



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 – Alfenas/MG – CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063



BIANCA ANDRADE DE CARVALHO

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE
FOLHAS E FLORES DE *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides***

ALFENAS – MG
2012

BIANCA ANDRADE DE CARVALHO

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE
FOLHAS E FLORES DE *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Química pela
Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG. Área
de concentração: Química Orgânica.
Orientadora: Prof^a. Dra. Marisi Gomes Soares

ALFENAS – MG
2012

Carvalho, Bianca Andrade de.

Estudo químico e avaliação das propriedades biológicas de folhas e flores de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* / Bianca Andrade de Carvalho. - 2012.

88 f. -

Orientadora: Marisi Gomes Soares.

Dissertação (Mestrado em Química - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2012.

Bibliografia.

1. Caesalpinia. 2. Inflamação. 3. Neoplasias. 4. Plantas Medicinais. 5. Rutina. I. Soares, Marisi Gomes. II. Título.

CDD: 547

BIANCA ANDRADE DE CARVALHO

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE
FOLHAS E FLORES DE *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides***

A banca examinadora, abaixo-assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre em Química
pela Universidade Federal de Alfenas. Área de
Concentração: Química Orgânica.

Aprovada em:

Prof.^a Dra. Marisi Gomes Soares

Instituição: Universidade Federal de Alfenas Assinatura: _____

Prof. Dra. Patrícia Sartorelli

Instituição: Universidade Federal de São Paulo Assinatura: _____

Prof. Dra. Amanda Latercia Tranches Dias

Instituição: Universidade Federal de Alfenas Assinatura: _____

Dedico esta dissertação aos meus pais Marco e Maria do Carmo que não mediram esforços para que eu chegasse até aqui e juntamente com eles aos meus irmãos Aline, Diego e Igor e ao meu marido Gustavo que estiveram sempre ao meu lado me apoiando e me dando forças quando mais precisei.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela vida, por me dar forças, por guiar os meus caminhos e por cuidar de todos os detalhes, pois sem ele nada seria.

Aos meus pais por todo o amor, toda dedicação e por me ensinarem os verdadeiros valores a serem conquistados. À **minha querida irmã Aline** e aos meus irmãos **Diego e Igor** que tanto amo.

Ao meu marido **Gustavo** pela paciência, carinho e apoio que me deu durante todo esse tempo.

À professora **Dra. Marisi Gomes Soares**, meu agradecimento especial pela orientação, compreensão, apoio e pela amizade conquistada. Muito obrigada por tudo!

À **Danielle** pelas dicas e conselhos e principalmente por sua amizade.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Química, especialmente ao **professor Marcelo Henrique, professora Márcia Paranho e professor Claudio Viegas**.

À professora **Marisa Ionta** pela relevante colaboração neste trabalho; ao professor **Alexandre Giusti-Paiva** também pela colaboração e à **Maria Eliza e à Danielle** pela disponibilidade em realizar testes farmacológicos propostos neste trabalho.

Aos colegas do grupo de pesquisa **João Luiz, Paloma, Ísis e principalmente à aluna de iniciação científica Olivia** que tanto me ajudou na conclusão deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal da Unifal (LFQM) e todos os amigos que conquistei na Unifal pela constante ajuda e pela amizade. E em especial à **Claudia Mara, Kris, Maria Cecília, Jaqueline, Aline, Isael, Gabriel (Bioquímica), Flávia e Carla Toledo**.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Química da UNIFAL**, por permitir o desenvolvimento deste trabalho. À **Capes** pela Bolsa concedida. A UFSCar, UFRJ e UFMG pelos espectros de Ressonância Magnética Nuclear e Infravermelho.

Enfim, agradeço **a todos** aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho.

“Educar é semear com sabedoria e colher com paciência”.

