

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

**BIOENSAIOS DE *Abarema cochliocarpa* (GOMES) BARNEBY &
GRIMES (LEGUMINOSAE)**

RENATA PATRÍCIA FREITAS SOARES DE JESUS

RECIFE
2010

RENATA PATRÍCIA FREITAS SOARES DE JESUS

**BIOENSAIOS DE *Abarema cochliocarpa* (GOMES) BARNEBY &
GRIMES (LEGUMINOSAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, do Departamento de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Pernambuco, como um dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco.

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

Orientadora: Prof^a Dr^a. Ivone Antônia de Souza.

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio

Prof. Dr. Geraldo Bosco Lindoso Couto.

RECIFE
2010



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

Recife, 01 de julho de 2010.

Defesa de Tese de Doutorado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 01 de julho de 2010 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E PRIMEIRO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Ivone Antônia de Souza

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

Assinatura:

SEGUNDO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Haroudo Satiro Xavier

(Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE)

Assinatura:

TERCEIRO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Sebastião José de Melo

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

Assinatura:

PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Thompson Lopes de Oliveira

(Deptº. de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba/Laboratório de Micologia e Microbiologia da Universidade Federal da Paraíba - UFPB)

Assinatura:

SEGUNDO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Fálba Bernadete Ramos dos Anjos

(Deptº de Histologia e Embriologia da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Assinatura:

Jesus, Renata Patrícia Freitas Soares de
Bioensaios de *Abarema cochliocarpa* (Gomes)
Barneby & Grimes (Leguminosae) / Renata Patrícia
Freitas Soares de Jesus. – Recife : O Autor, 2010.
239 folhas; il., fig., tab., gráf.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2010.

Inclui bibliografia, apêndices e anexos.

1. Antimicrobianos. 2. *Abarema cochliocarpa*. 3.
Inflamação. 4. Antinociceptivo. 5. Carcinogênese.
I. Título.

615
615.1

CDU (2.ed.)
CDD (20.ed.)

UFPE
CCS2010-148

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DOUTORADO EM OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE PRODUTOS
NATURAIS E BIOATIVOS**

**AMARO HENRIQUE PESSOA LINS
REITOR**

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

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

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

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

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

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

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

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

**A minha mãe pelo amor incondicional....
A minha avó por tudo que me ensinou ser.....
Ao meu esposo que a cada dia faz os meus dias mais especiais.**

AGRADECIMENTOS

À DEUS, pelo dom da vida, por ter me acompanhado nos momentos mais difíceis iluminando todos os meus caminhos, me encorajando e me abençoando.

À minha amada mãe, Sueli, meu grande porto seguro... por suas histórias de sucesso na educação dos filhos, diante de todas as adversidades e que um dia sonhou e hoje compartilha este importante momento comigo.... Não há palavras para expressar todo meu amor e gratidão...

Meu agradecimento especial a minha amada Vovó Aurora. Seu amor, carinho e compreensão foram essenciais durante todos os anos de minha vida. Seu interesse e incentivo, mesmo sem compreender muito bem o que eu fazia e pelo amor dispensado a cada reencontro que tornam tudo mais doce.

Ao meu pai, Sérgio, por todo seu carinho e amor que me ajudaram a alcançar mais essa vitória.

Aos minha querida irmã Ana Lígia e ao meu cunhado Paulo que mesmo de tão longe sempre se tem feito presente em minha vida e principalmente por ter me presenteado com minha maravilhosa princesinha bolota, Ana Paula.

Ao meu irmão Bruno Leonardo e minha cunhada Andréa, por ter colocado no mundo os meus dois amores, Maria Luiza e Pedro Henrique. Amo vocês.

À minha irmã Theska que com seu jeito maluquinho de ser tem tornado nossos dias mais alegres

Ao meu amado esposo Cleômenes, que esteve ao meu lado em absolutamente todas as etapas desse trabalho, mesmo quando isso significava ausências... seu exemplo de tranquilidade e confiança de que tudo dá certo, além da visão diferenciada do que vale a pena, tornam cada dia especial... por toda nossas vidas....

A minha Orientadora, Prof^a. Dr^a. Ivone Antônia de Souza, pela confiança em mim dispensada, pela compreensão, amizade, atenção, otimismo, satisfação, paciência e incentivo durante a execução deste trabalho. Meu respeito e admiração pela sua serenidade, capacidade de análise do perfil de seus alunos, e pelo seu Dom no ensino da Ciência, inibindo sempre a vaidade em prol da simplicidade e eficiência.

Ao Prof. Haroudo Sátiro Xavier, pelo convívio, com seu maravilhoso senso de humor e exemplo de ser humano, me mostrou o “caminho das pedras” e pela ajuda, oportunidade de estar ao lado de alguém que transpira sabedoria, paciência e dedicação como ‘guia’ nos caminhos da Farmacognosia. Professor fascinante: sua ajuda foi muito valiosa para mim. **“Bons professores são mestres temporários, professores fascinantes são mestres inesquecíveis”**. Ao senhor, meu professor e amigo, minhas eternas “saudações polares”.

A Isla Vanessa pela ajuda, apoio, convivência, por compartilhar conhecimentos, e principalmente, pela sua amizade e pela ajuda incondicional, no apoio nas realizações dos experimentos. Por sua sincera amizade, pelo cuidado e zelo demonstrado durante essa longa caminhada. Sua amizade foi essencial para que eu chegasse ao fim deste trabalho. Essa vitória é nossa!! Obrigada por tudo. ***”Amigo é coisa para se guardar do lado esquerdo do peito, dentro do coração....”***

Aos amigos do Laboratório de Cancerologia Experimental Guilherme Rodrigues, Grace Kelly, Cibelle e Felipe que muito contribuíram para a realização desta obra, durante o desenvolvimento dos experimentos e pro não medirem esforços para me ajudar. A todos muito obrigado!

Aos amigos do Doutorado, Antônio e Gibson, pela amizade e apoio. Sentirei saudades dos nossos momentos no laboratório de Gnosia!

A mestranda Evelyn Mirella e ao graduando Fernando, mãos amigas chegadas no momento exato.

A Profa. Dra. Jane Sheila Higino pela colaboração nas formulações dos cremes para uso tópicos.

A Prof^ª. Dr^ª. Paloma Lys pela imensa colaboração com seus esclarecimentos sobre a patologia e pelas análises histopatológicas.

A Prof. Dr. Késia pela ajuda incomensurável nos teste microbiológicos.

A Prof. Dr. Socorro Vieira e a mestranda Maria Regina pelo apoio com os estudos da microbiologia oral.

Ao Prof. Dr. George pelas orientações durante as análises estatísticas.

Ao Funcionário do Biotério, Janilson, o “Hermanotheu”, por toda ajuda dispensada e por transformar nossos dias mais fáceis e alegres.

Ao corpo docente do Mestrado em Ciências Farmacêuticas da UFPE, pelos ensinamentos ao longo do curso.

As secretárias do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPE, Margarete Valdevino da Silva e Maria da Conceição Barros, pela paciência e ajuda.

A Universidade Federal de Pernambuco pela estrutura fundamental fornecida em todas as etapas da minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela cooperação financeira.

Agradeço a todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana “*in vitro*”, e “*in vivo*” o nível de toxicidade aguda, cicatrizante, antiinflamatória, analgésica e antitumoral do extrato etanólico de *Abarema cochliocarpa* (EEAc) (Gomes) Barneby & Grimes. A ação antimicrobiana do extrato foi realizada por método de difusão em meio sólido, através da técnica de poços e de disco, obtendo-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM) sobre os principais representantes presentes na cavidade oral e da pele. A toxicidade aguda foi estabelecida através do cálculo da Dose letal (DL₅₀) nas vias intraperitoneal (i.p.) e oral (v.o.) em camundongos (*Mus musculus*). A avaliação cicatrizante foi observada em feridas excisionais no dorso de ratos albinos Wistar (*Rattus norvegicus*), tratados com creme dermatológico com EEAç nas doses de 51,5 e 103 mg/kg comparado a outros dois grupos: placebo e dexpantenol a 5% (controle-positivo). Os animais foram sacrificados no 3º, 7º e 14º dia de tratamento. A atividade antiinflamatória foi verificada através do modelo de edema de pata induzido por carragenina (0,1% p/v) em ratos Wistar. Os grupos padrão e controle receberam indometacina (10 mg/kg-i.p.) e solução salina (0,9%-i.p.), respectivamente. Foi estudado também o efeito antinociceptivo do EEAç e de suas frações através dos modelos de contorções abdominais, teste da formalina, da placa quente e de imersão de cauda. A ação antinociceptiva do extrato também foi testada com o naloxone nos testes da placa quente e de imersão de cauda. Para a avaliação da atividade antineoplásica foram utilizadas as linhagens de Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich. Os resultados do estudo microbiológico demonstraram que o extrato possui atividade antimicrobiana sobre todos os microorganismos orais testados. Os testes toxicológicos evidenciaram toxicidade por i.p. (DL₅₀ = 257, 49 mg/kg) e atóxica para via oral. Através da análise histológica da pele do dorso dos animais, o creme dermatológico contribuiu na redução do infiltrado inflamatório de células polimorfonucleares, e com o aumento da fibroplasia entre o 3º e o 7º dia de tratamento, quando comparado ao placebo e ao dexpantenol a 5%. Os estudos mostraram que o EEAç possui atividade antinociceptiva periférica e no Sistema Nervoso Central (SNC). O EEAç apresentou ação antiinflamatória significativa no modelo de edema de pata induzido por carragenina. Os resultados demonstraram que o extrato e suas frações de saponinas e de taninos foram capazes de inibir o crescimento de tumores carcinomatosos e sarcomatosos. A avaliação histológica demonstrou que a administração do EEAç provocou discretas alterações no tecido pulmonar quando comparados com os animais dos grupos controle e padrão. O *screening* fitoquímico do EEAç apresentou testes positivos para saponinas, flavonóides e taninos. Conclui-se que o *A. cochliocarpa* apresenta atividade antimicrobiana, antiinflamatória e cicatrizante, analgésica e antitumoral sendo possivelmente uma expectativa para o desenvolvimento de produto fitoterápico para utilização humana.

Palavras-chave: Antimicrobianos. Cicatrização. Inflamação. Antinociceptivo. Carcinogênese, *Abarema cochliocarpa*.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity in vitro and in vivo the level of toxicity, wound healing, inflammatory, analgesic and antitumor ethanolic extract of *Abarema cochliocarpa* (EEAc) (Gomez) Barneby & Grimes. The antimicrobial action of the extract was performed by diffusion method in solid obtaining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) on strains in the oral cavity and skin. The acute toxicity was established by calculating the LD₅₀ by the method of Karber and Behrens (1964) in the intraperitoneal (ip) and oral (po) in mice (*Mus musculus*). The assessment of healing was observed in excisional wounds in the back of Wistar rats (*Rattus norvegicus*) treated with dermatological cream with EEA in doses of 51.5 and 103 mg / kg compared to two other groups: placebo and dexpanthenol 5% (control -positive). The animals were sacrificed 3, 7 and 14 days of treatment. The antiinflammatory activity was analyzed with a model of paw edema induced by carrageenan (0.1% w / v) in rats. The standard and control groups received indomethacin (10 mg/kg ip) and saline (0.9%, ip), respectively. We also studied the antinociceptive effect of EEA and its fractions using the models of writhing, formalin test, hot plate and tail immersion. The antinociceptive action of the extract was also tested with naloxone in tests of the hot plate and tail immersion. For the evaluation of anticancer activity were used strains of sarcoma 180 and Ehrlich carcinoma. The results of microbiological study showed that the extract has antimicrobial activity against all microorganisms tested orally. Toxicology tests showed high toxicity by i.p. (LD₅₀ = 257, 49 mg/kg) and nontoxic for oral administration. Through histological analysis of skin from the back of the animals, dermatological cream has helped in reducing the inflammatory infiltrate of polymorphonuclear cells, and with increased fibroplasia between the 3rd and 7th day of treatment compared to placebo and dexpanthenol 5%. Studies have shown that the EEA has antinociceptive activity in peripheral and central nervous system. The EEA showed significant anti-inflammatory action in the model of paw edema induced by carrageenin. The results showed that the extract was able to inhibit tumor growth carcinomatous and sarcomatous. Histological evaluation showed that the administration of EEA caused mild changes in lung tissue when compared with the control group animals and pattern. The phytochemical screening of the EEA had tested positive for saponins, flavonoids and tannins. We conclude that the *A.cochliocarpa* possibly present a expectation for developing herbal medicine antimicrobial, antiinflammatory and wound healing, analgesic and anti-tumor for human use.

Key words: Antimicrobial agents. Toxicology. Healing. Inflammation. Antinociceptive. Carcinogen.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura	Pág.
Figura 1 Gravura de <i>Abaro temo</i> (<i>Abarema cochliocarpa</i>) in Marcgrave, George & Willem Piso. 1648.....	41
Figura 2 Reprodução de <i>Abarema cochliocarpa</i> in Flora Brasiliensis.	42
Figura 3 Descrição Botânica de <i>A. cochliocarpa</i> (Flora Brasilienses)	43
Figura 4 <i>Abarema cochliocarpa</i> (Gomes) Barneby & Grimes.....	44
Figura 5 Folhas bipinadas de <i>Abarema cochliocarpa</i> (Gomes) Barneby & Grimes.....	44
Figura 6 Inflorescência branca ou amarelada de <i>Abarema cochliocarpa</i> (Gomes) Barneby & Grimes.....	45
Figura 7 Fruto tipo vagem de <i>Abarema cochliocarpa</i> (Gomes) Barneby & Grimes.....	45
Figura 8 Frutos com exposição de sementes, bicolor, de <i>Abarema cochliocarpa</i> (Gomes) Barneby & Grimes.....	46
Figura 9 Cascas do caule de <i>Abarema cochliocarpa</i> (Gomes) <i>Abarema cochliocarpa</i> (Gomes) Barneby & Grimes.....	47
Figura 10 Etapas do processo cicatricial de lesões cutâneas.....	55

Artigo II

Figura 1	Atividade antimicrobiana do extrato etanólico das cascas de <i>Abarema cochliocarpa</i> (Gomes) Barneby & Grimes sobre o crescimento de <i>Streptococcus mutans</i>	100
-----------------	---	-----

Artigo IV

Figura 1	Fotomicrografia no 3° dia de reação inflamatória (Grupo G1). Reação inflamatória intensa foi observada, com células mononucleares e polimerfonucleares. Tricômio de Masson: Obj 200x.....	132
-----------------	---	-----

Figura 2	Fotomicrografia da presença de escaras no 3° dia de reação inflamatória. A presença de escaras nas feridas foi de intensidade moderada no grupo G1 (#). Lâminas coradas com Tricômio de Masson A) 100x and B) 200x Objetivas, respectivamente.....	133
-----------------	--	-----

Figura 3	Fotomicrografias das feridas cutâneas. Tricômio de Masson: Obj 100x (em todas as imagens). A representa o grupo controle (G1). B representa o G4 tratado com creme do extrato etanólico de <i>A. cochliocarpa</i> na dose de 103 mg/kg. Cada grupo de animais (n = 6 ratos). Os asterísticos representam o tecido normal e a seta à área de injúria da pele.....	133
-----------------	--	-----

Figura 4	Fotomicrografia da presença de tecido de granulação e neovascularização, 7° dia do grupo G4. Animais tratados com creme do extrato etanólico de <i>A. cochliocarpa</i> nas doses de 103 mg/kg (grupo G4). Presença de fibras colágenas (azul) e	
-----------------	---	--

	proliferação capilar (áreas brancas), com aspecto de tecido de granulação. Tricômio de Masson: Obj 200x.....	134
Figura 5	Fotomicrografia da presença de fibrose no 14 ^o dia do grupo G2. Observam-se colágenos finos e fibras densas abaixo da nova epiderme (evolução da reepitelização). Lâminas com Tricômio de Masson: Obj 200x	134

Artigo V

Figura 3	Aspectos histológicos do fígado de animais implantados com Sarcoma 180 e tratados com Metrotexato (10 mg/kg) . Em A presença de vasos congestionados no fígado. Em B a presença de esteatose (setas). Coloração em H.E. Obj 400x.....	143
Figura 5	Fotomicrografia do pulmão e do carcinoma de camundongos tratados com EEAc. A) Pulmão: comprometimento do interstício pulmonar no septo (setas) com redução da luz de alguns alvéolos (a) presença de infiltrado linfocítico nos bronquíolos (b) e saco alveolar (s). B) Tumor com infiltração de músculos (m) e de gordura (g). Coloração em H.E. Obj 400X.....	145

Artigo VIII

Figura 1	Fotomicrografias dos pulmões dos animais dos grupos tratados com as frações de <i>A. cochliocarpa</i> . Nota-se o envolvimento do interstício pulmonar, com espessamento do septo e redução das luzes de alguns alvéolos no grupo tratado com saponina (A) e grupo tratado com proantocianidina (B) H.E: 10x. (C) Espessamento interalveolar septal e diminuição da luz de alguns alvéolos no grupo tratado com leucoantocianidina HE.: 40x	193
-----------------	---	-----

Figura 2 Fotomicrografias do fígado e pulmões dos grupos tratados com as frações de *A. cochliocarpa*. Nas figuras A e B observa-se a presença do infiltrado perivascular (setas), mais intensa no grupo tratado com saponina (A) em comparação com o grupo tratado com tanino (B). (C) O envolvimento intersticial pulmonar com espessamento do septo e da redução da luz de alguns alvéolos no grupo tratado com saponina (C) H.E: 40x..... 194

LISTA DE TABELAS

Pág.

Artigo II

Tabela 1	Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em meio sólido do extrato etanólico de <i>Abarema cochliocarpa</i> sobre microrganismos orais.....	101
Tabela 2	Informações sobre a concentração inibitória mínima (mg/mL) do extrato de <i>Abarema cochliocarpa</i> e do gluconato de clorexidina a 0,12%.....	102
Tabela 3	Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) do extrato etanólico de <i>Abarema cochliocarpa</i> e gluconato de clorexidina a 0,12% sobre microrganismos orais.....	103
Tabela 4	Extrato de Babatenon (mg/mL): Teste não-paramétrico de Kolmogorov-Smirnov do extrato de casca de Babatenon.....	103
Tabela 5	Gluconato de clorexidina a 0,12% (mg/mL): Teste não-paramétrico de Kolmogorov-Smirnov do gluconato de clorexidina a 0,12%.....	103
Tabela 6	Resultados do teste t-Student (CIM: extrato da casca de <i>Abarema cochliocarpa</i> versus clorexidina).....	104

Artigo III

Tabela 1	Atividade antimicrobiana de extrato etanólico bruto das cascas de <i>Abarema cochliocarpa</i> (Gomes) Barneby & Grimes produzidos a partir da planta seca (2.000 µg/disco).....	111
-----------------	---	-----

Tabela 2	Valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM) em µg/mL para os extratos brutos das cascas de <i>Abarema cochliocarpa</i> (Gomes) Barneby & Grimes frente aos microrganismos testes.....	112
-----------------	---	-----

Artigo IV

Tabela 1	Protocolo da análise das feridas cutâneas.....	132
-----------------	--	-----

Artigo VI.

Tabela 1	Efeito do EEAc e do naloxone em camundongos avaliados pelo teste da placa quente.....	167
-----------------	---	-----

Tabela 2	Efeito do EEAc e do naloxone avaliados pelo teste de imersão de cauda.....	168
-----------------	--	-----

Tabela 3	Efeito do EEAc avaliado através do teste de contorções abdominais em camundongos.....	168
-----------------	---	-----

Artigo VII

Tabela 1	Efeito da fração purificada de saponina em camundogos avaliados pelo teste da placa quente.....	184
-----------------	---	-----

Tabela 2	Efeito da fração purificada de saponina em camundogos avaliados pelo teste de imersão de cauda.....	184
-----------------	---	-----

Tabela 3	Efeito da fração purificada de saponina em camundogos avaliado através do teste de contorções abdominais.....	185
-----------------	---	-----

LISTA DE GRÁFICOS

Pág

Revisao da Literatura

Gráfico 1 Componentes da Família Leguminosae

Artigo I

Gráfico 1 Curva dose-resposta da toxicidade de *Abarema cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes..... 85

Artigo V

Gráfico 1 Efeito antiinflamatório do EEAc no teste de edema de pata induzido pela carragenina (n = 6, por grupos). O Edema foi induzido pela administração subcutânea de 0,1 mL da suspensão de carragenina a 1%. Doses de 10 mg/kg de Indometacina e de 27,5, 51.5 e 103 mg/kg do EE de *A. cochliocarpa* foram administradas intraperitonealmente. Os valores representam a média $\pm$ D.P. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significante..... 142

Gráfico 2 Percentagem (%) de inibição de crescimento do tumor ascítico Sarcoma-180 em camundongos tratados com EE de *A. cochliocarpa* (n = 6, por grupo). Doses de 2,5 mg/kg de Metrotexato e de 27,5, 51,5 e 103 mg/kg do EE de *A. cochliocarpa* foram administradas intraperitonealmente . Os valores representam a média $\pm$ D.P. * $p < 0,05$ foi considerado

estatisticamente significante..... 143

- Gráfico 4** Percentagem (%) de inibição de crescimento do tumor ascítico de Ehrlich em camundongos tratados com EE de *A. cochliocarpa* (n = 6, por grupo). Doses de 2,5 mg/kg de Metrotexato e de 27,5, 51,5 e 103 mg/kg do EE de *A. cochliocarpa* foram administradas intraperitonealmente. Os valores representam a média ± D.P. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significante..... 144

Artigo VI

- Gráfico 1** Efeito do extrato etanólico de *Abarema cochliocarpa* nas lambidas induzidas pelo teste de formalina em camundongos. Os resultados estão expressos em média ± D.P. em segundos (n = 06). (ANOVA seguido de teste de Newman-Keuls test):* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado com o grupo controle..... 169

Artigo VII

- Gráfico 1** Efeito da fração purificada de saponina obtida de *Abarema cochliocarpa* nas lambidas induzidas pelo teste de formalina em camundongos. Os resultados estão expressos em média ± D.P. em segundos (n = 06). (ANOVA seguido de teste de Newman-Keuls test):* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado com o grupo controle..... 185

Artigo VIII

- Gráfico 1** Percentagem (%) de inibição de crescimento do tumor ascítico Sarcoma-180 em camundongos tratados com frações obtidas de *A. cochliocarpa* (n = 6, por grupo). Doses de 2,5 mg/kg de

Metrotexato e de 5,2 mg/kg das frações de *A. cochliocarpa* foram administradas intraperitonealmente. Os valores representam a média $\pm$ D.P. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significante..... 193

Gráfico 2 Percentagem (%) de inibição de crescimento do tumor ascítico de Ehrlich em camundongos tratados com frações obtidas de *A. cochliocarpa* (n = 6, por grupo). Doses de 2,5 mg/kg de Metrotexato e de 5,2 mg/kg ds frações de *A. cochliocarpa* foram administradas intraperitonealmente. Os valores representam a média $\pm$ D.P. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significante..... 194

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs – antiinflamatórios não-esteroides

ANOVA - Análise de variância

°C – Graus Celsius

CEEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal

CFS – Fator estimulador de colônias

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CIMA – Concentração Inibitória Mínima de Aderência

CL₅₀ – Concentração letal que mata 50 % da população

COX - Cicloxigenase

D₁ – Dose mais elevada isenta de mortalidade

D₂ – Menor dose com 100% de óbito

DL₅₀ – Dose letal que mata 50% da população

DL₉₉ – dose letal máxima

EE - extrato etanólico

EEAc- extrato etanólico de *Abarema cochliocarpa*

e.p.m – Erro padrão da média

FGF- Fator de crescimento dos Fibroblastos

g – grama

HE – hematoxilina-eosina

IL-1 -Interleucina- 1

i.p.- Via intraperitoneal

IPA – Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária

K – receptor opióide kapa

kg- Quilograma

LTF – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica

M – receptor opióide

M1- subtipo do receptor opióide M

M2 – subtipo do receptor opióide M

MEC – Matriz extracelular

mg- Miligrama

mL- Mililitro

M.O – Microscópio óptico

NMDA - N-metil Daspartato

NO – Ácido nítrico

OMS- Organização Mundial de Saúde

PDGF – Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta

PMN – células polimorfonucleares

p/p – Peso por peso

p/v – Peso por volume

SNC – Sistema Nervoso Central

SNA- Sistema Nervoso Autônomo

SPPS – Statistical Package for Social Sciences

S-180 - Sarcoma 180

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

TGF- β – Fator de crescimento transformante-beta

V.O – Via Oral

μ - Receptor opióide mu

μ g – Micrograma

μ L – Microlitro

δ – receptor opióide delta

% - percentagem

Σ – Somatório

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	31
2	OBJETIVOS.....	36
	2.1 Objetivo Geral.....	36
	2.2 Objetivos específicos.....	36
3	REVISAO DA LITERATURA.....	39
	3.1 Estudos sobre <i>Abarema cochliocarpa</i> (Gomes) Barneby & Grimes.....	39
	3.1.1 Descriçao da espécie	43
	3.1.2 Perfil fitoquímico de <i>Pithecellobium</i>	48
	3.2 Toxicidade das Plantas Medicinais.....	51
	3.3 Cicatrização.....	52
	3.3.1. Processo de cicatrização cutânea.....	53
	3.3.1.1 Hemostasia e Fase inflamatória.....	54
	3.3.1.2 Fase proliferativa.....	57
	3.3.1.3 Fase de remodelamento.....	59
	3.4 Inflamação.....	60
	3.5 Dor e analgésicos opióides.....	62
	3.6 Câncer.....	65
	3.6.1 Sarcoma 180.....	68
	3.6.2 Tumor de Ehrlich.....	69

4 ARTIGO I: AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DA TOXICIDADE AGUDA DO EXTRATO DAS CASCAS DE *Abarema cochliocarpa* (GOMES) BARNEBY & GRIMES

RESUMO.....	70
ABSTRACT.....	71
INTRODUÇÃO.....	71
MATERIAL E MÉTODOS.....	72
MATERIAL BOTÂNICO E OBTENÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA.....	72
EXTRAÇÃO.....	73
CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO.....	73
TOXICIDADE AGUDA DO EXTRATO PILULAR E DETERMINAÇÃO DA DL ₅₀	73
TOXICIDADE EM <i>ARTEMIA SALINA</i> L.....	75
RESULTADOS.....	75
DISCUSSÃO.....	77
CONCLUSÕES.....	80
AGRADECIMENTOS.....	81
REFERÊNCIAS.....	81

5 ARTIGO II: AÇÃO ANTIBACTERIANA E ANTIADERENTE DE *Abarema cochliocarpa* (GOMES) BARNEBY & GRIMES SOBRE MICRORGANISMOS ORAIS

RESUMO.....	87
INTRODUÇÃO.....	87
MATERIAIS E MÉTODOS.....	88
MATERIAL BOTÂNICO E OBTENÇÃO DO EXTRATO.....	88

CEPAS BACTERIANAS.....	89
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DE <i>Abarema cochliocarpa</i>	89
DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE ADERÊNCIA.....	90
ANALISE ESTATÍSTICA.....	90
RESULTADOS.....	91
DISCUSSÃO.....	92
CONCLUSÃO.....	95
REFERÊNCIAS.....	95

6 ARTIGO III: ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE *Abarema cochliocarpa* (GOMES) BARNEBY & GRIMES, LEGUMINOSAE

RESUMO.....	105
ABSTRACT.....	105
INTRODUÇÃO.....	106
MATERIAIS E MÉTODOS.....	107
MATERIAL BOTÂNICO E OBTENÇÃO DO EXTRATO.....	107
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	107
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	109
CONCLUSÕES.....	113
REFERÊNCIAS.....	113

7 ARTIGO IV: AVALIAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Abarema cochliocarpa* (GOMES) BARNEBY & GRIMES NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM PELE DE RATOS

ABSTRACT.....	117
INTRODUCTION.....	118
MATERIAL AND METHODS.....	119
PLANT MATERIAL.....	119
PREPARATION OF THE EXTRACT.....	119
ANIMALS.....	119
ANIMAL PROTOCOL.....	120
HISTOLOGIC ANALYSIS.....	120
RESULTS.....	121
DISCUSSION.....	123
CONCLUSIONS.....	126
REFERENCES.....	126

8 ARTIGO V: *IN VIVO* STUDY OF THE ANTI-INFLAMMATORY AND ANTITUMORAL ACTIVITIES OF BARKS FROM *Abarema cochliocarpa* (LEGUMINOSAE)

ABSTRACT.....	135
INTRODUCTION.....	136
MATERIALS AND METHODS.....	137
PLANT MATERIAL AND EXTRACT.....	137
ANIMALS.....	138
<i>in vivo</i> ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY.....	138
CARRAGEENAN-INDUCED RAT PAW EDEMA.....	138
ANTITUMORAL ACTIVITIES.....	139
TUMOR CELLS.....	139
SARCOMA-180.....	139

EHRlich ASCITE CARCINOMA.....	139
TREATMENT.....	140
HISTOLOGIC ANALYSIS.....	140
STATISTICAL ANALYSIS.....	140
RESULTS.....	140
DISCUSSION.....	144
ACKNOWLEDGEMENTS.....	146
REFERENCES.....	146

**9 ARTIGO VI - CENTRAL ANTINOCICEPTIVE EFFECTS OF
ETHANOLIC EXTRACT FROM THE BARK OF *Abarema
cochliocarpa* ON MICE**

ABSTRACT.....	151
INTRODUCTION.....	152
MATERIAL AND METHODS.....	153
PLANT MATERIAL.....	153
PREPARATION OF THE EXTRACT.....	153
ANIMALS.....	154
DRUGS.....	154
HOT PLATE TEST.....	154
TAIL IMMERSION TEST.....	155
ACETIC ACID-INDUCED WRITHING	155
FORMALIN TEST	156
ANTAGONISM OF THE ANTINOCICEPTIVE EFFECTS OF Pc BY PRE-TRATMENT WITH NALOXONE.....	156
PHYTOCHEMICAL ANALYSIS.....	156

STATISTICAL ANALYSIS.....	157
RESULTS.....	157
DISCUSSION.....	158
CONCLUSION.....	160
ACKNOWLEDGEMENTS.....	160
REFERENCES.....	161

**10 ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY OF FRACTIONS SAPONINS
FROM *Abarema cochliocarpa* (GOMES) BARNEBY & GRIMES
MACBR BARKS**

ABSTRACT.....	170
INTRODUCTION.....	171
MATERIAL AND METHODS.....	171
PLANT MATERIAL.....	171
OBTAINING OF THE EXTRACT AND FRACTIONS.....	172
ANIMALS.....	172
DRUGS.....	173
HOT PLATE TEST.....	173
TAIL IMMERSION TEST.....	173
FORMALIN TEST.....	173
ACETIC ACID-INDUCED WRITHING.....	174
STATISTICAL ANALYSIS.....	174
RESULTS.....	174
DISCUSSION.....	175
CONCLUSIONS.....	177
ACKNOWLEDGEMENTS.....	178

REFERENCES.....	178
11 IN VIVO STUDY OF THE ANTITUMORAL ACTIVITIES OF PURIFIED FRACTIONS FROM THE STEM BARKS FROM <i>Abarema cochliocarpa</i> (LEGUMINOSAE).	
ABSTRACT.....	186
INTRODUCTION.....	187
.	
MATERIALS AND METHODS.....	188
PLANT MATERIAL.....	188
OBTATIONS OF THE EXTRACT AND FRACTIONS.....	188
ANIMALS.....	189
ANTITUMORAL ACTIVITIES.....	189
TUMOR CELLS.....	189
SARCOMA 180.....	190
EHRlich ASCITE CARCINOMA.....	190
TREATMENT.....	190
HISTOLOGIC ANALYSIS.....	191
STATISTICAL	191
ANALYSIS.....	
RESULTS.....	191
DISCUSSION.....	194
CONCLUSIONS.....	197
ACKNOWLEDGEMENT.....	197
REFERENCES	197

12	CONCLUSÕES.....	203
13	REFERÊNCIAS.....	206
	APÊNDICES.....	221
	ANEXOS.....	233

1 Introdução



1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma diversidade florística notável à qual se alia uma tradição secular da utilização de suas plantas como recurso medicamentoso. De fato, as plantas sempre tiveram presença marcante na vida dos brasileiros, antes mesmo de seu descobrimento, nosso país, em todos os seus rincões, abrigava inúmeras tribos indígenas conhecedoras profundas das propriedades dos vegetais que as rodeavam. Mantinham por elas um grande fascínio, pois delas advinha-lhes, em grande parte, sua sobrevivência. Representava o alimento, o medicamento, instrumentos para abrigo, indumentária e adorno, ferramentas para o transporte, a caça, a pesca, a defesa territorial e a guerra.

Nossos primeiros colonizadores, impressionados com o conhecimento dos gentios sobre os recursos oriundos dos vegetais foram certamente impulsionados a adquirir com os mesmos todas as informações possíveis, e por razões óbvias, principalmente aquelas pertinentes as suas propriedades medicamentosas e condimentares.

Em um dos primeiros testemunhos escritos, que retrata o Brasil quinhentista, Gabriel Soares de Souza¹ relata inúmeros componentes de nossa flora, veja-se como exemplo os dizeres do cronista sobre o óleo da cabureíba² e copaíba “Não se podiam arrumar em outra parte que melhor estivessem as árvores de virtude que após das que dão fruto; e seja a primeira a árvore do bálsamo, que se chama cabureíba, que são árvores mui grandes de que se fazem eixos para engenhos, cuja madeira é pardaça e incorruptível. Quando lavram esta madeira cheira a rua toda a bálsamo,e todas as vezes

¹ Gabriel Soares De Souza – Em Tratado Descritivo do Brasil em 1587, obra restaurada pelo historiador brasileiro Francisco Adolfo de Varnhagen. 9ª. Edição revisada/atualizada por Leonardo Dantas Silva. Fundação Joaquim Nabuco, Recife: Massangana, 2000.

² *Myrocarpus fastigiatus* Fr. Allem. Óleo de cabreúva, também conhecido como resina de cabureicica; *Copaifera officinalis* L. (cf. Dicionário de Botânica Brasileira, coordenado e redigido por Joaquim de Almeida Pinto. Rio de Janeiro, Typographia Esperança, 1873.)

que se queira cheira muito bem. Desta árvore se tira o bálsamo suavíssimo, dando-lhe piques até um certo lugar, de onde começa de chorar este suavíssimo licor na mesma hora, o qual se recolhe em algodões, que lhe metem nos golpes; e como estão bem molhados do bálsamo, os espremem numa prensa, onde tiram este licor, que é grosso e da cor do arroze, o qual é milagroso para curar feridas frescas, e para tirar os sinais delas no rosto(...) De tão santa árvore como a do bálsamo merece ser companheira e vizinha a que chamam copaíba, que é árvore grande cuja madeira não é muito dura, e tem a cor pardaça; e faz-se dela tabuado; a qual não dá fruto que se coma, mas um óleo santíssimo em virtude, o qual é da cor e clareza de azeite sem sal; e antes de se saber de sua virtude servia de noite nas candeias. Para se tirar este óleo das árvores lhes dão um talho com um machado acima do pé, até que lhe chegam à veia, e como lhe chegam corre este óleo em fio, e lança tanta quantidade cada árvore que há algumas que dão duas botijas cheias, que tem cada uma quatro canadas. Este óleo tem muito bom cheiro, e é excelente para curar feridas frescas, e as que levam pontos da primeira curam, soldam se as queimam com ele, e as estocadas ou feridas que não levam pontos se curam com ele, sem outras mezinhas; com o qual se cria a carne até encourar, e não deixa criar nenhuma corrupção nem matéria. Para frialdades, dores de barriga e pontadas de frio é este óleo santíssimo, e é tão sutil que se vai de todas as vasilhas, se não são vidradas; e algumas pessoas querem afirmar que até no vidro mingua; e quem se untar com este óleo há de se guardar do ar, porque é prejudicial.”

Em todas as regiões florísticas do mundo são bem diferenciados os níveis de conhecimentos sobre a biodiversidade. A região neotropical³ é a mais rica em espécies, e o Brasil aí inserido detém cerca de 20% do total de espécies botânicas do planeta. Das

³ Ecozona conhecida também como Neotrópico, compreende a América Central, incluindo a porção sul do México e da península da Baixa Califórnia, o sul da Florida, todas as ilhas do Caribe e a América do Sul.

25 famílias de angiospermas endêmicas dessa região, apenas 11 não estão representadas em nosso país⁴.

Tratando-se de país em desenvolvimento, muito precisa ser realizado visando conhecer os diferentes biomas existentes, sua diversificada flora, sua biologia, ecologia e distribuição geográfica da maioria das espécies botânicas que medram em seu território. Estudos redobrados são urgentes e necessários pois, embora constantes no tempo, as pesquisas envolvendo nossos vegetais lamentavelmente passam por mínimos e máximos, consoante muitas vezes aos programas governamentais em voga.

Presentemente assistimos um interesse em todos os níveis do Estado brasileiro, incluindo as secretarias de saúde municipais que se voltam à aplicação das práticas integrativas e complementares em saúde, fazendo ressurgir os conhecimentos da farmacobotânica, farmacoergasia, farmacologia e fitoterapia elementos para a inclusão de plantas medicinais no todo ou em parte assegurando sua autenticidade e eficácia, estimulando recursos que envolvem mecanismos naturais de prevenção de agravos e recuperação da saúde no desenvolvimento do viés terapêutico e na integração do ser humano com o meio ambiente e a sociedade.

Ao contrário do que se observava até duas décadas passadas, o momento atual cobra e a opinião oficial parece concordar de que a planta reputada como medicinal e seus extratos não devem ser empregados diretamente sem uma avaliação maior de seus constituintes incluindo isolamento, caracterização e ensaios necessários de bioatividade.

Neste contexto direcionamos nossa tese aprofundando estudos de bioatividade envolvendo *Abarema cochliocarpa* (Gomes) Barneby & J. W. Grimes, o “abaremotemo”

⁴ Smith, N., Mori, S.A., Henderson, A., Stevenson, D.W. & Heald, S.V. 2004. *Flowering plants of the Neotropics*. Princeton University Press, Princeton.

de antanho, vegetal com conotação medicinal e com forte endemicidade em sua ocorrência, buscando-se informações etnobotânicas e etnomedicinais em inúmeras obras florísticas, assim como pesquisando em bases de dados atuais, permitindo incorporar também informações fitoquímicas indispensáveis à esta eleição.

2 Objetivos



2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos toxicológicos e farmacológicos através das atividades antimicrobiana, antiinflamatória, cicatrizante, antinociceptiva e antitumoral do extrato bruto etanólico das cascas de *Abarema cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes (EEAc) Macbr e de suas frações isoladas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a toxicidade aguda com reações comportamentais do extrato etanólico de *A. cochliocarpa* (EEAc) frente a camundongos albino Swiss *Mus musculus* e determinar a DL₅₀ por via oral e intraperitoneal;
- Investigar os efeitos *in vitro* com atividade antimicrobiana do extrato do EEAç a partir do método de difusão em meio sólido através da técnica de poços e de disco sobre culturas bacterianas de *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivares*, *Streptococcus oralis* e *Lactobacillus casei* (referentes a microbiota bucal) e *Staphylococcus aureus*; *Bacillus subtilis*; *Enterococcus faecalis*; *Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Serratia marcescens*; *Mycobacterium smegmatis*, bem como do fungo *Candida albicans* (quanto a microbiota cutânea crânio-cérvico-facial).
- Verificar *in vitro* a ação antimicrobiana do EEAç através do método de difusão em meio sólido sobre culturas bacterianas de *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivares*, *Streptococcus oralis* e *Lactobacillus casei*;
- Avaliar a atividade cicatrizante do EEAç através do estudo comparativo entre os grupos controle e padrão;

- Averiguar os tipos histológicos de infiltrados celulares nos sítios cirúrgicos tratados e do reparo tecidual após o óbito dos animais;
- Realizar a triagem fitoquímica do EEAc e efetuar cromatografia em coluna do EEAc, visando o fracionamento de seus componentes majoritários (saponinas e taninos);
- Determinar a atividade antiinflamatória do EEAc através do ensaio de edema de pata induzido por carragenina;
- Avaliar a ação analgésica central do EEAc e de suas frações a partir de testes de contorções abdominais, formalina, placa quente e imersão de cauda;
- Determinar o efeito da administração do EEAc e de suas frações, quanto à inibição de neoplasias malignas (Carcinoma de Ehrlich e Sarcoma 180), em camundongos;
- Realizar o estudo histopatológico da ação do EEAc e de suas frações frente aos tumores Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich bem como dos órgãos (fígado, baço, rins e pulmão).

3 Revisão da Literatura



3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Estudo sobre *Abarema Cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes.

Abarema cochliocarpa (Gomes) Barneby & J. W. Grimes, é uma das 19.500 espécies que compõe Leguminosae Adans (=Fabaceae)⁵, esta, representando a terceira maior família de angiosperma⁶ com difusão nos múltiplos ecossistemas do mundo e chegando abrigar atualmente cerca de 730 gêneros (Lewis et al. 2005). A região neotropical tem demonstrado ser um significativo centro de endemismo dessa família, aonde 100 gêneros e 2.500 espécies vêm aí circunscritos, seus limites de distribuição (Lavin, 1994). Para o Brasil estima-se um total de 176 gêneros abrigando 3.200 espécies (Giulietti et al, 2005)⁷.

A. cochliocarpa está inserida na subfamília Mimosoideae, a qual juntamente com Caesalpinioideae, e Papilionoideae (=Faboidea) vem sendo consideradas subordinadas a Leguminosae. De fato, análises filogenéticas têm demonstrado que esta família é monofilética (Wojciechowski 2003, Wojciechowski et al. 2004, Lewis et al. 2005) e, com base nestas evidências, esta é a posição sistemática que tem prevalecido (Lewis & Schrire 2003)⁸. O monofiletismo de Leguminosae foi confirmado por Chappill (1995) e Doyle et al. (2000), possuindo como sinapomorfias folhas compostas, alternas, com pulvinos; presença de uma pétala adaxial diferenciada; ovário monocarpelar, placentação marginal e fruto tipo legume. Dados indicativos sobre o número de componentes de Leguminosae e as subfamílias correspondentes acham-se disponibilizados em gráfico construído a partir de informações contidas em Polhill & Raven 1981; Lewis et al. 2005 (cf. gráfico 1).

⁵ O nome Leguminosae, alternativo à Fabaceae, sugerido por Lewis & Schrire (2003), foi adotado pelo Código Internacional de Nomenclatura Botânica - Código de Viena (McNeill et al. 2006) ressaltaram aqueles autores a ambiguidade existente empregando-se Fabaceae para sinonimizar Papilionoideae.

⁶ Superada apenas por Asteraceae e Orchidaceae (Lewis, G.P; Schrire, B.; Mackinder, B; Lock, M. 2005. *Legumes of the world*. Royal Botanic Gardens, Kew. 577pp.

⁷ Estes números mostram uma evolução no conhecimento de Leguminosae no Brasil, pois há duas décadas eram 178 gêneros e 1550 espécies (Barroso, 1984), passando há uma década para 188 gêneros e 2800 espécies (Lima, 2000) e 200 gêneros e 1500 espécies (Souza, V. C.; Lorenzi, H. 2005. *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p 291-328.)

⁸ Em concepção anterior eram tratadas na ordem Fabales, como famílias independentes: Caesalpinaceae, Fabaceae e Mimosaceae (Hutchinson, 1964. *The genera of flowering plants*. v.1 Oxford: Claredon Press; Cronquist A. 1988. *The evolution and classification of flowering plants*. Kansas: Allen Press.

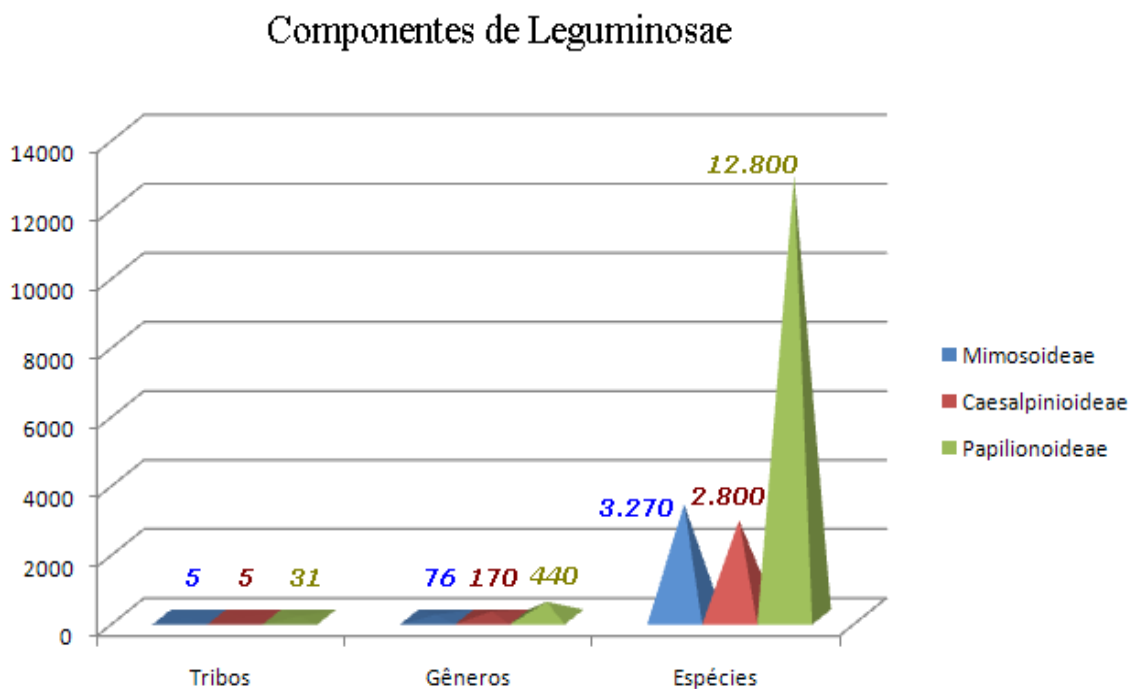


Gráfico 1 – Componentes da família Leguminosae

Abarema cochliocarpa (cf. figura 1 e 2) é uma espécie nativa do Brasil e endêmica da mata atlântica. Pode ser encontrada nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Espírito Santo, Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo. Ocorre em floresta pluvial densa, floresta estacional semidecidual, restinga, cerrado ou campos rupestres, em altitudes de até 1100 m⁹. Apresenta ampla distribuição geográfica e abrange praticamente toda a porção oriental do Brasil (IGANCI; MORIM, 2009).

Tem como sinonímia científica *Mimosa cochliacarpus* Gomes; *Inga cochlocarpus* (Gomes) Martius; *Feuilleea cochlocarpa* (Gomes) Kuntze; *Pithecolobium cochliocarpum* (Gomes) Macbride; *Inga nandinaefolia* DC; *Mimosa vaga* Vell.; *Pithecolobium auaremotemo* Martius; Vulgarmente é conhecida como barbatimão, bordão de velho e ingá negro (IGANCI; MORIM, 2009).

⁹ A fragmentação das áreas de ocorrência predispõe esta espécie à vulnerabilidade de extinção, como assinalado pela International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUNC), 2010.1, disponível em <http://www.redlist.org>. Acesso em 13/06/2010.



Figura 1-Gravura de *Abaro temo* (*Abarema cochliocarpa*) in Marcgrave, George & Willem Piso. 1648.



Figura 2 –Reprodução de *Abarema cocliocarpa* in *Flora Brasiliensis*.

3.1.1 Descrição da espécie

7. PITHECOLOBIUM AVAREMOTEMO MART. glabrum v. minute glanduloso-puberulum; pinnis 2—3- v. rarius 4-jugis, foliolis 2—4-jugis ovatis v. obovatis rhombeisve basi acutis concoloribus; pedunculis axillaribus, floribus in capitulo sessilibus, corolla calycem subtriplo excedente, staminum tubo incluso; legumine circinato, valvis coriaceis demum contortis.

Tabula nostra CXIII.

Inga nandinaefolia DC. Prodr. II. 440.

Mimosa vaga Vell. Fl. Flum. Ic. XI. t. 13.

Pithecolobium Avaremotemo Mart. Herb. Fl. Bras. 115.

Mimosa cochliocarpa Gomez Obs. Pl. Bras. 30? v. 24?
t. 4. §. 3.

Inga cochlocarpus Mart. Reise I. 549.

Avaremotemo Brasiliensium.

