



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

HORTÊNCIA FARIAS DE ANDRADE

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO AQUOSO DE *Caesalpinia
pyramidalis* E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS.**

Recife

2019

HORTÊNCIA FARIAS DE ANDRADE

CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO AQUOSO DE *Caesalpinia pyramidalis* E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS.

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito final para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnológica

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Tereza dos Santos Correia

Recife

2019

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

Andrade, Hortência Farias de

Caracterização fitoquímica do extrato aquoso de *Caesalpinia pyramidalis* e avaliação de atividades biológicas./ Hortência Farias de Andrade. – 2019.

94 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2019.

Inclui referências e apêndices.

1. Plantas medicinais. 2. Plantas da Caatinga. 3. Câncer. I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orientadora). II. Título.

581.634

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-296

HORTÊNCIA FARIAS DE ANDRADE

CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO AQUOSO DE *Caesalpinia pyramidalis* E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS.

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Tereza dos Santos Correia

PARECER: PROVADA EM 20/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Maria Tereza dos Santos Correia (UFPE)
Departamento de Bioquímica – UFPE

Prof^a Dr^a Maria Betânia Melo de Oliveira (UFPE)
Departamento de Bioquímica – UFPE

Prof^a Dr^a Márcia Vanusa da Silva (UFPE)
Departamento de Bioquímica – UFPE

Prof^a Dr Thiago Henrique Napoleão (UFPE)
Departamento de Bioquímica – UFPE

Dr^a Clébia Maria Alves de Almeida (UFPE)
Departamento de Bioquímica – UFPE

AGRADECIMENTOS

O sentimento que me ocupa inteiramente, neste momento, é o de GRATIDÃO. Então, por isso, começo meu texto agradecendo primeiramente:

A Deus, por tudo, sempre. Por me permitir finalizar um grande sonho, com saúde, sempre me estendendo a mão quando os dias eram mais nublados. Foi Ele quem me deu a força e a coragem pra caminhar até aqui.

Depois disso, preciso agradecer imensamente a minha família, por todo o apoio de sempre e com isso, preciso agradecer fortemente:

Ao meu esposo, Inhayan, por ser a pessoa que ele é. Por todo o apoio prestado todos esses anos, pelo o amor e cuidado de sempre. Agradeço também o companheirismo em todos os finais de semana que tive que ir ao laboratório. Meu amor, muito obrigada!

Aos meus pais, Lourdes e Humberto, pelo amor incondicional, carinho e cuidado. Pelo o apoio financeiro e emocional e principalmente pelo o incentivo de estudar e procurar ser sempre a minha melhor versão.

Aos meus irmãos, Igor e Mêncio. Eles são OS MELHORES! Sempre estiveram ao meu lado, torcendo por todas as conquistas e me incentivando na busca do melhor caminho.

As minhas orientadoras, Tereza Correia e Márcia Vanusa, por confiarem em mim e me possibilitar chegar até aqui.

De uma forma muito especial e carinhosa, preciso agradecer a professora Betânia Melo de Oliveira, por todos os ensinamentos, desde a graduação, sendo sempre uma pessoa extremamente humana e solícita. Ela esteve sempre comigo na correção de quase todos os meus trabalhos acadêmicos e cuidou de mim, como se eu fosse sua filha científica. Professora, muito obrigada!

Ao professor Cristiano Chagas, do CAV, por toda a atenção a mim prestada e por toda disponibilidade.

Aos mestres e doutores, professores da UFPE, em especial, ao professor Bruno Severo, por toda preocupação e amizade. Ele esteve sempre preocupado em me ajudar nas bancas de graduação e também me acompanha desde a graduação.

Ao professor Rafael Ximenes por todo apoio e paciência e por disponibilizar seu laboratório para realização dos ensaios.

As minhas queridas amigas, que estiveram comigo ao longo dessa caminhada, Daniele Pires e Rebeca Melo, por todo amor, amizade e presença.

Aos meus amigos do laboratório e da vida, Livia, Priscilla, Bruno, Bárbara, Sivoneide, Elys, Amanda, Ceci, Camilla, Vitória, Rafael e Robson, por toda a construção de conhecimento e ajuda. Muito obrigada, gente.

A Fatinha, de antibióticos, por toda a atenção e confiança prestada na execução dos ensaios com os camundongos.

As meninas do CAV, Tamiris e Daniele, por toda disponibilidade de me ajudar nos ensaios com os animais.

Ao CNPQ, pelo o incentivo financeiro, pois sem esse incentivo não seria viável a execução desse projeto.

Enfim... A todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a execução do meu trabalho.

“A persistência é o caminho do êxito”.

Charles Chaplin

RESUMO

De acordo com a organização mundial da saúde (OMS) a cada ano 8,8 milhões de pessoas morrem de câncer, a maioria em países de baixa e média renda. Devido a isso, vem aumentando, significativamente, nos últimos anos o número de pesquisas relacionadas a descobertas de tratamentos mais eficazes e menos traumático para o paciente. Nesse sentido as biomoléculas vegetais podem ser promissoras já que produzem ampla diversidade de compostos orgânicos, os chamados metabólitos secundários. A *Caesalpinia pyramidalis* é uma espécie arbórea endêmica da caatinga e está entre as espécies vegetais mais utilizadas para fins medicinais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a caracterização fitoquímica, o potencial antioxidante e a segurança de uso do extrato aquoso de *C pyramidalis* (CP Aq) por meio de ensaios de genotoxicidade, mutagenicidade, citotoxicidade, toxicidade. Além disto, foi investigado também a atividade antineoplásica, antibacteriana e anti-inflamatória do CP Aq. Os extratos foram obtidos através de agitação e sonificação e caracterizados por técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC). O ensaio de citotoxicidade foi realizado pelo método do brometo (MTT) e testado em três linhagens tumorais humanas: K-562 (leucemia), HL-60 (leucemia aguda) e DU-145 (Câncer de próstata). Os testes de genotoxicidade in vivo, foram feitos pelo ensaio cometa e teste do micronúcleo e os de mutagenicidade pelo ensaio de frequência e índice de dano no DNA. O ensaio de toxicidade oral foi realizado através da gavagem com camundongos *swiss* por 14 dias e avaliado através da histopatologia e dos níveis bioquímicos. Na caracterização fitoquímica o CP Aq revelou a presença de flavonoides, cumarinas, Lignanas, saponinas, taninos hidrolisáveis, triterpenos e esteroides. Sendo confirmada pelas técnicas de HPLC e UPLC/MS a presença de ácido gálico e ácido elágico. Já na determinação do teor total de fenóis e flavonoides, o extrato apresentou um conteúdo fenólico total de $216,02 \pm 11,30$ mg EAG/g de extrato e um conteúdo de flavonoides totais de $43,46 \pm 1,98$ mg EQ/g de extrato. A atividade antioxidante o ensaio de redução do radical DPPH, CP Aq apresentou um IC₅₀ de 32,52 µg/mL. Na avaliação da atividade antioxidante total pelo método de formação do complexo fosfomolibdênio, o extrato apresentou uma atividade antioxidante de $42,57 \pm 2,83$ e no ensaio de inibição da peroxidação lipídica, uma atividade de inibição maior que BHT e muito próxima da

quercitina. Não foi detectada diferença significativa dos níveis séricos e histopatológico dos animais com o extrato aquoso investigado. Este resultado sugere que CP Aq é seguro para ser utilizado em células animais, pois não apresentam genotoxicidade ou mutagenicidade e quando exposto a células neoplásicas como a de HL-60 reduzem em cerca de 50% sua viabilidade celular. Além disso, CP Aq foi capaz de diminuir os níveis de NO em células de macrófagos RAW 264.7, apresentando atividade anti-inflamatória *in vitro*. Porém, não apresentou atividade antimicrobiana em cepas gram-positivas e negativas. Dessa forma, conclui-se que os compostos encontrados no extrato aquoso de *Caesalpinia pyramidalis* são promissores nos efeitos antioxidantes, antineoplásica e anti-inflamatório.

Palavras-chave: Toxicidade, moléculas, câncer, Caatinga.

ABSTRACT

According to the World Health Organization (WHO) every year 8.8 million people die of cancer, mostly in low- and middle-income countries. Due to this, the number of research related to discoveries of treatments more effective and less traumatic for the patient has been increasing significantly in recent years. In this sense the vegetal biomolecules can be promising since they produce a wide diversity of organic compounds, the so-called secondary metabolites. *Caesalpinia pyramidalis* is an arboreal species endemic to the caatinga and is among the plant species most commonly used for medicinal purposes. The objective of this study was to evaluate the phytochemical characterization, the antioxidant potential and safety of use of the aqueous extract *pyramidalis* C (Aq CP) by means of genotoxicity tests, mutagenicity, cytotoxicity, toxicity. In addition, the antineoplastic, antibacterial and anti-inflammatory activity of CP Aq was also investigated. The extracts were obtained by shaking and sonification and characterized by thin layer chromatography (CCD), high performance liquid chromatography (HPLC) and ultra high performance liquid chromatography (UPLC). The cytotoxicity assay was performed by the method bromide (MTT) and tested in three human tumor cell lines: K-562 (leukemia), HL-60 (acute leukemia) and DU-145 (prostate cancer). In vivo genotoxicity tests were done by the comet assay and micronucleus test and the mutagenicity assays by frequency assay and DNA damage index. The oral toxicity test was performed through gavage with swiss mice for 14 days and evaluated by histopathology and biochemical levels. In the phytochemical characterization the CP Aq revealed the presence of flavonoids, coumarins, Lignans, saponins, hydrolysable tannins, triterpenes and steroids. The presence of gallic acid and ellagic acid was confirmed by HPLC and UPLC / MS techniques. In the determination of the total content of phenols and flavonoids, the extract had a total phenolic content of 216.02 ± 11.30 mg EAG / g extract and a total flavonoid content of 43.46 ± 1.98 mg EQ / g of extract. The antioxidant activity of the DPPH, CP Aq radical reduction assay presented an IC₅₀ of 32.52 μ g / mL. In assessing total antioxidant activity by the fosfomolibdênio complex formation method, the extract showed an antioxidant activity 42.57 ± 2.83 assay and inhibition of lipid peroxidation inhibition activity greater than BHT and very close to quercetin. No significant difference was detected in the serum and histopathological levels of the animals with the aqueous extract investigated. This result suggests that CP Aq is safe for use in animal cells because they lack genotoxicity or mutagenicity and when exposed to neoplastic cells such as HL-60 reduce their cell viability by about 50%. In addition, CP Aq was able to decrease NO levels in RAW 264.7 macrophages cells, presenting in vitro anti-inflammatory activity. However, it did not present antimicrobial activity in gram-positive and negative strains. Thus, it is concluded that the compounds found in the aqueous extract of *Caesalpinia pyramidalis* are promising in antioxidant, antineoplastic and anti-inflammatory effects.

Key words: Toxicity, molecules, cancer, caatinga.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação simplificada de algumas rotas biossintéticas para produção de metabólitos secundários (CASTRO et al., 2001).	20
Figura 2: Fatores que podem interferir na composição química dos metabólitos secundários dos vegetais (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).	20
Figura 3: Esquema das rotas metabólicas que dão origem aos compostos fenólicos (TAIZ; ZEIGER, 2004).	22
Figura 4: Área de ocorrência do Bioma Caatinga	24
Figura 5: A - Planta inteira da Catingueira; B - Detalhe do Galho com Folhas, Vargem nova e Flor (inflorescência) da Planta Catingueira; C - Detalhe do ramo terminal da planta Catingueira frutos em forma de vargem.	27
Figura 6: Classificação do dano do DNA das células analisadas por ensaio cometa. 0 (sem dano aparente); 1 (com pouco dano aparente); 2 (dano médio); 3 (dano médio com cauda mais longa) e 4 (dano máximo).	29
Figura 7: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma*. Fonte: BRASIL, INCA 2018.	30
Figura 8: Descrição geral das reações que conduzem à formação de ROS. Setas verdes representam a peroxidação lipídica. Setas azuis representam as reações Haber-Weiss e as setas vermelhas representam as reações de Fenton. As letras em negrito representam radicais livres. SOD - enzima superóxido-dismutase, CAT - enzima catalase. Adaptado de Ferreira et al. (2009) e Flora (2009).	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação taxonômica da espécie <i>Caesalpinia pyramidalis</i>	26
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Atividades biológicas testadas de <i>C. pyramidalis</i>	28
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. OBJETIVOS	17
1.1.1. Geral.....	17
1.1.2. Específicos	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO	18
3. MÉTODO.....	36
4. RESULTADOS.....	37
ARTIGO 1: COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO EXTRATO AQUOSO DA CASCA <i>Caesalpinia pyramidalis</i>	37
ARTIGO 2: EXTRATO AQUOSO DE <i>CAESALPINIA PYRAMIDALIS</i> DIMINUE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E A VIABILIDADE CELULAR EM CÉLULAS TUMORAIS	56
ARTIGO 3: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA E AÇÃO GENOTÓXICA E MUTAGÊNICA DO EXTRATO AQUOSO DE <i>Caesalpinia pyramidalis</i>	68
5. CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS	83
APÊNDICE	91
Artigo publicado na revista Brazilian Journal of Microbiology no ano de 2018, no período do desenvolvimento do doutorado. F.I. (2017): 1.810 – Qualis Capes para Ciências Biológicas I – B2.	91

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos países que detém a maior biodiversidade de planeta por possuir aproximadamente 20% do número total de espécies do mundo. Porém parte desta diversidade ainda não foi investigada quanto ao seu potencial terapêutico, embora este seja um processo que vem evoluindo significativamente nos últimos anos (Ribeiro et al, 2014; Albuquerque et al., 2007a; Maciel et al., 2002). No Nordeste, as pesquisas com plantas vêm sendo intensificadas principalmente em áreas de caatinga no estado de Pernambuco, que possui um grande número de plantas endêmicas, porém pouco exploradas pela farmacologia, mas que já são conhecidas e utilizadas na medicina tradicional (Ribeiro et al, 2014; Cartaxo et al., 2010). O uso de plantas com a intensão de prevenir, tratar e curar doenças é umas das mais antigas práticas na medicina popular (Atanasov, 2015).

A maioria das substâncias orgânicas conhecidas advém de fontes naturais, porém, são nos vegetais que são encontrados de forma mais significativa um enorme arsenal terapêutico, devido à grande produção de metabólitos secundários. As espécies vegetais se destacam por possuir grande capacidade de biosintetizar metabólitos secundários com ação farmacológica. As plantas são produtoras da maior diversidade de compostos ativos usados na terapêutica, uma vez que, um extrato vegetal pode conter milhares de substâncias com propriedades químicas distintas (Melo, 2018).

Segundo Souza et al (2007) os radicais livres e outros oxidantes foram apontados nos últimos anos como grandes causadores de doenças como o câncer, doenças cardiovasculares e enfraquecimento do sistema imune. No organismo, os radicais livres apresentam importantes funções, porém, o excesso deles pode ser responsável por uma série de efeitos deletérios como peroxidação de lipídios da membrana, agressão às proteínas dos tecidos, às enzimas, carboidratos e ao DNA, causando danos na membrana e levando ao surgimento de câncer como consequência de alterações no DNA, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares entre outras.

Por isso, a busca de por novos compostos que possam ser empregados como forma de tratamento preventivo, curativo e/ou paliativo para processos inflamatórios, por exemplo, resultando de uma menor incidência de complicações ao paciente e que apresente um custo acessível se faz necessário (Franco, 2017).

A *Caesalpinia pyramidalis* é uma planta da flora Brasileira, endêmica da região Nordeste e já é largamente utilizada pela população. Pertencente à família fabaceae, é conhecida popularmente como catingueira ou casca de porco e apresenta grande importância para a população, sendo utilizada para os mais diversos fins, dentre os quais podemos destacar forrageiro, combustível, construção e medicinal (Chaves, 2016; LUCENA et al., 2012).

Estudos relatam que várias partes desta planta são utilizadas no tratamento de asma, bronquite, expectorante, gripe, infecção respiratória, tosse, diarreia, gastrite, indigestão, dor no estômago e cicatrização (AGRA et al, 2007, 2008; ALBUQUERQUE et al, 2007; CARTAXO et al, 2010). Tais propriedades levaram ao desenvolvimento de estudos e esta espécie foi submetida a ensaios biológicos que revelaram suas propriedades antimicrobianas, (LIMA et al., 2006; SARAIVA et al., 2012) gastroprotetoras (RIBEIRO et al., 2013), anti-inflamatórias (SANTOS et al., 2011), antinociceptivas (SANTOS et al., 2013) e antioxidante (Silva et al., 2012). Tais funções podem ser justificadas pela presença de moléculas que estão ligadas a essas atividades, tais como compostos fenólicos, alcaloides, esteroides, entre outros.

Com o crescente uso clínico de extratos vegetais e a necessidade do desenvolvimento de formulações para uso terapêutico, um novo problema começa a surgir, a segurança de uso destes extratos. A partir dessa demanda, a pesquisa a favor da verificação da citotoxicidade, toxicidade oral, mutagenicidade e genotoxicidade tornam-se atores principais na busca dessas novas formulações. Além disso, estudos complementares sobre a composição da planta, bem como atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória se faz necessário para verificar o quão promissor pode ser este extrato no uso terapêutico ou como adjuvante em alguma formulação. Por isso este trabalho teve por objetivo cumprir todas as demandas acima citadas.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Geral

Identificar o perfil fitoquímico, investigar a toxicidade e avaliar as propriedades antioxidante, antimicrobiana, antineoplásica, anti-inflamatória, genotóxica e mutagênica do extrato aquoso da casca de *Caesalpinia pyramidalis*.

1.1.2. Específicos

- Realizar extração a frio para obtenção do extrato aquoso de *C. pyramidalis* (CP Aq);
- Analisar o perfil fitoquímico de CP Aq através de técnicas como cromatografia em camada delgada (CCD), Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e Cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC);
- Quantificar o conteúdo total de fenóis e flavonoides presentes em CP Aq por métodos *in vitro*;
- Avaliar a atividade antioxidante de CP Aq por métodos distintos;
- Avaliar a atividade antimicrobiana de CP Aq contra bactérias gram-positivas e gram-negativas;
- Determinar a citotoxicidade de CP Aq frente a células saudáveis do sangue periférico – (PBMC);
- Determinar a citotoxicidade de CP Aq frente a várias linhagens tumorais;
- Avaliar a toxicidade aguda oral de CP Aq (in vivo);
- Avaliar a frequência de micronúcleos em eritrócitos de sangue periférico de camundongos tratados com CP Aq.
- Analisar a frequência de danos ao DNA, pelo ensaio cometa, em células sanguíneas de camundongos tratados CP Aq.
- Avaliar a atividade anti-inflamatória através do método NO de células de macrófagos RAW 267-4 tratados com CP Aq.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

PLANTAS MEDICINAIS

Há relatos do uso de plantas medicinais, pelo homem, desde a pré-história. Na caatinga nordestina, especificamente, essas plantas já estão inseridas na medicina popular pelas comunidades locais. Há uma vasta farmacopeia natural sendo utilizada por estas comunidades e a maioria destes recursos são oriundos dos vegetais explorados por estas populações nos ambientes que lá vivem. No Brasil, a utilização de plantas como fonte de medicamentos teve uma influencia nas culturas indígenas e africanas (Zeni, 2017). Os Pajés associavam o uso de plantas a rituais de magia e seus tratamentos eram transmitidos de uma geração a outra. Diante deste quadro, é possível observar a importância dessas plantas na aplicação medicinal de forma nacional e até mesmo internacional, pois estas apresentam um grande potencial terapêutico e econômico. Inteirar-se das possibilidades de uso, locais de aquisição e partes de uso das plantas é de extrema importância para garantir a integridade e conservação das espécies nativas (Cavalcanti-filho, 2018).

Vários estudos demonstram uma grande número de populações que utilizam, tradicionalmente, essas plantas medicinais de forma complementar, são as chamadas medicina alternativa e complementar (MAC) que vem sendo cada vez mais difundida pelas populações em todo o mundo. Essa demanda, cada vez maior repercutiu numa necessidade de integrá-las as políticas públicas de saúde, pois esta crescente demanda está relacionada com as limitações da medicina convencional (Zeni, 2017).

No mundo inteiro, têm sido estabelecidas políticas de desenvolvimento do uso das plantas medicinais e fitoterápicas principalmente com envolvimento da Organização Mundial da Saúde (OMS). Essas medidas visam o acesso ao conhecimento sobre as plantas, o respeito aos princípios de segurança e eficácia na saúde, a pesquisa de novos fitoterápicos e a conciliação de desenvolvimento socioeconômico e conservação ambiental (BRASIL, 2006). No Brasil foi elaborada uma Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), para o SUS em 2006. Segundo Amorim (2009) esse projeto consiste de uma política pública que visa ampliar o atendimento na Atenção Básica à Saúde, através da utilização das práticas integrativas e complementares à medicina convencional. De acordo com dados oficiais publicados pelo Portal da Saúde, a procura por tratamentos à base de plantas medicinais e

medicamentos fitoterápicos cresceu 161% entre os anos de 2013 e 2015 (PORTAL DA SAÚDE, 2016).

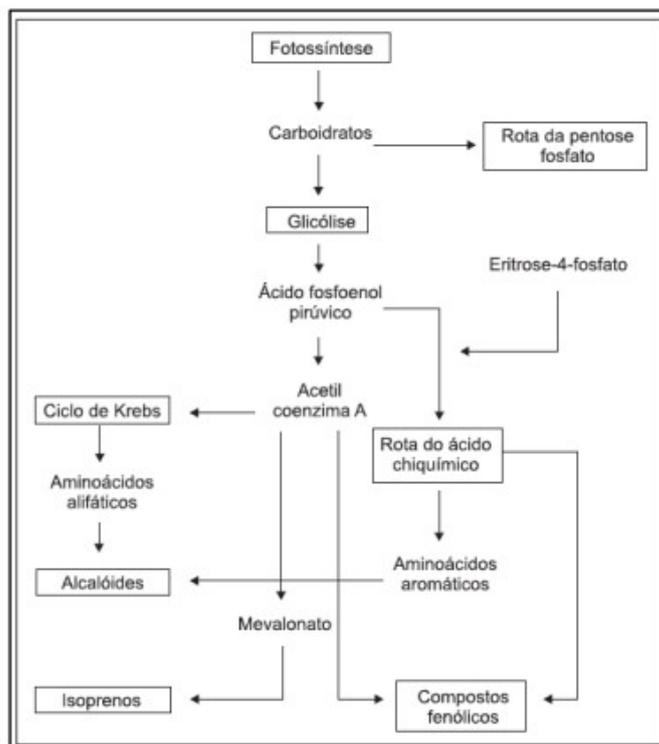
Em geral, a grande maioria dos organismos vivos, desde os microrganismos até aos milhares de células constituintes das plantas, são capazes de biossintetizar diversos compostos químicos necessários para o seu bom desenvolvimento e sobrevivência. Segundo Evans (2002) Estes compostos são divididos em duas categorias: os metabolitos primários, que são as substâncias químicas destinadas ao crescimento e desenvolvimento, tais como os hidratos de carbono, os aminoácidos, as proteínas e os lípidos, e que provêm do metabolismo primário; e os metabolitos secundários, que são o grupo de compostos que aumentam a capacidade global de sobrevivência, levando, no caso das plantas, à interação das mesmas com a vizinhança.

Muitas das experiências *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado os efeitos benéficos para a saúde humana, de alguns compostos com origem das plantas, normalmente designados por compostos bioativos. Esses compostos são responsáveis pelos efeitos medicinais ou até mesmo tóxicos, das plantas e apresentam extrema importância ecológica, uma vez que podem atuar na atração de polinizadores ou representar uma defesa química contra estresse ambiental (Azmir, 2013).

COMPOSTOS BIOATIVOS

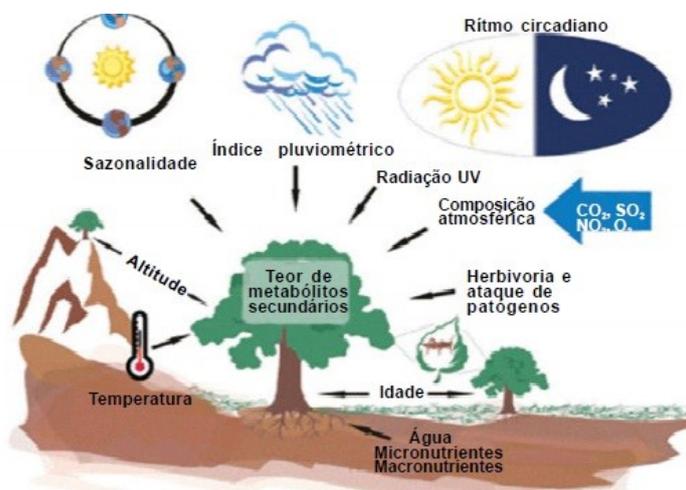
Como já citado acima, as plantas possuem compostos químicos que são divididos em metabolitos primários e secundários. Os metabólitos secundários das plantas, na maioria das vezes, são produzidos numa fase posterior ao seu crescimento e são formados por várias rotas biossintéticas (Figura 1) que formam moléculas com grande variedade de esqueletos estruturais, originando diversas classes de compostos, como: terpenos, flavonoides, cumarinas, quinonas, taninos, saponinas, alcaloides, entre outros. Sendo assim, não desempenha função direta ao crescimento da mesma. Com isso, a produção destes metabólitos é muitas vezes regulada pela necessidade específica de cada espécie, por exemplo, a produção de compostos voláteis pelas flores, para atração de insetos polinizadores, e a síntese de compostos tóxicos no sentido de afastar patógenos e herbívoros, e para suprimir o crescimento de plantas vizinhas (Bruneton, 1999).

