



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

RENATHA CLAUDIA BARROS SOBREIRA

***Piptadenia stipulacea* (BENTH) Ducke:** investigação fitoquímica e ensaios
toxicológicos *in vitro* e *in vivo*

Recife
2019

RENATHA CLAUDIA BARROS SOBREIRA

***Piptadenia stipulacea* (BENTH) Ducke:** investigação fitoquímica e ensaios
toxicológicos *in vitro* e *in vivo*

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

Área de concentração: Morfotecnologia.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Sônia Pereira Leite.

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

Recife

2019

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

Sobreira, Renatha Claudia Barros
Piptadenia stipulacea (BENTH) Ducke : investigação fitoquímica e ensaios
toxicológicos in vitro e in vivo / Renatha Claudia Barros Sobreira. –2019.

61 f. : il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sônia Pereira Leite.
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Ivone Antônia de Souza.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Biociências. Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia, Recife, 2019.
Inclui referências e anexo.

1. Plantas da caatinga. 2. Plantas medicinais. 3. Toxicologia. I. Leite, Sônia Pereira (Orientadora). II. Souza, Ivone Antônia de (Coorientadora). III. Título.

634.909811

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2019 - 191

RENATHA CLAUDIA BARROS SOBREIRA

***Piptadenia stipulacea* (BENTH) Ducke:** investigação fitoquímica e ensaios
toxicológicos *in vitro* e *in vivo*

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

Aprovada em: 19/02/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Sônia Pereira Leite (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Juliana Pinto de Medeiros (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr.^a Sandrine Maria Arruda de Lima (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Ao meu pai, José Geraldo Monteiro Sobreira (*in memoriam*) e minha mãe Fátima Maria Barros Sobreira, por me permitirem ser uma criatura livre e por sempre sonharem os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por sempre me sustentar nos momentos difíceis em que pensei em desistir.

Aos meus pais José Geraldo Monteiro Sobreira e Fátima Maria Barros Sobreira pelo incentivo, dedicação e amor incondicional, meus maiores exemplos de humanidade.

À minha família, por sempre acharem que sou melhor do que eu realmente sou e por todos os momentos de distração e carinho.

Agradeço a minha orientadora, Prof^a Dr^a Sônia Pereira Leite pela disponibilidade e por seus ensinamentos acadêmicos e de vida.

À minha co-orientadora, Prof^a Dr^a Ivone Antônia de Souza pela disponibilidade e parceria com o Biotério do Departamento de Antibióticos – UFPE.

Ao colega João Bosco da Silva Júnior pela parceria com o Laboratório de Ecologia aplicada e Fitoquímica (LEAF) do Departamento de Botânica – UFPE.

Ao BIOFARMATOX – UFPE (Departamento de Antibióticos), através de parceria com o estimado Jhonathan Brito e seu grupo de pesquisa.

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA de Caruaru (Sítio Malhada Pedras) pela enorme ajuda na coleta do material botânico através do Senhor Ivan.

Ao Herbário Geraldo Mariz – UFPE pela catalogação da exsicata coletada.

À disponibilidade e apoio do colega Anderson do Departamento de Anatomia - UFPE pelas fotos das lâminas.

À Sandrine Arruda pela paciência e parceria no Laboratório de Histotécnica do Departamento de Histologia e Embriologia – UFPE.

Agradeço a todo o Corpo Docente pelo aprendizado nesses dois anos e também a todos os que fazem parte do Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia, por tornarem o meu desejo de ser Mestre realidade.

Agradeço a todos os meus colegas de turma pela convivência maravilhosa, por todos os ensinamentos, hoje me sinto uma pessoa melhor e todos contribuíram para isso.

Em especial agradeço aos meus amigos de laboratório: Tainá Maria, Marcos Aurélio, Geovana Guedes, Willams Alves, Thaís Emanuelle, vocês tornaram tudo mais leve.

“E conhecereis a verdade, e a verdade vos libertará.”
(BÍBLIA, João 8:32).

RESUMO

Piptadenia stipulacea ocorre no Nordeste brasileiro, especialmente na Caatinga e é popularmente conhecida como jurema branca. É usada popularmente por sua atividade anti-inflamatória, analgésica, regenerador de células, antitérmico e adstringente peitoral. De acordo com a literatura esta espécie não possui estudos anteriores então, buscando elucidar seu potencial biológico e também dar base científica a sua utilização, este estudo foi desenvolvido investigando-se a presença de compostos químicos majoritários no extrato etanólico das folhas de jurema branca e seus efeitos toxicológicos. Foi realizada a cromatografia em camada delgada (CCD) do extrato etanólico das folhas de *Piptadenia stipulacea* para a identificação de seus constituintes químicos e como estudos toxicológicos foram realizados a verificação da atividade hemolítica com eritrócitos de carneiro, a genotoxicidade e mutagenicidade frente à *Allium cepa* e a determinação da concentração letal média (CL₅₀) no ensaio com *Artemia salina* Leach., foi realizado também o ensaio de toxicidade aguda segundo o protocolo preconizado pela Organization for Economic Cooperation and Development (OECD, 423). Foram utilizados camundongos albinos Swiss fêmeas neste ensaio e após a administração oral do extrato foram observados parâmetros comportamentais, consumo de água e ração e após a eutanásia dos animais foram analisados os parâmetros hematológicos, bioquímicos e histomorfológicos renal e hepático. Os metabólitos secundários majoritários encontrados foram: taninos, saponinas, cumarinas, flavonoides e terpenos (em menor expressividade). Diante da avaliação toxicológica, a atividade hemolítica frente a eritrócitos de carneiro revelou ausência de toxicidade, apresentando percentual de hemólise inferior a 20%. Não foi constatada genotoxicidade diante do ensaio com *Allium cepa*, assim como não houve diferença significativa no índice mitótico dos meristemas submetidos às diferentes concentrações testadas do extrato etanólico em comparação com o grupo controle. O extrato estudado exibiu toxicidade moderada frente ao ensaio com *Artemia salina* Leach. O extrato etanólico das folhas de *Piptadenia stipulaceae* não provocou alterações comportamentais persistentes nem morte dos animais após sua administração oral, apenas observou-se redução no consumo de água pelo grupo tratado com o extrato em relação ao grupo controle. Para os parâmetros bioquímicos analisados houve apenas um aumento na concentração sérica de uréia nos camundongos tratados com o extrato (57,4±7,33) em relação ao grupo controle

(49,4±9,73). De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que o extrato estudado possui baixa toxicidade diante dos ensaios realizados, porém sugere-se o prosseguimento com estudos de atividades biológicas mais específicas.

Palavras-chave: *Piptadenia stipulacea*. Jurema branca. Metabólitos secundários. Toxicidade.

ABSTRACT

Piptadenia stipulacea occurs in northeastern Brazil, especially in the Caatinga and is popularly known as white Jurema. It is popularly used for its anti-inflammatory activity, analgesic, cell regenerating, antithermal and pectoral astringent. According to the literature this species does not have previous studies, so seeking to elucidate its biological potential and also give scientific basis its use, this study was developed investigating the presence of major chemical compounds in Ethanolic extract of the leaves of white jurema and its toxicological effects. The thin layer chromatography (CCD) of the ethanolic extract of the leaves of *Piptadenia Stipulacea* was performed for the identification of its chemical constituents and as toxicological studies were performed the verification of the hemolytic activity with Mutton erythrocytes, genotoxicity and mutagenicity against *Allium Cepa* and determination of the mean lethal concentration (LC50) in the assay with *Artemia Salina* Leach., the acute toxicity test was also performed according to the Protocol recommended by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD, 423). Female Swiss albino mice were used in this assay and after oral administration of the extract were observed behavioral parameters, water and feed intake and after the euthanasia of the animals were analyzed the hematological parameters, biochemical and Renal and hepatic histomorphologic findings. The majority of the secondary metabolites found were: tannins, saponins, coumarins, flavonoids and terpenes (less expressiveness). In view of the toxicological evaluation, the hemolytic activity in relation to sheep erythrocytes revealed absence of toxicity, presenting a percentage of hemolysis lower than 20%. No genotoxicity was observed before the *Allium cepa* assay, as there was no significant difference in the mitotic index of the meristems subjected to the different concentrations tested by the ethanolic extract compared to the control group. The studied extract exhibited moderate toxicity compared to the assay with *Artemia Salina* Leach. The ethanolic extract of the leaves of *Piptadenia Stipulacea* did not provoke persistent behavioral alterations nor death of the animals after oral administration, only a reduction in water consumption was observed by the group treated with the extract in relation to the group Control. For the biochemical parameters analyzed, there was only one increase in the serum urea concentration in the mice treated with the extract ($57.4 \pm 7,33$) in relation to the control group ($49,4 \pm 9,73$). According to the results obtained, we can conclude that the extract studied has low toxicity in relation to the

tests performed, but it is suggested to continue with studies of more specific biological activities.

Keywords: *Piptadenia stipulacea*. White jurema. Secondary metabolites. Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Coleta da planta em Caruaru – Recife/PE	28
Figura 2 –	Exsicata Depositada no Herbário Geraldo Mariz – UFPE	29
Figura 3 –	Extrato etanólico das folhas de <i>P. stipulacea</i> em rota – evaporador	30
Figura 4 –	Amostras de sangue de carneiro expostas às diferentes concentrações do EEtFP.s	32
Figura 5 –	Espécimes de <i>Allium cepa</i> postos para germinar em contato com o EEtFP.s. em diferentes concentrações	34
Figura 6 –	Cistos de <i>Artemia salina</i> em incubadora sob iluminação e aeração	35
Figura 7 –	Valores das médias do crescimento radicular de <i>A. cepa</i> submetidas à diferentes concentrações do EEtFP.s	40
Figura 8 –	Fotomicrografias das radículas de <i>A. Cepa</i> em diferentes fases de divisão celular	42
Figura 9 –	Taxa de mortalidade dos metanúplios em relação às concentrações do EEtFP.s.a que foram submetidos	43
Figura 10 –	Evolução ponderal dos animais do grupo controle e o grupo tratado com EEtFP.s. na dose de 2000mg/kg	44
Figura 11 –	Consumo de ração para os camundongos do grupo controle e o grupo tratado com EEtFP.s. na dose 2000mg/kg	44
Figura 12 –	Consumo de água para os camundongos do grupo controle e o grupo tratado com EEtFP.s. na dose de 2000mg/kg	45
Figura 13 –	Índice dos órgãos para os animais submetidos ao EEtFP.s. na dose de 2000mg/kg e grupo controle	47
Figura 14 –	Fotomicrografia representando a histologia de fígado de camundongos submetidos ao tratamento com EEtFP.s. na dose de 2000mg/kg	48

Figura 15 –	Fotomicrografia representando a histologia de rins de camundongos submetidos ao tratamento com EEtFP.s. na dose de 2000mg/kg	48
-------------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Fases móveis, reveladores e padrões utilizados na cromatografia de camada delgada	31
Tabela 2 –	Detecção de classes de substâncias químicas presentes no EEtFP.s. pelo método de cromatografia em camada delgada (CCD)	39
Tabela 3 –	Percentual de hemólise em eritrócitos de carneiro após tratamento com EEtFP.s. (µg/mL)	40
Tabela 4 –	Porcentagem do índice mitótico das radículas de <i>A. cepa</i> submetidas ao EEtFP.s. nas diferentes concentrações	41
Tabela 5 –	Parâmetros hematológicos de camundongos submetidos ao EEtFP.s. na dose de 2000mg/kg	46
Tabela 6 –	Valores bioquímicos dos grupos controle e tratado com EEtFP.s. na dose de 2000mg/kg	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CL ₅₀	Concentração Letal Média
EEtFP.s	Extrato etanólico das folhas de <i>Piptadenia stipulacea</i>
FGAL	Flavonóide de Galetina 3,6-dimetil éter
HCl	Ácido Clorídrico
IM	Índice Mitótico
IPA	Instituto Agrônômico de Pernambuco
et al.	e outro
LEAF	Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
OMS	Organização Mundial de Saúde
TGO	Transaminase Glutâmico-oxalacética
TGP	Transaminase Glutâmico-pirúvica
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
PA	Pró-análise

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 OBJETIVOS	19
1.1.1 Objetivo Geral	19
1.1.2 Objetivos Específicos	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 MATERIAL BOTÂNICO	26
3.2 COMITÊ DE ÉTICA.....	27
3.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO VEGETAL	30
3.4 INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICO.....	30
3.5 ENSAIOS TOXICOLÓGICOS	32
3.5.1 Fragilidade Osmótica	32
3.5.2 <i>Allium cepa</i>	33
3.5.3 Toxicidade frente à <i>Artemia salina</i> Leach	34
3.5.4 Toxicidade Aguda	36
3.5.4.1 Avaliação da Evolução Ponderal e do Consumo de Água e de Ração	37
3.5.4.2 Avaliação dos Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos	37
3.5.4.3 Avaliação dos Índices dos Órgãos	37
3.5.4.4 Avaliação Histológica.....	37
3.6 ANÁLISE DE DADOS	38
4 RESULTADOS.....	39
4.1 INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA.....	39
4.2 ENSAIOS TOXICOLÓGICOS.....	39
4.2.1 Fragilidade Osmótica	39
4.2.2 <i>Allium cepa</i>	40
4.2.3 Toxicidade Frente à <i>Artemia salina</i>	42
4.2.4 Toxicidade Aguda	43
4.2.4.1 Avaliação da Evolução Ponderal e do Consumo de Água e de Ração	43
4.2.4.2 Avaliação dos Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos	45
4.2.4.3 Avaliação dos Índices dos Órgãos	46

4.2.4.4 Avaliação Histológica.....	47
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS.....	55
ANEXO A – OFÍCIO N° 38/18.....	61

1 INTRODUÇÃO

É de longo tempo que se conhece o potencial curativo das plantas, e então estas se tornaram objeto de estudo científico no que concerne às suas variadas propriedades medicinais. É estimado que das 250 a 500.000 espécies de plantas superiores existentes no planeta, apenas 1% têm sido estudadas pelo seu potencial farmacológico (MELENDEZ E CAPRILES, 2006). As plantas são capazes de produzir grandes quantidades de diferentes substâncias tóxicas, visando sua defesa contra vírus, bactérias, fungos e animais predadores. Muitas dessas substâncias são responsáveis pelas suas propriedades medicinais e aromáticas que são utilizadas na medicina popular e despertam interesse científico pelas suas atividades biológicas.