ARBOR 30—40-pedalis ramosissima, cortice rugoso. RAMULI juniores leviter angulati, uti petioli pilis brevissimis glanduliferis leviter puberuli, mox glabrati. STIPULAE ad tuberculum brevem acutum reductae v. omnino deficientes. FOLIA et inflorescentia siccitate nigricantia. PETIOLUS communis uti rhachis pinnarum 1—2-pollicaris, rarius longior. GLANDULAE parum conspicuae inter pinnae jugorum omnium et interdum inter foliola suprema. FOLIOLA 1—2 poll. longa, variant ovata obovata v. rhombea, obtusa acuta v. saepius acuminata, basi cuneata v. rarius rotundata, e costa subcentrali pennivenia. PEDUNCULI in axillis 2—3-ni, bipollicares v. paullo longiores, glabri. BRACTEAE minutae. FLORES interdum 4-meri, saepius tamen more generis 5-meri, glabri, albivirentes, demum flavescentes. CALYX 1 lin. longus. COROLLA 3-lin. STAMINA alba, corolla vix triplo longiora, tubo corolla breviora. LEGUMEN sessile, gyro saepe duplici interdum 3-plici circinatum, 1½ poll. diametro, planum, coriaceum, marginibus leviter incrassatis, valvis intus rubentibus post anthesin valde contortis.

Habitat in silvis per magnam plagam Brasiliae tropicae. E. gr. in provincia Rio de Janeiro frequens: Martius, Lhotsky, Pohl, Sello, Lusch-nath, Weddell, Burchell n. 944, Glaziou n. 1566; in deserto provinciae Bahiensis et in mediterraneis provinciarum Pernambucensis et Cearensis: Martius.

Figura 3- Descrição Botânica de *A. cochliocarpa* (Flora Brasilienses)

A. cochliocarpa consoante as condições edafoclimáticas em que medra, normalmente apresenta um porte arbóreo com altura de aproximadamente 30 m em floresta ombrófila densa ou estacional semidecídua, mostrando-se mais para arvoreta retorcida (4 m) ou arbusto (1 m) em solo árido, pouco profundo ou pedregoso (Figura 4). Apresenta indumento ferrugíneo nos ramos pubescentes e esparso-pulverulentos, com muitas lenticelas (LEWIS,1987; IGANCI & MORIM 2009).



Figura 4. *Abarema cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes.
Fonte: JESUS, 2009.

Possui folhas com (2) 3 (4) pares de pinas (Figura 5); raque pubescente, com pecíolo de 1–4 cm, canaliculada; pecíolo 1 – 4 cm, canaliculado, pubescente, ferrugíneo; pinas com (2) 3 – 4 pares de foliólulos; foliólulos 2 – 7 x 1 – 4 cm, membranáceos, de lanceolados a obovados, ápice acuminado, faces abaxial e adaxial glabras. Coflorescências homomórficas, racemos capitados; raque 0,1 – 0,2 cm, pubescente, ferrugínea; pedúnculo 3,5 – 10,5 cm. Bractéolas lanceoladas, ca. 1 mm, pubescentes.



Figura 5. Folhas bipinadas de *Abarema cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes (2X)
Fonte: JESUS, 2009.

Suas flores são subsésseis a pediceladas com cálice medindo $2-3 \times 1-2$ mm com margem ciliada e corola de $5-6 \times 1-2$ mm (Figura 6) (IGANCI & MORIM 2009).



Figura 6. Inflorescência branca ou amarelada de *Abarema cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes (Aumento 2X). Fonte: JESUS, 2009.

O Fruto, vagem com valvas espiraladas (Figura 7) onde as sementes, geralmente em número de 8–13, medem em média 8 x 6 mm e se apresentam bicolor e de formas globosas a lentiformes dispostas em várias fileiras (Figura 8) (IGANCI & MORIM 2009).



Figura 7. Fruto tipo vagem de *Abarema cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes (Reduzido 2X).
Fonte: JESUS, 2009.



Figura 8. Fruto com exposição de sementes, bicolor, de *Abarema cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes
Fonte: JESUS, 2009.

Em floresta pluvial densa e em floresta estacional semidecidual, ocorre como árvore de grande porte (até 30 metros). Em regiões mais áridas, com solo raso e

pedregoso ocorre como um arbusto retorcido (1–4 m alt.) e com folhas diminutas. É facilmente reconhecida, no entanto, por apresentar indumento ferrugíneo pulverulento nos ramos e no epicarpo, semelhante ao encontrado no gênero *Stryphnodendron* Mart. O desenho formado pela coloração diferenciada na testa da semente é peculiar a *P. cochliocarpum* e divide a semente com uma linha mediana, acompanhando o pleurograma mediano-basal. A presença de lenticelas nos ramos também é um caráter exclusivo para esta espécie. (IGANCI; MORIM, 2009).

O *screening* fitoquímico realizado com os extratos hidroalcoólico das cascas e das folhas de *A. cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes, foram positivos para saponinas, flavonóides e taninos, entretanto a presença de alcalóides foi muito discreta (SARMENTO, 1999).

A. cochliocarpa (Gomes) Barneby & Grimes pode ser utilizado internamente como antiinflamatório, para esse efeito, as cascas são preparadas na forma de infuso, tintura, decocto, vinhos e garrafadas (OLIVEIRA; SILVA, 1994).



Figura 9. Casca do caule de *Abarema cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes.
Fonte: JESUS, 2009.

Pereira et al., (2005) relatam que as cascas do caule dessa espécie são usadas medicinalmente no tratamento de lesões na pele, cuja forma de preparo é através do pó, maceração ou cozimento e são utilizadas na formas tópica, oral ou banho. Em

combinação com *Anacardium occidentale* L., *Schinus terebinthifolius* Raddi, *P. cochliocarpum* é utilizada pela população no tratamento de afecções dermatológicas como cicatrizante e antiinflamatório.

Em estudo etnobotânico Silva e Andrade (2005) determinou as relações entre comunidades e vegetação na Zona da Mata de Pernambuco enquadrando as plantas nas categorias de uso alimentação, comércio, construção, mágico, medicinal, tecnológico e outros. Segundo os autores, o *A. occidentale* (caju-roxo), *P. cochliocarpum* (barbatenon) e *S. terebinthifolius* (aroeira), foram às plantas medicinais mais citadas por essa população como de atividade antiinflamatória e cicatrizante.

De acordo com Oliveira (2006) o extrato etanólico da casca do caule de *P. cochliocarpum* causou inibição do crescimento de *S.epidermides* e *C. albicans* na concentração de 5.000 µg/mL; porém não apresentou atividades sobre bactérias Gram-negativas, como *P. aeruginosa* e *E. coli*.

Trabalhos feitos por Sarmento (1999) com a partição clorofórmica do extrato hidroalcoólico e butanólico da casca de *P. cochliocarpum*, resultou numa potente atividade sobre *S. aureus*.

Lima (2007) analisou a atividade antiinflamatória do extrato bruto etanólico das cascas do caule de *P. cochliocarpum* quando administrados por via intraperitoneal, porém essa atividade não apresentou resultados significativos.

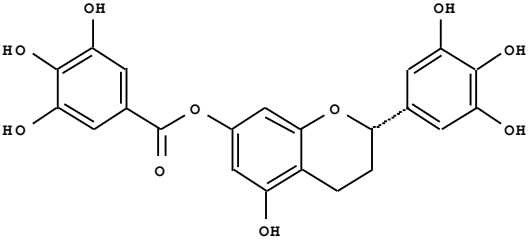
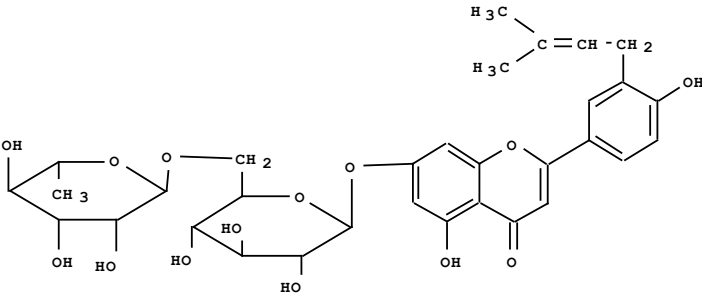
3.1.2 Perfil fitoquímico do gênero *Abarema*

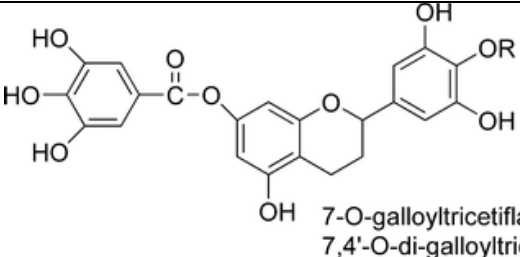
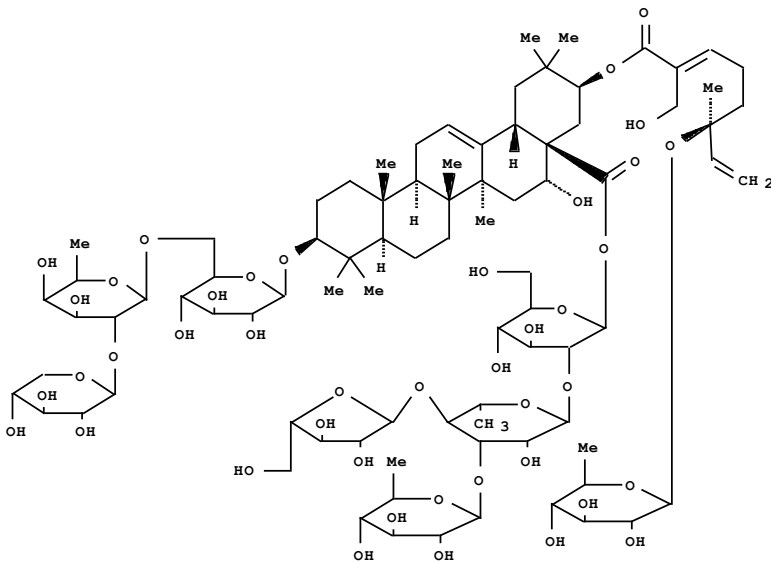
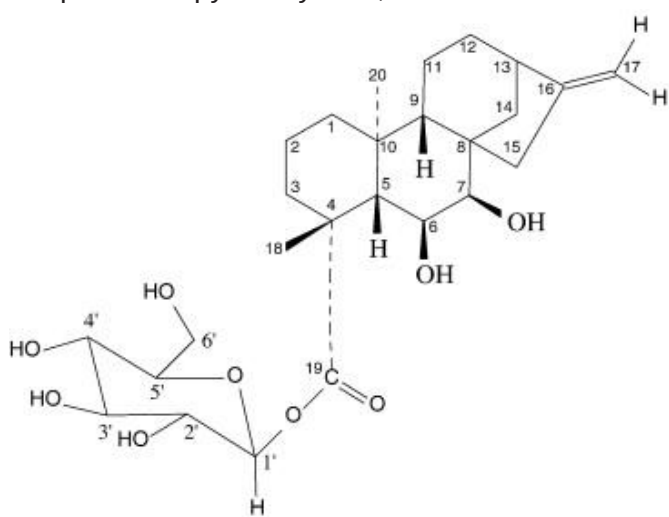
A. Cochliocarpa não foi alvo de pesquisas fitoquímicas mais aprofundadas, constatando apenas de abordagens superficiais para a definição de grupos de metabólitos secundários. Mesmo assim, com protocolos por via úmida (reações em tubos de ensaio), que deixam muito a desejar, principalmente quando se trata de análise de extratos vegetais estes em geral coloridos por natureza.

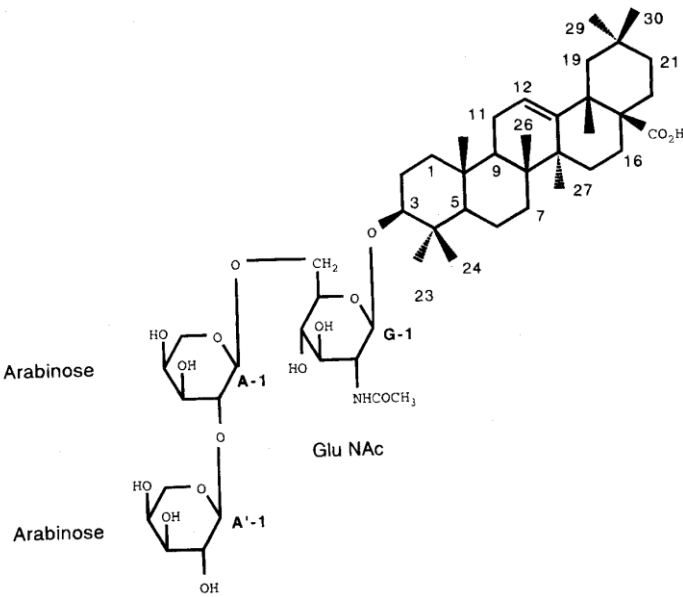
Consultando algumas bases de dados (Science Finder Scholar, Napralert, Google, etc.) consta-se a existência de algumas pesquisas já efetuadas envolvendo outros representantes de *Abarema* onde se expressa no quadro 1 algumas substâncias definidas abrangendo principalmente flavonóides, saponósidos e proantocianidinas (condensadas e leucoantocianidinas).

Em prospecção que efetuamos constatou-se que as cascas do caule de *A. cochliacarpa*, possui, predominantemente proantocianidinas condensadas, leucoantocianidinas, saponósidos e flavonóides (raros), um padrão que parece predominar nos demais membros do gênero *Abarema* (cf. apêndice).

Quadro 1 – Constituintes químicos isolados do gênero *Abarema*

Espécie vegetal	Compostos	Referências
<i>Pithecellobium clypearia</i>	(-)-5,3',4',5'-tetrahidroxilflavan-7-gallato 	Bao et al., 2009.
<i>Pithecellobium dulce</i>	 3'-Prenilapigeine 7-O-rutinósido	Saxena; Singhal; Madhuri, 1999.

<i>Pithecellobium clypearia</i>	 7-O-galloyltricitiflavan (1): R= H 7,4'-O-di-galloyltricitiflavan (2): R=COOC₆H₄	Li et al., 2006.
<i>Pithecellobium lucidum</i>		Ma et al., 2008.
<i>Pithecellobium albicans</i>	19-β-D-Glucopyranosyl 6,7-dihidroxi kaurenoato (1). 	Gonzalo et al., 2008.

<i>Pithecellobium racemosum</i>	 3-O[α-L-arabinopiranosil (1 - 2)][α-L arabinopiranosil (1 - 6)]2-acetoamido-2-desoxi-β-D-glico-pyranosil ácido oleanólico	Khan; Clark; McChesney, 1997.
---------------------------------	--	-------------------------------

3.2 Toxicidade das Plantas Medicinais

Para Turolla, Nascimento (2006), as plantas medicinais apresentam substâncias que podem desencadear reações adversas, seja de seus próprios componentes, seja pela presença de contaminantes, ou até mesmo, resultado das preparações caseiras duvidosas e também os adulterantes contidos em fitoterápicos já comercializados. No entanto, os efeitos adversos dos agentes fitoterápicos são menos freqüentes quando comparados com as drogas sintéticas (CALIXTO, 2000).

As pesquisas realizadas para a avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos ainda são incipientes, assim como o controle da comercialização, pelos órgãos oficiais, nas feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais (VEIGA-JUNIOR et al., 2005).

A toxicidade aguda é um estudo conduzido antes que os ensaios farmacológicos sejam iniciados, e representa uma avaliação estimativa e preliminar das propriedades

tóxicas de um fitoterápico, fornecendo informações acerca dos riscos sobre a saúde, resultantes de uma exposição de curta duração pela via selecionada (DI STASI, 1996).

Com o objetivo de determinar a sintomatologia em curto prazo após a administração de um composto, bem como o binômio dose-efeito letal, estimou-se um parâmetro denominado dose letal 50%, mais conhecida como DL_{50} (BARROS; DAVINO, 2003).

3.3 Cicatrização

Ferida é a separação dos tecidos do corpo ou qualquer lesão tecidual, seja epitelial, mucosas ou nos órgãos, com prejuízo de suas funções básicas. Elas podem ser produzidas por fatores extrínsecos como a incisão cirúrgica, lesões acidentais, corte e trauma, ou por fatores intrínsecos, como aquelas produzidas por infecção, e as úlceras crônicas, causadas por alterações vasculares, defeitos metabólicos ou neoplasias (WENDT, 2005).

A cicatrização de feridas consiste em uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a reconstituição do tecido. Tal evento é um processo dinâmico que envolve fenômenos bioquímicos e fisiológicos de forma sequencial, a fim de garantir a restauração tissular (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

Quando de origem cutânea, a cicatrização é mais complexa, pois envolve inflamação, reepitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de matriz intersticial, eventos realizados por grande número de diferentes tipos de células, como queratinócitos, fibroblastos, células inflamatórias e endoteliais, influências célula a célula, interação entre células, matriz intersticial e fatores de crescimento, de modo a reparar os tecidos danificados (TENIUS; BIONDO-SIMÕES; IOSHII, 2007).

Este processo pode ser dividido em cinco fases principais, que são: coagulação, inflamação, proliferação, contração da ferida e remodelação (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

De um modo geral, este se deve a um mecanismo competitivo entre a síntese e a lise de colágeno. Inflamação e infecção são as causas mais importantes de lise excessiva de colágeno, alterando o equilíbrio mencionado e impedindo a união das bordas das feridas (WENDT, 2005). A reação inflamatória será nociva se for intensa, pois assim compromete a microcirculação e a proliferação de fibroblastos na região da ferida (BRITO FILHO et al., 2006).

As grandes mudanças ocorridas nas últimas décadas nos conceitos referentes à cicatrização têm mobilizado as indústrias a desenvolver e colocar no mercado produtos cada vez mais específicos que sejam eficazes e adequados a cada tipo de ferida, em termos de custo/benefício (WENDT, 2005).

3.3.1 PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA

O processo envolve uma complexa seqüência de eventos celulares e bioquímicos com o objetivo de restaurar a integridade tecidual após o trauma. Existe uma diferença entre regeneração tecidual e cicatrização. A primeira envolve a reconstituição dos componentes teciduais de forma idêntica aqueles destruídos enquanto que a última é uma resposta fibroproliferativa, na qual os anexos epidérmicos não se regeneram e mantém uma cicatriz de tecido conjuntivo em lugar da rede mecanicamente eficiente de colágeno na derme não ferida. Porém, em feridas muito superficiais, o epitélio é reconstituído e pode haver pouca formação de cicatrização (SCHIRATO et al., 2006).

A cicatrização constitui resposta imediata, dinâmica e interativa do organismo a lesão tecidual, com o objetivo de restaurar a continuidade anatômica e funcional do tecido (BARBUL, 1990; THORNTON; SCHAFFER; BARBUL, 1997). Sob o ponto de vista histológico, pode ser definido como a substituição do tecido lesado por tecido conjuntivo

fibroso no qual formará uma cicatriz, restaurando a estrutura e preservando a função do tecido normal (DIEGELMANN, 1997). Consiste em processo que envolve células inflamatórias e do parênquima lesado, complexa cadeia de mediadores solúveis, bem como a matriz extracelular (GILLITZER; GOEBELER, 2001; EFRON, 2001).

As lesões cutâneas normalmente cicatrizam de uma maneira ordenada e eficiente, sendo classificadas nas seguintes fases: hemostasia, inflamatória, proliferativa ou de granulação e de remodelação da matriz extracelular ou maturação (Figura 8) (SINGER; CLARCK, 1999; KUROKAWA et al., 2006)

3.3.1.1 Hemostasia e Fase inflamatória

O primeiro evento da cicatrização é o controle da hemorragia na área lesionada ou hemostasia, uma vez que a lesão tecidual causa rompimento dos vasos sanguíneos com a conseqüente liberação dos seus constituintes, ainda que este sangramento não seja observado macroscopicamente no leito da lesão (CLARCK et al., 1998).

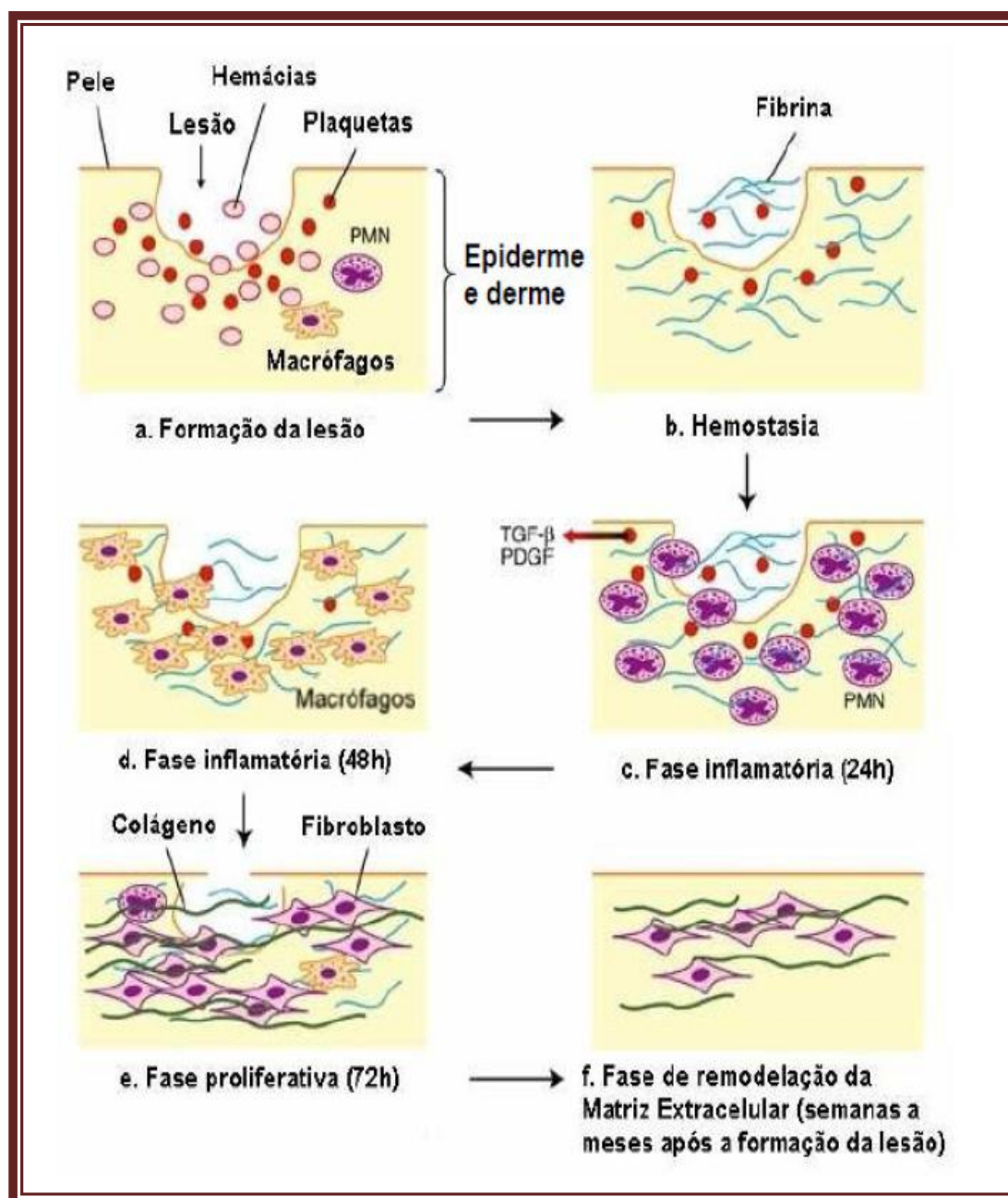


Figura 10: Etapas do processo cicatricial de lesões cutâneas. PMN- neutrófilos polimorfonucleares, PDGF- Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta e TGF- β - Fator de Crescimento Transformante-beta.

Fonte: Experts Reviews in Molecular Medicine, 2003. Cambridge University Press

A própria lesão endotelial ativa as plaquetas que iniciam a formação de um tampão plaquetário, o qual é o processo hemostático inicial que pára o sangramento. Estas células são as primeiras a se apresentarem no sítio da lesão, pois secretam vários mediadores envolvidos na cicatrização. Em paralelo, a cascata de coagulação é iniciada, contribuindo para a conversão do fibrinogênio em uma rede de fibras de fibrina insolúveis

(SANTORO; GAUDINO, 2005), fornecendo dessa maneira uma matriz extracelular (MEC) provisória para migração celular (DIEGELMANN; EVANS, 2004).

As plaquetas além de facilitarem a formação do tampão plaquetário, secretam fatores de crescimento e citocinas, dentre os quais, os mais importantes são o Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta (PDGF) e o fator de crescimento Transformante-beta ($\text{TGF-}\beta$). O PDGF inicia a quimiotaxia dos neutrófilos, macrófagos, células musculares lisas e dos fibroblastos e, além disso, estimula a mitogênese dos fibroblastos e das células musculares lisas. Já o $\text{TGF-}\beta$, além de atrair macrófagos, também estimula os mesmos a secretarem citocinas adicionais como FGF (fator de crescimento dos Fibroblastos), IL-1 (Interleucina- 1) e o próprio PDGF (DIEGELMANN; EVANS, 2004). O $\text{TGF-}\beta 1$, $\text{TGF-}\beta 2$ e $\text{TGF-}\beta 3$ promovem forte estímulo na migração de fibroblastos e células endoteliais, bem como, na deposição da MEC pelos fibroblastos durante a formação do tecido de granulação (LI, CHEN; KIRSNER, 2007).

À medida que a hemostasia vai-se concluindo, a resposta inflamatória é iniciada (TSIROGIANNI et al., 2006) e clinicamente observam-se alguns sinais típicos da inflamação tais como, edema, hiperemia, calor e dor (DIEGELMANN; EVANS, 2004). No universo microscópico, os neutrófilos são os primeiros tipos celulares sanguíneos a se apresentarem na área da lesão, poucos minutos após a sua formação, devido à quimiotaxia por mediadores liberados pelas plaquetas (especialmente o PDGF e o $\text{TGF-}\beta$), células pertencentes ao sistema imune (principalmente os macrófagos), microorganismos ou ainda devido à ativação do sistema complemento (TSIROGIANNI et al., 2006).

Nas primeiras 24 horas, os neutrófilos constituem as células predominantes na ferida. Eles caracterizam a primeira linha de defesa celular, eliminando partículas estranhas e destruindo microorganismos por fagocitose e pela liberação de enzimas. Segundo Werner & Grose (2003) além de sua função fagocitária, os neutrófilos possuem ação pró-inflamatória devido à liberação de citocinas que ativam os fibroblastos e as células epiteliais (queratinócitos). Posteriormente, o número de neutrófilos diminui e o de monócitos e macrófagos predomina (LI CHEN; KIRSNER, 2007).

Caso a ferida não esteja severamente infectada, em poucos dias o número de neutrófilos diminui devido à fagocitose realizada pelos macrófagos. Desta maneira, depois de um ou dois dias, monócitos teciduais infiltram-se no local da lesão e diferenciam-se em macrófagos que participam e concluem o processo inflamatório, realizando um debridamento no local da injúria, processo esse facilitado pela fagocitose e pela produção de enzimas como a collagenase e elastase (SZPADERSKA; DIPIETRO, 2005). Assim, a presença dos macrófagos o local da injúria indica que a fase inflamatória está aproximando-se do seu fim e conseqüentemente a fase proliferativa esta sendo iniciada (DIEGELMANN; EVANS, 2004).

2.1.2 Fase proliferativa

O surgimento do tecido de granulação, a reepitelização e a contração da ferida ocorrem durante a fase proliferativa, os quais desempenham papéis importantes na cicatrização normal (REGAN; BARBUL, 1994).

O tecido de granulação inicia o preenchimento no local da lesão 2 ou 3 dias depois da sua formação, onde esse tecido nada mais é do que o próprio tecido conjuntivo, o qual recebe essa denominação devido a sua aparência granular, a qual apresenta inúmeros capilares (WERNER; GROSE, 2003).

O tecido granular é composto pelas células endoteliais, fibroblastos, macrófagos, linfócitos e pela nova MEC. Nessa fase, os macrófagos liberam PDGF, TGF- β e o TGF, que estimulam a proliferação e migração dos fibroblastos para o local da lesão, sendo estes fibroblastos as células predominantes nessa fase de reparação tecidual, atingindo o pico de proliferação no 7º dia pós-trauma (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

Uma vez ativados, os fibroblastos sofrem alterações fenotípicas e iniciam a síntese e secreção de componentes da MEC, como os glicosaminoglicanos, proteoglicanos e as fibras colágenas do tipo I e III, associadas à proliferação e ao crescimento interno dos capilares (angiogênese ou neovascularização da ferida) (TSIROGIANNI et al., 2006). Alguns fibroblastos adquirem características fenotípicas de

miofibroblastos e participam do processo de contração cicatricial (WELCH; ODLAND; CLARK, 1990). A fibronectina, uma importante glicoproteína desta matriz, exerce função de estímulo e suporte para os fibroblastos e para o colágeno produzido, mediando também o fenômeno de contração (PEARLSTEIN, 1976).

A angiogênese refere-se à formação de novos vasos sanguíneos, a fim de prover nutrientes e oxigênio ao tecido cicatricial, além de permitir a migração de células inflamatórias para a ferida. Em resposta a lesão inicial, as células endoteliais da microcirculação iniciam o processo angiogênico, que consiste na ativação destas células, degradação da sua membrana basal, proliferação celular, formação da estrutura capilar tubular e reconstituição da membrana basal (SINGER; CLARK, 1999).

Nos primeiros três dias após a lesão, o principal fator estimulador da formação dos vasos é o FGF, enquanto do 4^o ao 7^o dia, durante a formação do tecido de granulação, o fator de crescimento vascular endotelial torna-se mais importante (NISSEN et al., 1998).

A MEC também tem importante participação neste processo, seja atuando como fator de suporte para os novos capilares, ou como reservatório de inúmeros fatores de crescimento (LI, ZHANG; KIRSNER, 2003). Quando o espaço da ferida é completamente preenchido por tecido de granulação, a angiogênese cessa e muitos dos vasos sanguíneos formados desintegram-se por apoptose (ILAN; MAHOOTI; MADRI, 1998).

Outro evento importante que ocorre nesse período é a reepitelização das feridas, fenômeno precoce, que se inicia algumas horas após a lesão (HELL; LAWRENCE, 1979).

Na pele íntegra, as células epiteliais estão ligadas à membrana basal, porém quando ocorre à lesão cutânea, elas sofrem alterações fenotípicas incluindo a perda dos desmossomas e hemidesmossomas para poder restabelecer uma fina membrana basal. Primeiramente, os queratinócitos respondem ao defeito epidérmico migrando das bordas integras do epitélio em direção ao centro da lesão. Um a dois dias após a lesão inicial, as células epidérmicas adjacentes as células ativas em migração começam a se proliferar. Os estímulos para proliferação e migração dessas células ainda não estão

definidos. A ausência de células vizinhas nas margens da ferida ou efeito da “margem livre”, a liberação local de fatores de crescimento – sendo os principais o fator de crescimento epidérmico, o TGF- α e o fator de crescimento derivado dos queratinócitos – associado ao aumento na expressão de receptores dos fatores de crescimento poderiam estimular o processo de proliferação e migração das células epidérmicas (WERNER et al., 1994; NANNEY; KING, 1996).

Com a reepitelização, proteínas da membrana basal reaparecem de forma ordenada, da periferia para o centro da lesão. As células epidérmicas readquirem as características fenotípicas originais, aderindo-se firmemente a membrana basal e derme neoformadas (CLARK et al., 1982).

Dessa maneira, com o passar do tempo (5º dia), a MEC provisória é gradualmente substituída por uma matriz colagenosa, uma vez que as fibras colágenas tornam-se mais abundantes e começam a unir a incisão (SINGER & CLARK, 1999).

3.3.1.3 Fase de remodelamento

Esta é a última e mais longa fase do processo de cicatrização. Sua duração depende de variáveis como idade, estado nutricional do indivíduo, local da ferida, tipo de lesão e duração do processo inflamatório e proliferativo (STADELMANN, DIGENIS; TOBIN, 1998). Consiste na substituição gradual do colágeno imaturo (tipo III) da MEC, por colágeno maduro (tipo I), bem como na redução do número de células inflamatórias e de vasos sanguíneos neoformados (WELCH, ODLAND; CLARK, 1990).

Na derme humana normal, as fibras colágenas constituem aproximadamente 80% do peso dérmico seco e representam a principal proteína estrutural, fornecendo suporte, resistência e rigidez a pele (BOOTH; POLAK; UITTO, 1980).

Nos indivíduos adultos saudáveis, a derme é constituída por fibras tipo I e fibras tipo III que representam 80% e 10% do colágeno total, respectivamente.

Durante as primeiras semanas do processo cicatricial em humanos, o colágeno tipo III é o principal tipo de colágeno produzido pelos fibroblastos. É encontrado após as primeiras 48 a 72 horas do trauma, atingindo o pico máximo de produção entre 5 e 7 dias. Assim, a quantidade total de colágeno aumenta progressivamente, atingindo seu máximo entre a segunda e terceira semana de cicatrização. Após o período de 1 ano ou mais, a derme cicatrizada gradualmente reassume características prévias a lesão, constituindo-se basicamente de colágeno tipo I. Com um mês, a força tensil readquire 40% do estado original e pode continuar aumentando por um ano, atingindo até 70% da resistência da pele normal (SINGER; CLARK, 1999; LI, CHEN; KIRSNER, 2007).

Com o fechamento da ferida, o remodelamento gradual do colágeno se faz por degradação das fibras tipo III e produção de colágeno tipo I, o qual apresenta maior alinhamento e ligações cruzadas entre as fibrilas (EHRlich; KRUMMEL, 1996). Isso é regido por um processo bastante controlado que envolve metaloproteinases secretadas por macrófagos, células epidérmicas, endoteliais e fibroblastos da matriz cicatricial (MIGNATTI et al., 1996; VISSE; NAGASE, 2003).

Estas enzimas geralmente são indetectáveis ou encontradas em concentrações mínimas na pele normal, sendo, então, estimuladas durante o processo de cicatrização por citocinas, fatores de crescimento e pelo contacto célula-matriz. Inibidores teciduais também exercem importante função na modulação da atividade dessas enzimas, sendo o equilíbrio entre ativação e inibição das metaloproteinases fundamental para o correto processo de reparo e remodelamento cicatricial (MADLENER; PARKS; WERNER, 1998; VISS; NAGASE, 2003).

3.4. Inflamação

A inflamação é uma resposta à infecção, antígenos ou lesão tecidual e tem por função erradicar os agentes microbianos ou irritantes e potencializar o reparo tecidual (CASTARDO, 2007).

Fisiologicamente, a inflamação caracteriza-se por: vasodilatação, com subsequente aumento do aporte sanguíneo local; aumento da permeabilidade dos capilares, permitindo o extravasamento de grande quantidade de líquidos para os espaços intersticiais; migração de inúmeros granulócitos e monócitos para o tecido (diapedese); e edema intracelular. Alguns dos inúmeros produtos teciduais que causam tais reações incluem a histamina, a bradicinina, a serotonina, as prostaglandinas, os produtos da reação do sistema de coagulação sanguínea e as linfocinas (GUYTON; HALL, 2002).

Neste processo, cada estímulo provoca um padrão característico de resposta que, apesar da diversidade e complexidade dos mediadores químicos, apresentam variação relativamente pequena, logo é de se esperar que os mecanismos farmacológicos necessários ao antagonismo deste processo fisiológico também não sofram grandes variações nos seus mecanismos de ação, e a evolução destas drogas desembocam naturalmente no desenvolvimento de apresentações farmacológicas mais eficazes, seguras e posologicamente confortáveis ao uso durante o tratamento com as mesmas. (CASTARDO, 2007).

Trummel (1991) analisa que as drogas antiinflamatórias para uso sistêmico utilizadas na prática clínica apresentam a inconveniente incapacidade de eliminar especificamente o estímulo inflamatório localizado, onde através da supressão inflamatória, alguns destes fármacos podem comprometer gravemente os mecanismos de defesa do organismo. O autor conclui que neste grupo farmacológico, a eficácia e a toxicidade geralmente estão intimamente associadas, e o seu uso crônico contribui ainda mais para a possibilidade de ocorrência de efeitos tóxicos.

Gregori e colaboradores (1996) dividem as drogas antiinflamatórias em três grandes grupos: *antiinflamatórios não-esteróides e não-enzimáticos (AINEs)*; *antiinflamatórios esteróides* e *antiinflamatórios enzimáticos*. No primeiro grupo incluem: salicilatos, derivados da 5-pirazolona, derivados do ácido arilacético, fenamatos, oxicanos e compostos heterocíclicos não-ácidos. Os corticóides são considerados bons agentes na redução do edema pós-operatório. Entretanto, interferem desfavoravelmente sobre a evolução do reparo tecidual, já que atuam sobre o metabolismo das proteínas e,

portanto, na produção de anticorpos. Já os antiinflamatórios enzimáticos exercem ações farmacológicas, segundo os autores, sobre o exsudato intersticial, ou seja, em uma fase em que o edema já se manifestou não representando o que mais se espera de um antiinflamatório em cirurgia bucal, que é a intensidade da resposta inflamatória.

A cicloxigenase (COX) catalisa a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas H_2 , que são precursores comuns para a síntese de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos. Atualmente é sabido que a cicloxigenase existe em duas isoformas, as quais exibem propriedades catalisadoras similares, mas diferem em termos de regulação da expressão. A COX-1 é responsável pela síntese de vários mediadores, incluindo as prostaglandinas que protegem a mucosa gástrica e regulam a homeostase renal, e os tromboxanos que iniciam a agregação plaquetária. Os leucotrienos também promovem a inflamação e podem causar broncoespasmo. Já o tecido lesado, resultante de cirurgia, irá induzir a produção de COX-2, que em termos, leva a síntese de prostaglandinas que sensibilizam as fibras da dor e promovem a inflamação (RIENDEAU *et al.*, 2001; HAAS, 2002).

3.5 Dor e analgésicos opióides

Considerando os diversos problemas que envolvem mecanismos centrais, os inerentes a dor têm merecido uma especial atenção dos estudiosos da área, em razão de ser a dor, em muitos casos, o único e destacado sintoma apresentado em várias patologias de origem inicialmente desconhecida, e o seu alívio podendo ser obtido de forma adequada por meios farmacológicos, com os agentes analgésicos (DUARTE, 2005).

O controle da dor no atendimento odontológico é essencial para que o profissional alcance seus objetivos. A dor é, ao lado do medo, um dos principais fatores responsáveis pelo comportamento do paciente frente ao tratamento. As odontalgias embora consideradas somáticas superficiais (localizadas) e melhor suportadas, muitas vezes, apresentam-se como dor profunda, mal localizadas, associadas a náuseas, palidez,

sudorese e podem ser referidas a outras áreas e, nessas condições, além de dificultar o diagnóstico, constituem-se exceção à regra (ROCHA et al., 2007).

A procura de novos opióides tem sido intensa nos últimos anos, devido ao fato de que os atuais representantes desse grupo, embora tendo comprovada eficácia terapêutica apresentam intensos e preocupantes efeitos colaterais nos seus usuários, principalmente a tolerância e a dependência, em decorrência do seu necessário uso contínuo (ALMEIDA, 2002).

A morfina tem a capacidade de promover efeitos depressores e/ou estimulantes que são particularizados por uma série de alterações no organismo, produzidos em decorrência de uma ação direta nos receptores opióides do tipo μ K e δ e de seus respectivos subtipos, e no trato gastrointestinal, induzindo a uma mistura de efeitos estimulantes e depressores, cuja ação global é a diminuição da atividade neuronal (DUTHIE; NOMO, 1987).

Entre os mais destacados efeitos depressores estão: analgesia (μ_2), sonolência, alerta mental diminuído (μ e K), depressão respiratória (μ_2), aumento da pressão intracraniana (μ_1), supressão da tosse (μ_2), peristalse intestinal diminuída (μ_2), menor secreção ácida gástrica (μ_2 e K), inibição do centro do vômito (μ_1), diminuição da temperatura corporal (μ_1), diminuição da liberação do hormônio luteinizante e do hormônio foliculoestimulante (μ_1) (SNYDER; CHILDRES, 1979; DUTHIE; NOMO, 1987).

Considerando ser a depressão do Sistema Nervoso Central (SNC) a ação predominante dos opióides, às vezes observa-se efeito sobre o Sistema Nervoso Autônomo (SNA) como a contração da pupila (miose), que tem grande importância toxicológica, já que ajuda na identificação clínica de usuários de heroína. Efeito este que é revertido pela aplicação oftálmica de escopolamina (SAWYNOK; SCHLICHTING, 1986).

Um segundo local de ação dos opióides é o trato gastrointestinal, local com predominância dos receptores (μ e δ), os quais tanto resultam em ações consideradas úteis do ponto de vista terapêutico, quando podem produzir efeitos colaterais indesejáveis, especialmente naqueles pacientes que necessitam do uso por um período

longo. Assim, pelo fato de produzirem constipação intestinal, eles são eficazes no tratamento sintomático da diarreia, onde não se observa nenhuma ação de tolerância para esse efeito (KOJIMA et al., 1974 ; KROMER, 1988).

Quanto aos principais efeitos estimulantes os analgésicos opióides apresentam; euforia (μ 1), aumento da liberação de prolactina (μ 1) e efeito convulsivante (μ 1) em doses altas. Por outro lado, a ação decorrente do uso prolongado desses analgésicos nos receptores μ e K é responsável pelo desenvolvimento dos fenômenos de tolerância e dependência (PAN, 1993; DRUMOND, 2000).

A tolerância e a dependência representam as ações mais indesejáveis que os analgésicos opióides provocam no homem. A primeira se caracteriza pela redução do efeito da droga devido ao seu uso contínuo, já a segunda é o estado resultante da absorção periódica ou contínua de certas substâncias químicas (analgésicos, alucinógenos, hipnóticos, psicotrópicos) no qual o indivíduo tem necessidade de uso contínuo. Essa ação pode ocorrer também na forma cruzada, na qual drogas de diferentes classes químicas podem reforçar a dependência ou a abstinência (HURLÉ; GIRIGOLZARRI; VALDIZÁN, 2000).

Estudos “*in vivo*” com animais demonstraram a participação de outros neurotransmissores no desenvolvimento da tolerância a morfina. O bloqueio das ações do glutamato por antagonistas do receptor NMDA (N-metil D-aspartato) e a glicina impede a tolerância e a dependência (TRUJILLO; AKYL, 1991). Já o óxido nítrico (NO) também tem participação no efeito da tolerância aos opióides, no entanto, o bloqueio da sintetase do óxido nítrico tem uma ação inibitória sobre o efeito da tolerância produzida pela morfina (KOLESNIKOV et al., 1994). Embora os antagonistas dos receptores NMDA e os inibidores da síntese do NO sejam eficazes sobre o efeito de tolerância produzido pela morfina e os agonistas δ , eles apresentam pequeno efeito contra a tolerância promovida pelo receptor K. Estes efeitos podem ser revertidos parcial ou totalmente com seus respectivos bloqueadores, e o efeito da tolerância e da abstinência estão intimamente relacionados com a participação dos receptores δ e K respectivamente (CRAIN; SHEN, 1998).

Outra grande utilização clínica dos opióides tem sido seu uso como agente pré-anestésico com a finalidade de produzir analgesia, sedação, redução da ansiedade e ainda potencializar os efeitos dos anestésicos gerais. Os opióides mais usados com esta finalidade são a própria morfina (opiáceo) e o fentanil (hipnoanalgésico sintético) (DEWEY et al., 1997). A naloxona e a naltrexona, alil derivados da oximorfona, são considerados antagonistas puros e interagem com os três tipos de receptores opióides M, K, S (GUSTEIN; AKIL, 2001).

3.6 Câncer

O câncer é hoje um dos principais problemas de saúde pública mundial. Dados epidemiológicos apontam as neoplasias como a terceira maior causa de morte do mundo, sendo a segunda entre doenças (INCA, 2009).

Câncer é a denominação genérica conhecida para uma série de doenças que possuem em comum a hiperproliferação de populações celulares específicas, com potencial de invasão de tecidos próximos e/ou distantes. Em termos patológicos é classificado como uma neoplasia maligna, ou seja, é o desenvolvimento de novos clones celulares com atividade proliferativa superior às das células vizinhas e com caráter de invasão e destruição tecidual acentuada (KNOWLES; SELBY, 2005).

Alguns autores descrevem o seu desenvolvimento como um processo microevolutivo em escala celular, onde uma entre os bilhões de células do organismo humano desenvolve algum tipo de nova característica que permite uma atividade proliferativa superior às das células vizinhas frente às pressões contra-proliferativas do organismo. A regulação do número de células dentro dos tecidos é fortemente realizada tanto por mecanismos intracelulares, representados pelos mecanismos de indução de apoptose e reparação de DNA quanto por fatores de controle extracelular, representados pelos mecanismos de indução de apoptose e reparação de DNA quanto por fatores de controle extracelular, como a supressão tumoral pelo sistema imune. A ocorrência de proliferações desordenadas como no caso do câncer ocorre pela falha na regulação de

algum destes mecanismos, ou pelo desenvolvimento de clones malignos que conseguem “escapar” destes mecanismos de regulação (MERLO et al., 2006).

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

As causas para o desenvolvimento de tumores malignos sempre estão correlacionadas com algum grau de instabilidade genética. Essa instabilidade pode decorrer de algum tipo de desordem genômica hereditária ou de alguma alteração promovida por causas e fatores ambientais. Os fatores ambientais que desencadeiam o processo de carcinogênese são denominados carcinógenos. Por sua vez, os carcinógenos são elementos químicos, físicos ou biológicos, aos quais expõem o indivíduo a riscos aumentados de desenvolvimento cancerígeno (SCULLY et al., 2000; TODD et al., 1997).

O processo de carcinogênese é quase sempre, muito lento, podendo demorar anos para que a célula transformada origine um tumor clinicamente detectável. Esse processo inclui três estágios: iniciação, promoção e progressão (DONNICI et al, 2005; REDDY; ODHAV; BHOOLA, 2006).

A iniciação se dá através da exposição de células normais a carcinógenos. A consequência disso, ou seja, a transformação pode permanecer dormente e levar anos para se manifestar. No segundo estágio, a célula iniciada sofre um longo período de contato com o agente transformador. Neste momento, o estilo de vida pode ter efeitos benéficos e evitar o desenvolvimento de cânceres. A progressão já é caracterizada pela proliferação descontrolada das células malignas, evoluindo para as manifestações clínicas e metástases (REDDY; ODHAV; BHOOLA, 2006; DONNICI et al, 2005).

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

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

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

Qualquer que seja a causa, trata-se basicamente uma doença celular, caracterizada por desvio nos mecanismos de controle que dirigem a proliferação e diferenciação celular, além de processos de apoptose celular (MOFFATT et al., 2000). Tudo isto, em decorrência de certa mudança no repertório da expressão gênica devido a alguma mutação ocorrida no DNA que determina o aparecimento e/ou o comportamento da neoplasia (DUESBERG; RASNICK, 2000).

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

Existem três abordagens principais para o tratamento: excisão cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. A quimioterapia é considerada o método mais efetivo (AJITH; JANARDHANAN, 2002), uma vez que muitos tumores caracterizam-se pelo desenvolvimento precoce de micrometástases, o que evidencia a necessidade de uma

abordagem terapêutica sistêmica que é realizada pela quimioterapia (ENGERS; GABBERT, 2000).

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

3.6.1 Sarcoma 180

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

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

3.6.2 Tumor de Ehrlich

O tumor de Ehrlich é uma neoplasia transplantável de origem epitelial maligna, é correspondente a um espontâneo de glândula mamária originário de camundongos fêmea, transplantado pela primeira vez por Paul Ehrlich em 1906. Originalmente, de crescimento sólido foi e desde então é estudado na forma sólida, quando as células são inoculadas no tecido subcutâneo, ou na forma ascítica, quando inoculado na cavidade peritoneal (EHRlich, 1906; KLEIN; KLEIN, 1956).

Pode-se dizer que este carcinoma, por ser um dos primeiros tumores transplantáveis conhecido, é um dos mais extensamente utilizados para experimentação (DAGLI, 1989). O tumor ascítico de Erlich se mostra bastante vantajoso frente a outros tumores; por não regredir de forma espontânea; por ser facilmente transplantável no tecido cutâneo ou peritônio, desenvolvendo-se em tumor sólido ou ascítico, respectivamente, apresenta um comportamento agressivo, pois cresce rapidamente, mesmo quando implantado em doses extremamente pequenas e é capaz de crescer em todos os animais que são transplantados (DOGRE et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2006; SILVA; FIGUEREDO, YANO, 2007).

Foi demonstrado em estudos recentes, que a resposta inflamatória é essencial para o controle do tumor de Ehrlich, pois o alto influxo de células inflamatórias promove o desenvolvimento do tumor. Este efeito provavelmente está relacionado com a angiogênese e fatores de crescimento induzidos pela inflamação (NASCIMENTO et al., 2006).