Figura 1: Representação simplificada de algumas rotas biossintéticas para produção de metabólitos secundários (CASTRO et al., 2001).



A maioria dos princípios ativos de importância farmacológica encontrada nos extratos de plantas, de modo geral, é proveniente de uma variedade de metabólitos secundários (FERREIRA; PINTO, 2010, SILVA; LIMA, 2016). Essas moléculas contribuem para que as mesmas possam ter uma boa interação com os diferentes ecossistemas. Esses metabólitos despertam interesse não só pelas atividades biológicas produzidas pelas plantas em resposta aos estímulos do meio ambiente, mas pela imensa atividade farmacológica desses compostos (SILVA; LIMA, 2016; SHAKYA et al., 2017).

Figura 2: Fatores que podem interferir na composição química dos metabólitos secundários dos vegetais (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).



A síntese desses metabólitos secundários está diretamente ligada a um processo que está vinculado a várias etapas nativas influenciadas por algumas variáveis, tais como: temperatura, umidade, luminosidade, disponibilidade de água, macronutrientes, micronutrientes, radiação, sazonalidade, entre outras (Figura 2). Esses metabólitos secundários se apresentam numa interface que está diretamente ligada a planta e ao ambiente em que estão inseridas (SHAKY, 2017). Por isso, os fatores bióticos e abióticos podem interferir na qualidade e quantidade desses metabólitos secundários. *Habitats* repletos de agentes físicos, químicos e biológicos causadores de estresse representam constantes desafios a serem superados pelos organismos, com ativação das propriedades bioquímicas e genéticas para assegurar sua sobrevivência. Diversos metabólitos secundários têm sido validados quanto à eficácia biológica e farmacológica e à segurança de uso como compostos bioativos no desenvolvimento de novos produtos de interesse agroindustrial e farmacêutico. No entanto, a baixa produtividade em plantas nativas ou cultivadas é um fator limitante à produção sustentável e um obstáculo à comercialização desses compostos. Por isso, novas abordagens biotecnológicas estão sendo realizadas para suplantar tais limitações (França, 2017).

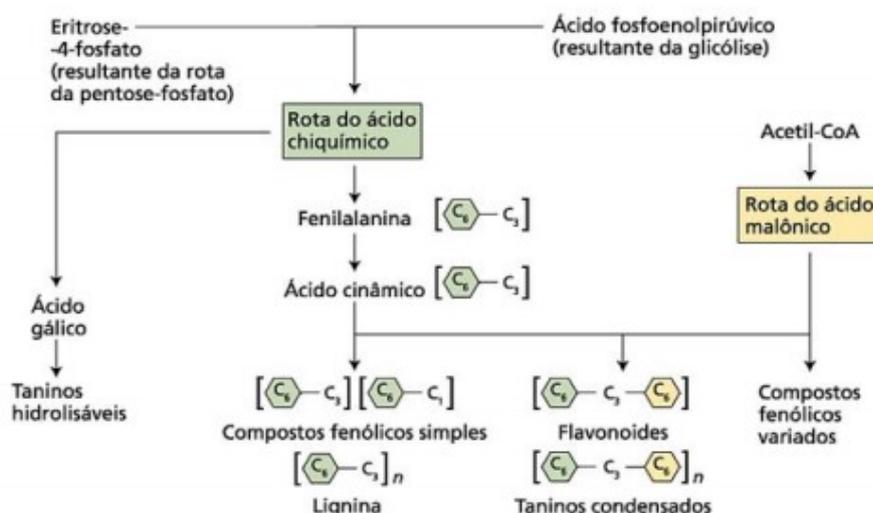
COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES

Os flavonoides, biossintetizados a partir da via dos fenilpropanoides, constituem uma importante classe de polifenóis presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais. Uma “substância fenólica ou polifenólica” é aquela que possui um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados e/ou seus derivados funcionais (ésteres, éteres, glicosídeos e outros) (Figura 3). Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (BRAVO, 1998).

Já são conhecidos mais de 8000 compostos pertencentes a este grupo de moléculas, os quais podem ser encontrados em diversas partes das plantas, como nas sementes, frutos, folhas, casca, caule e também na raiz (DREOSTI, 2000). Nesse sentido, os compostos fenólicos vem sendo cada vez mais estudados devido à propriedade antioxidante que essas substâncias apresentam em sequestrar radicais livres, os quais são extremamente prejudiciais a saúde humana. Os compostos fenólicos são

capazes de atuar como antioxidantes de várias formas. Por exemplo, os grupos hidroxilo dos fenóis são bons doadores de átomos de hidrogénio, podendo reagir com ROS e RNS, nas reações de terminação que quebram o ciclo de produção de novos radicais. Após a interação com as espécies reativas iniciais é produzida uma forma radicalar do antioxidante, que tem uma estabilidade muito maior do que o radical químico inicial (Pereira, 2009).

Figura 3: Esquema das rotas metabólicas que dão origem aos compostos fenólicos (TAIZ; ZEIGER, 2004).



Embora atualmente tenham sido introduzidas diversas técnicas empregando-se cromatografia/espectroscopia de alta eficiência na caracterização de flavonoides, as análises químicas elementares clássicas ainda podem ser usadas (Zucolotto, 2017).

A fartura e heterogeneidade dos flavonoides sugere que eles sejam de extrema importância para as plantas superiores. Contudo, não foi confirmada ainda a real necessidade para homem. Sabe-se que os humanos ingerem muitas gramas de flavonoides diariamente, já que são encontrados em frutas, cereais e em alguns corantes alimentares. O uso terapêutico de plantas contendo flavonoides é vasto e, na maioria das vezes, ainda empírico. Já existem medicamentos que são elaborados a partir de flavonoides e por isso pode ser utilizado como cofator da vitamina C e outras pesquisas sugerem que algumas classes de flavonoides sejam responsáveis por uma ação antitumoral, podendo, ainda, agir como antivirais, anti-hemorrágicos, hormonais, anti-inflamatórios, antimicrobianos e antioxidantes (Zuanazzi, 2017).

Em geral, os flavonoides não são considerados substâncias tóxicas, e algumas especialidades farmacêuticas relatam como isentos de toxicidade. Porém, atualmente não há respaldo na literatura científica para isentá-lo completamente de toxicidade. O que se sabe é que em doses elevadas poderiam induzir danos ao DNA (Trueba, 2001).

TANINOS

Há um grupo de compostos fenólicos denominados de taninos. Estes também fazem parte do grupo dos metabólitos secundários e são definidos como polímeros fenólicos solúveis em água que precipitam proteínas e possuem massa molecular entre 500 e cerca de 3000 Dalton. Historicamente, a importância das plantas ricas em taninos está ligada às suas propriedades de transformar a pele animal em couro e por vários anos esse processo requeria exclusivamente o uso de plantas taníferas. Plantas ricas em taninos podem ser usadas para o tratamento de diversas moléstias, como diarreias, pressão alta, reumatismo, hemorragias, feridas e problemas estomacais. Além disso, estes vem sendo utilizados contra os efeitos anti-séptico, antimicrobiano e inibitório da replicação do HIV (inibindo a transcriptase reversa, dificultando a replicação viral (YILDIRIM &KUTLU, 2015).

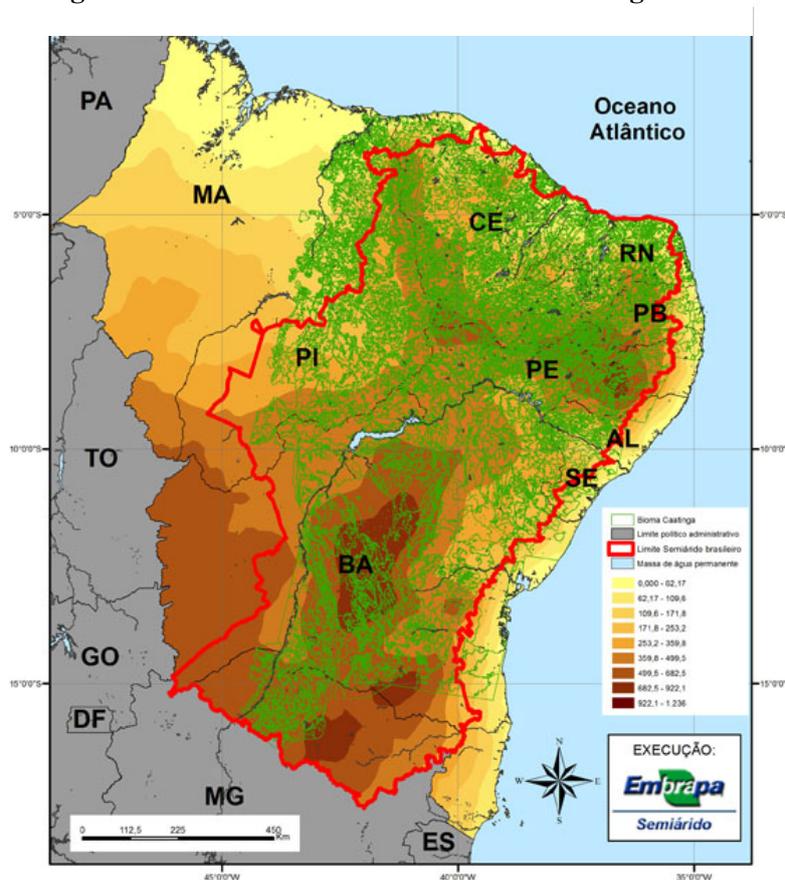
Acredita-se que as atividades farmacológicas dos taninos são derivadas, pelo menos em parte, a três características gerais que são comuns, em maior ou menor grau, aos dois grupos de taninos, os condensados e os hidrolisáveis. A capacidade dos taninos e de outros compostos fenólicos de serem antioxidantes é frequentemente citada como propriedade-chave na prevenção e/ou redução de doenças crônicas ligadas ao envelhecimento, que estão relacionadas com o estresse oxidativo (Haslam, 2007). Os taninos hidrolisáveis são ésteres de ácido gálico e elágico glicolisados, obtidos pela rota do chiquimato em que o grupo hidroxila do açúcar é esterificado com os ácidos fenólicos. Os ésteres do ácido hexaidroxidifênico são formados pelo acoplamento oxidativo fenólico de funções galoil catalisados pela enzima tipo lacase fenol oxidase (DEWICK, 2009).

O BIOMA CAATINGA

Segundo o ministério do meio ambiente (2011), a caatinga tem uma grande extensão e equivale a 11% do território nacional e 70% na região Nordeste. Englobam estados como, Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do

Norte, Piauí, Sergipe e o norte de Minas Gerais (Figura 4). Com isso percebe-se que a caatinga é uma formação vegetal, exclusivamente Brasileira (GIL, 2002). Para Rocha (2017) dentre os bioma brasileiros, a caatinga é a que possui uma vegetação mais heterogênea por conta da variação de temperatura e precipitação. Segundo PBMC (2015) os modelos climáticos para a Caatinga prevêm um aumento de 0,5 a 1 ° C na temperatura e uma diminuição de 10% a 20% na precipitação até 2040, e um aumento gradual na temperatura de 1,5 a 2,5 ° C e uma diminuição na precipitação entre 25% e 35% para o período 2041-2070 (MCTI, 2017).

Figura 4: Área de ocorrência do Bioma Caatinga



A vegetação da Caatinga é bastante diversificada sendo representada por aproximadamente 4.547 espécies, 159 famílias e 1.141 gêneros (FORZZA et al., 2013) e dessas, 318 espécies são consideradas endêmicas (PRADO, 2003; TABARELLI; SILVA, 2008; GIULIETTI et al., 2004). As principais famílias da Caatinga, no seu sentido mais restrito, considerando números de espécies, de acordo com Giulietti e colaboradores (2006) são: Leguminosae (278 espécies), Convolvulaceae (103 espécies),

Euphorbiaceae (73 espécies), Malpighiaceae (71 espécies), Poaceae (66 espécies) e Cactaceae (57 espécies).

Existem vários estudos que relatam a importância da medicina popular e essa diversidade do uso ocorre devido à disponibilidade local de cada planta (Revathi, 2010). Ainda sobre a diversidade da caatinga, Algumas dessas plantas medicinais conseguem sobreviver em condições adversas, inclusive após longos períodos de estiagem, e em meio a sua sobrevivência produzem um número maior de metabólitos secundários (SILVA, 2008).

Mesmo apresentando alta diversidade biológica, a caatinga é uma das vegetações que mais sofre com a interferência humana no Brasil, e vem suportando uma contínua devastação. Segundo estudos, foi verificado que aproximadamente 45% da sua vegetação original já havia sido desmatada (BRASIL, 2010).

A família Leguminosae consiste em uma das mais representativas da Caatinga, sendo constituída por 293 espécies que estão distribuídas entre suas três subfamílias, Faboideae, Caesalpinioideae e Mimosoideae (Giulietti et al. 2004). Entretanto, apenas oito (2,7%) das espécies encontradas nessa formação vegetacional (representando as subfamílias Faboideae e Caesalpinioideae) foram estudadas quanto à polinização e/ou ao sistema reprodutivo.

FAMÍLIA LEGUMINOSAE OU FABACEAE

A família Fabaceae ou Leguminosae, como também é conhecida, constitui uma das maiores famílias de Angiosperma do mundo, distribuídas em todo o globo. Segundo Lewis (2005) são reconhecidos cerca de 727 gêneros e 19.325 espécies. Ela é considerada a terceira maior família de angiosperma do planeta e a maior família botânica do Brasil, ocorrendo 2.826 espécies, sendo 1.524 endêmicas agrupadas em 222 gêneros encontrada amplamente na maioria das regiões e distribuídas por quase todas as vegetações (BFG, 2015). A presença de um grande número de espécie da família Fabaceae faz da Caatinga um diversificado ambiente pastoril que compõe o estrato herbáceo, arbustivo e arbóreo. As análises filogenéticas têm demonstrado que Fabaceae é uma família monofilética (Wojciechowski 2003, Wojciechowski et al. 2004). Ou seja, que consiste exclusivamente numa espécie ancestral e todos os seus descendentes.

Tabela 1: Classificação taxonômica da espécie *Caesalpinia pyramidalis*.

Reino: Plantae
Divisão: Magnoliophyta
Classe: Magnoliopsida
Ordem: Fabales
Família: Fabaceae
Gênero: <i>Caesalpinia</i>
Espécie: <i>pyramidalis</i>

Há anos atrás, as Leguminosas eram tratadas como apenas um grupo por BENTHAM (1865) formando uma única família contendo três subfamílias (Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae). Quase um século depois, HUTCHINSON (1964) e CRONQUIST (1981) propuseram que estas subfamílias fossem consideradas como famílias independentes. De acordo com o sistema APG IV (2016), as subfamílias são consideradas integrantes de uma única família (Fabaceae ou Leguminosae), posicionada na ordem Fabales, do clado Eurosids (Gomes, 2017).

Caesalpinia pyramidalis

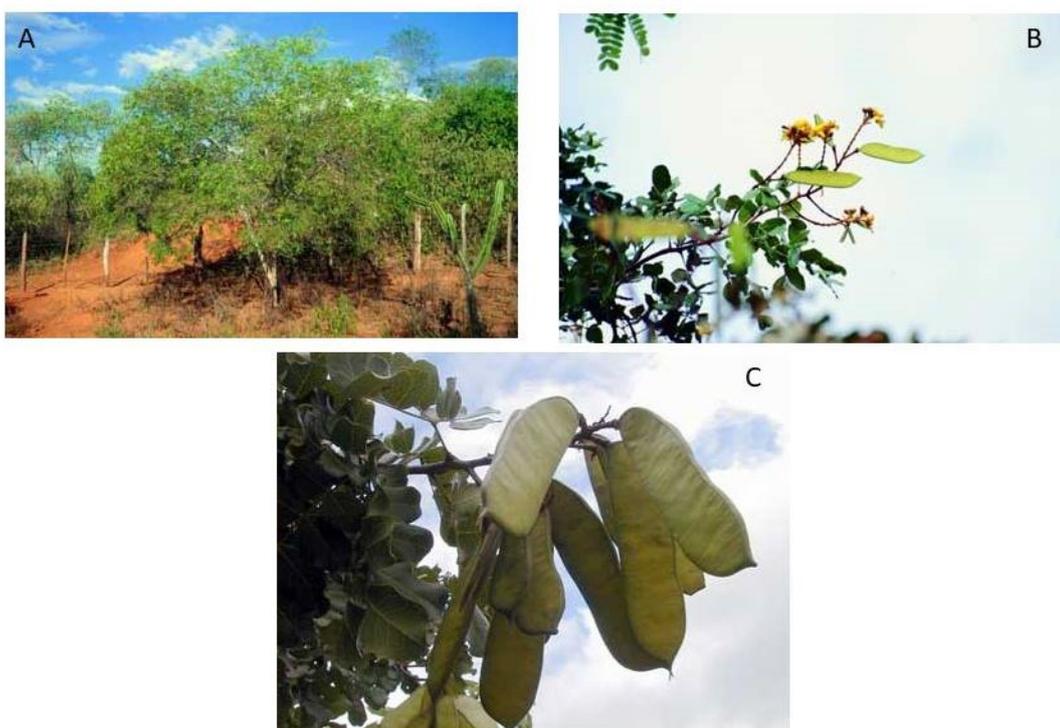
A *Caesalpinia pyramidalis* (figura 5) que é sinonímia com a *Poincianella pyramidalis* faz parte da família *Leguminosae caesalpinioideae* e é conhecida como catingueira, catinga-de-porco, casca de porco ou pau de rato, como é conhecida na Bahia. Há alguns anos houve uma reformulação taxonômica, fazendo com que a espécie *C. pyramidalis* passasse a integrar o gênero *Poincianella*, por isso desde 2010 ela vem sendo chamada de *Poincianella pyramidalis* (QUEIROZ, 2010).

Esta espécie está distribuída geograficamente com a mais ampla distribuição na caatinga, vegetando tanto nas várzeas úmidas como no Seridó semi-árido. Vegeta também no litoral, sertão e pés de serra. Ocorre nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e também Mato Grosso. Todas as suas partes são utilizadas, como por exemplo, sua madeira é Usada para estacas,

moirões e varas, na fabricação de carvão e lenha, bem como na confecção de cercas estivadas e cabos de ferramentas. As folhas jovens são procuradas pelo gado, mas são desprezadas quando adultas devido ao cheiro desagradável que adquirem; fenadas perdem esse cheiro, constituindo boa forragem para bovinos, caprinos e ovinos. Já as folhas maduras, flores e cascas são usadas no tratamento das infecções catarrais e nos distúrbios gastrointestinais (Matias, 2017).

Por todos esses motivos, a espécie *Caesalpinia pyramidalis* se mostrou extremamente promissora para que se pudesse explorar e desvendar as suas atividades biológicas e comprovar cientificamente seu uso popular.

Figura 5: A - Planta inteira da Catingueira; B - Detalhe do Galho com Folhas, Vargem nova e Flor (inflorescência) da Planta Catingueira; C - Detalhe do ramo terminal da planta Catingueira frutos em forma de vargem.



Algo que deve ser levado em consideração é a biologia reprodutiva da catingueira, pois a floração e frutificação dependem muito dos meses do ano. Após perder as flores na época da estiagem, a *C. pyramidalis* é a primeira a rebrotar com o início das chuvas e é no mês de agosto, onde geralmente se inicia a queda foliar e perdura até o mês de outubro, estando a planta em dormência de outubro a novembro,

com queda total de folhas (Maia, 2012; Matias, 2017). Com isso, muitas vezes a constituição química das plantas sofre os efeitos da sazonalidade e pode alterar a amplitude das ações biológicas desempenhadas por seus extratos e frações, o que representa um fator de dificuldade para padronização dos efeitos das plantas e pode gerar resultados não compatíveis com o que já está descrito na literatura (Figueiredo, 2010). *C. pyramidalis* apresenta uma grande importância para a população da região semiárida brasileira, devido a variedade de usos que possui, podendo-se destacar o uso como combustível, em construções, como forragem e o medicinal (LUCENA et al., 2012). Existe, acerca deste último, um grande arsenal de documentos na literatura comprovando tal uso, incluindo as várias partes desta planta, como, raízes, cascas, folhas e flores para o tratamento de diversas patologias, com maior ênfase para as doenças infecciosas e como anti- inflamatório e analgésico (ALMEIDA et al., 2006; AGRA et al, 2007a,b 2008; ALBUQUERQUE et al, 2007; CRUZ et al, 2007; BAHIA et al, 2010; SILVA, 2015).

Dessa forma é possível observar os resultados de vários autores (Quadro 1) a cerca das atividades da *C. pyramidalis*, principalmente o estudo fitoquímico dessa espécie. Alguns deles conseguiram identificar e isolar variadas substância, principalmente compostos fenólicos, o que conseqüentemente, gera uma variedade de atividades biológicas..

Quadro 1: Atividades biológicas testadas de *C. pyramidalis*

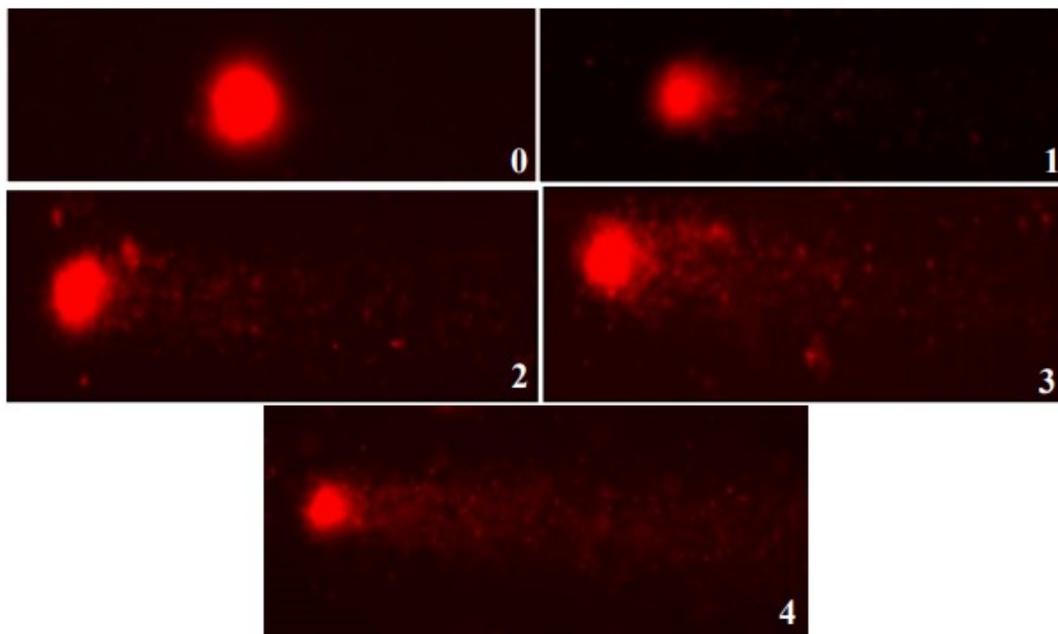
Partes da planta	Atividades biológicas avaliadas	Referências
Casca e folhas	Antibacteriana	Novais et al. (2003); Lima et al. (2006); Alviano et al. (2008); Saraiva et al. (2012a,b); Ribeiro et al. (2013)
Folhas	Antifúngica	Cruz et al. (2007); Barbosa Júnior et al. (2015)
Casca	Antioxidante	Alviano et al. (2008); Melo et al. (2010); Silva et al. (2011a)
Casca	Antiulcerogênica e Gastroprotetora	Ribeiro et al. (2013); Diniz et al. (2015)
Casca	Anti-inflamatória	Santos et al. (2011); Santana et al. (2012); Moraes et al. (2013).
Casca	Antinociceptiva	Santos et al. (2011); Santos et al., (2013a)
Casca e folhas	Radioprotetora	Santos et al. (2013b)
Folhas	Antihelmíntica	Borges-dos-Santos et al. (2012); Nunes (2012)

Chaves, 2016.

GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE

O efeito genotóxico de um composto pode ser avaliado por meio de ensaios que investiguem o dano cromossômico como o de eletroforese em gel, conhecido como ensaio cometa. Tal ensaio pode ser classificado numa escala visual de dano de acordo com a intensidade ou tamanho da cauda que vai de 0 (sem dano) a 4 (dano máximo) (Figura 6), que pode ser determinada utilizando-se microscopia (Collins, 2004). Genotoxicidade é a habilidade que algumas substâncias apresentam de induzir modificações no material genético do organismo a ele exposto. Essas substâncias interagem quimicamente com o material genético, causando alterações oxidativas ou mesmo quebras na molécula de DNA. Na maioria das vezes o dano é reparado pelo próprio organismo, caso ocorra um lesão e a mesma seja fixada, as alterações se perpetuam durante o processo de replicação (White; Rasmussen, 1998; Sasaki et al. 2000; Obe et al., 2002; Wasson; Mckelvey-Martin; Downes, 2008).

Figura 6: Classificação do dano do DNA das células analisadas por ensaio cometa. 0 (sem dano aparente); 1 (com pouco dano aparente); 2 (dano médio); 3 (dano médio com cauda mais longa) e 4 (dano máximo).



Rocha, 2015.

Já o efeito mutagênico se caracteriza pela indução de alterações transmissíveis e permanentes da quantidade ou da estrutura do material genético. Apesar de ocorrerem mutações espontâneas que surgem na ausência do efeito de um mutagênico conhecido, a

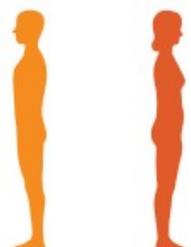
maioria delas é induzida por agentes físicos, químicos ou biológicos, aos quais os seres humanos e outros organismos podem ser expostos (Gameiro, 2005; Calviello et al., 2006). O potencial mutagênico pode ser determinado através de ensaio *in vitro* ou *in vivo*. Essencial no estudo da mutagênese, o teste do micronúcleo (MN) é um bioindicador do efeito clastogênico (quebra de cromossomos) ou aneugênico (segregação cromossômica anormal), revelando a instabilidade genômica (LINDBERG et al 2007; IarmarcovaI et al. 2009; Thierens; Vral, 2009; Mughal et al. 2010; Terradas et al. 2010).

ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER

A ocorrência do câncer vem crescendo em ritmo acelerado em todo o mundo. Segundo a organização pan-americana de saúde, o câncer é a segunda principal causa de morte no mundo e é responsável por 9,6 milhões de mortes em até mês de setembro de 2018. A nível global, uma a cada seis mortes estão relacionadas à doença. De acordo com a agência internacional de pesquisa em câncer (Iarc, do inglês International Agency for Research on Cancer) e da organização mundial de saúde (2018) em todo o mundo o número total de pessoas que vivem com o diagnóstico de câncer há 5 anos, chamado de prevalência dos 5 anos, é estimado em 43,8 milhões.

Na figura abaixo (figura 7), estão retratados os casos de câncer que mais ocorrem, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, que acometem homens e mulheres no Brasil. No sexo feminino, os cânceres de mama, colon e reto foram os mais frequentes. Já no mundo masculino, os cânceres de próstata, traqueia, brônquios e pulmão foram os mais frequentes no ano de 2018 (Brasil, INCA – 2018).

Figura 7: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma*. Fonte: BRASIL, INCA 2018.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	Homens		Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

O câncer não é uma doença nova, há comprovações, através das múmias egípcias, que ele já afetava o homem há mais de três mil anos antes de Cristo. Atualmente o câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças, que tem em comum o crescimento desordenado das células e tendem a invadir tecidos e órgãos vizinhos, podendo causar metástase. Carcinogênese ou oncogênese é o nome dado ao processo de formação do câncer, mas nem todo crescimento desordenado pode representar um câncer, muitas vezes a proliferação celular pode estar respondendo a necessidades específicas do corpo (ABC do câncer, 2018).

Dessa forma, há uma classificação sobre proliferação celular controlada ou não controlada. O que ocorre com a hiperplasia, displasia e metaplasia, por exemplo, são pequenas alterações nas células, em relação a proliferação, mas que pode ser rapidamente revertido com a ausência de estímulo fisiológico. Já no crescimento não controlado há uma massa anormal de tecido e se desenvolve de maneira quase autônoma persistindo dessa maneira excessiva após o término dos estímulos que o provocaram (ABC do câncer, 2018).

Independente da fase em que o câncer está há uma necessidade de classificação de cada caso em relação à extensão do tumor. Isso ocorre por que duas pessoas podem ter o mesmo tipo de câncer, mas o estadiamento ser diferente, que é como é chamada essa classificação. Porém, existe mais de 100 tipos de câncer, cada um com características clínicas e biológicas diversas, que devem ser estudadas para que o diagnóstico, o tratamento e o seguimento sejam adequados (ABC do câncer, 2018).

Com isso, está cada vez mais forte a procura do tratamento que seja menos danoso ao ser humano, onde as consequências físicas, psíquicas e emocionais sejam cada vez menores.

MÉTODOS ANTINEOPLÁSICOS

Os ensaios genotóxicos e mutagênicos devem ocorrer, para garantir a segurança terapêutica de um agente neoplásico, onde se deve comprovar que o seu uso não traz agravos à saúde humana por meio de estudos farmacológicos, histopatológicos e toxicológicos (AQUINO, 2010).

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2018), as doenças e agravos não transmissíveis (DANT) já são as principais responsáveis pelo adoecimento e óbito da população no mundo. O aumento no número de casos tem despertado interesse na busca de tratamentos mais eficazes na terapia do câncer. As terapias aplicadas hoje são cirurgias e métodos antineoplásicos como as radioterapias e quimioterapias (Wayteck et al., 2014). Porém esses métodos na maioria das vezes são bem sucedidos, mas pode haver lesão e até mesmo erradicação de células saudáveis, particularmente as células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico, pois as drogas utilizadas como agentes antineoplásicos atuam de forma não específica (De Almeida et al., 2005; Wayteck et al., 2014).

Com base nisso, se faz necessário o estudo de novos agentes antineoplásicos, que podem ser biomoléculas vegetais, com o intuito que sejam mais seletivos e tragam menos prejuízo aos pacientes (Nath, 2016).

ESTRESSE OXIDATIVO E RADICAIS LIVRES

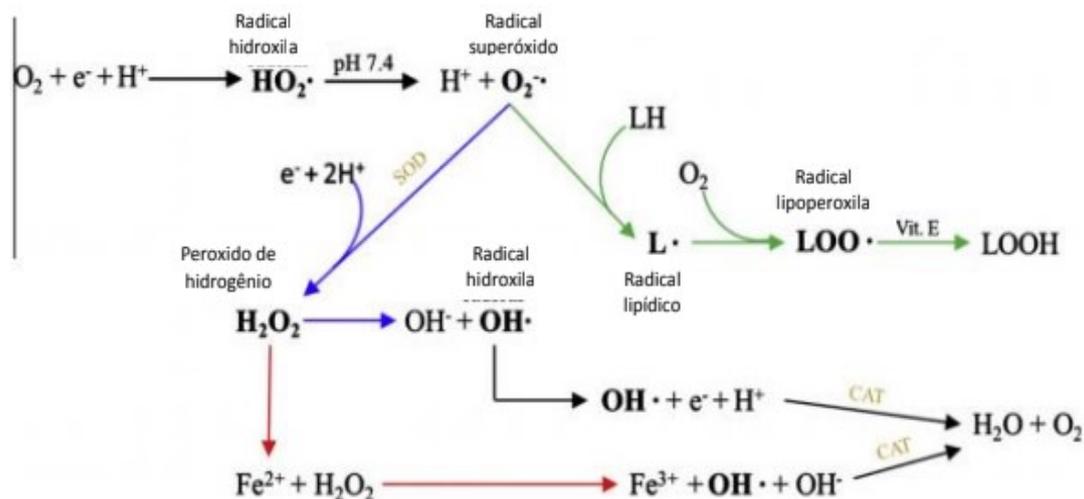
Os radicais livres são espécies químicas (átomos ou grupo de átomos), moléculas ou íons com elétrons não emparelhados que são altamente instáveis e ativos para reações químicas com outras moléculas. A geração de radicais livres constitui um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas (BARBOSA, K.B.F. et al, 2010).

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos culminou no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante. Estes têm o objetivo de limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência de danos decorrentes. Alguns fatores externos são responsáveis pela promoção dos radicais livres, tais como: o fumo, os poluentes ambientais, a radiação, o uso excessivo de medicamentos, os pesticidas (CHANDRA et al., 2010).

Segundo Lobo (2010), esses radicais são produzidos como uma parte normal do metabolismo, dentro da mitocôndria, através da xantina-oxidase, nos peroxissomos, nos processos inflamatórios, na fagocitose, isquemia, e no exercício físico.

Em condições fisiológicas, os organismos aeróbicos metabolizam 85% a 90% do oxigênio (O₂) consumido na mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons. Os restantes 10% a 15% são utilizados por diversas enzimas oxidases e oxigenases e, ainda, por reações químicas de oxidação direta (SCHNEIDER, C.D., 2004). Os radicais livres derivam de três elementos, oxigênio, nitrogênio e enxofre, dando origem a espécies reativas de oxigênio (EROs) (Figura 8), espécies reativas de nitrogênio e (ERNs) e espécies reativa de enxofre (ERSs). EROs incluem os radicais livres como o ânion superóxido (O₂⁻), radical hidroperoxil (HO₂·), radical hidroxila (·OH), o óxido nítrico (NO), e outras espécies, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), oxigênio singlete (1O₂), ácido hipocloroso (HOCl) e peroxinitrito (ONOO⁻). ERNs derivam de NO através da reação com O₂ e formação de ONOO⁻, já as ERSs são facilmente formadas por meio da reação com radicais tióis com qualquer umas das EROs (CAROCHO, M., 2013).

Figura 8: Descrição geral das reações que conduzem à formação de ROS. Setas verdes representam a peroxidação lipídica. Setas azuis representam as reações Haber-Weiss e as setas vermelhas representam as reações de Fenton. As letras em negrito representam radicais livres. SOD - enzima superóxido-dismutase, CAT - enzima catalase. Adaptado de Ferreira et al. (2009) e Flora (2009).



Segundo Henriques (2004) o estresse oxidativo pode ocorrer devido a uma redução nos níveis de defesa elevada velocidade na produção de espécies reativas ou uma junção de ambos. Normalmente, quando ocorre tal estresse o organismo apresenta duas possibilidades de ação. A primeira é se adaptando e a segunda, passando pelo dano

celular. GUTTERIDGE (2007) afirma que há duas formas desse estresse oxidativo atuar, podendo ser de forma leve, que a célula habitualmente se adapta, e a muito forte, quando o dano pode provocar uma morte celular. Por essa razão, as células possuem mecanismos antioxidantes para atacar possíveis efeitos deletérios, transformando as espécies reativas em compostos inativos.

DEFESA ANTIOXIDANTE

Com o passar dos anos a busca por substância que possam diminuir o risco do desenvolvimento de doenças crônicas provocadas pelo estresse oxidativo só aumenta (LIMA et al., 2012). É nesse contexto que as substância antioxidantes estão inseridas, pois um dos mecanismos em que estas atuam é impossibilitando a formação dos radicais livres, principalmente inibindo as reações em cadeia, onde o ferro e o cobre participam (ABRAHÃO et al., 2010). Segundo Lima et al (2012) há um outro mecanismos: o de reparo. É nele que ocorre a eliminação de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas. As substâncias de origem vegetal estão entre as mais promissoras que apresentam atividade antioxidante, já que muitas delas são ricas em polifenóis, flavonóides, alcalóides, terpenos, carotenoides, entre outros (Chaves, 2016).

Inúmeras moléculas antioxidantes têm apresentado algumas atividades biológicas, tais como antimicrobiana, antiparasitária, antifúngica entre outras. O nosso organismo pode adquirir tais moléculas através da alimentação, pois alguns alimentos são ricos em vitaminas (C e pró vitamina A) e compostos fenólicos que advem de alimentos vegetais (PIETTA, 2000; BARREIROS et al.,2006).

POTENCIAL ANTIMICROBIANO

A descoberta de fármacos antimicrobianos marcou uma nova fase no tratamento de doenças infecciosas, isso aconteceu durante a segunda guerra mundial, com o desenvolvimento da penicilina (WRIGTH, 2010). Desde então, esses fármacos estão entre os mais consumidos, estimando-se que desde a década de 1940, aproximadamente 1 milhão de toneladas tenha sido consumido, causando problemas como desequilíbrio da ecologia humana e a resistência microbiana (MOELLERING JR, 2000; ANDERSSON e HUGHES, 2010).

No mundo inteiro doenças bacterianas causam profundos impactos econômicos na saúde pública, especialmente em regiões tropicais e em pacientes imunodeficientes ou imunossuprimidos (SARAIVA, 2007). Por isso, estudos etnofarmacológicos vêm orientando à pesquisa para a descoberta de potentes antibióticos a partir de espécies vegetais usadas frequentemente pelas comunidades tradicionais, como no Brasil, que mantêm programas de triagem de produtos naturais para esta atividade (SARTORATTO et al., 2004). Como as plantas medicinais são capazes de produzir uma variedade de substância com ação antimicrobiana, é esperado que esses compostos sejam utilizados como atores principais no desenvolvimento de novas drogas.

Os métodos mais comuns para identificar atividades antimicrobianas são o método de difusão em Agar (CLSI, 2014) e a determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) (CLSI, 2014).

3. MÉTODO

A metodologia utilizada nesta tese, está descrita especificamente em cada artigo.

4. RESULTADOS

ARTIGO 1: COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO EXTRATO AQUOSO DA CASCA *Caesalpinia pyramidalis*

Esse artigo será submetido à revista **Journal of Ethnopharmacology**, com o fator de impacto (F.I) – 3.115 e o Qualis Capes B1

COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO EXTRATO AQUOSO DA CASCA *Caesalpinia pyramidalis*

Hortência Farias de Andrade¹; Barbara de Azevedo Ramos¹; Luís Cláudio Nascimento da Silva³; Túlio Diego da Silva² Márcia Vanusa da Silva¹; Maria Betânia Melo de Oliveira¹; Maria Tereza dos Santos Correia¹

¹ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

² Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, Recife, Pernambuco, Brasil.

³ Pós-Graduação em Biologia Parasitária, Laboratório de Imunologia e Microbiologia das Infecções Respiratórias, Universidade Ceuma, São Luís, Brazil

Resumo

Os radicais livres possuem diferentes papéis no organismo, estando envolvidos em processos fisiológicos naturais. Com a produção contínua destes radicais surgiu o mecanismo de defesa antioxidante, no qual os óleos essenciais apresentam elevado potencial. Extratos aquosos de diferentes tecidos vegetais vêm sendo amplamente investigados por suas propriedades farmacológicas. A caracterização química destes extratos permite a identificação de possíveis marcadores químicos e preconiza moléculas com alto potencial bioativo, por exemplo, os flavonóides que são metabólitos secundários com elevada importância farmacológica, por atuar na prevenção de doenças degenerativas. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante de cascas de *Caesalpinia pyramidalis*, bem como investigar sua composição química. Para isso foram utilizados os métodos como cromatografia líquida em camada delgada (CCD), Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas (UPLC/MS), adicionalmente foram utilizados métodos DPPH, ATT, FRAP e Peroxidação lipídica para verificar a atividade antioxidante do extrato testado. Na identificação do perfil fitoquímico, o extrato aquoso de casca de *C. pyramidalis* (CP Aq) revelou a presença de flavonoides, cumarinas, Lignanais, saponinas, taninos hidrolisáveis, triterpenos e esteroides. Na determinação do teor total de fenóis e flavonoides, CP Aq apresentou um conteúdo fenólico total de $216,02 \pm 11,30$ mg EAG/g de extrato e um conteúdo de flavonoides totais de $43,46 \pm 1,98$ mg EQ/g de extrato. A atividade antioxidante o ensaio de redução do radical DPPH, CP Aq apresentou um IC₅₀ de $32,52 \mu\text{g/mL}$. Na avaliação da atividade antioxidante total pelo método de formação do complexo fosfomolibdênio, o extrato apresentou uma atividade antioxidante de $42,57 \pm 2,83$ e no ensaio de inibição da peroxidação lipídica, uma atividade de inibição maior que BHT e muito próxima da quercitina. O método UPLC/MS, identificou o ácido gálico e ácido elágico, o que justifica o grande potencial antioxidante desta planta. Com isso, conclui-se que o extrato aquoso de *C. pyramidalis* tem um excelente potencial oxidante devido a presença dos flavonoides, como ácido gálico e ácido elágico que está presente de forma majoritária.

Introdução

Os radicais livres são espécies químicas (átomos ou grupo de átomos), moléculas ou íons com elétrons não emparelhados que são altamente instáveis e ativos para reações químicas com outras moléculas. A geração de radicais livres constitui um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas (BARBOSA, K.B.F. et al, 2010).

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos culminou no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante. Estes têm o objetivo de limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência de danos decorrentes. Alguns fatores externos são responsáveis pela promoção dos radicais livres, tais como: o fumo, os poluentes ambientais, a radiação, o uso excessivo de medicamentos, os pesticidas. Por outro lado, o termo antioxidante é antigo e no início era aplicado para a descrição de inibidores de processos oxidativos, os quais são capazes de reagir com radicais peróxil. Atualmente, este termo é frequentemente aplicado a todos os inibidores de radicais livres (CHANDRA et al., 2010).

Os antioxidantes são substâncias que, mesmo presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidante, podem atrasar ou inibir as taxas de oxidação (Lima, F.O., 2012). Extratos aquosos de diferentes tecidos vegetais vêm sendo amplamente investigados por suas propriedades farmacológicas (Paiva, 2010). *Caesalpinia pyramidalis* é uma planta endêmica do Nordeste, principalmente da região da caatinga. Tradicionalmente as partes utilizadas são: flores e cascas para o tratamento de processos inflamatórios, mas sabe-se que essas partes também são aplicadas em outras atividades biológicas, bem como afecções respiratórias (asma e bronquite), aumento da libido (afrodisíaco), cólicas, febre, diabetes e afecções do trato gastrointestinal (gastrite, disenterias, diarreias) e disenterias, e suas folhas usadas como antipirético, diurético e no tratamento de afecções digestiva (Ribeiro, 2013).

Em estudo realizado por Silva et al. (2011) foi observado que a *C. pyramidalis* possui elevado teor de compostos fenólicos, tanto nas folhas como na casca e ação antioxidante superior ao flavonóide rutina. Porém a maioria dos trabalhos da literatura trazem resultados de extratos etanólicos e por isso o objetivo deste trabalho foi a

investigação da composição química, com ênfase nos teores de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, bem como o potencial antioxidante do extrato aquoso de *C. pyramidalis*.

Materiais e Métodos

Obtenção do extrato aquoso

As cascas da planta *Caesalpinia pyramidalis* (CPAq) foram coletadas no Parque nacional do vale do Catimbau, em Buíque, Pernambuco. O material foi colocado na estufa de circulação de ar forçado a 45°C por um período de quatro dias. A amostra foi identificada conforme as técnicas taxonômicas habituais e depositado no Herbário IPA, Instituto Agrônômico de Pernambuco. O material vegetal foi processado em moinho de bancada seguido de extração por agitação (6h) e sonificação em água destilada para obtenção do extrato aquoso e posteriormente liofilizado.

Avaliação Fitoquímica

Cromatografia em Camada Delgada

O estudo do perfil fitoquímico do extrato aquoso de casca de *Caesalpinia pyramidalis* foi determinado por cromatografia em camada delgada de sílica gel. As metodologias utilizadas para identificar as classes de metabólitos secundários presentes no extrato aquoso de *C. pyramidalis* estão descritas na tabela a seguir (Tabela 1).

Identificação de compostos fenólicos através da Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

A identificação dos compostos fenólicos presentes na amostra foi determinada através de Cromatografia Líquida de Alta Performance (Agilent 1260 Infinity) usando uma coluna Zorbax SB-C18, 4,6 mm ID x 250 mm (5 µm) com temperatura de 30 °C. A separação cromatográfica foi realizada usando a fase móvel de gradiente: A (água acidificada) e B (acetonitrila), 0-15 min = 92% de A e 8% de B, 16-30 min = 65% de A e 35% de B, com fluxo de 2,4 mL/min, usando detector UV à 254 nm, em um volume de injeção de 5 µL. A identificação de cada composto foi estabelecida pelo tempo de retenção e pela comparação do espectro UV dos picos obtidos da amostra com os

previamente obtidos pela injeção dos padrões puros (Sigma Aldrich): ácido caféico, ácido clorogênico, ácido gálico, ácido elágico, ácido trans-ferúlico, catequina, quercetina e rutina.

Tabela 1: Sistemas e reveladores utilizados na cromatografia em camada delgada para identificação dos metabólitos secundários presentes no extrato aquoso *C. pyramidalis*.

Classe de Metabólitos Secundários	Padrões	Sistema de eluição	Revelador	Referências
Flavonoides, derivados cinâmicos e fenilpropanoglicosídeos	Quercetina, rutina e ácido clorogênico	AcOEt-HCOOH-AcOHH ₂ O (100:11:11:27 v/v)	NEU	Wagner & Bladt (1996) Brasseur & Angenot, (1986)
Triterpenos e Esteroides	β -sitosterol	Tolueno:AcOEt (90:10 v/v)	Lieberman & Burchard	Harborne (1998)
Mono e Sesquiterpenos	Timol	Tolueno:AcOEt (97:3 v/v)	Anisaldeído sulfúrico	Harborne (1998)
Cumarinas e Quinonas	Cumarina e lapachol	CHCl ₃ -MeOH (98:2 v/v)	KOH	Wagner & Bladt, (1996)
Alcaloides	Pilocarpina	AcOEt-HCOOH-AcOHH ₂ O (100:11:11:27 v/v)	Dragendorff	Wagner & Bladt, (1996)
Proantocianidinas condensadas Leucoantocianidinas	Catequina	AcOEt-HCOOH-AcOHH ₂ O (100:11:11:27 v/v)	Vanilina clorídrica	Roberts et al (1957)
Taninos hidrolisáveis	Ácido gálico	n-BuOH-H ₂ O-AcOH (40:50:10 v/v)	Alúmen de ferro 1%	Xavier (2002) Stiasny (1912)

Condições em UPLC-MS (cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas)

A cromatografia foi realizada com um cromatógrafo líquido de ultra performance (UPLC) Acquity H-Class (Waters). Foi empregada uma coluna BEH 2,1 x 100 mm e tamanho de partícula de 1,7 μ m. As fases móveis utilizadas consistiram de solução aquosa contendo 2% de MeOH, 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 0,25 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 foi feita através do software MassLynx™ (Waters).

Dosagem de Fenóis Totais

O conteúdo de fenóis totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu descrito por Li et al. (2008) com algumas adaptações. O extrato aquoso de *C. pyramidalis* foi dissolvido em água e testado na concentração de 1 mg/mL. No procedimento de dosagem (triplicata) 0,1 mL da solução de Folin foi misturado a 0,02 mL das amostras. Após 3 minutos, 0,08 mL de carbonato de sódio a 7,5% foi acrescentado as amostras, que em seguida ficaram em repouso e protegidas da luz por 120 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, a leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro à 765 nm. O branco da amostra foi obtido através da mistura de todos os reagentes citados acima, exceto o analito (extrato). O ácido gálico foi dissolvido em metanol e diluído em diferentes concentrações (0 – 1000 µg/mL) e utilizado para construir uma curva de calibração, preparada através da representação gráfica da absorbância em função da concentração, encontrando assim a seguinte equação linear ($y = 0,0114x + 0,0611$, $R^2 = 0,9917$). O conteúdo de fenóis totais no extrato foi determinado a partir da curva de calibração e expresso em miligramas equivalente de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG / g de extrato).

Dosagem de Flavonoides

O conteúdo total de flavonoides foi determinado pela técnica colorimétrica com cloreto de alumínio descrita por Woisky & Salatino (1998) com algumas adaptações. O

extrato aquoso de *C. pyramidalis* foi dissolvido em metanol e testado na concentração de 1 mg/mL. No procedimento de dosagem (triplicata), 0,1 mL da solução de cloreto de alumínio 67 (2 g de cloreto de alumínio diluído em etanol a 2%) foi misturado a 0,1 mL das amostras e em seguida ficaram em repouso e protegidas da luz por 60 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, a leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro à 420 nm. O branco da amostra foi obtido através da mistura de todos os reagentes citados acima, exceto o analito (extrato). A quercetina foi diluída em metanol em diferentes concentrações (0 – 100 µg/mL) e utilizada para construir uma curva de calibração, preparada através da representação gráfica da absorvância em função da concentração, encontrando assim a seguinte equação linear ($y = 0,005x + 0,0787$, $R^2 = 0,9927$). O conteúdo total de flavonoides foi determinado a partir da curva de calibração e expresso em miligramas equivalente de quercetina por grama de extrato (mg EQ / g de extrato).