(Augusto Cury)

RESUMO

Diversas espécies de *Caesalpinia* têm uso medicinal e algumas atividades biológicas foram comprovadas experimentalmente, como as atividades antitumoral, anti-inflamatória e antimicrobiana. No entanto, não existem relatos da espécie *Caesalpinia peltophoroides*, conhecida popularmente como sibipiruna, em relação às atividades biológicas e substâncias isoladas. O presente trabalho tem por objetivo o estudo químico e a avaliação das atividades antitumoral e anti-inflamatória das folhas de *Caesalpinia peltophoroides* e a avaliação antitumoral do óleo essencial das flores. Para tal estudo foram obtidas frações acetato de etila e hidroalcoólica das folhas da planta para o estudo fitoquímico a partir do extrato etanólico bruto para as avaliações farmacológicas. A proposta do trabalho fitoquímico foi estudar os extratos mais polares das folhas seguindo uma ordem de polaridade dos solventes extratores, uma vez que são escassas as informações de estudos químicos de *Caesalpinia peltophoroides*. O trabalho descreve o estudo fitoquímico realizado com o extrato etanólico bruto e as frações acetato de etila e hidroalcoólica das folhas. Os extratos foram fracionados e posteriormente submetidos a purificações. O fracionamento da fração acetato de etila das folhas levou ao isolamento da rutina. O composto isolado foi identificado por técnicas espectroscópicas usuais. A atividade anti-inflamatória foi avaliada no teste da retirada da pata (Von Frey eletrônico) e no modelo de edema de pata comparando os resultados com os grupos controle. Os resultados mostraram uma redução significativa no limiar da retirada da pata e redução do edema da pata quando os extratos foram testados. Esses resultados indicam que os extratos das folhas de *C. peltophoroides* testados, apresentam atividade anti-inflamatória e antinociceptiva, mas estudos futuros ainda são necessários para desvendar o mecanismo da ação anti-inflamatória. Para a atividade antitumoral realizada com as frações foram utilizadas linhagens celulares de carcinoma de pulmão (A549), adenocarcinoma mamário (MCF7), melanoma (HT144) e carcinoma de fígado (HepG2), provenientes de tumores humanos. Somente a fração acetato de etila inibiu a viabilidade celular de melanoma e carcinoma de pulmão. A atividade antitumoral do óleo essencial das flores foi avaliada contra células de melanoma murino (B16F10-Nex2). O valor de CI_{50} obtido foi de $69 \pm 5 \mu\text{g/mL}$ indicando alto potencial antiproliferativo do óleo em comparação ao controle positivo cisplatina ($53 \pm 4 \mu\text{g/mL}$).

Palavras-chave: *Caesalpinia*, Inflamação, Neoplasias, Plantas Medicinais, Rutina.

ABSTRACT

Several species of *Caesalpinia* have medicinal and some biological activities have been proven experimentally, such as anti-tumor, anti-inflammatory and antimicrobial activity. However, there are no reports of *Caesalpinia peltophoroides* species, popularly known as sibipiruna, when it comes to biological activities and isolated substances. This paper aims to study the chemical and evaluation of antitumor and anti-inflammatory activity of leaves and isolated compounds from *Caesalpinia peltophoroides*. For this study were obtained from ethyl acetate and hydroalcoholic fractions of leaves for phytochemical studies, beyond the crude ethanol extract for pharmacological evaluations. The purpose of this study was to study the phytochemical more polar extracts of leaves following an order of polarity of solvent extractors, since there are few studies of chemical information *Caesalpinia peltophoroides*. The paper describes the phytochemical study performed with crude ethanol extract and ethyl acetate and hydroalcoholic fractions of leaves. The extracts were fractionated and then subjected to purification. Fractionation of the ethyl acetate fraction of leaves led to the isolation of rutin. The compound were identified by usual spectroscopic techniques. The anti-inflammatory activity was evaluated in the paw withdrawal test (electronic Von Frey) and in the model of paw edema by comparing the results with the control groups. The results showed a significant reduction in paw withdrawal threshold and a reduction in paw edema when the extracts were tested. These results indicate that extracts of leaves of *C. peltophoroides* tested, exhibit anti-inflammatory and antinociceptive but further studies are still needed to discover the mechanism of anti-inflammatory action. For the antitumor activity performed with fractions the cell lines used were lung carcinoma (A549), breast adenocarcinoma (MCF7), melanoma (HT144) and liver carcinoma (HepG2), from human tumors. Only the ethyl acetate fraction inhibited cell viability of melanoma and lung carcinoma. The antitumor activity of essential oil was evaluated against murine melanotic cell (B16F10). The IC₅₀ value obtained was $69 \pm 5 \mu\text{g/mL}$, indicative of a high potential to the crude oil in comparison to positive control cisplatin ($53 \pm 4 \mu\text{g/mL}$).