Segundo Dagli (1989) a avaliação histológica do tumor de Ehrlich na forma sólida pode ser descrita como: células com alto grau de atipias (anaplasia), caracterizadas por nucléolos evidentes e numerosos, cromatina condensada, mitoses atípicas ou aberrantes e relação núcleo-citoplasma maior que a das células normais. O estroma é constituído por fibras colágenas e delicados capilares.

4 Artigo I

Artigo submetido à Revista Brasileira de Plantas Medicinais



Avaliação da citotoxicidade e da toxicidade aguda do extrato das cascas de *Abarema cochliocarpa* (Gomes) Barbeby & Grimes

LIMA, CMP¹; SOARES, RPF^{1*}; BASTOS, IVGA¹; GRANGEIRO, ARS¹; GURGEL, APAD¹;
SILVA, ACP¹; SILVA, JG¹; OLIVEIRA, RAG²; SOUZA, IA³

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

² Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, 58051-970, João Pessoa-PB, Brasil.

³ Departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco. Av. Arthur de Sá, s/n, 50740-521, Recife – PE, Brasil.

RESUMO: O objetivo desta pesquisa foi estimar a toxicidade aguda do extrato etanólico de *Abarema cochliocarpa* através da determinação da dose letal (DL₅₀) em roedores e da Concentração letal (CL₅₀) frente à *Artemia salina*. Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), fêmeas, pesando entre 25 a 35 g nas quais foram administradas doses de 100 a 600 mg/kg por via intraperitoneal e 1.000 a 5.000 mg/kg por via oral. Os sinais comportamentais foram avaliados durante uma hora após a administração do extrato etanólico de *A. cochliocarpa*, ficando em observação até 48 horas. O número de óbitos foi quantificado para posterior cálculo da DL₅₀. O cálculo proporcional foi realizado a fim de se obter a mesma dose para todos os animais de cada grupo. A administração foi por via intraperitoneal com intervalo de 5 minutos para cada animal. Nos ensaios de toxicidade por via oral a solução foi introduzida por via intragástrica através de cânula metálica acoplada a seringa (gavagem). Os animais apresentaram algumas reações, porém não letais até a dose de 5.000 mg/kg. A DL₅₀ para via intraperitoneal foi calculada pelo método de Karber e Behrens (1964), estabelecida em 257, 49 mg/kg (*muito tóxico*, grau 4). A CL₅₀ (543,5 µg/mL) demonstrou ser muito tóxica frente a *A. salina*. Conclui-se que sob condições agudas de exposição, o extrato de *Abarema cochliocarpa* apresentou toxicidade, devendo ser considerado como tal, dependendo da dose administrada ou absorvida, tempo e frequência de exposição e vias de administração.

Unitermos: Fitoterapia, Toxicologia, Citotoxicidade, Toxicidade aguda, *Abarema cochliocarpa* (Gomes) Barbeby & Grimes

Citotoxicity evaluation and acute toxicologic of the extract of bark of *Abarema cochliocarpa* (Gomes) Barbeby & Grimes

ABSTRACT: The aim of the present work was to evaluate the acute toxicity of ethanolic extract of *Abarema cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes through its lethal dose (LD₅₀) in mice and lethal concentration (LC₅₀) through *Artemia salina*. For this research, female Swiss mice (*Mus musculus*) were used, weighting between 25 and 35 g. They were injected with varying doses from 100 to 600 mg/kg through intraperitoneal route and 1.000 a 5.000 mg/kg through oral route. The behavior of these animals was monitored for hour right after administration of ethanolic extract of *A. cochliocarpa*, thus remaining in observation for 48 hours. The number of deaths was registered for calculation of LD₅₀. A proportional calculation was carried out in order to have the same dose for the animals in each group. The punctures were gotten by intraperitoneal route in intervals of five minutes among the individual doses. For the oral toxicity the solution was introduced in the digestive system of the animals through coupled metallic stem syringe (gavage). The animals presented non lethal toxic signs up to 5.000 mg/kg. DL₅₀ was established by the method of Karber and Behrens (1964). LD₅₀ was estimated in 257, 49 mg/kg (highly poisonous, degree 4). The LC₅₀ (543,5 µg/mL) has recognized medicinal that the extract is toxic to *A. salina*. It can be concluded that under acute conditions of exposure, the extract of clove is a poisonous agent and it should be considered as such, depending on the administered or absorbed dose, time and frequency exhibition and administration routes.

Keywords: Phytotherapy, Toxicology, Citotoxic, Acute toxicity, *Abarema cochliocarpa* (Gomes) Barbeby & Grimes.

INTRODUÇÃO

Para Rates (2001), esse aumento do interesse pelas plantas tem sido significativo para a origem de novos fármacos. Toledo (2003) acredita que o estímulo ao uso dos fitoterápicos tem como objetivos a prevenção, a cura ou a minimização dos sintomas das doenças, com custo mais acessível à população e aos serviços por síntese química, que são, em geral, mais caros, devido às patentes tecnológicas envolvidas. No entanto, a utilização de formulações fitoterápicas como alternativa terapêutica tem sido limitada pela questão da segurança de sua utilização (Mello; Mello; Langeloh, 2008).

Abarema cochliocarpa (Gomes) Barbeby & Grimes, conhecida também como *Mimosa cochliocarpos* (Gomes) e *Abarema cochliocarpos* (Gomes), é uma árvore de grande porte pertencente à família Leguminosae-Fabaceae. Popularmente é chamada de babatenon, babatimão ou barbatimão e amplamente utilizada devido a sua atividade cicatrizante, antiinflamatória e antiulcerogênica (Sarmento, 1999). Podem ser encontradas nos estados de Alagoas, Bahia, Paraíba, Pernambuco e Rio de Janeiro (Grin, 2005).

O *screening* fitoquímico dos extratos hidroalcoólicos das cascas apresentou testes positivos para saponinas, flavonóides e taninos (Sarmento, 1999). As cascas do caule são utilizadas como medicinal, em aplicações tópicas, para o tratamento de feridas na forma de decocto. Para uso interno utilizam-se as cascas preparadas na forma de infuso, decocto, tintura, vinhos e garrafadas como antiinflamatório (Oliveira; Silva, 1994).

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda e a citotoxicidade do extrato etanólico do caule de *Abarema cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes através da determinação da dose letal (DL₅₀) por via oral e intraperitoneal em camundongos e da Concentração letal (CL₅₀) frente à *Artemia salina*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material botânico e obtenção da matéria-prima

Amostras das cascas do caule de *A. cochliocarpa* foram coletadas no NUPA (Núcleo de Pesquisa e Processamento de Alimentos) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa – PB, Brasil e posteriormente identificadas pela botânica Dr^a Rita de Cássia de A. Pereira (IPA-PE). Uma excicata foi depositada no herbário “Prof. Lauro Pires Xavier”, da UFPB, sob o número 61.336. O material foi pesado em balança

eletrônica semi-analíticos (modelo BG 400, Gehaka®), com 835 g, que foram lavados em água corrente, e secos em estufa a 33 °C por uma semana.

Extração

Foram preparados 4 litros de solução extrativa etanólica. A mistura foi mantida sob refrigeração a 23 °C durante 40 dias e posteriormente filtrada com filtro de celulose adaptado a funil montado em suporte específico. O volume final obtido de extrato etanólico foi de 1,35 litros.

Concentração do extrato

A vaporização da porção etanólica através de evaporador rotativo (TE 120, Tecnal®, Brasil), acoplada a uma bomba a vácuo sob temperatura constante de 45 °C para obtenção do extrato pilular, com consistência resinosa, cor escura, bem dispersível em soro fisiológico nas dosagens utilizadas.

Toxicidade aguda do extrato pilular e determinação da DL₅₀

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética Experimental (protocolo número 041544/2006-47). O trabalho experimental foi desenvolvido no Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco a partir da seleção de camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) fêmeas, com pesos e idade aproximados, divididos em grupos de seis animais cada, previamente marcados e pesados. Todos os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, em condições controladas de iluminação (ciclo 12 horas claro/escuro) e temperatura de 22± 2°C, com alimentação suspensa 12 horas antes do ensaio e liberação de água *ad libitum*. O extrato etanólico foi

pesado em balança analítica (Scaltec®, modelo SBA 31) e diluído em solução fisiológica 0,9% de NaCl (p/v).

O ensaio foi realizado pela via de administração intraperitoneal e oral. A avaliação da toxicidade aguda e determinação da DL_{50} foram realizadas de acordo com a metodologia preconizada por Karber & Behrens (1964) efetuada em duas fases: uma preliminar e uma definitiva. Na fase preliminar foram administradas doses crescentes do extrato etanólico de *A. cochilliocarpa* para definir a D_1 (maior dose de sobrevivência) e D_2 (menor dose capaz de determinar 100% de letalidade dos animais).

Os dados obtidos na fase preliminar delinearam a fase definitiva. Os animais receberam doses compreendidas entre D_1 e D_2 seguindo a progressão geométrica de razão 1,2 com determinação da DL_{50} (Dose letal para 50% dos roedores), todos permaneceram em observação durante 48 horas. Os parâmetros observados pelas vias de administração foram às diversas reações comportamentais como: deambulação, alterações da frequência respiratória, diurese, óbitos, entre outros. O cálculo da DL_{50} foi obtida com emprego da seguinte fórmula:

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

Onde:

DF = dose mínima capaz de matar todos os animais

A = diferença entre duas doses consecutivas

B = animais mortos entre duas doses consecutivas

n = número total de animais por lote

A classificação da toxicidade relativa dos agentes químicos de acordo com a DL_{50} seguiu a proposta de Schuartsman (1980) grau 6 ($DL_{50} < 5$ mg/kg) = supertóxico; grau 5

(DL₅₀ = 5-50 mg/kg) = extremamente tóxico; grau 4 (DL₅₀ = 50-500 mg/kg) = muito tóxico; grau 3 (DL₅₀ = 0,5-5 g/kg) = moderadamente tóxico; grau 2 (DL₅₀ = 5-15 g/kg) = pouco tóxico; grau 1 (DL₅₀ >15 g/kg) = praticamente atóxico.

Toxicidade em *Artemia salina* L.

Os cistos de *A. salina* L. foram mantidos sob resfriamento a 5°C até a execução do experimento. Foram utilizadas larvas de *A. salina* L., na forma de metanúplio, empregando-se a Concentração Letal Média (CL₅₀) como parâmetro de avaliação da atividade biológica (Lopes et al., 2002). Para a obtenção dos metanúplios, cistos de *A. salina* foram incubados em solução salina (pH 8,5 e 29 °C) sob iluminação artificial por 48 h. Após eclosão, os metanúplios migravam através de uma placa perfurada para outro compartimento com livre incidência de luz. A partir de uma solução de 10 mg do extrato etanólico de *A. cochiliocarpa* foram efetuadas diluições com concentrações inferiores (40, 120, 240, 360, 480 e 600 µg/mL). Cinco mililitros de solução com as respectivas concentrações foram colocados em tubos de ensaio e adicionados 10 metanúplios. O teste foi feito em triplicata. Um grupo controle foi preparado contendo apenas os metanúplios. O conjunto permaneceu em incubação sob luz artificial por 24 h e então foi realizada a contagem do número de larvas vivas e mortas para determinação da CL₅₀ de acordo com o método estatístico de Probitos utilizando o programa Microcal Origin 4.1.9.

RESULTADOS

Na fase preliminar, do teste de toxicidade aguda por via intraperitoneal, foram administradas doses variadas onde se determinou a D₁ de 160 mg/kg e D₂ de 414,72 mg/kg. Os sinais de toxicidade apresentados na fase definitiva após administração do

extrato etanólico foram inicialmente efeitos estimulantes, tais como: taquicardia, taquipnéia, tremores finos e grosseiros, movimentos circulares, exoftalmia e movimentos estereotipados. Após 30 minutos da administração verificou-se a presença de sinais depressivos visualizados em todas as doses tais como: abaixamento dos membros posteriores, apnéia e alteração da marcha. Todos os efeitos observados sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) foram reativos e proporcionais as doses administradas.

Em 100 mg/kg foi observada aumento da diurese, excreção fecal, alterações de marcha e piloereção, além da ausência de mortalidade.

Com a dose de 155 mg/kg foram observados efeitos sobre o trato gastrointestinal como: distensão abdominal, contorções e diminuição da excreção fecal, piloereção, edema de focinho, palidez, fotofobia e cianose foram verificados em grande parte dos animais de cada grupo. Esses efeitos periféricos se acentuaram com doses mais elevadas.

Entre 176 e 345,6 mg/kg também foram observadas taquipnéia e taquicardia, agitação motora, reação de fuga, espasmos, diurese e excreção fecal, com mortalidade entre 18% e 85% das amostras, respectivamente.

A taxa de mortalidade do extrato etanólico de *A. cochliocarpa* se acentuou com o aumento das doses como demonstrado na curva dose-resposta (figura 1). As doses acima de 414,72 mg/kg foram capazes de matar 100% dos animais tratados com o extrato etanólico da planta. A DL_{50} determinada foi de 257, 49 mg/kg.

O ensaio de toxicidade oral aguda foi realizado com doses de 1.000, 3.000 e 5.000 mg/kg, onde se evidenciou baixa diurese, excreção fecal variável, aumento da frequência respiratória, palidez, agressividade, agitação e edema de focinho. Para a dose de 5.000 mg/kg também foram observados sinais depressores do SNC. Entretanto, não foram observadas óbitos com doses mais baixas e mais elevadas (5.000 mg/kg)

preconizadas por Zaupa et al. (2002), impossibilitando o cálculo da DL_{50} pela metodologia proposta.

A análise comportamental da *A. salina* Leach nas concentrações de 40 a 600 $\mu\text{g/mL}$ revelou uma diminuição na sua movimentação em relação àquelas selecionadas no controle, mostrando que a exposição às maiores taxas de concentração da amostra de *A. cochliocarpa* tem influência sobre a movimentação do organismo estudado. Após 24 horas de exposição da *A. salina* Leach, observou-se que houve moderado número de óbitos na maioria das concentrações utilizadas da amostra de *A. cochliocarpa*. Desta forma, através de todos os fatos observados foi comprovado experimentalmente que a amostra selecionada apresentou valores de CL_{50} na faixa de 543,5 $\mu\text{g/mL}$.

DISCUSSÃO

Os produtos fitoterápicos são, algumas vezes, erroneamente considerados como seguros porque são de origem natural (Gesler, 1992). Segundo Bent e Ko (2004), esses produtos contêm princípios bioativos capazes de causar efeitos adversos.

De acordo com Talalay e Talalay (2001), todo produto natural usado em terapêutica deveria ser submetido a testes de eficácia e segurança por métodos iguais aos usados por novas drogas sintéticas. Por motivos éticos, morais e legais, a obtenção de dados toxicológicos em seres humanos é bastante limitada. Com isso, as informações toxicológicas sobre compostos químicos são obtidas basicamente a partir de testes toxicológicos pré-clínicos, ou seja, com animais de laboratórios em condições previamente padronizadas (Morton, 1998; Boelsterli, 2003).

Sugere-se que as reações comportamentais observadas após a administração intraperitoneal do extrato etanólico de *A. cochliocarpa* decorre de alterações do equilíbrio dos neurotransmissores excitatórios e inibitórios. Inicialmente as doses demonstraram

ser estimulantes devido a liberação de neuro-trasmissores excitatórios e/ou inibição da recaptação desses. A inibição da recaptação aumenta a concentração dos neurotransmissores em contato com os receptores, incrementando, assim, a atividade do circuito neuronal (Silva, 2002). No entanto, os efeitos depressores estiveram presentes e foram pronunciados, possivelmente pelo esgotamento parcial das vesículas sinápticas dos neurotransmissores excitatórios.

Situação semelhante ocorreu em outros estudos, com outros extratos de planta, como foi o caso do extrato metanólico de folhas de alecrim-pimenta por via intraperitoneal (Farias et al., 2007) , do extrato aquoso da casca do barbatimão (Rebeca et al., 2002) por via oral e dos extratos das folhas de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*), aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) (Almeida et al., 2009). Os animais inoculados com o extrato avaliado neste trabalho apresentaram reações caracterizadas como neurovegetativas, com respostas estimulantes e depressoras (Brasil, 2004).

As cascas do caule desta planta contêm constituintes químicos dentre os quais taninos, saponinas, flavonóides (Sarmiento, 1999) e são utilizadas pela população no tratamento de feridas. Melo et al., (2007) afirmaram que as saponinas, por serem capazes de formar complexos com esteróides e fosfolipídeos das membranas das células da mucosa intestinal, causam irritação na mesma. Essa propriedade irritante sobre a mucosa possivelmente justifica o aumento das contorções abdominais á medida que aumentou a dose na administração intraperitoneal.

Os taninos são compostos responsáveis pela adstringência de muitos frutos e plantas em geral, devido á sua complexação com proteínas, que é à base de algumas de suas propriedades biológicas, tais como controle de insetos, fungos e bactérias (Aerts et al.,1999). A diminuição da excreção fecal pode ser observada com o aumento das doses do extrato etanólico de *A. cochliocarpa* provavelmente pela presença de taninos. Devido

ao alto peso molecular, essas moléculas estão relacionadas com a inibição da digestibilidade (Monteiro et al., 2005).

A presença de intensa taquicardia durante todo o período do ensaio, mesmo na fase final, na qual se verificou depressão do sistema nervoso, deve-se provavelmente à presença de taninos no extrato etanólico de *A. cochliocarpa*. Para Alice (1995), o uso excessivo de produtos de plantas medicinais ricos em taninos por via oral pode ser perigoso ao músculo cardíaco, o que justifica a taquicardia observada na administração das doses intraperitoneais do extrato.

De acordo com Pinto et al., (2001), o efeito tóxico dos taninos, causado pela absorção intestinal dos produtos finais da hidrólise, ocasiona hemorragias, gastroenterites, necrose hepática e nefrites, entre outros. A administração do extrato nos animais provocou, na maioria das doses utilizadas, a ausência de micção.

Embora o extrato etanólico de *A. cochliocarpa* tenha se apresentado muito tóxico por via intraperitoneal, o mesmo por via oral foi atóxico não verificando letalidade dos animais. Esta ausência pode estar relacionada aos mecanismos farmacocinéticos de absorção e/ou biotransformação, que possivelmente diminuíram os níveis séricos necessários para provocar efeito letal nos indivíduos, no entanto sinais clínicos de toxicidade foram observados (Silva, 2006).

Meyer et al., (1982) estabeleceram uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal média, CL_{50} , apresentada por extratos de plantas sobre larvas de *A. salina*, desde então, considera-se que quando são verificados valores acima 1.000 $\mu\text{g/mL}$, estes, são considerados atóxicos. Sendo assim, *A. cochliocarpa* pode ser considerado tóxico. Não foram verificados na literatura, dados que relatem a CL_{50} sobre *A. salina* que possam servir como parâmetro de comparação.

O teste de citotoxicidade com *A. salina* é um ensaio biológico amplamente utilizado por ser rápido, confiável, de baixo custo e por ter demonstrado uma boa correlação com várias atividades biológicas (Meyer et al., 1982), como atividade antitumoral (Mclaughlin, 1991a; Mclaughlin et al., 1991b, 1993), atividade contra o *Trypanosoma cruzi* (Dolabela, 1997), atividade antibacteriana e antifúngica (Brasileiro et al., 2006; Niño et al., 2006; Magalhães et al., 2007). Em geral, extratos com alta toxicidade para *A. salina* ($CL_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$) apresentam alto potencial para estas atividades. O extrato de *A. cochliocarpa* apresentou toxicidade moderada para *A. salina*, sugerindo que o mesmo possua propriedades biológicas como antitumoral, tripanossomicida, antibacteriana e antifúngica.

CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que o extrato etanólico de *A. cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes foi tóxico nos ensaios *in vitro* frente à *A. salina* Leach como também em testes pré-clínicos (agudos) por via intraperitoneal. Porém, o extrato etanólico da casca de *A. cochliocarpa* apresentou baixa toxicidade quando administrado por via oral.

Os dados obtidos neste estudo mostraram o extrato de *A. cochliocarpa* como um agente tóxico sob condições agudas de exposição, devendo ser considerado como tal, dependendo da dose administrada ou absorvida, tempo e frequência de exposição e vias de administração.

A utilização desse vegetal com fins terapêuticos, pela população, deixa sugestivas opções para trabalhos futuros, que visem ao encontro de uma nova atividade farmacológica.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de Bolsa de Doutorado.

REFERÊNCIAS

ALICE, B.C. Plantas medicinais de uso popular: atlas farmacológico. Canoas: editora da ULBRA, 1995.

ALMEIDA, A.C.; SOBRINHO, E.M.; PINHO, L.; SOUZA, P.N.S.; DUARTE, E.R.; SANTOS, H.O.; BRANDI, I.O.; CANGUSSUL, A.S.; COSTA, J.P.R. Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi administrados por via intraperitoneal. *Rev. Ciencia Rural*, v. 40, p. 200-203, 2009.

BENT, S.; KO, R. Commonly used herbal medicines in the United States: a review. **The American Journal of Medicine**, v. 116, p. 478-485, 2004.

BOELSTERLI, U.A.. Animal models of human disease in drug safety assessment. **J. toxicol. Sci.** v. 28, n. 3, p. 109-121, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução. RE no. 90/2004. Normas para estudos toxicológicos de produtos fitoterápicos. Diário Oficial [da] República federativa do Brasil. Poder Executivo. Brasília, DF. 12 de março de 2004.

BRASILEIRO, B.G.; PIZZIOLO, V.R.; RASLAN, D.S.; JAMAL, C.M.; SILVEIRA, D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Rev Bras Cienc Farm.** v. 42, p.195-202, 2006.

DOLABELA, M.F. Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti Trypanossoma cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas. Minas Gerais, 130p.1997.

FARIAS, E.M.F.G. et al. Avaliação da toxicidade aguda do extrato metanólico de folhas de Lippia sidoides Cham. (Verbenaceae) In. CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 2007, Natal, RN. Anais... Natal: Sociedade Brasileira de Química. 2007.

GESLER, W.M. Therapeutic landscapes: medical issue in light of the new cultural geography. **Social Science and medicine.** v. 34, p. 735-746, 1992.

GRIN 2005. Germplasm Resources Network. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. Internet, 2005. Disponível em: http://www.arsgrin.gov/npgs/sbml/jhw/public_html/cgi-bin/family.pl?440. Acesso em: 03 out 2005.

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

LOPES, W. B. et al. Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais. Horizonte Científico, 2002. Disponível em: <http://www.propp.ufu.br/revistaeletronica/index.html>. Acesso em 21/03/ 2008

MAGALHÃES, A.F.; TOZZI, A.M.G.A.; SANTOS, C.C.; SERRANO, D.R., ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M.; MAGALHÃES, E.G., MAGALHÃES, L.A. Saponins from *Swartzia langsdorffii*: biological activities. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 98, p. 713-718, 2007.

MCLAUGHLIN, J.L. Crown gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractions. In: Dey PM, Harbone JB (ed.) *Methods in Plant Biochemistry*. New York: Academic Press, p. 1-32, 1991.

MCLAUGHLIN, J.L.; CHANG, C.J.; SMITH, D.L. "Bench-top" bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update. In: Rahman A (ed.) *Studies in Natural Product Chemistry* 9. Amsterdam: Elsevier, p. 383-409, 1991.

MCLAUGHLIN, J.L.; CHANG, C.J.; SMITH, D.L. Simple bench-top bioassays (BS & PD) for discovery of plant antitumor compounds-review of recent progress in human medicinal agents from plants. Nova York: Kinghorn & Balandrini, p. 112-137, 1993.

MELO, D.S.; CORRÊA, A.D.; MARCOS, F.C.A.; SOUSA, R.V.; ABREU, C.M.P.; SANTOS, C.D. Efeitos da farinha de folhas de mandioca sobre a peroxidação lipídica, o perfil lipídico sanguíneo e o peso do fígado de ratos. **Cienc. Agrotec.**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 420-428, 2007.

MELLO, J.R.B.; MELLO, F.B.; LANGELOH, A. Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápico Contendo *Gentiana lutea*, *Rheum palmatum*, *Aloe ferox*, *Cynara scolymus*, *Atropa belladonna*, *Peumus boldus* e *Baccharis trimera* em Coelhos Nova Zelândia. **Lat. Am. J. Pharm.** v. 27, n. 5, p. 752-756, 2008.

MEYER, B.N.; FERRIGINI, N.R.; PUTNAN, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plants constituents. **Planta Médica**, v. 45, p. 31, 1982.

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; ARAÚJO, E.L.; AMORIM, E.L.C. Taninos: uma abordagem da química 'a ecologia. **Química nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MORTON, D.M. Importance of species selection in drugtoxicity testing. **Toxicol. Lett.** v. 102-103, p. 545-550, 1998.

NIÑO, J.; NARVÁEZ, D.M.; MOSQUERA, O.M.; CORREA, Y.M. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of eight Asteraceae and two Rubiaceae plants from colombian biodiversity. **Braz J Microbiol**, v. 37, p. 566-570, 2006.

OLIVEIRA, R.A.G.; SILVA M.S.H. Plantas medicinais na atenção primária a saúde. João Pessoa, UFPB, Série extensão, n. 1, p. 50-57, 1994.

PINTO L.G.Q., PEZZATO L.E., MIRANDA E.C. et al. Desempenho do piauçu (*Leporinus macrocephalus*) arraçoado em dietas contendo diferentes teores de tanino. **Rev. Bras. Zootec**, v. 30, n. 4, p. 1164-1171, 2001.

RATES, S.M.K. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, p.101-104, 2001.

REBECCA, M.A. et al. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.83, n.1-2, p.101- 104, 2002.

SARMENTO, D.M.A. 1999. Isolamento e identificação de substâncias bioativas de *Pithecellobium cochliocarpum* Mart., 86p. Dissertação de mestrado, Centro de Ciências Exatas da Natureza, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa.

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

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

SILVA, E.C.B. 2006. Avaliação Biológica da *Caesalpinia echinata* Lam. Fabaceae-Caesalpinoidea. Usos e riscos. Recife, 137p. Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco.

TALALAY, P.; TALALAY, P. The importance of using scientific principles in the development of medicinal agents from plants. **Academic Medicine**, v. 76, p. 238-247, 2001.

TOLEDO, A.C.O. et al. Fitoterápicos: uma abordagem farmacocinética. **Revista Lecta**, Bragança Paulista, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.

ZAUPA, C.; CARRASCHI, L.; TSUZUKY, J.K.; BOEIRA, R.; DUTRA, A.L.; AKIMOTO, L.; KANESHIMA, E.N.; SILVA, J.C.; MARQUES, L.C. Estudo toxicológico pré-clínico (agudo e sub-agudo) do produto Propovit Plus® em roedores. **Acta Farm Bonaerense** v. 21, p. 265-272, 2002.

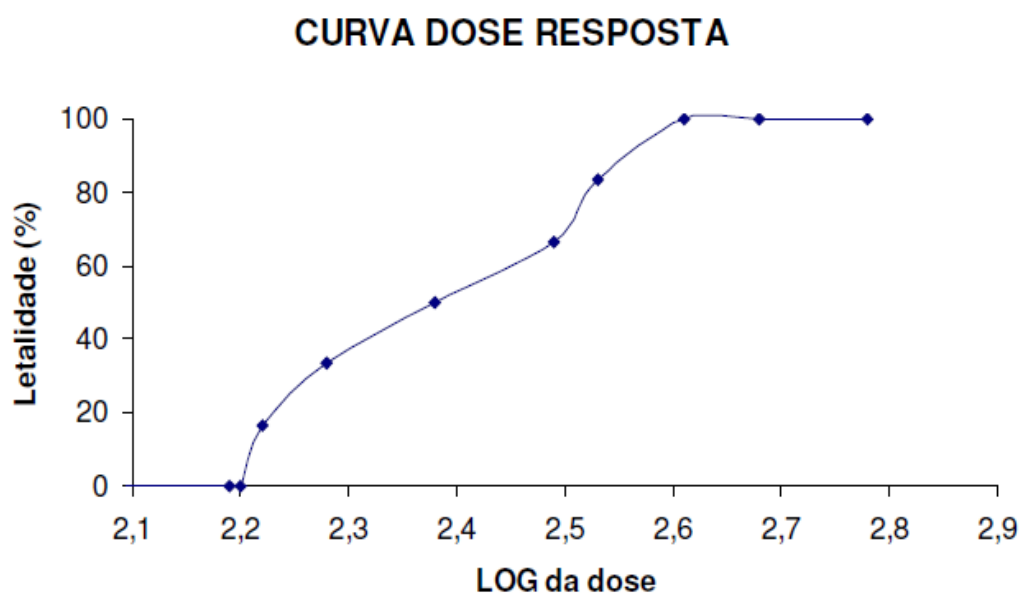


Figura 1 – Curva dose-resposta da toxicidade de *Abarema Cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes

5 Artigo II

Artigo aceito pela Revista Odontologia Clínico-Científico



Ação Antibacteriana e Antiaderente de *Abarema Cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes sobre microrganismos orais

Antimicrobial and antiadherent activity of *Abarema Cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes tested on oral microorganisms

O presente artigo corresponde à parte da tese de Doutorado do Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela UFPE.

Renata Patrícia Freitas Soares de Jesus

Doutoranda em Ciências Farmacêuticas pela UFPE

Maria Regina Macedo Costa

Mestranda em Odontologia Social pela UFPB

Isla Vanessa Bastos

Mestranda em Ciências Farmacêuticas pela UFPE

Geraldo Bosco Lindoso Couto

Professor Adjunto do Departamento de Clínica e Odontologia Preventiva da UFPE

Maria do Socorro Vieira Pereira

Professora Adjunta do Departamento de Biologia Molecular da UFPB

Ivone Antônia de Souza

Professora Adjunta do Departamento de Antibióticos da UFPE

Renata Patrícia Freitas Soares de Jesus

Rua do Sossego, 246, Ed. Lotus, apt. 32

CEP: 50.050-080. Boa Vista – Recife, PE

Resumo

O biofilme dental é o fator de maior importância na etiologia da cárie e das doenças periodontais. Diversos produtos de origem vegetal mostraram ser potencialmente interessante, no que se refere a sua atividade antimicrobiana. O objetivo do estudo foi avaliar a atividade antibacteriana e antiaderente do Extrato etanólico de *Abarema Cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes frente *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* e *Lactobacillus casei*. Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) os ensaios foram realizados em triplicata, em meio sólido, através da técnica de Ágar-Difusão em placas de Petri. Em relação à determinação da Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) da bactéria ao vidro na presença de sacarose a 5%, utilizou-se a técnica dos tubos inclinados. Em estudo comparativo, foi determinada a CIM e a CIMA do digluconato de clorexidina a 0,12%. Quanto a CIM, o *A. cochliocarpa* apresentou atividade antibacteriana similar ao digluconato de clorexidina frente a todas as linhagens ensaiadas. Os halos variaram entre 10 a 30 mm com resultado destacado (até a diluição 1:512) frente a *S. sanguinis*, *S. oralis* e *L. casei*. Já a CIMA frente ao babatenon mostrou-se efetivo na inibição da aderência até a última diluição considerada (1:512) para *S. sanguinis*, *S. mitis* e *S. oralis*, apresentando desempenho médio superior a clorexidina. Conclui-se que o *A. cochliocarpa* apresentou significativa atividade antimicrobiana e antiaderente ressaltando a importância de se avaliar um agente fitoterápico mais acessível à população com perspectiva da prescrição nos serviços de Atenção Básica, estando em consonância com as novas diretrizes do Ministério da Saúde.

Palavras chaves: *Abarema cochliocarpa*, atividade antimicrobiana, atividade antiaderente.

INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta um grande potencial para o desenvolvimento da Fitoterapia, inclusive no que se refere à Odontologia, vinculado ao conhecimento tradicional e tecnologico para validar cientificamente este esclarecimento^{4,24}. Atualmente a Fitoterapia faz parte do Sistema Único de Saúde, sendo possível a sua inclusão médica e odontológica^{10,38}.

Abarema Cochliocarpa (Gomes) Barneby & Grimes pertence à família Leguminosae-Fabaceae. É uma árvore de grande porte, endêmica do Brasil, e encontrada na mata atlântica. Sua decocção tem sido amplamente utilizada pela

população devido a sua propriedade antisséptica, cicatrizante, antiinflamatória, analgésica e antiulcerogênica ^{2, 28, 38}. É conhecida popularmente como babatenon, babatimão ou barbatimão. Estudos fitoquímicos relatam a presença de saponinas, flavonóides, catequinas e terpenos ^{25, 36}. Alguns relatos na literatura têm demonstrado suas atividades biológicas. Uma pesquisa realizada com o extrato hidroalcoólico das cascas de *A. cochliocarpa* demonstrou atividade antibacteriana em cepas Gram-positivas ^{7, 35}.

Em virtude da biodiversidade presente nos diferentes biomas brasileiros, existe uma crescente demanda para produtos naturais que impulsiona as investigações científicas e a busca por drogas naturais. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar a ação antimicrobiana e antiaderente do extrato das cascas de *Abarema Cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material Botânico e obtenção do extrato

Amostras de *A. cochliocarpa* foram coletadas no NUPA (Núcleo de Pesquisa e Processamento de Alimentos/ UFPB), em João Pessoa – PB, e posteriormente identificadas pela botânica Dr^a Rita de Cássia de A. Pereira (IPA-PE). Uma excicata foi depositada no do herbário “Prof. Lauro Pires Xavier”, da Universidade Federal da Paraíba, sob o número 61.336. O processo de secagem foi efetuado em temperatura ambiente durante 24 h. Em seguida foi colocado na estufa a 33°C durante uma semana, sendo posteriormente triturada a pó. A extração foi realizada em álcool etílico 95% (p/p)

e, após uma semana de maceração, foi obtido o extrato bruto por filtração. Este foi evaporado em rotavapor a 40°C obtendo-se resíduo escuro e higroscópico.

Cepas Bacterianas

Utilizou-se neste estudo linhagens bacterianas padronizadas de *Streptococcus mitis* ATCC 903, *Streptococcus sanguinis* ATCC 15300, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus salivares* ATCC 7073, *Streptococcus oralis* ATCC 10557 e *Lactobacillus casei* ATCC 9595, obtidas mediante solicitação na Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tozello” (Campinas- SP) e Instituto Adolfo Lutz (São Paulo- SP), respectivamente. Foram replicadas em Agar Sangue inclinado (“slants”), e posteriormente estocadas no Laboratório de Genética de Microrganismos – Departamento de Biologia Molecular/CCEN da Universidade Federal da Paraíba.

Determinação da Atividade Antimicrobiana do Extrato de *A. cochliocarpa*.

A atividade antimicrobiana em placas foi determinada pelo método de difusão em meio sólido através de poços para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato etanólico de *A. cochliocarpa* (EEAc) sobre as linhagens bacterianas. As linhagens foram cultivadas em caldo nutritivo (BHI-Brain Heart Infusion-DIFCO) e incubadas a 37 °C por 18-20 horas em microaerofilia. Foram realizadas perfurações no meio de cultura (Agar Mueller Hinton – DIFCO, acrescido de sacarose a 5% de aproximadamente 6 mm de diâmetro. Nos orifícios colocou-se um volume de 50 µl da solução do extrato diluído com DMSO, variando de 1:1 a 1:512. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por um período de 24 horas. Como padrão utilizou-se o gluconato de clorexidina a 0,12 % para fornecer comparações da eficiência

ou não dos produtos vegetais pesquisados. Cada ensaio foi realizado em duplicata frente a cada linhagem selecionada. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração do extrato capaz de impedir o crescimento microbiano.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Aderência

A concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) da bactéria ao vidro foi determinada na presença de sacarose a 5%, de acordo com Gerbara, Zardetto e Mayer (1996), usando-se concentrações crescentes e dobradas da solução diluída do extrato, variando de 1:1 a 1:512. A partir do crescimento durante 12 horas as linhagens foram cultivadas a 37°C em caldo Müeller-Hinton (DIFCO), em microaerofilia, por um período de 40 min obtendo-se um inóculo de 10^6 UFC/ml. A incubação foi a 37°C por 24 horas em microaerofilia, com os tubos inclinados a 30°. Como padrão utilizou-se o gluconato de clorexidina a 0,12% para fornecer comparações da eficiência ou não dos produtos vegetais pesquisados. Cada ensaio foi realizado em duplicata frente a cada linhagem selecionada. A CIMA foi definida como a menor concentração do agente antibacteriano que impediu a aderência bacteriana ao tubo de vidro.

Análise estatística

Os resultados obtidos no teste da Concentração Inibitória Mínima foram expressos nas medidas descritivas mínimo, máximo, média e desvio padrão mediante o emprego do programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences), versão 13.0. Utilizou-se o teste t-Student na comparação da inibição bacteriana mínima de cada extrato em relação ao digluconato de clorexidina a 0,12%. O nível de confiança utilizado para a obtenção dos intervalos foi de 95%. Para o seu uso, verificou-se inicialmente as premissas de normalidade e igualdade de variâncias, através dos seguintes testes: Kolmogorov-

Smirnov (uma amostra) para normalidade e Levene para verificação da homogeneidade dos dados.

RESULTADOS

Os resultados da atividade antimicrobiana para a determinação da CIM em meio sólido com halos de inibição do extrato da casca de *A. cochliocarpa* sobre *S. mitis*, *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. salivarius* e *L. casei* estão apresentados nas tabelas 1. Neste ensaio ficou demonstrado que todas as amostras utilizadas foram sensíveis ao extrato até a concentração 1:128 mg/mL. Os halos de inibição que variaram de 10 a 30 mm.

A ação antimicrobiana foi homogênea dentro dos gêneros para as linhagens ensaiadas e a inibição do crescimento bacteriano diminuiu, conforme a redução na concentração do extrato, com a formação de halos de inibição a partir do extrato bruto até a última diluição do extrato (1:512) frente as amostras de *S. sanguinis*, *S. oralis* e *L. casei*. A Figura 1 expressa a ação antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *A. cochliocarpa* frente a uma amostra de *S. mutans*.

Em relação aos ensaios da atividade antimicrobiana realizados com o digluconato de clorexidina a 0,12% (Tabela 2), todas as linhagens selecionadas foram inibidas pela ação dessa substância, como esperado. As linhagens de *S. oralis*, *S. salivarius* e *L. casei* foram as mais sensíveis apresentando halo de inibição até a diluição 1:128; o padrão de sensibilidade é seguido por *S. mutans* e *S. sanguinis*, com halo de inibição até a diluição 1:32. O *S. mitis*, apresentou halo de inibição até a diluição 1:16.

Na tabela 3 ficou demonstrado que o EEAc apresentou atividade antiaderente em todas as cepas estudadas. O extrato etanólico de *A. cochliocarpa* apresentou maior atividade antiaderente frente a todas bactérias estudadas quando comparado ao controle positivo (1:16), e atividade antiaderente maior frente ao *S. sanguinis*, *S. oralis* e *S. mitis* com CIMA de 1:512.

Admitiu-se normalidade para a Concentração Inibitória Mínima do extrato considerado (verificada através do teste não-paramétrico de normalidade de Kolmogorov-Smirnov) e igualdade de variâncias populacionais (verificado através do teste de Levene) (Tabelas 4 e 5).

Conforme resultados do teste-*t* (tabela 6), o extrato de babatenon teve desempenho médio superior ao Gluconato de clorexidina a 0,12% nas concentrações E1:8 a E1:128, quanto a concentração inibitória mínima (CIM), entretanto houve diferença significativa apenas nas concentrações E1:64 (sig. p-valor < 0,05) e E1:128 (sig. p-valor < 0,01). A clorexidina apresentou média superior com as concentrações EB vs SP e E1:2, porém, sendo estatisticamente não-significante.

DISCUSSÃO

As afecções odontológicas podem ser evidenciadas por sintomas característicos de diversas etiologias²⁹. Algumas dessas afecções vêm sendo tratadas com a fitoterapia sendo algumas espécies vegetais indicadas nos casos de gengivite, abscesso na boca, inflamação e aftas^{1, 9, 38, 42}. Porém, apesar das inúmeras possibilidades de uso de plantas medicinais por parte dos profissionais da área da saúde, seu uso na Odontologia tem sido pouco explorado, seja para tratar doenças bucais ou para tratar doenças sistêmicas com manifestações bucais^{23, 31, 41}.

Estes fitofármacos têm assumido um papel importante com atividade antimicrobiana e antifúngica frente às afecções bucais pelo considerável avanço do desenvolvimento de derivados naturais com ação bactericida ou fungicida^{14, 20,34, 39, 40, 43, 44}. Silva et al., 2008³⁹, avaliando a atividade antimicrobiana e antiaderente do *Rosmarinus officinalis* Linn. frente a *S. sobrinus*, *S. mutans* e *S. sanguis* demonstraram a inibição do crescimento bacteriano sobre estas cepas, sugerindo a sua utilização como meio alternativo no controle de bactérias cariogênicas. Melo et al., 2007²⁶ estudaram a atividade antimicrobiana do extrato da casca do caule de *Anacardium occidentale* L. Sobre *S. Mutans*, *S. Mitis* e *S. Sanguinis* isolados de biofilme dental, através da CIM e da CIMA. Segundo os autores, o extrato foi efetivo na inibição do crescimento e da aderência das três cepas estudadas.

No presente estudo, as bactérias *S. mitis*, *S. mutans* e *S. sanguis*, *S.oralis*, *S. salivares*, *L. casei* foram susceptíveis à ação do extrato etanólico da casca do caule *A. cochliocarpa*. A inibição do crescimento mostrou-se homogênea, de acordo com o grau de concentração do extrato. Houve uma redução proporcional do diâmetro dos halos à medida que a concentração diminuía, conforme a tabela 01. Estes resultados foram mais significativos dos que os encontrados quando utilizada a clorexidina a 0,12% conforme tabela 02.

O biofilme dental é uma película de microrganismos que se desenvolve naturalmente sobre as superfícies dos dentes. Nas fases iniciais do seu processo de formação, o biofilme bacteriano necessita de polissacarídeos extracelulares permitindo a adesão, interação e multiplicação das bactérias²⁶.

Sabe-se que a adesão das bactérias às superfícies dentais constitui um processo complexo multifatorial, influenciado pelo ambiente bucal, morfologia dental, superfície

bacteriana, e hábitos do hospedeiro e superfície do substrato ⁵. De acordo com Pereira et al., (2006)³³, vários fatores estão associados a esse processo, dentre estes, a interação de proteínas, adesinas, lectinas e interações hidrofóbicas. Desta forma, a interferência com a adesão bacteriana nas superfícies dos dentes pode ser um caminho para se obter o controle do biofilme dental, e conseqüentemente prevenir a instalação de patologias orais utilizando produtos que contenham *A. cochliocarpa*.

Nesse estudo, o extrato da casca de *A. cochliocarpa* foi efetivo na inibição da aderência das cepas utilizadas, apresentando os melhores resultados sobre o *S. sanguis*, *S. oralis* e *S. mitis* agentes importantes envolvidos nas afecções bucais. Atividade esta representada pela ausência de aderência da bactéria a parede do tubo de vidro na presença de sacarose, demonstrando a capacidade dos extratos de inibir a síntese do glucano pela glicosiltransferase ⁶. Os resultados são promissores uma vez que esses microrganismos também são os principais responsáveis pela formação do biofilme bacteriano.

S. mutans estão diretamente envolvidos na etiopatogenia da cárie, doenças periodontais, estomatites e outras infecções orais por contribuírem para o desequilíbrio da microbiota oral na medida em que criam condições favoráveis para a aderência de microorganismos oportunistas às superfícies dentárias, mucosas orais e próteses ^{22, 29, 37}. Nesse estudo, o extrato de *A. cochliocarpa* apresentou atividade inibitória frente a cepas de *S. mutans* maior do que o gluconato de clorexidina.

Considerando os constituintes presentes no vegetal, a atividade antimicrobiana positiva do extrato de *A. cochliocarpa* frente às amostras estudadas sugere ter sido devido à presença de compostos como taninos (compostos polifenólicos) previamente encontrados na planta ^{18, 36} uma vez que estes compostos têm comprovada ação

antimicrobiana, e que possuem uma ação inespecífica sobre o microrganismo, rompendo a parede celular bacteriana, inibindo os sistemas enzimáticos para a formação da mesma 3, 17, 19.

De acordo com Percival et al. (2006)³⁵, o pré-tratamento das superfícies dentárias com os fenóis pentâmeros do cacau, produz o efeito de reduzir a formação do biofilme dental por *S. mutans*, efeito não observado sobre o *S. sanguis*. No entanto, quando estudada a atividade antimicrobiana dos fenóis do cacau, observou-se a inibição do crescimento apenas de *S. sanguis*. Efeito positivo sobre a inibição de ambas as espécies foi obtido com a utilização do extrato do caule do *Anacardium occidentale* por Melo et al. (2006)²⁶.

A resistência bacteriana frente aos antimicrobianos é considerada como um problema inerente à terapia antimicrobiana, por este motivo é importante buscar novas fontes terapêuticas os quais sejam mais eficazes para o tratamento de infecções, como as bacterianas⁴⁶. O *A. cochliocarpa* é uma alternativa extremamente viável para o descobrimento de novos produtos com princípios ativos promissores além de ser uma alternativa mais econômica no controle de doenças para países em desenvolvimento.

CONCLUSÃO

O extrato etanólico da casca de *Abarema cochliocarpa* apresentou ação antimicrobiana significativa e atividade inibitória mínima de aderência *in vitro* sobre as linhagens de *S. mitis*, *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. oralis*, *S. salivares* e *L. casei*, presentes no biofilme bacteriano apresentando-se como opção terapêutica para as infecções orais, sendo acessível à população, uma vez que tem seu uso difundido na medicina popular.

REFERÊNCIAS

- 1 - Agra MF, França PF, Barbosa-Filho JM. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2007; 17: 114-140.
- 2- Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, França PF, Barbosa-Filho JM. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2008; 18: 472-508.
- 3- Akinpelu DA. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* bark. *Fitoterapia*, 2001; 72: 286-287.
- 4- Albuquerque UP, Hanazaki N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2006; 16: 678-689.
- 5- Alves PM, Pereira JV, Higino JS, Pereira MSV, Queiroz LMG. Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro da aroeira-do-sertão sobre o biofilme dental. *Revista Brasileira de Odontologia*, 2006; 63: 271-4.
- 6- Alves PMA, Queiroz LMG, Pereira JV, Pereira MSV. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica in vitro de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2009; 42: 222-224.
- 7- Araújo CW, Peixoto Neto PAS, Campos NV, Porfírio Z, Caetano LC. Antimicrobial activity of *Pithecolobium avaremotermo* bark. *Fitoterapia*, 2002; 73: 698-700.
- 8- Bandeira MFCL. Estudo farmacológico preliminar de *Copaifera multijuga* (óleo de copaíba). *Jornal Brasileiro de Clínica e Estética Odontológica*, 1999; 3: 39-41.
- 9- Barreto Vieira L, Feitosa Alves MSC, Araújo Teixeira J, Chagas Freire K, Costa Lima K. Acción antimicrobiana in vitro de dentífricos conteniendo fitoterápicos. *Revista de Odontoestomatologia*, 2005; 21: 195-201.
- 10- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006.
- 11- Buffon MCM, Lima MLC, Galarda I, Cogo L. Avaliação da eficácia dos extratos de *Malva sylvestris*, *Calendula officinalis*, *Plantago major* e *Curcuma zedoarea* no controle do crescimento das bactérias da placa dentária. Estudo "in vitro". *Revista Visão Acadêmica*, 2001; 2: 31-38.
- 12- Corrêa, MFP, Melo GO, Costa SS. Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da asma. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2008;18: 132-138.

