

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA**

YHASMINIE KARINE DA SILVA XAVIER

**AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS EFEITOS TOXICOLÓGICOS DE
Caesalpinia echinata NA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIFÚNGICA**

RECIFE
2019

Yhasminie Karine da Silva Xavier

**AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS EFEITOS TOXICOLÓGICOS DE
Caesalpinia echinata NA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIFÚNGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Área de Concentração: Morfotecnologia.

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

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Carina Scanoni Maia

Recife
2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Xavier, Yhasminie Karine da Silva

Avaliação dos possíveis efeitos toxicológicos de *Caesalpinia echinata* na atividade anti-inflamatória e antifúngica / Yhasminie Karine da Silva Xavier. – 2019.

72 f. : il.

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

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Carina Scanoni Maia.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biotecnologia. Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia, 2019.

Inclui referências e anexos.

1. Plantas medicinais. 2. Química vegetal. 3. Agentes anti-infecciosos. I. Souza, Ivone Antônia de (orientador). II. Maia, Carina Scanoni (coorientadora). III. Título.

581.634

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2019 – 170

Yhasminie Karine da Silva Xavier

**AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS EFEITOS TOXICOLÓGICOS DE
Caesalpinia echinata NA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIFÚNGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Aprovado em: 28/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Ivone Antônia de Souza (Orientadora)

Prof.^a Dr.^a Eliete Cavalcanti Silva (Interna)

Prof.^a Dr.^a Camilla Vila Nova Soares Silva (Externa)



pósMorfotec
Programa de Pós-Graduação
em Morfotecnologia

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

COORDENADOR

Prof.^a Dr.^a Juliana Pinto de Medeiros

VICE-COORDENADOR

Prof.^a Dr.^a Ivone Antônia de Souza

CORPO DOCENTE

Prof. Dr. André de Lima Aires

Prof.^a Dr.^a Cláudia Sampaio de Andrade
Lima

Prof.^a Dr.^a Eliete Cavalcante da Silva

Prof.^a Dr.^a Francisca Janaína Soares Rocha

Prof. Dr. Gilberto Gonçalves Rodrigues

Prof. Dr. Gilberto Nicácio Batista

Prof.^a Dr.^a Isvânia Maria Serafim da Silva
Lopes

Prof.^a Dr.^a Ivone Antônia de Souza

Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto

Prof. Dr. Jeymesson Raphael Cardoso
Vieira

Prof.^a Dr.^a Juliana Pinto de Medeiros

Prof.^a Dr.^a Leila Bastos Leal

Prof.^a Dr.^a Luciana Maria Silva de Seixas
Maia

Prof.^a Dr.^a Paloma Lys de Medeiros

Prof. Dr. Ricardo Yara

Prof.^a Dr.^a Roberta Maria Pereira Leite de
Lima

Prof.^a Dr.^a Rosa Valeria da Silva Amorim

Prof.^a Dr.^a Sônia Pereira Leite

**Recife
2019**

“Me diz o que é o sufoco que eu te
mostro alguém afim de te
acompanhar”.
(LH)

Muito Obrigada Ladjane Rufino,
Carlos Roberto e Fábio Xavier por
terem estado ao meu lado em
todos os momentos de sufoco. Eu
amo muito vocês!

Aos meus pais Carlos Roberto e
Ladjane Rufino, meu irmão
Thiago Carlos e meu esposo Fábio
Xavier.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me permitido chegar a essa etapa da vida acadêmica. Sem sua ajuda e proteção não chegaria a lugar nenhum.

Aos meus pais, Carlos Roberto e Ladjane Rufino, alicerce da minha vida, pelo amor incondicional e por sempre estarem ao meu lado apoiando todos os meus sonhos. Melhores companheiros da vida!

Ao meu irmão Thiago Carlos por ter sido um espelho para mim na escolha do curso de graduação.

Ao meu esposo Fábio Xavier, a quem tanto admiro, por todo companheirismo, incentivo e apoio com seu carinho, amor e dedicação.

A minha orientadora, Professora Dra. Ivone Antônia de Souza, pela oportunidade de ter desenvolvido este trabalho, a qual se tornou muito mais do que uma orientadora. Sempre com o seu carinho, palavras de incentivo e ensinamentos que contribuíram muito para minha formação pessoal e profissional.

A minha co-orientadora, Profa. Dra. Carina Scanoni Maia, pela excelente avaliação histológica, pelos ensinamentos, apoio, presteza e pelas sugestões de melhoria no meu trabalho.

A professora Elba Lucia/UFPE e o seu aluno Dr. Allan Jonathan pela ajuda na rotaevaporação do extrato.

Ao Professor Dr. Antônio Fernando/UFPE e seu doutorando João Bosco pelo auxílio e disponibilidade de seu laboratório e equipamentos;

A Profa. Dra Teresinha Gonçalves da Silva e o seu doutorando Jhonatta Alexandre pelo desenvolvimento do experimento de toxicidade aguda. Aprendi muito!

A Profa. Dra Gláucia Manoella de Souza Lima, por ter aberto as portas do seu laboratório para mim, pela paciência e ensinamentos além da bancada, os quais levarei para toda vida. Uma pessoa de muita luz!

Aos professores da Pós-Graduação pelos ensinamentos e sabedoria que me nortearam durante todo esse período, fazendo-me crescer intelectualmente.

As técnicas Sandrine Arruda e Marcela Sobral pelo apoio e ensinamentos nos experimentos de histologia e atividade antimicrobiana, respectivamente. Aprendi muito com vocês!

Ao laboratório de química do CETENE, mais especificamente a Túlio pela análise fitoquímica de UPLC do meu extrato.

Aos colegas da Pós Graduação, sobre tudo Elizabete, Isabel, Elivânia, Rita e John. Agradeço pelos momentos de almoço partilhados, pelas conversas e risadas. Vocês tornaram tudo mais leve.

Aos amigos que conquistei Sandrine Arruda, Elizabete Lucena, Isabel Lima, pelo apoio nos experimentos, vocês foram imprescindíveis!

A Renatha Sobreira e Nabuêr Franciely por terem estado presentes nos primeiros momentos dessa pesquisa compartilhando todas as dificuldades iniciais e por me ajudarem na adaptação quanto ao manuseio com os animais.

A todos que fazem parte do Laboratório de Canceologia Experimental, pela ajuda direta e indireta nos experimentos, pelos momentos de alegria e descontração, em especial a Rayra e Marília toda a ajuda no experimento anti-inflamatório. A Benaia e Luiz pelas conversas e ensinamentos. A Rômulo por sempre trazer Deus a nossas conversas e a certeza de que com Ele tudo dará certo. A Fernanda pela amizade, companhia, motivação e ajuda nessa última etapa de dissertação. Mais uma vez a Marília por toda a ajuda, inclusive pessoal, pelos momentos de descontração, por sempre ter estado disposta a me ajudar. A Marcilene, Livia e Laíse pelo apoio nos ensaios desenvolvidos e por partilhar os conhecimentos adquiridos.

A Rodrigo e sua equipe (Xerox CCS) por toda animação, palavras de incentivo e boas risadas. Pessoa ímpar!

A minha grande amiga Maria Carolina, a qual juntamente com o meu esposo e minha sogra, Rosilda Xavier, foram as pessoas que me despertaram e me deram os primeiros incentivos em busca do título de Mestre. Amo muito!

A amiga Cleidiane que me apresentou à orientadora Profa. Dra. Ivone Antônia.

Ao programa de Pós graduação em Morfotecnologia da UFPE.

A Diretoria e administração do CB.

A FACEPE pelo suporte financeiro através da concessão da bolsa.

A todos vocês o meu mais sincero muito obrigada!

RESUMO

Caesalpinia echinata, conhecida como Pau Brazil, é uma espécie nativa da Mata Atlântica, pertencente a família Fabaceae e é amplamente utilizada na medicina popular. O presente trabalho avaliou o estudo fitoquímico, toxicológico e biológico do extrato etanólico da associação das sementes e vagens de *Caesalpinia echinata* (EESV*Ce*). A caracterização fitoquímica do material vegetal foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de ultra performance (UPLC). Quanto à análise toxicológica, foram realizadas investigações através das toxicidades *in vitro* frente ao microcrustáceo *Artemia salina* e *in vivo* em camundongos albinos swiss *Mus musculus*. Já para a pesquisa biológica foram avaliadas as atividades anti-inflamatória através do método de bolsão de ar e a atividade antifúngica pelo método de difusão em disco de papel para fungos leveduriformes e microdiluição em caldo para fungos filamentosos. A análise fitoquímica do extrato pela CCD revelou a presença de saponinas, terpenos, taninos, flavonóides, cumarinas e glicosídeos e a ausência de alcalóides. O resultado encontrado na análise de UPLC indicou a presença de compostos fenólicos: flavonoides (ácido gálico e quercetina) e ácido siríngico. Na toxicologia, o extrato em estudo apresentou toxicidade moderada frente à *Artemia Salina*, com CL50 estimada em 189,45 µg / mL. Ainda nesse sentido, foi possível observar que o referido extrato nas análises *in vivo* apresentou baixa toxicidade, não sendo possível o cálculo da DL50, porém o mesmo foi capaz de causar efeitos tóxicos nos animais testados. Não foi possível detectar atividade antifúngica contra leveduras do gênero *Candida* e o fungo filamentoso *Trichophyton rubrum* (URM 5908). Porém, diferentemente desses resultados, foi possível detectar atividade antifúngica para a espécie *Trichophyton mentagrophytes* (URM 6272) com CMI de 200 µG/mL. Deste modo, o EESV*Ce* evidenciou a presença de moléculas bioativas. Além disso, apresentou toxicidade aguda *in vitro* moderada e toxicidade aguda *in vivo* baixa, ausência de ação anti-inflamatória e ação antifúngica de moderada a forte, frente à espécie *Trichophyton mentagrophytes*.

Palavras-chave: Fitoquímica. Toxicidade. Anti-inflamatório. Antifúngico.

ABSTRACT

Caesalpinia echinata, known as Pau Brazil, is a native species of the Atlantic Forest, belonging to the family Fabaceae and is widely used in folk medicine. The present work evaluated the phytochemical, toxicological and biological study of the ethanolic extract of *Caesalpinia echinata* seeds and pods association (EESV C_e). The phytochemical characterization of the plant material was performed by thin layer chromatography (CCD) and ultra performance liquid chromatography (UPLC). As for the toxicological analysis, investigations were carried out through *in vitro* toxicities against the microcrustacean *Artemia salina* and *in vivo* in albino mice swiss *Mus musculus*. For the biological research, the anti-inflammatory activities were evaluated through the air pocket method and the antifungal activity by the paper disc diffusion method for yeast fungi and microdilution in broth for filamentous fungi. The phytochemical analysis of the extract by the CCD revealed the presence of saponins, terpenes, tannins, flavonoids, coumarins and glycosides and the absence of alkaloids. The results found in the UPLC analysis indicated the presence of phenolic compounds: flavonoids (gallic acid and quercetin) and syringogenic acid. In toxicology, the extract under study presented moderate toxicity to *Artemia Salina*, with an estimated LC50 of 189.45 $\mu\text{g} / \text{mL}$. In this sense, it was possible to observe that the extract in the *in vivo* analyzes showed low toxicity, it was not possible to calculate the LD50, but it was able to cause toxic effects in the animals tested. It was not possible to detect antifungal activity against yeasts of the genus *Candida* and the filamentous fungus *Trichophyton rubrum* (URM 5908). However, unlike these results, it was possible to detect antifungal activity for the species *Trichophyton mentagrophytes* (URM 6272) with MIC of 200 $\mu\text{G} / \text{mL}$. Thus, the EESV C_e evidenced the presence of bioactive molecules. In addition, it showed moderate *in vitro* acute toxicity and low *in vivo* acute toxicity, absence of anti-inflammatory action and moderate to strong antifungal action against *Trichophyton mentagrophytes*.

Keywords: Phytochemistry. Toxicity. Anti-inflammatory. Antifungal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição de espécies da família Fabaceae no mundo. Fonte: Missouri Botanical Garden, 2012.	22
Figura 2 - Distribuição de espécies da família Fabaceae nas regiões brasileiras. Fonte: LIMA et al., 2010	23
Figura 3 - Aspecto da espécie <i>Caesalpinia echinata</i> Lam. e detalhe da floração. Fonte: BARONI, 2005.....	24
Figura 4 - Tronco de árvore jovem coberto por acúleos (a) e tronco de exemplar adulto (b). Fonte: www.flickr.com	24
Figura 5 - Cortes transversais de <i>Caesalpinia echinata</i> . Fonte: www.hestia.org.br	25
Figura 6 - Folha de <i>C. echinata</i> demonstrando (a) pina e (b) folíolo. Fonte: www.arboretto.blogspot.com	25
Figura 7 - Inflorescência do tipo cacho (a) e Destaque das flores de <i>C. echinata</i> Lam. (b). Fonte: ALEXANDER, 2009	26
Figura 8 - <i>C. echinata</i> : Fruto verde – imaturos (a), Fruto marrom - maduros (b). Fonte: www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br . Sementes (c) Fonte: www.arvoresdesaopaulo.wordpress.com	27
Figura 9 - Larva de <i>Artemia salina</i> . Fonte: www.flickrriver.com.....	29
Figura 10 - Experimento toxicidade aguda <i>in vitro</i> frente a <i>Artemia salina</i>	35
Figura 11 - Cromatograma do EESV <i>Ce</i>	43
Figura 12 - Cromatograma do EESV <i>Ce</i> identificando o ácido gálico como um dos compostos extraídos.	44
Figura 13 - Cromatograma do EESV <i>Ce</i> identificando o ácido siríngico como um dos compostos extraídos.	45
Figura 14 - Cromatograma do EESV <i>Ce</i> identificando a quercetina como um dos compostos extraídos.	46
Figura 15 - Percentual de larvas de <i>A. salina</i> mortas em relação ao aumento da concentração do EESV <i>Ce</i>	47

- Figura 16** - Grupo controle: A. Parênquima do fígado com hepatócitos de morfologia preservada, com um a dois núcleos, presença de vênula (asterisco) e ducto biliar (seta). B. Hepatócitos periféricos e capilares sinusoidais morfológicamente normais. Grupo tratado: C e D. Parênquima hepático apresentando focos de células inflamatórias predominantemente mononucleares (seta longa vermelha) e esteatose microvesicular leve (setas curtas) e macrovesicular (setas longas amarela). Coloração H.E. AU 400X. 53
- Figura 17** - Grupo controle: A e B. Córtex renal apresentando corpúsculos renais (setas longas), arteríola (seta curta), túbulos contorcidos proximais (TCP) e distais (TCD) preservados. Grupo tratado: C e D. Córtex renal apresentando corpúsculos renais (setas longas), túbulos contorcidos proximais (TCP) e distais (TCD) sem alterações morfológicas. Coloração H.E. AU 400X. 56
- Figura 18** - Atividade Anti-inflamatória - modelo bolsão de ar 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sistemas cromatográficos utilizados para a caracterização química do EESV <i>Ce</i>	33
Tabela 2 - Microrganismos testes utilizados na atividade antifúngica.....	38
Tabela 3 - Classes de metabólitos secundários identificados no EESV <i>Ce</i>	41
Tabela 4 - Sinais clínicos observados na toxicidade aguda in vivo nos animais do grupo tratado com EESV <i>Ce</i>	49
Tabela 5 - Consumo de água, ração, evolução ponderal e peso relativo dos órgãos de camundongos tratados com o EESV <i>Ce</i>	51
Tabela 6 - Efeito do EESV <i>Ce</i> sobre os parâmetros hematológicos de camundongos na toxicidade oral aguda.....	52
Tabela 7 - Valores bioquímicos dos grupos controle e tratado com o EESV <i>Ce</i> na toxicidade oral aguda na dose de 2.000 mg/kg.....	52

LISTA DE SÍMBOLOS

”	Aspas
cm	Centímetro
Da	Dalton
g	Gramma
°	Grau
h	Horas
L	Litro
±	Mais ou menos
<	Menor que
µg	Micrograma
µL	Microlitro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
min	Minutos
nm	Nanômetro
%	Por cento
Kg	Quilograma
kv	Quilovolt
=	Sinal de igual
v	Volt

LISTA DE ABREVIATURAS

A. SALINA	<i>Artemia salina</i>
ANOVA	Análise de Variância
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
C. ECHINATA	<i>Caesalpinia echinata</i>
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CL50	Concentração Letal Média
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DL50	Dose Letal Média
EESV <i>Ce</i>	Extrato etanólico da associação de sementes e vagens de <i>Caesalpinia echinata</i>
OECD	Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento
PE	Pernambuco
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UPLC	Cromatografia líquida de ultra performance

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	OBJETIVOS	20
1.1.1	Objetivo Geral	20
1.1.2	Objetivos Específicos	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	CONSIDERAÇÕES BOTÂNICA.....	22
2.1.1	Família Fabaceae	22
2.1.2	Gênero Caesalpinia	23
2.1.3	Considerações gerais sobre <i>Cesalpinia echinata</i> Lam.	23
2.2	FITOQUÍMICA	27
2.2.1	Investigação Fitoquímica	27
2.3	ATIVIDADES TOXICOLÓGICAS.....	28
2.3.1	Toxicidade <i>in vivo</i> - <i>Artemia salina</i>	28
2.3.2	Toxicidade <i>in vivo</i> - Camundongos <i>Mus musculus</i>	29
2.4	ATIVIDADE BIOLÓGICAS.....	29
2.4.1	Atividade Anti-inflamatória	29
2.4.2	Atividade Antifúngica	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1	MATERIAL VEGETAL.....	32
3.2	OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO.....	32
3.3	CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA.....	32
3.3.1	Análise por cromatografia em camada delgada	32
3.3.2	Análise por cromatografia líquida de ultra performance	33
3.4	ATIVIDADE TOXICOLÓGICA	34
3.4.1	Toxicidade Aguda <i>in vivo</i> – <i>Artemia salina</i>	34
3.4.2	Toxicidade Aguda <i>in vivo</i> - Camundongos <i>Mus musculus</i>	35
3.4.2.1	Realização da metodologia OECD	35
3.4.2.2	Preparação histológica	36
3.5	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	37

3.5.1	Atividade Anti-inflamatória	37
3.5.2	Atividade Antifúngica	38
3.5.2.1	Cepas fúngicas	38
3.5.2.2	Método de Difusão em Disco de Papel – Leveduras	38
3.5.2.3	Padronização dos Inóculos	39
3.5.2.4	Semeio e teste de atividade	39
3.5.2.5	Método Teste de Diluição em Caldo – Fungos Filamentosos	39
3.5.2.6	Preparação dos inóculos fúngicos	40
3.5.2.7	Concentração Mínima Inibitória (CMI)	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA	41
4.1.1	Análise por cromatografia em camada delgada	41
4.1.2	Análise por cromatografia líquida de ultra performance	42
4.2	ATIVIDADE TOXICOLÓGICA	47
4.2.1	Toxicidade Aguda in vivo – <i>Artemia salina</i>	47
4.2.2	Toxicidade Aguda in vivo - Camundongos <i>Mus musculus</i>	48
4.3	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	58
4.3.1	Atividade Anti-inflamatória	58
4.3.2	Atividade Antifúngica	59
5	CONCLUSÃO	61
	REFERÊNCIAS	62
	ANEXO A - REGISTRO DE COMPROVAÇÃO DO ESPÉCIME VEGETAL	71
	ANEXO B - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL (CEUA)	72

1 INTRODUÇÃO

De acordo com World Health Organization (2003), recebe o nome de planta medicinal as espécies vegetais utilizadas para fins terapêuticos, sejam elas cultivadas ou não. Ainda podem ser considerados como plantas medicinais àqueles vegetais que são usados tradicionalmente na medicina popular (BRASIL, 2006).