Keywords: *Caesalpinia*, Inflammation, Cancer, Medicinal Plants, Rutin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Imagens das folhas e flores de <i>C. peltophoroides</i> .	18
Figura 2 -	Flavonoides antioxidantes com múltiplas hidroxilas: quercetina (1), miricetina (2), luteolina (3), fustina (4), eriodictiol (5) e taxifolina (6).	20
Figura 3 -	Paclitaxel	27
Figura 4 -	Vincristina e Vinblastina	27
Figura 5 -	Fracionamento da FAcCp das folhas de <i>Caesalpinia peltophoroides</i>	37
Figura 6 -	Fracionamento 2 da FAcCp de folhas de <i>Caesalpinia peltophoroides</i> .	38
Figura 7 -	Fracionamento 3 da FAcCp de folhas de <i>Caesalpinia peltophoroides</i> .	39
Figura 8 -	Fracionamento 4 da FAcCp de folhas de <i>Caesalpinia peltophoroides</i> .	40
Figura 9 -	Fracionamento da FAqCp de folhas de <i>Caesalpinia peltophoroides</i> .	41
Figura 10 -	Perfil cromatográfico do EECp obtido por HPLC-DAD.	51
Figura 11 -	Perfil cromatográfico da FAcCp obtido por HPLC-DAD.	51
Figura 12 -	Perfil cromatográfico da FAqCp obtidos por HPLC-DAD	52
Figura 13 -	Estrutura química da Rutina; cromatograma e espectro UV do padrão de Rutina (Sigma-aldrich) obtidos por HPLC-DAD.	52
Figura 14-	Estrutura química da Quercetina; cromatograma e espectro UV do padrão de Quercetina (Sigma-aldrich) obtidos por HPLC-DAD.	53
Figura 15-	Estrutura química da Apigenina; cromatograma e espectro UV do padrão de Apigenina (Sigma-aldrich) obtidos por HPLC-DAD.	53
Figura 16-	Estrutura química do Canferol; cromatograma e espectro UV do padrão de Canferol (Sigma) obtidos por HPLC-DAD.	54
Figura 17 -	Estrutura química do Ácido Ferúlico; cromatograma e espectro UV do padrão de Ácido Ferúlico (Fluka) obtidos por HPLC-DAD.	54
Figura 18 -	Estrutura química de Catequina; cromatograma e espectro UV do padrão de Catequina (Sigma) obtidos por HPLC-DAD.	55
Figura 19 -	Estrutura química de Ácido cumárico; cromatograma e espectro UV do padrão de Ácido cumárico (Sigma) obtidos por HPLC-DAD.	55
Figura 20 -	Cromatograma do precipitado obtido da CI F18 (A) por HPLC-DAD e espectro UV do pico obtido.	56
Figura 21 -	Perfil cromatográfico do precipitado obtido da CI F31-38 (B) por HPLC-DAD.	57
Figura 22 -	Cromatograma do precipitado obtido da CI F39-44 (C) por HPLC-DAD.	58
Figura 23 -	Perfil cromatográfico da CD F17-33 (D) por HPLC-DAD e espectro UV do pico majoritário.	59
Figura 24 -	Espectro UV da CD F17-33 e da Rutina	60
Figura 25 -	Cromatograma da co-injeção da amostra CD F17-33 com o padrão Rutina.	61
Figura 26 -	Espectro de infravermelho para a CD 17-33 (KBr, cm ⁻¹).	62
Figura 27 -	Espectro RMN de ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) de CD 17-33.	63
Figura 28 -	Espectro RMN de ¹³ C – DEPT (125 MHz, CD ₃ OD) do composto CD 17-33.	65
Figura 29 -	quercetina-3-O-(6-O-α- L-ramnopiranosil)- β-D-glicopiranosídeo	67