Atividades Antioxidantes

Sequestro de Radicais Livres (DPPH●)

A atividade de sequestro do radical livre DPPH foi determinada pelo método descrito por Blois (1958). Esta técnica foi medida na forma de doação de hidrogênio usando o radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). O extrato aquoso de *C. pyramidalis* e os compostos de referência (Quercetina, Ácido Gálico e BHT) foram dissolvidos em água destilada e metanol respectivamente, e testados nas seguintes concentrações (1000 – 500 – 250 – 125 – 62,5 e 31,25 µg/mL). No ensaio (triplicata), 0,25 mL da solução de DPPH foi misturado a 0,04 mL das amostras, que em seguida ficaram em repouso e protegidas da luz por 25 minutos a temperatura ambiente. Após o tempo determinado, a leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro à 517 nm. O branco da amostra foi obtido pela mistura de 0,04 mL de cada concentração do extrato com 0,25 mL do solvente utilizado para dissolvê-lo (água destilada).

O controle do teste foi obtido pela mistura de 0,04 mL de água destilada (extrato) ou 0,04 mL de metanol (compostos de referência) com 0,25 mL da solução de DPPH. O sequestro de radicais livres foi calculado pela seguinte fórmula: $SRL [DPPH] (\%) = [(Aa - Ac) / Ac] \times 100$, onde: Aa = Absorvância da amostra e Ac = Absorvância

do controle. A partir dos resultados obtidos, foi calculado o IC50 da amostra por regressão linear utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.0.

Atividade Antioxidante Total (ATT)

A atividade antioxidante total foi determinada através do método descrito por Prieto et al (1999). Esta técnica fundamenta-se na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) ocorrida em presença de determinadas substâncias com capacidade antioxidante, com formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio (V), em pH ácido, o qual é determinado espectrofotometricamente a 695 nm. O extrato aquoso de *C. pyramidalis* e os compostos de referência (Quercetina, Ácido Gálico e BHT) foram dissolvidos em água e metanol respectivamente, e testados na concentração de 1 mg/mL. No ensaio (triplicata), 0,1 mL das amostras foram misturados com 1 mL do reagente de trabalho (600 mM de ácido sulfúrico, 28 mM de fosfato de sódio e 4 mM de molibdato de amônio). O branco do teste foi obtido pela mistura de 0,1 mL de água destilada (extrato) ou 0,1 mL de metanol (compostos de referência) com 1 mL do reagente de trabalho. Em seguida, todas as amostras foram incubadas em banho-maria à 95 °C por 90 minutos.

Após retornarem a temperatura ambiente, a leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro à 695 nm. A atividade antioxidante total foi expressa em relação ao ácido ascórbico (considerado como 100% de atividade antioxidante) e calculada pela seguinte fórmula: $ATT (\%) = [(Aa - Ac) / (Aaa - Ac)] \times 100$, onde: Ac = Absorbância do controle, Aa = Absorbância da amostra e Aaa = Absorbância do ácido ascórbico.

Redução do Íon Férrico (FRAP)

A atividade antioxidante por meio da redução de íons de ferro foi determinada pelo método descrito por Benzie et al. (1996), com algumas modificações. O extrato aquoso de *C. pyramidalis* e os compostos de referência (Quercetina, Ácido Gálico e BHT) foram dissolvidos em água e metanol respectivamente, e testados na concentração de 1 mg/mL. O reagente de trabalho (FRAP) foi preparado a partir da mistura do tampão acetato 300 mM em pH 3,6 (3,1 g de acetato de sódio em 16 mL de ácido acético) com a solução de TPTZ 10 mM (3,2 g de 2,4,6-Tris (2-pyridyl)-s-triazine em HCl 40 mM) e solução de cloreto férrico 20 mM na proporção de 10:1:1 (v/v). No ensaio (triplicata), 0,02 mL das amostras foram misturados a 0,180 mL do reagente de

trabalho (FRAP) e em seguida foram incubadas à 37 °C por 30 minutos, protegidas da luz.

Posteriormente, a leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro à 593 nm. O sulfato ferroso (FeSO₄) em diferentes concentrações (0 - 1000 µg/mL) foi utilizado para construção da curva de calibração e obtenção da seguinte equação linear: $y = 0,0054x + 0,1465$, $R^2 = 0,9847$. Os resultados foram expressos em miligramas equivalente de sulfato ferroso por grama de extrato (mg FeSO₄ (II) / g de extrato).

Inibição da Peroxidação Lipídica (LPIC)

O método do tiocianato férrico foi utilizado para avaliar a capacidade de inibição da peroxidação lipídica descrita por Mitsuda et al. (1967) com algumas modificações. Este ensaio monitora a quantidade de peróxido de hidrogênio no início da peroxidação lipídica, na qual o peróxido reage com o cloreto férrico e forma o íon férrico, que junta-se ao tiocianato de amônio causando a formação de tiocianato férrico, substância de cor vermelha.

O extrato aquoso de *C. pyramidalis* e os compostos de referência (Quercetina, Ácido Gálico e BHT) foram dissolvidos em água e metanol respectivamente, e testados na concentração de 1 mg/mL. No ensaio (triplicata), 0,2 mL das amostras foram misturados a 0,2 mL da solução de ácido linoleico (2,5 M), 0,4 mL de tampão fosfato (20 mM, pH 7) e 0,2 mL de água destilada (Volume final = 1 mL). Em seguida, as amostras foram incubadas à 40 °C por 24 horas, protegidas da luz. Após o período de incubação, 0,05 mL da solução preparada acima foi acrescentada de 0,05 mL de etanol à 75%, 0,05 mL da solução de tiocianato de amônio (0,3 M) e 0,05 mL da solução de cloreto de ferro (20 mM). Após 3 minutos, a leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro à 500 nm.

A mistura inicial voltou para incubação nas mesmas condições descritas anteriormente e o ensaio foi realizado a cada 24 h. Todo o procedimento ficou sendo repetido até o controle do teste (ácido gálico) atingir sua absorvância máxima. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da peroxidação lipídica e calculados pela seguinte fórmula: $I (\%) = [(Ac - Aa) / Ac] \times 100$, onde: Ac = Absorvância do controle, Aa = Absorvância da amostra.

Resultados e Discussões

Ensaio Químico

A caracterização química dos extratos vegetais tem como principal finalidade conhecer e identificar marcadores químicos responsáveis pelo potencial bioativo presente nas plantas. Por exemplo, os flavonóides são metabólitos secundários que têm uma extensa importância farmacológica, pois atuam na prevenção de patologias degenerativas (Cordeiro, 2018). O perfil fitoquímico do extrato aquoso de *C. pyramidalis* (CP Aq) foi obtido através de cromatografia em camada delgada e está descrito na tabela 2, onde é possível observar que CP Aq revelou a presença de flavonoides, cumarinas, lignanas, saponinas, taninos hidrolisáveis, triterpenos e esteroides. Não foi detectada a presença de alcaloides, antocianinas e antraquinonas o que pode ser justificado e relacionado com os fatores abióticos naturais e sazonalidade, ciclo circadiano, temperatura, homeostase hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, poluição atmosférica, ataque a patógenos, estágio de desenvolvimento da planta entre outras (Gobbo-Neto & Lopes, 2007; Chaves, 2013).

Tabela 2: Perfil fitoquímico do extrato aquoso de ramos de *Caesalpinia pyramidalis*

METABÓLITOS	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
Alcaloides gerais	-
Antocianinas	-
Antraquinonas	-
Compostos Fenólicos (Flavonoides)	++
Cumarinas	++
Derivados Antracênicos	+
Lignanas	++
Mono, sesqui e diterpenos	+
Naftoquinonas	+
Saponinas	+++
Taninos Condensados	-
Taninos Hidrolisáveis	+++
Triterpenos e Esteroides	+++
Xantinas	+

provavelmente correspondeu ao ácido gálico em comparação com o tempo de retenção do padrão (10,73 min; Fig. 1A). Já os demais picos não foram identificados pelo método utilizado, possivelmente por uma incompatibilidade de métodos e/os padrões. Segundo Rocha (2015) a técnica de HPLC é uma importante técnica para uma análise preliminar de identificação e rastreio, mas que há algum tempo vem sendo substituída por novos detectores, como o HPLC-DAD, que é capaz de detectar vários comprimentos de onda ou a mais recente cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC).

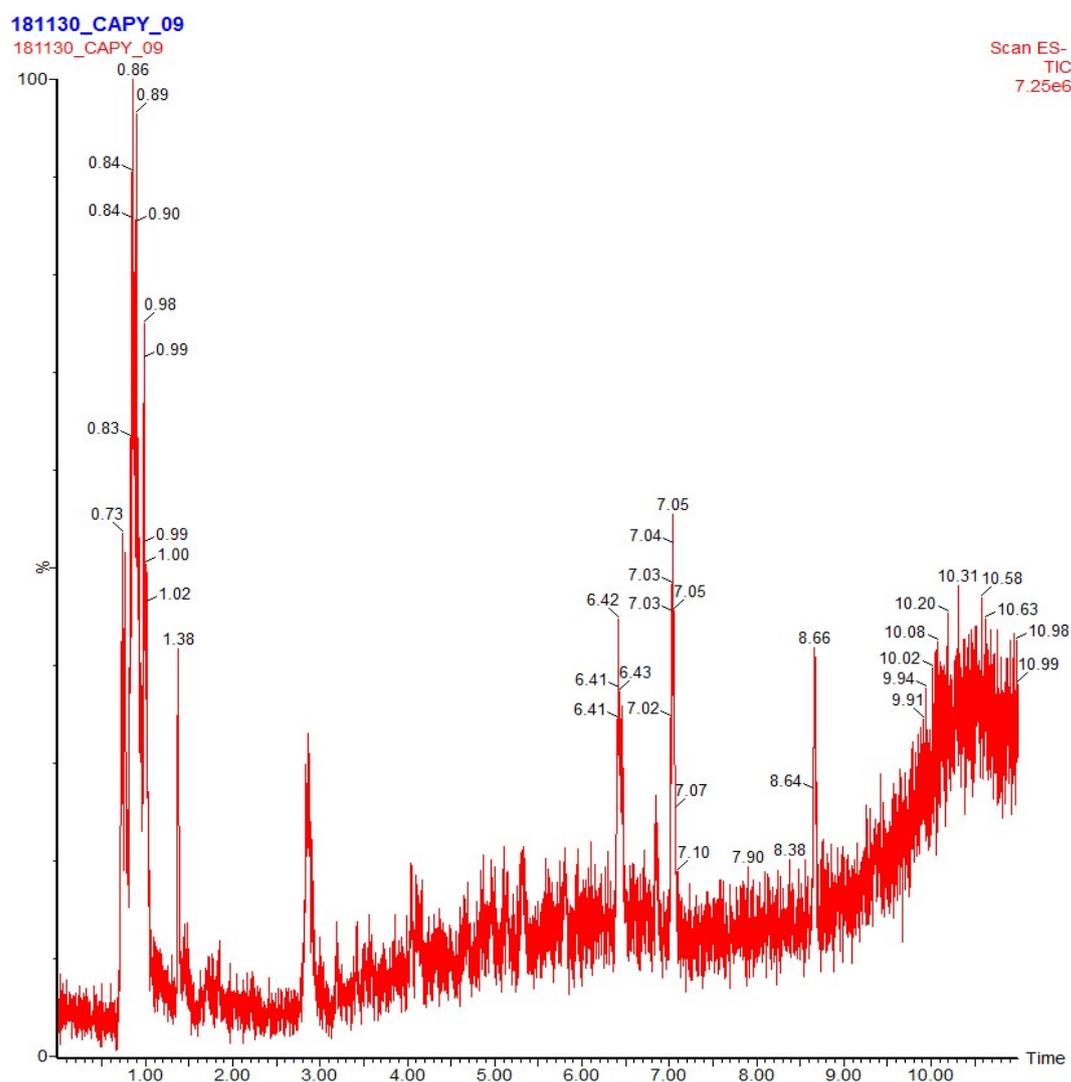
Em busca de resultados mais consistentes, o extrato de CP Aq foi submetido, mais uma vez, a análise. Nesta oportunidade, verificou-se, através do UPLC/MS, os compostos presentes no extrato bruto. A identificação dos principais compostos químicos foi através da massa molecular e tempo de retenção.

Dessa maneira, foi possível observar a presença de dois compostos que, na literatura, possuem uma excelente atividade antioxidante, o ácido gálico (TR = 3.09 e massa de 170.021530) e o ácido elágico (TR = 6.72 e massa de 302.0063). O cromatograma do extrato bruto de *C. pyramidalis* está representado na figura 2. Segundo Chaves (2016) estudos fitoquímicos conduzidos com extratos de *C. pyramidalis* revelaram a presença de alguns metabólitos secundários, entre eles o ácido gálico e o ácido elágico, sendo convergindo com os resultados encontrados neste estudo. O ácido gálico é polifenol que pode ser oriundo de espécies vegetais, que vem apresentado atividade anti-inflamatória, antitumoral, antimutagênica e forte ação antioxidante. Já o ácido elágico possui equivalência quando se trata das suas atividades biológicas, pois ele também apresenta forte atividade antioxidante além de também ser responsável pelo efeito anticarcinogênico (Lima, 2014; Chaves, 2016).

Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são largamente encontrados em materiais vegetais e essa composição garante uma excelente atividade antioxidante e conseqüentemente uma excelente habilidade em eliminar radicais livres, podendo trazer benefícios à saúde humana. A atividade antioxidante dos fenólicos é essencialmente determinada pelas suas estruturas, em particular a deslocalização dos elétrons sobre um núcleo aromático.

Figura 2: Cromatograma gerado a partir da corrida cromatográfica dos extratos de casca de *Caesalpinia pyramidalis* em UPLC.



Os compostos fenólicos totais e os flavonoides foram dosados em equivalente de ácido gálico e equivalente de quercitina, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3: Resultado das dosagens de Fenóis Totais e Flavonoides do extrato aquoso de *C. pyramidalis*.

AMOSTRA	Fenóis mg EAG / g extrato	Flavonóides mg EQ / g extrato
<i>C. pyramidalis</i> (Casca)	216,02 ± 11,61	43,46 ± 1,98
<i>C. pyramidalis</i> (Folha)	216,55 ± 11,00	306,56 ± 9,48

Esses resultados complementam os resultados encontrados no HPLC E UPLC/MS, onde encontram como pico majoritário o ácido gálico e o ácido elágico. Dessa forma, há uma forte evidencia de que há uma relação diretamente proporcional com o conteúdo de fenóis totais e a atividade antioxidante. Pesquisadores afirmam que atividades antioxidantes testadas estão diretamente ligadas ao conteúdo fenólico presente em diferentes partes das plantas (Hatamnia, et al. 2014).

Atividade antioxidante

Dentre as atividades antioxidantes testadas, o ensaio de varredura de DPPH foi um dos ensaios que se destacou. Nesse ensaio foi possível comparar a capacidade de eliminação dos radicais livres do extrato de *C. pyramidalis*, na concentração de 1000µg/mL, por sua capacidade de eliminar o DPPH. Ao observar o percentual da inibição do DPPH (tabela 4), descobrimos que o extrato apresentava alta taxa de inibição, sendo potencialmente maior do que os padrões testados, como o ácido gálico, por exemplo. O IC₅₀ de CP Aq foi de 32,52, enquanto que o do ácido gálico foi de 5,0. Segundo Chaves (2016) esse aumento pode estar associado ao número de substâncias presente no extrato bruto, já que os extratos são substâncias puras.

Devido ao seu grupo hidroxila, os compostos fenólicos são de extrema importância e contribuem diretamente para a eliminação desses radicais. E muitos trabalhos na literatura, afirmam que *C. pyramidalis* tem um bom número de compostos fenólicos (Hatano, 1989; Duh, 1999; Monteiro, 2005).

Tabela 4: Resultado das atividades antioxidantes dos extratos de casca de *C. pyramidalis* e dos padrões.

AMOSTRAS	DPPH IC50 (µg/mL)	ATT (1 mg/ml - %)	FRAP (1 mg/ml - %)	Peroxidação Lipídica
<i>C. pyramidalis</i> (Casca)	32,52	42,57± 2,83	921 ± 28,46	19,35 ± 0,84
Quercitina	19,8 (17,5 a 22,2)	59,4 ± 1,9	501,57 ± 16,49	26,92 ± 1,59
Ac. Gálico	5,0 (4,5 a 5,6)	1,5 ± 0,6	60,4 ± 1,8	100
Ác. Ascórbico	19,2 (16,8 a 21,9)	100	526,23 ± 21,98	NA
BHT	19,9 (16,8 a 22,6)	3,9 ± 0,1	563,52 ± 8,76	0,75 ± 0,40

A atividade antioxidante total (ATT) e a redução do íon férrico (FRAP) (tabela 4) caracteriza ensaios que usam de redução de íons metálicos. O método do ATT determina quantitativamente da capacidade antioxidante, através da formação de complexo fosfomolibdênio. O ensaio baseia-se na redução de Mo(VI) à Mo(V) e a subsequente formação de um complexo de fosfato de molibdênio, Mo(V), que possui a coloração verde em pH ácido (Shabbir, et al., 2013). O método FRAP baseia-se na redução do complexo de Fe³⁺-TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) à sua forma ferrosa em pH ácido (Urrea-Victoria et al, 2016). Disto isto, os resultados obtidos de ATT foi de $42,57 \pm 2,83$ sendo muito próximo do padrão de quercitina ($59,4 \pm 1,9$). Quando comparado ao ácido ascórbico, que é o padrão considerado 100%, o extrato de CP Aq demonstra uma atividade próximo a metade, porém alguns padrões também não demonstram atividades expressivas, como é o caso do ácido gálico que possui uma atividade de $1,5 \pm 0,6$, considerada baixa.

Já em relação ao FRAP (tabela 4) o extrato de CP Aq demonstrou uma atividade extremamente expressiva, sendo superior a todos os padrões testados, chegando a $921 \pm 28,46$, se mostrando com um poder de redução altamente significativo. Com isso é possível afirmar que o consumo de substâncias antioxidantes na dieta pode gerar uma proteção contra os danos provocados pelos processos oxidativos celulares (Sousa, 2016).

O ensaio de inibição da peroxidação lipídica (tabela 4) induz a peroxidação lipídica de um ácido graxo, o ácido linoléico, por aquecimento à 40 °C. Se houver produtos antioxidantes no meio, esses inibem a produção dos radicais peroxilas (LOOH●), no qual serão medidos indiretamente pela adição dos reagentes (Kumar, et al. 2014). Para a execução deste ensaio, o ácido gálico foi o padrão, com um aproveitamento de 100%, já o extrato de *C. pyramidalis* apresentou um valor de $19,35 \pm 0,84$, não atingindo os 20% da reação. Morais (2013) apresentou resultados bem superiores encontrados neste estudo, com o extrato do epicarpo de *Caryocar brasiliense*, com os mesmos métodos, ele obteve uma inibição de 42,31. Diante do exposto, verifica-se que para este método o extrato CP Aq não obteve êxito.

1. Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam que o extrato aquoso da casca de *C. pyramidalis* a presença de compostos fenólicos, como o ácido gálico e o ácido elágico, que são os componentes majoritários e por isso está diretamente associado com o potencial antioxidante sobre os radicais DPPH.

Com isso, percebe-se a importância do extrato de *C. pyramidalis*, principalmente por se aproximar da realidade da comunidade, pois o uso normalmente é a base de água e este extrato apresenta um potencial expressivo para compor formulações já que os antioxidantes naturais desempenham um papel importante nos cuidados de saúde e eles fornecem proteção contra o estresse oxidativo a doenças associadas.

2. Agradecimentos

Os autores agradecem às agências brasileiras (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq) pelo apoio financeiro concedido para realização deste trabalho.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Referências

CHAVES TP. SANTANA CP. VÉRAS G. BRANDÃO DO. FELISMINO DC. MEDEIROS ACD. ET AL. SEASONAL VARIATION IN THE PRODUCTION OF SECONDARY METABOLITES AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF TWO PLANT SPECIES USED IN BRAZILIAN TRADITIONAL MEDICINE. AFR J BIOTECHNOL. 2013; 12: 847–853. DOI: 10.5897/AJB12.2579

CHANDRA, N. ET AL. FREE RADICALS, ANTIOXIDANTS AND FUNCTIONAL FOODS: IMPACT ON HUMAN HEALTH. PHARMACOGNOSY REVIEWS, V. 4, N. 8, P, 118-126, 2010.

CHAVES, T.P. ESTUDO QUÍMICO-FARMACOLÓGICO DO EXTRATO SECO DE POINCIANELLA PYRAMIDALIS (TUL.) L.P. QUEIROZ, 2016.

CORDEIRO, B.M.P.C.; SANTOS, N.D.L.; FERREIRA, M.R.A.; ARAÚJO, L.C.C.; CARVALHO-JUNIOR, A.R.; SANTOS, A.D.C.; OLIVEIRA, A.P.; SILVA, A.G.; FALCÃO, E.P.S.; CORREIA, M.T.S.; ALMEIDA, J.R.G.S.; SILVA, L.C.N.; SOARES, L.A.L.;

NAPOLEÃO, T.H.; SILVA, M.V.; PAIVA, P.M.G., BMC COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDICINE, 18:284 - 2018.

DUH, P.D.; TU, Y. Y.; YEN, G.C.; ANTIOXIDANT ACTIVITY OF WATER EXTRACT OF HARNG JYUR (*CHRYSANTHE MUMMORIFOLIUM RAMAT*).FOOD SCI TECHNOL; 32:269–277.DOI:10.1006/FSTL.1999.0548, 1999.

HATAMNIA, A.A., ABBASPOUR, N., DARVISHZADEH, R. ANTIOXIDANT ACTIVITY AND PHENOLIC PROFILE OF DIFFERENT PARTS OF BENE (*PISTACIA ATLANTICA* SUBSP. *KURDICA*) FRUITS. FOOD CHEMISTRY. 145:306-311, 2014.

HATANO, T.; EDAMATSU, R.; MORI, A.; FUJITA, Y; YASUHARA, E; EFFECTO FINTER ACTION OF TANNINS WITH CO-EXISTING SUBSTANCES. VI. EFFECTS OF TANNINS AND RELATED POLYPHENOLS ON SUPEROXIDE ANION RADICAL AND ON DPPH RADICAL.CHEMPHARMBULL; 37:2016–2021, 1989.

HUA-BIN, L., ET AL. ANTIOXIDANT PROPERTIES IN VITRO AND TOTAL PHENOLIC CONTENTS IN METANOL EXTRACTS FROM MEDICINAL PLANTS. LWT. 41:385–390, 2008.

KUMAR, S., SANDHIR, R. E OJHA, S. EVALUATION OF ANTIOXIDANTE ACTIVITY AND TOTAL PHENOL IN DIFERENTE VARIETIES OF LANTANA CAMARA LEAVES. BMC RESEARCH NOTES. 7:560-568, 2014.

LIMA, F.O., BEZERRA, A.S. FLAVONOIDS AND FREE RADICALS. DISCIPLINARUM SCIENTIA. SÉRIE: CIÊNCIAS NATURAIS E TECNOLÓGICAS, SANTA MARIA. 13(1): 111-124, 2012.

LIMA, K.G. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO GÁLICO NO TRATAMENTO DE CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HEPG2, 2014.

MONTEIRO, J.M.; LINS-NETO, E.M.F.; AMORIM, E.L.C.; STRATTMANN, R.C.; ARAÚJO, E.L.; ALBUQUERQUE, U.P.TANNIN CONCENTRATION IN THREE SIMPATRIC MEDICINAL PLANTS FROM CAATINGA VEGETATION. VER. ÁRVORE.; 29:999– 1005.DOI:10.1590/S0100-67622005000600020, 2005.

PAIVA, P.M.G., ET AL. ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SECONDARY METABOLITES AND LECTINS FROM PLANTS. BADAJOZ: CURRENT RESEARCH, TECHNOLOGY AND EDUCATION TOPICS IN APPLIED MICROBIOLOGY AND MICROBIAL BIOTECHNOLOGY. P. 396-406. 2010.

PRIOR, R.L. E CAO, G. IN VIVO TOTAL ANTIOXIDANTE CAPACITY: COMPARISON OF DIFERENTS ANALYTICALS METHODS. FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE. 27: 1173-1181, 1999.