Há registros do uso de plantas como medicamento em todas as espécies. Observações sobre o comportamento de primatas não humanos, realizadas na África, sugerem a existência de uma automedicação através do consumo de folhas de diversas espécies de plantas comumente empregadas pelos humanos com finalidades terapêuticas.

É possível, portanto, que os nossos ancestrais, assim como os povos ‘primitivos’ (no sentido de serem iletrados), e outros primatas não humanos, tenham aprendido através da observação da Natureza o valor terapêutico das plantas. Na verdade, existem evidências históricas e arqueológicas de que as propriedades terapêuticas das plantas medicinais já eram conhecidas desde o período Neolítico (MILLS; BONE, 2012; ALVES, 2013).

Pesquisas também revelam o uso de plantas medicinais nas antigas civilizações do Oriente (ROCHA et al., 2015).

O faraó Ramsés I e seus contemporâneos, por exemplo, em 1500 a.C. já registravam e descreviam o uso das plantas medicinais na antiga civilização egípcia no chamado *Papiro de Ebers* (HARAGUCHI; CARVALHO, 2010).

As propriedades do ópio (*Papaver somniferum*) como sedativo e calmante, do óleo derícino (*Ricinus communis*), da alcaravia (*Carum carvi*) e da hortelã pimenta (*Mentha piperita*) como digestivo e da cila (*Drimia urticaria*) como estimulante cardíaco, já eram conhecidos no Egito há mais de 4.000 anos. Os egípcios sabiam como preparar diuréticos, vermífugos, purgantes e anti-sépticos de origem natural (ALVES, 2013).

A Índia também teve uma grande contribuição na descrição de plantas medicinais, dentro do conjunto dos seus 4 livros sagrados, um deles, chamado Charaka catalogou mais de 500 remédios os quais foram relacionados em grupos de acordo com a natureza de sua ação (AGUIAR, 2010).

Os Gregos e Romanos também fizeram uso das plantas medicinais e destinaram-na a Tratamento de enfermidades. (NETO; CAETANO, 2005; GOMES, 2011)

No Brasil, o convívio entre índios e jesuítas, durante o processo de catequese, permitiu a esse grupo religioso a identificação, a colheita, a manipulação e o emprego das plantas medicinais. Posteriormente, as receitas desenvolvidas pelos jesuítas para o tratamento de enfermidades foram catalogadas em um livro manuscrito intitulado ‘Coleção de Receitas’,

encontrado nas boticas de cada colégio da Companhia de Jesus. Esse documento representou o Código Farmacêutico Brasileiro até o final do século XVIII (ALVES, 2010).

O Brasil é o país que detém a maior parcela da biodiversidade, em torno de 15% a 20% do total mundial, com destaque para as plantas superiores, nas quais detém aproximadamente 24% da biodiversidade. Entre os elementos que compõem a biodiversidade, as plantas são a matéria-prima para a fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos. Além de seu uso como substrato para a fabricação de medicamentos, as plantas são também utilizadas em práticas populares e tradicionais, como remédios caseiros e comunitários, processo conhecido como medicina tradicional. Além desse acervo genético, o Brasil é detentor de rica diversidade cultural e étnica que resultou em um acúmulo considerável de conhecimentos e tecnologias tradicionais, passados de geração a geração, entre os quais se destacam o vasto acervo de conhecimentos sobre manejo e o uso de plantas medicinais (MISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Atualmente, os fitoterápicos constituem importante fonte de inovação terapêutica, sendo objeto de interesse industrial. Neste cenário destacam-se as drogas convencionais anti-inflamatórias e antifúngicas, disponíveis no mercado, as quais apresentam efeitos colaterais relevantes, além de crescente resistência microbiana. Por este motivo, justifica-se a busca por novos fármacos mais eficientes e sem tais efeitos adversos. (MISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Diante desse contexto, tem-se o espécime *Caesalpinia echinata* Lam, ou “pau-brasil”, uma angiosperma, pertencente à família Fabaceae. Este vegetal possui importantes potenciais econômicos, dentre os quais destacam-se suas atividades farmacológicas, como atividades antitumoral e antinociceptiva (GRANGEIRO, 2009) antibacteriana (SILVA et al., 2012) e antioxidante e antiangiogênica (GOMES, 2014), que podem ser obtidas a partir de extratos de várias partes de vegetais, pertencentes à mesma família (SILVA et al., 2012).

Uma vez que não é evidenciado na literatura estudos utilizando a associação de sementes e vagens do espécime em questão e aliado ao interesse em estudar o sinergismo dessas duas partes da planta, desenvolveu-se este protocolo experimental. Dessa forma, o presente trabalho propôs-se a caracterizar fitoquimicamente o extrato etanólico da associação de sementes e vagens de *Caesalpinia echinata*. Além disso, o trabalho também objetivou avaliar o potencial toxicológico e biológico do referido extrato, através das atividades anti-inflamatória e antifúngica, visto que a referida espécie possui potencial terapêutico.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 **Objetivo Geral**

Avaliar os possíveis efeitos toxicológicos de *Caesalpinia echinata* na atividade anti-inflamatória e antifúngica.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Identificar o material botânico;
- Obter o extrato etanólico da associação das sementes e vagens de *Caesalpinia echinata*;
- Identificar as classes de constituintes químicos por cromatografia em camada delgada e os compostos através da cromatografia líquida de ultra performance, presentes no extrato etanólico da associação de sementes e vagens de *Caesalpinia echinata*;
- Avaliar a toxicidade aguda *in vivo*, bem como determinar a CL50 e DL50;
- Analisar a atividade anti-inflamatória do extrato etanólico da associação das sementes e vagens de *Caesalpinia echinata*;
- Analisar a atividade antifúngica do extrato etanólico da associação das sementes e vagens de *Caesalpinia echinata*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

2.1.1 Família Fabaceae

A família Leguminosae (Fabaceae) é uma das maiores famílias botânicas, possui 727 gêneros e cerca de 19.325 espécies, e com ampla distribuição geográfica (LEWIS et al. 2005). Assim, esta família pode ser encontrada praticamente em qualquer lugar do mundo (Figura 1) e em todos os biomas brasileiros (Figura 2). Distribui-se desde os picos das serras montanhosas até o litoral arenoso, da floresta tropical úmida. Esta triagem vai até os desertos e aparecendo inclusive em ambientes aquáticos, porém a sua diversidade diminui à medida que se distancia latitudinalmente (FERNANDES; GARCIA, 2008; LEWIS, 1987; SILVEIRA, MIOTTO, 2013). E muitas de suas espécies possuem importância econômica (TUCKER, 2003).

É subdividida em três subfamílias muito distintas: Faboideae, Caesalpinioideae e Mimosoideae (JUDD et al, 1999)

A subfamília Caesalpinioideae é atualmente dividida em cinco tribos: Cercideae, Caesalpinieae, Cassieae, Detarieae e Macrolobieae (BRUNEAU et al., 2001; TUCKER et al., 2003). Na tribo *Caesalpineae* da subfamília Caesalpinioideae, encontra-se O gênero *Caesalpinia* juntamente com a subfamília Caesalpinioideae são identificados por certas peculiaridades de sua morfologia floral, como flores geralmente hermafroditas, com simetria radial ou bilateral e inflorescências indeterminadas (JUDD et al., 1999; TUCKER, 2003).

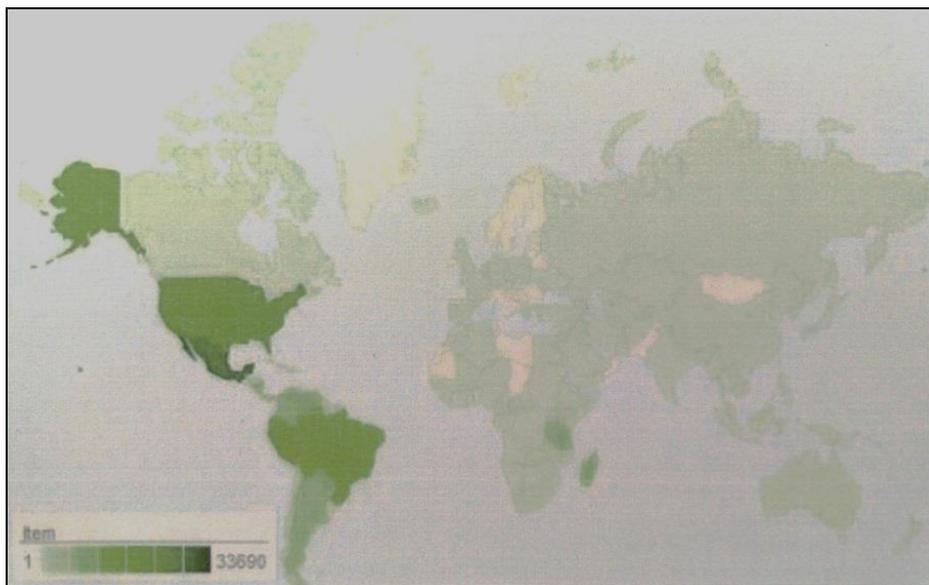


Figura 1 Distribuição de espécies da família Fabaceae no mundo. **Fonte:** Missouri Botanical Garden, 2012.

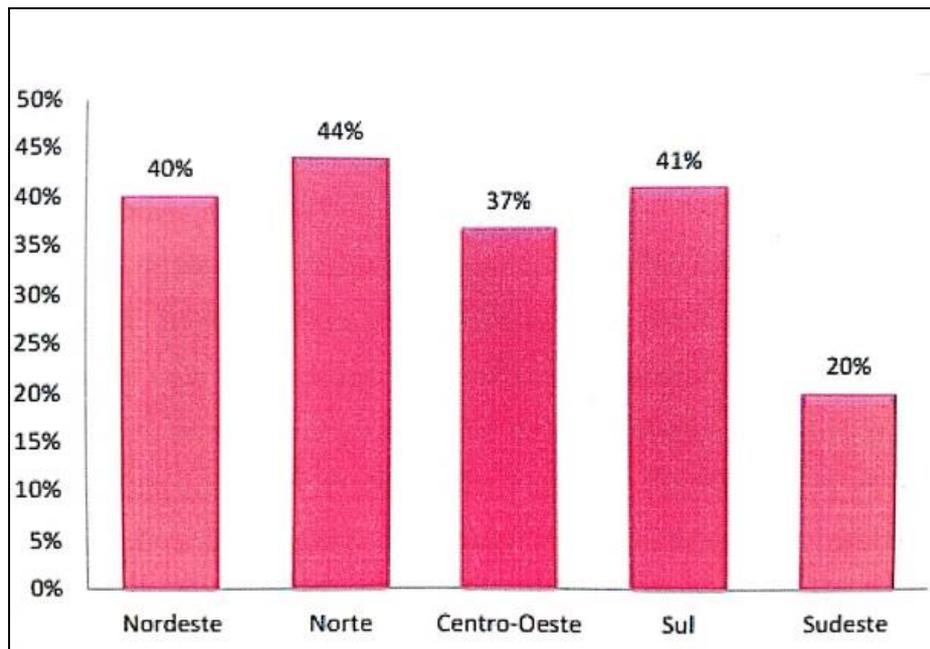


Figura 2 Distribuição de espécies da família Fabaceae nas regiões brasileiras. **Fonte:** LIMA et al., 2010

2.1.2 Gênero *Caesalpinia*

O gênero *Caesalpinia*, que está representada no Brasil por aproximadamente 130 espécies, dentre elas *Caesalpinia echinata* (LIMA, 2010).

Em um estudo realizado por Agra et al. (2008) em estados do Nordeste brasileiro, identificou-se que das 126 espécies relatadas como plantas medicinais, 6 pertenciam ao gênero *Caesalpinia*, onde o pau brasil (*Caesalpinia echinata*) foi uma das plantas mais citadas pela população.

A primeira espécie do gênero *Caesalpinia* comercializada a partir do século XII, destinada a ser utilizada em processos de tingimento, foi a *Cesalpinia sappan*, vinda do oriente. Conforme relatado em documentos genoveses da época, ela era conhecida como brazilio, brazil ou brazilleto, referenciando-se ao rubro e uma das possíveis fontes da origem do nome Brasil (BUENO, 2002).

2.1.3 Considerações gerais sobre *Caesalpinia echinata* Lam

Caesalpinia echinata, conhecida como pau-brasil possui porte arbóreo, variando de 5 a 15 m de altura (Figura 3). Entretanto, o porte dos exemplares atuais é de 10 a 12 m, contudo existem registros do período colonial de indivíduos com até 30 m (LEWIS, 1998; LIMA et al., 2002). Sua copa é bastante irregular e densa, repleta de galhos com tons variando de cinza-claro nas partes mais velhas e verde-escuro nas terminações. Em indivíduos jovens são detectados acúleos (Figura 4a) na extensão do caule, assim como, nos ramos mais novos (FONTES, 1995; LIMA et al., 2002). O seu tronco é geralmente curto, tortuoso e

irregularmente ramificado, apresentando entre 30 e 40 cm de diâmetro, podendo chegar até a 70 cm nas maiores árvores (REZENDE *et al*, 2004). A casca geralmente apresenta tonalidade pardo-acinzentada (Figura 4b). No interior do tronco, encontra-se o cerne, que na planta adulta varia de castanho-alaranjado ao vermelho-escuro, externamente encontra-se o albúrneo, mais claro e menos denso do lenho (DUCKE, 1953; LIMA *et al.*, 2002) (Figura 5).



Figura 3. Aspecto da espécie *Caesalpinia echinata* Lam. e detalhe da floração. **Fonte:** BARONI, 2005



Figura 4. Tronco de árvore jovem coberto por acúleos (a) e tronco de exemplar adulto (b). **Fonte:** www.flickr.com

A madeira é densa, pesada, compacta, muito resistente (LORENZI, 2000), inclusive a fungos e a ação de cupins (CARVALHO, 2003). Quando a espécie sofre contato com estes insetos o desgaste limita-se a superfície (PIVETTA, 2003).

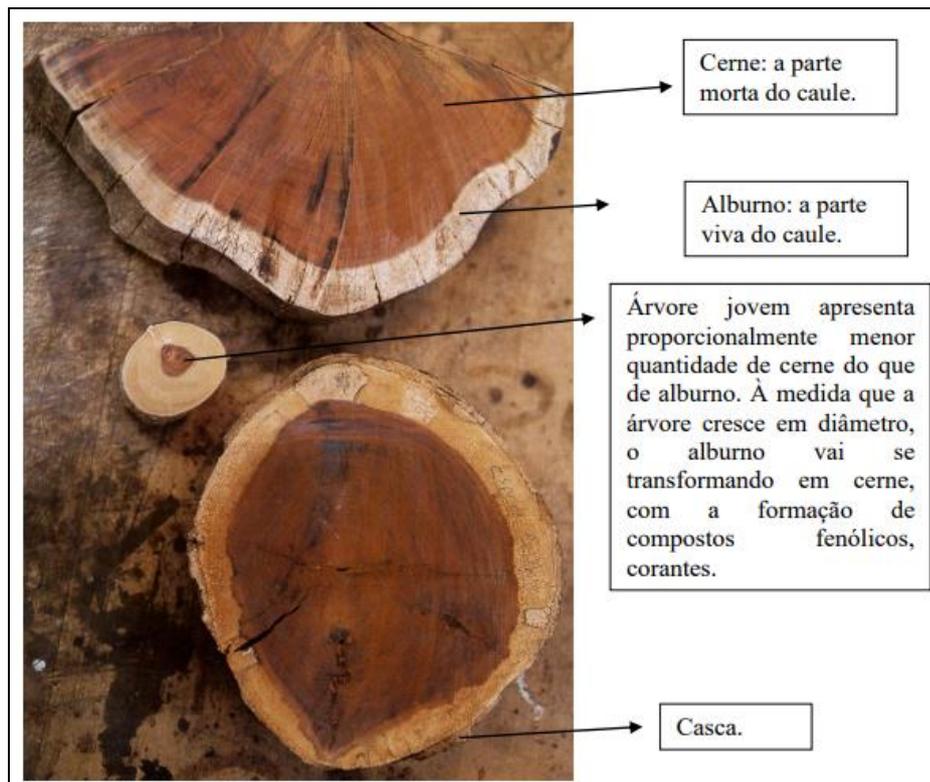


Figura 5. Cortes transversais de *Caesalpinia echinata*. **Fonte:** www.hestia.org.br

Sua copa é irregular, as folhas são compostas, bipinadas com 10 a 15 centímetros de comprimento com 3 a 7 pinas e de 8 a 21 folíolos por pina (LEWIS, 1998) (Figura 6).