Figura 30 - Curva analítica obtida pelo método de calibração externa a partir de injeções em triplicata das soluções padrões de rutina.....	67
Figura 31 - Efeito da administração de veículo, EECp ou indometacina no teste de hipernocicepção induzida pela injeção intraplantar de carragenina (100 µg/pata) em camundongos.....	71
Figura 32 - Efeito da administração de veículo, FAcCp ou indometacina no teste de hipernocicepção induzida pela injeção intraplantar de carragenina (100 µg/pata) em camundongos.....	72
Figura 33 - Efeito da administração de veículo, FAqCp ou indometacina no teste de hipernocicepção induzida pela injeção intraplantar de carragenina (100 µg/pata) em camundongos.....	72
Figura 34 - Efeito da administração de veículo, EECp ou indometacina no teste de edema de pata induzido por carragenina (800 µg/pata) em camundongos.....	74
Figura 35 - Efeito da administração de veículo, FAcCp ou indometacina no teste de edema de pata induzido por carragenina (800 µg/pata) em camundongos.....	74
Figura 36 - Efeito da administração de veículo, FAqCp ou indometacina no teste de edema de pata induzido por carragenina (800 µg/pata) em camundongos.....	75
Figura 37 - Efeitos das FAqCp e FacCp sobre a viabilidade celular após 3 dias de tratamento. A viabilidade foi determinada por MTS e expressa em percentual de células viáveis em relação ao controle.	77
Figura 38 - Efeitos da CD (F 17-33) sobre a viabilidade das células A549. A viabilidade foi determinada por MTS e expressa em percentual de células viáveis em relação ao controle.....	77
Figura 39 - Efeito do óleo essencial de flores de <i>C. peltophoroides</i> sobre a viabilidade das células B16F10-Nex2 determinada pelo ensaio MTT.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classes de flavonoides e suas principais características.....	19
Tabela 2- Rendimento das partições obtidas a partir de 65,6 g do EECp.	35
Tabela 3- Gradiente de eluição cromatográfica empregado na eluição dos metabólitos encontrados nas folhas de <i>Caesalpinia peltophoroides</i>	43
Tabela 4- Teor de flavonoides em miligrama de quercetina por grama do extrato, sendo o coeficiente de correlação obtido na curva de calibração de 0,9994.....	49
Tabela 5- Atribuição do espectro de RMN ¹ H para CD F17-33.....	64
Tabela 6- Atribuição do espectro de ¹³ C (DEPT) para CD F17-33.....	66
Tabela 7- Teor de Rutina expresso em porcentagem presente nos extratos, sendo o coeficiente de correlação obtido na curva de calibração de 0,9999.	68
Tabela 8- Composição química do óleo essencial de flores de <i>Caesalpinia peltophoroides</i> ...	69

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

μg	- Microgramas
λ	- Comprimento de onda
A549	- Carcinoma de pulmão
MCF7	- Adenocarcinoma mamário
HT144	- Melanoma
HepG2	- Carcinoma de fígado
AcOEt	- Acetato de etila
AINEs	- Anti-inflamatórios não-esteroidais
CC	- Cromatografia em coluna
CCD	- Cromatografia em camada delgada
CI ₅₀	- Concentração capaz de inibir o crescimento celular em 50%
cm	- centímetros
COX-1	- Ciclooxigenase 1
COX-2	- Ciclooxigenase 2
DMF	- Dimetilformamida
EtOH	- Álcool Etílico
EECp	- Extrato etanólico de <i>Caesalpinia peltophoroides</i>
FACp	- Fração Acetato de Etila de <i>Caesalpinia peltophoroides</i>
FAqCp	- Fração Hidroalcoólica de <i>Caesalpinia peltophoroides</i>
g	- grama
Hex	- Hexano
HPLC	- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência
MeOH	- Metanol
mg	- miligrama
MTS	- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4 sulfofenil)-2H-tetrazólio
MTT	- Brometo de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5 - difenil-tetrazólio
PGs	- Prostaglandinas
PMS	- Fenazina metosulfato
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
UV	- Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	FAMÍLIA Leguminosae	16
2.2	O GÊNERO <i>Caesalpinia</i>	16
2.3	A ESPÉCIE <i>Caesalpinia peltophoroides</i>	17
2.4	FLAVONOIDES	18
2.5	ASPECTOS GERAIS DA INFLAMAÇÃO	20
2.5.1	Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)	22
2.5.2	Anti-inflamatórios esteroidais (corticosteroides)	23
2.6	ANTITUMORAIS.....	24
2.6.1	As neoplasias	24
2.6.2	Antitumorais derivados de plantas	25
3	JUSTIFICATIVA	29
4	OBJETIVOS	30
5	PARTE EXPERIMENTAL	31
5.1	MATERIAIS, MÉTODOS E INSTRUMENTOS.....	31
5.2	COLETA DO MATERIAL VEGETAL	32
5.3	ESTUDO FITOQUÍMICO	33
5.3.1	Secagem	33
5.3.2	Trituração	33
5.3.3	Pesagem	33
5.3.4	Maceração	33
5.3.5	Particionamento	34
5.3.5.1	<i>Obtenção das frações hexânica, acetato etílica e hidroalcoólica:</i>	34
5.3.5.2	<i>Isolamento dos constituintes químicos da FAcCp:</i>	35
5.3.5.3	<i>Isolamento dos constituintes químicos da FAqCp:</i>	40
5.4	DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES E SAPONINAS	42
5.4.1	Determinação de flavonoides totais	42
5.4.2	Detecção de saponinas	42
5.5	CARACTERIZAÇÃO POR HPLC.....	42
5.5.1	Quantificação da CD F17-33	43
5.6	ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FLORES POR GC-MS.....	44
5.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANALGÉSICA	44
5.7.1	Animais	44
5.7.2	Teste de retirada de pata (von Frey eletrônico)	45
5.7.3	Teste de edema de pata induzido por carragenina	45
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
5.9	ATIVIDADE ANTITUMORAL.....	46
5.9.1	Avaliação da atividade citotóxica das frações	46
5.9.1.1	<i>Linhagens celulares</i>	46
5.9.1.2	<i>Condições de cultivo</i>	46
5.9.1.3	<i>Tratamento</i>	46
5.9.1.4	<i>Viabilidade celular</i>	47
5.9.2	Avaliação da atividade citotóxica do óleo essencial	47
5.9.2.1	<i>Linhagem celular</i>	47
5.9.2.2	<i>Condições de cultivo</i>	47
5.9.2.3	<i>Tratamento</i>	48
5.9.2.4	<i>Viabilidade celular</i>	48