- 13- Couto GBL. Biocompatibilidade do extrato hidro-alcoólico da *Lippia sidoides* Cham (Verbenaceae). Revista do Conselho Regional de Odontologia de Pernambuco, 2000; 3: 83-90.
- 14- Cowan MN. Plant products as antimicrobial agents. Journal of clinical and Microbiology, 1999; 12: 564-82.
- 15- Feres M, Figueiredo LC, Barreto IM, Coelho MH, Araujo MW, Cortelli SC. In vitro antimicrobial activity of plant extracts and propolis in saliva samples of healthy and periodontally-involved subjects. Journal International Academic of Periodontology, 2005; 7: 90-96.
- 16- Ferreira B. Fitoterapia: plante essa idéia. Revista ABO Nacional, 1996; 4: 2-5.
- 17- Haslam E. Natural polyfenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. Journal of Natural Products, 1995; 59: 39-43.
- 18- IPA. Empresa Pernambucana de Pesquisas Agropecuária (Recife, PE). Rita de Cássia A. Pereira. Exsicata n. 61336, 15 Out. 2002, 27 Set. 2005.
- 19- Jorge LIF, Silva GA, Ferro VO. Diagnose laboratorial dos frutos de *Anacardium occidentale* L. (caju). Revista. Brasileira de Farmacognosia, 1996; 5: 55-69.
- 20- Kreuger MRO, Ternes CE, Mello LL, Cruz AB, Leite SN, Tames DR. The influence of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* on the healing of infected dental alveoli: A histological study in rats. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2007; 17: 349-355.
- 21- Kulak Y, Arikan A, Kazazoglu E. Existence of *Candida albicans* and microorganisms in denture stomatitis patients. Journal of Oral Rehabilitation, 1997; 24: 778-790.
- 22- Luo G, Samaranayake LP. *Candida glabrata* and emerging fungal pathogen, exhibits superior relative cell surface hydrophobicity and adhesion to denture acrylic surfaces compared with *Candida albicans*. APMIS, 2002; 110:601-610.
- 23- Lustosa SR, Galindo AB, Nunes LCC, Randau KP, Rolim Neto PJ. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. Revista. Brasileira de Farmacognosia, 2008; 18: 447-454.
- 24- Martins ER. Plantas medicinais. Viçosa; UFV; 2000. p.
- 25- Mendonça RPC. Estudo da atividade biológica de *Pithecolobium avaremotemo* Mart. e de alguns compostos obtidos comercialmente. Maceió, 2000 (Dissertação de Mestrado). Maceió: Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Alagoas; 2000.
- 26- Melo AFM, Santos EJV, Souza LFC, Carvalho AAT, Pereira MSV, Higino JS. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Anacardium occidentale* L. sobre espécies de *Streptococcus*. Revista Brasileira de Farmacognosia 2006; 16: 202-205.

- 27- Melo Júnior EJM, Raposo MJ, Sant'A na AEG, Lisboa Neto JÁ, Diniz MFA. Estudo de plantas medicinais com atividade antimicrobiana sobre microrganismos presentes na alveolite. *Revista ABO Nacional*, 2000; 8: 4-9.
- 28- Migliatti JFZ. Barbatimão (*Stryphnodendron* spp. Leguminosae). *Jornal Brasileiro de Fitomedicina*, 2003 1: 32-35.
- 30- Nikawa H, Yamashiro H, Makihiro S, Nishimura M, Egusa H, Furukawa M, Setijanto D, Hamada T. In vitro cariogenic potential of *Candida albicans*. *Mycoses* 2003; 46: 471-478.
- 29- Gebara, ECE, Zardetto, CGDC, Mayer, MPA. Estudo in vitro da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*. **Revista de Odontologia da Univ. de São Paulo** 1996,10 (4): 251-56.
- 31- Oliveira FQ, Gobira B, Guimarães C, Batista J, Barreto M, Souza M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2007; 17: 466-476.
- 32- Paixão CCB. Uso de plantas medicinais em pacientes portadores de afecções bucais. *Odontologia Clínico-científica*, 2002; 1: 1-4.
- 33- Pereira JV, Pereira MSV, Sampaio FC. Efeito antibacteriano e antiaderente in vitro do extrato da *Punica granatum* Linn. Sobre microrganismos do biofilme dental. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2006; 16: 88-93.
- 34- Portillo A, Vila R, Freixa B, Adzet T, Cañigüeral S. Antifungal activity of region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2001; 18: 472-508.
- 35- Percival, R.S. et al. The effect of cocoa polyphenols on the growth, metabolism and biophilm formation by *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. *European Journal of Oral Science*, v.114, p.343-8, 2006.
- 35- Santos SC, Ferreira FS, Rossi-Alva JC, Fernandez LG 2007. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17: 215-219.
- 36- Sarmiento DMA. Isolamento e identificação de substâncias biotivas de *Pithecellobium cochliocarpum* Macbr. João Pessoa, 1999 (Dissertação de Mestrado). João Pessoa: Centro de Ciências Exatas da Natureza, Universidade Federal da Paraíba; 1999.
- 37- Shinada K, Ozaki F, Cordiero JG, Okada S, Shimoyama K, Nagao M, Ichinose S, Yamashita Y. A morphological study of interactions of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. *Kokubyo Gakkai Zasshi*, 1995; 62: 281-286.
- 38- Silva MIG, Gondim APS, Nunes IFS, Sousa FCF 2006. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16: 455-462.

- 39- Silva MSA, Silva MAR, Higino JS, Pereira MSV, Carvalho AAT. Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2008; 18: 236-240.
- 40- Simões CC, Araújo DB, Araújo RPC. Estudo in vitro e in vivo da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2008; 18: 84-89.
- 41- Soyama P. Plantas medicinais são pouco exploradas pelos dentistas. Ciência e Cultura, 2007; 59: 12-13.
- 42- Torres CRG, Kubo CH, Anido AA, Rodrigues JR. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na Odontologia. Pós-Grad Rev Fac Odontol São José dos Campos, 2000; 3: 43-52.
- 43- Vasconcelos KRF, Veiga Junior VF, Rocha WC, Bandeira MFCL. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de um cimento odontológico à base de óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2008; 18: 733-738.
- 44- Vasconcelos LCS, Sampaio FC, Sampaio MCC, Pereira MSV, Higino JS, Peixoto MHP. Minimum inhibitory concentration of adherence of *Punica granatum* Linn (pomegranate) gel against *S. mutans*, *S. mitis* and *C. albicans*. Brazilian Dental Journal, 2006; 17: 223-227.
- 45- Vendola MCC. *Equinacea purpurea* na odontologia. Tecnicas Esteticas, 2004; 1: 3-12.
- 46- Xu HX, Lee F. Song activity of plant fl avonoids against antibiotic- resistant bacteria. Phytotherapia Research, 2001; 15: 39-43.

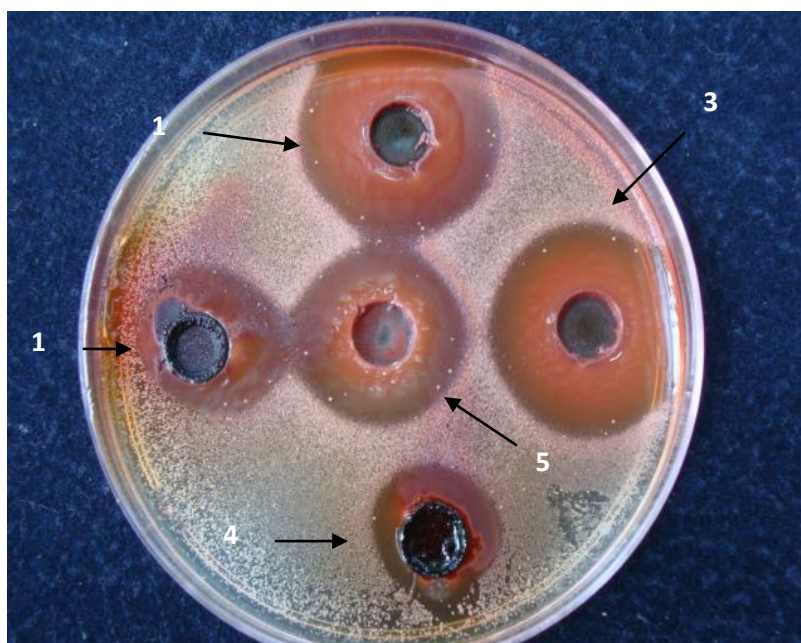


Figura 1. Atividade antimicrobiana do extrato etanólico das cascas de *A. cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes sobre o crescimento de *Streptococcus mutans* nas concentrações de (1) extrato bruto; (2) diluição 1:2; (3) diluição 1:4; (4) diluição 1:8; (5) diluição 1:16.

Tabela 1- Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em meio sólido do extrato etanólico de *Abarema cochliocarpa* sobre microrganismos orais

Linhagens bacterianas		Diâmetro dos halos de inibição (mm) Concentração do extrato (mg/mL)								
		EB	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
<i>S. mutans</i>	19	18	18	18	17	17	16	16	0	0
<i>S.sanguinis</i>	20	18	18	18	17	16	15	15	12	10
<i>S.oralis</i>	16	15	15	15	15	15	14	14	11	10
<i>S.salivares</i>	17	17	16	16	16	16	15	13	0	0
<i>S. mitis</i>	17	15	15	15	13	13	13	11	10	0
<i>L. casei</i>	30	26	24	21	19	19	17	15	12	10

EB= Extrato Bruto; mm= milímetros; mg/mL = miligrama por mililitro. Programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences).

Tabela 2 – Informações sobre a concentração inibitória mínima (mg/mL) do extrato de *Abarema cochliocarpa* e do Gluconato de clorexidina a 0,12%.

Linhasgens	Diâmetro dos halos de inibição (mm)									
	Extrato de <i>A. cochliocarpa</i> - Concentração (mg/mL)									
Bacterianas	EB	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
<i>Streptococcus mitis</i>	17	16	16	15	13	13	13	11	10	0
<i>Streptococcus mutans</i>	19	18	18	18	17	17	16	16	0	0
<i>Streptococcus sanguinis</i>	20	18	18	18	17	16	15	15	12	10
<i>Streptococcus oralis</i>	16	15	15	15	15	15	14	14	11	10
<i>Streptococcus salivarius</i>	17	17	16	16	16	16	15	13	0	0
<i>Lactobacillus casei</i>	30	26	24	21	19	19	17	15	12	10
Medidas descritivas	EB	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
Mínimo	16	15	15	15	13	13	13	11	0	0
Máximo	30	26	24	21	19	19	17	16	12	10
Média	19,8	18,3	17,8	17,2	16,2	16,0	15,0	14,0	7,5	5,0
D. Padrão	5,19	3,93	3,25	2,32	2,04	2,00	1,41	1,79	5,86	5,48

Linhasgens	Diâmetro dos halos de inibição (mm)									
	Gluconato de Clorexidina a 0,12% - Concentração (mg/mL)									
Bacterianas	SP	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
<i>Streptococcus mitis</i>	18	17	16	14	10	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus mutans</i>	18	17	16	15	12	10	0	0	0	0
<i>Streptococcus sanguis</i>	20	18	15	14	12	10	0	0	0	0
<i>Streptococcus oralis</i>	22	20	18	17	16	14	11	10	0	0
<i>Streptococcus salivarius</i>	25	22	21	20	19	17	15	10	0	0
<i>Lactobacillus casei</i>	23	22	21	19	17	15	12	10	0	0
Medidas descritivas	SP	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
Mínimo	18	17	15	14	10	0	0	0	0	0
Máximo	25	22	21	20	19	17	15	10	0	0
Média	21,0	19,3	17,8	16,5	14,3	11,0	6,3	5,0	0,0	0,0
D. Padrão	2,83	2,34	2,64	2,59	3,50	6,07	7,06	5,48	0,00	0,00

EP: Extrato Puro, SP: Substância Pura; Programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences).

Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) do extrato etanólico de *Abarema cochliocarpa* e gluconato de clorexidina a 0,12% sobre microorganismos orais.

Linhagens bacterianas	Extrato etanólico de <i>A. cochliocarpa</i> (CIMA)	Gluconato de clorexidina a 0,12%.
<i>S. mutans</i>	1:256	1:16
<i>S. sanguinis</i>	1:512	1:16
<i>S.oralis</i>	1:512	1:16
<i>S.salivares</i>	1:256	1:16
<i>S. mitis</i>	1:512	1:16
<i>L. casei</i>	1:128	1:16

Tabela 4: Extrato de *A. cochliocarpa* (mg/mL): Teste não-paramétrico de Kolmogorov-Smirnov do extrato de casca de *A. cochliocarpa*.

[illegible]

Tabela 5: Gluconato de clorexidina a 0,12% (mm/mg): Teste não-paramétrico de Kolmogorov-Smirnov do digluconato de clorexidina a 0,12%.

[illegible]

Tabela 6. Resultados do teste t-Student (CIM: extrato da casca de *A. cochliocarpa* versus clorexidina).

Concentração do Extrato (mg/mL)	CIM - Média		Estatística t (calculada)	Graus de liberdade (g.l)	Significância (p-valor)
	Babatenon	Clorexidina			
EB vs. SP	19,83	21,00	-0,483	10	0,639
E1:2	18,33	19,33	-9,535	10	0,604
E1:4	17,83	17,83	0,000	10	1,000
E1:8	17,17	16,50	0,47	10	0,648
E1:16	16,17	14,33	1,108	10	0,294
E1:32	16,00	11,00	1,917	10	0,084
E1:64	15,00	6,33	2,948	5,4 ⁺	0,029*
E1:128	14,00	5,00	3,826	6,1 ⁺	0,009**

⁺ Não se verifica a igualdade de variâncias; * Sig. p-valor < 0,05 (resultados significativos). ** Sig. p-valor < 0,01 (resultados significativos).

6 Artigo

Artigo submetido à revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas



Atividade antimicrobiana de *Abarema cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes, Leguminosae

Screening antimicrobial activity of *Abarema cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes, Leguminosae

Renata Patrícia Freitas Soares de Jesus¹; Rosilma de Oliveira Araujo¹; Isla Vanessa Gomes Alves Bastos¹; Kêsia X.F.R.²; Fábio Correia Sampaio³; Ivone Antônia de Souza²

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco

² Departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Brasil

³ Departamento de Odontologia Clínica e Social – Universidade Federal da Paraíba, UFPB, Brasil

Resumo

Abarema cochliocarpa (Gomes) Barneby & Grimes, Leguminosae, é uma planta nativa do Brasil. Conhecida popularmente como “barbatimão”, a decocção das cascas do caule é frequentemente utilizada na medicina tradicional como cicatrizante, analgésica, antiinflamatória, anti-séptica e para o tratamento de leucorreias. Este estudo avaliou a ação antimicrobiana, *in vitro*, do extrato etanólico das cascas de *A. cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes, pelo o método de difusão em disco de papel. Os dados obtidos foram significativos para as espécies *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis*. A concentração inibitória mínima (CIM = 62,5 µg/mL) foi obtida com o extrato etanólico das cascas frente a *B. subtilis*. Os resultados incentivam a realização de novas pesquisas que viabilizem a produção de compostos com finalidade terapêutica que possam ser utilizados clinicamente.

Palavras-chave: *Abarema cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes, Leguminosae, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT: *Abarema cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes is a Brazilian native plant, Popularly known as “barbatimão”, the decoction of stem bark is frequently used in traditional medicine for wound-healing, as analgesic, antiinflammatory, antiseptic and to treat leucorrhea. This study evaluated the action antimicrobial of ethanolic extract of *A. cochliocarpa* barks by the paper disk-diffusion method. The obtained data were satisfactory for species *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecali*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis*. The lowest inhibitory concentration (MIC = 62,5 µg/mL) was obtained with the ethanolic bark extract against *B. subtilis*. These results encourage new studies for the production of therapeutic compounds to be used in clinical.

Key words: *Abarema cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes, antimicrobial activity

1. Introdução

Várias comunidades têm feito uso de plantas que não tiveram seus efeitos analisados, o que pode representar sérios riscos à saúde. Por isso, estudos acerca das propriedades farmacêuticas de diversas plantas têm se intensificado a fim de minimizar esses riscos, bem como buscar novas drogas eficazes para o combate de algumas doenças (SANTOS et al., 2007).

Abarema cochliocarpa (Gomes) Barneby & Grimes (Leguminosae) é uma planta nativa do Brasil encontrada comumente na mata atlântica (IUCN, 2004). Conhecida popularmente como “barbatimão”, a decocção das cascas do caule é freqüentemente utilizada na medicina tradicional como cicatrizante, analgésica, antiinflamatória, anti-séptica e para o tratamento de leucorréias entre outros usos (SILVA, 2006; AGRA et al., 2008). As propriedades farmacológicas desta espécie não têm sido extensivamente estudadas e apenas poucos estudos têm sido reportados (SILVA et al., 2009). O extrato aquoso reduziu lesões gástricas causadas pelo álcool (SILVA, 2003), o extrato hidroetanólico de suas cascas mostrou atividade antimicrobiana (SANTOS et al., 2007) e o extrato aquoso das cascas mostrou atividade antinociceptiva (SILVA, 2009). Em relação aos seus constituintes químicos, estudos relatam a presença de taninos, triterpenóides, catequinas, saponinas, fenóis e antraquinonas (MENDONÇA, 2000; SILVA, 2009).

Considerando o desafio que a descoberta de novos fármacos a partir de plantas, este trabalho teve como objetivo realizar uma avaliação preliminar do potencial antimicrobiano *in vitro* do extrato bruto etanólico de *Abarema cochliocarpa* frente a culturas de algumas bactérias relacionadas à saúde humana.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Material Botânico e obtenção do extrato

Amostras de *A. cochliocarpa* foram coletadas no NUPA (Núcleo de Pesquisa e Processamento de Alimentos/ UFPB), em João Pessoa – PB, e posteriormente identificadas pela botânica Dr^a Rita de Cássia de A. Pereira (IPA-PE). Uma excicata foi depositada no do herbário “Prof. Lauro Pires Xavier”, da Universidade Federal da Paraíba, sob o número 61.336. O processo de secagem foi efetuado em temperatura ambiente durante 24h. Em seguida foi colocado na estufa a 33°C durante uma semana, sendo posteriormente triturada a pó. A extração foi realizada em álcool etílico 95% (p/p) e, após uma semana de maceração, foi obtido o extrato bruto por filtração. Este foi evaporado em rotavapor a 40°C obtendo-se resíduo escuro e higroscópico.

Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi verificada *in vitro*, pelo método de difusão em meio sólido (BAUER et al., 1966). Os extratos foram testados frente aos seguintes microrganismos que pertencem à coleção de microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco: *Staphylococcus aureus* UFPEDA 01; *Micrococcus luteus* UFPEDA 06; *Bacillus subtilis* UFPEDA 16; *Enterococcus faecalis* UFPEDA 138; *Escherichia coli* UFPEDA 224; *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 39; *Serratia marcescens* UFPEDA 398; *Mycobacterium smegmatis* UFPEDA 71; *Candida albicans* UFPEDA 1007. Os microrganismos teste foram padronizados pela turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland em solução fisiológica (BARRY, 1986; KONEMAN, 1997), correspondente a uma concentração de aproximadamente 10^7 UFC/mL para fungos e 10^8 UFC/mL para bactérias.

As bactérias foram inoculadas em Mueller Hinton Agar (*S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. marcescens*) e em glicose extrato de levedura (*E. faecalis* e *M. smegmatis*). Para a inoculação dos fungos foi utilizado o meio Sabouraud (*C. albicans*). Sobre o meio inoculado foram colocados discos de papel xarope estéreis, de 6 mm de diâmetro, embebidos com 10 µL da solução do extrato a 200.000 µg/mL. Após a colocação dos discos, as placas foram incubadas durante 24 h e 48 h à temperatura de 30 °C e 37 °C.

Os extratos foram testados em triplicata e os diâmetros dos halos foram expressos pela média $\pm$ desvio padrão dos resultados obtidos nas três repetições. Halos iguais e superiores a 10 mm foram considerados significativos de atividade antibiótica (AWADH ALI et al., 2001; BAKSHU et al., 2001; KHAN et al., 2001 e CHOWDHURY et al., 2002; FERRONATTO et al., 2007; SILVA et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2007).

Os antibióticos kanamicina e cetoconazol foram utilizados no testes como padrões, nas concentrações de 30 µg/disco e 300 µg/disco, respectivamente.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada, para os extratos que exibiram melhores atividades antibióticas, pelo método de diluições seriada em meio sólido (CARVALHO et al., 2002). Alíquotas de diferentes volumes (1,0, 0,5, 0,25, 0,125, 0,06 e 0,03 mL) de uma solução a 20.000 µg/mL foram colocadas em placa de Petri e homogeneizadas com 21 mL do meio de cultura ideal para o crescimento de cada microrganismo. Os microrganismos teste foram semeados, em estrias, sobre a superfície do meio e as placas foram incubadas a 37 °C e 30 °C por 24 h e 48 h. Valores de CIM iguais ou superiores a 1000 µg/mL não foram considerados satisfatórios (HOLETZ et al. 2002).

3. Resultados e Discussão

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é considerada como um problema por este motivo é preciso sempre à busca de novas fontes terapêuticas os quais sejam mais eficientes para o tratamento de infecções, como as bacterianas.

O uso do barbatimão pode ser indicado uma vez que, no presente estudo, a maioria das linhagens estudadas demonstrou sensibilidade ao extrato. Observaram-se halos de inibição de 10 a 24 mm, sendo considerado ativo o extrato que mostrou halos de inibição igual ou superior a 10 mm. O extrato etanólico das cascas de *A. cochiliocarpa* apresentou atividade frente a *S. aureus*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *M. smegmatis*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* sendo os melhores resultados observados frente a *M. luteus* ($24 \pm 0,6$ mm). O extrato não mostrou atividade antimicrobiana frente a *E.coli* e *S. marcescens* (Tabela 1).

Frente ao fungo *Candida albicans*, o extrato etanólico de *A. cochiliocarpa* apresentou halos de $12 \pm 0,6$ mm enquanto que o padrão cetoconazol exibiu halos de inibição de 45 mm em média, apresentando concentração inibitória de 500 µg/mL.

Tabela 1. Atividade antimicrobiana de extrato etanólico bruto das cascas de *A. cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes produzidos a partir da planta seca (2.000 µg/disco).

Microrganismos	EB a 2.000µg/disco	Kanamicina (30 µg/disco)	Cetoconazol (300 µg/disco)
Halos de Inibição em mm			
<i>S. aureus</i>	15±0,3	29	-
<i>M. luteus</i>	24±0,6	32	-
<i>B. subtilis</i>	12±0,6	30	-
<i>P. aeruginosa</i>	10±0,2	22	-
<i>M. smegmatis</i>	15±0,3	35	-
<i>E. faecalis</i>	14±0,4	13	-
<i>E. coli</i>	s.a	23	-
<i>S. marcescens</i>	s.a	20	-

EB = Extrato Bruto de *P. cochliocarpum*. sa - sem atividade. Numeração correspondente a identificação dos microrganismos da coleção do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco: *Staphylococcus aureus* UFPEDA 01; *Micrococcus luteus* UFPEDA 06; *Bacillus subtilis* UFPEDA 16; *Enterococcus faecalis* UFPEDA 138; *Escherichia coli* UFPEDA 224; *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 39; *Serratia marcescens* UFPEDA 398; *Mycobacterium smegmatis* UFPEDA 71.

O extrato etanólico de *A. cochliocarpa* apresentou ação antimicrobiana sobre bactérias Gram positivas, tanto na literatura estudada quanto neste trabalho. Recentemente, Santos et al., 2007 avaliaram o potencial antimicrobiano *in vitro* do extrato hidro-alcoólico da casca de *A. cochliocarpa* frente as cepas de *S. aureus*, *M. luteus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* isoladas de amostra clínica. Os ensaios de atividade antimicrobiana *in vitro* mostraram que o extrato hidro-alcoólico da casca de *A.*

cochliocarpa inibiu o crescimento das cepas Gram-positivas, mas não foi capaz de inibir o crescimento das cepas Gram-negativas corroborando com os resultados encontrados. Neste estudo, as bactérias gram-negativas *E. coli* e *S. marcescens* apresentaram resistência ao extrato etanólico do babatenon.

Tabela 2. Valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM) em µg/mL para os extratos brutos das cascas de *A. cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes frente aos microrganismos testes.

Microorganismos	Extrato Bruto (µg/mL)
<i>S. aureus</i>	2000
<i>M. luteus</i>	62,5
<i>B. subtilis</i>	2000
<i>M. smegmatis</i>	500
<i>E. faecalis</i>	> 2000

n.t = não testado. Numeração correspondente a identificação dos microrganismos da coleção do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco: *Staphylococcus aureus* UFPEDA 01; *Micrococcus luteus* UFPEDA 06; *Bacillus subtilis* UFPEDA 16; *Enterococcus faecalis* UFPEDA 138; *Escherichia coli* UFPEDA 224; *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 39; *Serratia marcescens* UFPEDA 398; *Mycobacterium smegmatis* UFPEDA 71.

A capacidade de inibição do crescimento bacteriano do extrato da casca de *A. cochliocarpos* frente às cepas Gram-positivas pode estar diretamente relacionada com a estrutura da parede celular das mesmas. Tendo em vista que essa é a principal característica que separa os dois grupos e também devido à presença da membrana externa das cepas Gram-negativas, pois ela age como barreira para certos tipos de antibióticos, enzimas digestivas, detergentes e metais pesados (TORTORA; FUNKE; CASE, 2003).

O extrato de *A. cochliocarpa*, embora ativo contra bactérias e fungos nesta pesquisa, não demonstrou atividade contra os microrganismos da orelha externa estudados por Nogueira et al, 2008, os quais avaliaram a atividade antibacteriana e antifúngica *in vitro* dos extratos e/ou óleos essenciais, obtidos das seguintes plantas medicinais: macassá, babatenon, cravo-da-índia, capim-santo, camomila, hortelã da folha grossa e arruda sobre agentes etiológicos de otite externa. Segundo os autores o extrato das cascas de *A. cochliocarpa* não apresentou atividade contra as cepas de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, e fungos do gênero *Candida*. Estes achados podem dever-se à virulência dos patógenos e/ou as características do extrato.

A atividade de óleos essenciais e extratos de plantas contra bactérias e fungos deve-se à presença de fitoconstituintes, cuja concentração pode variar dependendo de inúmeros fatores, que vão desde o cultivo da planta, a sua coleta, até a forma de obtenção do extrato ou óleo essencial (BEGUM et al., 1993).

A avaliação da concentração inibitória mínima do extrato das cascas do *A. cochliocarpa*, mostrou concentrações inibitórias entre 62,5 a 1.000 µg/mL para *M. luteus*, *M. smegmatis* (Tabela 2), diferindo dos resultados mencionados por Santos et al. (2007) os quais encontraram valores de CIM para extratos hidroalcoólicos das cascas de *A. cochliocarpa* de 0,1562 mg/mL para *M. luteus*. Em relação a *C. albicans* o valor da CIM foi de 500 µg/ML.

Considerando os constituintes presentes em plantas, a atividade antimicrobiana positiva do extrato do barbatimão frente a amostras estudadas pode ser devido à presença de compostos como taninos (compostos polifenólicos) e alcalóides previamente encontrados na planta, uma vez que estes compostos têm comprovada ação antimicrobiana, e que compostos fenólicos possuem uma ação inespecífica sobre o

microrganismo, rompendo a parede celular bacteriana, inibindo os sistemas enzimáticos para a formação da mesma (HASLAM, 1995).

A atividade antimicrobiana observada para os extratos das raízes e das folhas de *A. cochliocarpa* incentivam novas pesquisas com substâncias isoladas com o intuito de estabelecer o constituinte ou os constituintes químicos responsáveis por tal atividade.

Conclusões

Dado o exposto, pode-se concluir que o extrato etanólico das cascas de *A. cochliocarpa* apresenta potencial atividade antimicrobiana sobre *S. aureus*, *B. subtilis*, *M. smegmatis*, *M. luteus*, *E. faecalis* e *Candida albicans*.

A atividade antimicrobiana observada com o extrato etanólico das cascas de *A. cochliocarpa* serve de subsídio a futuros experimentos que visem elucidar as substâncias ativas deste extrato bem como seu mecanismo de ação e atividade antimicrobiana sobre outros microrganismos. A busca por agentes antimicrobianos com aplicabilidade terapêutica e economicamente viáveis torna-se um evento importante na promoção da saúde da população.

Referências

- Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, França PF, Barbosa-Filho JM 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 18: 472-508.
- Araújo CW, Peixoto Neto PAS, Campos NV, Porfírio Z, Caetano LC 2002. Antimicrobial activity of *Pithecolobium avaremotermo* bark. *Fitoterapia* 73: 698-700.
- Awadh Ali NA, Julich WD, Kusnick C, Lindequist U 2001. Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities. *J Ethnopharmacol* 74: 173- 179.

Bakshu LMD, Ram AJ, Raju RRV 2001. Antimicrobial activity of *Securinega leucopyrus*. *Fitoterapia* 72: 930-933.

Barry AL 1986. Procedure for testing antimicrobial agents in agar media: theoretical considerations. In: Lorian V (ed) *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Baltimore: Williams & Wilkins. p.13.

Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turk M 1966. Antibiotic susceptibility testing by the standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45: 493 - 496.

Begum J, Yusuf M, Chowdhury JU, Wahab MA 1993. Studies on essential oils for their antibacterial and antifungal properties. Part-I: Preliminary screening of 35 essential oils. *J Sci Ind Res*; 28: 25-34.

Carvalho AA, Sampaio MCC, Sampaio FC, Melo AFM, Sena KXFR, Chiappeta AA, Higino JS 2002. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos hidroalcoólico de *Psidium guajava* L. sobre bactérias Gram-negativas. *Acta Farm Bonaerense* 21: 255-258.

Chowdhury D, Sayeed A, Islam A, Bhuiyan MSA, Khan GRMAM 2002. Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Aerva lanata*. *Fitoterapia* 73: 92-94.

Ferronato R, Marchesan ED, Pezenti E, Bednarski F, Onofre SB 2007. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). *Rev Bras Farmacogn* 17: 224-230.

Haslam E 1995. Natural polyfenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. *J Nat Prod* 59: 205-215

Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias Filho BP 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 1027-1031.

IUCN 2004. Red List of Threatened Species, <http://www.redlist.org>, access in august 2004

Khan MR, Kihara M, Omoloso AD 2001. Antimicrobial activity of *Symplocos cochinchensis*. *Fitoterapia* 72: 825-828.

Koneman EW 1997. *Diagnóstico microbiológico*. México: J. B. Lippincott Co.

Mendonça, RPC 2000. *Estudo da atividade biológica de Pithecolobium avaremotemo Mart. e de alguns compostos obtidos comercialmente*. Maceió, 123p.

Nascimento PFC, Nascimento AC, Rodrigues CS, Antonioli AR, Santos PO, Barbosa Júnior, Trindade RC 2007. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Rev Bras Farmacogn* 17: 108-113.

Nogueira J, Rodrigues C, Diniz MFM, Lima EO 2008. Atividade antimicrobiana *in vitro* de produtos vegetais em otite externa aguda. *Rev Bras Otorrinolaringol*, 74:118-24.

Pereira, RS et al. 2004. Antibacterial activity of essential oils on microorganisms isolated from urinary tract infection. *Revista de Saúde Pública*, 38: 1-3.

Santos PO, Barbosa Junior AM, Mélo DLFM, Trindade RC 2007. Investigação da atividade antimicrobiana do látex da mangabeira (*Hancornia speciosa* GOMES). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 9: 108-111.

Santos SC, Ferreira FS, Rossi-Alva JC, Fernandez LG 2007. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes. *Rev Bras Farmacogn* 17: 215-219.

Silva, MS 2003. *Avaliação farmacológica de plantas medicinais de uso popular contra distúrbios do trato gastrointestinal no Povoado Colônia Treze em Lagarto/SE*. Sergipe, 118 pp. MSc. Thesis, Federal University of Sergipe

Silva NCB 2006. *Potencial biotecnológico de plantas medicinais: estudo etnofarmacológico em uma comunidade quilombola da Chapada Diamantina - BA*. Rio de Janeiro, 227 p. Ph. D. Thesis -Universidade Federal do Rio de Janeiro

Silva NCB, Esquibel MA, Alves IM, Velozo ES, Almeida MZ, Santos JES, Campos-Buzzi F, Meira AV, Cechinel-Filho V 2009. Antinociceptive effects of *Abarema cochliocarpos* (B.A. Gomes) Barneby & J.W.Grimes (Mimosaceae). *Rev.Bras.de Farmacogn*.19: 10-15.

Silva JG, Souza IA, Higino JS, Siqueira-Junior JP, Pereira JV, Pereira MSV 2007. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. *Rev Bras Farmacogn* 17: 572-577.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL 2003. *Microbiologia*. Porto Alegre: ArtMed.

7 Artigo IV

Artigo submetido à Revista Brasileira de Farmacognosia



Evaluation of ethanoholic extract of *Abarema cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes in the healing process of wound skin in rats

Renata P. de Freitas Soares^{1*}, Isla V. G. A. Bastos¹, Luiz F. da S. A. de Lima¹, Paloma L. de Medeiros², Mário R. de Melo-Júnior², Jane S. Higino³, Fábio Correia Sampaio⁴, Ivone A. de Souza⁴.

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife-PE, CEP 50740-521, Brasil.

²Departamento de Histologia e Embriologia – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife-PE, CEP 50740-521, Brasil.

³Departamento de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife-PE, CEP 50740-521, Brasil.

⁴Departamento de Clínica e Odontologia Social – Universidade Federal da Paraíba – UFPE, João Pessoa – PB, Brasil

⁵Departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife-PE, CEP 50740-521, Brasil.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the wound-healing in cutaneous tissue of rats by a topical application of cream containing ethanolic extract obtained from *Abarema cochliocarpa* stem barks. The animals were divided into four experimental groups: G1 group of treated with cream inert (n = 6/group), the G2 treated rats with dexpanthenol (n = 6), the G3 treated with the cream of the ethanolic extract of *A. cochliocarpa* in the dose of 51, 5 mg/kg (n = 6) and the G4 treated with the same cream in the dose of 103 mg/kg (n = 6). The wounds were analyzed microscopically for 14 days. In histological evaluation preparations stained with HE and Masson's trichrome were considered the type of reaction inflammatory as the predominant cell, presence of scars, presence of granulation

fabric, neovascularization, fibroplasias and epithelialization degree. The cream containing showed cicatrizing effect, with a significant decrease in the reaction inflammatory, intense reepitelization and fibroplasias, similar to group treated with dexpantenol. These results suggest that the use of topical creams containing ethanolic extract obtained from *A. cochliocarpa* had a significant effect on healing in cutaneous ulcers on the skin of rats. It might justify its use in folk medicine.

Key-words: Skin, wound healing, *Abarema cochliocarpa*.

INTRODUCTION

Wound healing is a highly ordered and well coordinated process that involves inflammation, cell proliferation, matrix deposition, tissue remodeling, collagenation and epithelialization. Many investigators evaluated the wound healing properties of many of the medicinal herbs, clinically on animal models using excision, incision and dead space models (Angela et al., 2001; Kumara Swamy et al., 2007). According to traditional medicine, wounds have been treated topically with various medicinal herbs or their extracts since time immemorial.

Several studies have shown the topical effect of medicines upon a wound, such as antibiotics (Raphael, 1965), association of an antibiotic with amino acids (Carvalho; Okamoto, 1977), antibacterial drugs (Carvalho; Oliveira, 1990), anti-inflammatories (Chaves; Petroianu et al., 2004; Upadhyay et al., 2009) to shorten healing time and avoid infections and aesthetic damages.

Abarema cochliocarpa (Gomes) Barneby & Grimes (Leguminosae) is a Brazilian native plant, occurring mainly in the Atlantic Forest (Iganci; Morim, 2009). In the Brazilian system of medicine, the attribution of these species has been known for a long time. As

per the traditional claims, the barks were used as an wound-healing, as analgesic, antiinflammatory, antiseptic and to treat leucorrhea, among other uses (Silva, 2006; Agra et al., 2008). The pharmacological properties of that bark extracts have been evaluated for wound healing and antimicrobial activity (Araujo et al., 2002; Silva, 2003, Santos et al., 2007). Phytochemically the plant has been reported to contain tannins, triterpenoids, catechins, saponins, phenols and anthraquinones (Mendonça, 2000; Silva, 2009).

The wound-healing property of this Mimosaceae member has not been scientifically evaluated so far. Hence, the present work was undertaken to evaluate the effect of ethanolic extract of *A. cochliocarpa* (EEAc) on excision model in rats.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

Stem barks of *A. cochliocarpa* were collected around João Pessoa - State of Paraíba – Brazil, during the month of January, 2006. A voucher specimen (N° 61.336) has been deposited in herbarium Prof. Lauro Pires Xavier of Botanical Department of the Federal University of Paraíba.

Preparation of the extract

The air dried powdered stem barks (3 kg) were extracted with 70% ethyl alcohol (3 x 3000 mL) and the pooled extract was concentrated under vacuum below 50 °C to give 560 g of gummy material.

Animals

The sample consisted of 72 adult female albino Wistar rats (*Rattus norvegicus*), with body weight ranging from 300 ± 10 grams. The animals came from the central

vivarium at Antibiotic Department of the Federal University of Pernambuco under controlled light and temperature conditions, with standard food and water available *ad libitum*. All the animals were carefully monitored and maintained in accordance with the ethical recommendation of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and the National Institute of Health Guide for Care and use of Laboratory Animals. This study was approved by the Committee of Ethics in Research at, Federal University of Pernambuco under protocol number 040505/2007-11

Animal protocol

The animals were intraperitoneally (i.p.) anesthetised with ketamine (Ketalar[®]) of the 50 mg/kg and xylazine (Xylazina[®]) of the 10 mg/kg. After manual depilation and antisepsis with povidone on the cervical back, a 1mm² excision was made with a bistoury. The animals were randomly separated into four experimental groups: G1 group of treated with cream inert (n = 6), the G2 treated rats with dexpanthenol (n = 6), the G3 treated with the cream of the ethanolic extract of *A. cochliocarpa* in the dose of 51,5 mg/kg (n = 6) and the G4 treated with the cream of the ethanolic extract of *A. cochliocarpa* in the dose of 103 mg/kg (n = 6), once a day. These groups were distributed into three subgroups according to the period of euthanasia, three, seven and fourteen days after the wounds.

Histologic analysis

The wound tissues were fixed with 10% formalin, embedded in paraffin, and sectioned. Sections of 5 µm thickness were stained using hematoxylin-eosin (HE) and Masson's trichrome stain for collagen content. In microscopy (MOTIC BA200) was evaluated the type of reaction inflammatory as the predominant cell, presence of scars, presence of granulation fabric, neovascularization, fibroplasias, epithelialization degree. The data were collected in proper fiche and evaluated as one describes in Picture 1.

For analysis statistics the Accurate test of Fisher (software "Epi-Info") for independent samples was used, p was adopted $\leq 0,05$ or 5% as level for rejection of the nullity hypothesis.

RESULTADOS

Microscopically evaluation of the cutaneous wound:

a) Type of inflammatory reaction (**Figure 1**):

In 3th day the inflammatory reaction revealed acute in 77,8% of the wounds of the G1 group, 80,9% in the G3 group, 87,8% in the G4 and 93% in the G2 group. In 7th day it was observed reaction acute-chronic in 83% of the wounds of the G1, already the groups G2, G3 and G4 had presented 92%, 74% and 78% of inflammatory standard of the acute type, respectively. However the differences between the groups, had not been significant ($p = 0,523$). In 14th day, the percentage of the wounds with inflammatory reaction of the chronic type was of 63,5% in the group has controlled. In the G2 groups, G3 and G4 had absence of inflammatory reaction in the 14th day.

b) Presence of scars (**Figure 2**):

In 3th day the presence of scars in the wounds was of moderate intensity in the groups G1, G3 and intense G4 and in the G2 group. In 7th day was intense in 100% of the G2, 87% of G3 and 93% of the moderate G4 and in 77,8% of the G1 group. In 14th day they were discrete in 87,5% of the wounds of the G2, 91,3% of G3 and 92,6% of the G4, but without significant differences ($p_{7th\ day} = 0,335$ and $p_{14th\ day} = 0,429$). Already the G1

group statistical presented in the 14 day presence of crust of moderate intensity in 63,3% of the animals being considered different of excessively ($p \leq 0,05$).

c) The degree of epithelialization:

In 3th day none of the groups presented wounds epithelialized. In 7th day epithelialization of 1/3 of the wound in the group control (G1) and of 2/3 of the wound in the groups dealt with the cream the base of the ethanolic extract of *A. cochliocarpa* (G3 and G4) was observed. In 14th day epithelialization of 2/3 of the wound was evidenced, in 45% of the group control, 72,2% of the groups dealt with the cream the base of the etanólico extract of *A. cochliocarpa*, presented significant statistic difference ($p=0,0328$) and in 74,6% of the group dealt with dexpanthenol (G2). Did not have statistical significant difference enters the groups dealt with the cream the base of EEAc and the group dealt with dexpatenol (**Figure 3 A e B**).

d) Evaluation of the granulation tissue and neovascularization: (**Figure 4**)

The granulation tissue percentages and neovascularization had been to the same ones for the groups G2, G3 and G4. In 3th they had day been of moderate intensity in 67,8% of the G2 group, 55,6% of G3 e 68,9% in the G4. In 7th, both had development for accented in 74,4% of the G2, 62,3% of the G3 and 75,7% of the G4. However, they regress in 14th day when both revealed in scarce amounts in 75% of the G2 group, 65,6% of G3 and 82% of the G4. Although the different observed percentages, these had not been significant ($p_{3th\ day} = 0,31$, $p_{7th\ day} = 0,318$ and $p_{14th\ day} = 0,317$).

e) Evaluation of fibrose (**Figure 5**):

All the wounds of the animals of the studied groups had presented scarce degree of fibrose in 3th day. In the 7th, 100% of the wounds of the group control had day shown discrete degree whereas 88,9% of the G2, 75% of the G3 and 82% of the G4 had shown moderate degree, being this not significant difference ($p=0,524$). In 14th day fibrose was similar in groups G2, G3 and G4 and graduated as intense 85% of the animals of the G2 group, 72,5% of G3 and 79,7% of the G4 while the G1 group the fibroplasia was graduated as moderate 70,8%.

DISCUSSION

Wound healing is known to be a complex and dynamic process which usually involves distinct phases marking the healing stages and requires multiple cell types to complete a variety of cellular activities (Chithra et al., 1998; McNees, 2006). The repair of wounds involves different phases including contraction, the formation of epithelialisation and fibrosis. The biological response regulating the body's own cellular defense mechanisms contributes to the wound and its repair (Charles et al., 1995). The major issue addressed in this study was determining the effect of cream preparations on excisional wound healing and evaluating their therapeutic potential for topical application.

Data present here indicate possible that creams prepared from *A. cochliocarpa* are capable to accelerate the progression of wound closure. An increase in the rate of wound healing, characterized by a shortened period of time for fully or partially epithelialization, is marked by the better wound severity scores. Such stimulation effect of *A. cochliocarpa* preparations took into effect in excisional wounds which the healing underwent the second intention.

The macroscopic evaluation of the injuries aimed at to observe, mainly, hemorrhages, presence of crusts and secretion presence. During the study, no episode of hemorrhage did not occur, only inherent bleeds to the surgical, controlled procedures only for compression with gauzes, to the similarity of the related one for some authors (Facury Neto, 2001; Miranda, 2001; Uzunköy et al., 2001).

The scars were present to a greater extent in the wounds of the 3rd day of evaluation, in all groups. The same was observed by Bevilacqua (1984), whereby the solution of continuity caused by the removal of a skin fragment is initially filled with clot, fibrin and inflammatory exudate, which originate fibrinleukocyte scars.

The presence of inflammatory exudate justifies the occurrence of secretion observed at 3 days of study. According to Gabbiani, Majno (1972), the healing of open wounds is different from closed despite the reactions after the lesions are identical for both types, occurring inflammatory exudation, neovascularization, cell proliferation, cell migration and epithelialization to from the edges.

In relation to vascular proliferation, we observed similar behavior in all groups during the first three days of study, with lower values on day 7, and progressively decreased on day 14. Similar assessments were cited by other authors who observed within the mass of granulation tissue, blood vessels arranged perpendicular to the epithelium and that with the progress of the repair process, would be featuring in at the same time and diminish in quantity (Brito, 1996; Miranda 2001).

This antiinflammatory effect is probably due to inhibition of the biosynthesis of mediators responsible for inflammation, eg, inhibition of cyclooxygenase and hence prostaglandin. The nonsteroidal antiinflammatory inhibit the accumulation of exudates and mobilization of leukocytes between 3 and 6 hours after noxious stimulation (Vinegar et al., 1973, Almeida et al., 1980).

In relation to the polymorphonuclear cells intragroup analysis showed, for both the G1 as for G2, G3 and G4, which suffered significant decreases in the values, and progressively lower in 14 days compared to 7 days. Intergroup comparison showed no significant difference. These findings are in agreement with Sanchez Neto (1993), whereby the polymorphonuclear present high concentration at the beginning of the inflammatory process, and then decrease gradually.

On the 14th day of evaluation, the G2 had a higher number of animals with complete histological reepithelialization of wounds, however, the intergroup statistical analysis for epithelial showed no significant difference between G2, G3 and G4 in the days studied. Similar trends were reported by Modolin; Bevilacqua (1984), whereby the reepithelialization begins around 10-15 hours after injury from the margins of the wound by epithelial cells with amoeboid movements on the adjacent tissue, with purpose recoating it.

The stem bark extract of *A. cochliocarpa* has been shown to possess tannin, flavonoids and saponin on preliminary screening. The wound healing potential of the *A. cochliocarpa* extract may probably be as a result of the presence of a mixture of phytoconstituents including flavonoids and tannins.

The tannin help in the process of wounds healing, burnings and inflammations through the formation of a protective layer (complex tanning/proteins and/or polysaccharide) on the damaged skin or mucosa. Underneath of this layer the natural process of wound healing can, then, occur. A similar process occurs probably in cases of gastric ulcer, where complexed tanning layer/proteins protects the mucosa of the stomach (Haslam, 1996).

There are several reports of flavonoids that have anti-inflammatory actions (Kim et al., 2004, Middleton et al., 2000, Cazarolli et al., 2008, Yoon, Baek, 2005, Santangelo et

al., 2007). Studies show that flavonoids act by modulating cells involved with inflammation (eg, inhibiting the proliferation of T lymphocytes) by inhibiting the production of proinflammatory cytokines (eg TNF- α and IL-1), modulating the activity of enzymes pathway of arachidonic acid, such as phospholipase A2, cyclo-oxygenase and lipo-oxygenase, and modulate the enzyme forming nitric oxide, nitric oxide synthase (iNOS). (López- Posadas et al., 2008; Kim et al., 2004, Middleton et al., 2000, Havsteen, 2002, Cazarolli et al., 2008, Biesalski, 2007).

CONCLUSIONS

The results of the current study show that preparations *EEAc* have the positive effect on wound healing. The results provide the primary evidence of the medicinal property of *A. cochliocarpa* cream for topical treatment of skin injury. However, further clinical trials regarding such claims are necessary before accurate conclusions regarding these health benefits can be made.

REFERENCES

- Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, França PF, Barbosa-Filho JM. (2008). Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 18: 472-508.
- Angela FD, Liu H, Jeffrey MD, Cynthia CD, Jay LD 2001. Wound healing defects in mice lacking fibrinogen. *Blood* 97: 3691–3698.
- Almeida AP, Bayer BM, Horakova Z, Beaven MA 1980. Influence of indomethacin and other anti-inflammatory drugs on mobilization and production of neutrophils: studies with carrageenan-induced inflammation in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 214: 74-79.

- Araújo MG. 2002. Atividade antioxidante da espécie *Schinus terebinthifolius Raddi* (Aroeira-da-praia). *Reunião Nordestina de Botânica*. Rio Grande do Norte, Brasil.

- Bevilacqua RG 1984. *Cicatrização. Manual do residente de cirurgia*. São Paulo: Pedagógica e Universitária.

- Biesalski, H. K. 2007. Polyphenols and inflammation: basic interactions. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2007, 10, 724.

- Brito NMB 1996. *Aspectos morfológicos e morfométricos da cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos tratados com óleo de copaíba*. São Paulo. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Técnica Operatória e Cirurgia Experimental, Universidade de São Paulo.

- Carvalho ACP, Okamoto T 1977. Cicatrização cutânea após aplicação tópica da associação antibióticos-aminoácidos: estudo clínico e histológico em ratos. *ARS Cvrandi Odontologia* 4: 27-33.

- Carvalho PSP, Oliveira GM 1990. Cicatrização cutânea após aplicação tópica de nebacetin e gingilone em feridas infectadas: estudo clínico e histológico em ratos. *Revista de Odontologia da UNESP* 19: 75-84.

- Cazarolli, L. H.; Zanatta, L.; Alberton, E. H.; Figueiredo, M. S.; Folador P., Damazio RG, Pizzolatti MG, Silva FRMB.2008. Flavoniods: prospective drug candidates. *Mini-Rev. Med. Chem.* 2008, 8, 1429-1440.

- Charles, V.M., Rusell, R.C.G., Williams, N.S., 1995. *Short Practice of Surgery*, 20th edn. Champan and Hall, London, pp. 9–11.

- Chaves DN, Petroianu A, Alberti LR, Pereira WA 2004. Effects of Thalidomide, Cyclosporine and Diclofenac on Skin Allograft Survival in Rabbits. *Transplantation proceedings* 36: 1018-1020.