As plantas medicinais têm sido utilizadas pelo homem desde o início da história, e são utilizadas, atualmente, como recursos para a medicina alternativa por grande parte da população mundial (CARNEIRO, 2014). O uso dessas ervas é feito na maioria das vezes por adultos e idosos que buscam complementar o tratamento de uma doença crônica e geralmente acreditam que as plantas medicinais são uma alternativa isenta de efeitos adversos (BRASIL, 2006).

Segundo a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) são consideradas plantas medicinais aquelas que possuam substâncias, ou classes de substâncias, responsáveis pela ação terapêutica (BRASIL, 2010). De acordo com a Organização Mundial de Saúde 80% da população mundial faz uso de algum tipo de erva medicinal (BRASIL, 2016).

A fitoterapia é uma forma de terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais, e suas formas farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas (BRASIL, 2006).

O Brasil é o país que detém a maior biodiversidade do planeta, em torno de 15% a 20%, do total mundial. Nesse sentido, nota-se que as plantas são matéria-prima para a produção de medicamentos e fitoterápicos (BRASIL, 2006). Para Carreiro et al (2018) produtos naturais têm sido importantes para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos.

Historicamente, produtos naturais têm desempenhado papel importante nos processos de descoberta e desenvolvimento de medicamentos, incluindo um papel fundamental na pesquisa farmacológica (NEWMAN e CRAGG, 2012). Desta forma, é

notório que os derivados de plantas são de importância científica, por contribuírem para muitos avanços na ciência e na indústria farmacêutica.

O gênero *Piptadenia* Benth. faz parte de um dos maiores grupos de leguminosas reconhecido como a subfamília Mimosoideae (LEWIS e ELIAS, 1981). *Piptadenia stipulacea* pertence a essa subfamília, sendo uma espécie arbórea de pequeno porte, nativa da Caatinga, amplamente distribuída na região Nordeste do Brasil com grande interesse comercial, econômico e ambiental para a região pelas suas características de uso múltiplo (MAIA, 2004).

Segundo Pereira et al. (2001), o comportamento de *P. stipulacea* reflete nitidamente os efeitos das perturbações a que uma vegetação foi submetida, mostrando-se bastante tolerante a elevados níveis de perturbação.

A espécie é conhecida popularmente por jurema branca (FABRICANTE; ANDRADE, 2007) e carcará (FLORENTINO; ARAÚJO; ALBUQUERQUE, 2007), sendo utilizada em marcenaria, construção civil, produção de estacas, lenha, carvão e na medicina caseira, em tratamentos de queimaduras e problemas de pele. A espécie possui potencial antimicrobiano, analgésico, regenerador de células, antitérmico e adstringente peitoral (MAIA, 2004). Suas sementes possuem teores altos de alcalóides e por isso são importantes em projetos fitoquímicos e farmacológicos (FISH et al., 1955; HOFMAN, 1959). É bastante utilizada como alimento por ovinos, caprinos e bovinos principalmente na estação seca quando não há pastagens para sua alimentação (BEZERRA, 2008).

Em parceria com a farmacologia, foi comprovado o potencial desta espécie, através dos estudos que apresentou atividade anti-inflamatória e antinociceptiva (QUEIROZ et al., 2010), além do efeito espasmolítico não seletivo em cobaias (MACÊDO et al., 2011).

No entanto, plantas utilizadas como medicamentos são xenobióticos, e como todo corpo estranho, os produtos de sua biotransformação são potencialmente tóxicos até que se prove o contrário (LAPA et al., 2002). Diante desse fato, este trabalho teve como objetivo a investigação fitoquímica e a avaliação toxicológica do extrato etanólico bruto das folhas de *P. stipulacea*. Levando-se em consideração o uso medicinal de uma espécie, com segurança, se faz necessário que a mesma seja estudada sob ponto de vista químico, farmacológico e toxicológico (RITTER et al., 2002).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Realizar estudo fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *P. stipulacea* e investigar a sua toxicidade.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Investigar a presença de metabólitos secundários majoritários no extrato etanólico das folhas de *P. stipulacea*;
- Avaliar a Fragilidade Osmótica do extrato etanólico das folhas de *P. stipulacea*;
- Avaliar o efeito do extrato etanólico das folhas de *P. stipulacea* frente *Allium cepa*;
- Avaliar a toxicidade do extrato etanólico das folhas de *P. stipulacea* frente à *Artemia salina*;
- Estudar os efeitos da toxicidade aguda do extrato etanólico das folhas de *P. stipulacea* em camundongos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke

A Fabaceae é uma das maiores famílias dicotiledôneas e de grande importância econômica (SOUZA e LORENZI, 2008), sendo apontada como uma das principais fontes para a produção de proteína vegetal, óleos, resinas, perfumes, tinturas, medicamentos, inseticidas, adubo, forragem para caprinos e por apresentar madeiras com grande valor comercial no mundo (JUDD et al., 1999). Muitas espécies da família são tipicamente utilizadas na alimentação, especialmente o amendoim (*Arachis hypogea*), ervilha (*Pisum sativum*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), soja (*Glycine max*) e tamarindo (*Tamrindus indica*). Além dos fins citados, várias espécies também são utilizadas como decorações ornamentais, sendo a principal família utilizada na arborização urbana no Brasil (SOUZA e LORENZI, 2008).

A família ainda é subdividida em três subfamílias: Caesalpinioideae (Leguminosae I), Mimosoideae ou Mimosaceae (Leguminosae II) e Papilionoideae ou Faboideae (Leguminosae II) (STATI et al., 2005; LEWIS et al., 2005). As Mimosoideae constituem-se a menor subfamília das Fabaceae, com espécies distribuídas nos trópicos, subtropicos e regiões de clima temperado, com gêneros e espécies representativas presentes no bioma da Caatinga, no nordeste brasileiro (SILVA e BARBOSA, 2000).

A Fabaceae é a família de maior ocorrência no país, com aproximadamente 2.694 espécies encontradas. Em seguida vêm a Orchidaceae, com cerca de 2.419 espécies, e a Asteraceae, com 1.966 espécies (FORZZA et al., 2010). A sua química é composta por várias classes de substâncias, destacando-se as classes dos flavonoides e alcaloides que são tidos como marcadores taxonômicos. Entre os flavonoides são encontrados flavonóis, flavonóis glicosilados, flavonas, isoflavonas, chalconas, entre outros. Entre os alcaloides encontram-se, entre outros aqueles derivados da fenilalanina, da tirosina e do triptofano (HARBORNE, 1971). No Brasil destacam-se as espécies dos gêneros *Mimosa*, *Acacia*, *Calliandra*, *Inga*, *Pithecellobium*, *Prakia*, *Piptadenia* e *Stryphnodendron*, muitos deles de valor medicinal (BARROSO, 1991).

O gênero *Piptadenia*, subfamília Mimosoideae/Mimosaceae, faz parte de um dos maiores grupos de leguminosas da subfamília (LEWIS e ELIAS, 1981), abrigando atualmente 33 espécies, 21 delas ocorrentes no Brasil (MORIM, 2010), encontradas nos estados no Amazonas, Bahia, Ceará, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul e São Paulo (CARDOZO, 2006). O gênero está distribuído em regiões tropicais e subtropicais, com centros de diversidade na Amazônia e na floresta Atlântica do Brasil (LEWIS et al., 2005; LUCKOW, 2005). O período de floração normalmente se estende de dezembro a março e o de frutificação de abril a julho, podendo ir até setembro em algumas espécies (MOURA e GARCIA, 2011).

Piptadenia stipulacea (Benth) Ducke. uma espécie arbórea de pequeno porte, nativa da Caatinga, amplamente distribuída na região Nordeste do Brasil, indo do Piauí até a Bahia; é de grande interesse comercial, econômico e ambiental para a região pelas suas características de uso múltiplo (MAIA, 2004). A espécie possui folhas alternas compostas bipinadas com 10-16 pares de pinas opostas e nectários foliares presentes. As flores em espigas simples, axilares, de cor alva, na extremidade dos ramos onde se encontram até três espigas por axila de folha. Seu fruto é uma vagem de cor castanho-pálido, com superfície ondulada nas áreas onde ficam as sementes. Contém 2-12 sementes pequenas livres, não carnosas, ovais de cor marrom por vagem. A madeira é de cor clara (BEZERRA, 2008). Segundo Pereira et al. (2001), o comportamento de *P. stipulacea* reflete nitidamente os efeitos das perturbações a que uma vegetação foi submetida, mostrando-se bastante tolerante a elevados níveis de perturbação.

É popularmente conhecida como “Jurema-branca” (FABRICANTE e ANDRADE, 2007, apud MACÊDO et al., 2014), “Jurema malícia-da-serra”, “Carcará”, “Calumbi” (FLORENTINO et al., 2007, apud MACÊDO et al., 2014) e “Rasga-beiço” (QUEIROZ et al., 2010).

O uso popular de *P. stipulacea* é relatado em diversas obras de literatura. Sendo utilizada em marcenaria, construção civil, produção de estacas, lenha, carvão e medicina caseira, em tratamentos de queimaduras e problemas de pele. É bastante utilizada como alimento por ovinos, caprinos e bovinos principalmente na estação seca quando não há pastagens para sua alimentação (BEZERRA, 2008).

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, estimada em cerca de 20% da flora mundial. Esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade (CALIXTO, 2003).

A espécie possui potencial antimicrobiano, analgésico, regenerador de células, antitérmico e adstringente peitoral (MAIA, 2004). Suas sementes possuem teores altos de alcaloides e por isso são importantes em projetos fitoquímicos e farmacológicos (FISH et al., 1955; HOFMAN, 1959).

O flavonóide galetina 3,6-dimetil éter (FGAL) é um flavonoide isolado das partes aéreas da *P. stipulacea* (CARREIRO et al., 2018; MACÊDO et al., 2014; QUEIROZ et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2015). Possui efeito tocolítico, que é a inibição da contração da musculatura lisouterina, o FGAL mostrou inibir contrações estimuladas por carbacol e ocitocina no útero de ratas (CARREIRO et al., 2018). Efeito espasmolítico, ou seja, provoca relaxamento da musculatura lisa, o FGAL foi testado em íleo de porquinho da índia, em aorta de ratos machos e em útero de rata, as contrações foram induzidas por diferentes substâncias e foi percebido que o FGAL mostra efeito espasmolítico não-seletivo (MACÊDO et al., 2011, VASCONCELOS et al., 2015), além disso também mostra efeito relaxante na traqueia (MACÊDO et al., 2014). E ainda tem ações antinoceptiva e anti-inflamatória, em experimento com ratos, a dor foi induzida por formalina e foi feito também o teste de peritonite induzido por zimosan A, provavelmente devido a ação antioxidante do flavanoide o FGAL mostrou atividade antinoceptiva, a atividade anti-inflamatória foi observada na fase aquosa do acetato de etila e do FGAL no teste de peritonite (QUEIROZ et al., 2010).

FITOQUÍMICA

Por ser o estudo dos componentes químicos de uma planta, a fitoquímica contribui para o processo de pesquisa com plantas medicinais, pois o conhecimento acerca dos compostos da planta estudada, sua constituição e sua função, é de suma importância para que haja uma comprovação dos efeitos curativos na medicina popular.

A fitoquímica realizada a partir dos resultados da pesquisa de Bezerra et al. (2011), o qual, eluiu a casca, cerne e as folhas da *P. stipulacea* em etanol P.A. por

72h, para a obtenção dos extratos resultou em: presença de taninos hidrolisáveis e condensados nos extratos da casca, do cerne e do caule, enquanto nas folhas foi ausente. Taninos são compostos responsáveis pelas atividades biológicas do caule da planta, a presença desse composto pode representar uma geração de alternativa antimicrobiana. (BEZERRA et al, 2011).

Extratos de casca, cerne e folhas apresentaram resultado positivo para antocianinas, antocianidinas, flavonoides, leucoantocianidinas, catequinas e flavonas. Apenas o extrato do caule apresentou resultado positivo para saponinas. A presença de alcaloides foi negativa para os extratos do caule, do cerne e da folha da *P. stipulacea*. (BEZERRA et al., 2011).

Avaliação nutricional: Teores de matéria seca 93,31%, matéria mineral 4,81%, proteína bruta 8,81%, fibra em detergente neutro 72%, energia bruta 4,4% das cascas de jurema-branca. (BEZERRA et al., 2011).

A casca e o caule da *P. stipulacea* apresentou atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *E. coli* e *S. aureus* na maioria das concentrações. Seus halos variando entre 9,5 – 6 mm, resultado inferior ao do antibiótico Vancomicina, cujo halo se apresenta em 9 mm. Outras partes da planta não apresentaram nenhuma atividade antimicrobiana (BEZERRA et al., 2011).