6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
6.1	ENSAIOS DE DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES E SAPONINAS.....	49
6.1.1	Teor de flavonoides.....	49
6.1.2	Detecção qualitativa de saponinas	50
6.2	AVALIAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO E ELUCIDAÇÃO DA CD F17-33	50
6.2.1	Perfil cromatográfico dos extratos e substâncias obtidas	50
6.2.2	Determinação estrutural da CD F17-33	62
6.2.3	Análise do Teor da CD F17-33 presente nos extratos	67
6.3	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FLORES	68
6.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANALGÉSICA	70
6.4.1	Teste de von Frey eletrônico	70
6.4.2	Ensaio de inibição do edema da pata induzido por carragenina	73
6.5	AVALIAÇÃO ANTITUMORAL	76
6.5.1	Avaliação da atividade citotóxica das frações.....	76
6.5.2	Avaliação da atividade antitumoral do óleo essencial.....	79
7	CONCLUSÃO.....	81
	REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO

A magnitude da biodiversidade brasileira não é bem conhecida, tamanha a sua complexidade. Estima-se existir mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microrganismos. O Brasil possui a maior biodiversidade genética vegetal do mundo (SIMÕES et al., 2007).

Os vegetais fazem parte da vida do homem como fonte de alimento, de materiais para o vestuário, habitação, como utensílios para manifestações artísticas, culturais, religiosas, e como meio restaurador da saúde (SIMÕES et al., 2007).

Há um grande interesse pelos estudos das propriedades medicinais das plantas, que vêm sendo explorados extensivamente pelos pesquisadores e, mais recentemente pela indústria farmacêutica, interessada em desenvolver medicamentos. Isso se deve, sobretudo, à grande tradição do uso das plantas pela medicina popular no Brasil (CALIXTO; SIQUEIRA, 2008).

O interesse pelos fitoterápicos ou fitomedicamentos (medicamentos derivados de plantas), tem aumentado em todo o mundo, em especial nos países desenvolvidos, notadamente em alguns países da Europa e nos Estados Unidos. Ao contrário de enormes investimentos, dos altos riscos e longo tempo de desenvolvimento de uma droga inovadora, o desenvolvimento de um fitomedicamento com comprovação científica de segurança, eficácia e qualidade demanda muito menos recursos e conseqüentemente menores riscos (CALIXTO, 2000).

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos, com freqüência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de, muitas vezes, não terem seus constituintes químicos definidos. Dessa forma, usuários de plantas medicinais de todo o mundo, preservam a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas as informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos (MACIEL et al., 2002).

No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde. Ao longo do tempo têm sido registrados variados procedimentos clínicos tradicionais utilizando plantas medicinais (VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005).