Figura 6. Folha de *C. echinata* demonstrando (a) pina e (b) folíolo. **Fonte:** www.arboretto.blogspot.com

Suas flores são hermafroditas e pentâmeras. O cálice de cor verde amarelada é formado por cinco sépalas. A corola possui cinco pétalas com intensa coloração amarela e com a pétala mediana destacando-se pela presença de uma mancha central vermelho-escura (FONTES, 1995; LEWIS, 1998, JUDD et al., 1999; TUCKER, 2003) (Figura 7). Acredita-se que essa pétala modificada esteja associada à estratégia reprodutiva e tenha sua função diretamente relacionada com a atração de agentes polinizadores (ZAIA, 2004). Com odor floral intenso, sua inflorescência apresenta, em média, 17 cm de comprimento, ocorrendo essa floração entre os meses de outubro e novembro no Sudeste e entre janeiro e fevereiro no Nordeste (LIMA, 1992; LEWIS, 1998; ROCHA, 2010).

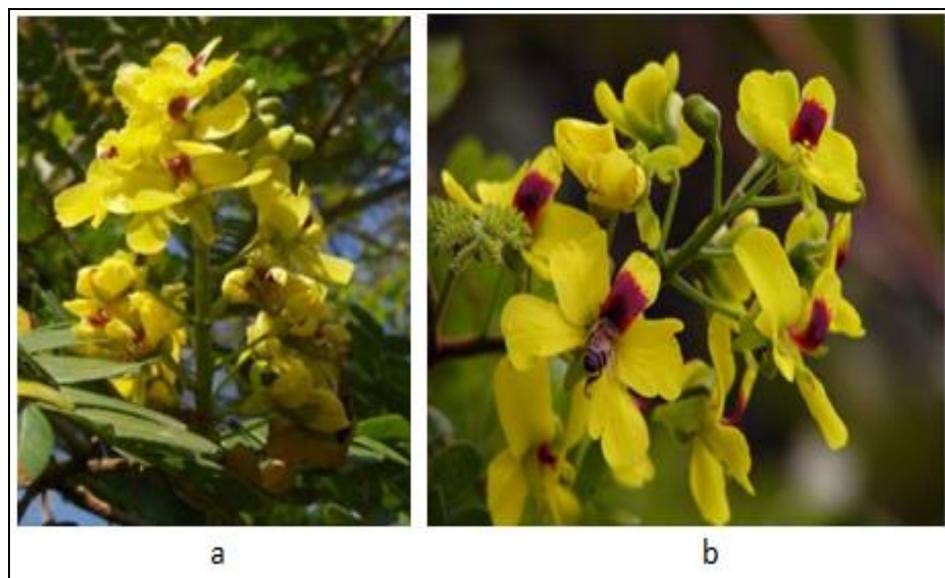


Figura 7. Inflorescência do tipo cacho (a) e Destaque das flores de *C. echinata* Lam. (b). **Fonte:** ALEXANDER, 2009

Os frutos são do tipo legume, conhecidos também como vagem, de coloração verde quando imaturos e de cor marrom quando maduros (Figura 8a e 8b). Os frutos possuem cerca de 6 a 8 centímetros de comprimento e 2 a 3 centímetros de largura, são oblíquos, podendo ser mais largos no ápice. Possuem deiscência explosiva, amadurecendo, em média, em um mês após a floração e, assim como o tronco, são repletos de acúleos (Figura 8b) (CARVALHO, 2003).

Suas sementes de coloração acastanhada, com pontuações de diferentes tonalidades, são normalmente elíptica, lisa, chata, de contorno irregular, medindo cerca de 17 mm de comprimento, 15 mm de largura por 0,3 cm de espessura (Figura 8c) (CARVALHO, 2003), presentes entre 1 a 2 por fruto (LEWIS, 1998; LIMA, 1992). No momento da abertura da

vagem são dispersas de quatro a cinco metros da árvore genitora (LIRA et al.,2003).

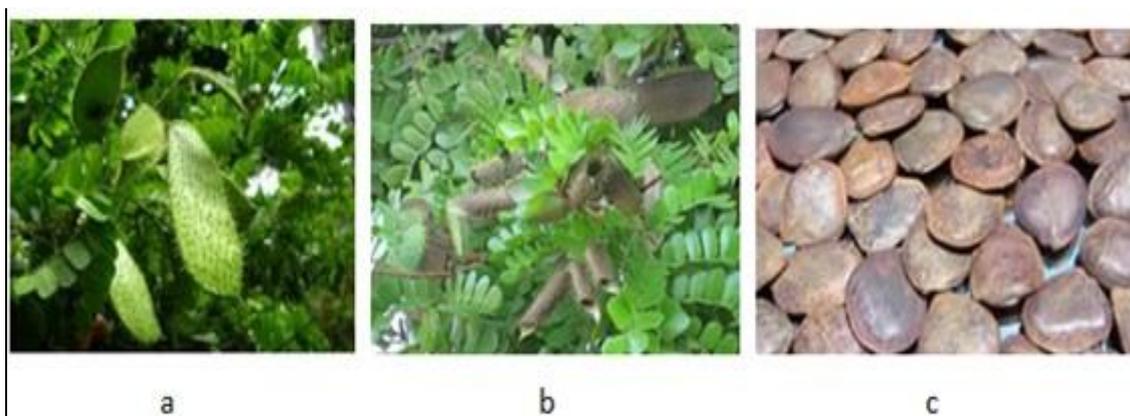


Figura 8. *C. echinata*: Fruto verde – imaturos (a), Fruto marrom - maduros (b). **Fonte:** www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br . Sementes (c) **Fonte:** www.arvoresdesaopaulo.wordpress.com

Sendo nativa da Mata Atlântica, este espécime possui distribuição geográfica confirmada no Nordeste (Alagoas, Bahia, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Sergipe) e Sudeste (Espírito Santo, Rio de Janeiro) do país (LIMA 2019).

2.2 FITOQUÍMICA

2.2.1 Investigação Fitoquímica

A fitoquímica é ciência responsável por caracterizar estruturalmente, avaliar as propriedades e investigar a biossíntese de metabólitos secundários produzidos por organismos vivos (RODRIGUES et al., 2010). Os metabólitos secundários, formados geralmente por estrutura complexa e baixo peso molecular, são responsáveis por atividades biológicas marcantes e, ao contrário dos metabólitos primários, apresentam-se em baixas concentrações e em determinados grupos de plantas (BERG E LUBERT, 2008). Muitos destes compostos possuem importância farmacológica, pois representam uma fonte promissora para a descoberta de novas moléculas úteis ao homem (HAIDA et al, 2007).

Técnicas cromatográficas como a cromatografia em camada delgada (CCD) e a cromatografia líquida e de alta eficiência (CLAE) têm sido largamente utilizadas tanto para o estudo fitoquímico, quanto na química analítica para o controle de qualidade de plantas medicinais, visto que proporcionam vantagens como à alta eficiência e rapidez (RIBANI et al., 2004).

Outras técnicas também ajudam a identificar e a elucidar estruturas de substâncias orgânicas, como por exemplo, a cromatografia líquida de ultra performance (UPLC) a qual baseia-se nos mesmos princípios da cromatografia líquida de alta eficiência. Porém, diferentemente da CLAE a UPLC é uma técnica que possui a capacidade de trabalhar a

pressões muito altas (100 MPa), volumes internos muito menores, além de um melhoramento no sistema de controle e de dados (MALDANER et al., 2009).

2.3 ATIVIDADES TOXICOLÓGICAS

Toxicidade é a propriedade de uma substância química ou biológica associada a sua capacidade de causar danos aos organismos vivos, em função da concentração e de duração da exposição (VENSON, 2011). Tem por objetivo caracterizar a relação dose/resposta que conduz ao cálculo da DL50 (Dose letal 50%) ou CL50 (Concentração letal média) (BARROS; DAVINO, 2008).

Quando nos referimos à toxicologia, algumas definições são levadas em consideração, por exemplo, toxicidade aguda e crônica. A primeira resulta da exposição a um agente tóxico, em um curto período, capaz de promover os efeitos indesejáveis, que vão desde uma simples tontura até mesmo à morte. Já a crônica está relacionada a exposições repetidas, de longa duração e doses frequentemente insuficientes para provocar uma intoxicação aguda, com os sintomas podendo manifestar-se após meses ou anos a partir do contato com o agente tóxico. Vale ressaltar que uma mesma substância pode provocar intoxicação aguda e após certo tempo, desencadear uma intoxicação crônica (OGA, 2014).

Diante do cenário da utilização de plantas medicinais como uma alternativa na busca de novos agentes terapêuticos, a determinação da toxicidade aguda é o primeiro passo nas investigações toxicológicas. A fim de estabelecer a eficácia e a segurança química no uso do extrato etanólico de *Caesalpinia echinata* Lam destinado à terapêutica, bem como o conhecimento prévio da composição química para a confirmação da presença dos princípios ativos.

2.3.1 Toxicidade *in vivo* – *Artemia salina*

Neste sentido, a utilização de *Artemia salina* (Figura 9) como organismo bioindicador em um teste de toxicidade aguda é um bioensaio que serve tanto como indicador de toxicidade como de bioatividade de extratos de plantas. Ele apresenta vantagens como: rapidez, praticidade, simplicidade, baixo custo, requer pouca quantidade de amostra (PARRA et al. 2001).



Figura 9. Larva de *Artemia salina*. **Fonte:** www.flickrriver.com

2.3.2 Toxicidade *in vivo* – Camundongos *Mus musculus*

Os estudos de toxicidade aguda *in vivo* também são realizados em animais adultos, preferencialmente fêmeas, onde verifica-se o número de animais que morrem durante o período de observação. Além dos dados de mortalidade e peso corporal, através dessa metodologia podem ser avaliados parâmetros como sinais de intoxicação, letargia, mudanças comportamentais, morbidade, alteração no consumo de alimentos, entre outros.

O teste serve de base para o estabelecimento de um regime de doses para pesquisas sobre a toxicidade subaguda e crônica. Além disso, fornece subsídios sobre o modo de ação tóxica da substância teste bem como a relação dose-efeito letal, a qual determina a DL50 (Dose letal 50%) (KLAASSEN; EATON, 2013).

A avaliação da toxicidade aguda realizada segundo a metodologia da Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD 423), preconiza administrar a grupo de três animais, doses seqüenciais menores a partir da máxima de 2000 mg/kg, caso seja observado morte.

2.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

2.4.1 Atividade anti-inflamatória

O processo inflamatório caracteriza-se por uma cadeia de eventos com o intuito de reparar tecidos em diversas situações. Essas situações vão desde cortes pequenos na pele até as agressões mais severas, como uma resposta à infecção, antígenos ou lesão tecidual. Assim, tem por função erradicar os agentes microbianos ou irritantes e potencializar o reparo tecidual (FLOWER e PERRETTI, 2005). Este é um processo benéfico, mas que deve ser

perfeitamente controlado, pois em caso contrário pode resultar em dano tecidual (SCHMID-SCHONBEIN, 2006).

O processo inflamatório é caracterizado pela presença de rubor (eritema), calor (aumento de temperatura na região inflamada), tumor (edema), dor e perda da função do tecido afetado (PEREIRA, 2004). Também consiste em uma cascata envolvendo a dilatação de arteríolas, aumento da permeabilidade vascular, infiltração de leucócitos e mais tardiamente a resolução da inflamação (KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013).

Uma maneira eficiente do hospedeiro defender-se contra agentes agressores é através do infiltrado leucocitário, onde as células imunológicas alcançam o foco da lesão e fagocitam, degradam e matam antígenos estranhos. Muitas vezes, num processo inflamatório prolongado estas células imunes podem agredir os próprios tecidos do hospedeiro, lesionando células normais. Além do que o próprio infiltrado celular pode contribuir para a amplificação dos eventos vasculares e celulares da resposta inflamatória, através da liberação de mediadores vasoativos e quimiotáticos (BEVILACQUA et al, 1994; WEDMORE; WILLIAMS, 1981).

Nesse contexto, tem-se os anti-inflamatórios não-esteroides (AINEs). Os AINEs são um grupo variado de fármacos que têm em comum os efeitos antipirético (abaixa a febre), analgésico (reduz a dor) e anti-inflamatório. Alguns dos fármacos mais comuns dessa classe de AINEs são o nimesulida e indometacina (SOUSA, 2016).

De forma sucinta, pode-se dizer que os quadros inflamatórios surgem quando há um aumento da produção de uma substância chamada prostaglandina. A prostaglandina é gerada através da ação de uma enzima chamada ciclooxigenase (COX). Os antiinflamatórios agem inibindo a ação dessa enzima COX, além de inibir a migração de leucócitos (principalmente neutrófilos) até o local da inflamação. Sem COX, há menor produção de prostaglandinas e menos estímulo para ocorrer inflamações (MOSQUINI, 2011). E, sem neutrófilos, haverá redução na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e conseqüentemente redução da injúria celular, já que EROs está associada a morte microbiana e lesão oxidativa tecidual (ROMANOVA, 2003). Como é a presença da prostaglandina que estimula o surgimento de inflamação, dor e febre, a sua inibição pelos AINES acaba tendo efeito analgésico, antipirético e anti-inflamatório.

2.4.2 Atividade antifúngica

A atividade antimicrobiana de extratos de plantas, óleos essenciais e seus componentes têm-se sido alvo de pesquisas no campo da medicina e terapêutica. Esse interesse justifica-se

pelo aumento da resistência aos antimicrobianos sintéticos comerciais por patógenos associados a doenças infecciosas (REICHLING et al. 2009).

No crescente aumento do número de infecções fúngicas, especialmente em pacientes imuno-comprometidos, destaca-se a levedura *Candida albicans*. Esse microrganismo é o agente causador da maioria das candidíases, porém outras espécies do gênero *Candida*, incluindo *C. glabrata* e *C. krusei*, também estão sendo responsáveis pela ocorrência de muitas infecções (AHMAD et al. 2011).

Já os dermatófitos, compreendem um grupo de fungos filamentosos com propriedades queratinofílicas e queratinolíticas, e são classificados em três gêneros: *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*. São capazes de infectar pele, pêlos e unhas, sendo diferenciados através de aspectos macroscópicos, microscópicos e fisiológicos (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; LARONE, 1996; LACAZ et AL., 2002).

A ocorrência de casos de resistência de leveduras e de dermatófitos a antifúngicos vem fazendo com que estudos sobre a atividade antimicrobiana sejam cada vez mais frequentes (AHMAD et al. 2010; DUARTE et al. 2005; PERES, 2010).

O combate as infecções fúngicas através da utilização de medicamentos a base de extratos vegetais pode ser um caminho promissor a ser trilhado na luta contra a resistência e na redução das limitações do tratamento convencional, como efeitos adversos e a alta toxicidade.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

Sementes e vagens de *Caesalpinia echinata* Lam foram coletadas na Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil, em janeiro e fevereiro de 2017. Amostras do espécime foram identificadas e depositadas, como exsicata, no Herbário da Universidade Federal de Pernambuco com o número UFP 82.205.

3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO

O extrato foi preparado pela mistura de 400g de sementes e vagens (200g de cada) de *C. echinata* Lam com 800 ml de etanol. O conjunto foi mantido à temperatura ambiente e agitando esporadicamente durante 12 dias e então filtrado com um filtro de celulose adaptado a funil montado em suporte específico. O filtrado resultante foi concentrado em rotaevaporador a vácuo, a temperatura de 60 °C.

3.3 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA

3.3.1 Análise por cromatografia em camada delgada

O extrato da associação das sementes e vagens de *C. echinata* (EESV*Ce*) foi dissolvido em etanol e assim, uma alíquota de 10 µL dessa solução foi retirada para análise por meio de cromatografia em camada delgada (CCD), dispondo-se de placas de gel de sílica (Merck) como fase estacionária. Para a caracterização das classes de metabólitos secundários, diversas fases móveis e reveladores específicos foram selecionados de acordo com a categoria de moléculas a ser pesquisada (WAGNER; BLADT, 1996). As placas cromatográficas foram eluídas em cubas previamente saturadas. A Tabela 1 apresenta as condições cromatográficas utilizadas na realização do perfil fitoquímico do extrato.