SHABBIR, M., KHAN, M.R. E SAEED, N. ASSESMENT OF PHYTOCHEMICALS, ANTIOXIDANTE, ANTI-LIPID PEROXIDATION AND ANTI-HEMOLYTIC ACTIVITY OF EXTRACTS AND VARIOUS FRANCTIONS OF MAYTENUS ROYLEANUS LEAVES. BMC COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDICINE. 13: 143-154, 2013.

ROCHA, T.A.M.C.; DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE HPLC-DAD-FLD PARA A DETERMINAÇÃO DE INIBIDORES DA ENZIMA FOSFODIESTERASE TIPO-5 (PDE-5) EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES À BASE DE PLANTAS, 2015.

TONG, J. ET AL. HEPATOPROTECTIVE ACTIVITY OF FLAVONOIDS FROM CICHORIUM GLANDULOSUM SEEDS IN VITRO AND IN VIVO CARBON TETRACHLORIDE-INDUCED HEPATOTOXICITY. JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY. 2015.

URREA-VICTORIA, V.; PIRES, J.; TORRES, P.B.; SANTOS, D.Y.A.C.; ENSAIO ANTIOXIDANTE EM MICROPLACA DO PODER DE REDUÇÃO DO FERRO (FRAP) PARA EXTRATOS DE ALGAS. INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO ISBN 978-85-85658-62-5, 2016.

MORAIS, M.L.; SILVA, A.C.R.; ARAÚJO, C.R.R.; ESTEVES, E.A.; DESSIMONI-PINTO, N.A.V.; DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE IN VITRO DE FRUTOS DO CERRADO BRASILEIRO - REV. BRAS. FRUTIC., JABOTICABAL - SP, V. 35, N. 2, P. 355-360, JUNHO 2013.

ARTIGO 2: EXTRATO AQUOSO DE *CAESALPINIA PYRAMIDALIS* DIMINUIE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E A VIABILIDADE CELULAR EM CÉLULAS TUMORAIS

Esse artigo será submetido à revista **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, com o fator de impacto (F.I) – 2.064 e o Qualis Capes B2

EXTRATO AQUOSO DE *CAESALPINIA PYRAMIDALIS* DIMINUE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E A VIABILIDADE CELULAR EM CÉLULAS TUMORAIS

Hortência Farias de Andrade¹; Marina Ferraz Cordeiro²; Fernanda Gomes Beserra²; Márcia Vanusa da Silva¹; Maria Betânia Melo de Oliveira¹; Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo²; Barbara de Azevedo Ramos¹; Maria Tereza dos Santos Correia¹

¹ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

² Laboratório de Imunomodulação e novas abordagens terapêuticas, Centro de pesquisa e inovação terapêutica Suely Galdino (NUPIT-SG), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

Resumo

Caesalpinia pyramidalis é uma planta endêmica do Nordeste, principalmente da região da caatinga. Tradicionalmente as partes utilizadas são: flores e cascas para o tratamento de processos inflamatórios, infecções catarrais e distúrbios gastrointestinais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana, anti-inflamatória e antineoplásica do extrato aquoso de *C. pyramidalis* (CP Aq). A atividade antibacteriana foi avaliada pela determinação da concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC). A atividade citotóxica foi avaliada através de células mononucleares do sangue periférico (normais). Já a atividade antineoplásica foi avaliada por ensaios de MTT de DU-145 (Câncer de próstata), K562 (Leucemia Mielóide Crônica) e HL-60 (leucemia aguda). E por fim a atividade anti-inflamatória foi avaliada através de células de macrófagos RAW 264.7 através da migração celular. Com isso, verificou-se que o CP Aq não apresentou atividade antimicrobiana, nem citotóxica em células normais. Porém diminuiu a viabilidade celular de células tumorais DU-145 e HL-60 e apresentou significativa diminuição de atividade anti-inflamatória *in vivo* através do método de NO. Dessa forma, o extrato CP Aq apresenta elevado potencial como insumo ativo vegetal para o desenvolvimento de formulações a serem utilizadas para a terapia antineoplásica e anti-inflamatória.

Palavras-chave: *Caesalpinia pyramidalis*, tumor, terapia.

1. Introdução

Há muitos anos que as plantas são utilizadas para tratar, prevenir e curar doenças (Atanasov, 2015). Por isso as que já possuem um histórico de medicina tradicional estão sendo, cada vez mais, utilizadas no meio científico, o que inclui a *Caesalpinia*

pyramidalis largamente utilizada para dor de estômago, disenteria e diarreia (Diniz, 2015).

As atividades biológicas atribuídas às plantas estão diretamente associadas à presença de metabólitos secundários como compostos majoritários. Na literatura, são descritos alguns trabalhos que investigam as atividades biológicas desta espécie tradicionalmente utilizada para problemas estomacais, tosse, bronquite, asma, infecção respiratória, gripe, cólica, dentre outros frente à presença destas moléculas nas espécies vegetais (Chaves, 2016).

A *C. pyramidalis* é uma planta endêmica do Nordeste do Brasil mais precisamente da região da Caatinga (Leite, 2009) também conhecida como catingueira. As cascas de *C. pyramidalis* apresenta uma grande fonte de ácido gálico, ácido elágico, saponinas, entre outros, o que permite um elevado potencial farmacológico desta espécie (Klein, 2012).

Porém não foram encontrados relatos, na literatura, trabalhos que façam uma análise do potencial antineoplásico desta espécie e por isso este trabalho possui uma significativa relevância. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi realizar uma avaliação do potencial antimicrobiano, antineoplásico e anti-inflamatório do extrato bruto aquoso da casca de *C. pyramidalis*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Obtenção do extrato aquoso

As cascas da planta *Caesalpinia pyramidalis* (CP Aq) foram coletadas no Parque nacional do vale do Catimbau, em Buíque, Pernambuco, Brasil. O material foi colocado na estufa de circulação de ar forçado a 45°C por um período de quatro dias. A amostra foi identificada conforme as técnicas taxonômicas habituais e depositado no Herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA). O material vegetal foi processado em moinho de bancada seguido de extração por agitação (6h) e sonificação em água destilada para obtenção do extrato aquoso e posteriormente liofilizado.

2.2. Avaliação antibacteriana

A Concentração mínima inibitória (CMI) foi realizada por meio da técnica de microdiluição, em placa de multipoços com 96 poços de fundo chato nas quais foram realizadas diluições seriada de razão 2 em caldo Mueller-Hinton. Ao final do processo, as concentrações dos extratos variaram de 250 a 2000 µg/mL e os poços

continham um inóculo de 5×10^5 UFC/mL. Foram estabelecidos dois controles positivos (um de viabilidade bacteriana e outro com DMSO) e dois negativos (um de esterilidade do meio e outro de esterilidade do extrato). As placas foram, então, incubadas sob condições aeróbicas a 37° C por 24 horas. Considerou-se a CMI, a menor concentração do extrato que inibiu crescimento bacteriano, ou seja, a menor concentração onde há ausência de crescimento visível. *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02), *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 09) e *Escherichia coli* (UFPEDA 84) foram às cepas utilizadas no teste.

Já para a determinação da concentração mínima bactericida (CMB) uma alíquota de 10 µL foi retirada dos poços com ausência de crescimento e semeados em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton, as quais foram incubadas a 37° C por 24 horas. A CBM foi considerada como a menor concentração na qual o extrato causou a morte de 99,9% das células bacterianas em relação ao inóculo inicial na superfície do meio de cultura, ou seja, sem crescimento visível sobre o ágar.

2.3. Avaliação Antineoplásica

- *Ensaio de Toxicidade em Células Sanguíneas Periféricas*

O ensaio foi realizado como descrito por Rêgo (2014). As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram obtidas de sangue heparinizado de doadores saudáveis, não fumantes, que não haviam usado drogas por pelo menos 15 dias e não haviam consumido álcool pelo menos 3 dias antes da coleta da amostra. As células foram isoladas através de um método padrão de centrifugação em gradiente de densidade sobre a solução Ficoll-Hypaque (GE Healthcare). As células foram contadas em uma câmara de Neubauer e a viabilidade foi determinada pelo método de exclusão do azul de trypan.

As células foram usadas apenas quando a viabilidade era de 98% e todos os doadores deram o consentimento para a realização da coleta. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços ($5,5 \times 10^5$ células / poço). Após 24 h, os compostos foram adicionados (10, 50, 100 e 200 µg / mL), e as células foram incubadas por 48 h e então submetidas ao ensaio de MTT. Após 48 h de incubação, 20 µL de MTT foram adicionados em cada poço (0,5 mg / mL). Após 3 h, o produto formado na redução de MTT foi dissolvido em dodecilsulfato de sódio a 20% e a

absorvância da solução a 570 nm foi medida com um leitor de multiplicação (EL808, Biotek, EUA). O efeito de cada composto testado foi quantificado pela absorvância como uma porcentagem da absorvância do corante reduzido no grupo tratado com DMSO.

- *Linhagens Celulares de Tumor Humano e Ensaio MTT.*

A citotoxicidade do extrato de *C. pyramidalis* foi testada contra três linhagens celulares tumorais humanas: DU-145 (Câncer de próstata), K562 (Leucemia Mielóide Crônica) e HL-60 (leucemia aguda). Todas as linhas celulares foram obtidas Célula de Tecidos do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em RPMI 1640 meio suplementado com soro bovino fetal a 10%, 2 Mm de glutamina, 100 mg / mL de estreptomicina e 100 U / mL penicilina a 37°C com 5% de CO₂.

Para o ensaio de citotoxicidade, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços. Após 24 h, uma solução de dimetil sulfóxido de compostos testados (10-200 µg / mL) foi adicionado a cada poço e incubado por 72 h. Grupos controle foram tratados com a mesma quantidade de sulfóxido de dimetil (0,1%). Inibição de crescimento celular foi avaliado pelo método MTT como descrito. Os valores de IC₅₀ foram determinados com a viabilidade de quatro doses testadas e o índice de seletividade (SI) foi calculado através da razão entre PBMC IC₅₀ e célula tumoral IC₅₀. O extrato foi considerado promissor quando os valores de SI foram maiores que 3.

2.4. Ensaio Anti-inflamatório In Vitro

Os efeitos do extrato de *C. pyramidalis* na produção de óxido nítrico (NO) foi testado em células de murinas RAW 264.7 utilizando o ensaio baseado em Griess. Para tal, as células utilizadas foram as de macrófagos da linhagem RAW 264.7. Essas foram plaqueadas a uma densidade de 2 x 10⁵ células / poço em placas de 96 poços.

Após 1,5 h, as células foram expostas a CP Aq com as concentrações de 500, 250, 100, 10 e 1µg/mL. Células tratadas e incubadas com 1 µg / mL de LPS (lipopolissacarídeo de *E. coli* 0111; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) e 100 µg / mL de IFN-γ (Interferon-gama; BD Pharmingen) foram utilizadas como

controle positivo. Após 24 h de incubação a 37 ° C em CO₂ a 5%, os sobrenadantes foram coletados (50 µL) e incubados com 50 µL de reagente Griess (1% sulfanilamida, 0,1% naftil etilenodiamina e 2,5% ácido fosfórico) por 10 min à temperatura ambiente no escuro, e a absorbância a 540 nm foi comparada com a de uma curva padrão derivada de 0–300 µM NO (Kim, 2016).

2.5. Análise estatística

Os dados foram apresentados como médias ± variação padrão (DP) ou porcentagens. A normalidade das distribuições foi determinada pelo teste de Shapiro-Wilk, e as diferenças entre os grupos foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparação múltipla de Tukey usando o software Graph Prism 6.0. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados

Ensaio de Citotoxicidade

Antes de iniciar os ensaios com células tumorais, foram feitas análises com as células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Após 48h da análise com essas células o extrato de CP Aq não foi considerado tóxico na dose de 200 µg / mL, demonstrando que o extrato não mostrou citotoxicidade frente as células de doadores saudáveis nas doses testadas. (Figura 1).

Figura 1: Análise de células PBMC pelo método do MTT (A) e pelo tripan (B).

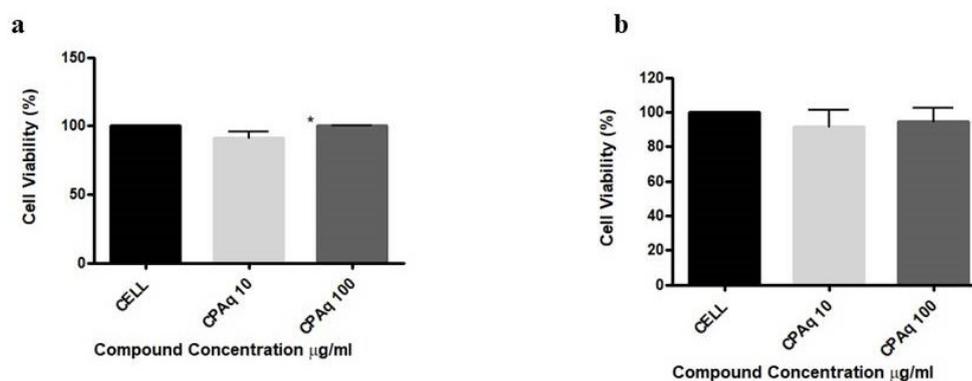
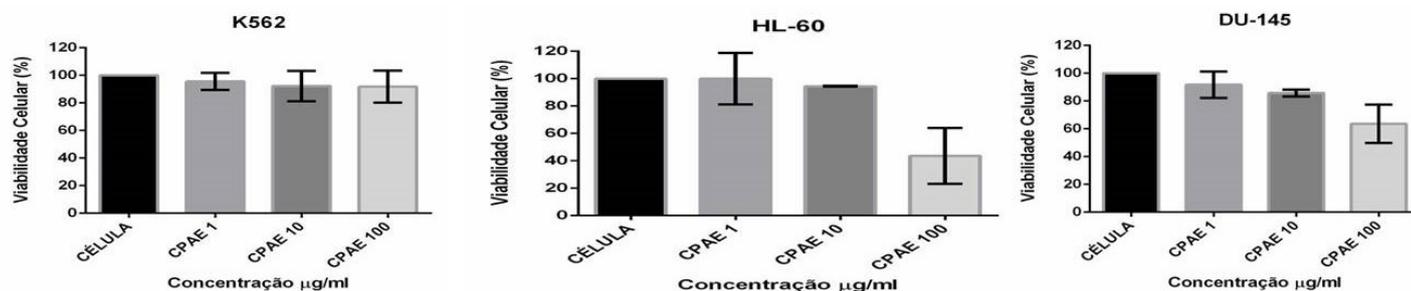


Figura 2: Avaliação da citotoxicidade do extrato aquoso de ramos de *C. pyramidalis* em diferentes linhagens celulares pelo ensaio colorimétrico de redução do MTT e ensaio de exclusão pelo azul de tripan.



Ensaio Antineoplásico

Neste trabalho, foi observada atividade antiproliferativa do CP Aq nas células HL-60 e uma notável redução de viabilidade celular nas células de DU-145. No entanto, o mesmo não foi observado nas células de K562 (Figuras 2).

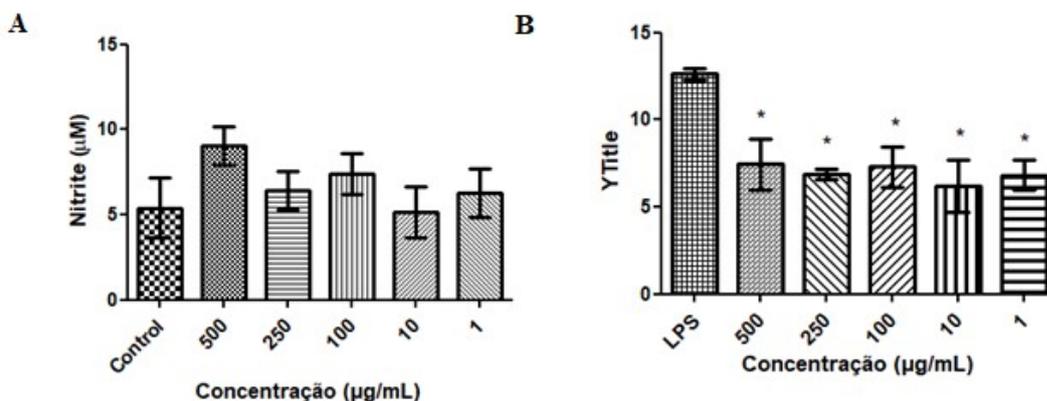
Ensaio antimicrobiano

Após o ensaio de citotoxicidade, a atividade antibacteriana foi avaliada pelo método de microdiluição, visando determinar os valores de CMI e CMB. Nas condições utilizadas, CP Aq não apresentou atividade antimicrobiana em nenhuma das cepas testadas.

Ensaio anti-inflamatório in vitro

As células dos macrófagos foram tratadas com diferentes concentrações do CP Aq e não foi observado aumento na produção de NO em relação aos macrófagos não tratados. Como esperado o tratamento apenas com LPS apresentou altos níveis de NO, Porém quando os macrófagos foram incubados com o CP Aq e com o LPS foi visto diminuição na produção de NO quando comparado com os macrófagos tratados apenas com LPS, ou seja, o extrato aquoso de *C. pyramidalis* apresentou uma possível ação anti-inflamatória (Figura 3).

Figura 3: Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato aquoso de ramos de *C. pyramidalis* na condição de **A:** Macrófagos tratados com diferentes concentrações do CP Aq e **B:** Macrófagos incubados com LPS e o CP Aq.



Discussão

As plantas medicinais, de maneira geral, são de extrema importância e dão um suporte para a pesquisa farmacológica, com espaço no tratamento e prevenção de doenças, bem como utilizadas como matéria-prima para a síntese de compostos farmacologicamente ativos (Carvalho, 2016). Nesse sentido a *C. pyramidalis* desempenha um papel importante por se apresentar de forma abundante na caatinga e pode ser usada como matéria-prima para a síntese de compostos farmacologicamente ativos. Nos dias de hoje, o uso popular dessa planta mantém o hábito de confeccionar chás e expectorantes para curar ou controlar infecções intestinais, diarreias, gripes fortes ou catarro empregando-o em uma ampla variedade de efeitos, como: Antimicrobiano, antioxidante, antidiarreico, afrodisíaco, entre outros (Chaves, 2016).

Frente a essas inúmeras propriedades, este trabalho apresentou um conjunto de três das suas principais atividades biológicas através da avaliação do extrato aquoso de *C. pyramidalis*. Em um estudo anterior (Andrade et al - em andamento), o CP Aq foi analisado por cromatografia em camada delgada – CCD e cromatografia líquida de ultra performance – UPLC e a presença de compostos fenólicos, bem como ácido gálico, ácido elágico e taninos foi observada, evidenciando tais propriedades citadas acima.

As bactérias resistentes, o surgimento de novos microrganismos patogênicos e o reaparecimento de antigos patógenos fundamentam a necessidade do desenvolvimento de novas drogas. Alguns dos compostos encontrados, como os taninos, possuem potencial antibacteriano (Scholz, 1994) e por isso os autores testaram tal atividade. Porém nas condições testadas, o CP Aq não mostrou atividade sobre as cepas de *S.*

aureus, *E. faecalis* e *E. coli* que corrobora com os estudo de Silva et al (2012) que testou o extrato etanólico contra as cepas *K. pneumoniae* e *E. coli*.

Porém o mesmo autor obteve resultado positivo quando testou duas linhagens de *Staphylococcus*. Saraiva et al (2012) também analisou a atividade antimicrobiana de *C. pyramidalis* sobre *S. aureus* e não obteve atividade significativa. Há registros na literatura que confirmam a atividade antimicrobiana de *C. pyramidalis* sobre diversas bactérias dentre as quais podemos destacar *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella spp*, sendo os melhores resultados exibidos contra as cepas gram positivas (Saraiva*, 2012). Um estudo interessante, realizado por Chaves (2016) também constatou que o extrato hidroalcoólico, que se assemelha ao deste estudo, não apresentou eficácia significativa sobre nenhuma das cepas estudadas. A natureza do extrato pode ser uma justificativa pertinente e ainda segundo Chaves (2016), essa discrepância entre os resultados encontrados neste e em outros estudos pode estar relacionado ao método utilizado para a determinação da atividade antimicrobiana, assim como o perfil fenotípico das cepas utilizadas. Ainda sobre essas diferenças de resultados, Carvalho et al (2016) afirma que atividades antimicrobianas distintas observadas pela mesma planta podem ser explicadas pela presença de uma maior quantidade de compostos bioativos resultantes do método de extração, tipo de fração e microrganismo utilizado.

Após a avaliação antimicrobiana, os extratos foram testados quanto o seu potencial antineoplásico, sendo obtidos resultados benéficos e que estão possivelmente ligados a sua composição química. Ainda referente a estudos realizados por Andrade et al (Em desenvolvimento), foi verificado como metabólito secundário majoritário, o ácido elágico, que segundo Costa (2017) os produtos que são metabolizados a partir do ácido elágico pode ser encontrado nos tecidos da próstata e por isso este ácido pode apresentar um expressivo potencial contra células tumorais de próstata. Com base nisso, as células tumorais DU-145 (câncer de próstata), k-562 (Leucemia mieloide crônica) e H-60 (Leucemia aguda). Neste trabalho, foi encontrada uma atividade antineoplásica contra o HL-60 e uma redução significativa da viabilidade celular em DU-145, já nas células de K-562 não foi observada diferença significativa nem na maior dose testada. Como dito anteriormente, o CP Aq apresentou taninos em suas composição e outros

trabalhos correlacionam a presença dos taninos com a atividade antineoplásica (Yang, 2000; Carvalho, 2016).

Em relação à produção de óxido nítrico (NO), segundo Kirtikar et al (1999) uma outra espécie de *Caesalpinia*, a *Caesalpinia sappan* L encontrada na Índia, Peru e Malásia é utilizada na medicina Ayurveda para o tratamento de feridas, úlceras e diarreia e o extrato dessa planta é considerado potentes inibidores da biossíntese das prostaglandinas e da formação do óxido nítrico demonstrando atividade anti-inflamatória e quimioterápica (Vasconcelos, 2011). Esse resultado corrobora com os encontrados neste trabalho, pois o CP Aq foi eficiente na redução de NO quando comparado ao LPS que possui a função de estimular a inflamação das células.

Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o extrato da casca de *C. pyramidalis* apresentam grande potencial para serem investigados, principalmente por apresentar baixo efeito citotóxico em células normais e é um promissor antineoplásico em células de HL-60. Também foi possível observar que extrato não apresentou atividade antimicrobiana significativa, mas foi capaz de reduzir níveis de NO, se apresentando, assim, com um potencial anti-inflamatório. Dessa forma, este trabalho, faz da *C. pyramidalis* uma fonte muito promissora para aplicações como adjuvante de formulações contra efeitos de radicais livres.

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências brasileiras (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq) pelo apoio financeiro concedido para realização deste trabalho.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERENCIAS

Atanasov, A G., B. Waltenberger, E. M. Pferschy-Wenzig et al., “Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review,” *Biotechnology Advances*, vol. 33, no. 8, pp. 1582–1614, 2015.

Chaves, T.P. Estudo químico-farmacológico do extrato seco de *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz, 2016.

Costa, F. Tudo sobre ácido elágico | O que é e os seus benefícios. Disponível em: <https://pt.myprotein.com/thezone/suplementos/acido-elagico-o-que-e-beneficios/> Acessado em 25/01/2019.

Guzik, T. J., R. Korbust, and T. Adamek-Guzik, “Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation,” *Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 54, no. 4, pp. 469–487, 2003.

Hertz, E.; F. C. Cadoná, and A. K. Machado, “Effect of *Paullinia cupana* on MCF-7 breast cancer cell response to chemotherapeutic drugs,” *Molecular and Clinical Oncology*, vol. 3, pp. 37–43, 2015.

Kim, G. T., N. K. Tran et al., “Immunomodulatory efficacy of standardized *Annona muricata* (Graviola) leaf extract via activation of mitogen-activated protein kinase pathways in RAW 264.7 macrophages,” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2016, Article ID 2905127, 10 pages, 2016.

Kirtikar, K.R. and Basu, B.D. *Indian Medicinal Plants*. International Book Distributors, Dehradun, India, 1965-1968, 1999.

Rego, M. J. B. D. M., M. R. Galdino-Pitta, D. T. M. Pereira et al., “**Synthesis, in vitro anticancer activity and in silico study of new disubstituted thiazolidinedione derivatives**,” *Medicinal Chemistry Research*, vol. 23, no. 6, pp. 3220–3226, 2014.

Saraiva, A. M.; C. L. Saraiva, A. M. Gonçalves, R. R. Soares, F. O. Mendes, R. P. Cordeiro, H. S. Xavier, M. N. C. Pisciotano, —Antimicrobial activity and bioautographic study of antistaphylococcal components from *Caesalpinia pyramidalis* Tul., *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 48, no. 1, pp.147-154, 2012.