- Chithra P, Sajithlal GB, Chandrakasan G 1998. Influence of *Aloe Vera* on collagen characteristics in healing dermal wounds in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 181: 71–76.
- Farsam H, Amanlou M, Dehpour AR, Jahaniani F 2000. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Biebersteinia multifida* DC. root extract. *J Ethnopharmacol* 71: 443-447.
- Facury Neto MA 2001. *Uso sistêmico da arnica (Solidago microglossa DC) em cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos*. São Paulo. Tese de Doutorado - Escola Paulista de Medicina, Universidade de São Paulo.
- Gabbiani G, Majno G 1972. Dupuytren's contracture: fibroblast contraction? A ultrastructural study. *Am Journal Pathology* 66: 131-8.
- Havsteen, B. H. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.* 96, 67.
- Iganci, JRV; Morim, MF. 2009. Abarema (leguminosae, mimosideae) no estado do Rio de Janeiro, brasil. *Rodriguésia* 60: 581-594.
- Haslam, E 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Product* .59: 205-15.
- Kim, H. P.; Son, K. H.; Chang, H. W.; Kang, S. S. J. 2004. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Pharmacol. Sci.* 96, 229.
- Kumara Swamy HM, Krishna V, Shankar Murthy K, Abdul R, Mankani KL, Mahadevan KM, Harish BG, Rajanaika H 2007. Wound healing activity of embelin isolated from the ethanol extract of leaves of *Embelia ribes* Burm. *Journal Ethnopharmacology* 109: 529–534.
- López-Posadas, R.; Ballester, I.; Abadía-Molina, A. C.; Suárez, M. D.; Zarzuelo, A.; Martínez-Augustin, O.; de Medina, F. S. Effect of flavonoids on rat plerocytes, a

structure-activity relationship study. *Biochem. Pharmacol.* 2008, 76, 495-506.

- McNees, P 2006. Skin and wound assessment and care in oncology. *Seminars in Oncology Nursing* 22: 130–143.

- Mendonça, RPC 2000. *Estudo da atividade biológica de Pithecolobium avaremotemo Mart. e de alguns compostos obtidos comercialmente*. Maceió, 123p MSc. Thesis - CPGQB, Universidade Federal de Alagoas.

- Middleton, E.; Kandaswami, C.; Theoharides, T. C. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* 52, 673.

- Miranda LTGS 2001. *Uso da tintura de arnica em feridas cutâneas abertas em ratos*. São Paulo. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Técnica Operatória e Cirurgia Experimental, Universidade Federal de São Paulo.

- Modolin M, Bevilacqua RG 1985. Cicatrização das feridas: Síntese das aquisições recentes. *Rev Bras Clin Terap* 14: 208-13.

- Raphael A 1965. Emprego tópico dos antibióticos em dermatologia. In: Lacaz, C. S. (org.) *Antibióticos*. São Paulo: Editorial Prociencx. p. 459.

- Sanchez-Neto R 1993. Aspectos morfológicos e morfométricos da reparação tecidual de feridas cutâneas de ratos com e sem tratamento com solução de papaína a 2%. *Acta Cirúrgica Brasileira* 8: 18-23.

- Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B, di Benedetto R, Filesì, C, Masella, R. 2007. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation *Ann Ist Super Sanità* 43, 394.

- Santos SC, Ferreira FS, Rossi-Alva JC, Fernandez LG 2007. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes. *Rev Bras Farmacogn* 17: 215-219.

- Silva, MS 2003. *Avaliação farmacológica de plantas medicinais de uso popular contra distúrbios do trato gastrintestinal no Povoado Colônia Treze em Lagarto/SE*. Sergipe, 118 pp. MSc. Thesis, Federal University of Sergipe.

- Silva, NCB 2006. *Potencial biotecnológico de plantas medicinais: estudo etnofarmacológico em uma comunidade quilombola da Chapada Diamantina - BA*. Rio de Janeiro, 227 p. Ph. D. Thesis - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

- Silva, NCB, Esquibel, MA, Alves, IM, Velozo, ES, Almeida, MZ, Santos, JES, Campos-Buzzi, F, Meira, AV, Cechinel-Filho, V 2009. Antinociceptive effects of *Abarema cochliacarpus* (B.A. Gomes) Barneby & J.W.Grimes (Mimosaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.* 19: 10-15.

- Upadhyay NK, Kumar R, Mandotra SK, Meena RN, Siddiqui MS, Sawhney RC, Gupta A 2009. Safety and healing efficacy of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil on burn wounds in rats. *Food and Chemical Toxicology* 47 1146–1153.

- Uzunköy A, Akince OF, Coskun A, Aslan O, Kocyigit A 2001. Effects of antiadhesive agents on the healing of intestinal anastomosis. *Dis Colon Rectum* 43: 370-5.

- Vinegar R, Traux JF, Selph JL 1973. Some quantitative temporal characteristic of carrageenin-induced pleurisy in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 143: 711-714.

- Yoon J H., Baek SJ. 2005. Molecular Targets of Dietary Polyphenols with anti-inflammatory Properties *Yonsei Med. J.* 46, 585.

Quadro1 - Protocol of microscopical analysis of the cutaneous wounds.

1- TYPE OF REACTION INFLAMMATORY AS THE PREDOMINANT CELL:

- acute (predominance of the neutrophils)
- chronic (predominance of the de lymphocyte)
- acute-chronic (without predominance of the neutrophils of the lymphocyte)

2- PRESENCE OF SCARS: (subjectively)

- discrete
- moderate
- intense

3- PRESENCE OF THE GRANULATION TISSUE AND NEOVASCULARIZATION:

- 0 = without the granulation tissue and neovascularization
- + = scarce amount of the granulation tissue and/or neovascularization
- ++ = discrete amount of the granulation tissue and/or neovascularization
- +++ = moderate amount of the granulation tissue and/or neovascularization
- ++++ = accented amount of the granulation tissue and/or neovascularization.

4- FIBROPLASIA

- 0 = without fibroplasia
- + = scarce amount of the fibroplasia
- ++ = discrete amount de fibroplasia
- +++ = moderate amount of the fibroplasia
- ++++ = accented amount of the fibroplasia

5- EPITHELIALIZATION DEGREE:

- + = without epithelialization
- ++ = epithelialization of the 1/3 of the wound
- +++ = epithelialization of the 2/3 of the wound
- ++++ = complete epithelialization

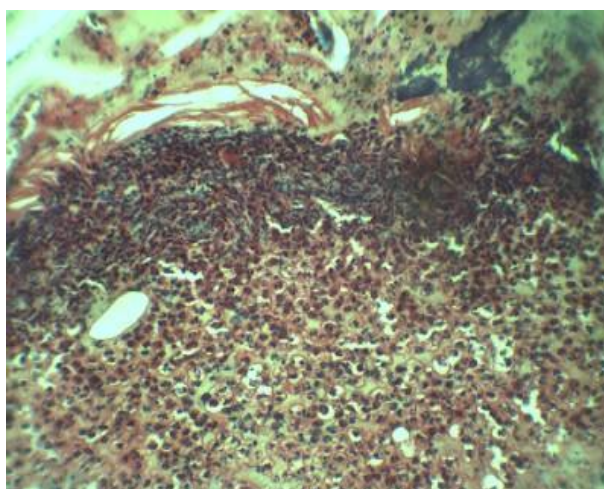


Figure 1 – Photomicrography in 3th day of the inflammatory reaction (Group G1). Intense inflammatory reaction was noted, with mononuclear and polimorfonuclear cells. Masson' trichrome: 200x magnification.

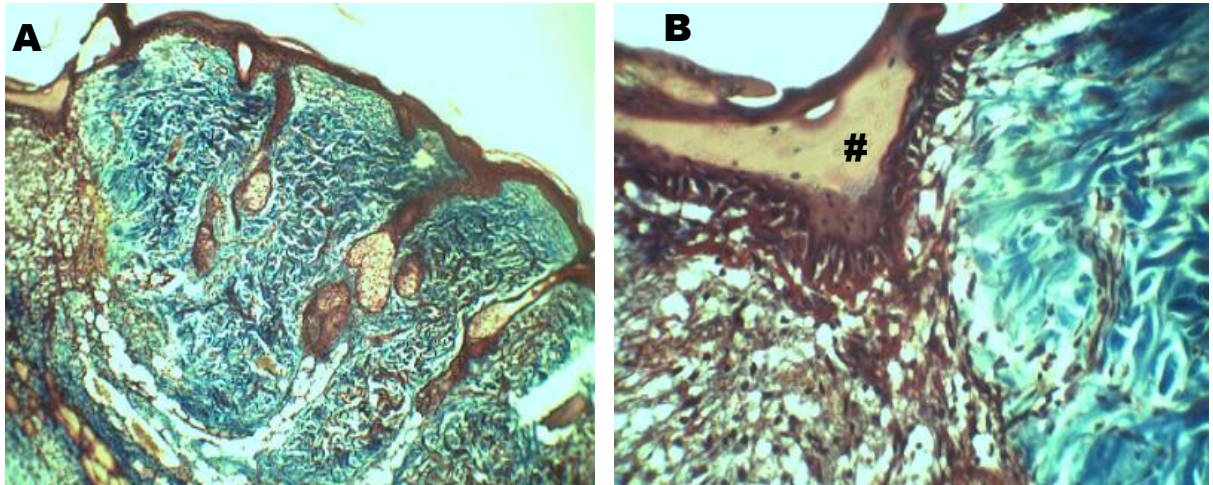


Figure 2 – Photomicrography of presence of scar in 3th day the inflammatory reaction. Presence of scars in the wounds was of moderate intensity in the groups G1 (#). Sections stained with Masson' trichrome: **A)** 100x and **B)** 200x magnification, respectively.

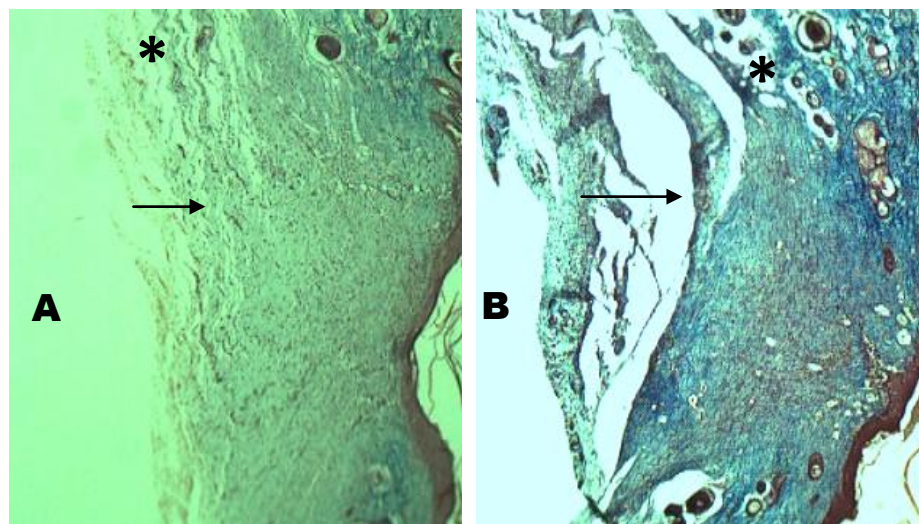


Figure 3 - Photomicrographs of microscopic of cutaneous wound. Masson' trichrome: 100x magnifications (all images). **A** represented the control group (G1). **B** represented the G4 treated with the cream of the ethanolic extract of *A. cochliocarpa* in the dose of 103 mg/kg. Each group of animals (n = 6 rats). Asterisks represented normal tissue and long arrow the area of skin injury.

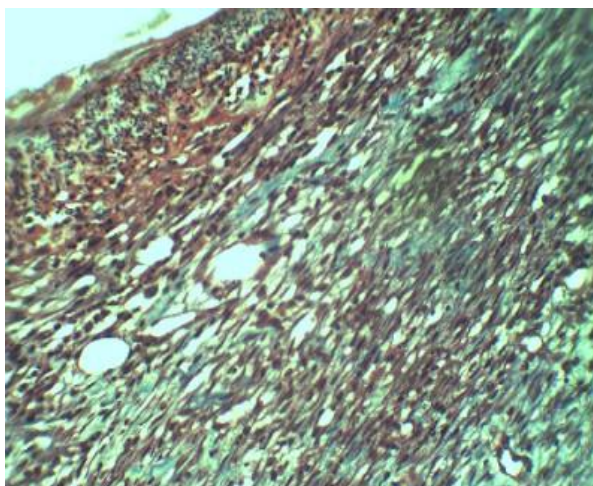


Figure 4 – Photomicrography of presence of granulation tissue and neovascularization, 7th day of the group G4. The animals were treated with the cream of the ethanolic extract of *A. cochliocarpa* in the dose of 103 mg/kg animal (group G4). We noted fine collagenous fibers (blue) and capillary proliferation (white areas), with aspect of granulation tissue. Masson' trichrome: 200x magnification.

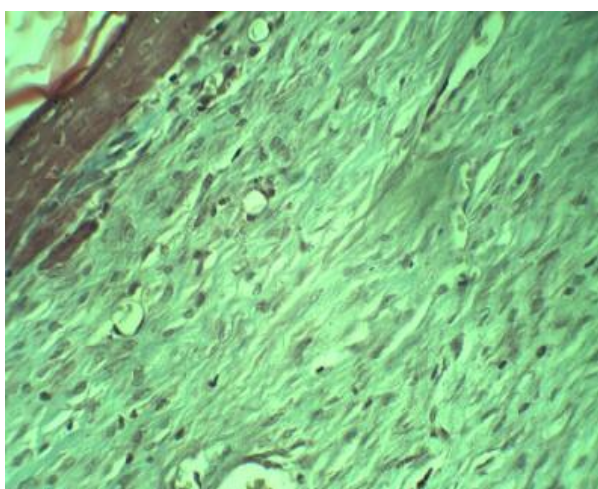


Figure 5 – Photomicrography of presence of fibroses in 14th day of the group G2. We observed collagen fine and dense fibers, under of new epidermis (evaluation of re-epithelialization). Sections stained with Masson' trichrome: 200x magnification.

8 Artigo V

Artigo a ser submetido ao Journal of Ethnopharmacology



***In vivo* study of the anti-inflammatory and antitumoral activities of stem barks from
Abarema cochliocarpa (Gomes) Barneby & Grimes (Leguminosae).**

**Renata Patrícia Freitas Soares de Jesus^a, Isla Vanessa Gomes Alves Bastos^a,
Haroudo Sátiro Xavier^a, Ivone A. Souza^b.**

^aDepartment Pharmacological Science, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rêgo, 1235 Cidade Universitária, Recife, 50740521- Pernambuco, Brazil.

^bDepartment of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rêgo, 1235 Cidade Universitária, Recife, 50740521- Pernambuco, Brazil.

Abstract

Ethnopharmacological relevance

Abarema cochliocarpa is a medicinal specie often used in Brazil, especially in Northeast Region, for the treatment of several diseases including inflammations and cancer.

Aim of the study

To evaluate the anti-inflammatory and antitumor activities of the ethanoholic extract from stem barks of *A. cochliocarpa* (EEAc) in an attempt to determine whether the medicinal uses are supported by pharmacological effects.

Materials and methods

Anti-inflammatory activity was determined by carrageenan-induced paw edema method. The antitumor effect was evaluated in an *in vivo* experimental study, using the following tumors: Sarcoma-180 and Erlich ascite carcinoma. After treatment of seven days, the animals were sacrificed and the tumoral mass, as well as liver, spleen, lung and kidneys were dissected and fixed for histopathological analysis.

Results

There were statistically significant decreases ($p < .05$) of edema paw in at the doses of 150, 250 and 350 mg/kg (i.p.) of the ethanolic extract of *A. cochliocarpa*. Similarly, the administration of *A. cochliocarpa* at the doses of 100, 150, 250 and 350 mg/kg (i.p.) inhibited the growth of sarcoma-180 and Ehrlich ascite carcinoma tumors in mice. In the histological evaluation of the organs little variation between the groups was evidenced, emphasizing the presence of steatosis in livers of the treated animals and the standard. All the animals treated with the extract presented solid vascularization.

Conclusion

The results suggest that the ethanolic extract of *A. cochliocarpa* possesses anti-inflammatory and antitumor activities, supporting the folk use of this medicinal specie.

Keywords: Anti-inflammatory activity; Antitumor activity; Sarcoma-180; Erlich ascite carcinoma; *Abarema cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes; Leguminosae.

1. Introduction

The *Abarema cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes (Leguminosae) is a native species from Brazilian and distributed in America. It is commonly known as “babatenon” and its use is frequent in folk medicine against inflammations, wound-healing, as analgesic, antiinflammatory, antiseptic and to treat leucorrhea, among other uses (Silva, 2006; Agra et al., 2008).

Previous pharmacological studies showed that *A. cochliocarpa* possesses anti-ulcerogenic (Silva, 2003), antinociceptive (Silva, 2009) and antimicrobial properties (Araújo et al., 2002; Santos et al., 2007). The bark of this specie contain tannins, triterpenoids, cathechins, saponins, phenols and anthraquinones (Mendonça, 2000; Silva,

2009). These phytochemicals possess anti-inflammatory and chemotherapy effects (Hirose et al., 1995, Taraphdar et al., 2001, Akayo et al., 2003 and Wang et al., 2003).

In Brazil, especially in the Northeast Region, the use of this medicinal specie is a practice widely employed, mainly in the form of crude extracts and infusions, to the treatment of several diseases including inflammations (Gazzaneo, Lucena, Albuquerque, 2005, Silva, 2006, Agra et al., 2008 and Santos et al., 2007), and cancer (Oliveira, Lima, Souza et al., 2007). However, there were no pharmacological evidences that support the use of this medicinal specie yet. Therefore, it is necessary to investigate the anti-inflammatory and antitumor activities of *A. cochliocarpa* in order to determine whether the medicinal uses are supported by pharmacological effects.

We report here the results of *in vivo* experimental studies with the ethanolic extract from the bark of *A. cochliocarpa* (EEAc) in rat paw edema model, sarcoma-180 and Ehrlich ascite carcinoma transplanted in mice.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and extract

Stems bark of *A. cochliocarpa* were collected in the Greenhouse of the Laboratory of Pharmaceutical Technology of the Federal University of Paraíba, Paraíba, Brazil, during the month of January, 2006 and were identified by Dra. Rita de Cássia A. Pereira (IPA-PE). The voucher specimen were deposited in the herbarium Prof. Lauro Pires Xavier under number 61336 of Botanical Department of the Federal University of Paraíba.

The air dried powdered stem barks (3 kg) were extracted with 70% ethyl alcohol (3 x 3000 mL) and the pooled extract was concentrated under vacuum below 50 °C to give 560 g of gummy material

2.2. Animals

Wistar albino female rats Wistar (*Rattus norvegicus*; weight 250 ± 50 g) and Swiss albino female mice (*Mus musculus*; weight 25 ± 10 g) were obtained from the animal house of the Department of Antibiotics of the Federal University of Pernambuco, Brazil. All the animals were maintained under standard condition, with temperature at 25 ± 2 °C, 12 h dark-light cycle and relative humidity. The animals received food and water *ad libitum*. The experiments were carried out in accordance with the ethical principles of The Brazilian College of Animal Experiments and the National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals. This study was approved by the Committee of Experimental Animal of the Federal University of Pernambuco (041544/2006-47).

2.3. *In vivo* anti-inflammatory activity

2.3.1. Carrageenan-induced rat paw edema

The carrageenan-induced hind paw edema test was performed according to the method reported by Winter et al., (1962). Acute inflammation was produced by sub plantar injection of 0,1 mL of 1% suspension of carrageenan in animals of all groups. The animals were divided into five groups, with five animals per group. The negative control group received saline solution at 0,9% (i.p.). The positive control group was treated with Indomethacin (10 mg/kg, i.p.) (Sigma Chemical, Co., USA). The groups III, IV and V received 25,75, 51,5 and 103 mg/kg of the EEAc (i.p.), respectively. The paw edemas were measured at every hour during a 6 h period. Anti-inflammatory activity was evaluated as the percentage of reduction of the edema in the treated groups that received the extract when compared with the control groups.

2.4. Antitumoral activities

2.4.1. Tumor cells

Sarcoma-180 ascite and Ehrlich ascite carcinoma were maintained *in vivo* in mice by transplantation of 0,2 mL of ascites (1×10^7 cell) from the infected mice to the non-infected mice.

2.4.2. Sarcoma-180

The sarcoma-180 ascites (S-180) tumor cell (1×10^7 cell/mouse) were subcutaneously implanted into the inguinal region of the mice in accordance with Sugiura et al., (1955), with some modifications. The mice were divided into six groups, with five mice per group. The group of negative control received saline solution at 0,9% (i.p.). The positive control group received 10 mg/kg of the Metrotexat (i.p.) (Sigma Chemical, Co., USA). The groups III, IV and V received 25,75, 51,5 and 103 mg/kg (i.p.) of the EEAc, respectively.

2.4.3. Ehrlich ascite carcinoma

Similarly, Ehrlich ascite carcinoma cells (EACs) (1×10^7 cell/mouse) were implanted in the inguinal region of the mice, as previously reported by Sugiura et al., (1955), with modifications. The animals were divided into five groups (six animals in each group). The group corresponding to the negative control received saline solution (0,9%, i.p.). The positive control group received 10 mg/kg of the Metrotexat (i.p.) (Sigma, USA). Mice of groups III, IV and V received 25,75, 51,5 and 103 mg/kg (i.p.) of the EEAc, respectively.

2.4.4. Treatment

The animals were treated with the EEAc and Metrotexat during seven days. On the eighth day, the mice were weighed, euthanized and the tumors were removed, as well as liver, spleen, heart and kidneys were dissected and fixed for histopathological analysis. The inhibition of tumor growth was calculated by percentage of reduction of the tumors when compared with the control group.

2.4.5 Histologic analysis

The wound tissues were fixed with 10% formalin, embedded in paraffin, and sectioned. Sections of 5 μ m thickness were stained using hematoxylin-eosin (HE). In microscopy (MOTIC BA200) was evaluated.

2.5. Statistical analysis

The values are expressed in mean $\pm$ S.D. Data were statistically evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA) (Origen 5.0 software). The values were considered significant when $p < .05$.

3. Results

3.1. Anti-inflammatory activity

A significant reduction ($p < 0,05$) of the paw edema was observed at doses of 27,5, 51,5 and 103 mg/kg of the EEAc (Fig. 1). The anti-inflammatory effects were observed after a second hour of treatment in the groups that received the doses of 27,5, 51,5 and 103 mg/kg of the EEAc. The highest percentages of reduction of the paw were observed in the groups treated with 51,5 (41%) and 103 mg/kg (33%) of the EEAc, at the third and sixth hours of treatment, respectively. Curiously, after 6 h of treatment the lowest

percentage of inhibition of paw edema was observed in the groups that were treated with 10 mg/kg of the Indomethacin.

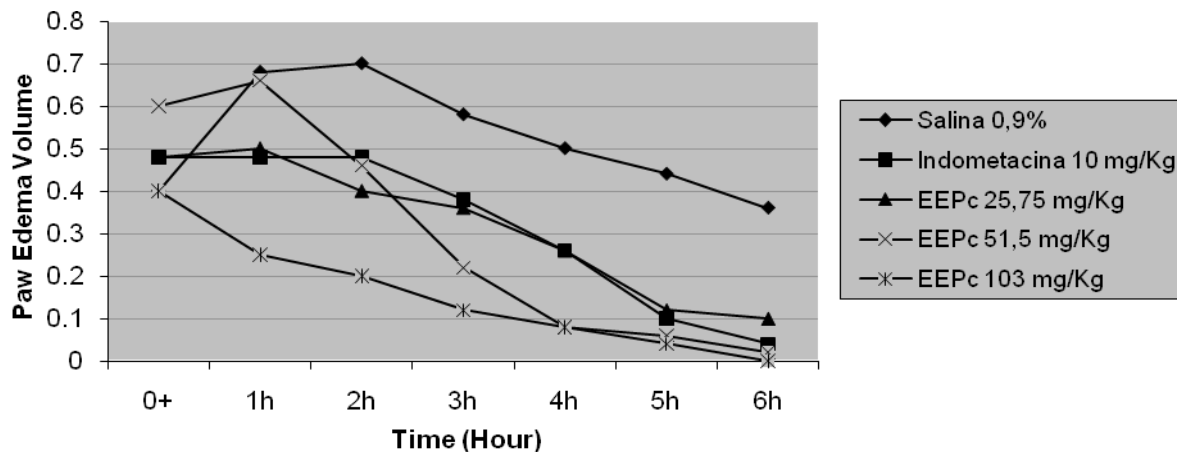


Fig. 1. Anti-inflammatory effects of EEAc in carrageenan-induced rat paw edema (n = 6, per groups). Edema was induced by subcutaneous administration of 0.1 mL of 1% suspension carrageenan. Doses of 10 mg/kg of Indomethacin and 27,5, 51,5 and 103 mg/kg of the EE of *A. cochliocarpa* were intraperitoneally administrated. The value represents mean $\pm$ S.D. * $p < 0,05$ was considered statistically significant.

3.2. Antitumor activity

3.2.1. Sarcoma-180

The results showed a significant inhibition on the growth of S-180 tumor in mice treated with the EE of *A. cochliocarpa*. As shown in Fig. 2 the dose of 103 mg/kg of EE of *A. cochliocarpa*, significantly reduced ($p < 0,05$) the growth of S-180 tumor with percentage of inhibition of 80%, while the doses of 27,5, 51,5 mg/kg of the EEAc reduced, 67% and 75%, respectively. In the groups treated with 10 mg/kg of the Metrotextat, it was observed a reduction of 89% of tumoral growth. There were no significant differences in body weight before and after of the treatments (date not showed).

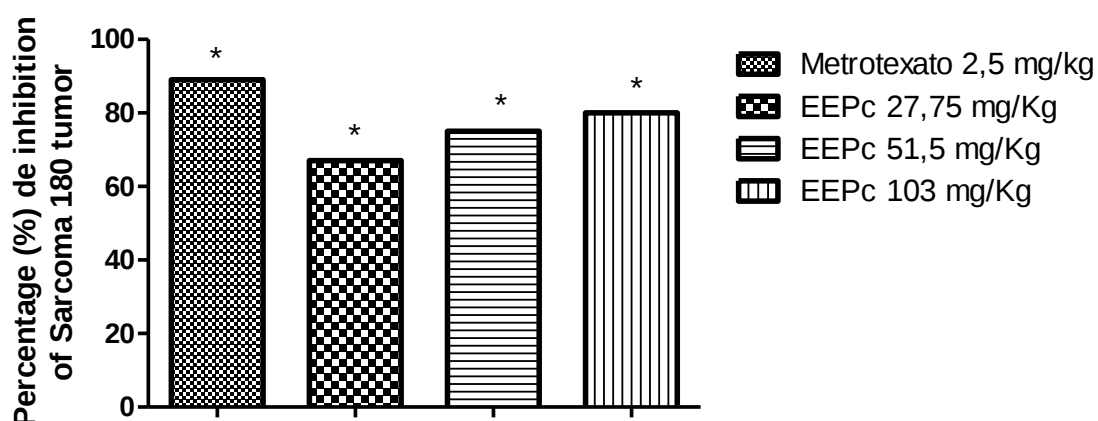


Fig. 2. Percentage (%) of inhibition of growth of Sarcoma-180 ascite tumor in mice treated with EE of *A.cochliocarpa* (n = 6, per groups). Doses of 2,5 mg/kg of Metrotexat and 27,5, 51,5 and 103 mg/kg of the EE of *A .cochliocarpa* were intraperitoneally administrated. Data are expressed as the mean $\pm$ S.D. * $p < 0,05$ was considered statistically significant.

The histological data revealed the presence of inflammatory cells kidneys from animals treated with methotrexate and EEAc, as well as visualization of renal vessels congested (Figure 3- A). And control groups were treated with the extract also showed these changes. The liver of animals treated with at a dose of 103 mg/kg showed the presence of congested vessels, appearance of estetose (figure 3-B) and perivascular infiltrate. The structural characteristics of Sarcoma 180 in control and treated groups did not differ and showed infiltrated with adipose tissue and skeletal muscle.

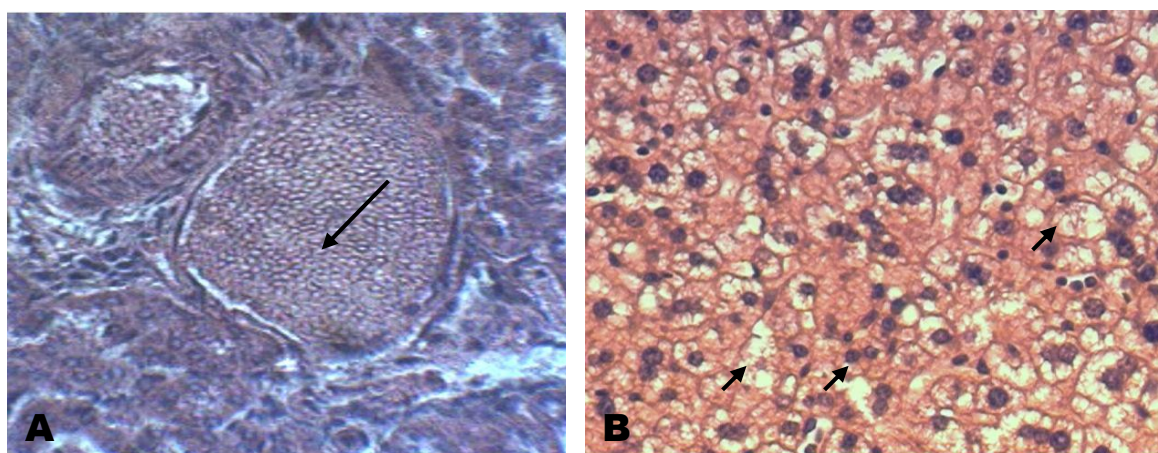


Fig. 3 - Histological aspects of kidney from animals implanted with Sarcoma 180 and treated with methotrexate (10 mg/kg) HE staining (MO). In A the presence of congested kidney vasculature. In B there is the appearance steatosis (arrows).

3.2.2. Ehrlich ascite carcinoma

There was a significant inhibition on the growth of EAC tumor in mice. The group treated with the dose of 103 mg/kg showed a significant reduction ($p < 0,05$) of EAC tumoral growth, with inhibition percentage of 83% (Fig.3). Doses of 27,5, 51,5 mg/kg of EEAc of reduced 67% and 79%, respectively. Groups treated with 2,5 mg/kg of the Metrotextat showed a reduction of almost 92% of tumoral growth. There were no significant differences in body weight before and after of the treatments (date not showed).

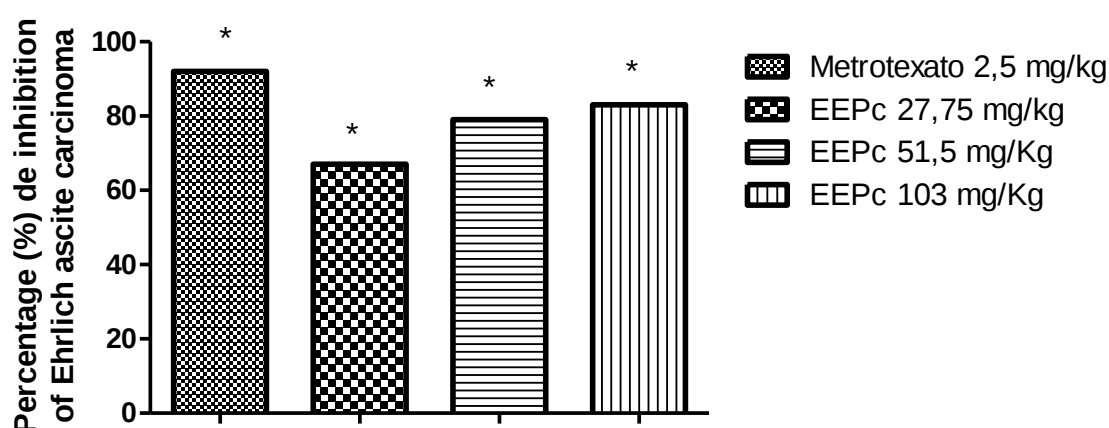


Fig. 4. Percentage (%) of inhibition of growth of Ehrlich ascite carcinoma tumor in mice treated with EH of *A. cochliocarpa* (n = 6, per groups). Doses of 2,5 mg/kg of Metrotextat and 27,5, 51,5 and 103 mg/kg of the EE of *A. cochliocarpa* were intraperitoneally administrated. Data are expressed as the mean $\pm$ S.D. * $p < 0,05$ was considered statistically significant.

The animals treated with extracts of EEAc (independent of the doses) showed interstitial pulmonary involvement, as evidenced by a process of alveolitis limited possibly due to an allergic mechanism. Changes were observed as peribronchiolar lymphocytic infiltration, thickening of the septum with reduction of the lights of some alveoli and vascular congestion (Figures 4-A) when compared to the descriptions for the control

group. The structural characteristics of Ehrlich carcinoma in control and treated groups did not differ and showed cells with different formats, infiltrated with adipose tissue and skeletal muscle (Figure 4-B).

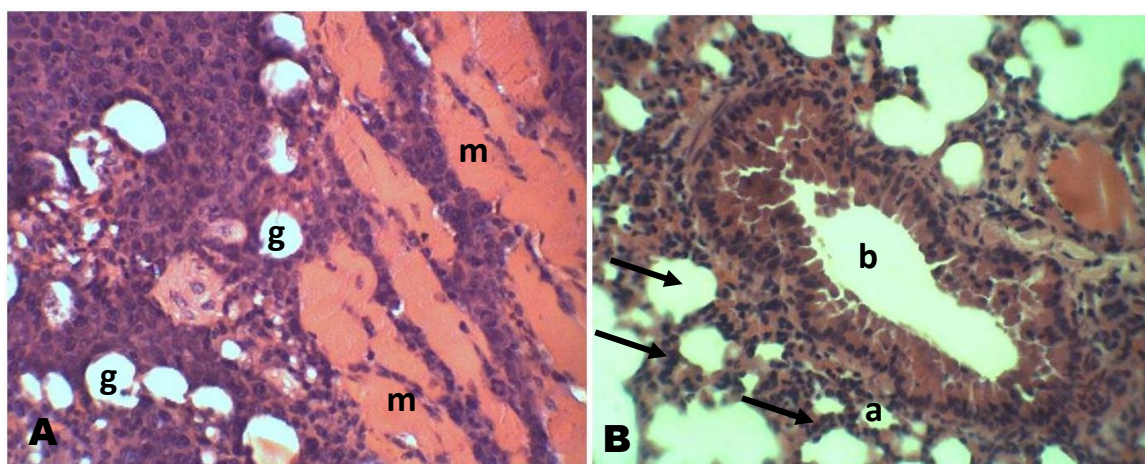


Fig. 5. Photomicrographs of lung and tumor (carcinoma) of Swiss albino mice treated with EEAc. **A)** Lung: interstitial pulmonary involvement particularly due to thickening of the septum (arrows) with reduction of the lights of some alveoli (a) and presence of bronchioles with lymphocytic infiltrate around (b) and alveolar sac (s). **B)** Tumor infiltration with marked muscle (m) and moderate adipose tissue infiltration (g). H.E.: 400X.

4. Discussion

We performed an experimental study *in vivo* in order to test a putative anti-inflammatory and antitumor pharmacological effect of the EEAc. The results provided preliminary evidences suggesting that this extract possesses anti-inflammatory and antitumor effects.

The anti-inflammatory activity of the EEAc was statistically significant in all tested doses. Furthermore, the anti-inflammatory effect of *A. cochliocarpa* was observed in the two phases of the inflammation. In the first phase (0–180 min) there was a significant reduction of paw edema ($p < 0,05$) in doses of 51,5 and 103 mg/kg of the EEAc. Similarly, a significant reduction of size of paw edema was observed in the last phase (180–360 min) in all doses of the EEAc and Indomethacin. These anti-inflammatory effects may be

explained by the presence of phenolic compounds, which are found on the EE of *A. cochliocarpa* (Mendonça, 2000) and posses a promising anti-inflammatory activity (Gazzaneo, Lucena, Albuquerque, 2005, Silva, 2006 and Agra et al., 2008).

The results of microscopy of liver tumors of the S-180 confirm the data found by the literature cited above, showing a decrease in vascularization around the tumor and the presence of adipose tissue liver as a result of toxicity in animals treated with the extract at higher doses (Ishiki; Onishi; Machida, 2004; Steele; Kelloff, 2005). The inflammatory infiltrates, sometimes lymphocytes, sometimes mixed in the organs examined microscopically, are in agreement with Sato et al. (2005) which showed that the colony-stimulating factor (CSF) produced by tumor cells increases the number of polymorphonuclear cells (PNM) in the peripheral circulation.

Significant ($p < 0,05$) antitumor effects were observed in S-180 and EAC tumor when treated with the EEAc. These effects may be due to the presence of phenolic compounds on the EEAc, which possess the antitumor effects. Studies have demonstrated that quercetin and luteolin inhibit the tumoral growth in several *in vivo* experimental models (Hirose et al., 1995; Yang et al., 2000). Furthermore, other compounds such as terpenoids (monoterpenoids, sesquiterpenoids, diterpenoids, triterpenoids and steroids), caffeic acid and cinnamic derivates, which are present on the EEAc, possess a chemotherapy effects (Taraphdar et al., 2001).

In conclusion, in this work we reported that the EE of *A. cochliocarpa* possesses promising anti-inflammatory and antitumor effects. These results corroborate the traditional use of this specie in Brazil. Further studies should be performed to elucidate which compounds are responsible for these activities.

Acknowledgements

Authors acknowledge the Laboratory of Pharmaceutical Technology, Mr. Fernando Antonio C. Viana, Mr. Raimundo Nonato da Silva and Funding agency CAPES.

References

Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, França PF, Barbosa-Filho JM 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 18: 472-508.

Akayo Y, Maruyama HK, Matsumoto K, Ohguchi K, Nishizawa T, Sakamoto Y, Araki S, Mishima and Y. Nozawa 2003. Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines, *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 26 :1057–1059.

Alves, TMA 2000. Biological screening of Brazilian medicinal plants, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95: 367–373.

Araújo CW, Peixoto Neto PAS, Campos NV, Porfírio Z, Caetano LC 2002. Antimicrobial activity of *Pithecolobium avaremotermo* bark. *Fitoterapia* 73: 698-700.

Castillo RAM, González VP 1999. *Plecthranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 3: 110–115.

Diniz MFFM 1997. *Memento fitoterápico: as plantas como alternativa terapêutica: conhecimentos populares e científicos*, João Pessoa, Ed Universitária/UFPB (pp. 205.

França F, Lago EL arsdén PDM 1996. Plants used in the treatment of leishmania ulcers due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in an endemic area of Bahia, Brazil, *Revista-Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 29: 229–232.

Gazzaneo LR, Lucena RFP, Albuquerque UP 2005. Knowledge and use of medicinal plants by local specialists in a region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil). *J Ethnobiol Ethnomedicine* 1: 9.

Gurgel APAD, Silva JG, Grangeiro ARS, Xavier HS, Oliveira RAG, Pereira MSV, IA Souza 2009. Antibacterial effects of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae) in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Latin American Journal of Pharmacy* 28: 3.

Hamalainen M, Nieminen R, Vuorela P, Heinonen M, Moilanen E 2007. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF- κ B activations, whereas flavones, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- κ B activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activate macrophages, *Mediators of Inflammation* 1: 1–10.

Hirose M, Akagi KT, Hoshiya Y, Mizoguchi N, Shirai T, 1995. Modulating effects of ellagic acid, vanillin and quercetin in a rat medium term multi-organ carcinogenesis model, *Cancer Letters* 94: 113–121.

Ishiki N, Onishi H, Machida Y 2004. Evaluation of antitumor and toxic side effects of mitomycin C–estradiol conjugates. *International Journal of Pharmaceutics* 279: 81–93.

IUCN 2004. Red List of Threatened Species, <http://www.redlist.org>, access in august 2004.

Lorenzi H, Matos FJA 2002. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas, Nova Odessa : Instituto Plantarum.

Lukhoba CW, Simmonds MSJ, Paton AJ 2006. *Plectranthus*: a review of ethnobotanical uses, *Journal of Ethnopharmacology* 103: 1–24.

Mendonça, RPC 2000. *Estudo da atividade biológica de Pithecolobium avaremotemo Mart. e de alguns compostos obtidos comercialmente*. Maceió, 123p.

Oliveira RAG, Lima EO, Souza EL, Vieira WL, Freire KRL, Trajano VN, Lima IO, Silva-Filho RN 2007. Interference of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on the anti-*Candida* activity of some clinically used antifungals. *Rev Bras Farmacogn* 17: 186-190.

Sálman JGD, Jimenez TEG, Castilho RM 1996. Efecto antioxidante de los extractos fluido e de flavanóides del *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (Orégano Francés), *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 2 : 27–30.

Santos SC, Ferreira FS, Rossi-Alva JC, Fernandez LG 2007. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes. *Rev Bras Farmacogn* 17: 215-219.

Sato DYO, Wal R, Oliveira CC, Cattaneo RII, Malvezzi M, Gabardo J, Buchi DF. 2005. Histopathological and immunophenotyping studies on normal and sarcoma 180- bearing mice treated with a complex homeopathic medication. *Homeopathy* 94: 25-32.

Silva, MS 2003. *Avaliação farmacológica de plantas medicinais de uso popular contra distúrbios do trato gastrintestinal no Povoado Colônia Treze em Lagarto/SE*. Sergipe, 118 pp. MSc. Thesis, Federal University of Sergipe.

Silva NCB 2006. *Potencial biotecnológico de plantas medicinais: estudo etnofarmacológico em uma comunidade quilombola da Chapada Diamantina/BA*. Rio de Janeiro, 227 p. Ph.D. Thesis -Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Silva NCB, Esquibel MA, Alves IM, Velozo ES, Almeida MZ, Santos JES, Campos-Buzzi F, Meira AV, Cechinel-Filho V 2009. Antinociceptive effects of *Abarema cochliocarpos* (B.A. Gomes) Barneby & J.W.Grimes (Mimosaceae). *Rev.Bras.de Farmacogn*.19: 46-50.

Sugiura K, Stock CC, Sugiura MM 1955. The effect of phosphoramides on the growth of a variety of mouse and rats tumors, *Cancer Research* 2: 38–50.

Steele VE, Kelloff GJ 2005. Development of cancer chemopreventive drugs based on mechanistic approaches. *Mutation Research* 591: 16-23.

Taraphdar AK, Roy M, Bhattacharya RK 2001. Natural products as inducers of apoptosis: implication for cancer therapy and prevention, *Current Science* 80: 1387–1396.

Ueda H, Yamazaki C, Yamazaki M 2002. Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of *Perilla frutescens*, *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 25: 1197–1202.

Wang H, Qial Z, Ren W 2003. Flavonoids: Promising anticancer agents, *Medicinal Research Review* 23: 519–534.

Winter CA, Rishley EA, Nuss GW 1962. Carrageenan induced edema in hind paw as an assay for anti-inflammatory drugs, *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine* 3: 544–547

Yang K., Lamprecht SA, Liu Y, Shinozaki H, Fan K, Leung D, Newmark H, Steele VE, Kelloff GJ, Lipkin M 2000. Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon, *Carcinogenesis* 21: 1655–1660.

9 Artigo

Artigo submetido ao Pharmaceutical Biology



Central antinociceptive effects of ethanolic extract from the stem bark of *Abarema cochliocarpa* on mice.

Renata P. F. S. de Jesus^a, Isla V. G. A. Bastos^a, Guilherme Carvalho Ribeiro Rodrigues^a, Haroudo S. Xavier^a, Geraldo B. L. Couto^b, Ivone A. de Souza^c.

^aDepartment Pharmacological Science, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rêgo, 1235 Cidade Universitária, Recife, 50740521 Pernambuco, Brazil.

^bDepartament of Clinical and Preventive Dentistry, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rêgo, 1235 Cidade Universitária, Recife, 50740521 Pernambuco, Brazil.

^cDepartment of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, 50740521 Recife, Brazil.

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance – *Abarema cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes (Leguminosae) has been used in Brazilian folk medicine. The present study examined the possible antinociceptive effect of the ethanolic extract from *A. cochliocarpa* barks in chemical behavioral in four models of nociception, namely, acetic acid-induced abdominal writhing, formalin, tail immersion test and hot plate test. The extract at doses of 25,75; 51,5 and 103 mg/kg given intraperitoneally (i.p) produced inhibition of acetic acid-induced visceral pain. In the formalin test, the extract (27,75-103 mg/kg, i.p) also caused significant inhibition of both, the early (neurogenic pain) and the late (inflammatory pain), phases of formalin-induced licking. The antinociceptive action of the extract was tested against naloxone in the hot-plate test in a bid to further elucidate probable mechanisms of

antinociception. Results showed that the extract at doses of 27,75; 51,5 and 103 mg/kg body weight caused significant ($p < 0,05$) antinociceptive activity in all the nociceptive models. Furthermore, naloxone (2 mg/kg), significantly ($p < 0,05$) antagonised the antinociceptive activity in all doses of the extract suggesting that the endogenous opioid system is involved in its analgesic mechanism of action. Thus, the study showed that the ethanolic extract of *A. cochliocarpa* (EEAc) possesses both peripherally and centrally mediated antinociceptive activity. The central mediated action may be linked partly via opioid receptors in the central nervous system.

Keywords: *Abarema cochliocarpa*; Central antinociceptive; Morphine; Naloxone

1. INTRODUCTION

Medicinal plants have been used extensively by the Brazilian people to treat bodily ailments (Almeida, 1993) and they are known to be an important source of new chemical substances with potential therapeutic effects (Farnsworth, 1989). The research into plants which are employed as pain-relievers in traditional or ethnopharmacology is therefore one of the productive and logical strategies in the search for new analgesic drugs (Elisabetsky et al., 1999). *Abarema cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes (Leguminosae) is a plant originally from Brazil (IUCN, 2004). It is used in folk medicine as wound-healing, as analgesic, antiinflammatory, antiseptic and to treat leucorrhea, among other uses (Silva, 2006; Agra et al., 2008).

The pharmacological properties of this plant have not yet been extensively investigated, and only a few studies have been reported. The hydroalcoholic extract bark showed antimicrobial activity (Araújo et al., 2002; Santos et al., 2007). *A. cochliocarpa*

also contains significant amounts of tannin and saponins. Regarding the chemical composition, the presence of tannins, triterpenoids, catechins, saponins, phenols and anthraquinones has been suggested (Mendonça, 2000; Silva, 2009). This study aimed to examine the possible central analgesic activity of ethanolic extract of *A. cochliocarpa* (EEAc) using the hot plate, tail immersion test, formalin test and acetic acid-induced writhing.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Plant material

Stem Barks of *A. cochliocarpa* were collected in the vicinity of João Pessoa - State of Paraíba - Brazil in January 2006 and were identified by Dra. Rita de Cássia A. Pereira (IPA-PE). The voucher specimens were deposited in the herbarium Prof. Lauro Pires Xavier under number 61 336 of Botanical Department of the Federal University of Paraíba.

2.2 Preparation of the extract

The air dried powdered stem barks (3 kg) were extracted with 70% ethyl alcohol (3 x 3000 mL) and the pooled extract was concentrated under vacuum below 50 °C to give 560 g of gummy material.

2.3 Animals

Female Swiss albino mice (*Mus musculus*) with body weight 20 – 30 g, two months old at the beginning of the experiment were used. The animals were housed in groups of six per cage, with a light/dark period of 12 h (6:00 am to 6:00 pm). They were given food and water *ad libitum*. All experiments were conducted between 10:00 am and 4:00 pm. Female mice were tested without monitoring the estrus cycle. All the animals were carefully monitored and maintained in accordance with the ethical recommendation of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and the National Institute of Health Guide for Care and use of Laboratory Animals. This study was approved by the Committee of Experimental Animal of the Federal University of Pernambuco (041544/2006-47).

2.4 Drugs

Morphine and Naloxone were obtained from Sigma (USA). The extract was diluted with saline. All solutions were administered via intraperitoneal (i.p.) route in volume of 0,1 mL/10 g body weight.

2.5 Hot plate test

Mice were divided into five groups, each group of six animals. The tests were used, following the method described by Yeh & Mitchell (1971). The test animals received three doses 27,75; 51,5 e 103 mg/kg (i.p.) of EEAc 1 h before measurements. In the control group, saline 0,1 mL/10g was administered (i.p.), and morphine 10 mg/kg, (i.p.) was given to the standard group. Each assessment was carried out for a period of 15 min and the tests were performed at 30, 60, 90, and 120 min intervals after the respective treatments.

2.6 Tail immersion test

The mice were divided into five groups of six animals in each group. Group I received saline (0,1 mL/10g), and group II that served as standard group, received morphine 10 mg/kg, (i.p.). The analgesic activity was evaluated 1 h after administration of EEAc, and morphine was evaluated 15 min after administration. The tail (up to 5 cm) was then dipped into a pot of water maintained at 55°C. The time (in seconds) the mice took to withdraw its tail clearly out of the water was taken as the reaction time according to Janssen et al., (1963).