Tabela 1 Sistemas cromatográficos utilizados para a caracterização química do EESV *Ce*

METABOLITOS	SISTEMA DE ELUIÇÃO	REVELADOR	PADRÃO
Alcalóides	-	Dragendorff	Ácido P-cumárico
Cumarinas	Éter-tolueno (50:50 v/v)	KOH	Extrato clorofórmico de <i>Justicia pectoralis</i> (xambá)
Flavonóides	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27v/v)	NP-PEG (NEU) (a base de polietileno glicol)	Quercitina
Saponinas	Teste de formação de espuma	Espuma	Casca de <i>Zizipus joazeiro</i> (Juazeiro)
Taninos	CHCl ₃ -CH ₃ OH-H ₂ O (67:30:3v/v)	FECl ₃	Ácido Tânico
Terpenos	Tolueno-AcOEt (90:10 v/v)	Anisaldeído (1ml)+ ácido acético glacial (20 ml) Metanol (170 ml), H ₂ SO ₄ (10 ml)	Lupeol

Fonte: Adaptado de Wagner e Bladt, 1996

3.3.2 Análise por cromatografia líquida de ultra performace

A cromatografia foi realizada com um cromatógrafo a líquidos de ultra performance (UPLC) Acquity H-Class (Waters) do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE). Foi empregada uma coluna BEH 2,1 x 100 mm e tamanho de partícula de 1,7µm. As fases móveis utilizadas consistiram de solução aquosa contendo 2% de Metanol, 5 mM de formiato de amônio e 0,1% de ácido fórmico (eluente A) e solução metanólica contendo 0,1% de ácido fórmico (eluente B), que foram bombeadas a uma vazão de 0,3 mL/min. A eluição foi realizada em modo gradiente e a condição inicial (98% A/ 2% B) foi mantida por 25 minutos. A proporção de B foi aumentando linearmente para 99% em 8,5 minutos, se mantendo em 99% de B por um minuto, seguida da imediata diminuição para 2% de B, onde foi mantida até 11 minutos. Dez microlitros de amostra foram injetados. A temperatura da coluna foi mantida a 40 °C e o auto injetor a 10 °C. O sistema UPLC foi acoplado a um espectrômetro de massa single quadrupolo SQ Detector 2 (Waters). A voltagem do capilar foi de 3,5 kV, a voltagem do cone 30 V, a temperatura de dessolvatação foi de 450°C, com fluxo

de gás da fonte de 650 L/h. A aquisição dos dados foi feita em modo fullscan, buscando massas entre 100 e 1000 Da, em ionização negativa. A aquisição dos cromatogramas e espectros de massas foram feitos através do software MassLynx™ (Waters).

3.4 ATIVIDADE TOXICOLÓGICA

3.4.1 Toxicidade Aguda *in vivo* – *Artemia salina*

O teste de toxicidade *in vitro* foi realizado através da metodologia de Meyer *et al.* (1982), modificada. Neste ensaio biológico foram utilizadas larvas de *Artemia salina* Leach, divididas em 3 grupos. Os grupos foram organizados em: um controle negativo contendo água do mar + tween, outro controle negativo contendo apenas água do mar e um grupo tratado com o extrato etanólico da associação de sementes e vagens de *Caesalpinia echinata*.

Assim, essa atividade foi realizada em 3 momentos:

No primeiro momento, contabilizado como 1º dia de experimento, 20 mg de cisto de *Artemia salina* foram colocados em uma cuba plástica, contendo água marinha. O referido conjunto manteve-se sob luz artificial por 48 horas, temperatura de 28°C e aeração constantes. A essa etapa do experimento denomina-se período de incubação;

No segundo momento, contabilizado como 3º dia de experimento, houve a completa eclosão dos cistos em larvas de *Artemia salina* e montagem do experimento de acordo com os grupos. Quanto ao grupo tratado, primeiramente, o extrato em estudo foi preparado nas concentrações de 50, 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/ml em água destilada. Em seguida as soluções foram transferidas para tubos de ensaio, completando-os com água do mar até o volume final de 10 mL. E por fim, as larvas em estágio metanauplii (10 unidades) foram adicionadas a cada tubo, contendo as diluições dos três grupos.

Todo o experimento foi desenvolvido em triplicata e as percentagens de mortalidade determinadas após 24 horas de contato.

No terceiro momento, contabilizado como 4º dia de experimento, foi observado a mortalidade das larvas do micro crustáceo e então contabilizada. De acordo com a metodologia utilizada, a CL50 deve ser interpolada através da plotagem gráfica dos dados.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental no Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (Figura 10).



Figura 10. Experimento toxicidade aguda *in vivo* frente a *Artemia salina*. **A.** Água do mar sendo inserida no meio. **B.** Sistema de aeração mecânica e luz artificial para eclosão dos cistos em larvas. **C.** Montagem do experimento de acordo com os grupos (soluções em diferentes concentrações do EESVc contendo as larvas de *Artemia salina*).

3.4.2 Toxicidade Aguda *in vivo* – Camundongos *Mus musculus*

3.4.2.1 Realização da metodologia OECD

O teste de toxicidade aguda oral foi realizado conforme a metodologia descrita no Guia 423 das diretrizes da OECD (Organization for Economic Cooperation and Development).

O emprego de animais, camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) fêmeas (25-30g), deu-se através de 2 grupos com 3 roedores da referida espécie em cada um desses (total de 6 animais). Os grupos foram distribuídos em: um controle negativo (solução salina contendo 5% de tween 80) e um grupo tratado como extrato etanólico de *Caesalpinia echinata*.

Assim, essa atividade foi realizada em 3 momentos:

No primeiro momento, contabilizado como 1º dia de experimento, os animais manipulados foram pesados, esse dado foi registrado e em seguida receberam por via oral, as substâncias. O grupo controle recebeu o veículo (solução salina + 5% de tween). O grupo tratado recebeu única dose de 2.000 mg/kg do extrato etanólico de *C. echinata*.

Após a administração, foram realizadas observações nos comportamentos dos animais nos primeiros 5 min, 15 min, 30 min, 1h, 2h e, a partir de então, diariamente, até o décimo quarto dia, em um mesmo horário. Os animais foram avaliados pelo método de *screening* hipocrático, que consiste na observação de parâmetros comportamentais e fisiológicos de animais de experimentação.

No segundo momento, contabilizado como os 14 dias seguintes do experimento, prosseguiu-se com a pesagem de cada animal, bem como com a análise comportamental dos mesmos. Também foram observados o consumo de água e ração diariamente, durante igual período.

No terceiro momento, contabilizado como 15º dia do experimento, foi finalizado o período de observação e todos os animais sobreviventes foram eutanasiados por deslocamento

cervical, sendo imediatamente coletado o sangue coletado por punção cardíaca. O sangue foi coletado em tubos com anticoagulante (EDTA) e os parâmetros hematológicos e bioquímicos foram determinados em analisador automático ABX micros 60-Horiba. Os animais eutanasiados também foram autopsiados e assim, os órgãos (fígado e rim) foram analisados macroscopicamente, dissecados e pesados.

3.4.2.2 Preparação histológica

Um dos componentes imprescindíveis para a Histologia designa-se de preparado histológico permanente. Neste, os tecidos são previamente cortados no micrótomo e examinados no microscópio. Para que se tenha uma lâmina histológica com um tecido perfeitamente preservado as etapas necessárias à sua elaboração são: fixação, desidratação, clareamento (ou diafanização), impregnação, inclusão e microtomia. Por fim, como a maioria dos tecidos é incolor, torna-se necessário métodos para a sua coloração, de modo a tornar os seus componentes visíveis e diferenciados uns dos outros.

Nesse sentido, o procedimento de preparo histológico foi realizado no Laboratório de Histologia da UFPE, no departamento de histologia e embriologia do Centro de Biociências. Os órgãos coletados (fígado e rim) passaram pela etapa de fixação (fixados, por 48 h, em solução de formol tamponado 10%, na proporção de 20 vezes o volume do fixador em relação ao volume das peças). Após o período de fixação, os órgãos foram clivados em fragmentos menores e estes últimos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados pelo xilol, impregnados pela parafina líquida em estufa regulada à temperatura de 59 °C e incluídos em parafina. Em seguida, os blocos foram cortados em micrótomo, ajustado para 5 mm. Os cortes obtidos foram colocados em lâminas e mantidos em estufa regulada à temperatura de 37 °C, durante 24 horas, para secagem e colagem. Posteriormente, os cortes foram submetidos a uma bateria de coloração para hematoxilina e eosina (H.E.), segundo a metodologia de Junqueira & Junqueira (1983) e ao final, a montagem das lâminas foi realizada com lamínulas fixadas em resina Entellan (Merk).

As lâminas foram analisadas em Microscópio de Luz e os cortes fotografados em Microscópio Biológico no Laboratório de Morfometria do Programa de Pós Graduação em Patologia da UFPE.

A Resolução 90 da ANVISA de 2004 e Guia 423 da OECD (OECD, 2001) determinam que os exames histopatológicos sejam feitos somente se houver alterações macroscópicas nos órgãos, mas o presente estudo realizou a investigação histopatológica

mesmo os órgãos não apresentando alteração macroscópica, a fim de aumentar a possibilidade de detectar alguma possível toxicidade.

3.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

3.5.1 Atividade Anti-inflamatória

A realização da medição da atividade anti-inflamatória foi executada através do método de bolsão de ar, descrito por Perretti e Flower (1994). Este método consiste em formar um espaço com ar estéril, na área dorsal do camundongo, auxiliando-se assim o desencadeamento da cascata inflamatória.

A bolsa de ar é um dos métodos mais adequados para se estudar a inflamação e para a triagem de fármacos com efeitos anti-inflamatórios (JAIN; PARMAR, 2011). Pois, a administração da carragenina nesta cavidade promove uma resposta inflamatória que mimetiza a inflamação que ocorre em humanos (ELLIS et al., 2000). Este modelo experimental permite estudar propriedades farmacológicas, imunológicas e mecanismos de ação de fármacos e biomateriais (VANDOOREN et al., 2013). Além disso, é um modelo confiável para análise da migração celular e mediadores pró-inflamatórios, no exsudato obtido da referida bolsa de ar (MURATA et al., 2014).

Quanto aos animais manipulados, foram utilizados 4 grupos contendo 5 animais em cada um desses (total de 20 animais). Os grupos foram distribuídos em: um controle positivo, um controle negativo, um grupo tratado com 500 mg/Kg do extrato em estudo e um outro tratado com 250 mg/kg também deste último.

Assim, esta atividade foi realizada em 3 momentos:

No primeiro momento, contabilizado como 1º dia de experimento, injetou-se 2,5 mL de ar estéril no dorso do animal;

No segundo momento, contabilizado como 3º dia de experimento, novamente foi injetado 2,5 mL de ar estéril (72 horas após a primeira aplicação), na mesma região dorsal do animal.

No terceiro momento, contabilizado como 7º dia de experimento, os animais manipulados receberam, por via oral, as substâncias: O grupo controle negativo (G1) recebeu o veículo (solução salina 9%); O grupo controle positivo (G2) recebeu o fármaco indometacina (10mg/kg); O grupo controle (G3) recebeu o extrato etanólico das sementes e vagens de *Caesalpinia echinata* na dose 500mg/Kg e o grupo controle (G4) recebeu o extrato etanólico das sementes e vagens de *Caesalpinia echinata* na dose 250mg/kg.

Em seguida, para a indução da inflamação foi injetado 1,0 mL de uma solução de carragenina a 1% dentro da bolsa de ar uma hora após a administração dos compostos. Decorridas 6 horas após a aplicação do agente flogístico, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e as bolsas lavadas com 3,0 mL de solução salina.

Este estudo tem como objetivo avaliar a atividade do extrato etanólico das sementes e vagens de *C. echinata* no processo inflamatório.

O número de células totais no lavado foi determinado através de contagem com o auxílio de uma câmara de Neubauer sob microscopia óptica.

3.5.2 Atividade Antifúngica

A avaliação da atividade antifúngica dos compostos foi verificada através da metodologia proposta pelo Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI, EUA. Para os testes com fungos leveduriformes seguiu-se a norma M27-A2: Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica (Norma Aprovada) (CLSI, 2002b) e para os testes com fungos filamentosos a norma M38-A2: Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos (CLSI, 2002 a).

3.5.2.1 Cepas fúngicas

Foram utilizadas neste estudo, linhagens fúngicas procedentes da Coleção de Cultura da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA). Os microrganismos utilizados encontram-se dispostos na Tabela 2.

Tabela 2. Microrganismos testes utilizados na atividade antifúngica

Leveduras	Fungos Filamentosos
<i>Candida peliculosa</i> URM 6281	<i>Trichophyton rubrum</i> URM 5908
<i>Candida glabrata</i> URM 6393	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> URM 6272
<i>Candida albicans</i> URM 6401	
<i>Candida guilliermondii</i> URM 6403	
<i>Candida parapsilosis</i> URM 6408	

3.5.2.2 Método de Difusão em Disco de Papel – Leveduras

A metodologia difusão em disco de papel foi realizada segundo Bauer *et al.* (1966).

3.5.2.3 Padronização dos Inóculos

As leveduras foram inoculadas em ágar sabouraud e após 24 horas de incubação a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ foram suspensas em solução salina 0,9%. Essas suspensões foram padronizadas pela turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala McFarland (BARRY, 1986; KONEMAN 1997; NCCLS, 2003) e também analisadas em espectrofotômetro modelo Biospectro, SP 220, comprimento de onda de 530 nm, e densidade ótica entre 0,08 a 0,13. Esse valor corresponde a uma concentração de aproximadamente 10^8 Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL, posteriormente, foi feita diluição desta suspensão para obter um inóculo na concentração de 10^5 UFC/mL.

3.5.2.4 Semeio e teste de atividade

As suspensões das leveduras padronizadas foram semeadas em tapete, utilizando “swab” esterilizado e embebido com as mesmas, na placa contendo o meio de cultura Ágar Müeller Hinton suplementado com 2% de glicose e 0,5 mg/mL de azul de metileno, de acordo com o protocolo M44-A (NCCLS, 2009)

Após a semeadura foram inseridos na superfície do meio, discos de papel filtro esterilizados, com 6 mm de diâmetro, os quais foram embebidos com 50 μL do extrato etanólico de sementes e vagens de *Caesalpinia echinata*, na concentração final de 1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1 mg/mL) em cada um dos discos, os quais foram posicionados de forma equidistante.

Em seguida, as placas foram incubadas durante 48 h à 37°C . Como controle negativo, foram utilizados discos de papel filtro saturado com 50 μL do solvente utilizado (etanol). Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

A avaliação consiste na mensuração do diâmetro dos halos de inibição, os quais devem ser expressos em mm pela média aritmética dos resultados obtidos nas duas repetições. Halos iguais e superiores a 10 mm são considerados positivos quanto à atividade antifúngica (PORTILHO et AL., 2013).

3.5.2.5 Método Teste de Diluição em Caldo – Fungos Filamentosos

Os ensaios de inibição foram realizados pelo método de microdiluição em caldo usando placa de microtitulação de 96 poços de acordo com as diretrizes do documento NCCLS M38-A2 (2008).

3.5.2.6 Preparação dos inóculos fúngicos

Os fungos foram cultivados em placas contendo 10 mL meio de cultura ágar sabouraud para respectivo crescimento, durante 7 dias a 36 °C . Após o período de incubação, foi preparada uma suspensão de cada fungo segundo documento citado no item 4.5.2.5. Os inóculos foram suspensos em 5 mL de solução salina 0,9%, esterilizada, acrescida de 30 µL de tween 20 (necessário para fragmentar as hifas).

Em seguida, o sobrenadante dessa suspensão foi transferido para um tubo de ensaio e agitadoem vórtex. Posteriormente, o sobrenadante foi deixado em repouso durante 3- 5 minutos e a análise da densidade das suspensões foi feita em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 530nm, e ajustadas a uma densidade óptica (DO) de 0,15 a 0,17. Essas suspensões foram diluídas de 1:50, correspondendo a 2X a densidade necessária de 0,4 a 5×10^4 UFC / mL.

3.5.2.7 Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Em microplacas de 96 poços foram adicionados 100 uL de caldo RPMI e, em seguida, foram feitas diluições seriadas do extrato etanólico nas concentrações de 1600 a 3,125 µg/mL. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de cada suspensão fúngica. Como controles foram utilizados o meio de cultura com as suspensões fúngicas com e sem o solvente etanol. As microplacas foram incubadas a 36 °C, durante 50 h e após este tempo realizada a leitura para determinar a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento fúngico.

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA

4.1.1 Análise por cromatografia em camada delgada

Conforme demonstrado na tabela 3, a abordagem fitoquímica da espécie *C. echinata* Lam realizada com extrato etanólico da associação das sementes e vagens do vegetal, indicou a presença de saponinas, terpenos, taninos, flavonóides, cumarinas e glicosídeos. Além disso, essa pesquisa também evidenciou a ausência de alcalóides.

Tabela 3. Classes de metabólitos secundários identificados no EESV*Ce*

Classes de metabólitos secundários	EESV <i>Ce</i>
Alcalóides	-
Saponinas	+
Terpenos	+
Taninos	+
Flavonóides	+
Cumarinas	+
Glicosídeos	+

Legenda: - ausência/ não reagente, + presença/ reagente.

A partir do perfil fitoquímico, foi possível identificar metabólitos secundários de interesse farmacológico presente no extrato em estudo. A presença de flavonoides na caracterização química do extrato de sementes e vagens está de acordo com a literatura, que relata a presença deste composto como o metabólito mais observado em espécies do gênero *Caesalpinia* (REZENDE et al., 2004). Esse resultado corrobora com a pesquisa fitoquímica realizada por Luna et al. (2005) e Silva (2006) utilizando-se o extrato etanólico de folhas e cerne de *C. echinata* Lam.

Estudos sobre atividade farmacológica do extrato etanólico de sementes de *C. echinata* Lam apresentaram propriedades antimicrobianas e anticancerígenas (SILVA, 2012). No entanto, propriedades farmacológicas podem ser associadas a compostos fitoquímicos encontrados neste estudo, como saponinas, relacionadas a atividades antimicrobianas e anti-inflamatórias, antifúngico, antiparasitário (SPARG, et al. 2004); taninos também com atividades antimicrobianas (MONTEIRO, et al. 2005); atividade antibacteriana, antioxidante, ação fungicida, reparação de tecidos, regulação enzimática em processos de cicatrização de feridas (MELLO; SANTOS, 2001); patologias estomacais (HASLAM, 1989), fenóis (ROCHA et al. 2011) tem atividade antioxidante, flavonóides com propriedades

antioxidantes, antiproliferativas e anti-inflamatórias (MUSCHIETTI; MARTINO, 2009); antiulcerogênico e antimicrobiano (PINTO et al. 2000); anti-alérgico, hepatoprotetor, antitrombo, antiviral e anti-carcinogênico (MIDDLETON JUNIOR et al. 2000).