Determinados vegetais possuem a capacidade de apresentar atividades antimicrobianas por sua composição molecular. Sendo assim, a presença de taninos no extrato aquoso da casca do caule da *P. stipulacea* possui um caráter antibacteriano *in vitro* frente à *S. aureus* (DANTAS et al, 2016). Além disso, esses compostos presentes na jurema-branca possibilitam uma alternativa aos antibióticos tradicionais, já que há uma resistência dessa bactéria no tratamento de infecções (DANTAS et al., 2016).

ENSAIOS TOXICOLÓGICOS

A relevância do estudo sobre a toxicidade *in vitro* com organismos de potencial medicinal refere-se à característica de algumas substâncias possuírem a propriedade de inibir a ação de uma célula, causando morte ou efeito negativo na mesma (SEYFRIED, 2010). Segundo Silva (2017) a citotoxicidade caracteriza-se como um relevante mecanismo de avaliação toxicológica. Além disso, testes científicos cuja finalidade alerte para bioprospecção e também a descoberta de biomoléculas com

potencial terapêutico são imprescindíveis, pois, inclinam-se em ratificar a veracidade do uso e conhecimento popular de plantas medicinais (SEYFRIED, 2010).

O interesse da pesquisa nas alterações morfológicas das células consiste de uma importante ferramenta que contribui para avaliar a possível citotoxicidade das substâncias em diversos estudos (SILVEIRA, 2010). Os testes de citotoxicidade, frequentemente, são realizados *in vitro* simulando os processos que ocorrem *in vivo* (ARAÚJO, 2018), ainda que a influência dos processos fisiológicos não sejam as mesmas do tecido tegumentar.

FRAGILIDADE OSMÓTICA

O teste de fragilidade osmótica eritrocitária consiste em avaliar o potencial citotóxico de determinadas substâncias medicinais, evidenciando a capacidade das células resistirem a estresse osmótico (VELOSO, 2015). Considera-se ainda que os eritrócitos sejam mais suscetíveis aos agentes oxidantes, em razão de sua membrana conter lipídeos com ligações insaturadas e, por consequência, um elevado número de compostos sulfidril, altas concentrações de ferro e de oxigênio (MACEDO, 2010).

É notório que a facilidade das células em tornar resistente ao estresse osmótico se dá principalmente pela relação superfície/volume, sendo modificada nos variados distúrbios das hemácias (GÉRARD et al, 2017). A vantagem de se utilizar a membrana dos eritrócitos como modelo se deve ao fato da facilidade no controle da lise celular por medição espectrofotométrica do número de hemoglobina livre (PARAISO et al, 2017).

Sabendo que a hemólise consiste na quebra da membrana das hemácias, a fragilidade osmótica eritrocitária (FOE) estabelece a influência em teor qualitativo de substâncias sobre os eritrócitos (VELOSO, 2015).

Allium cepa

Testes toxicológicos permitem avaliar a biodisponibilidade de contaminantes em amostras; devido a sua importância biológica muitos desses testes têm sido desenvolvidos com uma grande variedade de organismos. Dentro dessa diversidade

de bioensaios toxicológicos está o teste de toxicidade aguda com bulbos de cebola, *Allium cepa*, que permite avaliar a inibição do crescimento das radículas da cebola, determinando fácil e rapidamente o efeito das substâncias orgânicas sobre o organismo vivo (RESTREPO et al., 2012).

O ensaio em *A. cepa* é uma ferramenta simples e útil para análises de genotoxicidade e mutagenicidade (FREITAS et al., 2017). O teste é caracterizado por ser de curta duração e possuir baixo custo, esse organismo possui cromossomos grandes e em pequena quantidade, dessa forma os danos cromossômicos e distúrbios do ciclo mitótico tornam-se visíveis (BORTOLUCI et al., 2015).

Este teste tem sido utilizado com sucesso na obtenção da genotoxicidade de extratos de plantas com efeitos medicinais, pois permite utilizar diferentes concentrações da planta em estudo, avaliando assim as alterações cromossômicas e as divisões celulares das raízes da cebola. Por ser um bioindicador de genotoxicidade em plantas medicinais, o pesquisador pode advertir a população sobre o consumo de determinado produto (BEZERRA & OLIVEIRA, 2016).

Artemia salina Leach.

Diversos bioensaios são feitos em laboratórios de produtos naturais com o intuito de selecionar e monitorar o estudo fitoquímico de extratos de plantas em busca de produtos bioativos (SIQUEIRA et al., 1998).

O bioensaio com *Artemia salina* Leach. (Artemiidae), constitui de um microcrustáceo cosmopolita de água salgada, que apresenta grande facilidade de reprodução, favorecendo, desta forma, seu uso em ensaios de toxicidade; podendo ainda indicar possíveis ações biológicas como anticancerígena, inseticida, moluscicida e antifúngica (ROSA et al., 2016).

A utilização do microcrustáceo *A. salina* L. nos testes de toxicidade aguda visa pesquisar a atividade biológica de extratos e frações de produtos naturais (MERINO et al., 2015). A toxicidade sobre *A. salina* L. é amplamente utilizada por apresentar algumas vantagens, como o baixo custo, a simplicidade e por não exigir técnicas assépticas (SIQUEIRA et al., 1998). Trata-se de um monitor conveniente para a citotoxicidade de produtos, além de ser um método rápido e sensível a substâncias tóxicas (MERINO et al., 2015).

A toxicidade com *A. salina* L. demonstra uma boa correlação com as atividades biológicas de grande interesse terapêutico como antitumoral, sendo dessa forma indicado na avaliação preliminar de extratos vegetais (SIQUEIRA et al., 2001 e ROSA et al., 2016).

TOXICIDADE AGUDA

Os testes de toxicidade são conduzidos antes de iniciar os ensaios farmacológicos e possibilitam uma avaliação preliminar das propriedades tóxicas de uma substância (PUCCI, 2009).

Conforme a legislação brasileira para registro de medicamentos fitoterápicos, os testes de toxicidade pré-clínica exigidos são estabelecidos pelo GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE FITOTERÁPICOS. Neste documento, consistem, dentre outros, os ensaios de toxicidade aguda e o de doses repetidas (longa duração), que devem ser realizados quando há indicação de uso contínuo ou prolongado em humanos (BRASIL, 2010).

Segundo o GUIA PARA A CONDUÇÃO DE ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DE TOXICOLOGIA E SEGURANÇA FARMACOLÓGICA NECESSÁRIOS AO DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS, publicado pela Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF da ANVISA em 2013, estudos de toxicidade de dose única (aguda) consistem por avaliar a toxicidade produzida por uma substância teste quando administrada em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas, seguido de observação dos animais por 14 dias após a administração (BRASIL, 2013).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BOTÂNICO

A espécie *P. stipulacea* (Benth.) Ducke foi coletada em Caruaru/PE, no sítio de Malhada de Pedra no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) no dia 02/03/2018. (Fig. 1). A exsicata foi depositada no Herbário Geraldo Mariz na Universidade Federal

de Pernambuco, Centro de Biociências/Departamento de Botânica sob o Nº83426 (Fig. 2).

3.2 COMITÊ DE ÉTICA

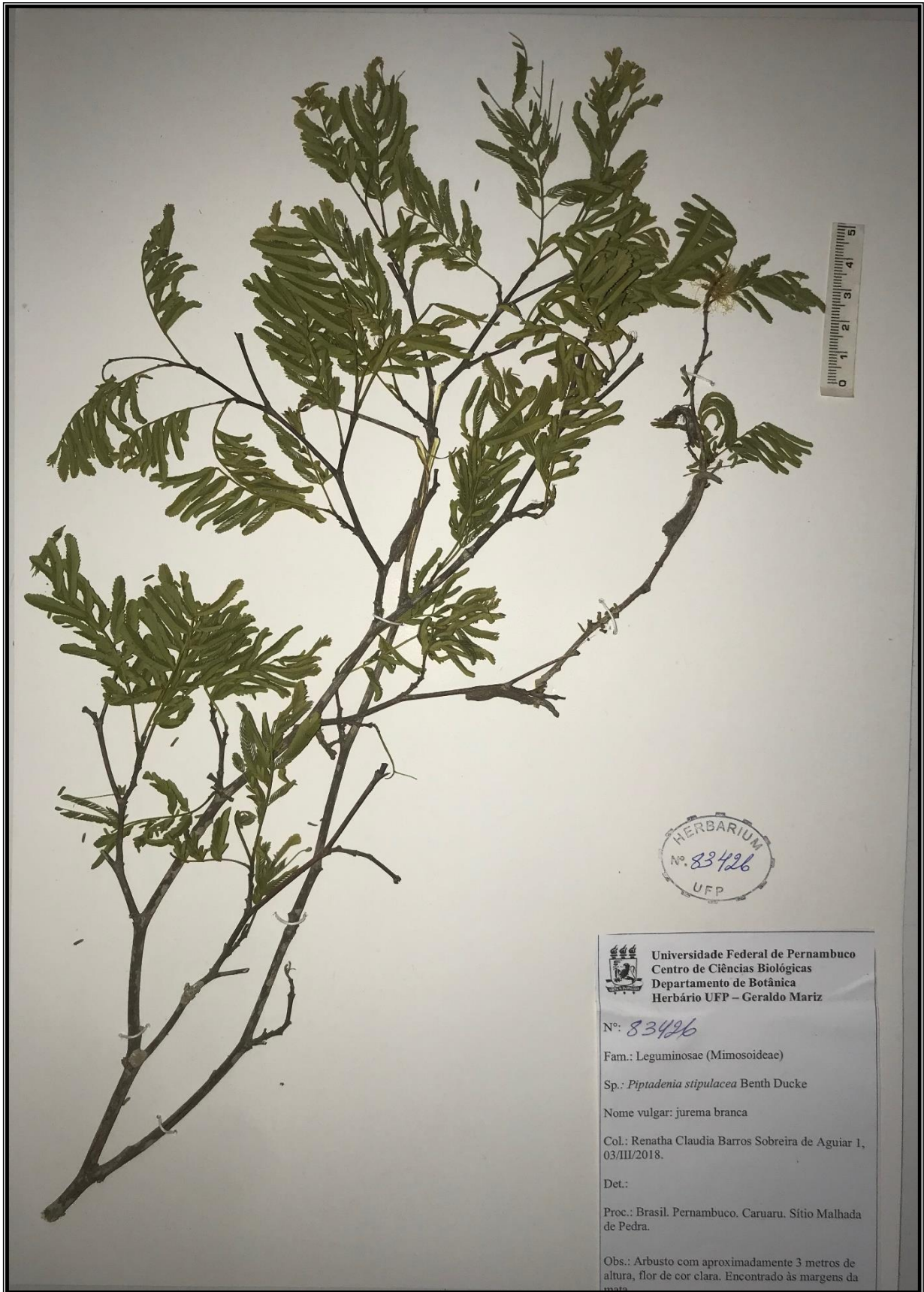
Este projeto foi aprovado pelo Comitê de ética no uso de animais da Universidade Federal de Pernambuco sob o Nº 0002/2018. E encontra-se em concordância com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – Art. 32 e decreto 3.179 – Art. 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Figura 1: *P. stipulacea* sendo coletada no Sítio Malhada de Pedra – Caruaru – Recife/PE em 02/03/2018.



Fonte: O autor (a)

Figura 2: Exsicata Depositada no Herbário Geraldo Mariz – UFPE



Fonte: Herbário Geraldo Mariz - UFPE

3.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO VEGETAL

As folhas de *P. stipulacea* foram pesadas (50 g), reduzidas a um menor tamanho em moinho de facas e a elas adicionado álcool etílico P.A. (500 ml), deixando-se a mistura sob extração por 72h. Após filtração e concentração em rota-evaporador (Fig. 3), foi obtido um material viscoso com rendimento de 36,86%, totalizando 18,43g de extrato bruto.

Figura 3: Extrato etanólico das folhas de *P. stipulaceae* em rota-evaporador.



Fonte: O autor (a)

3.4 INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICO

Perfil de cromatografia em camada delgada de *P. stipulacea* (CCD). O teste realizado seguiu os procedimentos estabelecidos por Wagner e Bladt (1996) com adaptações. Foram usadas cromatoplaças de alumínio TLC de sílica gel 60 F254 (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Foi feita análise qualitativa identificando as seguintes classes de metabólitos secundários: saponinas, taninos, flavonoides, cumarinas, terpenos e alcaloides. As fases móveis, reveladores e padrões utilizados estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Fases móveis, reveladores e padrões utilizados na cromatografia de camada delgada.

