Vero cells.

Figure 4 shows the activity of ethanolic extract of *C. echinata* about the viability of the culture of Vero cells. The toxic concentrations for 50% of the cells (CC_{50}), determined using the MTT dye, was 168.4483 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.17 mg/mL). Here, it is interesting to note that the cytotoxic response intensifies according as increases the concentration of EE of *C. echinata*.

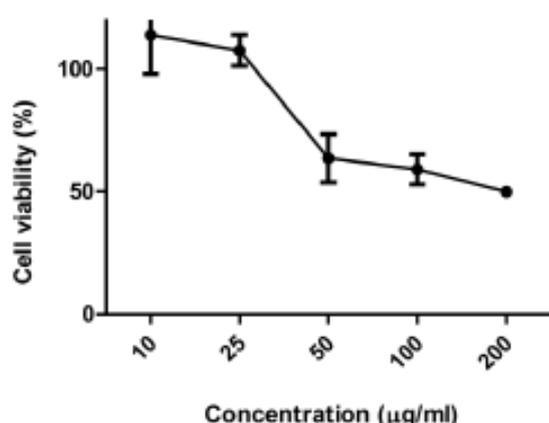


Figure 4. Viability of culture of VERO cells subjected to different concentrations of the ethanolic extract of *Caesalpinia echinata*.

Extracts of vegetable origin which contains principles antioxidants usually present potential cytotoxic and antitumor activity in experimental animals [51]. There are no other studies regarding the cytotoxic activity of *C. echinata*, however, this activity has already been observed in other species of the genus *Caesalpinia*, being this activity related to the presence of homoisoflavonoides, diterpenoides, as well as other polyphenolic compounds present in the chemical composition of wood; these plants [51, 52].

Protective effects against H_2O_2 -induced damage

In this experiment, a fibroblast cell culture established from the renal cells of monkey *Cercopithecus aethiops* (African green monkey) was used to investigate the protective properties of EE of *C. echinata* against oxidative stress induced by H_2O_2 .

The cells pre-treated with EE of *C. echinata* showed significant increase in viability when compared with cells exposed only to hydrogen peroxide, especially in concentrations of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($12.5 \pm 4.63\%$), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($16.93 \pm 3.52\%$) and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($46.52 \pm 6.79\%$). The highest concentration tested it was observed that 46.5% of the cells pre-treated with EE of *C. echinata* survived exposure to oxidizing agent H_2O_2 .

Our data demonstrate that, in in vitro conditions, the EE of *C. echinata* 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ exerts an important protective action against the oxidative stress generated by H_2O_2 . As discussed earlier, this result is possibly due to the antioxidant activity observed in this extract, which is probably related to the ability of polyphenolic compounds in act with antioxidant.

Antiangiogenic Activity

Angiogenesis has been described as one of the main events in the process of tumor growth, interfering in the mechanisms involved in the proliferation of metastases. Apart from cancer, other pathological conditions also persistently stimulate angiogenesis, such as diabetic retinopathy, hemangioma, arthritis, psoriasis and atherosclerosis. In view of this, inhibition of angiogenesis has been proposed as a strategy for combating cancer and other angiogenesis-dependent diseases.

The capacity to inhibit angiogenesis mediated by extract of *C. echinata* was evaluated using a model of inflammatory angiogenesis in the corneas of rats, according to the methodology described by Fachine-Jamacaru; Fachine Júnior; Moraes Filho [25], adapted for Wistar rats.

After 18 days of treatment with topical application of EE C_e (100mg/mL) at a dose of 10 $\mu\text{L}/\text{eye}$, it

was observed that *C. echinata* inhibits the inflammatory angiogenic response caused by cauterization of rats' corneas with NaOH (1M), giving rise to a substantial reduction in the number of new capillaries (Figs. 5A, B and C), showing inhibitory activity (Figure 6) of 77.49%.

These data suggest that biochemical components belonging to the extract of *C. echinata* interfere with mechanisms that effect the angiogenic process, mediated by substrates belonging to the arachidonic acid cascade, although the data described above also suggest that NO buffer may contribute in some way to reducing the angiogenic response.



Figure 5. A) Overview of crystalline rats stimulated with NaOH (at the time of cauterizing); B) View of crystal in Wistar rat stimulated with NaOH, not treated (control); C) crystal in Wistar rat treated with EECE.

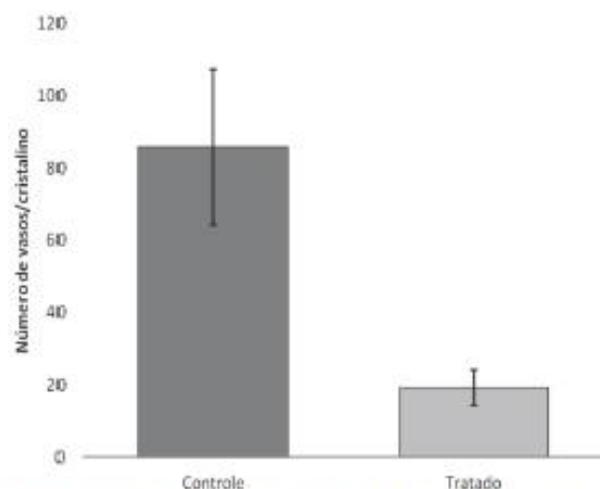


Figure 6. Number of vessels counted on the surface of the crystal in Wistar rats treated with EECE.