Os terpenos são reconhecidos pelos efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e antitumorais (IKEDA et al. 2008) enquanto as cumarinas são utilizadas no tratamento de doenças da pele como psoríase, dermatoses, vitiligo e alguns compostos têm efeito anticoagulante (LEITE, 2009).

Os alcalóides estavam ausentes nas sementes e vagens da espécie no presente estudo. Resultado também relatado por Bastos (2011) e Pereira (2017) utilizando respectivamente flores e sementes da mesma espécie.

Gomes (2014) associou a presença de polifenóis no extrato bruto do caule de *C.echinata* com as propriedades antioxidantes desta planta, além de desempenhar um papel importante na modulação de sistemas angiogênicos em expansão.

Os flavonóides são compostos sintetizados por plantas em resposta à infecção microbiana, sendo atribuídas a esses metabólitos a proteção contra fungos, bactérias e insetos. A atividade protetora é provavelmente devido à sua capacidade de formar complexos com proteínas solúveis que se ligam à parede celular bacteriana e alguns flavonoides lipofílicos podendo também causar ruptura da membrana plasmática de microrganismos (RANDAU et al. 2004; TSUCHIYA et al. 1996; DIXON et al. 1983). Além disso, os flavonóides têm sido associados a inúmeras propriedades medicinais, destacando-se seu poder antioxidante (BOHM e et al., 1998; GROOT; RAUEN, 1998); anti-inflamatório; (FERRANDIZ; ALCARAZ, 1991); antimicrobiano e antialérgico (RUSSO et al., 2000).

4.1.2 Análise por cromatografia líquida de ultra performance

Com o intuito de identificar compostos presentes no extrato etanólico da associação de sementes e vagens de *Caesalpinia echinata* realizou-se técnica de cromatografia líquida de ultra performance. O cromatograma obtido pela referida técnica permitiu a identificação de 3 compostos (Figura 11). Sendo eles o ácido gálico, o ácido siríngico e a quercitina com tempo de retenção de 3,01 , 5,95 e 7,58 min respectivamente (Figuras 12, 13 e 14).

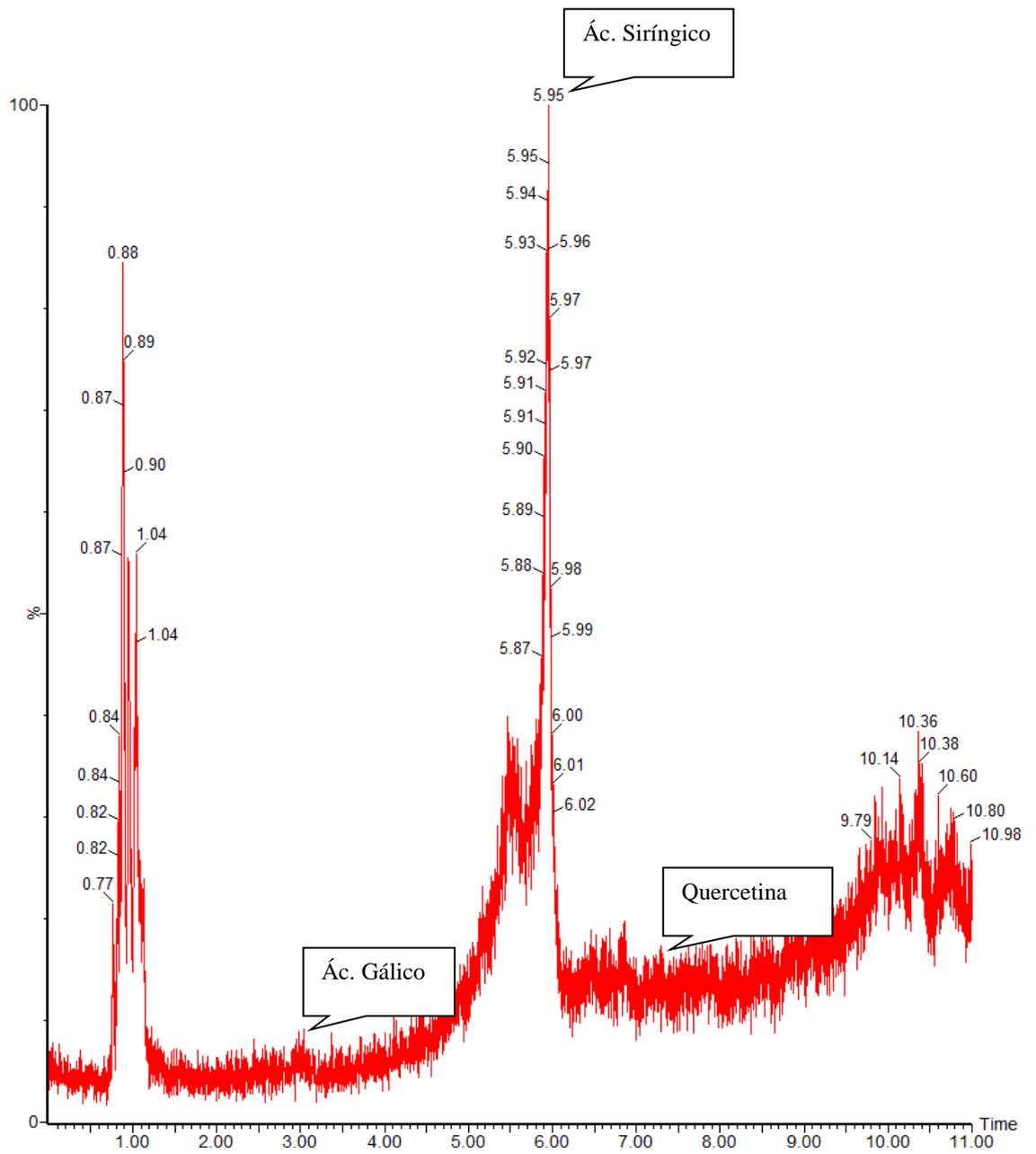


Figura 11. Cromatograma do EESV Ce

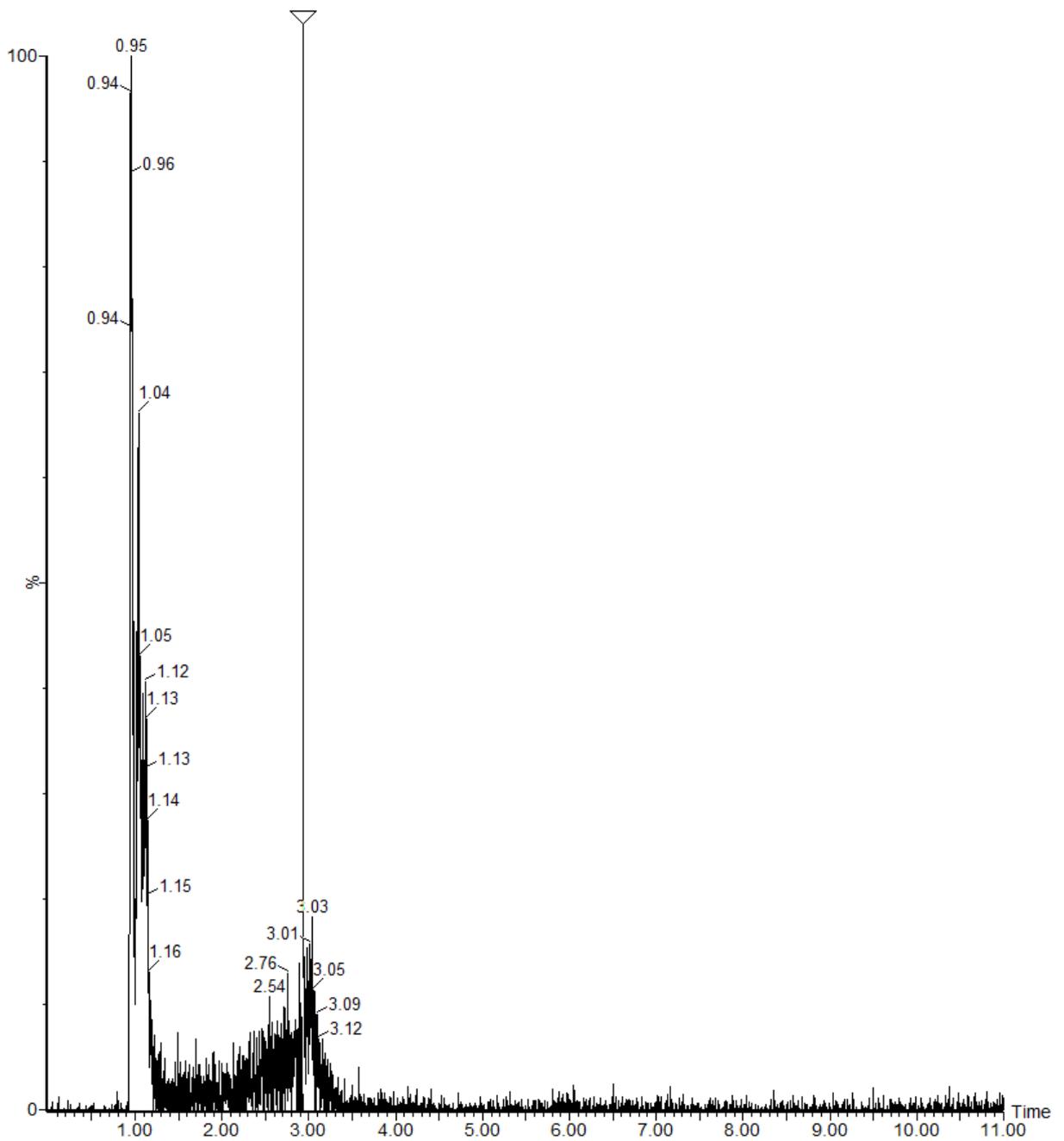


Figura 12. Cromatograma do EESV Ce identificando o ácido gálico como um dos compostos extraídos.

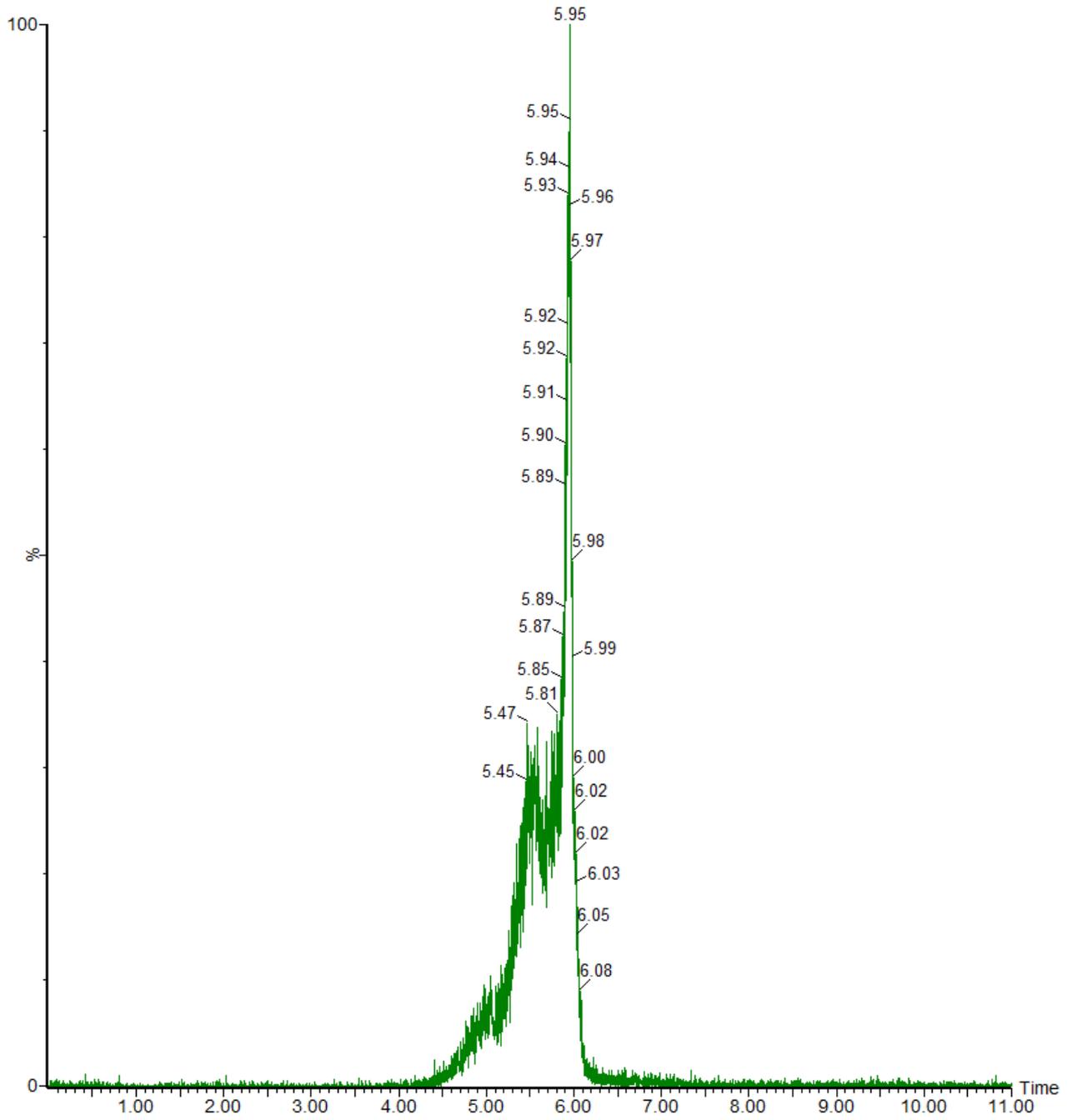


Figura 13. Cromatograma do EESV*Ce* identificando o ácido siríngico como um dos compostos extraídos.

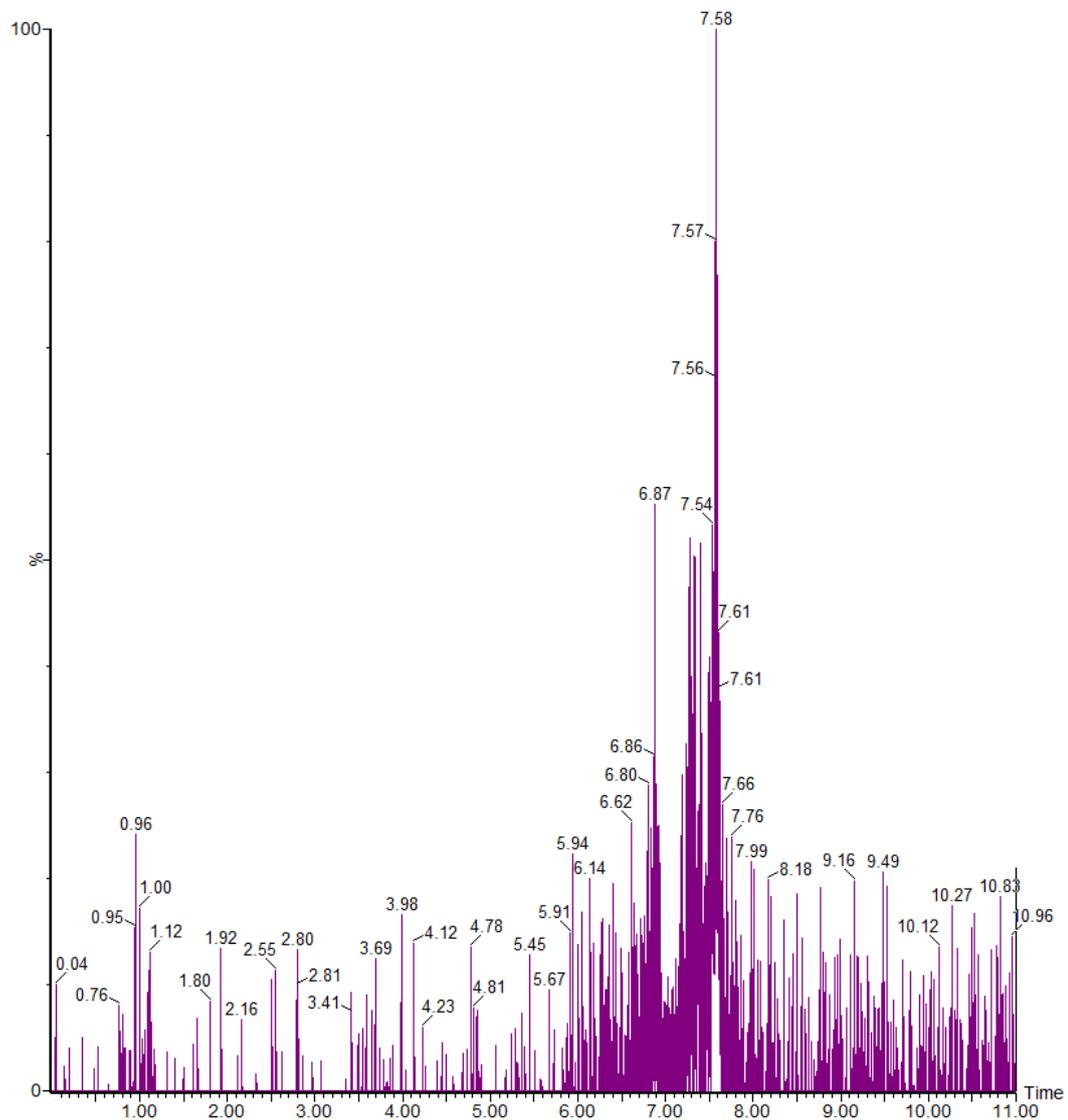


Figura 14. Cromatograma do EESVc identificando a quercetina como um dos compostos extraídos.