Classe	Fase móvel	Revelador	Padrão
Taninos	Clorofórmio: Metanol: Água (67:30:3)	FeCl ₃	Ácido Tânico
Alcalóides	-----	Reagente de Dragendorff	Brometo de escopolamina
Saponinas	Água	Espuma	Casca de <i>Zizipusjoazeiro</i> (juazeiro)
Terpenos	Tolueno:Acetato de Etila (93:7)	Anisaldeído + Aquecimento em estufa (100°C - 5min)	Lupeol
Cumarinas	Tolueno : Éter (1:1)	KOH 10% Etanol	Ácido p-cumárico Extrato clorofórmico de <i>Justiciapectoralis</i> (xambá)
Flavonóides	Acetato de Etila : Ácido Fórmico : Ácido Acético Glacial : Água (100:11:11:26)	Ácido Etilborilaminoéster (NEU)	Quercetina

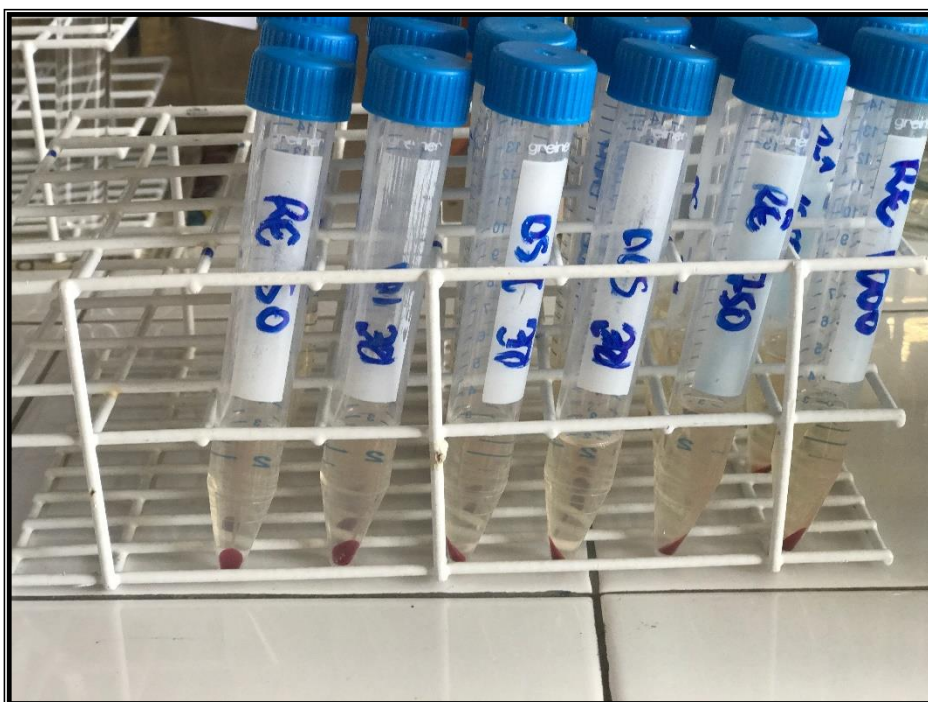
Com o auxílio de tubos capilares de vidro, os extratos foram aplicados nas cromatoplasmas formando manchas semelhantes e regulares. Todo o processo de análise fitoquímica foi realizado no Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica (LEAF) no Departamento de Botânica, do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco. Os aspectos considerados foram cor e altura da corrida nas cromatoplasmas antes e após exame com luz UV e mudanças de coloração com o uso de reveladores. Dependendo da tonalidade predominante, a cor da imagem em conjunto se define como vivamente colorida, pouco colorida ou muito pouco colorida.

3.5 ENSAIOS TOXICOLÓGICOS

3.5.1 Fragilidade Osmótica

A técnica de fragilidade osmótica foi realizada segundo a metodologia descrita por Dacie et al., (1975). Amostras de sangue de carneiro Laborclin® (25µL) foram expostas ao EEtFP.s., durante 30 minutos a temperatura ambiente em diferentes concentrações (50µg/mL, 100 µg/mL, 250µg/mL, 750 µg/mL e 1000µg/mL) diluídas em solução de cloreto de sódio 0,9% e centrifugadas à 2500rpm, por 3 minutos a 25°C, podendo ser observadas na figura 4. Foi utilizado como controle negativo solução de cloreto de sódio 0,9% e como controle positivo água destilada. O ensaio foi realizado em triplicata e o percentual hemolítico foi estabelecido de acordo com o controle positivo, que foi designado como 100%. Em seguida, o sobrenadante foi lido no espectrofotômetro bioplus com comprimento de onda 540nm, para obter a absorbância resultante.

Figura 4: Amostras de sangue de carneiro expostas às diferentes concentrações do EEtFP.s. após diluição em cloreto de sódio 0,9% e centrifugação.



Fonte: O autor (a)

3.5.2 *Allium cepa*

Foi realizada avaliação dos efeitos do EEtFP.s. frente à *Allium cepa*, conforme metodologia descrita por Guerra & Souza, 2002 com modificações referentes a utilização do corante. Os espécimes de *A. cepa* utilizados foram adquiridos em um mercado local e escolhidos de acordo com seu tamanho (aproximadamente 3,5cm de diâmetro) e peso (média de peso $\approx$ 63,7 gramas). As escalas externas e raízes antigas foram removidas com cuidado, e os bulbos foram lavados, secos e mantidos em geladeira a 4 °C até a início do experimento. O tratamento foi simultâneo, para cada concentração, incluindo o controle positivo, cinco bulbos foram usados por grupo. Os bulbos foram postos para germinar, por um período de sete dias a temperatura ambiente ($\approx$ 25°C), em frascos apropriados, com a parte inferior mergulhada em solução contendo 50 mL de água destilada (grupo controle) e os demais contendo 50 mL de água destilada com o extrato nas seguintes concentrações: 50mg/mL, 500mg/mL e 1000mg/mL, como pode ser observado na figura 5. No sétimo dia as raízes foram coletadas, medidas, lavadas em água destilada, hidrolisadas em HCl (1mol/mL) por 10 minutos e em seguida os meristemas foram lavados, então foram feitos esfregaços em lâminas de vidro que após secas (30 minutos) foram coradas com hematoxilina. Dez preparações foram analisadas (1000 células por concentração e controle) um teste “cego” com ampliação de x1000. O cálculo de índice mitótico (IM), que foi estabelecido relação entre o número de células em divisão e o número total de células analisadas, como mostra a equação abaixo:

$$\text{IM} = \text{NCM} / \text{NTC} \times 100$$

NCM: número de células em mitose

NTC: número total de células contabilizadas

A partir dos valores obtidos na equação acima, é possível avaliar o potencial citotóxico das amostras, em inibir ou aumentar a proliferação celular.

Para a análise dos efeitos tóxicos foram medidos os comprimentos das raízes e realizada a média simples. De acordo com a observação de qualquer aberração cromossômica, foi analisado se houve efeito genotóxico. Já o efeito mutagênico pode ser verificado através da ocorrência de micronúcleos.

Figura 5: Espécimes de *Allium cepa* postos para germinar em contato com o EEtFP.s. nas diferentes concentrações 50mg/mL, 500mg/mL e 1000mg/mL.



Fonte: O autor (a)

3.5.3 Toxicidade frente à *Artemia salina* Leach

Foram utilizadas as larvas na forma de metanáflio, adquiridas em um Mercado público do Recife (Mercado da Madalena) utilizando-se a Concentração Letal Média (CL50) como parâmetro de avaliação da atividade biológica (MEYER et al., 1982). Para a obtenção dos metanáflios, cistos de *A. salina* foram incubados em um recipiente contendo 500 mL de solução de água do mar. O recipiente foi colocado dentro de uma incubadora iluminada por uma lâmpada fluorescente, no qual foram adicionados 0,2 mg de cistos de *A. salina*, mantendo a água em aeração constante, com auxílio de um compressor de aeração para aquário, conforme figura 6. A incubação foi feita durante o período de 48 horas. Após o período de incubação, os organismos-testes (metanáflios) foram expostos às diferentes concentrações (50,

100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL) do extrato etanólico das folhas de *P. stipulacea* (EEtFP.s.) por 24 horas, utilizando-se tubos de ensaio, cada um contendo 10 metanúplios de *Artemia salina*, previamente selecionados. O teste foi realizado em triplicata para cada concentração. Um grupo controle foi preparado contendo apenas os metanúplios em água do mar. O conjunto permaneceu em incubação sob luz artificial por 24 h e então foi realizada a contagem do número de metanúplios vivos e mortos para determinação da CL50 de acordo com o método estatístico de Probitos, utilizando o programa Microcal Origin. Foram considerados vivos todos aqueles animais que apresentassem qualquer tipo de movimento quando observados próximos a uma fonte luminosa.

Figura 6: Cistos de *Artemia salina* em incubadora sob iluminação e aeração.



Fonte: O autor (a)

3.5.4 Toxicidade Aguda

Para a avaliação da toxicidade aguda do EEtFP.s. foi utilizada a metodologia preconizada pela Organization for Economic Cooperation and Development (OECD, 423).

Foram utilizados camundongos albinos da linhagem Swiss, *Mus musculus* procedentes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. O teste consistiu na administração da dose única de 2000 mg/kg do extrato em estudo. Os animais foram divididos em três grupos cada um contendo três animais (fêmeas). O procedimento foi realizado em duplicata. Não havendo morte dos animais, o extrato não será considerado tóxico. O EEtFP.s. foi solubilizado em solução salina e um grupo recebeu apenas o veículo.

Após administração por via oral (gavagem), os animais foram observados cuidadosamente para detecção de sinais tóxicos de caráter geral (Agitação, convulsão, frêmito vocal, irritabilidade, movimentos estereotipados, resposta ao toque, salivação, taquicardia, tremores, contorção abdominal, estiramento, ptose, sonolência, cianose, defecação, diarreia, lacrimejamento, micção, piloereção e óbito) nos intervalos de 30 minutos, 1h, 2h, 24h, 48h e então diariamente por 14 dias. Durante estes intervalos de tempo foram analisados em relação ao sistema nervoso central (SNC) sinais excitatórios como agitação, convulsões, frêmito vocal, irritabilidade, movimentos estereotipados, resposta ao toque, salivação, taquicardia, tremores e sinais inibitórios como contorção abdominal, estiramento, ptose e sonolência. Da mesma forma foram analisadas também possíveis alterações no sistema nervoso autônomo (SNA), tais como: defecação, diarreia, lacrimejamento, micção, piloereção, entre outros. Os animais foram pesados diariamente, assim como foram registrados os consumos de água e ração, para a avaliação de possíveis efeitos tóxicos. Ao final dos experimentos, todos os animais foram anestesiados com solução xilazina (90mg/kg) -cetamina (9mg/kg) e eutanasiados por deslocamento cervical de acordo com “os princípios éticos de experimentação animal”, proposta pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA). Então as cavidades abdominal e torácica foram abertas e todas as alterações macroscópicas foram registradas. Em seguida, rins, fígado e baço foram coletados para a determinação de seus índices. O índice dos órgãos foi calculado seguindo a fórmula: Índice = peso do órgão (mg) / peso do animal (g).

3.5.4.1 Avaliação da Evolução Ponderal e do Consumo de Água e de Ração

Após o tratamento com o EEtFP.s., para a avaliação de possíveis efeitos tóxicos os animais foram pesados no início e ao final do experimento e foi avaliado diariamente o consumo de água e ração.

3.5.4.2 Avaliação dos Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos

Ao final dos experimentos, após os animais serem anestesiados com solução xilazina (90mg/kg) -cetamina (9mg/kg) foram coletadas amostras de sangue por punção cardíaca.

Para as análises hematológicas foi utilizado o sangue coletado em tubo com EDTA e realizada avaliação das séries vermelha e branca. Para a análise dos parâmetros bioquímicos (uréia, creatinina, Transaminase glutâmico-oxalacética – TGO e Transaminase glutâmico-pirúvica – TGP) o sangue foi submetido à centrifugação para obtenção do plasma. Os parâmetros hematológicos e bioquímicos foram determinados utilizando-se kits específicos e através de analisadores automatizados.

3.5.4.3 Avaliação dos Índices dos Órgãos

Após a coleta do sangue todos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, e os órgãos (rins e fígado) retirados, pesados e analisados macroscopicamente para a investigação de alteração de coloração, hemorragias, entre outras. O índice dos órgãos foi calculado como: $\text{Índice} = \frac{\text{peso do órgão (mg)}}{\text{peso do animal (g)}}$.

3.5.4.4 Avaliação Histológica

Após a pesagem dos órgãos, rins, fígado e baço foram seccionados, fixados em formalina (solução de formol a 10%) tamponada e após 24 horas sofreram processamento histopatológico. Passaram pela desidratação com séries crescentes de álcool (70% - 100%), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina. As inclusões emblocadas, foram seccionadas (3µm de espessura) em micrótomo e

submetidas à coloração hematoxilina-eosina e observadas sob microscópio óptico (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

3.6 ANÁLISE DE DADOS

Os dados experimentais foram analisados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) seguido pelos testes t Student e Tukey para comparar as médias através do software Graph Pad prism. 5.0. Onde valores de “p” menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados significantes.

4 RESULTADOS

4.1 INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA

Pelos resultados expostos observa-se através da análise fitoquímica a presença de taninos, alcalóides, saponinas, terpenos (em menor expressividade), cumarinas e flavonóides nas folhas de *P. stipulacea*.

Tabela 2: Detecção de classes de substâncias químicas presentes no EEtFP.S. pelo método de cromatografia em camada delgada (CCD).