2.7 Acetic acid-induced writhing

The analgesic effect of extract was evaluated in mice using the acetic acid-induced writhing test. Mice were divided into five groups of six animals each. Controls-saline 0,1 mL/10g, (i.p.), EEAc 27,75; 51,5 e 103 mg/kg, (i.p.) and morphine 10 mg/kg, (i.p.) were administered. Sixty minute after treatment, acetic acid (0,85% v/v solution) was injected (i.p.) at a dose of 10 mg/kg. The number of writhings was counted and recorded for 15 min (Almeida et al., 2000).

2.8 Formalin test

The method of Fasmer et al. (1985) was used. For this, 20 µl 1% formalin was administered (n = 6) in the mouse right hind paws and the licking time was registered from 0 to 5 min (phase 1, neurogenic) and from 20 to 25 min after the intraplantar injection of formalin (phase 2, inflammatory). Animals were pretreated with EEAc or

morphine 10 mg/kg, (i.p.), 30 min before formalin administration. Control animals were injected with a similar volume of saline (10 ml/kg body weight).

2.9 Antagonism of the antinociceptive effect of Pc by pre-treatment with naloxone

In the experiments, five groups of six animals in each group were used. All the animals had naloxone administered at dose of 2 mg/kg (i.p.). After 15 min the test groups were give doses of 27,75, 51,5 e 103 mg/kg (i.p.) of EEAc. The control group received saline 0,1 mL/10g, (i.p.) and the standard group had morphine 10 mg/kg (i.p.) administered. The assessments were conducted at 30, 60, 90, and 120 min in accordance with the method proposed by Younos et al., (1990).

2.10 Phytochemical *screening*

Phytochemical *screening* of the tested extracts was performed to detect the eventual presence of different classes of constituents, such as alkaloids, polyphenols and terpenoids using specific reactions (Harbone, 1998; Wagner, 1996).

2.11 Statistical analysis

The data obtained were analyzed using the GraphPad software program Version 5,0 and expressed as a mean $\pm$ S.D. The data was submitted to analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman–Keuls test. *p*-Values less than 0,05 ($p < 0,05$) were used as the significance level.

3. RESULTS

As shown in Table 1 the EEAc, administered intraperitoneally at doses up to 27,75, 51,5 and 103 mg/kg, produced a significant antinociceptive action when compared to the control group and one similar to that of morphine at 10 mg/kg (i.p.). This action of central nervous system (CNS) was confirmed by the blocking effect of naloxone.

The EEAc (Table 2) administered intraperitoneally at doses up to 27,75, 51,5 e 103 mg/kg produced a significant antinociceptive action when compared to the control group and one similar to the action of morphine 10 mg/kg, (i.p.). This action was the blocking effect of naloxone.

The intraperitoneal administration of EEAc (27,75–103 mg/kg) caused a significant reduction in the number of writhing episodes induced by acetic acid compared to the control ($p < 0,01$). The EEAc produced a near maximal inhibition of the writhing response similar to that of morphine. The results are provided in Table 3.

The extract ethanolic EEAc at doses of 27,75–103mg/kg (i.p.) had a significant antinociceptive activity compared to the control in both the early and late phases ($p < 0,001$). The reference drug, morphine 10 mg/kg (i.p.), suppressed both phases of the pain stimulus ($p < 0,001$; Fig. 1).

Phytochemical *screening* indicated the presence of tannins and saponins at high concentrations in EEAc. Flavonoids content was found at low concentration. Alkaloids were not detected.

4. DISCUSSION

A. cochliocarpa (Gomes) Barbeby & Grimes extract demonstrated analgesic effects both in the visceral and central nociceptive mouse models.

The tail-immersion and hot-plate tests, which consists of a thermal stimulus, have been widely used as experimental models to measure nociception, especially for the screening of analgesic drugs (Dewey et al., 1969; Ruijanawate, 2003). These tests are able to differentiate between central and peripheral analgesics (Asongalem, 2004).

Tail-immersion test is considered to be a spinal reflex, but the mechanism of response could also involve higher neural structures (Chapman, 1985; Jensen & Yaksh, 1986).

The hot-plate test produces, at constant temperature, two kinds of behavioural response, which are paw licking and jumping. Both of these are considered to be supraspinally integrated responses (Chapman, 1985).

The analgesic action presented by EEAc involves supraspinal as well as spinal components as demonstrated by the use of the hot plate (Yaksh & Rudy, 1976; Yaksh & Rudy, 1977; Yeung et al., 1977) and tail immersion test (Mayer & Liebeskind, 1974; Woolf et al., 1980, respectively). In the present study we demonstrated that EEAc intraperitonealmente administered prolonged the latency in both thermal tests of nociception.

The results suggest that EEAc has a central analgesic effect, as evidenced by increase in reaction time of mice in the hot plate test and tail immersion test. The pre-treatment with a specific morphinomimetic receptor antagonist, naloxone significantly reversed the antinociceptive effect of EEAc and morphine in both phases of the tail immersion test as well as in the hot plate test, compared to extract and morphine alone.

These results suggest that activation of central opioid receptors are involved in the antinociceptive action of the EEAc (Belvisi, 1998; Quock et al., 1999; Munday et al., 2000).

An intraperitoneal injection of acetic acid can produce peritoneal inflammation, which causes a response consisting of the contraction of the abdominal muscles accompanied by an extension of the forelimbs and elongation of the body. This writhing response is considered to be a visceral inflammatory pain model and has been used as a *screening* tool for the assessment of analgesic or anti-inflammatory agents (Koster et al., 1959; Collier et al., 1968). This method has been associated with increased levels of prostaglandins in the peritoneal fluids (Deraedt et al., 1980). Acetic acid injection in mice peritoneal cavity promotes the release of many inflammatory mediators such as PG, BK, SP, TNF- α , IL-1 β , IL-8 and others (Vinegar et al., 1979; Deraedt et al., 1980; Ribeiro et al., 2000; Ikeda et al., 2001; Feng et al., 2003). The results herein revealed that EEAc had significantly reduced acetic acid-induced writhing responses, which were similar to those of the reference drugs.

The antinociceptive effects EEAc were also verified on formalin-induced spontaneous nociceptive behaviors. An intraplantar injection of formalin is a commonly used model of acute inflammatory pain, in which rodents display spontaneous nociceptive behaviors consisting of flinching/shaking of the affected hind paw in two distinct phases (Dubuisson & Dennis, 1977). The first and second phases are generally believed to reflect excitation of peripheral afferent nociceptors and central sensitization, respectively (Dickenson & Sullivan, 1987; Yaksh et al., 2001). The neurogenic phase is probably a direct result of stimulation in the paw and reflects centrally mediated pain with release of substance P while the late phase is due to the release of histamine, serotonin, bradykinin and prostaglandins (Amresh et al., 2007). The systemic (i.p.) administration of the extract

also causes significant inhibition against both neurogenic and inflammatory pain responses induced by formalin. Different mechanisms have been shown to be involved in first and second phase nociceptive behaviors, based on the differential pharmacology associated with these behaviors. For example, whereas second phase behaviors are selectively attenuated by cyclooxygenase inhibitors, first and second phase behaviors are attenuated by opioids (Yaksh et al., 2001). Like other substances that act on the CNS, EEAc extract inhibited both phases of the test in a manner similar to that of morphine.

Moreover, the results of this test are in agreement with those obtained in the hot plate and tail immersion tests, confirming the central antinociceptive effect of this extract.

5. CONCLUSION

The present study showed the efficacy of the EEAc in different antinociceptive responses generated by a probable chemical noxious stimulus produced by formalin or acetic acid injections or by a thermal noxious stimulus in the hot plate and tail immersion tests. Further studies should be carried out to investigate the molecular mechanism of action of the *A. cochliocarpa* extract and their participation in the pain inhibitory mechanisms in the CNS.

6. ACKNOWLEDGEMENTS

Authors acknowledge the Laboratory of Pharmaceutical Technology, Mr. Fernando Antonio C. Viana, Mr. Raimundo Nonato da Silva and Funding agency CAPES.

REFERENCES

- MF Agra, KN Silva, IJLD Basílio, PF França, JM Barbosa-Filho. (2008). Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn*, 18, 472-508.
- ER Almeida. **Plantas medicinais brasileiras**: conhecimentos populares e científicos. São Paulo: Ed. Hemus, 1993. 342p.
- ER Almeida, AM Melo, H Xavier. (2000). Toxicological evaluation of the hydroalcoholic extract of the dry leaves of *Peumus boldus*. *Phytotherapy Research*, London, v. 14, p. 99-102.
- G Amresh, GD Reddy, ChV Rao, PN Singh. (2007). Evaluation of antiinflammatory activity of *Cissampelos pareira* root in rats. *J. of Ethnopharmacology*, 110, 526–531.
- CW Araújo, PAS Peixoto Neto, NV Campos, Z Porfírio, LC Caetano. (2002). Antimicrobial activity of *Pithecolobium avaremotermo* bark. *Fitoterapia*, 73, 698-700.
- EA Asongalem, HS Foyet, S Ekobo, T Dimo, P Kamtchouing. (2004). Antiinflammatory, lack of central analgesia and antipyretic properties of *Acanthus montanus* (Ness) T. Anderson. *J of Ethnopharmacology*, 95, 63–68.
- MG Belvisi, DM Chung, PY Barnes. (1998). Opioid modulation of non-cholinergic neural bronchoconstriction in guinea-pig in vivo. *Br J Pharmacol*, 95, 413–418.
- CR Chapman, KL Casey, R Dubner, DM Foley, RH Graceley. (1985). Pain measurement: an overview. *Pain*, 22, 1–31.
- JENSEN TS, YAKSH TL. Comparison of antinociceptive action of morphine in the periaqueductal gray, medial and paramedial in rat. **Brain Res** 363: 99-113, 1986.
- HO Collier, LC Dinneen, CA Johnson, C Schneider. (1968). The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *J of Pharmacol and Chemotherapy*, 32, 295–310.

- R Deraedt, S Jouquey, F Delevalée, M Flahaut. (1980). Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. *Eur. J. of Pharmacol*, 61, 17–24.
- WL Dewey, JW Snyder, LS Harris, JF Howes. (1969). The effect of narcotics and narcotic antagonists on the tail-flick response in spinal mice. *J Pharm Pharmacol*, 21, 548–550.
- AH Dickenson, AF Sullivan. (1987). Peripheral origins and central modulation of subcutaneous formalin-induced activity of rat dorsal horn neurons. *Neuroscience Letters*, 83, 207–211.
- D Dubuisson, SG Dennis. (1977). The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, 4, 161–174.
- E Elisabetsky, RF Brum, DO souza. Anticonvulsant properties of linalool in glutamate-related seizure model. *Phytochemistry*, Chicago, v. 6, n. 2, p. 107 –113, 1999.
- NR Farnsworth, AS Bingel. New natural products and plant drug with pharmacological, biological or therapeutic activity. New York: Springer, New York, 1997. 73p. ou 1989.
- OB Fasmer, OG Berge, K Hole, (1985). Changes in nociception after lesions of descending serotonergic pathways induced with 5,6-dihydroxytryptamine. Different effects in the formalin and tail-flick tests *Neuropharmacology* 24: 729–734.
- Y Feng, M Cui, W Willis. (2003). Gabapentin markedly reduces acetic acid-induced visceral nociception. *Anesthesiology*, 98, 729–733.
- JB Harbone. **Phytochemical methods**. London: Chapman & Hall, 1998. 288p.
- Y Ikeda, A Ueno, H Naraba, S Oh-Ishi. (2001). Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanooids in the acid-induced writhing responses of mice. *Life Sci*, 69, 2911–2919.
- IUCN. (2004). Red List of Threatened Species. [Disponível em: <http://www.redlist.org>]. Access in 12 August 2004.

- PAJ Janssen, CJE Niemegeers, JGH Dony. (1963). The inhibitory effect of fentanyl and other morphine-like analgesics on the water induced tail withdrawal reflex in rats *Arzneimitter-Forschung. Drug Research*, 6, 502-507.
- TS Jensen, TL Yaksh. (1986). Comparison of antinociceptive action of morphine in the periaqueductal gray, medial and paramedialmedullal in rat. *Brain Res*, 363, 99–113.
- M Koster Anderson, EJ Beer. (1959). Acetic acid for analgesic screening. *Federation Proceedings*, 18, 412–416.- D Luttinger. (1985). Determination of antinociceptive efficacy of drugs in mice using different water temperatures in a tail-immersion test. *J of Pharmacological Methods*, 13, 351–357.
- DL Mayer, JC Liebeskind. (1974). Pain reduction by focal 260 electrical stimulation of the brain and anatomical and behavioral analysis. *Brain Res*, 68, 73–93.
- RPC Mendonça, 2000. Estudo da atividade biológica de *Pithecolobium avaremotemo* Mart. e de alguns compostos obtidos comercialmente. Maceió, 123p MSc. Thesis - CPGQB, Universidade Federal de Alagoas.
- MK Munday, A Ali, R Mason, VG Wilson. (2000). Pharmacological examination of contractile response of the guinea-pig isolated ileum produced by u-opioid receptor 265Q2 antagonists in the presence of, and following exposure to morphine. *Br J Pharmacol*, 131, 893–902.
- RM Quock, TH Burrkey, E Varga, Y Hosohata, K Hosohata, SM Cowell, CA Slate, FJ Ehlert, WR Roeske, HI Yamamura. (1999). The d-opioid receptor molecular pharmacology signal transductional and the determination of drug. *Efficacy Pharmacol Rev*, 51, 503–507.
- RA Ribeiro, MV Vale, SM Thomazzi, ABP Paschoalato, S Poole, SH Ferreira. (2000). Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur J Pharmacol*, 387, 111–118.

- C Rujjanawate, D Kanjanapothi, A Panthong. (2003). Pharmacological effect and toxicity of alkaloids from *Gelsemium elegans* Benth. J of Ethnopharmacology, 89, 91–95.
- SC Santos, FS Ferreira, JC Rossi-Alva, LG Fernandez. (2007). Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes. Rev Bras Farmacogn, 17, 215-219.
- NCB Silva (2006). *Potencial biotecnológico de plantas medicinais: estudo etnofarmacológico em uma comunidade quilombola da Chapada Diamantina - BA*. Rio de Janeiro, 227 p. Ph.D. Thesis - Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- MS Silva, AR Antonioli, JS Batista, CN Mota (2006). Plantas medicinais usadas nos distúrbios do trato gastrintestinal no povoado Colônia Treze, Lagarto, SE, Brasil1 Acta bot. bras. 20(4): 815-829.
- R Vinegar, JF Truax, JL Selph, PR Johnston. (1979). Antagonism of pain and Hyperalgesia, Anti-inflammatory Drugs. In: JR Vane, SH Ferreira, ed. Handbook of Experimental Pharmacology Springer. Berlin, 208-222.
- H Wagner, HS Bladt. Plant drug analysis. New York: Springer, 1996. 302p.
- CJ Woolf, D Mitchell, GD Barrett. (1980). Antinociceptive effect of peripheral segmental electrical stimulation in the rat. Pain, 8, 237–252.
- TL Yaksh, TA Rudy. (1976). Analgesia mediated by a direct spinal action of narcotics. Science, 192, 1357–1358.
- TL Yaksh, TA Rudy. (1977). Studies on the direct spinal action of narcotics in the production of analgesia in the rat. J of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 202, 411–428.
- TL Yaksh, G Ozaki, D McCumber, M Rathbun, C Svensson, S Malkmus, MC Yaksh. (2001). An automated flinch detecting system for use in the formalin nociceptive bioassay. J of Applied Physiology, 90, 2386–2402.

- SY Yeh, CL Mitchel. (1971). Analgesic activity and toxicity of oripavine and Δ -dihydrothebaine in the mouse and rat. J of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 179, 642-651.
- JC Yeung, TL Yaksh, TA Rudy. (1977). Concurrent mapping of brain sites for sensitivity to the direct application of morphine and focal electrical stimulation in the production of antinociception in the rat. Pain, 4, 23–40.
- C Younos, A Rolland, J Fleurentin, MC Lanhers. (1990). Analgesic and behavioral effects of *Morinda citrifolia*. Planta Medica, 56, 430-434.

Table 1. Effect of EEAc extract and naloxone on mice assessed by the hot plate test.

Material	Dose (mg/kg)	Latency time				
		Basal	30	60	90	120
Control		6.5±0.5	5.8±0.75	6.1±0.7	6.0±0.6	6.1±0.40
EEAc	27.75	5.3±0.8	7±0.6*	8.3±0.54***	8.6±0.51***	9.6±0.51***
EEAc	51.5	6.3±0.5	14±0.6***	15.5±0.54***	16.8±0.4***	17.6±0.51***
EEAc	103	6.1±0.4	14±0.9***	15.67±0.51***	16.8±0.98***	17.5±0.54***
Morphine	10	6.5±0.5	6.8±0.7*	16.50±0.54***	17.6±0.51***	18.5±0.54***
EEAc + naloxone	27.5 + 2	6.2±0.8	5.9±0.3	6.1±0.4	6.1±0.7	6.3±0.8
EEAc + naloxone	51.5 + 2	6.8±0.9	6.7±0.4	6.1±0.5	6.0±0.6	6.6±0.5
EEAc + naloxone	103 + 2	6.9±1.2	6.3±0.3	6.3±0.6	6.7±0.4	6.2±0.3
Morphine + naloxone	10 + 2	6.7±1.4	6.7±0.6	6.5±0.7	6.5±0.5	6.3±0.7

Results are expressed as the mean ± S.D in seconds (n = 06). (one-way ANOVA followed by Newman–Keuls test): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ compared to the control group.

Table 2. Effect of EEAc and naloxone on mice assessed by the tail immersion test.

Material	Dose (mg/kg)	Latency time				
		Basal	30	60	90	120
Control		6.5±0.54	6.5±0.54	6.5±0.54	6.5±0.54	6.4±1.5
EEAc	27.75	6.3±0.51	9.6±0.51***	11.6±0.8***	14.0±0.89***	17.3±1.2***
EEAc	51.5	6.3±0.51	12.3±1.2***	15.5±0.54***	16.6±0.8***	18.17±0.9***
EEAc	103	6.1±0.4	11.8±1.16***	15.17±0.75***	16.8±0.75***	18.3±0.8***
Morphine	10	6.5±0.54	13±0.51***	16.6±0.8 ***	17.5±0.5***	20.5±0.54***
<i>A. cochiliocarpa</i> + naloxone	27.5 + 2	8.1±0.9	8.8±0.75	8.8±0.4	8.6±0.51	8.3±0.8
<i>A. cochiliocarpa</i> + naloxone	51.5 + 2	8.5±0.6	9.1±0.9	8.6±0.8	8.5±0.54	8.6±0.51
<i>P. cochiliocarpa</i> + naloxone	103 + 2	8.4±0.8	9.0±0.89	8.6±0.81	8.8±0.75	8.5±0.54
Morphine + naloxone	10 + 2	8.7±1.4	8.5±0.54	8.3±0.51	8.6±0.51	8.3±0.51

Results are expressed as the mean ± S.D in seconds (n = 06). (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ compared to the control group.

Table 3. Effect of EEAc evaluated using acetic acid-induced writhing in mice.

Treatment (mg/kg,i.p.)	Writhing (mean ± S.D)
Saline (control)	55.3±8.6
Pc (27.75)	4.3±4.2*
Pc (51.5)	2.6±4.3*
Pc (103)	3.1±4.9*
Morphine (10)	3.7±0.4*

n=6. * $p < 0,01$ compared to saline group values.

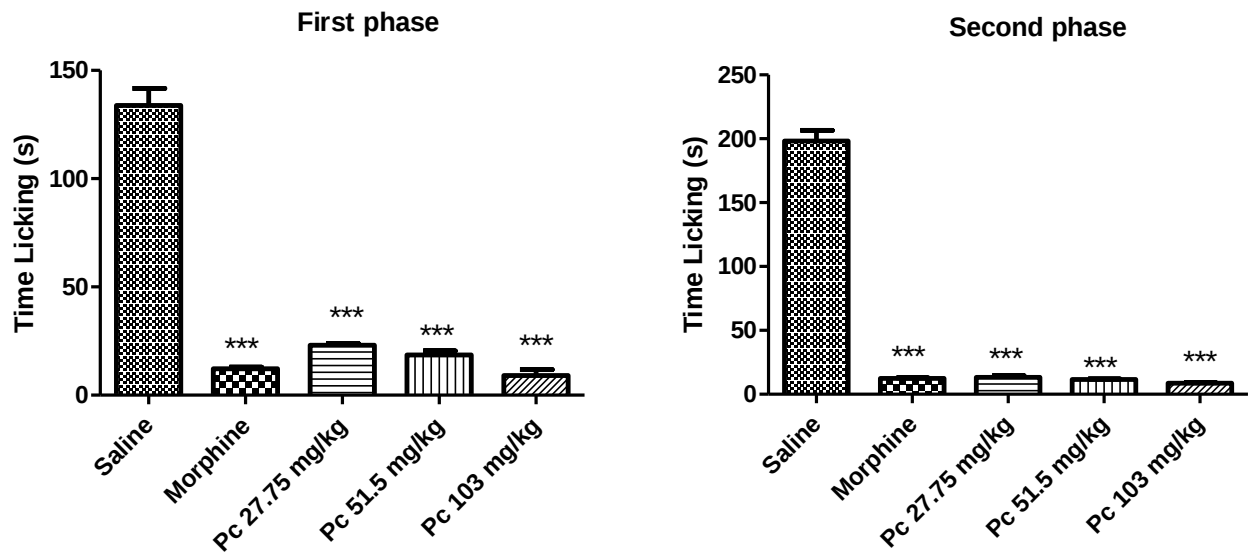


Figure 1- Effects *EEAc* on the licking induced by formalin in mice. Results are expressed as the mean $\pm$ S.D in seconds (n = 06). (One-way ANOVA followed by Newman-Keuls test): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ compared to the control group.

10 Artigos VI

Artigo submetido a Revista Latin American Journal of Pharmacy



Antinociceptive activity of a purified saponin fraction from the stem barks of

Abarema cochliocarpa (Gomes) Barneby & Grimes.

Renata P. F. Soares^{a*}, Isla V. G. A. Bastos^a, Guilherme C. R. Rodrigues^a, Cybelly M.s de Melo, Haroudo Satiro Xavier^b, Ivone A. de Souza^c.

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife-PE, CEP 50740-521, Brasil.

^bDepartamento de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife-PE, CEP 50740-521, Brasil.

^cDepartamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife-PE, CEP 50740-521, Brasil.

Abstract

Infusions obtained from its stem barks *Abarema cochliocarpa* are used in South America for the treatment of several disorders such as pain and inflammatory processes. The aim of this study was to evaluate antinociceptive effects of purified saponin fraction (PSF) obtained from ethanolic extract of the *A. cochliocarpa* (EEAc) in four analgesic models (acetic acid-induced contortions, formalin test, tail flick and hot plate). The PSF used for the study is a mixture of two major saponins obtained for chromatographic procedure. Given intraperitoneally, the PFS produced significant inhibitions on chemical nociception induced by intraperitoneal acetic acid and subplantar formalin since decreased the number of writhing episodes and the time licking. Treatment with the PSF produced a significant increase of the reaction time in tail immersion and in the hot plate test. The saponins administered had a antinociceptive effect similar of the morphine (10 mg/kg, i.p.). The fractions saponins of *A. cochliocarpa* markedly demonstrated antinociceptive action in mice.

Key-words: Inflammatory processes, pain, *Abarema cochliocarpa*, saponins.

Introduction

Pain is a sensorial modality which in many cases represents the only symptom for the diagnosis of several diseases. It often has a protective function. Throughout history man has used many different forms of therapy for the relief of pain, among them, medicinal herbs are highlighted due to their wide popular use (Oliveira et al., 2009).

In Brazilian traditional medicine, barks of *Abarema cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes (Leguminosae) are used mostly treating wound healing, inflammation, as analgesic, antiseptic and to treat leucorrhea (Silva, 2006; Agra et al., 2008). Phytochemical studies of these species have also revealed the presence of terpenoids (triterpenoids, steroids and saponins), polyphenols (tannins, catechins, flavonoids, anthraquinones) (Mendonça, 2000; Silva, 2009).

The pharmacological activity of saponins, such as their anti-inflammatory, antitumor, antiexudative, antiulcer, analgesic, antipyretic and immunostimulant, has been known for many years, while new actives are continually being discovered (Hostettmann; Martdon, 1995).

Natural products exhibiting analgesic properties are of great interest for many reasons. Keeping in view the ethnobotanical use of the plant in the treatment of painful conditions, the current study was to provide scientific background to this claim.

Material and Methods

Plant material

Stem barks of *A. cochliocarpa* were collected around João Pessoa - State of Paraíba – Brazil, during the month of January, 2006. A voucher specimen (N° 61.336) has been

deposited in herbarium Prof. Lauro Pires Xavier of Botanical Department of the Federal University of Paraíba.

Obtations of the extract and fractions

The air dried powdered stem barks (3 kg) were extracted with 70% ethyl alcohol (3 x 3000 mL) and the pooled extract was concentrated under vacuum below 50 °C to give 560 g of gummy material. 50 g of this residue was chromatographed on a sílica gel column (2000 g Kieselgel Merck 0,05-02 mm). Eluition with dichloromethane-methanol (9:1) gave fractions containing two saponins (withe colour with water on TLC and brown colour with vanillin-H₂SO₄). These fractions were combined, and concentrated in vacuo leaving 3,2 g residue.

Animals

Female Swiss albino mice (*Mus musculus*) with body weight 20 – 30 g, two months old at the beginning of the experiment were used. Animals were maintained in a room with controlled temperature 22 ± 2 °C for 12 h light/dark cycle with free access to food and water. All experiments were conducted between 10:00 am and 4:00 pm. Female mice were tested without monitoring the estrus cycle. All the animals were carefully monitored and maintained in accordance with the ethical recommendation of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and the National Institute of Health Guide for Care and use of Laboratory Animals approved by the Biomedical Science Institute/UFPE, Ethical Committee for Animal Research, and received the number 041544/2006-47.

Drugs

Morphine was obtained from Sigma (USA). The fractions were diluted with saline (0,9%). All solutions were administered via intraperitoneal (i.p.) route in volume of 0,1mL/10g body weight.

Hot plate test

Mice were divided into five groups, each group of six animals. The tests were used, following the method described by Yeh and Mitchell (1971). The test animals received PSF obtained from EEAc 1 h before measurements. In the control group, saline (0,1 mL/10g, i.p.) was administered (i.p.), and morphine 10 mg/kg, (i.p.) was given to the standard group. Each assessment was carried out for a period of 15 min and the tests were performed at 30, 60, 90, and 120 min intervals after the respective treatments.

Tail immersion test

The mice were divided into five groups of six animals in each group. Group I received saline (0,1 mL/10g), and group II that served as standard group, received morphine (10 mg/kg, i.p.). The test animals received PSF obtained from EEAc The analgesic activity was evaluated 30 min after administration of the extract, and morphine was evaluated 15 min after administration. The tail (up to 5 cm) was then dipped into a pot of water maintained at 55 °C. The time (in seconds) the mouse took to withdraw its tail clearly out of the water was taken as the reaction time according to Janssen et al (1963).

Formalin test

The method of Fasmer et al. (1985) was used. For this, 20 µl 1% formalin was administered (n = 6) in the mouse right hind paws and the licking time was registered

from 0 to 5 min (phase 1, neurogenic) and from 20 to 25 min after the intraplantar injection of formalin (phase 2, inflammatory). Animals were pretreated with PSF of the *A. cochliocarpa* or morphine (10 mg/kg, i.p.), 30 min before formalin administration. Control animals were injected with a similar volume of saline (10 ml/kg body weight).

Acetic acid-induced writhing

The analgesic effect of extract was evaluated in mice using the Acetic acid-induced writhing test. Mice were divided into 5 groups of 6 animals each. Saline (0,1 mL/10g, i.p. - controls), PSF and morphine 10 mg/kg, (i.p.) were administered. Thirty min after treatment, acetic acid (0.85% v/v solution) was injected (i.p.) at a dose of 10 mg/kg. The number of writhings was counted and recorded for 15 min (Almeida et al., 1999).

Statistical analysis

The data obtained were analyzed using the GraphPad software program Version 5.0 and expressed as a mean $\pm$ S.D. The data was submitted to analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman–Keuls test. *p*-Values less than 0,05 ($p < 0,05$) were used as the significance level.

Results

As presented in Table 1, the PSF obtained EEAc, administered intraperitoneally at doses of 51,5 mg/kg produced a significant antinociceptive action when compared to the control group and one similar to that of morphine at 10 mg/kg (i.p.). The response was showed by the increase in latence time in seconds. The increase in latency time was measured at 0, 30, 60, 90 and 120 min after the administration of vehicle, FS and standard drug morphine. The peak protection against thermal pain was achieved at 90 min do FS administration compared to vehicle.

The Fraction saponin obtained from EEAc (Table 2) administered intraperitoneally at dose of the 51,5 mg/Kg produced a significant antinociceptive action when compared to the control group and one similar to the action of morphine (10 mg/kg, i.p.).

The intraperitoneal administration of Fraction saponin obtained from EEAc caused a significant reduction in the number of writhing episodes induced by acetic acid compared to the control ($p < 0,05$). The Fraction saponin obtained from EEAc produced a near maximal inhibition of the writhing response similar to that of morphine. The results are provided in Table 3.

The PSF obtained from *A. cochlicarpa* offered marked and significant reduction in pain induced by formalin as compared to control in both the early and late phases ($p < 0,05$). The reference drug, morphine (10 mg/kg, i.p.), suppressed both phases of the pain stimulus ($p < 0,05$; Fig. 1).

Discussion and conclusion

The present study was conducted to assess the antinociceptive effect of the purified fractions saponins of EEAc, a medicinal claimed in Brazilian folk medicine for its analgesic and anti-inflammatory properties. It was demonstrated on chemical nociception in the test models of acetic acid-induced writhing, formalin-induced paw licking and on thermal nociception in hot plate test. These methods were selected such that both centrally and peripherally mediated effects were investigated. The acetic acid-induced abdominal constriction is believed to show the involvement of peripheral mechanisms, whereas the hot plate test is believed to show that of central mechanisms (Abbott and

Melzack, 1986). The formalin test is used to investigate both peripheral and central mechanisms (Tjolsen et al., 1992).

PFS showed marked antinociceptive activity in various pain models including visceral pain model, formalin test, hot plate test and tail flick test. Results of the present study demonstrated that the PFS possessed antinociceptive activity evident in all the nociceptive models, which suggestive of the presence of both central and peripherally mediated activities. The acetic-induced contorcion has been used as screening tool for the assessment of analgesic or antiinflammatory agents (Coolier et al., 1968).

Algesic effects os acetic acid are due the liberation of several mediators such as histamine, serotonin, bradykinin, cytokines, substance P and eicosanoids with an increase in peritoneal fluid levels of these mediators (Deraedt et al., 1980; Ikeda et al., 2001; Tsung-chun et al., 2007). These mediators are able to increase vascular permeability, reduce the threshold of the nociception and stimulate the nervous terminal of nociceptive fibres (Martinez et al., 1999). Hyperalgesia induced by the injection of acetic acid is characterized by contraction of the abdominal muscle accompanied by extension of the forelimbs and body elongation. These peripheral nociceptive fibers are sensitive to both narcotics analgesic (morphine and non-steroid anti-inflammatory drugs (Wibool et al., 2008).

It has been widely reported that formalin-induced persistent pain in mice paws involves two distinct phases: neurogenic, corresponding to the first phase (0-5 min), followed by inflammatory, accompanied by the release of inflammatory mediators and designated as second phase (15-30 min) (Hunskaar et al., 1985; Murray et al., 1988). In rats, the spontaneous nocieptive responses are typically characterized by lifting, bit/licking and flinching of hind paw after injection of formalin into either the dorsal or plantar surface of the paw (Nisar et al., 2008). Centrally acting drugs such opioids inhibit both phases

equally but peripherally acting drugs inhibits only the late phase. The antinociceptive activity of the saponins fractions was also manifested in the formalin test showing inhibition during both phases. This is of interest considering that both phases are sensitive to centrally acting drugs such as opioids (Shibata et al., 1989). To confirm the participation of central system in the antinociceptive activity of FS hot plate test and tail flick test was employed.

In the present study we demonstrated that PSF of EEAc prolonged the latency in both thermal tests of nociception. The tail-immersion and hot-plate tests have been widely used as experimental models to measure nociception, especially for the screening of analgesic drugs (Dewey et al., 1969). Tail-immersion is considered to be a spinal reflex, but the mechanism of response could also involve higher neural structures (Jensen and Yaksh, 1986). The hot-plate test produces, at constant temperature, two kinds of behavioural response, which are paw licking and jumping. Both of these are considered to be supraspinally integrated responses (Chapman et al., 1985). It is therefore, selective for centrally acting analgesic drugs, like morphine, while peripheral antinociceptive agents are found to be inactive on thermal stimulus (Yu-Feng et al., 2008).

The antinociceptive of saponins is well documented in literature (Dilipkumar et al., 2005; Kumar, Nemmani, 2002; Farouk et al., 2008), therefore, the saponins of *A. cochliocarpa* could be the antinociceptive constituents. Further fractionation and analysis of the fraction tested here will produce more purified proteins that will be tested in order to isolate the active molecule.

In conclusion, the present study demonstrated that the purified fractions saponins of EEAc possess significant antinociceptive effects in laboratory animals at the doses investigated and thus substantiated the traditional claim of the plant in the treatment of painful conditions. For further clarification of the mechanism and involvement of specific

components in the present study, bioassay directed isolation of pharmacologically active molecules of the plant is needed.

Acknowledgement

Authors acknowledge the Laboratory of Pharmaceutical Technology, Mr. Fernando Antonio C. Viana, Mr. Raimundo Nonato da Silva and Funding agency CAPES.

References

- (1) Oliveira, R.R.B., Góis, R.M.O., Siqueira, R.S., Almeida, J.R.G.S., Lima, J.T., Nunes, X.P., Oliveira, V.R., Siqueira, J.S., Quintans-Júnior, L.J. 2009. Antinociceptive effect of the ethanolic extract of *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Sm., Fabaceae, in rodents. *J of Pharmacognosy* 19: 672-676.
- (2) Silva, N.C.B. 2006. *Potencial biotecnológico de plantas medicinais: estudo etnofarmacológico em uma comunidade quilombola da Chapada Diamantina - BA*. Rio de Janeiro, 227 p. Ph.D. Thesis - Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- (3) Agra, M.F., Silva, K.N., Basílio, I.J.L.D., França, P.F., Barbosa-Filho J.M. 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 18: 472-508.
- (4) Mendonça, R.P.C. 2000. *Estudo da atividade biológica de Pithecolobium avaremotemo Mart. e de alguns compostos obtidos comercialmente*. Maceió, 123p MSc. Thesis - CPGQB, Universidade Federal de Alagoas.
- (5) Silva, N.C.B, Esquibel, M.A, Alves, I.M.; Velozo, E.S., Almeida, M.Z., Santos, J.E.S, Campos-Buzzi, F., Meira, A.V, Cechinel-Filho, V. 2009.

Antinociceptive effects of *Abarema cochliacarpus* (B.A. Gomes) Barneby & J.W.Grimes (Mimosaceae). *Rev. Bras. Farmacogn* 19: 46-50.

- (6) Hostettmann, K., Marston, A. 1995. **Saponins**. Cambridge University press, Cambridge, U.K., pp. 59.
- (7) Yeh, S.Y., Mitchel, C.L. 1971. Analgesic activity and toxicity of oripavine and Ø-dihydrothebaine in the mouse and rat. *J of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 179: 642-651.
- (8) Janssen, P.A.J., Niemegeers, C.J.E., Dony, J.G.H. 1963. The inhibitory effect of fentanyl and other morphine-like analgesics on the water induced tail withdrawal reflex in rats *Arzneimittel-Forschung. Drug Research* 6: 502-507.
- (9) Fasmer, O.B., Berge, O.G., Hole ,K. 1985. *Neuropharmacology* 24: 729–734.
- (10) Almeida, R.N., Falcão, A.C.G.M., Diniz, R.S.T., Quintans-Júnior, L.J., Polari, R.M., Barbosa-Filho, J.M., Agra, M.F., Duarte, J.C., Ferreira, C.D., Antonioli, A,R,, Araújo, C.C. 1999. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. *Rev Bras Farm* 80: 72-76.
- (11) Abbott, F.V., Franklin, K.B.J. 1986. Noncompetitive antagonism of morphine analgesia by diazepam in the formalin test. *Pharmacol Biochem Behav* 24: 319-321.
- (12) Tjolsen, A., Berge, O.G., Hunskaar, S., Rosland, J.H., Hole, K. 1992. *Pain* 51: 5-9.

- (13) Collier, H.D.J., Dinnin, L.C., Johnson, C.A., Schneider, C. 1968. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Brit J Pharmacol Chemother* 32: 295-310.
- (14) Deraedt, R., Jouquey, S., Deleval'ee, F., Flahaut, M., 1980. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. *European Journal of Pharmacology* 61: 17–24.
- (15) Ikeda, Y., Ueno, A., Naraba, H., Oh-Ishi, S. 2001 .Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. *Life Sci* 69: 2911–2919.
- (16) Tsung-Chun, L., Yu-Zen, K., Hsin-Wei, H., Ying-Chun, H., Ying-Chih, L., Wen-Huang, P. 2007. Analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous extract from *Glycine tomentella* root in mice, *Journal of Ethnopharmacology* 113: 142–148.
- (17) Martinez, V., Thakur, S., Mogil, J.S., Taché, Y., Mayer, E.A. 1999. Differential effects of chemical and mechanical colonic irritation on behavioral pain response to intraperitoneal acetic in mice, *Pain* 81: 163–185.
- (18) Wibool, R., Chutha, S., Wantana, R., Malinee, W. 2008. Antinociceptive activity of the methanolic extract of *Kaempferia galangal* Linn. in experimental animals, *Journal of Ethnopharmacology* 118: 225–230.
- (19) Hunskaar, S., Fasmer, O.B., Hole, K. 1985. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J of Neuroscience Methods* 14: 69–76.

- (20) Murray, C.W., Porreca, F., Cowan, A. 1988. Methodological refinements to the mouse paw formalin test. An animal model of tonic pain. *J of Pharmacological Methods* 20: 175–186.
- (21) Nisar, M., Khan, I., Simjee, S.U., Gilani, A., Obaidullah, H. Perveen, H. 2008. Anticonvulsant, analgesic and antipyretic activities of *Taxus wallichiana* Zucc, *Journal of Ethnopharmacology* 116: 490–494.
- (22) Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H., Inoki, R. 1989. Modified formalin test; characteristic biphasic pain response. *Pain* 38: 347– 352.
- (23) Dewey, W.L., Snyder, J.W., Harris, L.S., Howes, J.F. 1969. The effect of narcotics and narcotic antagonists on the tail-flick response in spinal mice. *J Pharm Pharmacol* 21: 548–550.
- (24) Jensen, T.S., Yaksh, T.L. 1986. Comparison of antinociceptive action of morphine in the periaqueductal gray, medial and paramedialmedullal in rat. *Brain Res* 363: 99–113.
- (25) Chapman CR, Casey KL, Dubner R, Foley DM, Graceley RH, Reading AE: Pain measurement: an overview. *Pain* 1985, 22:1–31.
- (26) Yu-Feng, C., Nan, L., Yu-Liang, J., Peng, W., Qiao-Yan, Z., Rahman, K., Han-Chen, Z., Lu-Ping, Q. 2008. Antinociceptive activity of petroleum ether fraction from the MeOH extracts of *Paederia scandens* in mice, *Phytomedicine* 15: 427–436.
- (27) Dilipkumar, P., Sahoo, M., Mishra, A.K. 2005. analgesic and anticonvulsant effects of saponin isolated from the stems of *opuntia vulgaris* mill. in mice. *European Bulletin of Drug Research* 13: 91- 97.
- (28) Kurnar, V.S., Nemmani, P. 2002. Role of benzodiazepine–GABA_A receptor complex in attenuation of U-50,488H-induced analgesia and inhibition of

tolerance to its analgesia by ginseng total saponin in mice. *Life sciences* 70: 1727-1740.

- (29) Farouk, L., Laroubi, A., Aboufatima, R., Benharref, A., Abder-rahman, C. 2008. Evaluation of the analgesic effect of alkaloid extract of *Peganum harmala* L. Possible mechanisms involved, *Journal of Ethnopharmacology* 115: 449–454.

Table 1. Effect of purified saponin fraction of *A. cochliocarpa* on mice assessed by the hot plate test.

Material	Dose (mg/kg)	Latency time				
		Basal	30	60	90	120
Control		6.5±0.5	5.8±0.75	6.1±0.7	6.0±0.6	6.1±0.40
PSF	51,5	6,5±0.75	6,5±0.5*	14,3±0.8***	17,3±0.4***	19±0.41***
Morphine	10	6.5±0,5	6.8±0.7*	16.50±0.54***	17.67±0.51***	18.5±0.54***

Results are expressed as the mean ± S.D in seconds (n = 06). (one-way ANOVA followed by Newman–Keuls test): ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ compared to the control group.

Table 2. Effect of purified saponin fraction of *A. cochliocarpa* on mice assessed by the tail immersion test.

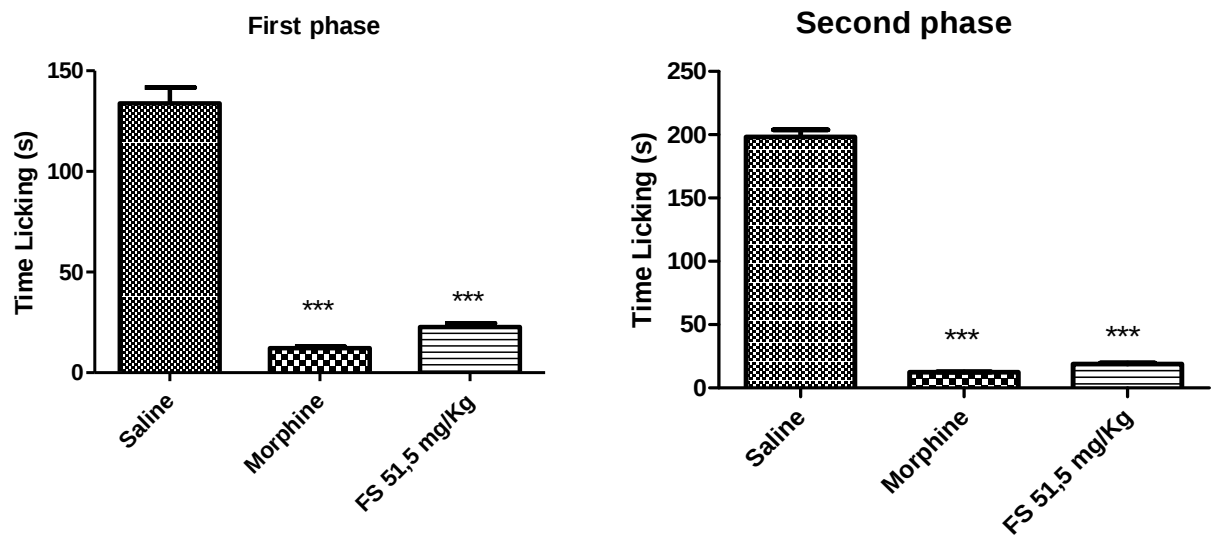
Material	Dose (mg/kg)	Latency time				
		Basal	30	60	90	120
Control		6.5±0.54	6.5±0.54	6.5±0.54	6.5±0.54	6.4±1.5
PSF	51.5	6.6±0.51	10.0±0.8***	13.5±0.50***	17.5±1.0***	19.3±0.52***
Morphine	10	6.5±0.54	13±0.51***	16.6±0.8***	17.5±0.5***	20.5±0.54***

Results are expressed as the mean ± S.D in seconds (n = 06). (one-way ANOVA followed by Newman–Keuls test): ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ compared to the control group.

Table 3. Effect of purified saponin fraction of *A. cochliocarpa* evaluated using acetic acid-induced writhing in mice

Treatment (mg/kg,i.p.)	Writhing (mean $\pm$ S.D)
Saline (control)	55.3 $\pm$ 8.6
PSF (51.5)	1.5 $\pm$ 2.3***
Morphine (10)	3.7 $\pm$ 0.4***

n=6. ***p<0.05 compared to saline group values. PSF: purified saponin fraction

**Figure 1-** Effects purified saponin fraction obtained from *Abarema cochliocarpa* on the licking induced by formalin in mice. Results are expressed as the mean $\pm$ S.D in seconds (n = 06). (One-way ANOVA followed by Newman-Keuls test *** $p < 0,05$ compared to the control group.

10 Artigo V.I.I.I

Artigo a ser submetido a Revista Life Sciences



***In vivo* study of the antitumoral activities of purified fractions from the stem barks
from *Abarema Cochliocarpa* (Leguminosae).**

**Renata Patrícia Freitas Soares de Jesus^a, Isla Vanessa Gomes Alves Bastos^a,
Haroudo Sátiro Xavier^a, Paloma L. de Medeiros^b, Ivone A. Souza^c.**

^aDepartment Pharmacological Science, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rêgo, 1235 Cidade Universitária, Recife, 50740521- Pernambuco, Brazil.

^bDepartament of Embryology and Histology, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rêgo, 1235 Cidade Universitária, Recife, 50740521- Pernambuco, Brazil

^c Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rêgo, 1235 Cidade Universitária, Recife, 50740521- Pernambuco, Brazil.

Abstract

Abarema cochliocarpa is a medicinal specie often used in Brazil for the treatment of several diseases including inflammations and cancer. To evaluate the antitumor activities of the fractions obtained from ethanoholic extract stem barks of *A.cochliocarpa* (EEAc) in an attempt to determine whether the medicinal uses are supported by pharmacological effects. The antitumor effect was evaluated in an *in vivo* experimental study, using the following tumors: Sarcoma-180 and Ehrlich ascite carcinoma. After treatment of seven days, the animals were sacrificed and the tumoral mass, as well as liver, spleen, lung and kidneys were dissected and fixed for histopathological analysis. There were statistically significant decreases ($p < 0.05$) of inhibited the growth of sarcoma-180 and Ehrlich ascite carcinoma tumors in mice in at the dose of 5,2 mg/kg (i.p.) of the ethanolic extract of *A. cochliocarpa*. In the histological evaluation of the organs variation between the groups was evidenced, emphasizing the presence of interstitial pulmonary involvement of the

treated animals with saponin fraction. All the animals treated with the extract presented solid tumors and discrete vascularization. The results suggest that fractions leucoanthocyanidin and protoanthocyanidin obtained from the ethanolic extract of *Abarema cochliocarpa* possesses antitumor activities, supporting the folk use of this medicinal specie.

Keywords: Antitumor activity; Sarcoma-180; Ehrlich ascite carcinoma; *Abarema cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes; Leguminosae.

1. Introduction

Brazil is a rich source of medicinal plants and a number of plant extracts are used against diseases in folk medicine, but only a few of these have been scientifically investigated. Plant-derived natural products such as flavonoids, terpenes, alkaloids, and so on have received considerable attention in recent years due to their diverse pharmacological properties, including and cancer chemopreventive effects (Roja and Heble, 1994; Di Carlo et al., 1999).

The *Abarema cochliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes (Leguminosae) is a native species from Brazilian and distributed in America. It is commonly known as “barbatimão” and its use is frequent in folk medicine against inflammations, wound-healing, as analgesic, antiinflammatory, antiseptic and to treat leucorrhea, among other uses (Silva, 2006; Agra et al., 2008).

Previous pharmacological studies showed that *A. cochliocarpa* possesses anti-ulcerogenic (Silva, 2003), antinociceptive (Silva, 2009) and antimicrobial properties (Araújo et al., 2002; Santos et al., 2007). The bark of this specie contain tannins, triterpenoids, cathechins, saponins, phenols and anthraquinones (Mendonça, 2000; Silva,

2009). These phytochemicals possess chemotherapy effects (Hirose et al., 1995, Taraphdar et al., 2001, Akayo et al., 2003 and Wang et al., 2003).

In Brazil, especially in the Northeast Region, the use of this medicinal specie is a practice widely employed, mainly in the form of crude extracts and infusions, to the treatment of several diseases including cancer (Oliveira, Lima, Souza, 2007). However, there were no pharmacological evidences that support the use of this medicinal specie yet. Therefore, it is necessary to investigate the antitumor activities of purified fractions of *A. cochliocarpa* in order to determine whether the medicinal uses are supported by pharmacological effects.