É dentro deste contexto que o Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal (LFQM) da UNIFAL-MG vêm contribuindo não somente para a fitoquímica clássica (isolamento e determinação estrutural), mas também realizando trabalhos que envolvem a investigação da atividade biológica de extratos de plantas e de seus compostos isolados que apresentem algum tipo de uso na medicina tradicional.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FAMÍLIA Leguminosae

A família Leguminosae é a terceira mais numerosa entre as famílias de plantas superiores, compreendendo mais de 600 gêneros, que reúnem mais de 13.000 espécies, encontradas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. São plantas que vão desde grandes árvores, arbustos, ervas e também trepadeiras, sendo que muitas delas possuem importância na economia como alimento (soja), árvores florestais, condimentos e plantas ornamentais. Esta família compreende três importantes subfamílias, diferenciadas segundo sua estrutura floral: Caesalpinoideae, Papilionoideae (Faboideae) e Mimosoideae. (JOLY, 1977). As plantas desta família são largamente empregadas na medicina tradicional com várias funções como: analgésica, antidiabética, anti-inflamatória, antimicrobiana, antifúngica e diurética, com componentes químicos identificados como sendo principalmente: glicosídeos esteroidais, triterpenos, lactonas e flavonoides. O uso medicinal das plantas deste gênero pela população tem revelado excelentes resultados e aos poucos, estudos científicos vêm comprovando a eficácia em vários modelos experimentais, justificando o uso na medicina popular.

A subfamília Caesalpinoideae ou Caesalpiniaceae é constituída por 152 gêneros e aproximadamente 2.700 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais.

2.2 O GÊNERO *Caesalpinia*

O gênero *Caesalpinia*, é constituído por diversas espécies, muitas delas utilizadas na medicina popular como anti-inflamatórios, anti-hipertensivos, antioxidantes, antimicrobianos. Estudos de tais espécies têm demonstrado que este gênero é rico em uma considerável diversidade de compostos como flavonoides, diterpenos e esteroides (ZANIN et al., 2012). Foram isolados de *Caesalpinia sappan* quatro compostos: 4-*O*-metilsapanol , protosapanina A , brazilina e caeasalpin J . As atividades destes foram testadas sobre o fungo *Beauveria bassiana* sendo que o composto 4-*O*-metilsapanol apresentou atividade antifúngica (NIRANJAN REDDY et al., 2003). Outra classe de compostos isolados da *Caesalpinia bonduc* exibiu atividade antiproliferativa (ATHAR et al., 2009).

Compostos isolados de *Caesalpinia pulcherrima* mostraram atividade antitumoral (CHE et al., 1986; PATEL et al., 1997) e propriedades antimicrobianas (RAGASA et al., 2002). Foi relatada atividade antimicrobiana de dois novos flavonoides, 5,7-dimetoxi-3',4'-metilenodioxiflavanona e isobonducelina. Os flavonoides conhecidos, 2-hidroxi-2,3,4',6'-tetra-metóxi, 5,7-dimetoxiflavanona e o homoisoflavanoide bonducelina também foram isolados (VENTURELLA; BELLINO, 1960; McPHERSON et al., 1983).

Ensaio bioguiado de folhas de *Caesalpinia pulcherrima* levaram ao isolamento de furanoditerpenóides, assim como nas raízes, além de ácidos cinâmicos que mostram fortes atividades antituberculares e atividades citotóxicas sobre células cancerígenas humanas KB (carcinoma epidermóide oral), BC (câncer de mama) e NCI-H187 (câncer de pulmão).

Flavonoides isolados e extratos aquosos de *Caesalpinia pulcherrima* foram testados em uma série de vírus, herpes viroses (HSV-1, HSV-2) e adenoviroses (ADV-3, ADV-8, ADV-11), sugerindo que a quercetina poderá se usada no tratamento de infecções causadas por esses vírus (CHIANG, 2003). Estudos realizados com a casca da *Caesalpinia bonducella* demonstraram atividade com a inibição de glutathione-S-transferase e antifúngica onde as substâncias encontradas foram Caesalpinianone e 6-O-methylcaesalpinianona. As cascas das sementes e as amêndoas de *Caesalpinia bonducella* apresentam atividade antimicrobiana (ARIF et al., 2009).