Compostos	Resultados
Taninos	+++
Alcalóides	+++
Saponinas	+++
Terpenos	++
Cumarinas	+++
Flavonóides	+++

4.2 ENSAIOS TOXICOLÓGICOS

4.2.1 Fragilidade Osmótica

Para o ensaio de fragilidade osmótica frente a eritrócitos de carneiro o EEtFP.s. foi testado em diferentes concentrações (50µg/mL, 100µg/mL, 250µg/mL, 750µg/mL e 1000µg/mL) e não apresentou toxicidade significativa. Não houve hemólise quando avaliado qualitativamente pela tonalidade avermelhada no sobrenadante obtido após a centrifugação, permanecendo límpida a solução de soro fisiológico, caracterizando integridade das hemácias que permaneceram no fundo dos tubos com formação de um precipitado sem que tenha havido a lise celular. O Percentual de hemólise baseou-se na seguinte equação e o resultado está descrito na Tabela 3.

$$\% \text{ Hemólise} = \frac{Ab \times 100\%}{1,32}$$

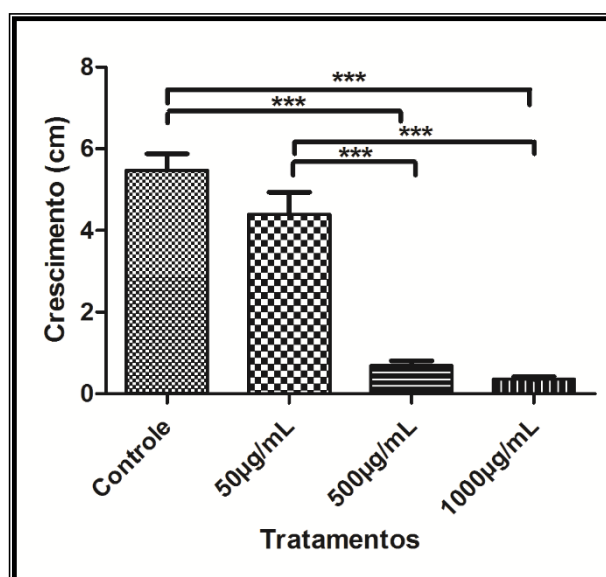
Tabela 3: Percentual de hemólise em eritrócitos de carneiro após tratamento com EEtFP.s. (µg/mL)

Concentração testada	% Hemólise
50 µg/mL	10,73%
100 µg/mL	10,46%
250 µg/mL	10,77%
750 µg/mL	10,77%
1.000 µg/mL	13,14%

4.2.2 *Allium cepa*

Os resultados do ensaio estão expostos nas figuras e tabela que se seguem. É mostrada na figura 7 a avaliação do crescimento radicular, onde houve uma redução do crescimento de modo significativo, quando comparado com o grupo controle (água destilada).

Figura 7: Valores das médias do crescimento radicular de *A. cepa* submetidas à diferentes concentrações do EEtFP.s.



Dados apresentados como média ± erro padrão da média analisado por ANOVA seguido de Tukey. $P < 0,05$ comparado ao grupo controle.

O índice mitótico (IM), apresentado na Tabela 4, corresponde à relação do número de células em divisão e total de células observadas, em porcentagem. Para

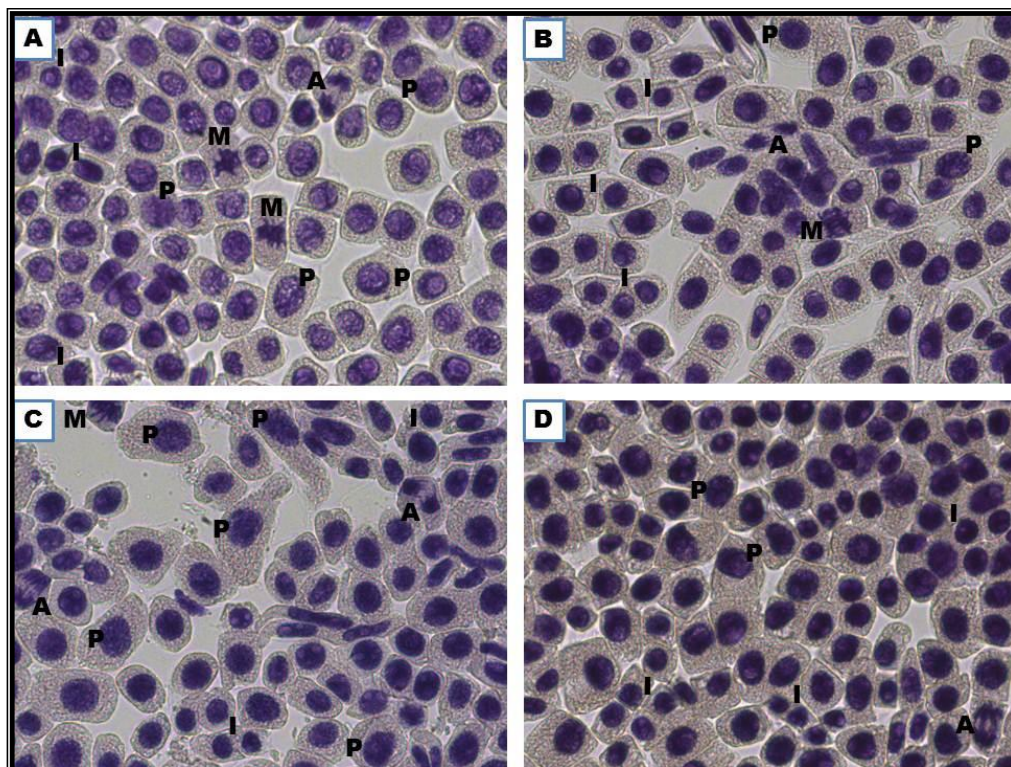
os resultados de toxicidade, a análise estatística não indicou nenhuma mudança na atividade mitótica. O índice mitótico não apresentou diferença significativa entre os percentuais dos tratamentos: controle (18,3%) e EEtFP.s. nas concentrações de 50 µg/mL (11,9%), 500 µg/mL (14,8%) e 1000µg/mL (14,1%).

Tabela 4: Porcentagem do índice mitótico das radículas de *A. cepa* submetidas ao EEtFP.s. nas diferentes concentrações

EEtFP.s. µg/mL	Nº total de células	Nº de células em interfase	Nº de células em divisão	Índice mitótico (%)
Controle	1.194	1011	183	18,3%
50 µg/mL	1.104	985	119	11,9%
500 µg/mL	1.024	876	148	14,8%
1000 µg/mL	1.078	937	141	14,1%

Já as observações morfológicas das radículas de *A. cepa* tratadas nas diferentes concentrações (50µg/mL; 500µg/mL e 1000µg/mL) com EEtFP.s., quando comparadas com o controle (água destilada), mostrou que as fases de divisão celular (prófase, metáfase, anáfase, telófase e interfase) na radícula de *A. cepa* não apresentaram alterações morfológicas, como pontes cromossômicas e células micronucleadas, conforme figura 8.

Figura 8: Fotomicrografias das radículas de *A. Cepa* em diferentes fases de divisão celular.



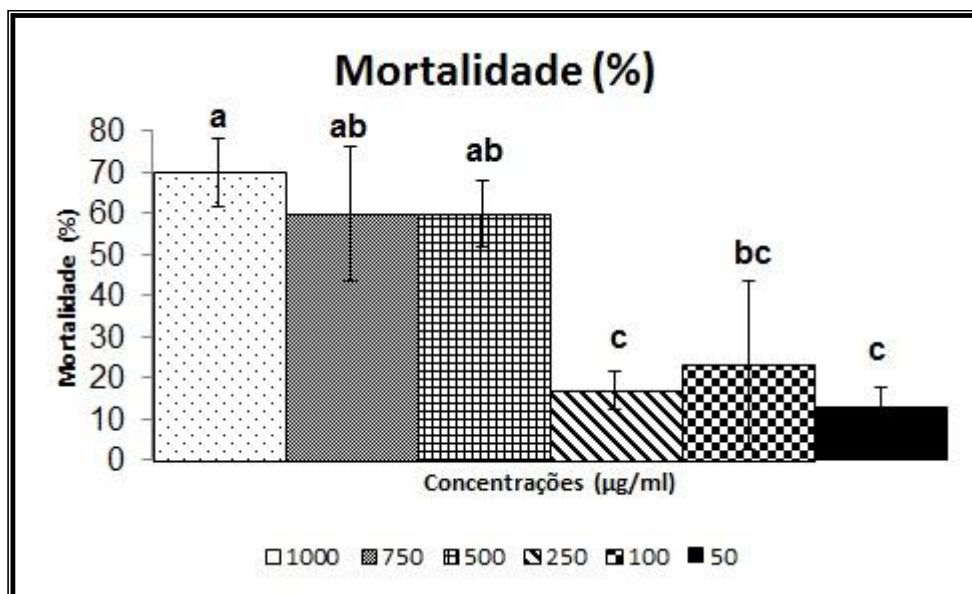
Controle negativo (A), submetidos ao EEtFP.s. nas concentrações de 50 µg/ml (B), 500 µg/ml (C) e 1000 µg/ml (D). P-Prófase; M-Metáfase; A-Anáfase; T-Telófase; I- Interfase. Objetiva de 10X. Aumento - 1000X. Coloração - Hematoxilina-Eosina.

4.2.3 Toxicidade Frente à *Artemia salina*

Com os resultados obtidos do ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina* do EEtFP.s. foi possível observar que à medida que as concentrações dos extratos aumentavam, havia aumento da taxa de mortalidade dos metanúplios (Figura 9).

A análise dos dados finais foi feita pelo método Probit (FINNEY, 1962), sendo a $CL_{50} = 478,94 \mu\text{g/mL}$. O que demonstra um resultado de toxicidade moderada. Já que na avaliação de extratos vegetais por *A. salina*, resultados de CL_{50} menores que 1000 µg/mL são considerados bioativos (MEYER et al., 1982). Considera-se baixa toxicidade quando a concentração letal (CL_{50}) for superior a 500 µg/mL; moderada para CL_{50} entre 100 a 500 µg/mL e muito tóxico quando a CL_{50} for inferior 100 µg/mL.

Figura 9: Taxa de mortalidade dos metanúplios em relação às concentrações do extrato etanólico das folhas de *P. stipulaceae* a que foram submetidos.



A figura demonstra uma relação dose-dependente diante da mortalidade. Aumento da mortalidade com o aumento da dose.

4.2.4 Toxicidade Aguda

No presente estudo não foram observadas alterações persistentes comportamentais ou morte dos animais após tratamento com o EEtFP.s.. Após análise comportamental algumas alterações se mostraram presentes até 2h após a administração do extrato testado e foram: agitação, irritabilidade, movimentos estereotipados, taquicardia.

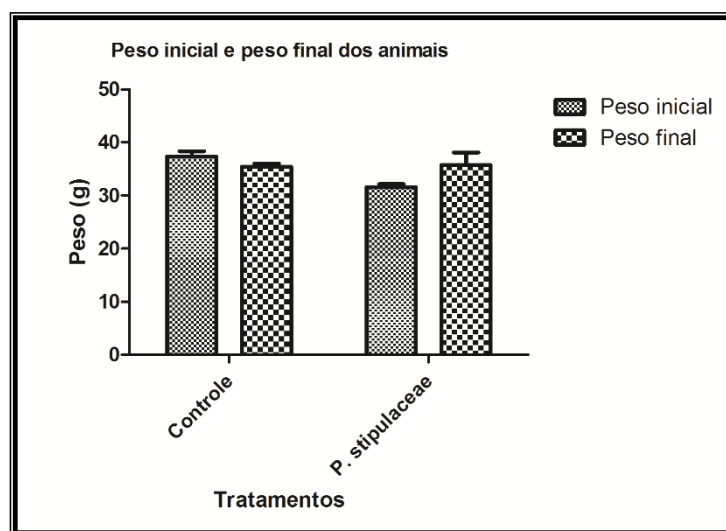
A estimativa da DL 50 foi superior a 2000 mg/kg, sendo considerado de baixa toxicidade de acordo com o método de classes preconizado pela OECD 423 (OECD, 2001). A dose seguinte a ser testada seria a de 5000 mg/kg; no entanto, o estudo dessa dosagem somente é recomendado em casos excepcionais que justifiquem a sua necessidade.

4.2.4.1 Avaliação da Evolução Ponderal e do Consumo de Água e de Ração

Ao final dos 14 (quatorze) dias, os órgãos (rins e fígado) foram removidos e pesados, e analisados de forma macroscópica quanto a sua coloração, consistência, presença de petéquias ou pontos hemorrágicos. Não sendo observado qualquer sinal de alteração.

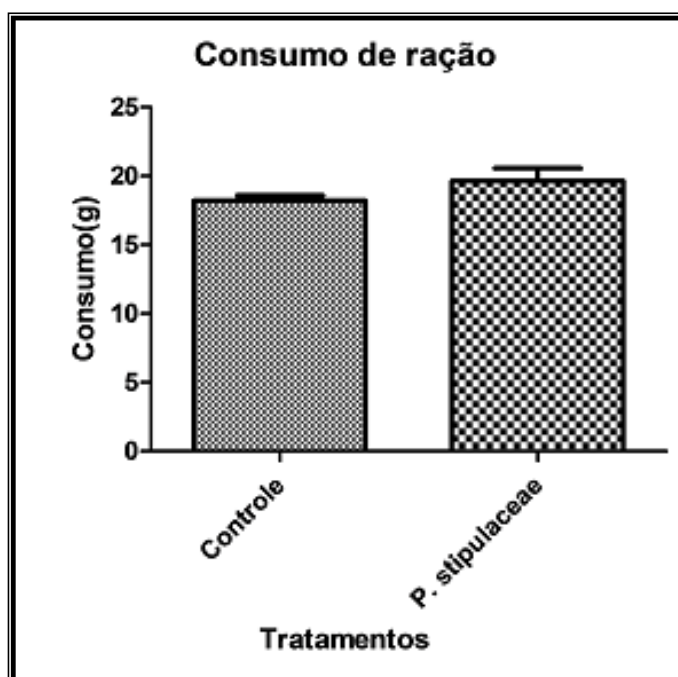
Não houve diferença entre a evolução ponderal dos animais (Figura 10), bem como em relação ao consumo de ração (Figura 11), para o consumo de água (Figura 12) houve uma diminuição na ingestão pelo grupo tratado com o EEtFP.s.

Figura 10: Evolução ponderal dos animais do grupo controle e o grupo tratado com EEtFP.s. na dose de 2000mg/kg.