A análise por cromatografia líquida de ultra performance permitiu a identificação do ácido gálico, pertencente a classe dos compostos fenólicos, grupo dos flavonóides, com tempo de retenção de 3,01 min (Figura 12). Este composto tem demonstrado ação antimutagênica (GICHNER et al., 1987), antioxidante (KIM et al., 2002) e antitumoral (LOCATELLI et al., 2013). Sua identificação corrobora com os resultados da cromatografia em camada delgada quanto a presença de taninos. Além disso, foi possível reconhecer o ácido siríntrico, um ácido fenólico também pertencente a classe dos compostos fenólicos, com tempo de retenção de 5,95 (Figura 13). Esse último metabólito identificado tem sido relatado como potente antioxidante (YAN, 2016). A análise possibilitou também a identificação do metabólito quercetina, um flavonóide natural, com um tempo de retenção de 7,58 min (Figura 14). A

Quercetina vem sendo associada a feitos anticarcinogênicos, protetores do sistema renal, cardiovascular e hepático (BEHLING et al., 2004).

Não foi evidenciado na literatura realização de análise fitoquímica através da metodologia UPLC com o espécime *Caesalpinia echinata*. Sendo então este resultado inédito.

4.2 ATIVIDADE TOXICOLÓGICA

4.2.1 Toxicidade *in vivo* – *Artemia salina*

De acordo com a figura 15, a toxicidade aguda *in vivo* do EESV C_e indicou uma relação de dose-dependência entre a taxa de mortalidade de *A. salina* e as concentrações do referido extrato.

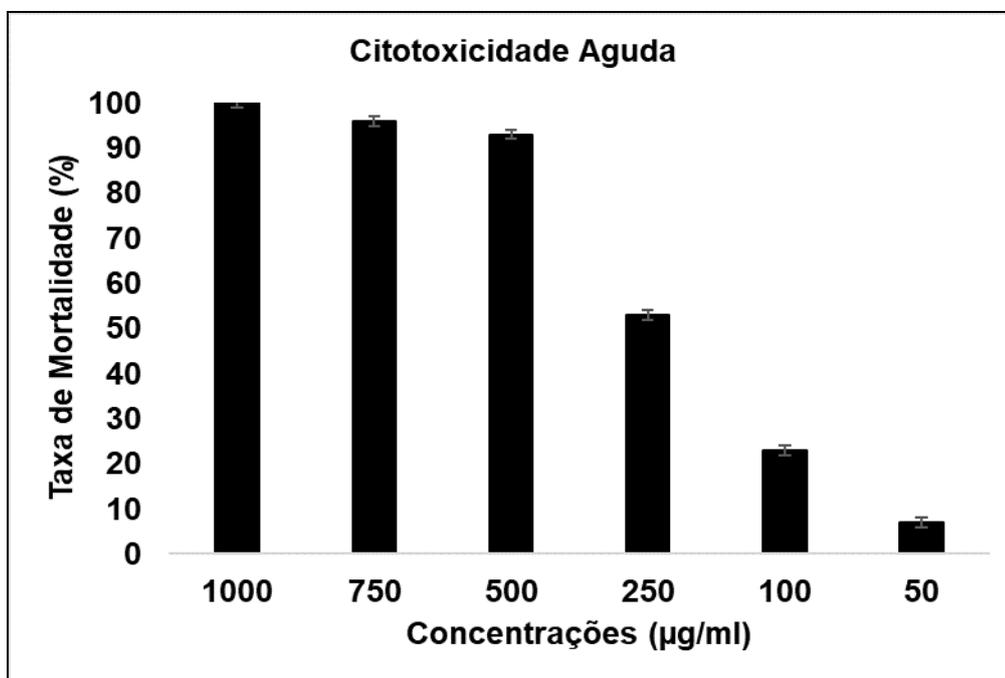


Figura 15. Percentual de larvas de *A. salina* mortas em relação ao aumento da concentração do EESV C_e

Em estudos Meyer e colaboradores (1982) estabeleceram uma relação entre o grau de toxicidade e a concentração letal média, CL50, apresentada por extratos de plantas sobre larvas de *A. salina* e, desde então, considera-se que quando valores superiores a CL50 1000 µg/mL são verificados, eles são considerados não tóxicos. Para os vegetais, o método é útil para identificar a toxicidade que os mesmos podem exibir e minimizar o equívoco da população em acreditar que os produtos naturais são desprovidos de efeitos tóxicos ou adversos (CUNHA et al. 2013).

O presente estudo sobre a investigação da toxicologia *in vivo* frente a *Artemia salina*, revelou uma CL50 estimada em 189,45 µg/mL, sendo então o EESV C_e considerado moderadamente tóxico.

Não há relato na literatura do extrato etanólico da associação de sementes e vagens de *Caesalpinia echinata* frente a *A. salina*. No entanto, a toxicidade moderada observada (189 µg/mL) pode ser relacionada por terpenos presentes no referido extrato. É possível que as saponinas possam elevar os efeitos tóxicos devido às suas propriedades emolientes ou estimulantes (AKAH; OFFIAH 1992). Esta toxicidade corrobora com Silva (2006) que usou o extrato etanólico do cerne de *Caesalpinia echinata* no mesmo teste e, assim, obteve CL50 = 705,6 µg/mL.

Em pesquisas sobre o extrato etanólico de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam realizadas por Silva (2012) e Pereira (2017) frente a *A. salina*, não foram observadas mortes larvais em nenhuma das doses testadas, considerando o extrato não tóxico (ambos obtiveram CL50 maior que 1000,00 µg/mL). O presente estudo não corrobora com os resultados obtidos por esses autores.

4.2.2 Toxicidade *in vivo* – Camundongos *Mus musculus*

No decorrer do período de observação de 14 dias, não houve morte de nenhum animal que recebeu a dose de 2000 mg/kg do extrato em estudo. Conforme o protocolo da OECD (2001), quando não há morte de nenhum animal do grupo tratado, torna-se necessário repetir o experimento com a mesma dose testada. A repetição do teste com a mesma dose foi realizada, e mais uma vez, não foi constatado letalidade em nenhum animal, impossibilitando a realização do cálculo da DL₅₀. Mesmo não havendo letalidade, efeitos tóxicos foram verificados após administração do extrato etanólico da associação de sementes e vagens de *Caesalpinia echinata* durante todo o ensaio. Os sinais clínicos da toxicidade observada nos camundongos do grupo tratado estão dispostos na Tabela 4.

Tabela 4. Sinais clínicos observados na toxicidade aguda *in vivo* nos animais do grupo tratado com EESV C_e

PARÂMETROS	EFEITOS
Estimulantes	
↑ Frequência Respiratória	+
Agitação	+++
Ereção de cauda	+
Expansão do pavilhão auricular	-
Frêmito Vocal	+
Movimentos Circulares	-
Movimentos de Vibrissas	+++
Movimentos Estereotipados	+++
Ondulações/Fasciculações na cauda	-
Piloereção	+++
Postura de ataque	-
Postura em Garra	-
Reação de Fuga	++
Resposta ao Toque	+++
Saltos	-
Taquicardia	+++
Tremores	+
Depressões	
Abaixamento do Trem Posterior	-
Alteração de Marcha	-
Dispneia	-
Postura Estática	-
Prostração	-
Sonolência	+
Outros	
Agressividade	-
Contorções	-
Distensão Abdominal	-
Diurese	+
Edema de Focinho	-
Espasmos	-
Excreção Fecal	++
Exoftalmia	-
Lacrimajamento	-
Palidez	-
Prurido	-
Refluxo	-

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

Em relação ao consumo de água e ração dos animais tratados não houve discrepância significativa em relação aos animais do grupo controle (Tabela 5). Quanto a média de peso corporal, também não houve divergência significativa entre os animais tratados e os animais do grupo controle, ao final do experimento (Tabela 5). Da mesma forma, na avaliação hematológica, não houve diferença estatística significativa entre os animais de ambos os grupos, inferindo-se que o extrato não apresentou toxicidade frente as células sanguíneas de camundongos, (Tabela 6).

Tabela 5. Consumo de água, ração, evolução ponderal e peso relativo dos órgãos de camundongos tratados com o EESV*Ce*

Grupos	Consumo de água (mL/dia)	Consumo de ração (g/dia)	Peso dos animais (g) (Inicial/Final)	Peso relativo dos órgãos	
				Fígado	Rim
Controle	28,2 ± 0,7	20,4 ± 0,4	34,8 ± 0,4 - 41,30 ± 3,7	2,1 ± 0,3	0,2 ± 0,0
EESV <i>Ce</i>	23,8 ± 0,7	19,8 ± 0,9	33,8 ± 1,1 - 37,40 ± 1,0	1,8 ± 0,6	0,2 ± 0,0

Tabela 6. Efeito do EESV*Ce* sobre os parâmetros hematológicos de camundongos na toxicidade oral Aguda

Parâmetros	Controle	EESV<i>Ce</i>
Hemácias (10⁶/mm³)	9,9 ± 0,2	9,2 ± 0,5
Hemoglobina(g/dL)	15,9 ± 0,7	15,10 ± 0,7
Hematócrito (%)	47,30 ± 2,0	45,10 ± 2,2
VCM (µg)	47,80 ± 1,1	49,20 ± 1,3
HCM (pg)	16,0 ± 0,4	16,50 ± 0,8
CHCM (%)	33,60 ± 1,0	33,50 ± 0,9
Leucócitos (10³/mm³)	9,6 ± 2,4	6,0 ± 2,1
Plaquetas (10³/mm³)	747, 0 ± 161,0	793,8 ± 195,9

Os valores são expressos como média ± SEM (*n* = 5 para cada grupo).

Quanto aos parâmetros bioquímicos avaliados, (Uréia, Creatinina, TGO, TGP, Fosfatase Alcalina, Proteína Total, Albumina e Glicose) nos grupos de toxicidade aguda, nenhum deles apresentou diferença significativa nos resultados (Tabela 7).

Tabela 7. Valores bioquímicos dos grupos controle e tratado com o EESV*Ce* na toxicidade oral aguda na dose de 2.000 mg/kg

Parâmetros	Controle	EESV<i>Ce</i>
Ureia (mg/dL)	39,8 ± 9,7	47,4 ± 7,3
Creatinina (mg/dL)	0,45 ± 0,0	0,46 ± 0,1
TGO (U/L)	176,8 ± 63,3	186,4 ± 23,7
TGP (U/L)	45,5 ± 9,5	46,7 ± 22,4
F. Alcalina (U/L)	140,4 ± 36,7	148,3 ± 30,9
P. Total (g/dL)	5,44 ± 1,1	5,93 ± 0,5
Albumina (g/dL)	3,03 ± 0,3	3,68 ± 0,2
Glicose (mg/dL)	101,3 ± 10,8	107,5 ± 9,1

**p*<0,05. Significativos após análise de variância (ANOVA) de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo controle.

A análise histopatológica também foi realizada. Apesar de não terem sido observadas alterações macroscópicas hepáticas, a esteatose micro e macrovesicular e a presença de células inflamatórias no grupo tratado, foram constatadas (Figura 16).

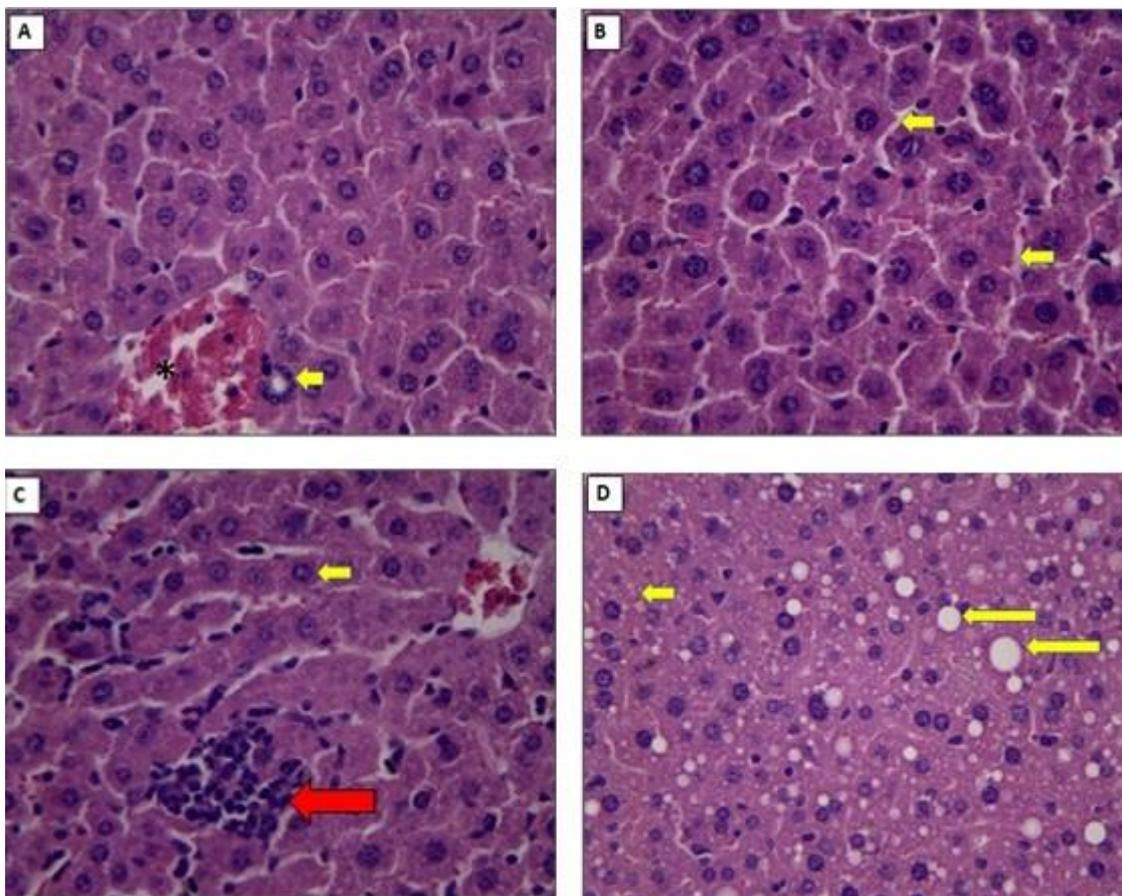


Figura 16. Grupo controle: **A.** Parênquima do fígado com hepatócitos de morfologia preservada, com um a dois núcleos, presença de vênula (asterisco) e ducto biliar (seta). **B.** Hepatócitos periféricos e capilares sinusoidais morfologicamente normais. **Grupo tratado:** **C.** Parênquima hepático apresentando focos de células inflamatórias predominantemente mononucleares (seta longa vermelha). **D.** Esteatose microvesicular leve (setas curtas) e macrovesicular (setas longas amarelas). Coloração H.E. AU 400X.

Tumefação celular e esteatose, acompanhada ou não de colestase fazem parte do quadro de Reações do hepatócito à agressão tóxica. Uma vez constatado intoxicação suficientemente grave, essa pode progredir para necrose e insuficiência hepática (MACLACHLAN; CULLEN, 1998). Segundo YEH (2011), substâncias tóxicas podem provocar inflamação e degeneração gordurosa do fígado pela lesão de mitocôndrias, incapacitando o fígado de metabolizar adequadamente as gorduras, o que pode levar à destruição de células e inflamação. Embora tenha sido encontrado alterações microscópicas, como no caso de esteatose, a ausência de resultados significativos nos níveis das enzimas TGO e TGP nos animais testados do grupo tratado com o extrato, demonstrou ausência de agressão hepática.

TGO e a TGP são enzimas intracelulares responsáveis pela síntese e degradação dos aminoácidos, presentes em grandes quantidades no citoplasma dos hepatócitos. Lesões ou destruição das células hepáticas liberam estas enzimas para a circulação. A TGP é encontrada principalmente no citoplasma do hepatócito, enquanto 80% da TGO está presente na mitocôndria. Em dano hepatocelular leve a forma predominante no soro é citoplasmática (TGP), enquanto em lesões graves há liberação da enzima mitocondrial (BERTOLAMI, 2005; MOTTA, 2009; AQUINO, 2011; AQUINO, 2012). Na fase tóxica aguda a TGP, geralmente, apresenta atividade maior que a TGO (MOTTA, 2009; MICHAEL et al, 2010).

TGP é uma enzima indicativa de lesão hepática aguda, uma vez que sua localização celular é citoplasmática. Assim sendo, num primeiro sinal de lesão hepática a primeira enzima a ser liberada dos hepatócitos é a TGP (BERTOLAMI, 2005; MOTTA, 2009; AQUINO, 2012).

As dosagens das enzimas transaminases (TGP e TGO) são importantes indicadores de lesão celular hepática. Estas enzimas estão amplamente distribuídas em vários tecidos e podem fornecer uma avaliação quantitativa do grau de dano sofrido pelos hepatócitos. Este estudo sugere que o EESVCe não provocou dano hepático nos animais submetidos à dose de 2.000 mg/Kg, uma vez que não houve diferença estatística entre as dosagens dos grupos de doses e do grupo controle.

A esteatose hepática (EH) ou fígado gorduroso apresenta significado clínico quando o acúmulo de lipídeos nos hepatócitos representa mais de 5% do peso deste órgão. Como a esteatose promove lesões hepáticas é, portanto, considerado um dos fatores que mais causa doenças hepáticas (PINTO et al. 2012)

Pode-se dizer, contudo, tendo em vista os resultados estatísticos obtidos, que as alterações observadas nas análises histopatológicas relacionadas ao acúmulo de lipídeos (EH) e às RI nas células do fígado, encontrado nos animais estudados, provavelmente foram provocadas pelo uso do extrato. Porém, as correlações com as dosagens bioquímicas aqui analisadas sugerem que as alterações encontradas não são capazes de desenvolver uma sintomatologia clínica.