2. Materials and methods

2.1 Plant material

Stems bark of *A. cochliocarpa* were collected in the Greenhouse of the Laboratory of Pharmaceutical Technology of the Federal University of Paraiba, Paraíba, Brazil, during the month of January, 2006 and were identified by Dra. Rita de Cássia A. Pereira (IPA-PE). The voucher specimen were deposited in the herbarium Prof. Lauro Pires Xavier under number 61336 of Botanical Department of the Federal University of Paraíba.

2.2 Obtations of the extract and fractions

The air dried powdered stem barks (3 kg) were extracted with 70% ethyl alcohol (3 x 3000 mL) and the pooled extract was concentrated under vacuum below 50 °C to give 560 g of gummy material. 50 g of this residue was chromatographed on a sílica gel column (2000 g Kieselgel Merck 0,05-02 mm). Elution with dichloromethane-methanol (9:1) gave fractions containing two saponins (with the colour with water on TLC and brown colour with vanillin-H₂SO₄). These fractions were combined, and concentrated in vacuo

leaving 3,2 g residue. The fractions eluted with dichloromethane-methanol (9:3) provided 3,8 g a mixture of two leucoantocianidinas (TLC vanillin-HCl, red colour with vanillin- HCl). Finally, fractions eluted with the mixture (9:5) showed essentially contain 3,6 g proatocianidina condensed (TLC vanillin-HCl, red colour with vanillin- HCl).

2.2. Animals

Swiss albino female mice (*Mus musculus*; weight 25 ± 10 g) were obtained from the animal house of the Department of Antibiotics of the Federal University of Pernambuco, Brazil. All the animals were maintained under standard condition, with temperature at 25 ± 2 °C, 12 h dark-light cycle and relative humidity. The animals received food and water *ad libitum*. The experiments were carried out in accordance with the ethical principles of The Brazilian College of Animal Experiments and the National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals. This study was approved by the Committee of Experimental Animal of the Federal University of Pernambuco (041544/2006-47).

2.3. Antitumoral activities

2.4.1. Tumor cells

Sarcoma-180 ascite and Ehrlich ascite carcinoma were maintained *in vivo* in mice by transplantation of 0,2 mL of ascites (1×10^7 cell) from the infected mice to the non-infected mice.

2.4.2. Sarcoma-180

The sarcoma-180 ascites (S-180) tumor cell (1×10^7 cell/mouse) were subcutaneously implanted into the inguinal region of the mice in accordance with Sugiura et al., (1955), with some modifications. The mice were divided into six groups, with five mice per group. The group of negative control received saline solution at 0,9% (i.p.). The positive control group received 10 mg/kg of the Metrotexat (i.p.) (Sigma Chemical, Co., USA). The groups III, IV and V received 5,2 mg/kg (i.p.) of the saponins, leucoanthocyanidin and protoanthocyanidin fractions, respectively.

2.4.3. Ehrlich ascite carcinoma

Similarly, Ehrlich ascite carcinoma cells (EACs) (1×10^7 cell/mouse) were implanted in the inguinal region of the mice, as previously reported by Sugiura et al., (1955), with modifications. The animals were divided into five groups (six animals in each group). The group corresponding to the negative control received saline solution (0,9%, i.p.). The positive control group received 10 mg/kg of the Metrotexat (i.p.) (Sigma, USA). Mice of groups III, IV and V received 5,2 mg/kg (i.p.) of the saponins, leucoanthocyanidin and protoanthocyanidin fractions, respectively.

2.4.4. Treatment

The animals were treated with the fractions obtained from EEAc and Metrotexat during seven days. On the eighth day, the mice were weighed, euthanized and the tumors were removed, as well as liver, spleen, heart and kidneys were dissected and fixed for histopathological analysis. The inhibition of tumor growth was calculated by percentage of reduction of the tumors when compared with the control group.

2.4.5 Histologic analysis

The wound tissues were fixed with 10% formalin, embedded in paraffin, and sectioned. Sections of 5 μ m thickness were stained using hematoxylin-eosin (HE). In microscopy (MOTIC BA200) was evaluated.

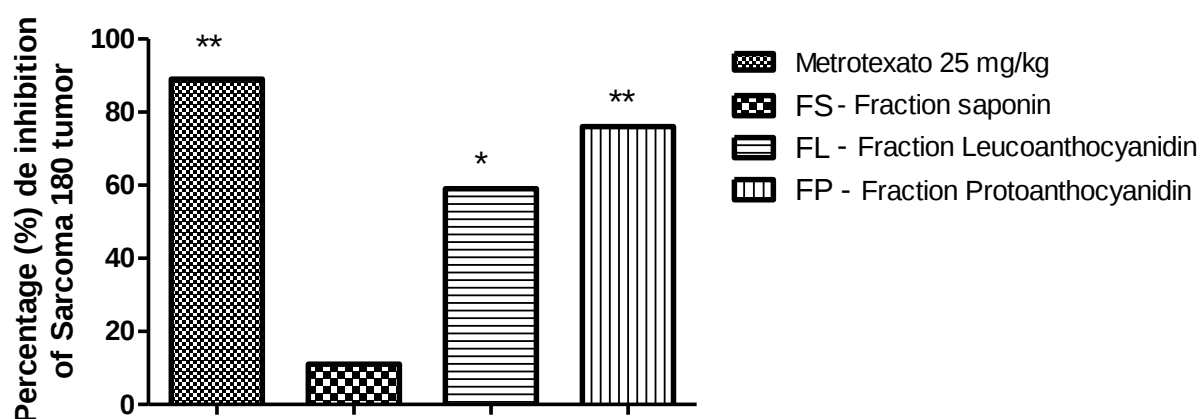
2.5. Statistical analysis

The values are expressed in mean $\pm$ S.D. Data were statistically evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA). The values were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Sarcoma-180

The results showed a significant inhibition on the growth of S-180 tumor in mice treated with the fractions tannins obtained from *A.cochliocarpa*. As shown in Fig.1 the fraction of proanthocyanidin of EE of *A.cochliocarpa*, significantly reduced ($p < .05$) the growth of S-180 tumor with percentage of inhibition of 76%, while the fractions of Saponin and Leucoanthocyanidin of the EE of *A. cochliocarpa* reduced, 11% and 59%, respectively. In the groups treated with 10 mg/kg of the Metrotexat, it was observed a reduction of 89% of tumoral growth. There were no significant differences in body weight before and after of the treatments (date not showed).



Graf. 1 Percentage (%) of inhibition of growth of Sarcoma-180 ascite tumor in mice treated with fractions obtained from *A.cochliocarpa* (n = 6, per groups). Doses of 2,5 mg/kg of Metrotexat and 5,2 mg/kg of the fractions of *A .cochliocarpa* were intraperitoneally administrated. Data are expressed as the mean $\pm$ S.D. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ was considered statistically significant.

The histological data revealed the presence of inflammatory cells in kidneys from animals treated with methotrexate and fraction obtained from EEAc, as well as visualization of renal vessels congested. Changes were observed as peribronchiolar lymphocytic infiltration, thickening of the septum with reduction of the lights of some alveoli and vascular congestion when compared to the descriptions for the control group. The reactions were more intense in the group treated with saponin (Figure 2A) compared with groups treated with fractions leucoanthocyanidine and proanthocyanidine (Figura 2B e 2C). The structural characteristics of sarcoma 180 in control and treated groups did not differ and showed infiltrated with adipose tissue and skeletal muscle.

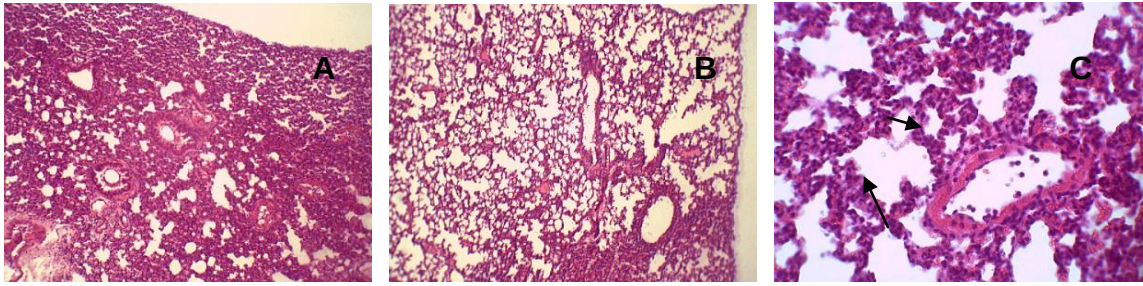
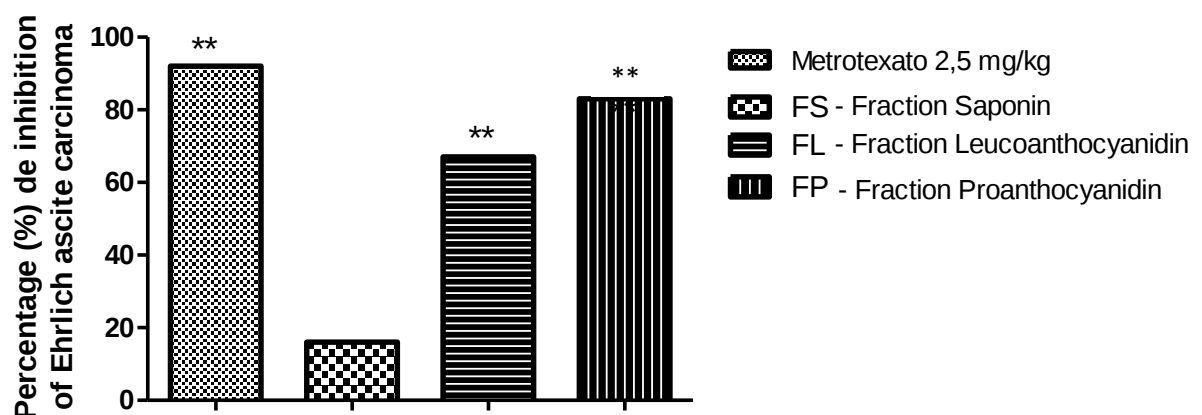


Figure 1- Photomicrographs of lungs in the groups treated with fractions of *A. cochliocarpa*. Notice of interstitial pulmonary involvement with thickening of the septum and reduction of the lights of some alveoli in the group treated with saponin (A) and the group treated with protoanthocyanidin (B) H.E: 10x. (C) Inter-alveolar septal thickening and reduction in light of some alveoli in the group treated with leucoanthocyanidin HE.: 40x

Ehrlich ascite carcinoma

There was a significant inhibition on the growth of EAC tumor in mice. The group treated with fractions proanthocyanidin obtained from *A. cochliocarpa* showed a significant reduction ($p < .05$) of EAC tumoral growth, with inhibition percentage of 83% (Fig.2). Doses of 5,2 mg/kg fractions of Saponin and Leucoanthocyanidin of EEA_c reduced 16% and 67%, respectively. Groups treated with 10 mg/kg of the Metrotexat showed a reduction of almost 92% of tumoral growth. There were no significant differences in body weight before and after of the treatments (date not showed).



Graf. 3 Percentage (%) of inhibition of growth of Carcinoma de Ehrlich ascite tumor in mice treated with fractions obtained from *A.cochliocarpa* (n = 6, per groups). Doses of 2,5 mg/kg of Metrotexat and 5,2 mg/kg of the fractions of *A .cochliocarpa* were intraperitoneally administrated. Data are expressed as the mean $\pm$ S.D. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ was considered statistically significant.

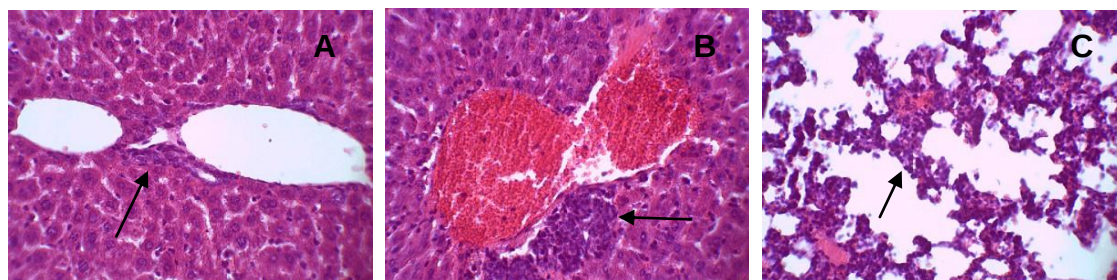


Figure 2- Photomicrographs of livers and lungs in the groups treated with fractions of *A. cochliocarpa*. Figures A and B note the presence the perivascular infiltrate (arrows) more intense in the group treated with saponin compared with the group treated with tannin. (C) Interstitial pulmonary involvement with thickening of the septum and reduction of the lights of some alveoli in the group treated with saponin (C) H.E: 40x.

The animals treated with fractions obtained from showed interstitial pulmonary involvement, as evidenced by a process of alveolitis limited possibly due to an allergic mechanism Figure 2-C). Changes were observed as peribronchiolar lymphocytic infiltration, thickening of the septum with reduction of the lights of some alveoli and vascular congestion when compared to the descriptions for the control group. However, the reactions were more intense in the group treated with saponin (Figures 2-A). The structural characteristics of Ehrlich carcinoma in control and treated groups did not differ and showed cells with different formats, infiltrated with adipose tissue and skeletal muscle.

The liver of animals treated with at a fraction saponin showed the intense presence of congested vessels (figure 2-B) and perivascular infiltrate

Discussion and conclusion

Drug discovery from medicinal plants has played an important role in the treatment of cancer and, indeed, most new clinical applications of plant secondary metabolites and their derivatives over the last half century have been directed towards combating cancer

(Butler, 2004). In this study, the anticancer activity of three fractions purified from *A. cochliocarpa* extracts from Brazilian folk medicine was investigated.

Preliminaries analysis was performed by the phytochemical group and was revealed that crude and methanolic extracts of *A. cochliocarpa* gave positive results for saponins, catechins, tannins, phenols and anthraquinones (Silva et al., 2009). Phytochemical analysis of the butanolic fraction identified a high content polyphenols. The tannins are of condensed subgroup, proanthocyanidins, and the major constituents were catechins and the minor were dimers and trimers. The NMR characterization shows the major constituent was (+)-catechins (Silva et al., 2010).

Data from this study indicates that fractions tannins have an important anticarcinogenic effect ($p < 0,05$) against sarcoma 180 and Carcinoma de Ehrlich tumors, showing better activity when compared with the saponin fractions and leucoanthocyanidins.

Tannins are polyphenol compounds that exist widely in plants. Non-specific precipitation of protein is the common characteristic of tannins. Condensed tannins are structurally more complex, and more widely spread among the plants than hydrolyzable tannins. They are mainly the oligomers and polymers of flavan-3-ols (catechins), also known as proanthocyanidins (Harborne, 1998, Xiao et al., 2000, Schofield et al., 2001). Some authors considered that the polymerized products of flavan-3,4-diols also belong to the category of condensed tannins, also called leucoanthocyanidins (Chung et al., 1998).

These phenolic phytochemicals have recently aroused considerable interest because of their broad pharmacological activity. Tannins have been shown to have antiviral (Nakashima et al., 1992), antibacterial (Chung et al., 1998), immunomodulatory (Feldman et al., 1999; Wang et al., 2002), hepatoprotective (Bhattacharya et al., 2000; Lin et al., 2001), antitumor (Gali-Muhtasib et al., 2001; Magiatis et al., 2001; Salem et al.,

2002, Borrelli et al., 2004) activities as well as antioxidant capacity (Nakagawa and Yokozawa, 2002). The latter renders these polyphenols particularly useful in the prevention of human pathologies in which free radical production plays a key role, such as atherosclerosis, ischemic injury, aging, neurodegenerative diseases (Parkinson and Alzheimer), inflammation and cancer (Halliwell, 1994).

Flavonoids are phenolic compounds that show a basic C6–C3–C6 skeleton: two benzene rings linked by a three carbon chain. Many different groups of flavonoids have been described according to their chemical composition, and over four thousand flavonoids have been identified and characterized in nature (Shirley, 1996; Heim et al., 2002). Flavonoids are of great interest for human health due to their antiinflammatory (Subarnas and Wagner, 2000), antiplatelet (Lou et al., 1992), antiviral (Formica and Regelson, 1995) and antitumoral (Duthie et al., 2000) activities.

Different *in vitro* studies have showed that polyphenols including catechins are able to inhibit COX-2 expression. It has been demonstrated how theaflavin monogallate from black tea suppressed COX-2 in human colon cancer cells (Lu et al., 2000). Studies from de Gerhauser et al. (2003) and Hong et al. (2001) have revealed that catechins have COX-1/COX-2 inhibitory activity in different human and mouse cell lines of colon tumor tissues.

Saponins are known to form pores in biological and artificial membranes (Dourmashkin et al. 1962, Bangham et al., 1962, Li et al., 2005). Due to its ability is frequently used as a classical permeabilizant agent and possess many biological activities such as hemolytic, antiviral, fungicidal, antimicrobial, cytotoxic, proapoptotic, neuroprotective, anti-platelet aggregation, antiinflammatory and antitumoral (Chwalek et al., 2006, Huang et al., 2007; Son et al., 2007; Sparg et al., 2004). Recently, a number of

studies have demonstrated the cytotoxic and anti-tumor activity in tumor cells (Setzer and Setzer, 2003; Sparg et al., 2004, Wang et al., 2009).

A saponin contained in *P. racemosum* and other legume seeds has shown cytotoxic activity against cancer cell lines of ovaries (A2780) and lungs (M109) (Abdel-Kader et al., 2001, Seo et al., 2002). Although in vitro studies with family *Pithecellobium* demonstrate antitumor activity in different cell lines, this research found no inhibitory effect *in vivo* of saponins front of carcinomatous and sarcomatous tumors. Although they have been recorded yet secondary metabolites for the species *A. cochliocarpa*, data from the literature for other taxons show the presence of predominantly oleonolic saponosides and diterpenes (Khan; Clark; McChesney, 1997).

The results demonstrate that leucoanthocyanidin and protoanthocyanidin fractions can play a significant effect in the inhibition of carcinogenic processes. Further studies should be performed to elucidate and isolated the compounds responsible for these activities.

Acknowledgement

Authors acknowledge the Laboratory of Pharmaceutical Technology, Mr. Fernando Antonio C. Viana, Mr. Raimundo Nonato da Silva and Funding agency CAPES.

References

- Abdel-Kader, M.; Hoch, J.; Berger, J. M.; Evans, R.; Miller, J. S.; Wisse, J. H.; Mamber, S. W.; Dalton, J. M.; Kingston, D. G. I. Two bioactive saponins from *Albizia sudimidiata* from the Suriname Rainforest. *J. Nat. Prod.* 2001, 64, 536-539.
- Agra M.F., Silva K.N., Basílio I.J.L.D., França P.F., Barbosa-Filho J.M., 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 18: 472-508.

Akayo Y., Maruyama H., Matsumoto K., Ohguchi K., Nishizawa K., Sakamoto T., Araki Y., Mishima S., Nozawa Y. Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines, *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **26** (2003), pp. 1057–1059.

Bangham A.D., Horne R.W., Glauert A.M., Dingle J.T., Lucy J.A., 1962. Action of saponin on biological cell membranes, *Nature* **196**, 952–955.

Bhattacharya, A., Kumar, M., Ghosal, S., Bhattacharya, S.K., 2000. Effect of bioactive tannoid principles of *Embllica officinalis* on iron-induced hepatic toxicity in rats. *Phytomedicine* **7**, 173–175.

Borrelli, F., Capasso, R., Russo, A., Ernest, E., 2004. Systematic review: green tea and gastrointestinal cancer risk. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **19**, 497–510.

Butler, M.S., 2004. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products*, **67**, 2141–2153.

Chung, K.T., Lu, Z., Chou, M.W., 1998. Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. *Food and Chemical Toxicology* **36**, 1053–1060.

Chwalek M., Lalun N., Bobichon H., Plé K., Voutquenne-Nazabadiok L., 2006. Structure–activity relationships of some hederagenin diglycosides: haemolysis, cytotoxicity and apoptosis induction, *Biochim. Biophys. Acta* **1760**, 1418–1427.

Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A.A., Capassao, F., 1999. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.*, **65**, 337–353.

Dourmashkin R.R., Dougherty R.M, Harris R.J., 1962 Electro microscopic observation on Rous sarcoma virus and cells membranes, *Nature* **194** ,1116–1119.

Duthie, G.G., Duthie, S.J., Kyle, J.A.M., 2000. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutr. Res. Rev.* **13**, 79–106.

Feldman, K.S., Sahasrabudhe, K., Smith, R.S., Scheuchenzuber, W.J., 1999. Immunostimulation by plant polyphenols: a relationship between tumor necrosis factor_ production and tannin structure. *Bioorganic and Madicinal Chemistry Letters* **9**, 985–990.

Formica, J.V., Regelson, W., 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol.* **33**, 1061–1080.

Gali-Muhtasib, H.U., Younes, I.H., Karchesy, J.J., el-Sabban, M.E., 2001. Plant tannins inhibit the induction of aberrant crypt foci and colonic tumors by 1,2-dimethylhydrazine in mice. *Nutrition Cancer* **39**, 108–116.

Gerhauser, C., Klimo, K., Heiss, E., Neumann, I., Gamal-Eldeen, A., Knauff, J., Liu, G.Y., Sitthimonchai, S., Frank, N., 2003. Mechanism based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents. *Mutation Research* **523-524**, 163–172.

Harborne J., 1998. *Phytochemical Methods: A guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Chapman & Hall, London.

Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure–activity relationships. *J.Nutr. Biochem.* 13, 572–584.

Hirose M., Akagi K., Hoshiya T., Mizoguchi Y., Ito N., Shirai T. Modulating effects of ellagic acid, vanillin and quercetin in a rat medium term multi-organ carcinogenesis model, *Cancer Letters* **94** (1995), pp. 113–121.

Hong, J., Smith, T.J., Ho, C.T., August, D.A., Yang, C.S., 2001. Effects of purified green and black tea polyphenols on cyclooxygenase and lipoxygenase-dependent metabolism of arachidonic acid in human colon mucosa and colon tumor tissues. *Biochemistry Pharmacology* 62, 1175–1183.

Huang, H.C., Tsai, W.J., Liaw, C.C., Wu, S.H., Wu, Y.C., Kuo, Y.H. 2007. Anti-platelet aggregation triterpene saponins from the galls of *Sapindus mukorossi*. *Chem. Pharm. Bull.* 55, 1412–1415.

Khan, I.A., Clark, A.M., McChesney, J.D. 1997. Antifungal Activity of a New Triterpenoid Glycoside from *Pithecellobium racemosum* (M.) *Pharmaceutical Research* 14, 358-361.

Lin, C.C., Hsu, Y.F., Lin, T.C., Hsu, H.Y., 2001. Antioxidant and hepatoprotective effects of punicalagin and punicalin on acetaminopheninduced liver damage in rats. *Phytotherapy Research* 15, 206–212.

Li X.X., Davis B., Haridas V., Gutterman J.U., Colombini M., 2005 Proapoptotic triterpene electrophiles (avicins) form channels in membranes: cholesterol dependence, *Biophys. J.* 88, 2577–2584.

Lou, F.Q., Zhang, M.F., Zhang, X.G., Liu, J.M., Yuan, W.L., 1992. A study on tea pigment in the prevention of atherosclerosis. *Prev. Med.* 21, 333.

Lu, J.B., Ho, C.-T., Ghai, G., Chen, K.Y., 2000. Differential effects of theaflavin monogallates on cell growth, apoptosis and Cox-2 gene expression in cancerous versus normal cells. *Cancer Research* 60, 6465–6471.

Magiatis, P., Pratsinis, H., Kalpoutzakis, E., Konstantinidou, A., Davaris, P., Skaltsounis, A.L., 2001. Hydrolyzable tannins, the active constituents of three Greek *Cytinus* taxa against several tumor cell lines. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 24, 707–709

Mendonça, R.P.C., 2000. Estudo da atividade biológica de *Pithecolobium avaremotemo* Mart. e de alguns compostos obtidos comercialmente. *Maceió*, 123p.

Nakagawa, T., Yokozawa, T., 2002. Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. *Food and Chemical Toxicology* 40, 1745–1750.

Nakashima, H., Murakami, T., Yamamoto, N., Sakagami, S., Tanuma, S.-I., Hatano, T., Yoshida, T., Okuda, T., 1992. Inhibition of human immunodeficiency viral replication by tannins and related compounds. *Antiviral Research* 18, 91–103.

Roja, G., Heble, M.R. 1994. The quinoline alkaloid Camptothecin and 9-methoxy camptothecin from tissue cultures and mature trees of *Nathapodytes foetida*. *Phytochemistry*, 36, 65-66.

Saleem, A., Husheem, M., Harkonen, P., Pihlaja, K., 2002. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* Retz. *Fruit. J. Ethnopharmacol.* 81, 327–336.

Santos S.C., Ferreira F.S., Rossi-Alva J.C., Fernandez L.G., 2007. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes. *Rev Bras Farmacogn* 17: 215-219.

Schofield D.M., Mbugua D.M. and Pell A.N., 2001 Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology* 91, pp. 21–40.

Seo, Y.; Hoch, J.; Abdel-Kader, M.; Malone, S.; Derveld, I.; Adams, H.; Werkhoven, M. C. M.; Wisse, J. H.; Mamber, S. W.; Dalton, J. M.; Kingston, D. G. I. Bioactive saponins from *Acacia tenuifolia* from the Suriname Rainforest. *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 170-174.

Setzer, W.N., Setzer, M.C., 2003. Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. *Mini Rev. Med. Chem.* 3, 540–556.

Silva M.S., 2003. *Avaliação farmacológica de plantas medicinais de uso popular contra distúrbios do trato gastrointestinal no Povoado Colônia Treze*. *Rev. Bras. Farmacogn. Braz J. Pharmacogn.* 19. 53-57

Silva, M.S., Sánchez-Fidalgo S., Talero E., Cárdeno A., Silva M.A., Villegas W., Brito A.R.M.S., Lastra C.A.L., 2010. Anti-inflammatory intestinal activity of *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes in TNBS colitis model. *Journal of Ethnopharmacology* 128, 467–475.

Silva N.C.B. ,2006. *Potencial biotecnológico de plantas medicinais: estudo etnofarmacológico em umacomunidade quilombola da Chapada Diamantina* - BA. Rio de Janeiro, 227 p. Ph.D. Thesis -Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Silva, N.C.B., Esquibel, M.A., Alves, I.M., Velozo, E.S., Almeida, M.Z., Santos, J.E.S., Campos-Buzzi, F., Meira, A.V., Cechinel-Filho, V., 2009. Antinociceptive effects of *Abarema cochliocarpos* (B.A. Gomes) Barneby & J.W. Grimes (Mimosaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 19, 46–50.

Shirley, B.W., 1996. Flavonoid biosynthesis: ‘new’ functions for and ‘old’ pathway. *Trends Plant Sci.* 1, 377–382.

Son I.H., Park Y.H., Lee S.I., Yang H.D., Moon H.I., 2007. Neuroprotective activity of triterpenoid saponins from *Platycodi radix* against glutamate-induced toxicity in primary cultured rat cortical cells. *Molecules* 12, 1147–1152.

Sparg, S.G., Light, M.E., van Staden, J., 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethnopharmacol.* 94, 219–243.

Subarnas, A., Wagner, H., 2000. Analgesic and anti-inflammatory activity of the proanthocyanidin shelleagueain A from *Polypodium feei* METT. *Phytomedicine* 7, 401–405.

Taraphdar A.K., Roy M., Bhattacharya R.K. 2001. Natural products as inducers of apoptosis: implication for cancer therapy and prevention, *Current Science* 80, 1387–1396.

Wang, C.C., Chen, L.G., Yang, L.L., 2002. In vitro immunomodulatory effects of cuphiin D1 on human mononuclear cells. *Anticancer Research* 22, 4233–4236.

Wang H., Qial Z., Ren W., 2003. Flavonoids: Promising anticancer agents, *Medicinal Research Review* 23, 519–534.

Wang J., Zhao X.Z., Qi Q., Tao L., Zhao Q., Mu H., Gu H.Y., Wang M, Feng X., Guo Q.L., 2009. Macranthoside B, a hederagenin saponin extracted from *Lonicera macranthoides* and its anti-tumor activities in vitro and in vivo. *Food and Chemical Toxicology* 47, 1716–1721.

Xiao C.H., Yang S.S., Hong X.K., 2000 *The Chemistry of Traditional Chinese Medicines.* , Shanghai Science and Technology Publishing House, Shanghai.

11 Conclusões



11 CONCLUSÕES

- De acordo com os valores da DL50 e CL50 apresentados, concluímos que o vegetal estudado apresenta toxicidade moderada quando administrado por via intraperitoneal;
- Foi conferida atividade antimicrobiana significativa do extrato etanólico de *A. cochliocarpa* nas concentrações testadas frente a bactérias *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivares*, *Streptococcus oralis* e *Lactobacillus casei*;
- *A. cochliocarpa* apresentou efeito antiaderente no teste de Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) frente a bactérias *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivares*, *Streptococcus oralis* e *Lactobacillus casei*;
- O extrato de *A. cochliocarpa* auxiliou o processo de cicatrização das feridas cutâneas através da redução do processo inflamatório;
- O extrato bruto etanólico da casca do caule de *A. cochliocarpa* Macbr, administrado por via intraperitoneal apresentou efeito antiinflamatório satisfatório no modelo de edema de pata induzido por carragenina;
- Quanto à capacidade de inibir o desenvolvimento tumoral, verificou-se que o extrato e suas frações purificadas de proantocianidinas e leucoantocianidinas mostraram inibição tumoral em duas linhagens de tumores malignos.
- A avaliação histológica demonstrou que o tratamento com extrato de *A. cochliocarpa* não promoveu alterações teciduais relevantes;

- Todos os ensaios utilizados para a avaliação da atividade analgésica central de *A. cochiliocarpa* apresentaram o efeito analgésico, induzido pelo extrato, estatisticamente significativo, observado para os mesmos o resultado ($p < 0,05$).
- O extrato etanólico das cascas de *A. cochiliocarpa* apresentou uma atividade analgésica central, caracterizada pelo bloqueio da ação analgésica pela naloxona, semelhante às drogas morfinomiméticas.
- A fração purificada de saponina do extrato etanólico de *A. cochiliocarpa* produziu efeito antinociceptivo em camundongos quando administradas por via intraperitoneal sendo, provavelmente, o componente antinociceptivo presente neste extrato.
- Os resultados demonstraram que o extrato etanólico de *A. cochiliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes apresentou atividades significantes em estudos pré-clínicos, ratificando cientificamente a utilização desse vegetal com fins terapêuticos pela população . Esta pesquisa viabiliza novas perspectivas para investigações futuras que visem elucidar as substâncias ativas deste extrato, bem como, o seu mecanismo de ação.

12 Referências



12 REFERÊNCIAS

AJITH, T.A.; JANARDHANAN, K.K. Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, *Hellinusrimosus* (Berk) Pilat. **Journal of Ethnopharmacology**, v.84, p.157-162, 2002.

AKIYAMA, T.; ISHIDA, J.; NAKAGAWA, S. OGAWARA, H.; WATANABE, S.; ITOH, N.; SHIBUYA, M.; FUKAMI, Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 5592-5595, 1987.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K; WATSON, J. D. **Biologia molecular da célula**. Ed 4, 2004.

ALMEIDA, E. R. **Estudo da atividade antinociceptiva central do extrato hidroalcoólico das sementes de *Dioclea grandiflora* Mart ex. Benth (Fabaceae) e dois de seus constituintes químicos: Dioclenol e Dioflorina**. 2002.Tese (Doutorado)-Universidade Federal da Paraíba Paraíba, João Pessoa, 2002.

AWADH ALI, N.A. et al.. Screening of medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n.2, p. 173 – 179, 2001.

BAO, L.; YAO, X. XU J; GUO, X; LIU, H.; KURIHARA, H. Effects of *Pithecellobium clypearia* Benth extract and its main components on inflammation and allergy. **Fitoterapia**, v.80, p. 349–353, 2009.

BARBUL, A. Immune aspects of wound repair. **Clin. Plast. Surg.**, Philadelphia, v. 17, p. 433-442, 1990.

BARNEBY, R. C.; GRIMES J. W. Silk tree, Guanacaste, Monkey's Earring: a generic system for the synandrous Mimosaceae of the Americas. part I. *Abarema*, *Albizia*, and allies. **Mem. N. Y. bot. Gdn.**, v.74, n.1, p. 85, 1996.

BARROS, S. B.; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S. (Editor.) **Fundamentos da toxicologia**, 2 ed., São Paulo: Atheneu Editora, p.59-63, 2003.

BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A. L.; COSTA, C. G., ICHASSO; C. L. F., GUIMARÃES; E. F. & LIMA, H. C. Sistemática das Angiospermas do Brasil, v. 2. Imprensa Universitária, Viçosa, 377p, 1991.

BOOTH, B. A.; POLAK, K. L.; UITTO, J. Collagen biosynthesis by human skin fibroblasts: I. Optimization of the culture conditions for synthesis of type I and type III procollagens. *Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam*, v. 607, p. 145-160, 1980.

BRANDI, M. L. Natural and synthetic isoflavones in the prevention and treatment of chronic diseases. **Calcification Tissue International**, v.61, n.1, p.5-8, 1997.

BRITO FILHO, S. B.; MATIAS, J. E. F.; STAHLKE JÚNIOR, H. J.; TORRES, O. J. M.; TIMI, J. R. R.; TENÓRIO, S. B.; TÂMBARA, E. M.; CARSTENS, A. G.; CAMPOS, R. V.; MYAMOTO, M. Análise da cicatrização com uso de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu). Estudo controlado em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21(3), p. 76-88, 2006.

CALIXTO, J. B; BEIRITH, A; FERREIRA, J; SANTOS, A. R. S; CECHINEL-FILHO; YUNES, R. Reviews: Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytotherapy Research**, London, v.14, n.401 – 418, 2000.

CASTARDO, J. C. **Avaliação da atividade do extrato hidroalcoólico bruto da *Garcinia gardneriana* (planchon & triana) zappi em modelos experimentais de inflamação aguda em camundongos**. Curitiba, PR: UFP, 2007. (dissertação).

CASTRO, H. G; FERREIRA, F. A. A Dialética do conhecimento no uso das Plantas Medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, São Paulo, v.3, n.2, p.19 –21, 2001.

CHAPPILL, J.A. Cladistic analysis of the Leguminosae: the development of an explicit phylogenetic hypothesis. In: M. Crisp & J.J. Doyle (eds.). **Advances in Legume Systematics 7: Phylogeny**. Kew, Royal Botanic Gardens. p. 1-9, 1995

CLARK, R. A. F.; LANIGAN, J. M.; DELLAPELLE, P.; MANSEAU, E.; DVORAK, H. F.; COLVIN, R. B. Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization. **J. Invest. Dermatol.**, New York, v. 79, p. 264-269, 1982.

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

COS, P.; CALOMME, M.; SINDAMBIWE, J.B.; DE BRUYNE, T.; CIMANGA, K.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J.; VANDEN BERGHE, D.B. Citotoxicity and lipid peroxidation- inhibiting activity of flavonoids. *Planta Medica*, v, 67, p. 515-519, 2001.

COSTA, M. C. C. D. **Aspectos farmacológicos de *Plectranthus barbatus* Andr. (Laminaceae): atividade antimicrobiana, citotóxica e antitumoral**. 2002. 124f. Tese (Doutorado em Ciencias Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco.

CRAIN, S.M.; SHEN, KE-FEI. Modulation of opioid analgesia, tolerance and dependence by Gs-coupled, GM1 ganglioside-regulated opiod receptor functions. **Trends in Pharmacological Science**. v. 19, p.358 –365, 1998.

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.

DEWEY, W.L.; OSCARSON, M.E.; BREWER, C.F. thermodynamics of binding of core trimannoside of asparagines-linked carbohydrates and deoxy analogs to *Dioclea Grandiflora* lectin. In: BRODY, T.M.; LARNER, J.; MINNETH, K.P.; NEU, H.C. *Farmacologia humana*. 2º Ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, p. 329- 343, 1997.

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

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo, Ed. Unesp, p.27-100, 1996.

DIEGELMANN, R. F. Cellular and biochemical aspects of normal and abnormal wound healing: an overview. **J. Urol.**, Hagerstown, v. 157, p. 298-302, 1997.

DIEGELMANN, R. F. & EVANS, C. M. Wound healing an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Front Biosci.**, v. 9, n.1, p. 283-9, 2004.

DOGRE, S. H. et al. Antitumor activity of the methanol extract of *Hypericum hookerianum* stem against Ehrlich ascites carcinoma in swiss albino mice. **Journal Pharmacology Sciences**, v. 103, p. 354-359, 2007.

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

DUARTE, D.F. Uma breve história do ópio e dos opióides. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v.55, n.1, p.135-146, 2005.

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

DUTHIE, D.J.R.; NOMO, N.S. Adverse effects of opioids analgesic drugs. **British Journal of Anesthesiology**, London, v. 59, p. 61-77, 1987.

DUTRA, V.F.; GARCIA, F. C. P.; LIMA, H. C. & QUEIROZ, L. P. Diversidade Florística de Leguminosae Adans. Em áreas de Campos Rupestres. Megadiversidade (Belo Horizonte) , v.4, p. 163-171, 2008.

DRUMMOND, J.P. **Dor aguda: fisiologia, clínica e terapêutica**. São Paulo. Ed. Atheneu, 2000. 262 p.

EFRON, D. T.; MOST, D.; SHI, H. P.; TANTRY, U. S.; BARBUL, A. A novel method of studying wound healing. **J. Surg. Res.**, New York, v. 98, p. 16-20, 2001.

EHRlich, P. Experimentelle uço gica studien na Mause. **Exp. Ther. Frankfurt**, 1:78-80, 1906.

EHRlich, H. P.; KRUMMEL, T. M. Regulation of wound healing from a connective tissue perspective. **Wound Repair Regen.**, Malden, v. 4, p. 203-210, 1996.

ELIAS, T. S. Mimosoideae. In: Polhill, R. M. & Raven, P. H. (eds.). Advances in legumes Systematics, Parte I. **Royal Botanic Gardens**, U.K.. p.143-151, 1981.

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

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

FARNSWORTH, N.R.; BINGEL, A.S. **New natural products and plat drug with therapeutical activity**. New York: Springer, New York , 1997. 73p.

FERREIRA, S.H; BARATA,L.E.S;SALLES, S.L.M; QUEIROZ,S.R.R;HELUY NETO, N.E; CORAZZA, R; FARIAS, R. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998.128 p.

GILLITZER, R.; GOEBELER, M. Chemokines in cutaneous wound healing. *J. Leukoc. Biol.*, New York, v. 69, p. 513-521, 2001.

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P.; WANDERLEY, M. G. L. & BERG, C. Biodiversity and conservation of plants in Brazil. **Conservation Biology**, v. 19, p. 632-639, 2005.

GREGORI, C. *et al.* Suporte medicamentoso em cirurgia Buco-dento-alveolar. In: GREGORI, C. **Cirurgia Buco-Dento-Alveolar**. 1ª ed. São Paulo: Sarvier, 1996. Cap. 7. p. 33-52.

GUTSTEIN, H.B; AKIL, H. Opioid analgesica. In: HARDMAN, J.G; LIMBIRD, L.L. GOODMAN; GILMAN'S. **Pharmacological basis of therapeutics**, 10ª ed. New York: Mc Graw Hill. p.569-619, 2001.

GUYTON, A.C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 10ª. Ed: Guanabara-Koogan: Rio de Janeiro; 2002. p. 973.

HAAS, D. A. An update on analgesics for the management of acute postoperative dental pain. **J. Can. Dent. Assoc.** v. 68, n. 8, p. 475-482, 2002.

HELL, E.; LAWRENCE, J. C. The initiation of epidermal wound healing in cuts and burns. **Br. J. Exp. Pathol., Oxford**, v. 60, p. 171-179, 1979.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. **Princípios Ativos de Plantas Superiores**. São Carlos: Edufscar, 2003. p. 9-43.

HURLÉ, M.A, GIRIGOLZARRI, I.; VALDIZÁN, E. M. Involvement of the cycle AMP system in the switch from tolerance into supersensitivity to the antinociceptive effect of the opioid sufentanil. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 130, p. 174-180, 2000.

IGANCI, J. R. V. & MORIM, M. P. *Abarema* (Leguminosae, Mimosideae) no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**. v. 60, n. 3, p. 581-594, 2009.

ILAN, N.; MAHOOTI, S.; MADRI, J. A. Distinct signal transduction pathways are utilized during the tube formation and survival phases of in vitro angiogenesis. **J. Cell Sci.**, Cambridge, v. 111, p. 3621-3631, 1998.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2008**: Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa>>. Acesso em: 6 maio 2009.

JOLY, A.B. **Botânica**: introdução a taxonomia. 12 ed. São Paulo: Nacional, 1998. 777 p.

KHAN, I.A., CLARK, A.M., MCCHESENEY, J.D. Antifungal Activity of a New Triterpenoid Glycoside from *Pithecellobium racemosum* (M.) **Pharmaceutical Research** . v. 14, p. 358-361, 1997.

KLEIN, G & KLEIN, E. Conversion of solid neoplasm into ascites tumors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 63:640-661, 1956.

KNOWLES, M., SELBY, P. **Cellular and Molecular Biology of Cancer**. 4 ed. Oxford University Press, USA, 2005, p. 146

KOJIMA, Y.; TAKAHASHI, T.; FUJINA, M.; OWYANG, C. Inhibition of cholinergic transmission by opiates in ileal myenteric plexus is mediated by Kappa receptor. Involvement of regulatory inhibition G protein and calcium N-channels. **Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v.268, n.2, p. 965-970, 1974

KOLESNIKOV, Y.A.; MACCEHINI, H.L.; PASTERNAK, G.W. 1- Aminocyclopropane carboxylic acid (ACPC) prevents mu and delta opioid tolerance. **Life science**. v.55, p. 1393 – 1398, 1994.

KROMER, W. Endogenous and exogenous opioids in the control of gastrointestinal motility and secretion. **Pharmaceutical reviews**. v.40, p. 121-162, 1988.

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

KUROKAWA, D., SAKURAI, Y., INOUE, A., NAKAYAMA, R., TAKASAKI, N., SUDA, Y., MIYAKE, T., AMEMIYA, C.T., AND AIZAWA, S. Evolutionary constraint on Otx2 neuroectoderm enhancers-deep conservation from skate to mouse and unique divergence in teleost. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 103, n.51, p. 19350-19355, 2006.

LAPA, A. J. et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMOES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS, 2004. cap.11.

LAVIN, M. Origin, diversity and biogeography of neotropical Fabaceae. Proceedings of the VI Congreso Latinoamericano de Botánica. Monographs in Systematic Botany from Missouri Botanical Garden, v. 68, p. 131-145, 1994.

LEWIS, G.P. **Legumes of Bahia.** Kew: Royal Botanic Gardens, 1987. 362.p.

LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B. D.; MACKINDER, B. A. & LOCK, J. M. **Legumes of the world.** Royal Botanic Gardens, Kew, 592p, 2005.

LEWIS, G. P. & SCHIRE, B. D. Leguminosae or Fabaceae? *In*: Klitgaard, B. B. & Bruneau, A. (ed.). **Advances in Legume Systematics** Part 10. Royal Botanic Gardens, Kew. Pp. 1-3, 2003.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clin. Dermatol.**, New York, v. 25, p. 9-18, 2007.

LI, Y; LEUNG, K.T.; YAO, F.; OOI, L.S.M.; OOI, V.E.C. Antiviral Flavans from the Leaves of *Pithecellobium clypearia*. **J. Nat. Prod.**, v. 69, n. 5, p. 833–835, 2006.

LI, J.; ZHANG, Y. P.; KIRSNER, R. S. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. **Microsc. Res. Tech.** New York, v. 60, p. 107-114, 2003.

LIMA, C. M. P. ***Pithecellobium cochliocarpum* (Gomez) Macbr:** Da teoria medicinal à investigação toxicológica e utilização Terapêutica. Pernambuco, Recife. Originalmente

apresentada como dissertação de mestrado, Centro de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, 2007.

LIMA, H.C.D.E.; CORREIA, C.M.B.; FARIAS, D.S., 1994. Leguminosae. In: M.P.M. de Lima; R.R. Guedes-Bruni (Eds). Reserva Ecológica de Macaé de Cima: Nova Friburgo – RJ: **Aspectos Florísticos das Espécies Vasculares**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 167-228.

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

LIMA, H.C. 2004. Leguminosas arbóreas da Floresta atlântica: riqueza e endemismo no estado do Rio de Janeiro. In: 55º Congresso Nacional de Botânica, 2004, Viçosa, MG. **Simpósios, Palestras e Mesas Redondas**. Viçosa, MG: Sociedade Botânica do Brasil/Universidade Federal de Viçosa, 1-12.

MARCGRAVE, GEORGE & WILLEM PISO. 1648. *Historia Naturalis Brasiliae... in qua non tantum plantae et animalia, sed et indigenarum morbi, ingenia et mores describuntur ET iconibus supra quingentas illustrantur*. Lugdun. Batavorum, apud Franciscus Hackium et Amstelodami apud Lud. Elzevirium. [Organizado por Joannes de Laet]

MADLENER, M.; PARKS, W.C.; WERNER, S. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their physiological inhibitors (TIMPs) are differentially expressed during excisional skin wound repair. **Exp. Cell Res.**, Orlando, v. 242, p. 201-210, 1998.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78(4), p. 393-410, 2003.

MARCHIORI, J. N. C. & SOBRAL, M. **Dendrologia das angiospermas: Myrtales**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 1997, 304 p.

MERKEN, H.M.; BEECHER, G.R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.48, p. 577-5999, 2000.

MIGNATTI, P.; RIFKIN, D. B.; WELGUS, H. G.; PARKS, W. C. Proteinases an tissue remodeling. In: CLARK, R.A.F. (Ed.). **The molecular and cellular biology of wound repair**. 2nd ed. New York: Plenum, 1996, p. 427-474

MERLO, L., PEPPER, J., REID, B., MALEY, C. Cancer as an evolutionary and ecological process. **Nature reviews cancer**, v. 6, p. 924-935, 2006.

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

NANNEY, L. B.; KING, L. E. Jr. Epidermal growth factor and transforming growth factor-a. In: CLARK, R. A. F. (Ed.). **The molecular and cellular biology of wound repair**. 2nd ed. New York: Plenum, 1996, p. 171-194.

NASCIMENTO, F. R. F. et al., Ascitic and solid Erlich inhbtion by *Chenopodium ambrosioides* L. Treatment. **Life Sciences**, v. 78, p. 2650-2653, 2006.

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

NISSEN, N. N.; POLVERINI, P. J.; KOCH, A. E.; VOLIN, M. V.; GAMELLI, R. L.;DIPIETRO, L. A. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activityduring the proliferative phase of wound healing. **Am. J. Pathol.**, Bethesda, v. 152, p.1445-1452, 1998.

OLIVEIRA, R. A. G. **Plantas medicinais usadas tradicionalmente na dermatologia: avaliação da atividade biológica de seus extratos, óleos essenciais e suas associações.** Paraíba, João Pessoa. Originalmente apresentada como tese de doutorado, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 2006.

OLIVEIRA, R.A.G.; SILVA MSH 1994. **Plantas medicinais na atenção primária a saúde.** João Pessoa, UFPB, Série extensão, n.1, p. 50-57.

OTTO, R.G.; KAPLAN, C.A.M.; ORIN, R.M. **Biodiversidade um enfoque químico.** Rio de Janeiro: Editora UFRJ, p. 20-32, 1996.

PAN, Z.Z. mu-opposing actions of the kappa-opioid analgesic. **Clinical Neuropharmacology**. v.16, p.1-18, 1993.

PASTERNAK, G.W. Pharmacological mechanisms of opioid analgesic. **Clinical Neuropharmacology**, Chicago, v. 16, p. 1-18, 1993.

PEARLSTEIN, E. Plasma membrane glycoprotein which mediates adhesion of fibroblasts to collagen. *Nature*, Basingstoke, v. 262, p. 497-500, 1976.

PEREIRA, C.O.; LIMA, E.O.; OLIVEIRA, R. A.G.; TOLEDO, M.S.; AZEVEDO, A.K.A.; GUERRA, M.F.; PEREIRA, R.C. Abordagem etnobotânica de plantas medicinais utilizadas em dermatologia na cidade de João Pessoa-Paraíba, Brasil. **Rev.Bras.Pl.Med.**, v.7, n.3, p.9-17, 2005.

POLHILL, R. M. & RAVEN, P. H. **Advances in Legume Systematics.** Royal Botanic Gardens, Kew, 1049p, 1981.

REDDY L, ODHAV B, BHOOLA K. Aflatoxin B1-induced toxicity in HepG2 cells inhibited by carotenoids: morphology, apoptosis and DNA damage. **Biol Chem**, v. 387, n.1, p. 87-93, 2006.