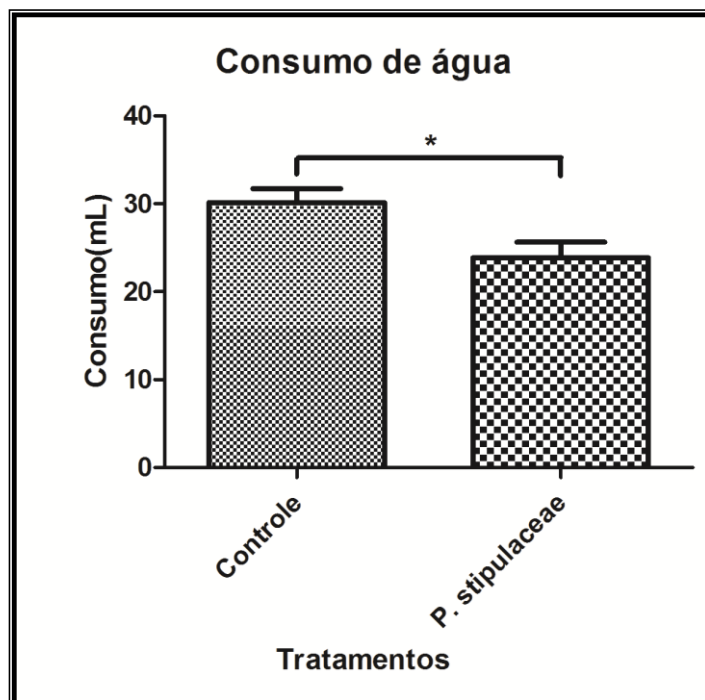
Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média analisado por ANOVA seguido de Tukey. $P < 0,05$ comparado ao grupo controle.

Figura 11: Consumo de ração para os camundongos do grupo controle e o grupo tratado com EEtFP.s. na dose 2000mg/kg.



Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média analisado por ANOVA seguido de Tukey. $P < 0,05$ comparado ao grupo controle.

Figura 12: Consumo de água para os camundongos do grupo controle e o grupo tratado com EEtFP.s. na dose de 2000mg/kg.



Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média analisado por ANOVA seguido de Tukey. $P < 0,05$ comparado ao grupo controle.

4.2.4.2 Avaliação dos Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos

A análise dos parâmetros hematológicos não revelou alteração significativa em relação às séries vermelha e branca, como podemos observar na tabela 5.

A investigação dos efeitos toxicológicos do EEtFP.s. através das análises bioquímicas não revelou alterações significativas na atividade enzimática de TGO (transaminase glutâmico-oxalacética) e TGP (transaminase glutâmico-pirúvica) dos animais do grupo controle e dos submetidos a dose de 2000mg/kg de EEtFP.s.

Ainda em relação aos parâmetros bioquímicos, na avaliação da função renal, foi possível observar um aumento significativo da concentração sérica de uréia dos camundongos tratados com EEtFP.s. na dose de 2000mg/kg ($57,4 \pm 7,33$) em relação ao grupo controle ($49,4 \pm 9,73$).

Não foram observadas alterações significativas na concentração sérica de creatinina na dose testada de EEtFP.s.

Tabela 5: Parâmetros hematológicos de camundongos submetidos ao EEtFP.s. na dose de 2000mg/kg.

PARÂMETROS	PARÂMETROS NORMAIS	CONTROLE	EEtFP.s.
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	9,0 – 11,3	9,52 $\pm$ 0,506	9,82 $\pm$ 0,624
Hemoglobina (g/dL)	13,5 – 17,0	14,76 $\pm$ 1,230	15,86 $\pm$ 0,557
Hematócrito (%)	45 – 55	44,93 $\pm$ 3,700	49,7 $\pm$ 2,334
VCM (fm^3)	47 – 55	47 $\pm$ 3,286	50,66 $\pm$ 1,211
HCM (pg)	13 – 16	32,88 $\pm$ 0,746	16,15 $\pm$ 0,677
CHCM (g/dL)	29 – 34	32,88 $\pm$ 0,746	31,9 $\pm$ 0,672
Leucócitos Totais ($10^3/\text{mm}^3$)	2 – 10	11,03 $\pm$ 1,979	6,86 $\pm$ 3,204

Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média analisado por ANOVA seguido de Tukey. $P < 0,05$ comparado ao grupo controle. *Parâmetros normais (Fonte: Gad, 2007).

Tabela 6: Valores bioquímicos dos grupos controle e tratado com EEtFP.s. na dose de 2000mg/kg.

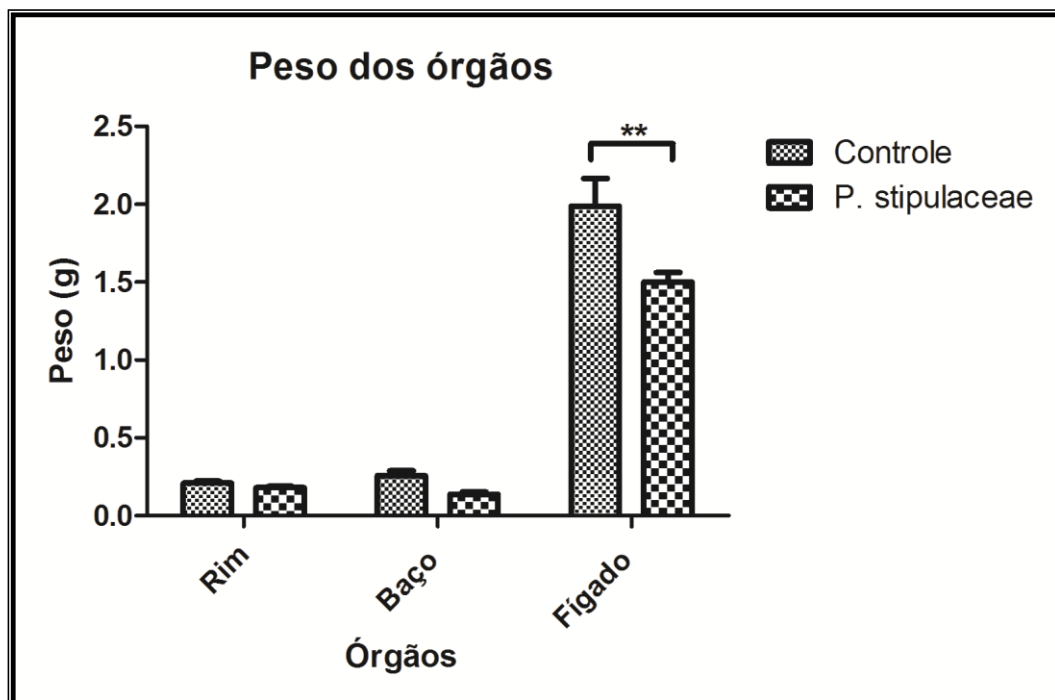
Parâmetros	Parâmetros Normais	Controle	EEtFP.s.
Ureia (mg/dL)	15 – 40	49,4 $\pm$ 9,73	57,4 $\pm$ 7,33
Creatinina (mg/dL)	0,2 – 0,6	0,41 $\pm$ 0,03	0,38 $\pm$ 0,06
TGO (U/L)	70 – 400	184,8 $\pm$ 63,3	186,4 $\pm$ 24,6
TGP (U/L)	25 – 100	45,5 $\pm$ 9,50	46,2 $\pm$ 23,6

* $p < 0,05$. 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. *Parâmetros normais (Fonte: Gad, 2007).

4.2.4.3 Avaliação dos Índices dos Órgãos

Em relação aos índices dos órgãos, não foram evidenciadas alterações significativas nos índices dos rins nos camundongos tratados com EEtFP.s. quando comparado ao grupo controle, como pode-se observar na figura 13. Já para o índice do fígado, foi observada uma diminuição significativa.

Figura 13: Índice dos órgãos para os animais submetidos ao EEtFP.s. na dose de 2000mg/kg e grupo controle



Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média analisado por ANOVA seguido de Tukey. $P < 0,05$ comparado ao grupo controle.

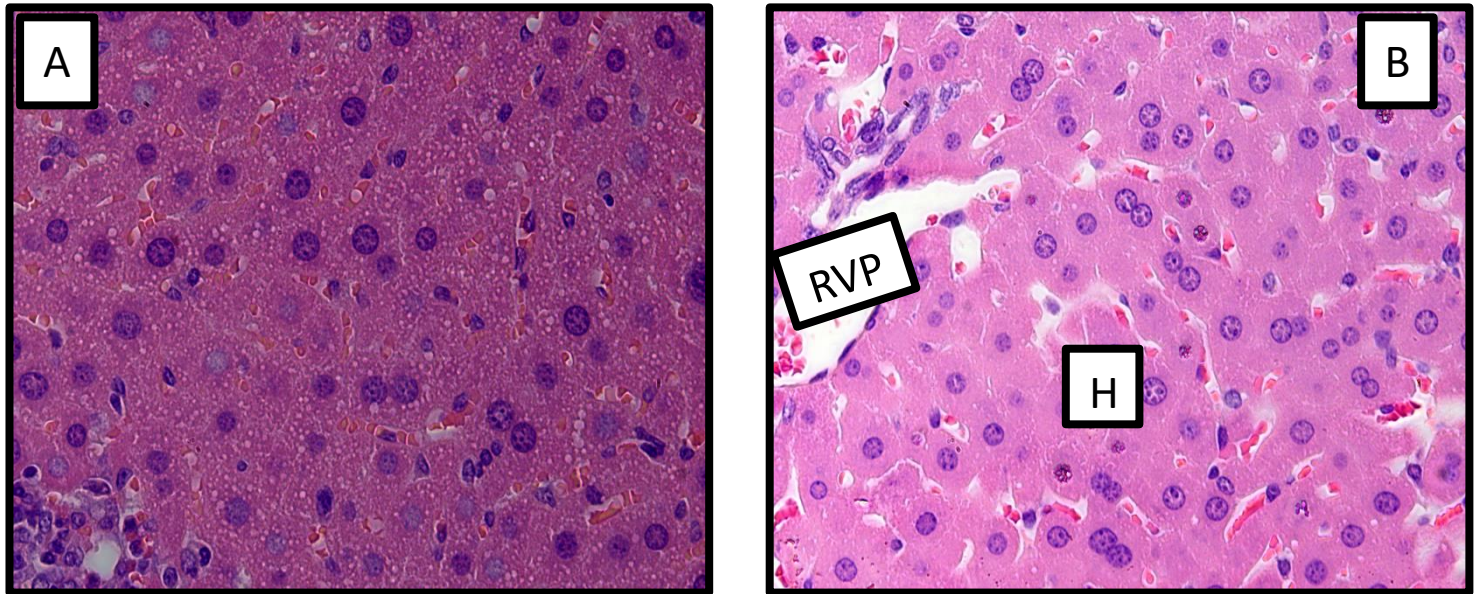
4.2.4.4 Avaliação Histológica

A histologia hepática e renal dos animais tratados com EEtFP.s. não revelou alterações significativas, como podemos ver nas figuras 14 e 15 respectivamente.

Nas amostras de fígado podemos observar que o corte histológico corado com hematoxilina-eosina apresenta arquitetura tecidual preservada, há presença de ramo da veia porta, hepatócitos com citoplasma visível e núcleo arredondado organizados em fileiras delimitadas pelos sinusóides.

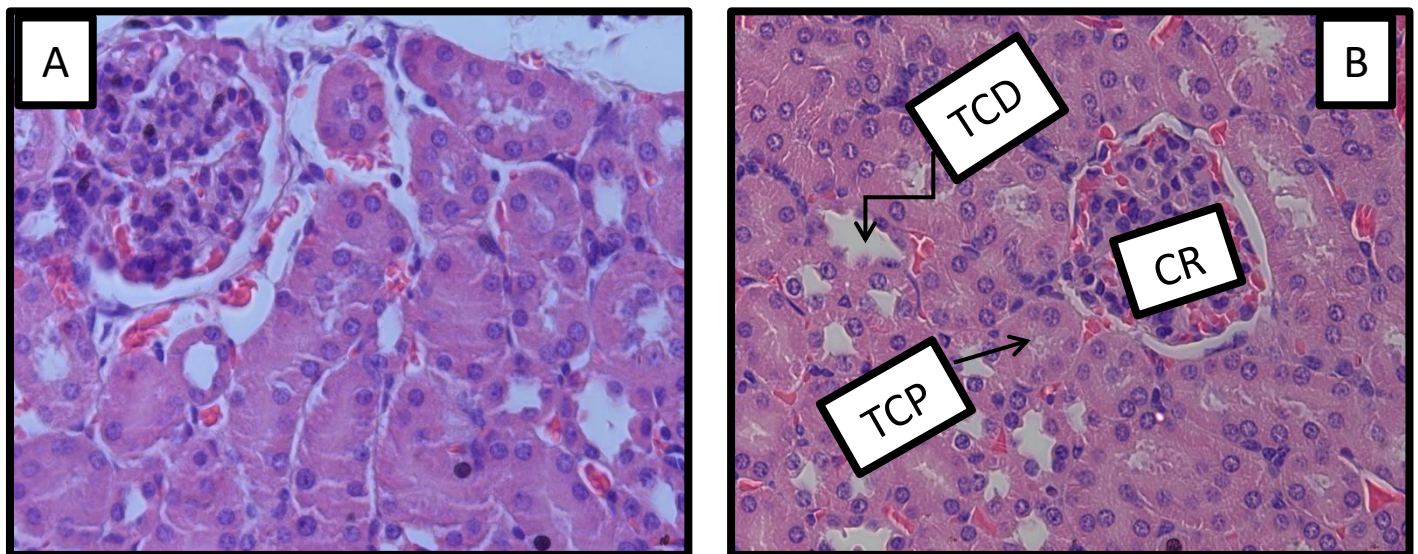
Já nas lâminas de rins, verifica-se que é um preparado histológico convencional do córtex renal que mostra túbulos contorcidos proximais (células cuboides com borda em escova), distais (menores), e um corpúsculo renal com polo vascular bem preservado. Presença de vaso interlobular e células com arquitetura preservada.