Saraiva*, A. M., M. G. Saraiva, A. M. Gonçalves, J. G. Sena Filho, H. S. Xavier, M. N. C. Pisciotano, —Avaliação da atividade antimicrobiana e perfil fitoquímico de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Fabaceae), *Biofar*, vol. 7, no. 2, pp. 52-60, 2012.

Scholz, E.; M. Heinrich, and D. Hunkler, “Caffeoylquinic acids and some biological activities of *Pluchea symphytifolia*,” *Planta Medica*, vol. 60, no. 4, pp. 360–364, 1994.

Silva CHTP, Peixoto Sobrinho TJP, Saraiva AM, Pisciotano MNC, Amorim, ELC. Phytochemical profile and antibacterial activity of bark and leaves of *Caesalpinia pyramidalis* Tul. and *Sapium glandulosum* (L.) Morong. *J Med Plants Res*. 2012; 6: 4766-4771. doi: 10.5897/JMPR12.830.

Vasconcelos, C.F.B.; O NO produzido por células ativadas possui ação citotóxica e microbicida que promove a destruição de microorganismos invasores, 2011.

Yang, L.-L., C.-Y. Lee, and K.-Y. Yen, "Induction of apoptosis by hydrolyzable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells," *Cancer Letters*, vol. 157, no. 1, pp. 65–75, 2000.

ARTIGO 3: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA E AÇÃO GENOTÓXICA E MUTAGÊNICA DO EXTRATO AQUOSO DE *Caesalpinia pyramidalis*

Esse artigo será submetido à revista **Journal of Toxicology and Environmental Health, Parte A**, com o fator de impacto (F.I) – 1.733 e o Qualis Capes B2

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA E AÇÃO GENOTÓXICA E MUTAGÊNICA DO EXTRATO AQUOSO DE *Caesalpinia pyramidalis*

Hortência Farias de Andrade¹; Danielle Feijó de Moura²; Tamiris Alves Rocha²; Cristiano Aparecido Chagas²; Rafael Matos Ximenes³; Maria de Fátima Rodrigues³; Márcia Vanusa da Silva¹; Maria Betânia Melo de Oliveira¹; Maria Tereza dos Santos Correia¹

¹ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.

² Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil.

Resumo

Relevância etnofarmacológica: *Caesalpinia pyramidalis* é uma planta endêmica do Bioma caatinga e é bastante utilizada como gastroprotetora. Os produtos a base de plantas estão sendo cada vez mais usados devido aos seus benefícios à saúde e baixos efeitos colaterais. Mundialmente fármacos que advêm de plantas são conhecidos como “naturais” e por isso não fazem mal a saúde. Embora exista esse pensamento como uma crença geral, as pesquisas revelam que essas ervas não são sempre seguras. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo investigar a segurança do uso desta planta por intermédio da toxicidade oral aguda, bem como sua ação genotóxica e mutagênica *in vivo* do extrato aquoso da casca de *C. pyramidalis* (CP Aq). Dois grupos (Grupo controle e testado) de animais (N = 5) da espécie swiss foram observados durante o período de 14 dias após administração do extrato, para avaliação da toxicidade oral aguda. A genotoxicidade e mutagenicidade *in vivo* foram avaliadas através do ensaio cometa e teste do micronúcleo respectivamente após 48 horas da administração da fração. Para análise da toxicidade aguda foi aplicada a análise de variância (ANOVA) com intervalo de confiança de 95% e para os testes de genotoxicidade e mutagenicidade o teste de Mann-Whitne. Os resultados indicaram que até 2000 mg/kg de peso corporal o CP Aq não causou qualquer dano da toxicidade aguda oral e os níveis bioquímicos, que avaliam dano hepático e renal, permaneceram inalterados, bem como a histologia dos órgãos avaliados. Observou-se, também, que o CP Aq não induziu o aumento da frequência ou índice de danos no DNA e número de micronúcleos nos eritrócitos dos animais tratados com CP Aq os quais apresentaram valores próximos do grupo controle negativo. Os resultados aqui apresentados demonstram a viabilidade da utilização da *C. pyramidalis* na medicina popular, uma vez que fornece uma base científica para garantir a população o uso desta planta de forma segura.

Palavras-chave: Micronúcleo; Ensaio Cometa; Segurança de uso.

Introdução

A *Caesalpinia pyramidalis* Tul. Também conhecida popularmente como catingueira, é endêmica do bioma Caatinga e possui ampla distribuição geográfica no

Nordeste brasileiro (Matias, 2017). Esta planta é largamente conhecida nessa região por já possuir propriedades medicinais cientificamente comprovadas, como anti-inflamatória, cicatrizante, antimicrobiana e efeito gastroprotetor (Fabricante, 2009; Ribeiro, 2013). Numerosas populações, tradicionalmente, utilizam plantas medicinais para sanar alguns tipos de enfermidades, muitas destas se apoiam no fato de algumas dessas crenças serem resultante de práticas empíricas que ultrapassam gerações (Bruning, 2012).

Segundo a organização mundial da saúde - OMS (2008) as práticas fitoterápicas vêm, cada vez mais, ganhando forças e se expandindo no mundo de forma a complementar às terapias medicamentosas alopáticas. Apesar disso, a segurança desses fitoterápicos tornou-se uma preocupação para as autoridades, uma vez que, há um número crescente de relatórios de agências de monitoramentos alertando sobre drogas fitoterápicas (Sahoo et al., 2010).

Os extratos aquosos permitem uma análise mais fiel, pois são os que mais se aproximam das práticas utilizadas na medicina popular. Porém se faz necessário uma caracterização do mesmo para que se obtenha informações absolutas sobre suas moléculas majoritárias e segurança de uso (França, 2017). Vários são os métodos utilizados para verificar a segurança da utilização destes produtos, pois a ausência dos efeitos letais não é garantia de segurança das preparações vegetais em relação à genotoxicidade. Por exemplo, Oliveira et al (2016) avaliaram o extrato etanólico de *Morus alba L.* o qual apresentou alterações histológicas significativas no fígado, baço e rim causando, na maior dose (2000 mg/kg) e na menor dose (300 mg/kg) vacuolização dos hepatócitos e agrupamento dos linfonodos do baço, embora não tenha causado morte ou manifestações clínicas. O ensaio de micronúcleo é reconhecido como um importante biomarcador de danos citogenéticos causados por agentes genotóxicos (Oliveira et al, 2016). Um composto é determinado como genotóxico quando a frequência de micronúcleos em animais tratados é estatisticamente diferente daquela observada em animais de controle negativo (OECD, 2016).

Sendo assim, baseado no uso popular e na falta de estudos toxicológicos nesta espécie de planta e afim de contribuir com os crescentes dados associados a toxicologia de casca de *C. pyramidalis*, este trabalho objetivou avaliar a segurança do extrato aquoso desta espécie por meio dos efeitos de toxicidade aguda oral, genotoxicidade e mutagenicidade.

Materiais e Métodos

Material botânico e obtenção do extrato aquoso

As cascas da planta *C. pyramidalis* foram coletadas no Parque nacional do vale do Catimbau, em Buíque, Pernambuco, Brasil. O material foi colocado na estufa de circulação de ar forçado a 45°C por um período de quatro dias. A amostra foi

identificada conforme as técnicas taxonômicas habituais e depositado no Herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA. O material vegetal foi processado em moinho de bancada seguido de extração por agitação (6h) e sonificação em água destilada numa proporção de 1:10 (Pó : Água destilada) para obtenção do extrato aquoso e posteriormente liofilização. O extrato obtido foi guardado em um dessecador para evitar umidade do ambiente.

Animais

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas swiss albinos, com grupos de três (Toxicidade aguda oral) ou cinco (genotoxicidade e mutagenicidade) animais, com aproximadamente oito semanas de idade, pesando em torno de 30g. Durante o experimento, os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno mantidas a temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $50 \pm 5\%$, com ciclo de 12 horas claro/escuro. Os animais receberam água potável e ração à vontade. Todos os procedimentos experimentais obedeceram às normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA).

Avaliação da toxicidade oral aguda

Para a avaliação da toxicidade do extrato aquoso de *C. pyramidalis* foi utilizada a metodologia recomendada pela Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD, 2001). O método permite a classificação do material que está sendo testado em diversas classes de toxicidade definidas por valores de corte fixos de DL50 (dose letal média), (Reddy, 2015). O teste de toxicidade aguda consistiu na administração da dose de 2000 mg/kg do extrato em estudo por gavagem. Foram utilizados dois grupos, cada um contendo três animais (fêmeas), totalizando seis animais para o experimento. O extrato aquoso foi solubilizado em NaCl (0,85%) e um grupo recebeu apenas o veículo (Controle). Após a administração os animais foram observados continuamente nas primeiras duas horas e depois a cada 24 horas diariamente durante 14 dias para a verificação de qualquer alteração comportamental ou nas atividades fisiológicas. Os animais foram avaliados pelo método de *screening* hipocrático, o qual verifica qualquer comprometimento do animal, como: o estado de consciência, disposição, atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular, atividade do sistema nervoso central e autônomo do animal. Também foram observados

o consumo de água, ração e o peso dos órgãos após o término do período de experimentação (fígado, rim e baço). O sangue dos animais também foi coletado para verificação dos parâmetros bioquímicos de proteína total, albumina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), proteínas totais (PT), albumina (ALB) e ureia, utilizando kits específicos (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil).

As análises histológicas do fígado, rim e baço dos animais do grupo controle e fração foram realizadas por microscopia óptica. Fragmentos dos órgãos foram fixados em formalina (10% v/v), em seguida desidratados em soluções de etanol em uma série graduada (70-100%), diafanizadas em xilol e embutidas em parafina. Secções histológicas de 5 µm foram cortadas em micrótomo, coradas com hematoxilina-eosina e montadas com lâmina de cobertura com resina Entellan (Merk- German). As lâminas foram observadas em microscópio óptico acoplado a uma câmera digital para a confecção das fotos.

Ensaio de genotoxicidade in vivo

Grupos de camundongos fêmeas (n=5) foram tratados com solução salina a 0,9% (controle negativo), ciclofosfamida (25 mg/kg via intraperitoneal, controle positivo) e extrato aquoso de *C. pyramidalis* (2000 mg/kg por gavagem). Os animais foram anestesiados por uma combinação quetamina (100 mg/kg) e xilazina (10mg/kg) 48 horas após o tratamento e seu sangue (1mL) foi coletado por punção retro-orbital para utilização no ensaio de genotoxicidade e mutagenicidade.

A atividade genotóxica do extrato aquoso de *C. pyramidalis* foi avaliada utilizando-se o Ensaio Cometa (EC). Primeiramente, 15 µL do sangue coletado foram homogeneizados com 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão, sendo a mistura depositada em lâminas previamente preparadas com uma cobertura de agarose padrão. As lâminas foram mantidas a temperatura 4 °C por 10 minutos. Depois da refrigeração, as lâminas sem as lamínulas foram submetidas a uma solução de lise por um período de 48 horas (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM TRIS, 1% Triton X-100, DMSO 10%, com pH 10). Após a lise as lâminas foram submetidas à eletroforese em uma cuba horizontal contendo solução tampão alcalino (1M NaOH e 200 mM sal dissódico EDTA, pH 13) por 20 minutos, com corrente de ± 300 mA e diferença de potencial de

32V. As lâminas que serviram de controle positivo foram expostas durante 10 minutos a uma solução de peróxido de hidrogênio a 200 mM. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas durante 15 minutos em tampão Tris- HCl 0,4 M, pH 7,5, fixadas por 5 minutos em álcool absoluto. Para a revelação, cada lâmina foi corada com 30µL de solução de brometo de etídio (0, 0002%, p/v). A avaliação foi feita em microscópio de fluorescência (Zeiss-Imager, M2). Foram analisados 100 nucleoides por animal, com observação da relação entre o comprimento da cauda e o tamanho da cabeça do cometa. Cada nucleoide analisado foi classificado em uma das cinco classes: 0 (sem dano); 1 (pouco dano aparente); 2 (dano médio); 3 (dano médio com cauda mais longa); e 4 (dano máximo). Os valores obtidos para cada indivíduo podem variar de 0 (totalmente intacta: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4); a este valor dar-se o nome de índice de dano (ID) por animal. Assim, o ID foi calculado da seguinte forma:

$$\text{ID total} = 0 (\text{n}^\circ \text{ de cometas classe } 0) + 1 (\text{n}^\circ \text{ classe } 1) + 2 (\text{n}^\circ \text{ classe } 2) + 3 (\text{n}^\circ \text{ classe } 3) + 4 (\text{n}^\circ \text{ classe } 4)$$

Outro parâmetro analisado corresponde a frequência de danos (FD%), calculada de acordo com a porcentagem de todos os nucleoides que apresentam algum dano (classe 1 até classe 4) em relação ao total de nucleoides contados, que vai da classe 0 a classe 4 (nº total) (COLLINS et al., 2008), seguindo a fórmula:

$$\text{FD} = \frac{[(\text{n}^\circ \text{ total} - \text{n}^\circ \text{ classe } 0) \cdot 100]}{\text{n}^\circ \text{ total}}$$

Avaliação do potencial mutagênico in vivo

O teste do micronúcleo em sangue periférico (MN) foi usado para verificar o potencial mutagênico *in vivo* do extrato aquoso de *C. pyramidalis*. Foram colocados em duas lâminas, previamente preparadas com laranja de acridina, 10 µl de amostra de sangue de cada animal e a presença de micronúcleos foi avaliada utilizando-se um

microscópio de fluorescência (OCDE, 2016). Para cada amostra, 2000 eritrócitos policromáticos foram contados e uma análise cega foi realizada por um único indivíduo.

Análise estatística

Os resultados da toxicidade aguda foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo controle. Os resultados do MN e EC foram analisados comparando-se o grupo tratado que recebeu extrato aquoso de *C. pyramidalis* com o grupo controle negativo pelo teste de Mann-Whitney. Para se verificar a eficiência destes testes, os grupos controle negativo (CN) e positivo (CP) foram comparados entre si também pelo teste de Mann-Whitney. O nível de significância estabelecido em todos os testes foi $p \leq 0,05$ e o software R foi usado para todas as análises (RDEVELOPMENT, 2012).

Resultados

Avaliação da toxicidade oral aguda

Os resultados avaliando a toxicidade oral aguda estão representados na tabela 1. Os animais receberam a dose de 2000 mg/kg de CPAq por via oral. Nas primeiras horas de observação durante o screening hipocrático, logo após a gavagem, os animais que receberam tratamento não apresentaram nenhuma mudança comportamental não sendo observada nenhuma variação significativa no peso, consumo de água e ração em relação aos animais do grupo controle durante os 14 dias de observação. Também não foram observadas diferenças significativas no peso dos órgãos investigados (Tabela 2). Os resultados obtidos indicam que o produto CPAq apresentou baixa toxicidade com DL_{50} estimada em 2000 mg/kg, não havendo óbitos e nem diferença estatística entre os pesos dos grupos tratados e controle.

Tabela 2: Evolução do peso corporal, consumo de ração, água e variação do peso corporal (média \pm desvio padrão), dos animais tratados com a extrato aquoso de *C. pyramidalis* em relação ao grupo controle (Solução salina).

Grupos	Consumo de ração (g)	Consumo de água (mL)	Peso dos animais Inicial/Final (g)	Variação do Peso Corporal	
				Fígado/Rim	
CP Aq	17,6 \pm 2,6	38,5 \pm 2,9	30,8 – 32,6	0,71 \pm	0,15

Controle	18,5 ± 3,6	35,4 ± 2,7	30,4 – 31,3	0,69 ± 0,19
----------	------------	------------	-------------	-------------

Tabela 3: Peso relativo dos órgãos dos animais do grupo controle (Solução Salina) e do grupo tratado com CPAq na dose de 2000 mg/Kg.

Grupos	Fígado (g)	Baço (g)	Rins (g)
CP Aq	1,6 ± 0,2	0,1 ± 0,01	0,4 ± 0,1
Controle	1,5 ± 0,2	0,2 ± 0,01	0,3 ± 0,1

Os parâmetros bioquímicos foram avaliados (Tabela 3) para detectar possíveis danos causados aos principais órgãos, em especial o fígado e o rim já que ambos possuem um papel de extrema importância para o funcionamento regular do organismo (Han, 2011) e os efeitos nocivos à saúde que podem resultar do uso indiscriminado de medicamentos naturais incluem a hepatotoxicidade (Furbee et al., 2006).

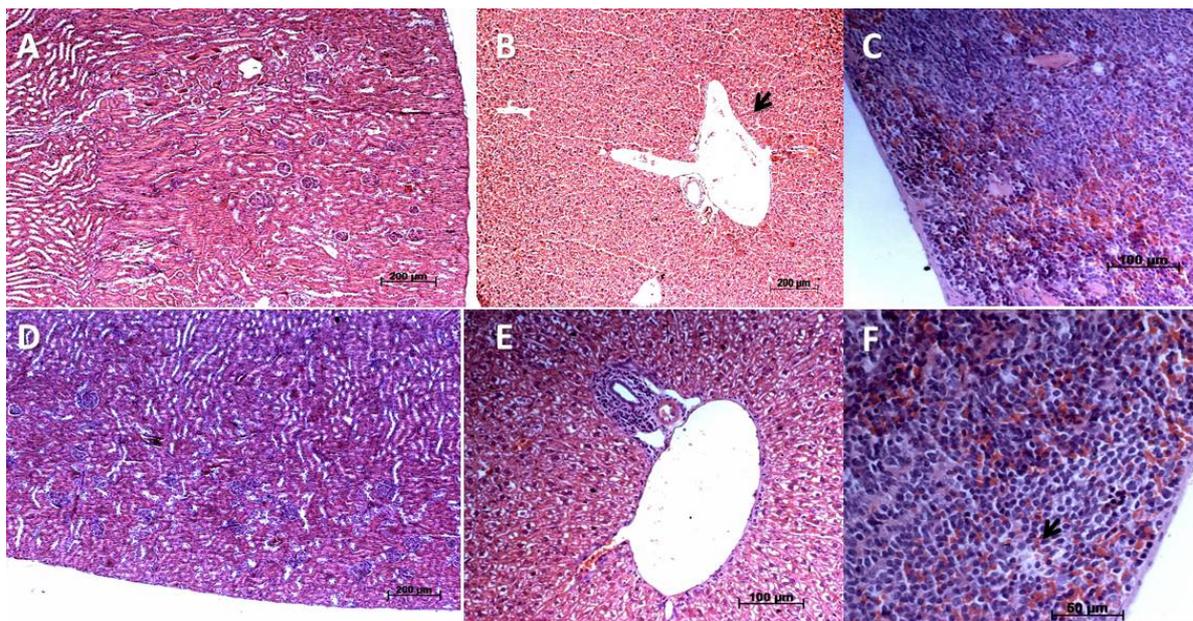
Tabela 4: Análise Bioquímica de animais tratados com CP Aq na dose de 2000 mg/kg frente a análise do controle. Os valores estão demonstrados como absolutos ± desvio padrão.

Parâmetros	Controle (Veículo – Salina) (n = 3)	CP Aq (2000 mg/kg) (n = 3)
Ácido Úrico (mg/dL)	0,95 ± 0,03	0,60 ± 0,03
ALT (U/L)	64,38 ± 1,08	62,59 ± 1,91
AST (U/L)	122 ± 1,10	101,21 ± 2,04
Creatinina (mg/dL)	0,19 ± 0,04	0,18 ± 0,03
Proteínas Totais (g/dL)	4,65 ± 0,08	4,22 ± 0,33
Fosfatase Alcalina (U/L)	97,65 ± 0,23	81,55 ± 0,59
Uréia (mg/dL)	57,93 ± 0,27	55,30 ± 0,11
Albumina	2,14 ± 0,02	2,21 ± 0,03

Quanto às análises histopatológicas, os resultados mostraram que o fígado do grupo de animais tratados com CP Aq na dose de 2000 mg/kg apresentou externamente uma delgada cápsula composta de tecido conjuntivo fibroso, a cápsula de Glisson, um

parênquima bem desenvolvido e com uma malha vascular com vasos de vários calibres. Os hepatócitos apresentaram morfologia poliédrica, núcleo central, nucléolo proeminente e citoplasma acidófilo não havendo diferenças morfológicas entre o grupo controle e o grupo após 14 dias do tratamento. Ainda sobre as análises histopatológicas observou-se também que os rins de todos os grupos experimentais não demonstraram alterações morfológicas, apresentando uma região cortical bem desenvolvida e uma região medular característica. Além disso, os túbulos renais e os glomérulos estavam preservados em todos os animais analisados (Figura 1).

Figura 1: Análise histológica da Toxicidade dos rins, fígado e baço, 14 dias após o tratamento. A- Rins do grupo controle apresentando uma região cortical bem desenvolvida. B- Fígado do grupo controle apresentando um parênquima bem desenvolvido e com uma malha vascular com vasos de vários calibres C- Baço apresentando cápsula e trabécula preservados e polpa branca e vermelha sem alterações. D - Rins Túbulos renais do grupo tratado bem preservados e Glomérulos do grupo tratado semelhante ao grupo controle. E - Hepatócitos grupo tratado com morfologia poliédrica, núcleo central, nucléolo proeminente e citoplasma acidófilo, sem alterações. F – Baço com células e características preservadas e semelhante ao grupo controle.

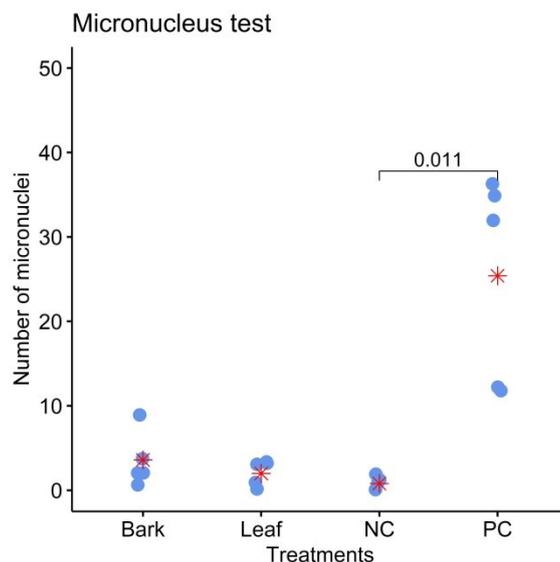


Avaliação da genotoxicidade e mutagênese in vivo

Uma vez que não houve toxicidade aguda oral na dose de 2000 mg/kg esta mesma dose foi utilizada para os testes de genotoxicidade e mutagênese. A figura 2 representa o número de micronúcleos em eritrócitos policromáticos dos animais dos grupos controle e tratado, sacrificados após 48 horas com os tratamentos específicos. Pode ser observado que o número de eritrócitos policromáticos de CP Aq foi

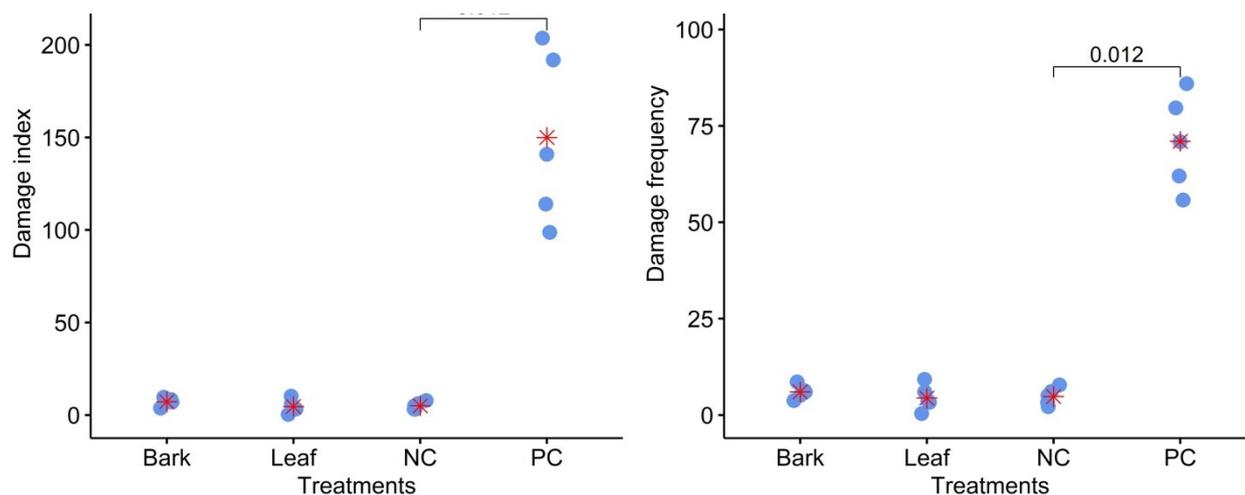
semelhante ao controle negativo (>10), não havendo diferença estatística significativa entre eles ($p > 0,05$) e demonstrado que a fração CP Aq utilizada não foi mutagênica.