REGAN, M. C.; BARBUL, A. The cellular biology of wound healing. In: SCHALAG, G.; REDL, H. (Eds.). **Fibrin sealing in surgical and nonsurgical fields**. Heidelberg: Springer, 1994. p. 3-17.

RIENDEAU, D. *et al.* Etoricoxib (MK-0663): Preclinical profile and comparison with other agents that selectively inhibit cyclooxygenase-2. **J Pharmacol Exp Ther** v. 296, n. 2, p. 558-566, 2001.

ROCHA, R.G.; TORTAMANO, N.; ADDE, C.A.; SIMONE, J.L.; PEREZ, F.E.G. O controle da dor em Odontologia através da terapêutica medicamentosa. In: CONCLAVE ODONTOLOGICO INTERNACIONAL, 15., Campinas. **Anais...** Disponível em : <<http://www.acdc.com.br>>. Acesso em: 27 jun. 2007.

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

SAMPAIO, E. V. S. B. 1999. Evolution of the Brazilian phytogeography classification systems: implications for biodiversity conservation. **Ciência e Cultura**, v. 51, p. 331-48, 1999.

SANTORO MM, GAUDINO G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. **Exp Cell Res**. 2005;304:274-86

SARMENTO, D.M.A. 1999. Isolamento e identificação de substâncias bioativas de *Pithecellobium cochliocarpum* Mart, 86p. Dissertação de mestrado, Centro de Ciências Exatas da Natureza, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa.

SAXENA, V.K.; SINGHAL, M.; MADHURI, S. Novel triterpenoidal saponin from the seeds of *Pithecellobium dulce*. **Proc. Indian Acad. Sci.** v.110, p. 409-414, 1999.

SAWYNOK, M.M.; SCHILICHTING, D.A. The therapeutic use of heroine: a review of the pharmacologic literature. **Canadian Journal Physiology and Pharmacology**. v.64, p.1-6, 1986.

SCHIRATO, G.V. et al. O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. **Ciência Rural**, v.36, p.149-154, 2006.

SCULLY, C.; FIELD, J.K.; TANZAWA, H. genetic aberrations in oral or head neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. **Oral Oncology**, v. 36, p. 256-263, 2000.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v. 341, p. 738-746, 1999.

SILVA, A. J.R.; ANDRADE, L.H.C.A. Etnobotânica nordestina: estudo comparativo da relação entre comunidades e vegetação na Zona do Litoral - Mata do Estado de Pernambuco, Brasil. **Acta bot. bras.** v.19, n.1, p. 45-60, 2005.

SILVA, S.L.; FIGUEREDO, P. M. S. ; YANO, T. Chemotherapeutic potential of the volatile oils from *Zonothoxylum rhoifolium* Lam leaves. **European Journal of Pharmacology**, 2007. DOI:10.1016/ejphar2007.07.065

SNYDER, S.H.; CHILDRES, S.R. Opiate receptors and opiod peptides. **Annual Review Neurosciences**, v.2, p.35, 1979.

STADELMANN, W. K.; DIGENIS, A. G.; TOBIN, G. R. Impediments to wound healing. **Am. J. Surg., Belle Mead**, v. 176 (suppl. 2A), p. 39-47, 1998.

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

SZPADERSKA, A. M.; DIPIETRO, L. A. Inflammation in surgical wound healing: Friend or foe? **Surgery**, v. 137, p. 571-573, 2005.

TENIUS, F. P.; BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; IOSHII, S. O. Efeitos do uso crônico da dexametasona na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n.2, p. 141-149, 2007.

THORNTON, F. J.; SCHAFFER, M. R.; BARBUL, A. Wound healing in sepsis and trauma. **Shock**, v. 8, p. 391-401, 1997.

TSIROGIANNI, A.K. et al. Wound healing: immunological aspects. **Injury**, v.375, p.S5-S12, 2006.

TODD, R.; DONOFF, R.B.; WONGD, T. W. The molecular biology of oral carcinogenesis: toward a tumor progression model. **J Oral Maxillofac Surg**,. V.55, n.6, p. 613-623, 1997.

TRUJILLO, K.H.; AKIL, H. Innibition of morfine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK801. **Science**. v. 251, p. 85-87, 1991.

TRUMMEL, C. L. Drogas antiinflamatórias. In: NEIDLE, E. A. e YAGIELA, J. A. **Farmacologia e Terapêutica para Dentistas**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. cap. 22. p. 250-269.

TUROLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.42, n.2, 2006.

VEIGA-JÚNIOR, V. F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química nova**, v.28, p.33-38, 2005.

VEITCH, N.C. Isoflavonoides of the Leguminosae. **Natural Products Reports**, v.26, n.6, p.776-802, 2007.

VERMA, P.; MUKHOPADHYAY, B. Concise synthesis of two trisaccharides related to the cytotoxic triterpenoid saponin isolated from *Pithecellobium lucidum*. **Carbohydrate Research**, v.344, n.18, p.2554-2558, 2009.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ. Res.**, v. 92, p. 827-839, 2003.

WAGNER, H. Pesquisa fitomédica no novo milênio: tendências e mudanças. In: Yunes, R.A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: Editora da UNIVALI, 2007. p.34-47.

WANG, S.Y.; YANG, K.W.; HSU, Y.T.; CHANG, C.L.; YANG, Y.C. The differential onhibitory effects of genistein on the growth of cervical cancer cells in vitro. **Neoplasma**, v. 48, p. 227-233, 2001.

WELCH, M. P.; ODLAND, G. F.; CLARK, R. A. F. Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction. **J. Cell Biol.**, v. 110, p. 133-145, 1990.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological Reviews**, v. 83, p. 835-870, 2003.

WERNER, S.; SMOLA, H.; LIAO, X.; LONGAKER, M. T.; KRIEG, T.; HOFSCHEIDER, P. H.; WILLIAMS, L. T. The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. **Science**, v. 266, p. 819- 822, 1994.

WENDT, S. B. T. **Comparação da eficácia da calendula e do óleo de girassol na cicatrização por segunda intenção de feridas em pequenos animais**. Curitiba, PR:UFP, 2005. (dissertação).

WOJCIECHOWSKI, M. F. Reconstructing the phylogeny of legumes (Leguminosae): an early 21st century perspective. In: Klitgaard, B. B. & Bruneau, A. (eds.). *Advances in Legume Systematics Part 10*. **Royal Botanic Gardens**, Kew. p. 5-35, 2003.

WOJCIECHOWSKI, M. F.; LAVIN, M. & SANDERSON, M. J. 2004. A phylogeny of Legumes (Leguminosae) basead on analysis of the plastid *mat-K* gene resolves many

well-supported subclades within the family. **American Journal of Botany**, v. 91, n. 11, p. 1846-1862.

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

Apêndices



Tabela 1 – Sinais clínicos da toxicidade observada em camundongos albinos swiss fêmeas, tratados com diferentes doses do EE da *A. cochliocarpa*, por via oral.

Parâmetros	Dose (mg/Kg)	
	2500	5000
Estimulantes		
Agitação	+++	++
Piloereção	++++++	++++++
Movimentos estereotipados	+	+
Movimentos circulares	+	+
Movimentos de vibrissas	+	+
Tremores finos/grosseiros	+	+
Ereção de calda	+	+
Excreção fecal	+	+
Reação de fulga	+	+++++
Diurese	+	-
Postura em garra	+++++	+++
Refluxo	++++++	++++++
Exoftalmia	+++	++
Agressão	+++	-
Taquicardia	+	++
Postura de ataque	+	+
Aumento da libido	+	+
Depressores		
Prostração	-	+
Sonolência	-	++++++
Tendência ao agrupamento	-	++++++
Outros		
Espasmos	+	+
Palidez	+++	++++
Cianose	+++++	-
Edema de fucinho	+++++	-
Abaixamento posterior	+	+
Postura estática	+	+
Petéquias	++++++	+++++
Escurecimento do olho	+++	-
Fotossensibilidade	++	-
Tremores nas patas	-	+
Auto limpeza	-	+
Sibilo	-	+
Apnéia	-	+
Fotofobia	-	++++++
Coceira	-	+
Coprofagia	-	+

Tabela 2 – Efeitos relacionados às doses administradas na fase preliminar, por via intraperitoneal, do extrato etanólico de *A. cochliocarpa*.

Parâmetros	Doses (mg/Kg)						
EFEITOS	100	150	160 (D ₁)	400	414,72 (D ₂)	480	600
Estimulantes							
Taquicardia	-	++	+++	+++	+++	+++	+++
Taquipnéia	-	++	+++	+++	+++	+++	+++
Piloereção	+	+	+	+	+	+	+
Agitação	-	-	+	+	++	++	++
Exoftalmia	-	+	+	+	+	+	+
Movimentos estereotipados	-	+	+	+++	++	+++	+++
Movimentos circulares	-	++	++	++	+++	+++	+++
Movimentos de vibrissas	-	+	+	+	+	+	+
Ondulação caudal	-	-	+++	-	-	-	-
Ereção de cauda	-	+	+	+	+	+	+
Tremores finos/ grosseiros	-	++	++	-	+++	++	+++
Postura de ataque	-	-	-	++	-	+	+
Levantamento dos membros inferiores	-	+	+	+	+	+	+
Convulsão focal	-	-	-	-	-	-	-
Depressores							
Abaixamento dos membros posteriores	-	-	-	+	-	+	+
Apnéia	-	-	-	+	-	+	+
Alteração da marcha	+	+	+	+	+	+	+
Sonolência	-	-	-	-	-	-	-
Prostração	-	-	+	-	-	-	-
Outros							
Excreção fecal	+	+	++	+	+	+++	-
Diurese	+	-	-	+	-	-	-
Contorções abdominais	-	++	+++	+++	+++	+++	+++
Espasmos	-	++	+++	+++	+++	+++	++
Reação de fuga	-	+	+++	+++	+++	++	+++
Palidez	-	+	+	+	+	+	++
Distensão abdominal	-	+	+	+	+	++	++
Petéquias	-	-	+	+	+	+	+
Edema de fucinho	-	-	+	+	+	+	+
Cianose	-	-	+	-	+	++	++
Fotofobia	-	-	+	+	+	+	+
Refluxo	-	-	-	-	+	-	-

Tabela3 – Efeitos relacionados às doses administradas na fase definitiva, por via intraperitoneal, do extrato etanólico de *A. cochliocarpa*.

Parâmetros	Doses (mg/Kg)						
EFEITOS	100	150	160 (D ₁)	400	414,72 (D ₂)	480	600
Estimulantes							
Taquicardia	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Taquipnéia	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Piloereção	+	+	++	+	+	++	+
Agitação	+	-	-	+	++	+	+
Exoftalmia	+	+	+	+	+	+	+
Movimentos estereotipados	+	+	++	+++	+	++	++
Movimentos circulares	++	+	++	+++	++	++	++
Movimentos de vibrissas	+	+	+	+	+	+	+
Ondulação caudal	++	+	-	+	-	-	-
Ereção de cauda	+	+	+	+	+	+	+
Tremores finos/ grosseiros	++	++	+++	++	+++	++	+++
Postura de ataque	+	-	-	+	+	+	+
Levantamento dos membros inferiores	-	+	+	+	+	+	+
Convulsão focal	-	-	+	+	+	-	-
Depressores							
Abaixamento dos membros posteriores	+	+	+	-	-	-	-
Apnéia	+	+	+	+	+	++	++
Alteração da marcha	+	+	+	+	+	+	+
Sonolência	-	-	-	-	-	-	-
Prostração	+	+	+	-	-	-	-
Outros							
Excreção fecal	+	+	+	+	+	+	+
Diurese	-	-	-	+	+	+	+
Contorções abdominais	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Espasmos	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Reação de fuga	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Palidez	+	+	+	+	+	+	+
Distensão abdominal	+	+	+	+	+	+	+
Petéquias	-	-	-	+	+	-	+
Edema de fucinho	+	+	+	+	+	+	+
Cianose	+	+	+	+	+	+	+
Fotofobia	+	+	+	+	+	+	+
Refluxo	+	-	-	-	-	-	-

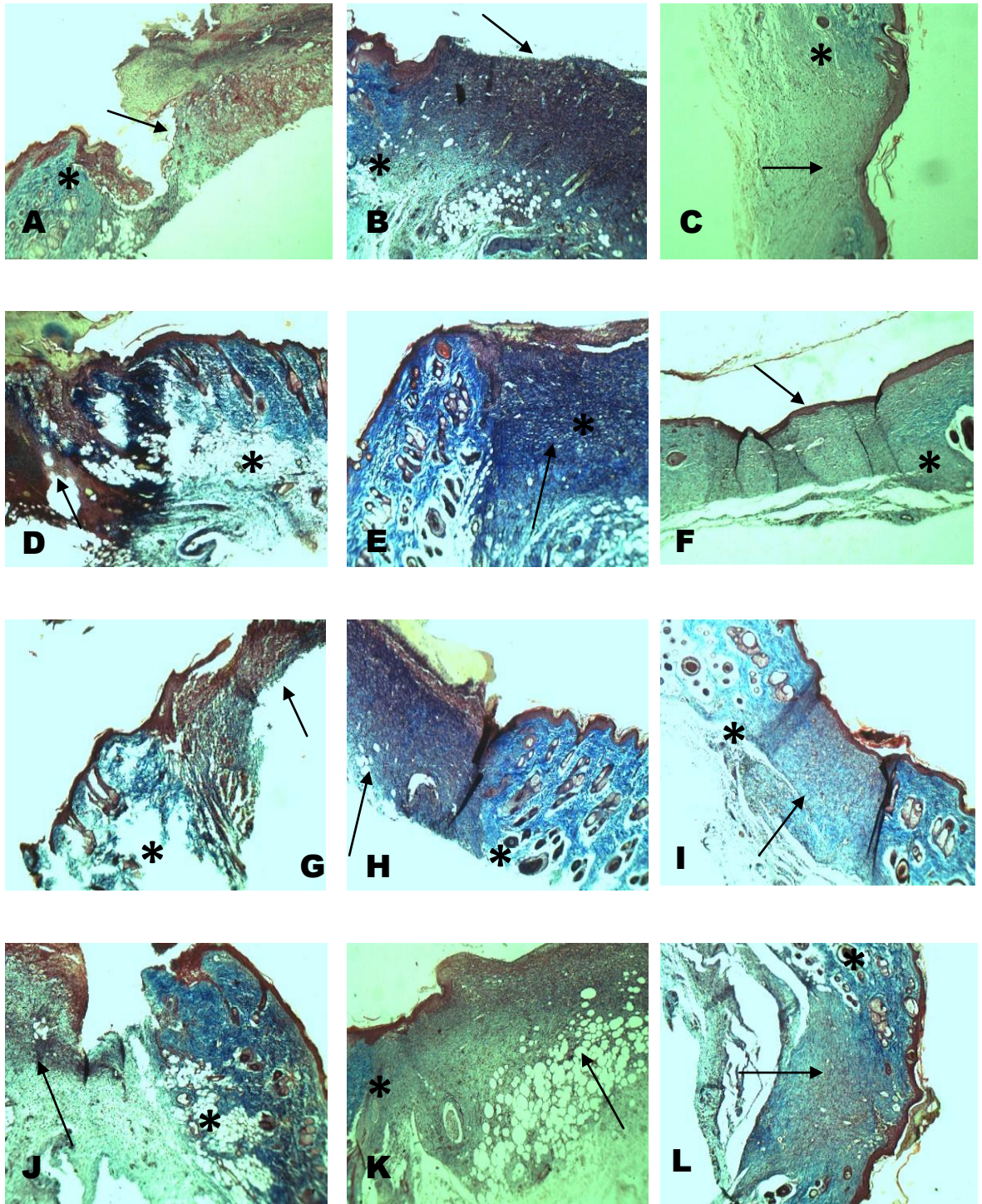


Figure 1 - Photomicrographs of microscopic evaluation of cutaneous wound with 3, 7 and 14 days respectively. Masson' trichrome: 100x magnifications (all images). **A, B** and **C** represented the control group (G1). **D, E** and **F**, the group treated with Dexpanthenol (G2). **G, H** and **I**, the G3 treated with the cream of the ethanolic extract of *A. cochliocarpa* in the dose of 51, 5 mg/kg. **J, K** and **L**, the G4 treated with the cream of the ethanolic extract of *A. cochliocarpa* in the dose of 103 mg/kg. Each group of animals (n = 6 rats). Asterisks represented normal tissue and long arrow the area of skin injury

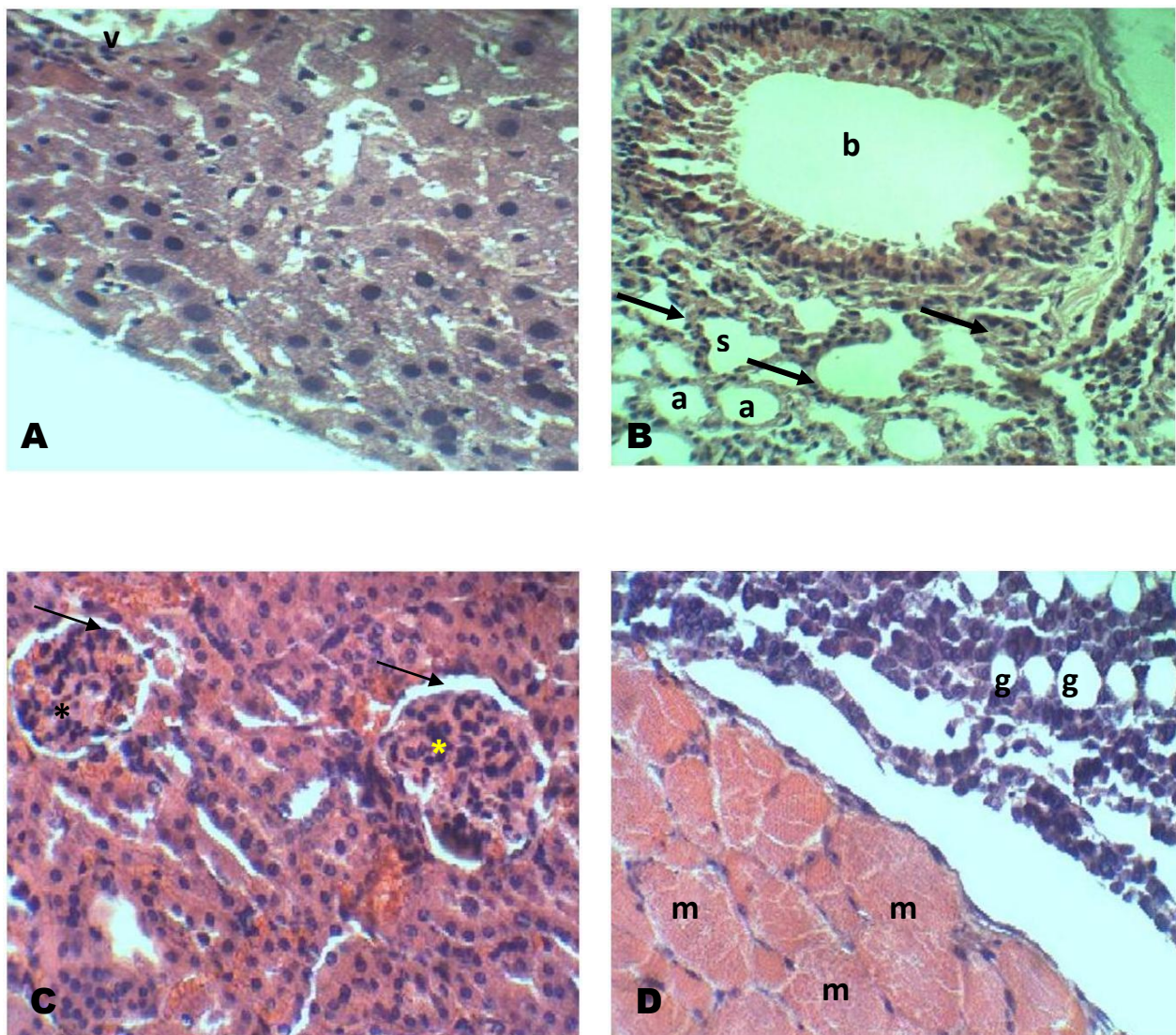


Figura 2 - Fotomicrografias de órgãos (fígado, pulmão e rins) e Carcinoma de Ehrlich de camundongos albinos Swiss (CONTROLES). **A)** Fígado com veia centrolobular (**v**) ao redor hepatócitos e capilares sinusóides preservados, **B)** Pulmão: interstício pulmonar aerado com presença de septos interalveolares (**setas**), alvéolos íntegros (**a**), bronquíolo pérvio ao ar (**b**) e saco alveolar (**s**). **C)** Rim com glomérulos renais (**asteriscos**) e espaços urinários (**setas finas**) sem quaisquer alterações, **D)** Tumor com células de formatos variados e infiltrações: muscular (**m**) e gordurosa (**g**). H.E.: 400X.

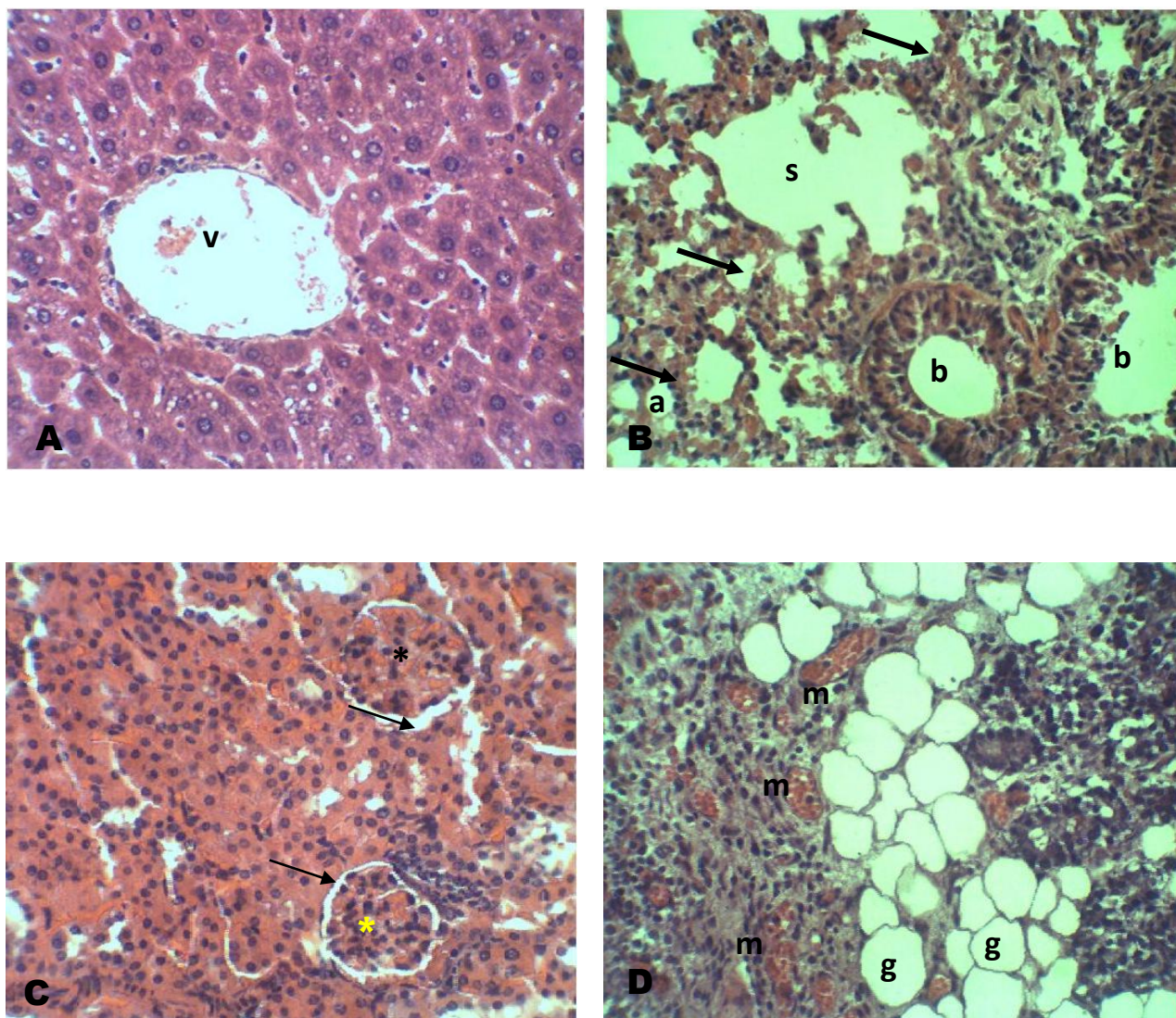


Figura 3 - Fotomicrografias de órgãos (fígado, pulmão e rins) e Carcinoma de Ehrlich de camundongos albinos Swiss tratados com EEAc (dose= 25,75 mg/Kg). **A)** Fígado com veia centrolobular (**v**) ao redor hepatócitos e capilares sinusóides preservados, **B)** Pulmão: notar comprometimento do interstício pulmonar com espessamento dos septos interalveolares (**setas**) e redução das luzes de alguns alvéolos (**a**); presença de bronquíolos com infiltrado linfocitário ao redor (**b**) e saco alveolar (**s**). **C)** Rim com glomérulos renais (**asteriscos**) e espaços urinários (**setas finas**) sem quaisquer alterações, **D)** Tumor com evidentes infiltrações: muscular (**m**) e gordurosa (**g**). H.E.: 400X.

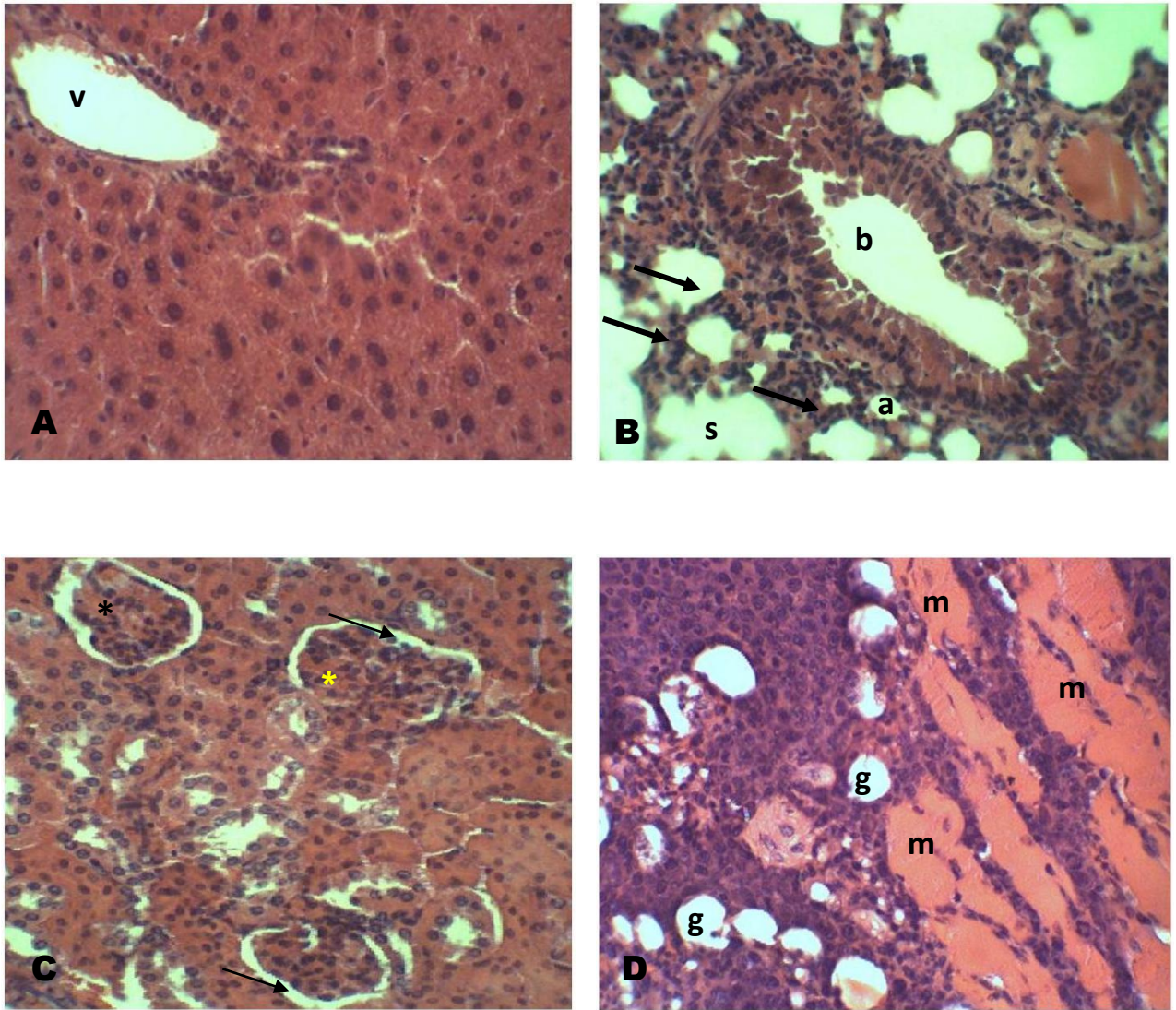


Figura 4 - Fotomicrografias de órgãos (fígado, pulmão e rins) e Carcinoma de Ehrlich de camundongos albinos Swiss tratados com EEAc (dose= 103 mg/Kg). **A**) Fígado com veia centrolobular (**v**) ao redor hepatócitos e capilares sinusóides preservados, **B**) Pulmão: comprometimento do interstício pulmonar especialmente devido ao espessamento dos septos interalveolares (**setas**) com redução das luzes de alguns alvéolos (**a**) e presença de bronquíolos com infiltrado linfocitário ao redor (**b**) e saco alveolar (**s**). **C**) Rim com glomérulos renais (**asteriscos**) e espaços urinários (**setas finas**) sem quaisquer alterações, **D**) Tumor com marcante infiltração muscular (**m**) e moderada infiltração gordurosa (**g**). H.E.: 400X.

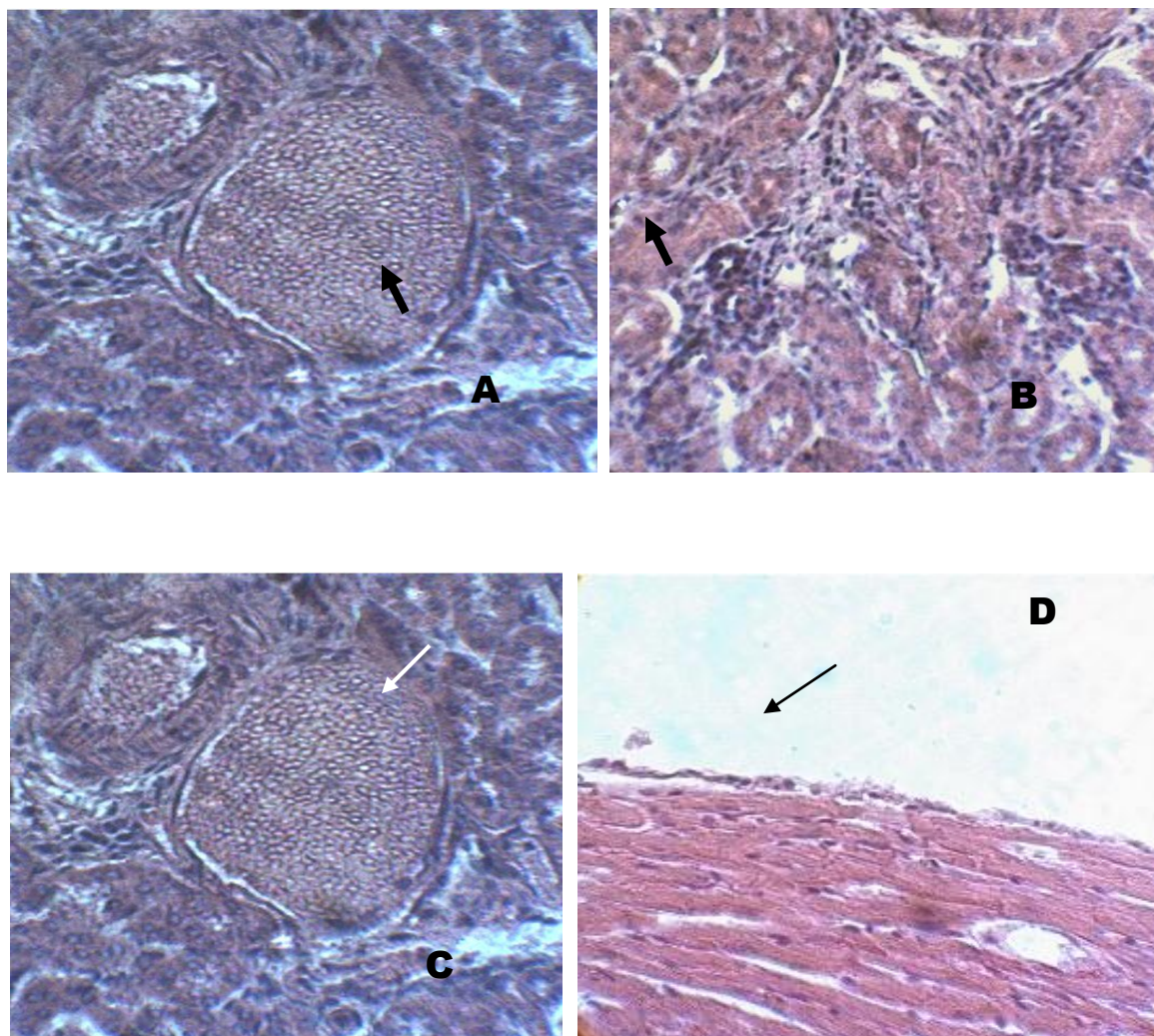


Figura 5. Aspectos histológicos do rim e coração dos animais implantados com Sarcoma 180 e tratados com Metotrexato (10 mg/kg), coloração H.E. (M.O.). Em A e B, visualização de infiltrado inflamatório (setas largas). Em C, presença de vascularização congesta no rim (seta branca). Em D, visualização de infiltrado inflamatório no pericárdio (seta fina). A, B e C aumento de 400x, D aumento de 100x.

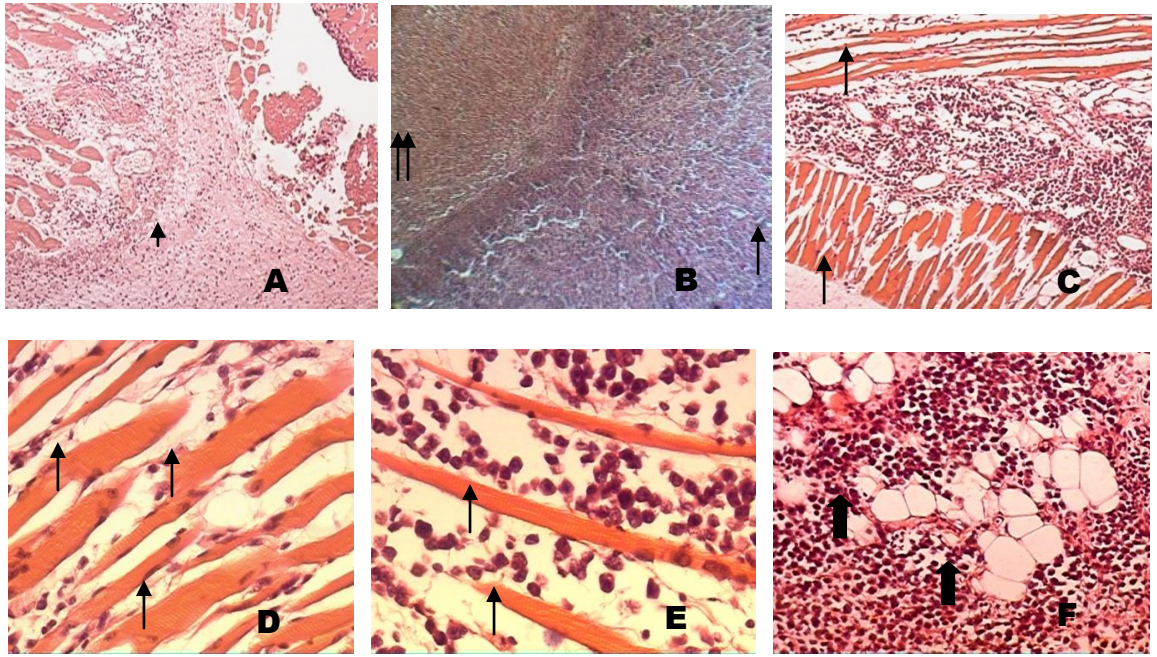


Figura 6. Aspecto histológico do Sarcoma 180 nos animais tratados com Metotrexato (10 mg/kg), coloração H.E (M.O.). Em A, observa-se a presença de extensa necrose (ponta da seta). Em B, presença de fibrose (seta dupla). C, D e E demonstram infiltração de tecido muscular estriado esquelético (setas). Em F, infiltração adipocitária (setas largas). A, B e C, aumentos de 100x, D, E e F, aumentos de 400x.

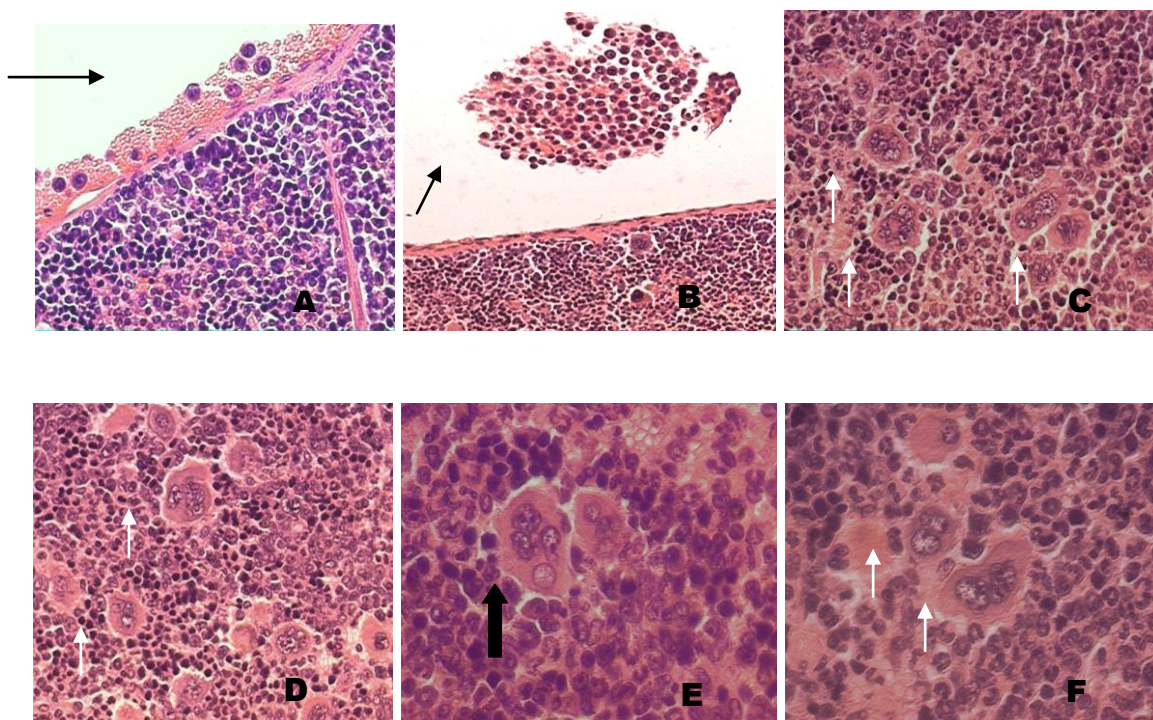


Figura 7. Aspecto histopatológico do baço dos animais implantados com Sarcoma 180 e tratados com Metotrexato (10 mg/kg). Coloração H.E. (M.O.), aumentos de 100x (B), 200x (A) e 400x (C, D, E e F). Em A e B, infiltração de células neoplásicas (setas). Em C, D e F visualiza-se células atípicas multinucleadas. A figura E demonstra a presença de um vacúolo (seta larga).

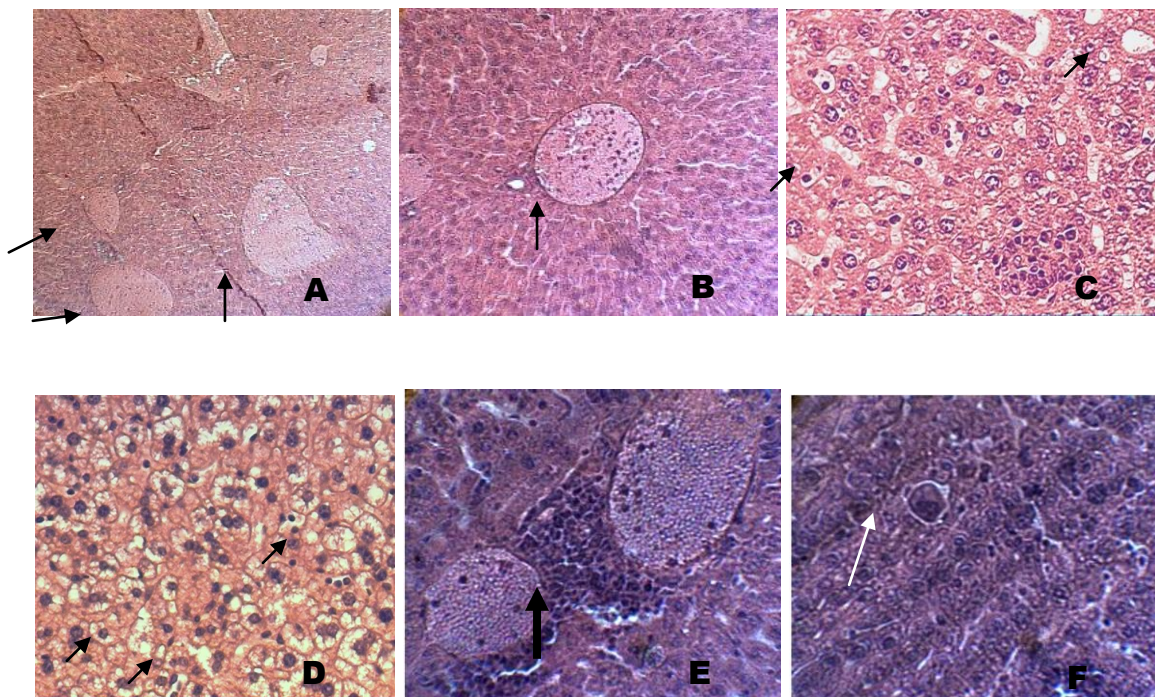
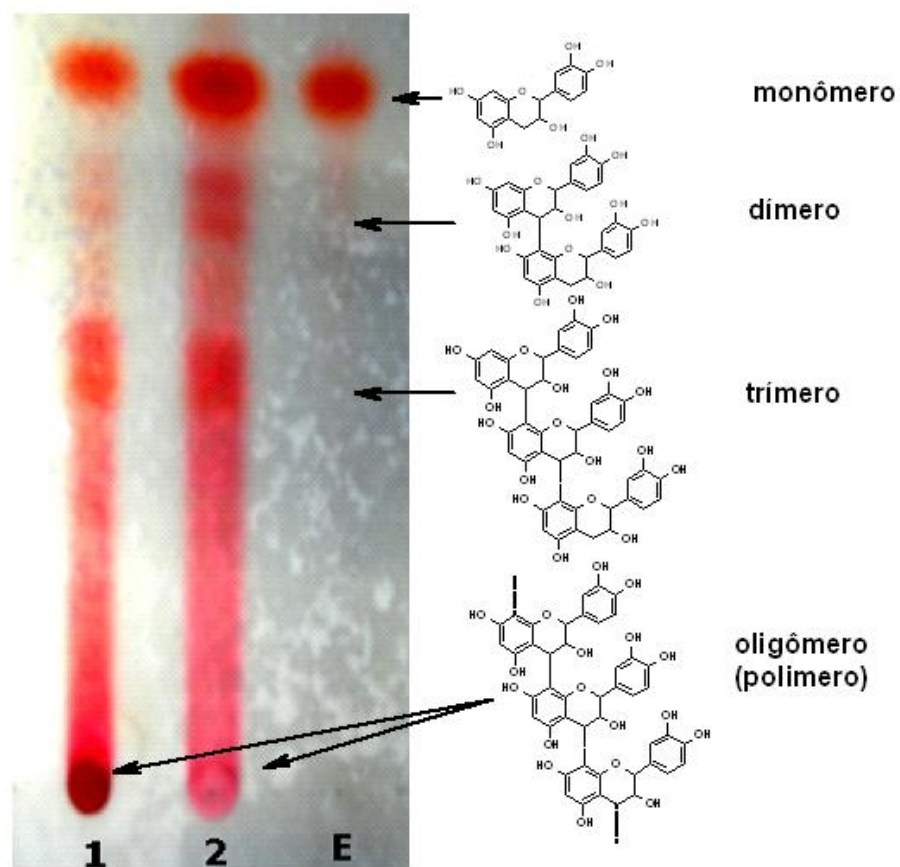
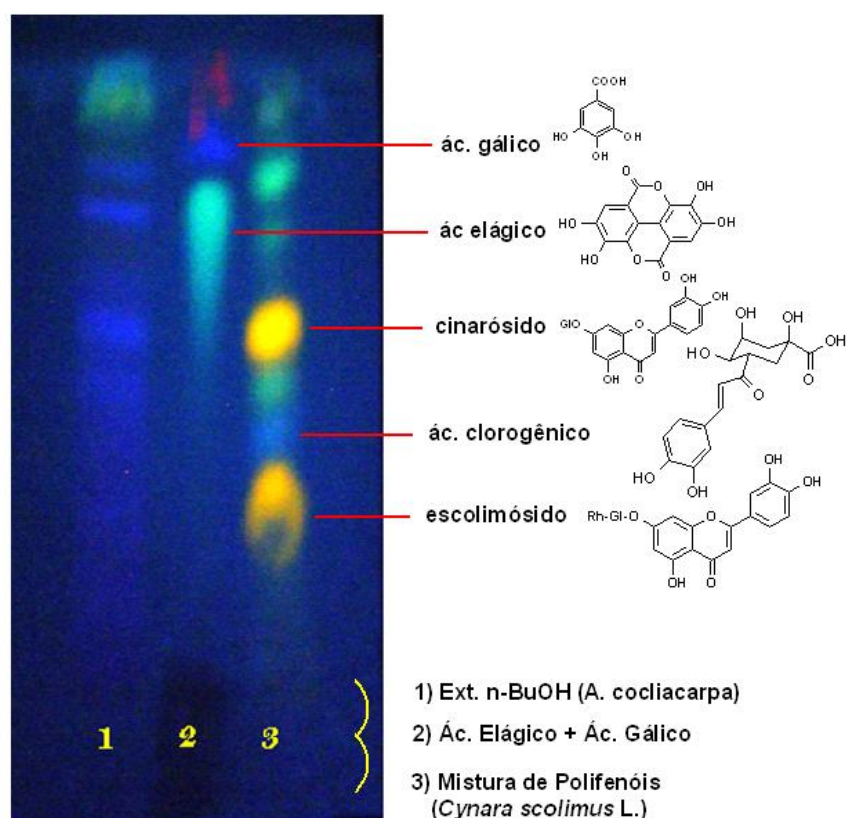


Figura 5. Aspecto histológico do fígado de animais implantados com Sarcoma 180 e tratados com extrato de *A. cochliocarpa* (103 mg/kg). As figuras A e B demonstram a presença de vasos congestionados (setas). Em C e D observa-se o aparecimento esteatose (ponta das setas). Em E visualiza-se o infiltrado perivascular (seta larga). Em F, observa-se a presença de uma célula atípica (seta branca). Coloração H.E. (M.O.). A, aumento de 100x; B e C, aumentos de 200x; D, E e F, aumentos de 400x.



Anexos



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

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



Ofício nº 76/06

Recife, 27 de dezembro de 2006

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da UFPE
Para: **Profa. Ivone Antonia de Souza**
Departamento de Antibióticos – UFPE
Processo nº 041544/2006-47

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEAA-UFPE) avaliaram a resposta de V. Sa. referente ao primeiro parecer da CEEA sobre o projeto de pesquisa intitulado **“*Phithecellobium cochliocarpum* (Gomez) Macbr: Da Teoria Medicinal à Investigação Toxicológica e Utilização Terapêutica”**.

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

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

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

Atenciosamente,

Prof. Silene Carneiro do Nascimento
 Presidente CEEA

Sistemas cromatográficos e reveladores utilizados para a prospecção fitoquímicos de *Abarema cochiliocarpa* (Gomes) Barneby & Grimes.

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

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