Figura 14: Fotomicrografia representando a histologia de fígado de camundongos submetidos ao tratamento com EEtFP.s. na dose de 2000mg/kg.



A – Grupo Controle; **B** – Grupo Tratado; **H** – Hepatócito; **RVP** – Ramo da Veia Porta. Hematoxilina-eosina (400X).

Figura 15: Fotomicrografia representando a histologia de rins de camundongos submetidos ao tratamento com EEtFP.s. na dose de 2000mg/kg.



A – Grupo Controle; **B** – Grupo Tratado; **CR** – Corpúsculo Renal; **TCP** – Túbulo Contorcido Proximal; **TD** – Túbulo Distal.

5 DISCUSSÃO

O uso tradicional das plantas medicinais não é suficiente para validá-las como alternativa terapêutica segura e eficaz (MARTINS-RAMOS; BORTOLUZZI; MANTOVANI, 2010). Por isso é necessário o estudo fitoquímico, que nos possibilite conhecer a constituição química e a realização de testes toxicológicos dessas plantas, para garantir a segurança no seu uso e também para estabelecer doses seguras através de ensaios pré-clínicos.

Considerando que *P. stipulaceae* é utilizada popularmente por seu potencial antimicrobiano, analgésico, anti-inflamatório, torna-se de suma importância a avaliação de sua toxicidade para a segurança da população que a utiliza.

Os resultados encontrados em relação à investigação fitoquímica de *P. stipulaceae* neste estudo confirmam o achado do alcalóide indólico bufotenina no primeiro estudo fitoquímico realizado para esta planta (WILLAMAN et al., 1970). Bem como o posterior isolamento de alguns flavonóides (LIRA, 2009). Os Flavonoides pertencem à classe dos polifenóis, que estão presentes em abundância relativa em metabolitos secundários de vegetais.

Ensaios *in vitro*, tal como a avaliação toxicológica frente à *Artemia salina* são extremamente importantes, pois funcionam como uma ótima ferramenta em pesquisas com plantas medicinais, devido a diminuição do uso de animais vertebrados na experimentação, o que vem sendo uma preocupação dos Comitês de ética em experimentação animal (BEDNARCZUK et al., 2010). O uso de bioensaios, como o de *A. salina*, para o monitoramento de bioatividade em extratos, frações ou compostos isolados de plantas medicinais, tem sido cada vez mais frequente em pesquisas fitoquímicas (NOLDIN et al., 2003). Somando-se a isso, temos a simplicidade, rapidez e baixo custo deste método favorecendo a sua utilização em diversos estudos. O potencial tóxico observado nos extratos de *P. Stipulacea* mostram a importância de estudos químicos posteriores para esta espécie, uma vez que esta pesquisa é a primeira registrada na literatura consultada, até o presente momento.

A ação hemolítica dos diferentes compostos tóxicos é atribuída a vários mecanismos inespecíficos. Como por exemplo, os compostos surfactantes, que

produzem seu efeito hemolítico por meio da solubilização da membrana plasmática do eritrócito, ou pela lise osmótica, que promove alterações na permeabilidade da membrana plasmática da hemácia. Em contrapartida, os compostos xenobióticos reduzidos, como os compostos fenólicos, são capazes de promover hemólise por meio da oxidação da hemoglobina, formando meta-hemoglobulina.

O estudo proposto não apresentou atividade hemolítica nas concentrações testadas. Entretanto, tais resultados não excluem a existência de toxicidade, já que amostras mais concentradas do extrato não foram testadas e estudos farmacológicos sobre *P. stipulaceae* são escassos na literatura.

Os dados obtidos com o teste de fragilidade osmótica neste trabalho indicaram que o EEtFP.s. não mostrou alteração da integridade da membrana em concentrações de NaCl próximas ao nível fisiológico. Estudos similares verificaram alterações no perfil osmótico em eritrócitos quando incubados com extratos vegetais (VELOSO et al., 2015).

É afirmativo, portanto, que eritrócitos incubados com produtos naturais podem sofrer um distúrbio em sua estrutura e citoesqueleto causado por alteração do coeficiente de partição na membrana destas células (DIDELON, 2000).

Nos últimos anos, o teste com *Allium cepa* vem sendo utilizado por suas inúmeras vantagens (confiabilidade, custo, entre outros). É um teste que permite análises tanto macroscópicas (alteração de cor, formato e tamanho das radículas) quanto microscópicas (índice mitótico e a ocorrência de anormalidades e aberrações cromossômicas (PEREIRA et al., 2018).

Os resultados da capacidade citotóxica e mutagênica do EEtFP.s. avaliado pelo teste *A. cepa* através da inibição do crescimento radicular, tamanho e forma nuclear mostrou um comportamento citotóxico dependente da dose nas concentrações testadas. A citotoxicidade foi demonstrada pela inibição da divisão celular nos meristemas de *A. cepa*, conforme o aumento das concentrações utilizadas. A avaliação da mutagenicidade obtida pela observação de micronúcleos nas células expostas a diferentes concentrações foram baixas, considerando que não foi observada a presença de micronúcleos nas concentrações testadas. Portanto, neste estudo a citotoxicidade foi definida pela inibição do crescimento radicular na maior concentração testada.

Posteriormente, com o intuito de avaliar a toxicidade do EEtFP.s. *in vivo*, foi realizado o teste de toxicidade aguda segundo o que preconiza o protocolo OECD, 423.

Os resultados obtidos deixam claro que houve uma baixa toxicidade, nas condições avaliadas. O que pode ser confirmado através da análise dos parâmetros avaliados nesses 14 dias de observação.

Foi observado diminuição significativa relacionada ao consumo de água para o grupo tratado com EEtFP.s., porém este fato não provocou alterações na evolução ponderal dos animais.

Parâmetros metabólicos, tais como a evolução ponderal e consumo de água e ração são utilizados para investigar a toxicidade de uma amostra em estudo sobre o sistema gastrointestinal ou mesmo sobre o sistema nervoso central caso haja alteração em mais de um dos parâmetros em questão.

Um dos órgãos de grande importância para o corpo humano é o fígado, já que sua função está relacionada com o metabolismo de nutrientes e a biotransformação de drogas e produtos químicos, o que confere ao organismo proteção contra agentes tóxicos (AL-ASMARI et al., 2014).

Podemos encontrar enzimas em todos os tecidos do corpo e são elas as responsáveis por várias reações químicas importantes em nosso organismo. Algumas reações podem acontecer no plasma e outras no soro e sua aferição sérica pode indicar um estado de normalidade ou dano celular. Para a avaliação da função hepática, duas enzimas têm grande importância, a transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e Transaminase glutâmico-pirúvica (TGP). A ação dessas enzimas tem sido utilizada como indicador de dano hepatocelular (MONTEIRO, 2010).

A TGO catalisa a conversão de aspartato em oxaloacetato, é encontrada em diversos órgãos e tecidos dentre eles o fígado, coração (miocárdio), músculo esquelético entre outros. Está presente no citoplasma e também nas mitocôndrias, portanto sua elevação indica um dano celular mais profundo.

A TGP catalisa a conversão de alanina em ácido pirúvico, é encontrada em maior concentração no fígado e rim, sua origem é predominantemente citoplasmática, fazendo que se eleve rapidamente quando ocorre lesão hepática, o que a torna um marcador sensível da função do fígado (MINCIS, 2006).

Não foi observada alteração significativa na atividade de TGO nem de TGP nos animais expostos ao EEtFP.s., demonstrando que o mesmo está isento de toxicidade hepática nas condições testadas.

A toxicidade medicamentosa decorrente da excreção inadequada de medicamentos ou seus metabólitos pode levar a uma alteração da função renal. Desta forma, a avaliação dos níveis sanguíneos de uréia e creatinina é um excelente indicador de toxicidade renal. Particularmente o acúmulo dessas substâncias nitrogenadas no sangue pode indicar insuficiência dos rins (HENRY, 2008).

A uréia, o produto final do metabolismo protéico, é excretada pelos rins. Os túbulos renais reabsorvem 40% desse produto, portanto, os níveis sanguíneos desse parâmetro constituem uma indicação da função renal e podem servir como índice da taxa de filtração glomerular (SCHOSSLER et al., 2001), teoricamente, a creatinina é a mais indicada para verificar a função renal, uma vez que a quantidade de creatinina presente nos rins é mais constante, porém não é reabsorvida nos túbulos renais como a uréia (EMANUELLI et al., 2008).

Os animais tratados com EEtFP.s. apresentaram uma elevação significativa da concentração sérica de uréia, o que pode ser um indicativo de diminuição da taxa de filtração glomerular. Porém alguns fatores não associados à disfunção renal, tais como hemorragia gastrointestinal, terapia com corticosteroide e dieta rica em proteínas podem elevar a produção de uréia (KLEIN et al., 2008).

Nenhum achado clínico importante foi observado na histopatologia do fígado, não evidenciando, portanto, toxicidade em nível tecidual do extrato testado.

Na análise histopatológica dos rins dos animais submetidos ao EEtFP.s. também não foram observadas alterações significativas, apesar do aumento nos níveis séricos de uréia. O que sugere que esse aumento causou um dano leve e não foi capaz de alterar a estrutura do tecido.

Para estudos de toxicidade a análise dos parâmetros hematológicos são muito importantes, já que o sistema hematopoético é bem sensível a atividades de agentes tóxicos. As análises hematológicas são realizadas com direcionamento para os eritrócitos (hemácias), leucócitos e trombócitos.

A exposição ao EEtFP.s. levou a uma diminuição significativa dos seguintes parâmetros: HCM e número de leucócitos. Assim como foi observada elevação do hematócrito e do VCM, porém ambos os resultados estão dentro da faixa de parâmetros normais, o que não demonstra significado clínico.

Os índices dos órgãos são importantes indicadores fisiopatológicos relacionados ou não à injúria causada por alguma substância em animais e humanos (VAGHASIYA; SHUKLA; CHANDA, 2011). A análise do índice dos órgãos demonstrou que houve diminuição significativa no índice do fígado do grupo tratado com o EEtFP.s. em relação ao grupo controle. Porém não houve alteração enzimática específica para este órgão e nem achados histopatológicos que corroborem com este resultado, o que demonstra ausência de significado clínico.

Esse estudo expõe, portanto, informações relevantes acerca da toxicidade do EEtFP.s., o que indica a necessidade de estudos pré-clínicos adicionais em vista da escassez de informação na literatura sobre a planta estudada.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os estudos realizados com o extrato etanólico das folhas de *Piptadenia stipulaceae* (EEtFP.s.), pode-se concluir que:

- A investigação fitoquímica do EEtFP.s. demonstrou a presença dos seguintes metabólitos secundários majoritários: taninos, alcaloides, saponinas, cumarinas, flavonoides e terpenos;
- Toxicidade:

De acordo com a taxa de hemólise frente a eritrócitos de carneiro, o EEtFP.s. não apresentou toxicidade significativa para as concentrações testadas.

O extrato estudado não apresentou atividade genotóxica nem mutagênica no ensaio com *Allium cepa*.

O ensaio utilizando o EEtFP.s. frente à *Artemia* resultou em uma toxicidade moderada de acordo com a concentração letal média (CL₅₀) encontrada.

Foi conferida baixa toxicidade aguda ao EEtFP.s., quando o mesmo foi administrado por via oral em camundongos.

REFERÊNCIAS

- AL-ASMARI, Abdulrahman K. et al. A review of hepatoprotective plants used in Saudi traditional medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2014, 2014.
- ARAÚJO, J. F. O. *Atividade antibacteriana, citotóxica e cicatrizante in vitro de fungos endofíticos isolados de plantas medicinais: Mimosa Tenuiflora (Willd.) Poir., Poincianella Pyramidalis Tul. e Acrocomia Aculeata (Jacq.) Lodd. Ex Mart.* Repositório UFAL. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Alagoas, Escola de Enfermagem e Farmácia, 2018.
- BARROSO, G. M. *Sistemática de Angiospermas do Brasil*. Viçosa: Universitária, v.2, 1991.
- BEDNARCZUK, V. O. et al. Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. *Visão Acadêmica*, v. 11, n. 2, 2010.
- BEZERRA, C. M., & OLIVEIRA, M. A. S. Avaliação da toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade do infuso de Malva-Santa (*Plectranthus barbatus*-Lamiaceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v.1, n.4, p.220-228, 2016.
- BEZERRA, D. A. C. *Estudo fitoquímico, bromatológico e microbiológico de Mimosa tenuiflora (Wild) Poiret e Piptadenia stipulacea (Benth) Ducke*. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Campina Grande/UFCG, 2008.
- BEZERRA, D. A. C. et al. Abordagem fitoquímica, composição bromatológica e atividade antibacteriana de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 33, n. 1, p. 99-106, 2011.
- BORTOLUCI M. E.; BARUFATTI G. A.; OLIVEIRA V. J.; CANDIDO, L. S. Uso de biomarcadores para monitoramento das águas do Córrego Arara no município de Rio Brilhante, MS, Brasil. *Ambiente & Água-An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, v.10, n.1, p.1-13 , 2015.
- BRASIL, *Ministério da Saúde: Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. Resolução – RDC nº 10, de 09 de março, Brasília, 2010.
- BRASIL. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. Guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasília, DF 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos*. Brasília: 2006.