Figura 2: Avaliação da mutagenicidade in vivo de CP Aq (2000 mg/kg b.w. v.o.) através da frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos (MPH) murinos. Cada ponto representa um animal (n=5) do grupo. CN: controle negativo.



A genotoxicidade in vivo também foi analisada após 48 horas da administração de CPAq, onde verificou-se a frequência e índice de dano ao DNA. Através dos resultados obtidos foi observado que não houve aumento estatisticamente significativo da FD ou ID das amostras dos animais tratados com o extrato, em relação ao controle negativo (Figura 3). Para a avaliação da mutagênese e genotoxicidade foi possível fazer uma comparação com duas partes das plantas e com isso foi possível observar que tanto o uso da casca quanto o uso da folha não traz alterações.

Figura 3: Ensaio Cometa em sangue periférico de camundongos tratados com CPAq (2000 mg/kg) através da análise da do Índice de Dano (ID) e Frequência de Dano (FD). CN: controle negativo. Resultados expressos em Média \pm Desvio Padrão. * $P < 0,05$ = diferença significativa com o controle negativo.



Discussão

As plantas geralmente apresentam uma grande variedade de metabólitos secundários que as proporcionam várias atividades químicas e biológicas, como antioxidante, antitumoral, entre outras (Al-Saleem, 2017), possuindo, portanto, grande importância terapêutica. Nos ensaios realizados neste trabalho não houve morte ou alteração de comportamento dos animais do grupo tratado bem como nas análises bioquímicas realizadas. Segundo Ashafa (2009) o peso órgão – corpo traz muita informação sobre o que pode ter acontecido do decorrer do ensaio. O aumento do peso do órgão pode indicar uma inflamação enquanto que uma diminuição do peso pode ser induzir uma constrição celular. A diminuição do baço, por exemplo, pode estar relacionado com distúrbios metabólicos (Xiang et al., 2015).

Segundo Haase (2017) o teste micronúcleo pode ser considerado referência para avaliações na estrutura cromossômica. Ele aponta um aumento no número de micronúcleos nos eritrócitos do sangue periférico quando a substância é mutagênica. Os resultados mostraram que o extrato de CP Aq na dose de 2000 mg/Kg administrada por via oral não foi mutagênico não havendo diferença estatística no número de micronúcleos em relação ao controle negativo. Em 2016, Mendonça et al também realizou a mesma atividade com extrato aquoso de *Cecropia pachystachya* e obteve resultado similar ao deste estudo, não sendo mutagênico ou genotóxico. Os eritrócitos do sangue periférico sofrem alteração no aumento do número de micronúcleos quando uma substância é mutagênica, o que não foi verificado neste estudo. Segundo a OECD (2016) um composto é definido como genotóxico quando a frequência de micronúcleos em animais tratados é estatisticamente diferente daquela observada em animais de controle negativo. A partir dos resultados gerados nesse estudo, é possível afirmar que o extrato de *C. pyramidalis* pode ser considerado seguro quando administrado por via oral.

De outro modo, a análise do DNA cometa possui uma ampla sensibilidade, pois permite a identificação de agentes genotóxicos indutores de quebra de fita simples no DNA, através da medição dos fragmentos (Traesel et a., 2017). Mendonça e colaboradores (2017) encontraram resultados semelhantes a este estudo, com o extrato aquoso de *Cecropia pachystachya*, ou seja, não foi mutagênico. Ainda nesse contexto, estudos investigativos vem sendo realizados e têm evidenciado o potencial

genotóxico de substâncias extraídas de plantas medicinais em organismos como roedores e plantas.

O uso destas plantas tem sido vivenciado por várias gerações ao longo da história da humanidade. As plantas representam uma fonte de produtos naturais com princípios ativos que podem resultar em efeitos mutagênicos. Estudos realizados por Sousa (2017) evidenciou que testes feitos com *Caesalpinia férrea*, planta que pertence ao mesmo gênero deste estudo, não apresentou efeito citotóxico e/ou mutagênico na concentração de 0,039g/L em células meristemáticas radiculares apicais de *Allium cepa*, porém em doses elevadas se evidenciou ação mutagênica, o que não ocorreu o presente estudo. Este trabalho contribui para a determinação da segurança do uso medicinal de casca de *C. pyramidalis*, que tem crescido rapidamente em todo o mundo.

Conclusão

Os resultados demonstram que o extrato aquoso de *C. Pyramidalis* não causou alterações significativas de toxicidade quando administrado por via oral, não sendo capaz de induzir danos genéticos ou mutações em nenhum dos testes realizados *in vivo*. Os resultados obtidos neste estudo contribuem para a determinação da segurança do uso medicinal popular da casca de *C. pyramidalis*.

4. Agradecimentos

Os autores agradecem às agências brasileiras (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq) pelo apoio financeiro concedido para realização deste trabalho.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Referências

A.O.T. Ashafa, M.T. Yakubu, D.S. Grierson, A.J. Afolayan **Toxicological evaluation of the aqueous extract of *Felicia muricata* Thunb. leaves in Wistar rats** Afr. J. Biotechnol., 8 (2009), pp. 949-954

Bruning, M.C.R.; Mosegui, G.B.G.; Vianna, C.M.M.; The use of phytotherapy and medicinal plants in primary healthcare units in the cities of Cascavel and Foz do Iguaçu – Paraná: the viewpoint of health professional, 2012.

OCDE. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris, 2016. Disponível em: < https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-474-mammalian-erythrocyte-micronucleus-test_9789264264762-en >.

Organization For Economic Cooperation And Development, Oecd/Ocde. **Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. Guideline For The Testing Of Chemicals**, p. 1-14, 2001.

Reddy, S.G.E., Dolma, K.S.; Koundal, R.; Singh, B. 2015. Chemical composition and insecticidal activities of essential oils against diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Nat. Prod. Res.* 11: 1-5.

F. Xiang, Z.W. Li, Z.Q. Yin, R.Y. Jia, Z.Q. Hu, L.C. Peng, Y.Q. Ni, X.X. Liang, L.X. Li, C.L. He, L.Z. Yin, G. Su, C. Lv **Acute and subchronic toxicity as well as evaluation of safety pharmacology of *Galla chinensis* solution** *J. Ethnopharmacol.*, 172 (2015), pp. 386-394.

Han, Y.D., Song, S.Y., Lee, J.H., Lee, D.S., Yoon, H.C., 2011. Multienzyme-modified biosensing surface for the electrochemical analysis of aspartate transaminase and alanine transaminase in human plasma. *Anal. Bioanal. Chem.* 400, 797–805
Santos, C.A., Passos, A.M.P.R., Andrade, F.C., Camargo, E.A., Estevam, C.S., Santos, M.R.V., Thomazzi, S.M., 2011. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Caesalpinia pyramidalis* in rodents. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21, 1077–1083.

HAASE, A.; DOMMERSHAUSEN, N.; SCHULZ, M.; LANDSIEDEL, R.; REICHARDT, P.; KRAUSE, B. C.; TENTSCHERT, J; LUCH, A. Genotoxicity testing of different surface-functionalized SiO₂, ZrO₂ and silver nanomaterials in 3D human bronchial models. *Archives of Toxicology*, p. 1-17, 2017.

Oliveira, A. M.; Nascimento, M.F.; Ferreira, M.F.A.; Moura, D.F.; Souza, T.G.S.; Silva, G.C.; Ramos, E.H.S.; Paiva, P.M.G.; Medeiros, P.L.; Silva, T.G.; Soares, L.A.L.; Chagas, C.A.; Souza, I.A.; Napoleão, T.H., 2016.

Matias, J. R.; Silva, F. F. D.; Dantas, B. F.; Catingueira-verdadeira - *Poincianella pyramidalis* [Tul.], 2017.

MENDONÇA, E. D.; DA SILVA, J.; DOS SANTOS, M. S.; CARVALHO, P.; PAPKE, D. K. M.; ORTMANN, C. F.; PICADA, J. M.; FERRAZ, A. D. B. F. Genotoxic, mutagenic and antigenotoxic effects of *Cecropia pachystachya* Trécul aqueous extract

using in vivo and in vitro assays. *Journal of ethnopharmacology*, v. 193, p. 214-220, 2016.

Organização mundial da saúde, OMS - Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde, 2008.

Ribeiro, A.R.S.; efeito gastroprotetor do extrato etanólico da entrecasca da *Caesalpinia pyramidalis tul.* em ratos, 2013.

Sahoo, N., Manchikanti, P., Dey, S., 2010. Herbal drugs: standards and regulation. *Fitoterapia* 81, 462–471.

Silva, F.D.B.; Sales, M.A.G.; Sá, O.R.M.; Santana, G.M.; Deus, M.S.S.; Sousa, J.M.C.; Ferreira, P.M.P.; Peron, A.P.; Potencial citotóxico, genotóxico e citoprotetor de extratos aquosos de *Caesalpinia pyramidalis Tul.*, *Caesalpinia ferrea Mart.* e *Caesalpinia pulcherrima Sw.*, 2015.

Sousa, M.J.B.; Avaliação do Potencial Genotóxico e Mutagênico de Extratos Padronizados de *Caesalpinia ferrea* (jucá) e *Brosimum gaudichaudii* (inharê), 2017.

Traesel, G. K., Souza De Araújo, F. H., Almeida Castro, L. H., Freitas De Lima, F., Lima Tolouei Menegati, S. E., Justi, P. N.; Kassuya, C.A.L.; Cardoso, C.A.L.; Argandoña, E.J.S.; Oesterreich, S. A. Safety Assessment of Oil from Pequi (*Caryocar brasiliense Camb.*): Evaluation of the Potential Genotoxic and Clastogenic Effects. **Journal of Medicinal Food**, 2017.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho indicaram os componentes majoritários do extrato de *C. pyramidalis*, como ácido gálico, ácido elágico e saponinas o que justifica a sua eficiência significativa na atividade antioxidante, em especial sobre radicais DPPH. Além disso, o CP Aq mostrou eficiência nos testes citotóxicos em células tumorais. Por outro lado o mesmo não se mostrou tóxico em células normais e o uso do extrato por via oral pode ser considerado seguro, não apresentando genotoxicidade ou mutagenicidade. Outro fator relevante foi a diminuição dos níveis de NO (óxido nítrico), se mostrando um possível agente anti-inflamatório, porém para as metodologias e cepas testadas o CP Aq não apresentou atividade antimicrobiana.

Os resultados encontrados foram favoráveis para que estudos futuros sejam realizados, sejam eles para o isolamento de moléculas líderes ou melhoramento de condições pra obtenção de melhores resultados.

O extrato aquoso de *C. pyramidalis* apresentou um expressivo potencial para ser utilizado como componente adjuvante que ajudem a tratar ou amenizar patologias que atormentam a saúde da população.

REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, S. A. et al. **Compostos bioativos e atividade antioxidante do café.** *Ciência e Agrotecnologia*, v. 34, p. 414-420, 2010.

AGRA, M. F.; NURIT, K.; BASÍLIO I. J. L. D.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. **Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil.** *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. v. 18, n. 3, pp. 472-508, 2008.

ALBUQUERQUE, U.P; OLIVEIRA, R.F. **Is the use-impact on native caatinga species in Brazil reduced by the high species richness of medicinal plants?** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 113, p.156–170, 2007.

ALMEIDA, V.L. et al. **Câncer e agentes antineoplásicos ciclo- celular específicos e ciclocelular não-específicos que interagem com DNA: uma introdução.** *Química Nova*, v. 28, n. 1, p. 118-129. 2005.

AMORIM, LLS. **Saúde e meio ambiente- Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde- atitude e ampliação do acesso: uma questão de direito** [dissertação]. Caxias do Sul: Universidade de Caxias do Sul; 2009

ATANASOV, A. G., B. WALTENBERGER, E. M. PFERSCHY-WENZIG et al., **“Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review,”** *Biotechnology Advances*, vol. 33, no. 8, pp. 1582–1614, 2015.

APG. **The angiosperm phylogeny group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV.** *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 181, p. 1–20, 2016.

AZMIR,J.; I. S. M. ZAIDUL, M. M. RAHMAN, K. M. SHARIF, A. MOHAMED, F. SAHENA, M. H. A. JAHURUL, K. GHAFOOR, N. A. N. NORULAINI, A. K. M. OMAR, **“Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review,”** *J. Food Eng.*, 117, 4, 426–436, 2013;

BAHIA, M. V.; SANTOS, J. B.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. **Biflavonoids and other phenolics of *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae).** *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 16(6b): 1402-1405.

BAHIA, M. V.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. **Occurrence of biflavones in leaves of *Caesalpinia pyramidalis* specimens.** *Química Nova*, v. 33, n. 6, p. 1297-1300, 2010.

BARREIRO, E. J.; MANSUR, C. A. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos.** Porto Alegre: ArtMed,. 608 p. 2001.

BARREIROS, A. L. B. S. et al. **Estresse oxidativo:relação entregeração de espécies reativas e defesa do organismo.***Química Nova*, São Paulo, v. 29, n.1, p. 113-123, 2006

BRASIL. Instituto Nacional do Câncer -INCA. **Estimativa | 2018. Incidência de Câncer no Brasil**. Acesso em 07 de janeiro de 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2018-incidencia-de-cancer-no-brasil>

BRASIL. MMA – **Ministério do Meio Ambiente. Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da caatinga**. Brasília: Universidade Federal de Pernambuco, Conservation International, Fundação Biodiversitas. 2002.

BENTHAM, G. Leguminosae. In: BENTHAM, G.; HOOKER, J. D. **Sistens dicotyledonum polypetalorum ordines XI: Leguminosae-Myrtaceae**. Genera Plantarum. London: Lovell Reeve e Co, v. 1, n. 2, p. 434-600, 1865.

BFG - **The Brazil Flora Group. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil**. Rodriguésia, v.66, n.4, p.1085-1113. 2015.

BRUNETON, J.; **Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales**, 3 Édition. Paris: Éditions Tec & Doc, 1999;

CAKILCIOGLU U, SENGUN MT, TURKOGLU I. **An ethanobotanical survey of medicinal plants of Yazikonak and Yurtbasi districts of Elazigprovidence, Turkey**. J Med Plant Res.; 4(7): 567–572. 2010.

CALVIELLO, G. et al. **DNA Damage and Apoptosis Induction by the Pesticide Mancozeb in Rat Cells: Involvement of the Oxidative Mechanism**. Toxicology and Applied Pharmacology, v. 211, n. 2, p. 87 - 96, 2006.

CAROCHO, M., FERREIRA, I.C.F.R. **A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives**. Food and Chemical Toxicology. 51: 15–25, 2013.

CARTAXO, S.L.; SOUZA, M.M.A.; ALBUQUERQUE, U.P. **Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil**. Journal of Ethnopharmacology. v.131, p. 326-342, 2010.

CHANDRA, N. et al. **Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health**. Pharmacognosy Reviews, v. 4, n. 8, p, 118-126, 2010.

COSTERTON, W. et al. **The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections**. The Journal Clinical Investigation, v. 112, p. 1466–1477, 2003.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants.** Columbia University Press, New York. p. 1262, 1981.

CRUZ, M. C. S.; SANTOS, P. O.; BARBOSA, J. R. A. M.; MELO, D. L. F. M.; ALVIANO, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; ALVIANO, D. S.; TRINDADE, R. C. **Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses.** Journal of Ethnopharmacology, v. 111, n. 2, p. 409-412, 2007.

DEWICK, P. M. **The mevalonate and methylerythritol phosphate pathways: terpenoids and steroids.** In: Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 3 ed, chichester: John Wiley & Sons, 2009. Cap. 5, p. 187-306.

DUNNE JUNIOR, W. M. **Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?** Clinical Microbiology Reviews, v. 15, p.155-166, 2002.

EVANS, W.; **Pharmacognosy**, Fifteenth. China: Elsevier, 2002;

FERREIRA, I.C.F.R., BARROS, L., ABREU, R.M.V. **Antioxidants in wild mushrooms.** Curr. Med. Chem. 16: 1543–1560, 2009.

FLORA, S.J.S., **Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and mettaloid exposure.** Oxid. Med. Cell. Longev. 2: 191–206, 2009.

FLORES, A. V. et al. **Organochloride: a public health problem.** Ambiente & Sociedade, v. 7, n. 2, p. 111-124, 2004.

FRANCO, D.C.Z., **Investigação Dos Potenciais Anti-Inflamatório E Antitumoral De Análogos Do Resveratrol**, 2017.

FRANÇA, S.C; SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P; MELLO, J.C.P; MENTZ, L.A; PETROVICK, P.R.; **FARMACOGNOSIA DO PRODUTO NATURAL AO MEDICAMENTO**, 2017.

FORZZA R.C.; STEHMANN, J. R.; NADRUZ, M.; COSTA, A.; CARVALHO JÚNIOR, A. A. et al. **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. 2013.

GALLINDO, F.A.T. - Recife: **Cntro Nordestino de Informações sobre Plantas - CNIP**; Associação Plantas do Nordeste - APNE, 2003.

GAMEIRO, P. H. **Efeito antimutagênico do extrato aquoso de Agaricus brasilienses em cultura de linfócitos humanos.** Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal de Pelotas, p. 56, 2005.

GIULIETTI, A. M.; NETA, A. L. B.; CASTRO, A. A. J. F.; GAMARRA-ROJAS, C. F. L.; SAMPAIO, E. V. S. B.; VIRGÍNIO, J. F.; QUEIROZ, L. P.; FIGUEIREDO, M. A.; RODAL, M. J. N.; BARBOSA, M. R. V.; HARLEY, R. M. **Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga.** Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. 2004.

GIULLIETI, A. M.; CONCEIÇÃO, A.; QUEIROZ, L. P. **Diversidade e caracterização das fanerógamas do semiárido brasileiro**. Recife: Associação Plantas do Nordeste, 2006, 488 p. Revathi P, Parimelazhagan T. Traditional knowledge on medicinal plants used by the Irula tribe of Hasanur hills, Erode district, Tamil Nadu, India. *Ethnobot Leaflets*; 14: 136–160. 2010.

GOMES, G.S.; SILVA, G.S.; CONCEIÇÃO, G.M.; **Diversidade De Leguminosas No Cerrado Do Município De São João Do Sóter, Maranhão, BRASIL**, 2017.

HASAN HA, RAAUF AMR, RAZIK BMA, HASSAN BAR. **Chemical composition and antimicrobial activity of the crude extracts isolated from Zingiber officinale by different solvents**. *Pharm Anal Acta*. 2012; 3(9): 1–5.

HASLAM, E. **Vegetable tannins: lessons of a photochemical lifetime**. *Phytochemistry*. 2007; 68 (22-24): 2713-21

HENRIQUES, J. A. P.; SALVADOR, M. **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. 1ª edição. Canoas: Editora da Ulbra, pp.13-110, 2004.

HUTCHINSON, J. **The genera of flowering plants**. Oxford University Press, Oxford. v. 1. p. 516, 1964.

IARMARCOVAI, G. et al. **Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: a meta-analysis**. *Mutation Research, Amsterdam* v. 659, n. 3, p. 274–283, 2009.

KARUNAMOORTHY K, JEGAJEEVANRAM K, XAVIER J, VIJAYALAKSHMI J, MELITA L. **Tamil traditional medicinal system—siddha: an indigenous health practice in the international perspectives**. *Int J Genuine Trad Med*; 2(2): 1–11. 2012.

KAVINDRA NATH, LILI GUO , BETHANY NANCOLAS, DAVID S. NELSON, ALEXANDER A. SHESTOV, SEUNG-CHEOL LEE, JEFFREY ROMAN A, RONG ZHOU, DENNIS B. LEEPER, ANDREW P. HALESTRAP, IAN A. BLAIR, JERRY D. GLICKSON; **Mechanism of antineoplastic activity of lonidamine**, (2016).

LIMA, M. R. F.; LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; ANDRADE, M. C. C.; SANTANA, A. E. G.; GENET, J. P.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. **Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants**. *Journal of Ethnopharmacology*. v.105, n. 1-2, pp. 137–147, 2006.

LIMA, R. K. et al . **Bactericidal and antioxidant activity of essential oils from Myristica fragrans Houtt and Salvia microphylla H.B.K**. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 89, p. 523-528, 2012.

LINDBERG, H. K. et al. **Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folatedeprived human lymphocytes**. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 617, n. 1 – 2, p. 33 – 45, 2007.

LÓPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. **Biofilms**. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 2, p. 11, 2011.

LUCENA, C. M.; COSTA, G. G. S.; CARVALHO, T. K. N.; GUERRA, N. M.; QUIRINO, Z. G. M.; LUCENA, R. F. P. **Uso e conhecimento de cactáceas no município de São Mamede (Paraíba, Nordeste do Brasil)**. *Biofar*, Volume especial, pp. 121-134, 2012.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; V.F. VEIGA. JR.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. **Plantas Medicinais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares**. *Química Nova*, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MELO, M.C.L.V.; **Avaliação Da Toxicidade E Do Potencial Antioxidante, Antimicrobiano E Antitumoral Do Extrato Aquoso De Ramos De *Krameria tomentosa* A. ST. -HIL (KRAMERIACEAE)**, 2018.

MARIZ, S.R.; BORGES, A.C.R. ; MELO-DINIZ, M.F.F.; MEDEIROS, I.A. **Possibilidades terapêuticas e risco toxicológico de *Jatropha gossypifolia* L.: uma revisão narrativa** (2010).

Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação **Previsão Climática Sazonal do MCTIC** Available in http://www.cptec.inpe.br/~rupload/arquivo/GTPCS_Nota34_27042017.pdf (2018), Accessed 5th May 2017.

Ministério do Meio Ambiente **Relatório técnico de monitoramento do desmatamento no bioma Caatinga, 2008 a 2009**. MMA/IBAMA/CID, Brasília (2011).

MUGHAL, A. et al. **Micronucleus and comet assay in the peripheral blood of juvenile rat: establishment of assay feasibility, time of sampling and the induction of DNA damage**. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 700, n. 1-2, p. 86-94, 2010.

OBE, G. et al. Chromosomal Aberrations: Formation, **Identification and Distribution**. *Mutation Research*, v. 504, n.5, p. 17-36, 2002.

Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas **Capítulo 9—Mudanças ambientais de curto e longo prazo: projeções, reversibilidade e atribuição**
T. Ambrizzi, M. Araujo (Eds.), Base Científica das Mudanças Climáticas, 1, COPPE, Rio de Janeiro, pp. 322-346. (2015).

PEREIRA, S. C. **Plantas úteis do Nordeste do Brasil**. Sidclay Cordeiro Pereira, Cintia Ferreira Lima Gamarra- Rojas, Guillermo Gamarra-Rojas, Marcelino Lima. (2003).

PEREIRA, D. M., P. VALENTÃO, J. A. PEREIRA, P. B. ANDRADE, “**Phenolics: From Chemistry to Biology**,” *Molecules*, 14, 6, 2202–2211, 2009;

PIETTA, G. **Flavonoids as antioxidants**. *Journal of Natural Products*, United States, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PRADO, D. E. **As caatingas da América do Sul**. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. *Ecologia e conservação da caatinga*. Recife: Editora Universitária da Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS, 2006

SCHNEIDER, C.D., OLIVEIRA, A.R. **Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico**. *RBME*. 10(10): 308-13, 2004.

RAMEY, B. E. et al. **Biofilm formation in plant–microbe associations**. *Current Opinion in Microbiology*, v. 7, p. 602–609, 2004.

REVATHI P, PARIMELAZHAGAN T. **Traditional knowledge on medicinal plants used by the Irula tribe of Hasanur hills, Erode district, Tamil Nadu, India**. *Ethnobot Leaflets*. 2010; 14: 136–160.

RIBEIRO, A. R. S.; DINIZ, P. B.; ESTEVAM, C. S.; PINHEIRO, M. S.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L.; THOMAZZI, S. M. **Gastroprotective activity of the ethanol extract from the inner bark of *Caesalpinia pyramidalis* in rats**. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 147, n. 2, p. 383-388, 2013.

RIBEIRO, D.A.; MACÊDO, D.G.; OLIVEIRA, L.G.S.; SARAIVA, M.E.; OLIVEIRA, S.F.; SOUZA, M.M.A.; MENEZES, I.R.A.; **Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil**, *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, v.16, n.4, p.912-930, 2014.

Saeed S, Tariq P. **Antimicrobial activities of *Embllica officinalis* and *Coriandrum sativum* against gram positive bacteria and *Candida albicans***. *Pak J Bot.* 2007; 39(3): 913–917.

SAMUEL JK, ANDREWS B. **Traditional medicinal plant wealth of Pachalur and Periyur hamlets Dindugal district, Tamil Nadu**. *Ind J Tradit Know.* 2010; 9(2): 264–270.