Quanto aos demais parâmetros bioquímicos, tem-se a fosfatase alcalina (ALP), uma enzima que é sinalizadora da ocorrência de colestase (fluxo biliar prejudicado). Como consequência, essa colestase pode desencadear um aumento dos níveis séricos em

até 10 vezes (SANTOS et al., 2008). A proteína total, a qual avalia a concentração das proteínas presentes na corrente sanguínea em sua totalidade, também serviu de parâmetro para avaliar a possível hepatotoxicidade provocada pelo EESVCe. Ainda nesse contexto, dispõe-se da dosagem sérica da albumina (proteína produzida pelo fígado) também como indicador da capacidade funcional hepática (SCHINONI, 2006). Desta forma, uma diminuição da concentração de albumina nos níveis séricos do sangue é indicativa de doença hepatocelular, pois evidencia carência da produção desta proteína pelo fígado (MORIM, 2004; BROCK, 2016). O que não pôde ser observado neste estudo, uma vez que as dosagens entre os grupos não demonstraram diferença e apresentaram-se dentro dos parâmetros normais, como se observa na Tabela 7.

Já no órgão rim dos animais do grupo tratado, nenhuma alteração histopatológica foi observada, quando comparado com os animais do grupo controle (Figura 17). Assim como os valores de peso relativo dos dois órgãos avaliados (fígado e rim) não diferiram estatisticamente entre os dois grupos de animais, demonstrando que nenhum desses órgãos avaliados foram alterados macroscopicamente pelo tratamento com o extrato (Tabela 5).

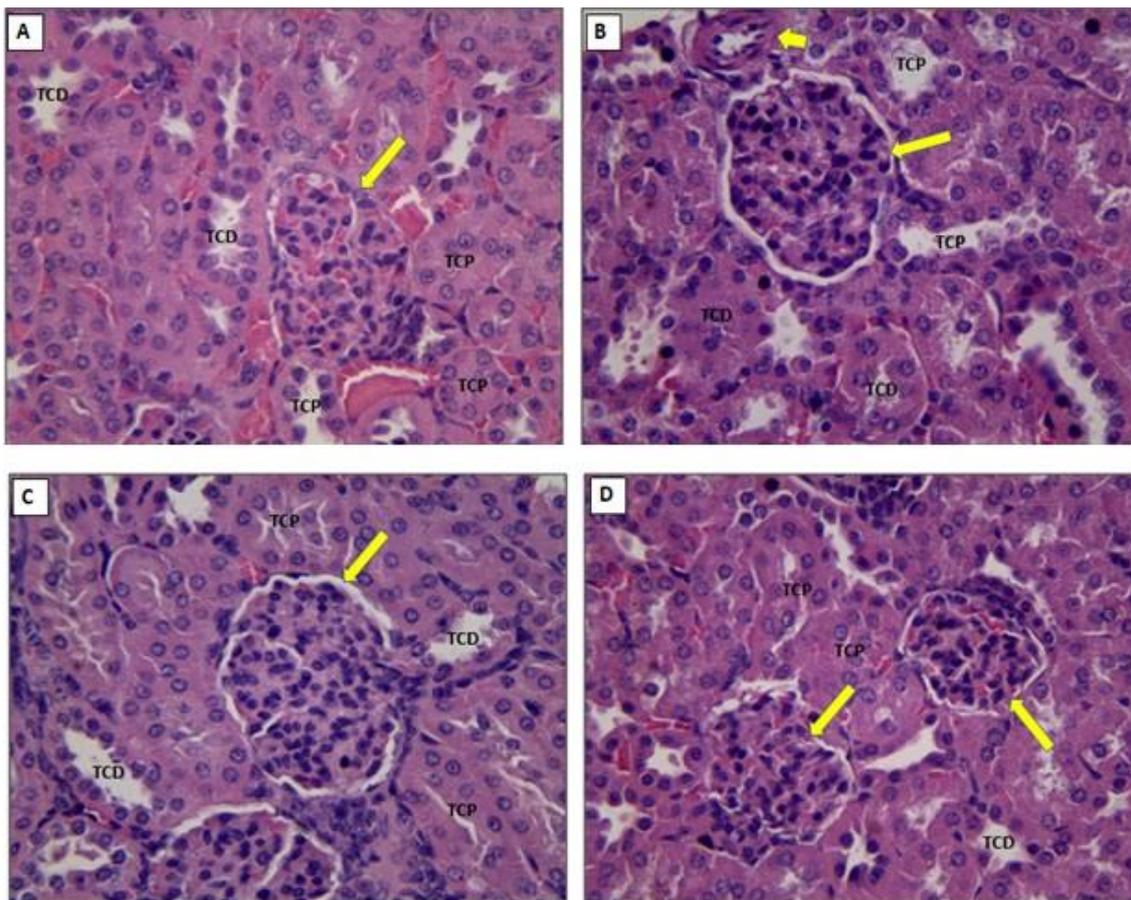


Figura 17. Grupo controle: A e B. Córtex renal apresentando corpúsculos renais (setas longas), arteríola (seta curta), túbulos contorcidos proximais (TCP) e distais (TCD) preservados. **Grupo tratado: C e D.** Córtex renal apresentando corpúsculos renais (setas longas), túbulos contorcidos proximais (TCP) e distais (TCD) sem alterações morfológicas. Coloração H.E. AU 400X.

O analito bioquímico ureia é produto final do metabolismo protéico de compostos nitrogenados. É excretada pelos rins e cerca de 40% é reabsorvida pelos túbulos renais, por isso é parâmetro de avaliação da função renal (SODRÉ, 2007). Na prática clínica, uréia e creatinina são consideradas os marcadores da função glomerular renal. Contudo tem sido mais amplamente utilizadas para a avaliação da filtração glomerular, visto que outros, como a medição da uréia plasmática, são influenciadas por fatores relacionados ao metabolismo de nitrogênio, como ingestão calórica e protéica, catabolismo protéico excessivo, causado por trauma, infecção e febre (RIELLA, 1996; SODRÉ, 2007; MOTTA, 2009). Este dado deve ser associado a outros parâmetros de avaliação da função renal para ser mais bem elucidado.

Já a creatinina é um metabolito produzido nos músculos, a qual é sintetizada a partir da creatina ou da fosfocreatina. Aproximadamente 1,6% a 1,7% da creatina é transformada em creatinina por dia, e é logo em seguida excretada pelo rim (JOHNSON, 2008; DUSSE, 2017). Diante disso e também por sua produção não ser

influenciada pelo metabolismo protéico ou outros fatores externos, a concentração da creatinina sérica é uma excelente medida para avaliar a função renal (SODRÉ, 2007; MOTTA, 2009). Qualquer circunstância que reduza a velocidade de filtração glomerular promove uma alteração na excreção urinária de creatinina, diminuindo a sua eliminação e conseqüentemente aumentando a sua concentração plasmática (MOTTA, 2009).

De acordo com os dados obtidos nesse estudo, o extrato etanólico da associação das sementes e vagens de *Caesalpinia echinata* quando administrado por via oral, enquadra-se na Classe 5, pois a estimativa da DL 50 foi superior a 2000 mg/kg, sendo considerado de baixa toxicidade de acordo com o método de classes preconizado pela OECD 423 (OECD, 2001).

Resultado semelhante foi descrito por BASTOS et al. (2011), que classificaram como baixa toxicidade o extrato etanólico de flores de *Caesalpinia echinata*, quando administrado por via oral, pois o mesmo não causou óbito até a dose limite de 5.000 mg/kg sobre camundongos swiss *Mus musculus*. Da mesma forma, Silva (2006), detectou que o extrato etanólico do cerne de *C. echinata*, quando administrado por via oral foi atóxico até a dose de 4.000 mg/Kg.

Segundo HURST (1942), o nível tóxico de uma planta pode variar conforme fatores ambientais. Esses fatores incluem área geográfica, clima e condições de crescimento, sendo que em algumas plantas pode ser totalmente ausente. Porém, essa toxicidade também pode ser inerente à composição química da planta (OELRICHS et al., 1985).

No presente estudo, a próxima dose a ser testada seria a de 5000 mg/kg, no entanto, a avaliação dessa dosagem somente é sugerido em casos excepcionais que justifiquem a sua necessidade. Visto que, alterações em doses muito elevadas podem ocorrer por descompensação do organismo avaliado e não necessariamente por uma ação tóxica específica.

O grupo tratado não apresentou diferença com relação ao grupo controle, sugerindo que não houve alteração na função renal dos animais deste grupo. Correlacionando os dados de função renal desta dose, não há evidências de comprometimento renal associado aos efeitos do extrato estudado.

A toxicidade de uma substância por via oral pode ser classificada como extremamente tóxica ($DL50 \leq 25$ mg/kg), altamente tóxica ($DL50 100 - 500$ mg/kg), mediamente tóxica ($DL50 500 - 2000$ mg/kg) e pouco tóxica ($DL50 > 2000$ mg/kg) (ZANETTI et al., 2003).

Silva 2012, ao investigar o potencial tóxico agudo do extrato etanólico das sementes de *C.echinata*, quando administrado pela via intraperitoneal, classificou o referido extrato como de baixa toxicidade. No estudo de Silva 2012, também não foi possível calcular a DL50, corroborando com o resultado encontrado nesse estudo.

4.3. ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.3.1 Atividade Anti-inflamatória

Os dados obtidos demonstram que o extrato etanólico da associação de sementes e vagens de *C. echinata* não possui efeito anti-inflamatório (figura 18), pois o extrato não foi capaz de impedir a produção de neutrófilos, os quais deslocam-se para o exsudato.

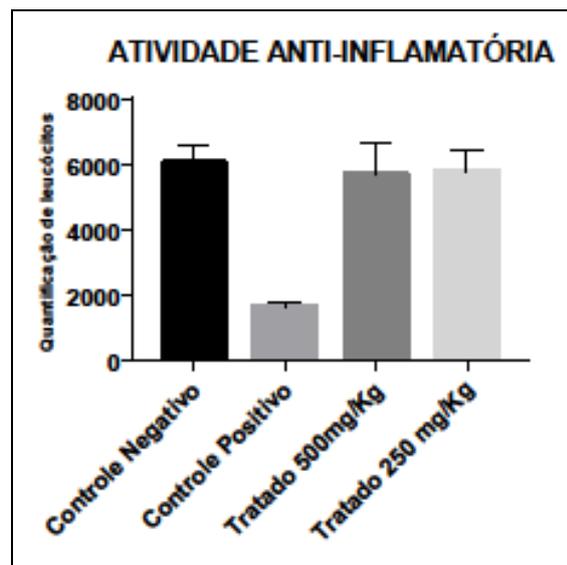


Figura 18 Atividade Anti-inflamatória - modelo bolsão de ar

O ensaio de bolsão de ar é um importante teste para estudar a inflamação aguda. A administração de carragenina por via subcutânea, na bolsa de ar induz uma rápida resposta inflamatória caracterizada pelos altos níveis de prostaglandinas e leucotrienos no exsudato presente. A carragenina é amplamente utilizada por induzir a migração de neutrófilos e por ter uma intensa ação quimiotática, desencadeando uma inflamação aguda associada à hiperalgesia envolvendo liberação sequencial de vários mediadores inflamatórios, como por exemplo, histamina, serotonina, cininas, prostaglandinas e tromboxanos (SCOGNAMILLO-SZABÓ, BECHARA; CUNHA, 2005, ROCHA et al., 2007).

O modelo de inflamação de bolsa de ar induzido por carragenina é caracterizado pela elevação da permeabilidade vascular com produção de mediadores inflamatórios incluindo prostaglandinas além do influxo de leucócitos polimorfonucleares no exsudato (JAIN; PARMAR, 2001).

Embora não seja evidenciado na literatura a utilização do extrato etanólico contendo a associação de sementes e vagens em testes de atividades anti-inflamatória, outros autores estudaram outras partes da espécie frente ao referido teste. Assim, GOMES e colaboradores (2014) utilizaram-se do extrato etanólico da casca de *C. echinata* para avaliar a propriedade antiangiogênica deste espécime através do modelo angiogênese inflamatória em córneas de ratos. Essa equipe obteve resultados promissores quanto à redução no número de novos capilares, apresentando atividade inibitória de 77.49%, evidenciando que o extrato foi capaz de reduzir a resposta angiogênica inflamatória. Esses autores relatam que a casca de *Caesalpinia echinata* Lam. (Fabaceae), apresenta uma ampla gama de polifenóis, em flavonóides em particular (brazilin e seus derivados brazilein), além de ligninas e concentrações mais baixas de taninos e cumarinas. Os autores também afirmam que pode ser que essa ampla e diversificada gama de polifenóis, desempenha um papel importante na modulação da expansão sistemas angiogênicos.

As classes de compostos flavonóides, taninos e cumarinas também foram encontrados no estudo fitoquímico realizado pela CCD, neste trabalho. A diferença encontrada entre os resultados obtidos por Gomes e colaboradores (2014) e o presente estudo, pode estar associado com as concentrações dos metabólitos nas diferentes partes das plantas.

4.3.2 Atividade Antifúngica

Foi possível verificar que não houve atividade antifúngica do extrato etanólico da associação das sementes e vagens de *Caesalpinia echinata* frente às cepas do gênero *Candida* testadas, pois não houve crescimento do halo de inibição.

Quanto ao teste da suscetibilidade de fungos filamentosos pelo método de microdiluição em caldo, o EESV_{Ce} apresentou CMI de 200 µg/mL para o fungo *Trichophyton mentagrophytes*. Porém para o *Trichophyton rubrum* não houve atividade.

A técnica de difusão em disco de papel baseia-se na inibição do crescimento do microrganismo, seguindo-se da formação de um halo de inibição, na superfície do meio de cultura sólido semeado com o microrganismo-teste. O halo inibitório projeta-se ao redor de um disco de papel filtro impregnado com a substância em estudo. Este método informa se o

microrganismo é sensível ou resistente a uma determinada substância numa concentração conhecida (KONEMAN et al. 2001).

Holetz et AL; (2002) e Regasini et AL. (2010) propuseram uma classificação para produtos vegetais com base nos resultados de CMI. Esta classificação considera que extrato de plantas com atividade antimicrobiana com valores de CMI menores que 100 µg/mL têm atividade antimicrobiana promissora. Extratos de plantas com CMI entre 100-500 µg/mL possuem atividade moderada, acima de 500 até 1000 µg/mL, a atividade é considerada fraca e superior a 1000 µg/mL são considerados inativos.

Já Aligianis et AL. (2001), considerou como forte inibição CMI até 500 µg/mL, inibição moderada entre 600 e 1500 µg/mL e fraca inibição CMI acima de 1600 µg/mL.

De acordo com os autores citados, o EESV*Ce* apresentou moderada a forte atividade antimicrobiana frente a espécie *Trichophyton mentagrophytes*.

Este é o primeiro relato de atividade antifúngica de *Caesalpinia echinata* na literatura.

Não foi possível comparar os resultados obtidos pelo método de microdiluição em caldo dos extratos de *C. echinata*, já que ainda não existem estudos publicados demonstrando as CMIs deste extrato pelo mesmo método.

3 CONCLUSÃO

O extrato etanólico da associação das sementes e vagens de *Caesalpinia echinata* demonstrou moderada toxicidade frente à *Artemia salina* e baixa toxicidade frente a camundongos *Mus musculus*. Além disso, o referido extrato não apresentou atividade anti-inflamatória. E a pesar de não ter apresentado atividade anti fúngica contra fungos leveduriformes, apresentou atividade contra fungos da espécie *Trichopyton mentagrophytes*. Este é o primeiro relato envolvendo a associação de partes de *Caesalpinia echinata* destinado a estudos fitoterápicos. Esse trabalho fornece dados importantes, contribuindo com futuras pesquisas para o possível desenvolvimento de medicamentos à base de *Caesalpinia echinata*, além de melhorar o conhecimento científico sobre o referido espécime.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F., SILVA, K. N., BASÍLIO, I. J. L. D., FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. **Survey of medicinal plants used in the region Northeast to Brazil**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 8, n.3, p. 472- 508, 2008.
- AGUIAR, E. **Medicina: uma viagem ao longo do tempo**. 243p., 2010. Disponível em: <<http://www.dominiopublico.gov.br/download/texto/ea000722.pdf>> Acesso em 01/11/2018.
- AHMAD, A. et al. Antifungal activity of *Coriaria nepalensis* essential oil by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **Yeast**, v. 28, p. 611-617, 2011.
- AKAH, P.A.; OFFIAH, V.N. Gastrointestinal Effects of *Allamanda cathartica* Leaf Extracts. **International Journal of the Pharmacognosy**, v. 30, n. 3, p. 213-217, 1992.
- ALVES, L. F. **Plantas Medicinais e Fitoquímica no Brasil: Uma Visão Histórica**. 2010. 383 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de História das Ciências e das Técnicas e Epistemologia, Rio de Janeiro.
- ALVES, L. F. Produção de Fitoterápicos no Brasil: História, Problemas e Perspectivas. **Revista Virtual de Química**, v.5, n.3, p. 450-513, 2013.
- BARROS, S. B. M. B.; DAVINO, S. Avaliação da Toxicidade. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2008.
- BASTOS, I.V.G.A. **Avaliação da atividade farmacológica de *Caesalpinia echinata* Lam. (FLORES)**. 2011. 99 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P.; Flavonóide Quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alim. Nutr**, v.15, n.13, p.285-292, 2004.
- BERG, J. M. T.; LUBERT, J. **Bioquímica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 545p, 2008.
- BERTOLAMI, M. C. Mecanismos de hepatotoxicidade. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, n. 5, p. 25-27, 2005.
- BEVILACQUA, M.P.; NELSON, R.M.; MANNORI, G. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. **An. Rev. of Medicine**, v. 45, p. 361-378, 1994.
- BOHM H, BOEING H, HEMPEL J, RAAB B, KROK A. Flavonols, Flavone and anthocyanins as natural antioxidants of foods and their possible role in the prevention of chronic diseases. **Z. Ernährungswiss**, v. 37, n. 2, p. 147-63, 1998.