BRASIL. Resolução - RDC Nº 14, de 31 de março DE 2010. *Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos*. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 5 de abril de 2010. DOU nº 63.

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

CARDOZO, N. A. R. *Metabolitos especiais isolados dos galhos e folhas de Piptadenia gonoacantha (Mart.) J.F.Macbr. (Leguminosae) e das flores de Laseguea erecta Mull. Arg. (Apocynaceae)*. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica da Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2006.

CARNEIRO, F. M.; SILVA, M. J. P. D.; BORGES, L. L.; ALBERNAZ, L. C.; COSTA, J. D. P. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. *Rev Sapiê: Soc Sab Prát Educ*, v.3, n.2, 44-75, 2014.

CARREIRO, J. B. X. et al. Da educação superior tradicional ao ensino contextualizado: algumas lições da universidade federal do cariri para o desenvolvimento territorial do semiárido brasileiro. *Revista Interdisciplinar de Gestão Social*, v. 6, n. 2, 2018.

DACIE, J. V. et al. *Practical haematology*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1975.

DANTAS, V. M. C. et al. Taninos: principal componente do extrato *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke inibe o crescimento de cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* de origem bovina. *Rev. Biotemas*, v.29, n.1, p.109-114, 2016.

DIDELON, J. et al. Osmotic fragility of the erythrocyte membrane: characterization by modeling of the transmittance curve as a function of the NaCl concentration. *Biorheology*, v. 37, n. 5, 6, p. 409-416, 2000.

EMANUELLI, M. P. et al. Concentração Sérica de Fosfatase Alcalina, Gama-glutamil transferase, uréia e creatinina em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). *Ciência Animal Brasileira*, v.9, n.1, p. 251-255, 2008.

FABRICANTE, J. R. & ANDRADE, L. A. Análise estrutural de um remanescente de caatinga no seridó paraibano. *O ecologia Brasiliensis*, v. 11, n. 3, p. 341-349, 2007.

FINNEY, D. J. *Probit analysis* (2nd. Ed.). Cambridge: Cambridge University Press, 1962.

FISH, M. S.; JOHNSON, N. M.; HORNING, E. C. *Piptadenia alkaloids*. Índole bases of *Piptadenia peregrina* and related species. *Journal of the American Chemical Society*, v.77, n.22, p.5892-5895, 1955.

FLORENTINO, A. T. N.; ARAÚJO, E. L.; ALBUQUERQUE, U. P. Contribuição de quintais agroflorestais na conservação de plantas da caatinga, município de CARUARU, PE, Brasil. *Acta Botânica Brasilica*, v.21, n.1, p.37-47, 2007.

FORZZA, R.C. et al. Lista de Espécies da Flora do Brasil. *Jardim Botânico do Rio de Janeiro*, 2010.

FREITAS, L. A. D. et al. Coal extraction causes sediment toxicity in aquatic environments in Santa Catarina, Brazil. *Revista Ambiente & Água*, v.12, n.4, p.591-604, 2017.

GÉRARD, D. et al. Evaluation of OSMOCELLS, a new semi-automatic device for osmotic fragility assessment. *Journal Article*, v.39, n.5, p.521-527, 2017.

GUERRA, M. & SOUZA, M.J. Como observar cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana. São Paulo: Funpec, 2002. 131p.

HARBORNE, J.B. et al. Chemotaxonomy of the Legumin-osae. London, UK, Academic Press Inc.(London) Ltd., 1971.

HENRY, J. B. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. In: Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. 2008.

HOFMAN, A. Psychotomimetic drugs: chemical and pharmacological aspects. *Acta Physiologica et Pharmacologica Neerlandica*, v.8, n.240, p. 158, 1959.

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

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. Texto e Atlas. 11ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara, 2008.

KLEIN, L. et al. Admission or changes in renal function during hospitalization for worsening heart failure predict postdischarge survival: results from the Outcomes of a Prospective Trial of Intravenous Milrinone for Exacerbations of Chronic Heart Failure (OPTIME-CHF). *Circulation: Heart Failure*, v.1, n.1, p. 25-33, 2008.

LAPA, A.J. et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMAN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A. PETROVICK, P.R. Farmacognosia – da planta ao medicamento. 4ªed. Porto Alegre/Florianópolis. Editora da Universidade, p.183-199. 2002

LEWIS, G. P.; ELIAS, T. S. Mimoseae. Pp. 155-168. In: Polhill, R.M. & Raven, P.H. (eds.). Advances in Legume Systematics. v.1. *Royal Botanic Gardens*, Kew, 1981.

LEWIS, G.P., et al. Legumes of the World. Royal Botanic Gardens, Kew. Pp. 57–67. 2005.

LIRA, D. P. *Flavanóides isolados de Piptadenia stipulacea (Benth.) Ducke. (Fabaceae)*. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba. 2009.

LUCKOW, M. Tribe Mimoseae. Legumes of the World, p. 163-183, 2005.

MACEDO, T. R. *Avaliação das concentrações de superóxido dismutase e da fragilidade osmótica eritrocitária em cães com linfoma multicêntrico com e sem anemia*. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2010.

MACÊDO, C. L. et al. Spasmolytic effect of galentin 3,6- dimethyl ether, a flavonoid obtained from *Piptadenia stipulacea* (Benth) Duck. *J. Smooth Muscle Res.*, v. 47, n. 5, p. 123-134, 2011.

MACÊDO, C. L. et al. Mechanisms underlying vasorelaxation induced in rat aorta by galentin 3, 6-dimethyl ether, a flavonoid from *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Duck. *Molecules*, v.19, n.12, p.19678-19695, 2014.

MAIA, N. G. *Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades*. São Paulo: D & Z. Computação Gráfica e Editora, 2004.

MARTINS-RAMOS, D.; BORTOLUZZI, R. L. C.; MANTOVANI, A. Medicinal plants in a remnant of High Montane Araucaria Moist Forest, Urupema Municipality, Santa Catarina State, Brazil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 12, n. 3, p. 380-397, 2010.

MELÉNDEZ, P. A.; CAPRILES, V. A. Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. *Phytomedicine*, v. 13, n. 4, p. 272-276, 2006.

MERINO, F. et al. Phytochemical analysis, antioxidant potential and toxicity of crude ethanol extract and fractions of the species *Senecio westermanii* Dusén against *Artemia salina*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v.17, n.4, 1031-1040, 2015.

MEYER BN, et al., 1982. Brine shrimp, a convenient general bioassay for active-plant constituents. *Planta Med* 45: 31-34.

MINCIS, M.; MINCIS, R. Enzimas hepáticas: aspectos de interesse prático. *Revista Clínica e Terapêutica*, v.32, n.2, p.56-60, 2006.

MONTEIRO, E. A. S. *Avaliação toxicológica da Ipomoea asarifolia (Salsa) em ratos*. 2010.

MORIM, M. P. *Piptadenia Benth*. In: Forzza RC (org.). *Catálogo de plantas e fungos do Brasil*. Instituto Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, v.2, pp. 1077-1078. 2010.

MOURA, M. N; TERRA, V.; GARCIA, F. *Piptadenia* (Leguminosae, Mimosoideae) in the state of Minas Gerais, Brazil. *Rodriguésia*, v. 68, n. 1, p. 209-222, 2017.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products*, v.75, n.3, p.311-335, 2012.

NOLDIN, V. F. et al. Chemical composition and biological activities of the leaves of *Cynara scolymus* L.(artichoke) cultivated in Brazil. *Química Nova*, v. 26, n. 3, p. 331-334, 2003.

OECD 2001. Guideline 423: Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method. Acessado em 18 de março de 2018 em <http://www.oecd.org/publications>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Alma-Ata, 1979. Cuidados Primários de Saúde, p. 64, Brasília, 1979.

PARAISO, L. F. et al. Effects of acute and chronic exercise on the osmotic stability of erythrocyte membrane of competitive swimmers. *PloS one*, v.12, n.2, 2017.

PEREIRA, I. M. et al. Regeneração natural em um remanescente de caatinga sob diferentes níveis de perturbação, no agreste paraibano. *Acta Botanica Brasilica*, v. 15, n. 3, p. 413-426, 2001

PEREIRA, A. C.; SILVA, N. C.; ALMEIDA, L. M. Potencial toxicológico de *Lafoensia pacari* (Lythraceae) usando o sistema teste *Allium cepa* como bioindicador. In: *Anais do Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEG (CEPE)* (ISSN 2447-8687). 2018.

PUCCI, L. L. *Avaliação da toxicidade oral aguda e as atividades diurética e antioxidante da Rudgea viburnoides* (CHAM.) BENTH. (CONGONHA DE BUGRE). Dissertação de mestrado. Goiânia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás. 2009.

QUEIROZ, A. C. et al. The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Piptadenia stipulacea* Benth. (Fabaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v.128, p.377- 383, 2010.

RESTREPO, R.; REYES, D.; ORTIZ, M. C.; ROJAS, R. F. A.; KOUZNETSOV, V. V. Aberraciones cromosomales en bulbos de cebolla *Allium cepa* inducidas por moléculas híbridas 4-aminoquinolínicas. *Universitas Scientiarum*, v.17, n.3, 2012.

RITTER, M. R., et al. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. *Revista brasileira de farmacognosia*. São Paulo, SP. Vol. 12, n. 2 (jul./dez. 2002), p. 51-62, 2002.

ROSA, C. et al. Chemical composition and toxicity against *Aedes aegypti* L. and *Artemia salina* Leach of the essential oil from *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. leaves. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v.18, n.1, p.19-26, 2016.

SCHOSSLER, D.; ALIEVI, M. M.; EMANUELLI, M. P.; SCHOSSLER, J. E. Função renal de cães tratados com doses terapêuticas de flunixin meglumine e ketoprofen durante o trans e pós-operatório. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.16, n.1, p.46-51, 2001.

SEYFRIED, M. Triagem da atividade antitumoral de extratos vegetais utilizando ensaios de toxicidade in vivo sobre *artemia salina* e in vitro sobre células da linhagem HeLa. Monografia – Universidade Federal do Paraná, Curso de Ciências Biológicas, 2010.

SILVA, L. M. B. & BARBOSA, D. C. A. Crescimento e sobrevivência de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan (Leguminosae), em uma área de Caatinga, Alagoinha, PE. *Acta Botanica*, v.14, n.3, p.251-261, 2000.

SILVA, D. O. Avaliação da toxicidade, citotoxicidade e de características fenológicas e físico-químicas da planta *Pereskia aculeata*. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2017.

SILVEIRA, J. C. Avaliação dos efeitos imunomoduladores e citotóxicos de polissacarídeos de *Chorisia Speciosa* e *Hymenaea Courbaril*. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curso de Ciências Biológicas, 2010.

SIQUEIRA, J. M. D.; BOMM, M. D.; PEREIRA, N. F. G.; GARCEZ, W. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii*-Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* leach. *Química Nova*, v.21, n.5, p. 557-559, 1998

SIQUEIRA, J. D.; ZIMINIANI, M. G.; RESENDE, U. M.; BOAVENTURA, M. A. D. Estudo fitoquímico das cascas do caule de *Duguetia glabriuscula*–Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. *Química Nova*, v.24, n.2, p.185-187, 2001.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II*. 2. Ed. Nova Odessa - SP: Instituto Plantarum, 2008.

STATI, L. C.; GUIMARÃES, E. M.; SANTOS, C. M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUZA-BRITO, A. R. M. Fabales medicinais. In Di Stati, L.C. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2ª edi. rev. e ampl. São Paulo: Editora UNESP, 2002.

VAGHASIYA, Y. K.; SHUKLA, V. J.; CHANDA, S. V. Acute oral toxicity study of *Pluchea arguta* boiss extract in mice. *J Pharmacol Toxicol*, v. 6, n. 2, p. 113-23, 2011.

VASCONCELOS, L. H. et al. Flavonoid galeitin 3, 6-dimethyl ether attenuates guinea pig ileum contraction through K⁺ channel activation and decrease in cytosolic calcium concentration. *European journal of pharmacology*, v.767, p.52-60, 2015.

VELOSO, C. A. G. *Triagem fitoquímica e avaliação do potencial antifúngico e citotóxico das folhas de Calotropis procera* (Ait.) Ait.f. (APOCYNACEAE). Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2015.

WILLAMAN, J. J. et al. Alkaloid-bearing plants and their contained alkaloids, 1957-1968. *Lloydia*, v. 33, n. 3A, 1970.

ANEXO A
OFÍCIO Nº 38/18



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones 2126-8840 | 2126-8351
www.ccb.ufpe.br

Recife, 19 de junho de 2018.

Ofício nº 38/18

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof.ª Sônia Pereira Leite**
Departamento de Histologia e Embriologia
Centro de Biociências
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 0002/2018

Certificamos que a proposta intitulada "**Utilização de Piptadenia Stipulacea para Ensaios Pré-clínico - Estudo IN Vivo e IN Vitro**", Registrada com o nº0002/2018 sob a responsabilidade de **Prof.ª Sonia Pereira Leite** 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 06/06/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	07/05/2018 a 27/05/2018
Espécie/linhagem/raça	<i>Camundongo heterogenico</i>
Nº de animais	32
Peso/Idade	25-30g/60 dias
Sexo	Machos (20) e fêmea (12)
Origem	Bioterio do Departamento de Antibióticos

Atenciosamente,

Pedro V. Carelli

Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1801584