SARAIVA, A. M.; SARAIVA, M. G.; GONÇALVES, A. M.; SENA FILHO, J. G.; XAVIER, H. S.; PISCIOTTANO, M. N. C. **Avaliação da atividade antimicrobiana e perfil fitoquímico de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Fabaceae)**. *Biofar.* v. 7, n. 2, p. 52- 60, 2012b.

SANTOS, N. K. A.; COUTINHO, H. D. M.; RODRIGUES, F. F. G.; VIANA, G. S. B.; COSTA, J. G. M. **Chemical characterization and synergistic antibiotic activity of**

volatile compounds from the essential oil of *Vanillosmopsis arborea*. Medicinal Chemistry Research, v. 20, p. 637-641, 2011.

SANTOS, N. K. A.; RODRIGUES, F. F. G.; COUTINHO, H. D. M.; VIANA, G. S. B.; COSTA, J. G. M. **Isolation of alpha-Bisabolol from the Essential Oil of *Vanillosmopsis arborea* Baker and Modulation of Antibiotic Activity Using Gaseous Contact.** Journal of Essential Oil Bearing Plants, v. 16, p. 826-831, 2013a.

SASAKI, Y.F. et al. **The comet assay with mouse multiple organs: Comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP carcinogenicity database.** Critical Reviews Toxicology, London, v. 30, n. 6, p. 629-799, 2000.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R. ; CRUZ, M. E. S. **Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas.** Fitopatologia Brasileira, v. 28, p. 554-556, 2003.

SHAKYA, P.; MARSLIN, G.; SIRAM, K.; BEERHUES, L.; FRANKLIN, G. **Elicitation as a tool to improve the profiles of high- value secondary metabolites and pharmacological properties of *Hypericum perforatum*.** Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2017.

SILVA, K. M. A.; CHAVES, T. P.; SANTOS, R. L.; BRANDÃO, D. O.; FERNANDES, F. H. A.; RAMOS JÚNIOR, F. J. L.; SANTOS, V. L.; FELISMINO D. C.; MEDEIROS, A. C. D. **Modulation of the erythromycin resistance in *Staphylococcus aureus* by ethanolic extracts of *Ximenia americana* L and *Schinopsis brasiliensis* Engl.** Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. v. 14, n.2, pp. 92 – 98, 2015.

SILVA, C. A.; PAULA JÚNIOR, T. J.; TEIXEIRA, H. **Ação antimicrobiana de extratos de plantas medicinais sobre espécies fitopatogênicas de fungos do gênero *Colletotrichum*.** Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Botucatu, v. 10, n. 3, p. 57-60, 2008.

SILVA, C. H. T. B.; PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S.; CASTRO, V. T. N. A.; LIMA, D. C. A.; AMORIM, E. L. C. **Antioxidant Capacity and Phenolic Content of *Caesalpinia pyramidalis* Tul. and *Sapium glandulosum* (L.) Morong from Northeastern Brazil.** Molecules. v. 16, n. 6, p. 4728-4739, 2011a.

Tabarelli, M.; Silva, J. M.C; Fonseca, M. T.; Lins, L. V. **Áreas e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Caatinga.** In: LEAL, I. R.; TABARELLI M.; SILVA, J. M. C. Ecologia e Conservação da Caatinga. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2003. 382 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** 5. ed. Porto Alegre: Artmed, p.918, 2013.

TERRADAS, M. et al. **Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell?** Mutation Research, Amsterdam, v. 705, n. 1, p. 60 – 67, 2010.

THIERENS, H.; VRAL, A.; **The micronucleus assay in radiation accidents.** Annali dell' Institute Superiore de Sanità, Roma, v. 45, n.3, p. 260-264, 2009.

TRENTIN, D. S. et al. **Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against Staphylococcus epidermidis planktonic and biofilm lifestyles.** Journal Ethnopharmacology, v. 137, p. 327–335, 2011.

TRUEBA, G.P; SANCHEZ, G.M.; **Los flavonoides como antioxidantes naturales.** Acta farm Bonaerense. 2001; 20 (4): 297-306.

WASSON, G. R.; MCKELVEY-MARTIN, J.; DOWNES, C.S.; **The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer.** Mutagenesis, Swasea. v.23, n.3, p. 153 – 162, 2008.

wayteck, I. et al. **A personalized view on cancer immunotherapy.** Cancer Letters, v. 352, p. 113–125, 2014.

WHITE, P. A; RASMUSSEN, J. B. **The Genotoxic Wastes in Surface Waters.** Mutation Research, v. 410, p. 223-236, 1998.

YILDIRIM, I and KUTLU, T.; **Anticancer Agents: Saponin and Tannin,** 2015

ZENI, A.L.B.; PARISOTTO, A.V.; MATTOS, G.; HELENA, E..T.S.; **Use of medicinal plants as home remedies in Primary Health Care in Blumenau – State of Santa Catarina, Brazil;** 2017.

APÊNDICE

Artigo publicado na revista *Brazilian Journal of Microbiology* no ano de 2018, no período do desenvolvimento do doutorado. F.I. (2017): 1.810 – Qualis Capes para Ciências Biológicas I – B2.

BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY 495 (2018) 59-63



BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY

<http://www.bjmicrobiol.com.br/>



Short communication

Screening of endophytic fungi stored in a culture collection for taxol production



**Hortência Farias de Andrade^a, Lívia Caroline Alexandre de Araújo^a,
 Bruno Souza dos Santos^a, Patrícia Maria Guedes Paiva^a, Thiago Henrique Napoleão^a,
 Maria Tereza dos Santos Correia^a, Maria Betânia Melo de Oliveira^{a,*},
 Gláucia Manoella de Souza Lima^b, Rafael Matos Ximenes^b, Túlio Diego da Silva^c,
 Gírliane Regina da Silva^d, Márcia Vanusa da Silva^a**

^a Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biotecnologia, Departamento de Biotecnologia, Recife, PE, Brazil
^b Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biotecnologia, Departamento de Antibióticos, Recife, PE, Brazil
^c Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, Recife, PE, Brazil
^d Universidade Federal Rural de Pernambuco, Centro de Apoio à Pesquisa (CIEMAPESQ), Recife, PE, Brazil

<p>ARTICLE INFO</p> <p>Article history: Received 5 March 2018 Accepted 6 June 2018 Available online 11 August 2018 Associate Editor: Gisela Monteiro</p> <p>Keywords: Paclitaxel Taxol route genes ITS <i>Colletotrichum gloeosporioides</i></p>	<p>ABSTRACT</p> <p>In this work, four isolates of endophytic fungi (<i>Alternaria alternata</i>, <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>, <i>Gliosporium dingiana</i> and <i>Nigrospora sphaerica</i>), deposited in the culture collection 'University Recife Mycologia' (URM) at the Universidade Federal de Pernambuco, were characterized for the genes ITS 1 and 4 (region 5.8 S) and evaluated for taxol production.</p> <p>© 2018 Sociedade Brasileira de Microbiologia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).</p>
---	--

Endophytic microorganisms are those that live inside plants, inhabiting the aerial parts, such as the leaves and stems, without causing any damage to their hosts, unlike pathogens.^{1,2} However, an endophytic microorganism may become pathogenic, if there is an imbalance between their virulence and the plants defense.³ Endophytic fungi have biotechnological relevance for many applications, such as

for use in bioremediation processes⁴ and the production of compounds with antimicrobial, antioxidant or anticancer activities.⁵⁻⁷ However, endophytic fungi have still been poorly explored industrially.⁸

According to the World Health Organization (WHO), 8.8 million deaths occurred in 2015, due to cancer, and it is estimated that 12.6 million deaths will occur per year by 2030.⁹ Taxol

* Corresponding author.
 E-mail: mbeccaria2008@gmail.com (M.B. Oliveira).
<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.06.001>
 1517-8362/© 2018 Sociedade Brasileira de Microbiologia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

(paclitaxel) is a potent drug used in the treatment of some neoplasms, as both a first- and second-line of treatment.²⁰ It acts by inhibiting cell replication through binding to the beta-tubulin subunit of microtubules and induces apoptosis by inactivating the apoptosis inhibitory protein I κ I-2.²¹ This compound is naturally produced by the bark of yew plants (*Taxus* species). However, new methods to obtain it are being explored, because its extraction or semi-synthesis of sufficient quantities to supply the current demand would imply devastation, as the removal of the bark results in the death of the tree.^{22,23}

Taxol can also be produced by some fungi such as *Colletotrichum gloeosporioides*, *Gliosporium cingulata*, *Nigrospora sphaerica*, *Pestalotiopsis guayanae*, *Alternaria alternata*, and *Fusarium solani*.²⁴ Genetic screening for taxol production is currently used to identify microorganisms that produce it, and three key genes are usually investigated: *tx* (encoding taxadiene synthase), *dlot* (encoding 10-deacetylacrylatin III-10-O-acetyltransferase), and *hapt* (encoding C-13 phenylpropanoyl side chain-CoA acyltransferase).²⁵

Due to the great importance of taxol in anti-cancer therapy, there is a constant search for new production methods. In this work, four isolates of endophytic fungi, deposited in a culture collection from the Universidade Federal de Pernambuco, were evaluated for their ability to produce taxol through a search of the genes involved in the taxol metabolic pathway. Next, the presence of taxol in the cell mass and metabolic liquid of fungal cultures was investigated by LC/MS. In addition, the isolates were molecularly characterized for the ITS 1 and 4 genes (region 5.8 S).

The study was performed with four isolates of endophytic fungi that, belong to different genera and were, previously deposited in the culture collection 'University Recife Mycology (URM)' of the Departamento de Micologia at the Universidade Federal de Pernambuco. The place of collection and the plant from which they were isolated are described in Table 1. All of the samples were stored lyophilized and/or in mineral oil.

The isolates were reactivated in Potato Dextrose Agar (PDA) medium. The standard cetyl trimethylammonium bromide

(CTAB) method was used for the extraction of total DNA. The genes ITS 1 and 4 (ITS1-5.8S-ITS2 rDNA) were amplified using the oligonucleotide primers ITS1 and ITS4. The rDNA gene sequences of the samples were compared with others deposited in the NCBI Genbank database using the BLAST tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). The quality of the sequencing was analyzed using the Pregap4.0 and Gap4.0 programs of the Staden package. Screening of the genes in the taxol metabolic pathway was performed using three conserved sequences of the main genes involved in taxol biosynthesis: *tx*, *dlot* and *hapt* (Table 2).

To obtain the pre-inoculum, fungi were cultivated in Petri dishes in PDA medium for 7 days at 28 °C. Next, blocks (6 mm diameter) were made, and six of them were transferred to 2-L Erlenmeyer flasks, with one quarter of their capacity filled with Potato Dextrose medium (24 g/L), supplemented with chloramphenicol (0.1 g/L), phenylalanine (0.04 g/L), magnesium sulfate heptahydrate (2 g/L), and ammonium sulphate (12 g/L). Three flasks were prepared for each fungus. The fungi were cultivated at 28 °C under agitation (160 rpm) and every 7 days an erlenmeyer of each species was used for extraction.

The cell mass was treated with ethyl acetate in order to extract intracellular secondary metabolites. For this, 10 mL of the solvent was added to 1 g of the wet weight of each cell mass, and the mixture was subjected to agitation (180 rpm) for 30 min. For extraction of the compounds present in the metabolic liquid, ethyl acetate was added to the liquid at a ratio of 2:1 (v/v) and subjected to stirring at 180 rpm for 30 min.

To verify taxane production, the extracts were evaluated by thin layer chromatography (TLC) in a saturated chamber, using 60 F254 silica gel plates with 0.25 mm thickness (Macherey-Nagel, Germany). The standard, paclitaxel (Cayman Chemical, MI, USA), was dissolved in methanol, and the Liebermann-Burchard reagent, anisaldehyde-H₂SO₄, and sulfuric vanillin were used as chemical developers. Chloroform-acetonitrile (7:3 v/v) was used as the elution system.

High performance liquid chromatography (HPLC) was performed using a Prominence LC-20AT liquid chromatograph (Shimadzu, Kyoto, Japan), consisting of an LC-20AT quaternary

Table 1 - Fungal isolates used in this work, with respective place and plant of collection.

Isolate	City of collection	Year	Plant
<i>Nigrospora sphaerica</i>	Recife	2007	<i>Indigofera suffruticosa</i>
<i>Alternaria alternata</i>	Recife	2007	<i>Lippia sidifolia</i> (yeroa)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Jaboatão dos Guararapes	2012	<i>Portulaca major</i> (leaf)
<i>Gliosporium cingulata</i>	Arcoverde	2008	bean leaves

All cities are located at Pernambuco state, northeastern Brazil.

Table 2 - Oligonucleotide primers used in the screening of taxol biosynthesis genes by PCR.

Gene	Primers	Sequences (5'-3')	Size of amplification
<i>tx</i>	<i>tx</i> - F / <i>tx</i> - R	CAAGCCGCGTGGAAATTCAGAAAG CAAGTTTCATGACTCTGGAAATCT	610 bp
<i>dlot</i>	<i>dlot</i> - F / <i>dlot</i> - R	GGGAGGTTGCTCTGTCTTTG GTTACCTGAAACCGACGAGGG	710 bp
<i>hapt</i>	<i>hapt</i> - F / <i>hapt</i> - R	GCTCTCTGGCCGATTCGACAA TGGCCATCTCTGGCATACTT	460 bp

Table 3 - Molecular characterization of the isolates by analysis of ITS rDNA genes.

Isolate	Size (pb)	Similarity (%)	Similar species
<i>Nigrospora sphaerica</i>	623	-	Not identified
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	666	99	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
<i>Alternaria alternata</i>	573	99	<i>Alternaria alternata</i>
<i>Gloeospora dingiana</i>	582	99	<i>Gloeospora dingiana</i>

pump, DGIU-30Aa degasser, CTO-20AC column oven, SPD30A diode array detector (DAD), SE-30A autoinjector and CRM-30A communication module, controlled by the LcSolution software. The extracts were passed through 0.45 μ m membrane filter (Supelco, Sigma-Aldrich, MO, USA). A flow rate of 1.0 mL/min was employed. The solvents used were methanol, acetonitrile (Merck, Darmstadt, Germany), and ultrapure water at a ratio of 25:35:40 (v/v/v). The taxol content was estimated using a standard curve ($Y = 5189.7X + 1081.3$), with a limit of detection of 0.0473 μ g/mL and a limit of quantitation of 0.1435 μ g/mL.

Liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC/MS) was performed with an LC/MS ACQUITY UPLC H-Class-5Q Detector 2 column (Waters), with a dimension of 2.1 \times 100 mm, pore size 130 \AA , and particle size 1.7 μ m. The mobile phase was acetonitrile/MilliQ water/methanol at flow rate of 0.630 mL/min.

In the present work, we evaluated four isolates from this collection, obtained from different plants collected in different regions of Pernambuco, in regard to their ability to produce taxol.

The isolates were previously identified by Stackebrandt and Goebel.²⁶ In the present work, we performed a molecular characterization of the isolates based on the ITS genes. For all the isolates, the sequences of the ITS rDNA genes obtained, showed a homology of greater than or equal to 99% (Table 3) with the previously determined species, except for *N. sphaerica*. All four isolates had the *tr* and *dstb* genes, and only two

presented the *hopt* gene. Extracts from the cell mass and metabolic liquid were then evaluated by TLC, but taxol was not identified in any sample. This result may be associated with interfering substances present in the samples. On the other hand, HPLC analysis showed that the extracts from the metabolic liquid produced by *C. gloeosporioides* (14th and 21st days) exhibited a peak with a retention time close to that of paclitaxel, and the UV spectrum was also similar to this standard, confirming taxol production. The standard paclitaxel showed a retention time of 2.71 min and the sample presented a peak at 2.62 \pm 0.03 min (Fig. 1). In addition, the molecular mass detected for the compound, produced by *C. gloeosporioides*, was 852.32 g/mol, which is close to the molecular mass of taxol (853.906 g/mol). The taxol content was estimated at 5.24 μ g/mL in the sample collected on the 14th day and 4.4 μ g/mL in the sample from the 21st day.

The search for new strategies to obtain taxol is of utmost importance, as about 10,000 kg of yew leaves and bark are needed to isolate 1 kg of this substance.²³ In addition, the semi-synthesis methods consume a large amount of trees and are not enough to meet the demand.⁵ Alternative strategies, such as the optimization of *Yarrowia* cell cultures and production using microbial sources, have gained increasing attention. The URM culture collection possesses a large collection of endophytic fungi that have still not been screened for their biotechnological potential. This is the first report of an evaluation of the biotechnological potential of some of the isolates in the collection for taxol production.

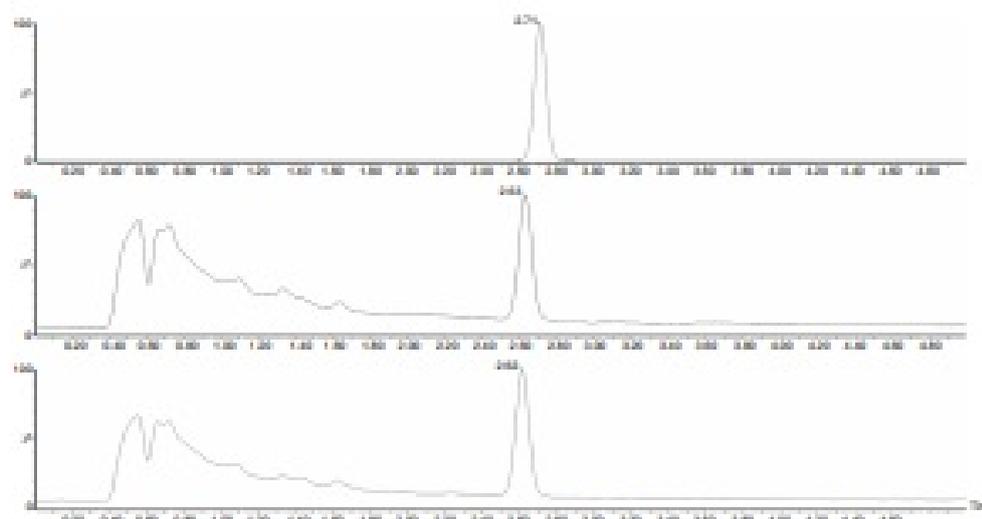


Fig. 1 - LC/MS profile of standard paclitaxel (A) and metabolic liquid of *Colletotrichum gloeosporioides* collected after 14 (B) and 21 (C) days.

In addition, molecular analysis was performed to confirm the identity of the isolates. According to Nilsson et al.,²⁷ a margin of 2% is acceptable for intraspecific divergence in the ITS region sequences. The *tr* gene has been proposed as a primary screening method to identify taxol-producing fungi whereas *ibat* has been reported to be more diagnostic as a molecular marker.¹⁸ However, it is common to only detect one or two of the genes associated with taxol production in microorganisms. For example, endophytic fungi from different genera, isolated from *Salacia oblonga* bark, were screened for the presence of two genes; seven had the *ibat* gene, and one contained *hopt*.¹⁸ Despite the detection of the genes, the effective production of the compound must also be confirmed. According to Xiong et al.,¹¹ the *tr* and *ibat* genes are essential for taxol biosynthesis, but are not diagnostic, because the *hopt* gene encodes the enzymes required to convert the precursor haccatin III to taxol. In the present study, all of the isolates presented *tr* and *ibat*. However, our data showed that only the *C. gloeosporioides* isolate is a promising producer of paclitaxel, although it was negative for the *hopt* gene.

The other isolates may also be able to produce taxol, but under conditions different from those used here. It has been reported that stress conditions can be favorable for the production of this compound. Somjaipong et al.²⁸ reported that stress, associated with environmental factors (water activity or pH), and the presence of elicitors (ammonium acetate, gallic acid, phenyl-alanine, salicylic acid, serine, silver nitrate and sodium acetate) induced the production of taxol by the endophytic fungi *Panaxiconiophyium variabile* and *Epicoceum nigrum*, isolated from *Toxus lacustris*. In addition, the production of metabolites by endophytes may depend on other factors, such as and multiparite interactions with host plants, as well as the selection pressures of biotic (such as pathogens and predators) and abiotic (such as precursors of metabolites and environmental conditions) factors.⁸ Many studies have been conducted searching for taxol-producing microorganisms among the endophytes found in *Toxus* plants.^{11,28,29} In this study, the isolates from endophytic *C. gloeosporioides* possessed two genes involved in taxol biosynthesis, and the presence of this compound was confirmed in the metabolic liquid it produced. This study shows the biotechnological potential of an isolate stored at the URM collection as a producer of a substance with high pharmacological relevance. However, future studies using polymer nanoparticles may facilitate the industrial use of taxol in antitumor activities.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for fellowships (PMGP, THN and MTSC) as well as to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We are also grateful for the Plataforma de Sequenciamento (LABGEN-CB) of the Universidade Federal de Pernambuco.

REFERENCES

1. Santos C, Paterson RR, Verlicino A, Lima N. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Appl Microbiol*. 2014;106(2):375-385.
2. Souza IFAC, Napoleão TH, Sena ECRF, Paiva PMG, Araújo JM, Coelho LGBB. Endophytic microorganisms in leaves of *Moringa oleifera* collected in three localities at Pernambuco State, Northeastern Brazil. *Br Microbiol Res J*. 2014;14(5):1-7.
3. Hardoin PR, Overbeek LSV, Beng G, et al. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2015;79(3):293-320.
4. Khan AR, Ullah I, Waqar M, et al. Host plant growth promotion and cadmium detoxification in *Salween nigrum*, mediated by endophytic fungi. *Environ Biol Soil*. 2007;196:180-188.
5. Wibowo M, Prachyawarakorn V, Aree T, Mahidol C, Ruchirawat S, Kinnakop P. Cytotoxic sesquiterpenes from the endophytic fungus *Panaxiconiophyium variabile*. *Phytochemistry*. 2006;123:126-138.
6. Dasym J, Malong R, Tierno AJ, et al. Cytotoxicity, antioxidant and antibacterial activity of four compounds produced by an endophytic fungus *Epicoceum nigrum* associated with *Emada alayensis*. *Rev Bras Farmacogn*. 2007;17:251-253.
7. Sridechakorn I, Yae Z, Mittraphab Y, Lei X, Puthorn K. Identification of spiribisnaphthalene derivatives with anti-tumor activities from the endophytic fungus *Rhizoglyphus nigulus* AS218. *Bioorg Med Chem*. 2007;25(11):2878-2880.
8. Kasari S, Singh S, Jayatilakara C. Rethinking production of Taxol® (paclitaxel) using endophyte biotechnology. *Trends Biotechnol*. 2014;32(5):304-311.
9. World Health Organization. *Projections of Mortality and Causes of Death, 2015 and 2030*; 2017.
10. Kharina C, Rosenberg M, Vail DM. A Review of paclitaxel and novel formulations including those suitable for use in dogs. *J Vet Intern Med*. 2015;28:1006-1012.
11. Fedini C, Cicchillitti L, Raspaglio G, et al. Paclitaxel directly binds to hC1-3 and functionally mimics activity of Nur77. *Exp Therap Med Targets Chem Biol*. 2009;2(17). <http://dx.doi.org/10.1155/0908-5472.CMB-09-0540>
12. Melnicoff T. Paclitaxel Production; 2014. Retrieved from News Medical: <http://www.newsmedical.net/health/Paclitaxel-Production.aspx>.
13. Ward MC, Horvitz SR. Nature as a remarkable chemist: a personal story of the discovery and development of taxol. *Anticancer Drugs*. 2014;25(5):483-487.
14. Gend SE, Kharwar RH, White (F) Jr. Will fungi be the new source of the blockbuster drug taxol? *Fung Biol Rev*. 2004;28:77-84.
15. Xiong Z, Yang Y, Zhao M, Wang Y. Diversity of endophytic fungi and screening of fungal paclitaxel producer from *Aglojap yau*, *Toxus o-madia*. *BMC Microbiol*. 2013. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-13-71>.
16. Sridharan L, Goshal BM. TRISOME: Test: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol*. 1994;44(4):840-843.
17. Nilsson RH, Tedesco L, Lindah SD, et al. Towards standardization of the description and publication of next-generation sequencing datasets of fungal communities.

- New Phytologist. 2008, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03755.x>.
18. Flores-Santamaría ZR, Rivera-Ordoña FN, Martínez-Cárdenas A, Flores-Corzo LA. Microbial pacifism: advances and perspectives. J Antibiot. 2010;61:460-467.
 19. Koopa G, Madhusudhan MC, Sundi KCB, et al. Identification of Taxol-producing endophytic fungi isolated from *Salacia oblonga* through genomic mining approach. J Genet Eng Biotechnol. 2015;13:109-127.
 20. Songjaipong S, Medina A, Magan N. Environmental stress and elicitors enhance taxol production by endophytic strains of *Paecilomyces variabilis* and *Epicoceum nigrum*. Enzyme Microb Technol. 2004;30:69-75.