BRUNEAU, A.; FOREST, F., HERENDEEN, P.S.; KLITGAARD, B.B.; LEWIS, G.P. Phylogenetic relationships in the Caesalpinioideae (Leguminosae) as inferred from chloroplast trnL intron sequences. **Systematic Botany**, v. 26, n.3, p. 487-514, 2001.

BUENO, E. Pau-brasil: uma biografia. In **Pau-Brasil** (E. Bueno, ed.). Axis Mundi Editora, São Paulo, p.39-76, 2002.

CARVALHO, P. E. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, v.1, 1093 p, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLSI document M44-A2 Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline.. 2nd ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Referencemethod for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. M27-S44 th Ed. 2012.

CUNHA, L. C.; MELO, D.F.A.; PEREIRA, M.E.; MELO, D.S.; PARENTE, L.L.; SILVA, M.A.C.; CONCEIÇÃO, E.C.; GONZAGA, L.Q.S. Avaliação da toxicidade aguda do extrato aquoso de *Apeiba tibourbou* Aubl (Tiliaceae), em camundongos e ratos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 3, p 357-362, 2013.

DIXON, R. A.; DEY, P. M.; LAMB, C. J. Phytoalexins: enzymology and molecular biology. **Advances in enzymology and related areas of molecular biology**, v. 55, London: England, 1983.

DUCKE, A. As leguminosas de Pernambuco e Paraíba. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 51, p. 417-461. 1953.

DUSSE, L.M.S.; RIOS, D.R.A.; SOUSA, L.P.N.; MORAES, R.M.M.S.; DOMINGUETI, C.P.; GOMES, K.B. Biomarcadores da função renal: do que dispomos atualmente? *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 49, n.1, p. 41-51, 2017.

ELLIS, L.; GILSON, V.; SOO, C.C.; MORRIS, C.J.; KIDD, B.L.; WINYARD, P.G. Activation of the transcription factor NF-kappaB in the rat air pouch model of inflammation. **Ann Rheum Dis**, v. 59, n. 4, p. 303-7, 2000.

FERNANDES, J. M.; GARCIA, F. C. P. Leguminosae em dois fragmentos de floresta estacional semidecidual em Araçuaia, Minas Gerais, Brasil: arbustos, subarbustos e trepadeiras. **Rodriguésia**, v. 59, n.3, p. 525-546, 2008.

FERRANDIZ, M.L.; ALCARAZ, M.J. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Agents Actions**, v.32, n. 3-4, p.283-8, 1991.

FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. Controlling inflammation: a fat chance? **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 5, p. 671 – 674, 2005.

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

GICHNER, T.; POSPÍŠIL, F.; VELEMÍNSKÝ, J.; VOLKEOVA, V.; VOLKE, J. Two types of antimutagenic effects of gallic and tannic acids towards N-nitroso-compounds-induced mutagenicity in the Ames Salmonella Assay. **Folia microbiologica**, v. 32, n. 1, p. 55-62, 1987.

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

GOMES, E.C.B.S. Evaluation of Antioxidant and Antiangiogenic Properties of *Caesalpinia Echinata* Extracts. **Journal of Cancer**, v.5, n.2, p.143-150, 2014.

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

GROOT, H.; RAUEN, U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 12, v.3, pp. 249-55, 1998.

Haida, K. S.; Parzianello, L.; Werner, S.; Garcia, D. R.; Inácio, C. V. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 11, n.3, p. 185-192, 2007.

HARAGUCHI, L. M.M.; CARVALHO, O.B.; **Plantas Mediciniais**. 1 ed., São Paulo: Secretaria Municipal do Verde e do Meio Ambiente, 248p, 2010.

HASLAM, E. **Plant Polyphenols, Vegetable Tannins Revisited**. Cambridge University Press, Cambridge, 230p, 1989.

IKEDA, Y.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H. Ursolic acid: na anti- and pro-inflammatory triterpenoid. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52, n. 1, p. 26-42, 2008.

JAIN, M.; PARMAR, H. S. Evaluation of antioxidative and antiinflammatory potential of hesperidin and naringin on the rat air pouch model of inflammation. **Inflamm Res**, v. 60, n. 5, p. 483-91, 2011.

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

HURST, E. **Poisonous plants of New South Wales**. Plants Committee, NSW, Sydney, 342p. 1942.

JOHNSON, A.M. Aminoácidos e proteínas. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. **Fundamentos de Química Clínica**. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p. 295-325.

KIM, D. O.; LEE, K. W.; LEE, H. J.; LEE, C. Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 50, n.13, p. 3713-3717, 2002.

KLAASSEN, C.D.; EATON, D.L. Principles of Toxicology. In: AMDUR, M.O.; DOULL, J.; KLAASSEN, C.D. (Eds.). Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. 8 ed. New York: McGraw-Hill Inc, 1424p, 2013.

KOLACZKOWSKA, E. ; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat Rev Immunol.**, v.13, n. 3, p. 159–175, 2013

LARONE, D.H. Culture and identification of Dermatophytes. **Clinical Microbiology Newsletter.** V. 18, n. 5, p. 33-40, 1996

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica.** 9. Ed. Rio de Janeiro: Sarvier, 1104p, 2002.

LEITE, J.P.V. **Química dos produtos naturais: Uma abordagem Biossintética.** In: Leite, J.P.V. Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas. 1. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 328p, 2009.

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

LEWIS, G.; SCHIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the World.** The Royal Botanic Gardens, Kew, 577p, 2005.

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

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

LIMA, H.C. **Paubrasilia in Flora do Brasil 2020 em construção.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB602728>. Acesso em: 29 Jan. 2019

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

LOCATELLI, C.; FILIPPIN-MONTEIRO, F. B.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: a review. **Eur J Med Chem**, v. 60, n.1, p. 233-9, 2013.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivos de plantas arbóreas nativas do Brasil.** 3 ed. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 145 p, 2000.

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

MACLACHLAN, N. J., CULLEN, J. M. Fígado, Sistema Biliar e Pâncreas exócrino. In: Carlton, W.W., McGavin, M.D. **Patologia Veterinária Especial.** 2.ed. Artmed, São Paulo, p.95-131, 1998.

MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, 2009.

MELLO, J. C.P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre: Ed.UFRGS/Ed.UFSC, 2001. cap. 24, p.517-543.

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; McLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medida**, v.45, n. 5, p.31-34, 1982.

MIDDLETON Jr. E. Effect of Plant Flavonoids on Immune and Inflammatory Cell Function Flavonoids in the Living System. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. V. 439, n. 1, p 175-182, 1998.

MIDDLETON JUNIOR, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacol Rev**, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000.

MILLS, S. e BONE, K. **Principles and Practice of Phytotherap**. Churchill Livingstone. Edinburgh, 2 ed., 1051 p, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Política e Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**, 1 ed., Brasília:Ministério da saúde, p.190, 2016.

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; NETO, E.M.F.L.; ARAÚJO, E.L.; ALBUQUERQUE, M. M.; AMORIM, E.L.C. The effects of seasonal climate changes in the Caatinga on tannin levels in *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. and *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, n. 3, p.338-344, 2006.

MOSQUINI, A. F.; ZAPPA, V.; MONTANHA, F. P. Características dos aintinflamatórios não esteroidais – Revisão de Literatura. **Revista eletrônica de Medicina Veterinárias**, v. 9 , n. 17, p. 1-7, 2011.

MOTTA, V.T. **Bioquímica para o laboratório, princípios e interpretação**. 5ª ed. Rio de Janeiro, Medbook Ed, 400 p. 2009.

MURATA, K.; YOSHITOMI, H.; FURU, M.; ISHIKAWA, M.; SHIBUYA, H.; ITO, H.; MATSUDA, S. MicroRNA-451 down-regulates neutrophil chemotaxis via p38 MAPK. **Arthritis Rheumatol**, v. 66, n. 3, p. 549-59, 2014.

MUSCHIETTI, L.V.; MARTINO, V.S. Atividades biológicas dos flavonóides naturais. In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 2 ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, p.189-218, 2009.

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

NCCLS- National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Método de Referência para Diluição de Caldo Teste de Susceptibilidade Antifúngica de Fungos Filamentosos**, norma M38-A2, 2 ed. V. 28, n16, p 1- 62. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

NETO, P. A. S. P.; CAETANO, L. C. **Plantas Mediciniais: do popular ao científico**. Maceió: EDUFAL, 90p, 2005.

OELRICHS, P. B.; HILL, M. W.; VALLEY, P. J., MACLEOD, J. K., MOLINSKI, T. F. Toxic tetranortriterpenes of the fruit of *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 2, p. 531-534, 1985.

OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A.O. **Fundamentos de Toxicologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2014.

PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SARDIÑAS, I.G.; BUELA, L.I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acutotoxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n.5, p. 395- 400, 2001.

PEREIRA, F.E.L. Inflamações. In G.B. Filho (Ed.) **Patologia Geral**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004.

PERES, N.T.A.; MARANHÃO, F.C.A.; ROSSI, A.; MARTINEZ-ROSSI, N.M. Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n.5, p.657-667, 2010.

PERRETTI, M.; FLOWER, R.J. Cytokines, glucocorticoids and lipocortins in the control of neutrophil migration. **Pharmacol Res**, v. 30, n. 1, p. 53-59, 1994.

PINTO, A. S.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; LOPES, R. M. Flavonóides. **Biotechnologia, Ciência & desenvolvimento**, v.3, n.14. p.18-22, 2000.

PINTO, C. G. S., MAREGA, M., CARMONA, F. G., DAUREA, C., CARVALHO, J. A.M., FIGUEIRA, A. Esteatose Hepática e Estilo de Vida Ativo: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 20, n. 3, p. 125-134, 2012.

PIVETTA, M. Vida longa ao pau-brasil. **Revista Pesquisa FAPESP**, v.84, n.1, p.45-49, 2003.

PORTILHO, D.R.; DE MELO, I.A.; GUERRA, R.C.; BATISTA, H.L.; FERNANDES, C.H.C. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica da própolis produzida no estado do Tocantins. **Revista Científica do ITPAC**, v.6, n.2, 8p, 2013.

RANDAU, K. P.; FLORÊNCIO, D. C.; FERREIRA, C. P.; XAVIER, H. S. Pharmacognostic study of *Croton rhamnifolius* HBK and *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm.(Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 2, p. 89-96, 2004.

REICHLING, J.; SCHNITZLER, P.; SUSCHKE, U.; SALLER, R. Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties – an Overview. **Forsch Komplementmed**, v.16, n. 2, p. 79-90, 2009.

REZENDE, C. M.; CORRÊA, V. F. S.; COSTA, A. V. M.; CASTRO, B. C. S.; ALVES, R. J.V. Constituintes químicos voláteis das flores e folhas do pau-brasil (*Caesalpinia echinata*, Lam.). **Quím. Nova**, v. 27, n. 3, p 14-416, 2004.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, v.27, n.5, p. 771-780, 2004.

RIELLA CM. **Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrólíticos**. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Avaliação clínica e laboratorial da função renal; p. 268-75, 1996.

ROCHA, Y. T. Distribuição Geográfica E Época De Florescimento do Pau-Brasil (*Caesalpinia echinata* Lam. – Leguminosae). **Revista do Departamento de Geografia**, v.20, p.23-36, 2010.

ROCHA, W. S.; LOPES, R.M.; SILVA, D.B.; VIEIRA, R.F.; DA SILVA, J.P.; AGOSTINI-COSTA, T.S. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1215-1221, 2011.

ROCHA, F. A. G.; ARAÚJO, M. F. F.; COSTA, N. D. L.; SILVA, R. P. O uso terapêutico da flora na história mundial. *Holos*, v. 1, n. 31, p. 49-61, 2015.

RODRIGUES, K. A. D. F.; DIAS, C. N.; FLORÊNCIO, J. C.; VILA NOVA, C. M.; GONÇALVES, J. D. R. S.; COUTINHO-MORAES, D. F. Prospecção Fitoquímica e atividade moluscicida de folhas de *Momordica charantia* L. **Cadernos de Pesquisa**, v. 17, n. 2, 2010.

ROMANOVA, N. A.; BROVKO, L. Y.; MOORE, L. Assessment of photodynamic destruction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* by using ATP bioluminescence. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n. 11, p. 6393- 6398, 2013.

RUSSO, A.; ACQUAVIVA, R.; CAMPISI, A.; SORRENTI, V.; DI GIACOMO, C. Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. **Cell Biol Toxicol**, v.16, n.2, p. 91-8. 2000.

SANTOS, J.C.A.; RIET-CORREA, F.; SIMOES, S.V.D.; BARROS, C.S.L. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e eqüinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n.1, p. 1-14, 2008.

SCHINONI, M.I. Fisiologia hepática. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 76, n.1, p. 5-9. 2006

SCHMID-SCHONBEIN, G. W. Analysis of inflammation. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 8, p. 93-131, 2006

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

- SILVA, R.C. **Plantas medicinais na saúde bucal**. Vitória: Artgraf, 2001. 136 p.
- SILVA, D.I.S. **Avaliação de bioensaio das sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (in vivo e in vitro)**. 2012. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco. 2012.
- SILVEIRA, F. S.; MIOTTO, S. T. A. A família Fabaceae no Morro Santana, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil: aspectos taxonômicos e ecológicos. **R. Brás. Bioci.**, Porto Alegre, v. 11, n.1, p. 93-114, 2013.
- SODRÉ, F.L.; COSTA, J.C.B.; LIMA, J.C.C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **J. Bras. Patol. Med. Lab**, v. 43, n. 5, p. 1-9. 2007.
- SOUZA, J.M.; NETO, M.F.A.; PARTATA, A.K. Ação anti-inflamatória da nimesulida e seu grau de hepatotoxicidade. Revista científica do ITPAC, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2016.
- SPARG, S.G.; LIGHAT, M.E.; VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 2-3, p. 219-243, 2004.
- TSUCHIYA, H.; SATO, M.; MIYAZAKI, T.; FUJIWARA, S.; TANIGAKI, S.; OHYAMA, M.; IINUMA, M. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 50, n. 1, p. 27-34, 1996.
- TUCKER, S.C. Floral development in legume. **Plant Physiology**, v. 131, n.1, p. 911-926, 2003.
- VANDOOREN, J. et al. Intradermal air pouch leukocytosis as an in vivo test for nanoparticles. **Int J Nanomedicine**, v. 8, n.1, p. 4745-56, 2013.
- VENSON, R.; WIENS, A.; CORRER, C.J.; OTUKI, M.F.; GROCHOCKI, M.C.; PONTAROLLI, D.R.S.; PONTAROLO I, R. Avaliação econômica das anticitocinas adalimumabe, etanercepte e infliximabe no tratamento da artrite reumatoide no Estado do Paraná. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**. v. 21, n. 2, p. 359-376, 2011.
- YEH, M. M., Non alcoholic Fatty Liver Disease, in: Saxena, R., **Practical Hepatic Pathology. A Diagnostic Approach**, Elsevier, Philadelphia, p. 435-440, 2011.
- WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. 2 ed. Berlim: Springer Verlag, 384p, 1996.
- WEDMORE, C. V.; WILLIAMS, T. J. Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in flammation. **Nature**, v. 289, p. 646-650, 1981.
- WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R.C. The Dermatophytes. **Clinical microbiology reviews**, v.8, n.2, p. 240-259, 1995.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on Good Agricultural and Collection Practices (GACP) for Medicinal Plants**. World Health Organization, Geneva, Suíça, 2003.

ZAIA, H.A.B.A. Desenvolvimento floral de *Caesalpinia echinata* Lam., *C. peltophoroides* Benth. e *C. ferrea* var. *leyotachia* Benth. (Fabaceae/ Caesalpinioideae). 2004. 53 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2004.

ANEXOS

ANEXO A – REGISTRO DE COMPROVAÇÃO DO ESPÉCIME VEGETAL



HERBARIUM
82.205
UFP

 Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica
Herbário UFP – Geraldo Mariz

Nº: 82.205

Fam.: Fabaceae

Sp.: *Paubrasilia echinata* (Lam) Gagnon. H.C.Lima & G.P.Lewis

Nome vulgar: pau brasil

Col.: Silva, Y.K.; Neta, C.R.F.; Pereira, L.N.E. (01)
08/III/2017

Det.:

Proc.: BR. PE. Recife, campus da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Antibióticos, área externa (jardim).

Obs.: flores amarelas perfumadas.

ANEXO B – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL (CEUA)



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 Fones: (55 81) 2126 6940 | 2126 8351
 Fax: 2126 8350
 www.ccbi.ufpe.br

Recife, 19 de junho de 2017.

Ofício nº 48/17

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
 Para: **Prof.ª Ivone Antonia de Souza**
 Departamento de Antibióticos
 Universidade Federal de Pernambuco
 Processo nº 23076.022852/2017-26

Certificamos que a proposta intitulada **"Abordagem morfológica dos possíveis efeitos toxicológicos, na ação fungicida e nos processos inflamatórios, das sementes e vargens de Caesalpinia echinata- Modelos experimentais."** registrada com o nº23076.022852/2017-26 sob a responsabilidade de **Prof.ª Ivone Antonia de Souza** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 07/06/2017.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/07/2017 a 01/12/2018
Espécie/ linhagem/raça	Camundongos albinus Swiss (Mus musculus)
Nº de animais	32
Peso/idade	25g /60 dias
Sexo	Macho
Origem	Bioterio do Departamento de Antibióticos da Universidade Farmacologia da (UFPE).

Atenciosamente,