Competing Interests

The authors have declared that no competing interest exists.

CONCLUSION

By way of conclusion, the results obtained in the present study have shown that the extract of *C. echinata* wood is capable of inhibiting the oxidant activity of DPPH and NO radicals in *in vitro* assays. In addition to presenting protective action against oxidative stress H_2O_2 -induced. Associated with its antioxidant capacity, the extract also reduced the inflammatory angiogenic response in the corneas of rats.

We hope that further studies can be developed, with more specific experimental models, to shed more detailed light on the biochemical agents and the main mechanisms associated with the action of *C. echinata* in mediating vascular events, especially those associated with angiogenesis in cancer.

References

- González RP, Leyva A, Melo RAB, Moreira RDM, Pessoa C, Farias R F, Moraes MO. Método para o estudo *in vivo* da angiogênese: indução de neovascularização na córnea de coelho. *Acta Cir. Bras* 2000; 15: 00-00.
- Damico FM. Angiogênese e doenças da retina. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 2007; 70: 547-53.
- Castro PR. Cinética da angiogênese inflamatória induzida por implante de esponja na musculatura abdominal em camundongos. 2012 [Dissertação de mestrado]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais.
- Ushio-Fukai M. Redox signaling in angiogenesis: Role of NADPH oxidase. *Cardion. Res.* 2006; 71: 226-35.
- Dias PF, Ribetto-do-Valle RM, Maraschin RP, Maraschin M. Novos moduladores da formação de vasos sanguíneos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 2002; nº 25.
- Capp C, Zennig N, Wajner S, Maia A.L. Papel do fator de crescimento endotelial vascular nos carcinomas de tireoide. *Revista HCPA.* 2009; 29: 51-59.
- Duarte M, Filho AL, Schmitt FC. "Angiogenesis, haemostasis and cancer: new paradigms and old concerns". *Bras Patol Med Lab.* 2007;43: 441-449.
- Urao N, Sudhakar V, Kim S-J, et al. Critical Role of Endothelial Hydrogen Peroxide in Post-Ischemic Neovascularization. *PLoS ONE.* 2013; 8:1-12.
- Łuczak K, Balcerzyk A, Soszyński M, Bartosz G. Low concentration of oxidant and nitric oxide donors stimulate proliferation of human endothelial cells *in vitro.* *Cell Biol Int.* 2004; 28:483-486.
- Polytarchou C, Papadimitriou E. "Antioxidants Inhibit Angiogenesis *In Vivo* through Down-regulation of nitric oxide synthase Expression and Activity. *Free Radic Res.* 2004; 38: 501-8.
- SILVA ECB. Avaliação Biológica de *Caesalpinia echinata* Lam. Usos e Riscos. [Dissertação de Mestrado]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 114p, 2006.
- Fukushima RS, 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.
- Oliveira LFC, Edwards HGM, Vellozo ES, Nesbitt M. Vibrational spectroscopic study of brazilin and brazilein, the main constituents of brazilwood from Brazil. *Vibrational Spectroscopy.* 2002; 28:143-249.

14. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 2006; 99: 91-203.
15. Silva RC. Plantas medicinais na saúde bucal. Vitória: Arigraf, 2001. 136p.
16. Xavier MN, Ramos INC., Xavier Filho L. A. Fitoterapia no Combate as Afeções Buciais, Editora Idéia, 1995.
17. Ramalho RS. "Pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.)". Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1978. 11p.
18. Freire MLLB. Avaliação da atividade antitumoral e antibacteriana do extrato etanólico da *Caesalpinia echinata* Lam [Monografia de Conclusão de Curso]". Recife: Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 25p, 2004.
19. [Internet] Souza R.T.D., et al. Caracterização da presença de ácido daniélico em extratos de ramos de pau-brasil com atividade fungitóxica. http://www.botanicasp.org.br/pau_brasil/resumos/29.htm.
20. Grangero A.R.S. Avaliação Biológica do potencial toxicológico e farmacológico das folhas de *Caesalpinia echinata* Lam. [Dissertação de Mestrado]". Recife: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, 42p., 2009.
21. Shen J, Zhang H, Lin H, Su H, Xing D, Du L. Brazilin protects the brain against focal cerebral ischemia reperfusion injury correlating to inflammatory response suppression". *European Journal of Pharmacology*. 2007; 558: 88-95.
22. Yen C-T, Nakagawa-Goto K., Hwang T.L, et al. Antitumor agents. 271: Total synthesis and evaluation of brazilin and analogs as anti-inflammatory and cytotoxic agents". *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010; 20: 1037-1039.
23. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958;181:1199-1200.
24. Marcocci L, Maguire JJ, Droy MT. The nitric oxide scavenging properties of *Ginkgo biloba* extract BCB 761. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; 15:748-755.
25. Fachine-Jamacarú FV, Fachine Júnior JU, Moraes Filho MO. Modelo de angiogênese inflamatória em córnea de coelho induzida pela cauterização alcalina pontual. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2005; 20: 64-73.
26. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39: 44-84.
27. Souza TM, Severi JA, Silva VYA., Santos E, Pietro RCLR. Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Styryliodesdendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 2007; 28: 221-226.
28. Barretos ALBS, Barretos ML, David JM, David JP, Queiroz LP. Atividade antioxidante de substâncias presentes em *Dioclea violacea* e *Erythroxylum rammularia*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2003; 13: 08-11.
29. Naik SR. Antioxidants and their role in biological functions: An overview. *Indian drugs*, 2003; 40: 501-516.
30. Roesler R, Malta L.G., Carrasco L.C., Holanda R.B., Sousa CAS, Pastore GM. Antioxidant activity of cerrado fruits. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2007; 27: 53-60.
31. Kumaran A., Karunakaran RJ. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT*. 2007; 40: 344-352.
32. Duarte-Almeida JM, Santos RJ, Genovese ML, Lajolo FM. Avaliação da atividade antioxidante utilizando o sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH $^{\cdot}$. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2006; 26: 446-452.
33. Rezende CM, Corrêa VPS, Costa AVM, Castro BCS., Alves RJV. Constituintes Químicos Voláteis das Flores e Folhas do Pau-Brasil (*Caesalpinia echinata*, Lam.). *Química Nova*. 2004; 27: 414-416.
34. Hu J, Yan X, Wang W, Wu H, Hua L, Du L. Antioxidant activity in vitro of three constituents from *Caesalpinia sappan* L. *Tsinghua Science and Technology*. 2008;13: 474-479.
35. Liang C.H., Chan L.P., Chou T.H., Chiang F.Y., Yen C.M., Chen P.J., Ding H.Y., Lin R.J. Brazilin from *Caesalpinia sappan* L. Antioxidant Inhibits Adipocyte Differentiation and Induces Apoptosis through Caspase-3 Activity and Anthelmintic Activities against *Hymenolepis nana* and *Anisakis simplex*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013; 2013: 2013.
36. Rosselli M, Keller PJ, Dubey RK. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Human Reproduction Update*. 1998; 4: 3-24.
37. Saravana PS, Renukadevi KP. Methods for Determination of Antioxidant Capacity, Total Flavonoids and Flavonoids in *Chenopodium resicardii* (CC-124). *J. Pharm. Res.* 2011; 4: 2384-2387.
38. Pacher P., Beckman JS, Liandet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease". *Physiol Rev*. 2007; 87: 315-424.
39. Dai X, Faber JE. Endothelial Nitric Oxide Synthase Deficiency Causes Collateral Vessel Rarefaction and Impairs Activation of a Cell Cycle Gene Network During Arteriogenesis. *Circul. Res*.2010;106: 1870-1881.
40. Bodgan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.* 2001; 2: 907-916.
41. Luiking YC., Poeze M, Ramsay G., Deutz NE. Reduced citrulline production in sepsis is related to diminished de novo arginine and nitric oxide production. *Am J Clin Nutr*. 2009; 89: 142-152.
42. Volpe MA, Carmeto JJ, Magna LA., Viaro F., Origuêla EAL, Evora PRB. Disfunção endotelial após isquemia global e reperfusão em cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea: estudo do papel do magnésio em artérias coronarianas caninas. *Rev Bras Cir Cardiotasc*. 2002; 17: 187-200.
43. Luiking YV., Deutz NEP. Isotopic investigation of nitric oxide metabolism in disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. 2003; 6: 103-108.
44. Jayakumar R., Kanthimathi MS. Inhibitory effects of fruit extracts on nitric oxide-induced proliferation in MCF-7 cells. *Food Chem.* 2011;126: 956-960.
45. Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, et al. Nitric Oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *J. Clin. Invest*. 1994; 94: 2036-2044.
46. Gallo O, Masini E, Morbidelli L, Franchi A, Fini-Storchi I, Vergari W.A., Ziche M. Role of Nitric Oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. *J. Natl Cancer Inst*. 1998; 90: 588-596.
47. Ziche M, Morbidelli L. Nitric Oxide and Angiogenesis. *J. Neuro-Oncology*. 2000; 50: 39-148.
48. Bennett LL, Rojas S, Seefeldt T. Role of Antioxidants in the Prevention of Cancer. *Journal of Experimental & Clinical Medicine*. 2012; 4: 215-222.
49. Holseth LJ. Nitric oxide as a target of complementary and alternative medicines to prevent and treat inflammation and cancer. *C. Lett.* 2008; 268:10-30.
50. Nussenbaum F, Herman IM. Tumor Angiogenesis: Insights and Innovations. *J. Onc.* 2010; 2010: 1-24.
51. Hoff PM., Machado KK. Role of angiogenesis in the pathogenesis of cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 2012; 38:825-833.
52. Quesada AR., Muñoz-Chápuli R, Medina MA. Anti-angiogenic drugs: from bench to clinical trials. *Medicinal Research Reviews*. 2006; 26: 483-530.