2.3 A ESPÉCIE *Caesalpinia peltophoroides*

Também conhecida como sibipiruna, coração-de-negro ou sibipira, é uma árvore de grande porte, com origem no Brasil. Chega a medir 18 metros de altura, para 7 metros de diâmetro da copa arredondada. Ela também pode ser confundida com o Pau-Brasil ou Pau-Ferro, pela semelhança da sua folhagem. Na verdade é a de maior crescimento da espécie, sendo muito usada para arborização. É uma árvore de clima tropical, de crescimento rápido, com folhas pequenas e caducas. A floração ocorre entre setembro a novembro e produz flores amarelas organizadas em cachos. A frutificação dá origem a vagens entre julho e agosto. Os frutos tem uma cor verde claro fosforescente, e podem ficar vários meses à espera de dispersores naturais, geralmente pássaros. É empregada na medicina popular como anti-hipertensivo e estudos realizados anteriormente no LFQM (Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal) demonstraram atividade anti-inflamatória das flores de *Caesalpinia peltophoroides* em modelos animais (ZANIN, 2012).



Figura 1- Imagens das folhas e flores de *C. peltophoroides*.

Fonte: <http://www.arvores.brasil.nom.br/florin/sibipir.htm>

2.4 FLAVONOIDES

Os flavonoides estão entre os grupos fenólicos mais importantes e diversificados do reino vegetal. São conhecidas mais de 4.200 estruturas de flavonoides sendo suas maiores classes os flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavona, diidroflavonóis e chalconas (SIMÕES et al., 2007).

Os flavonoides são encontrados em frutas, legumes, grãos, raízes, talos, flores, chá e vinho. O consumo destes produtos naturais é conhecido há muito tempo devido aos efeitos benéficos para a saúde. Muitos dos compostos identificados são responsáveis pelas cores atrativas das flores, frutos e folhas. Cresceu o número de pesquisas com flavonoides depois da descoberta do Paradoxo Francês, onde houve uma redução na taxa de doenças cardiovasculares em populações do Mediterrâneo mesmo ingerindo alimentos gordurosos quando essa ingestão era associada ao consumo de vinho. Os flavonoides presentes no vinho são responsáveis, pelo menos em parte, por este efeito. Além disso, estudos de epidemiologia, sugerem um papel protetor dos flavonoides contra doenças do coração (NIJVELDT et al., 2001).

Os flavonoides despertam, sob o ponto de vista econômico, grande interesse por parte das indústrias alimentícias, corantes e, sobretudo farmacêutica, devido às suas comprovadas atividades farmacológicas: anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral, antiviral, entre outros (SKIBOLA; SMITH, 2000).

Dentre as várias funções atribuídas aos flavonoides nas plantas estão a proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível, além da proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; atraentes de animais com finalidade de polinização; antioxidantes;

controle da ação de hormônios vegetais; agentes alelopáticos e inibição de enzimas. Os flavonoides encontrados nas folhas podem ser diferentes daqueles presentes nas outras partes da planta. O mesmo composto pode ainda apresentar diferentes concentrações dependendo do órgão vegetal que se encontra (SIMÕES et al., 2007). A TABELA 1 apresenta as principais classes de flavonoides e algumas das suas características.

Tabela 1- Classes de flavonoides e suas principais características.

Classes	Número aproximado de estruturas conhecidas	Características
Flavonas, flavonóis e seus <i>O</i> -heterosídeos	1660	Copigmentação em flores, protetores contra raios UV nas folhas
<i>C</i> -heterosídeos	303	-
Antocianos	256	Pigmentação do vermelho até o azul
Chalconas	197	Pigmentação amarela
Auronas	29	Pigmentação amarela
Di-hidro-flavonóis	110	Estão presentes freqüentemente em tecidos de madeiras
Flavanonas	319	Podem apresentar sabor amargo
Di-hidro-chalconas	71	Podem apresentar sabor amargo
Flavanas, leucoantocianidinas e proantocianidinas	309	Substâncias adstringentes com propriedades tanantes
Isoflavonoides	630	Propriedades estrogênicas e/ou antifúngicas
Neoflavonoides	70	-
Biflavonoides	134	Propriedades antifúngicas
Outras estruturas	100	-

Fonte: Simões et al. 2007

De modo geral, os polifenóis e em particular os flavonoides são bons antioxidantes, pois possuem estrutura ideal para o sequestro de radicais livres. A atividade de sequestro está

diretamente ligada ao potencial de oxidação dos flavonoides e das espécies a serem sequestradas. A atividade sequestrante de radicais livres é maior quando o potencial de oxidação do flavonoide é menor. Em relação ao número de hidroxilas, a atividade é maior quando este número for maior. Sendo assim, os flavonoides monoidroxilados apresentam atividade muito baixa e os com múltiplas hidroxilas (FIGURA 2) como a quercetina (1), a miricetina (2), a luteolina (3), a fustina (4), o eriodictiol (5) e a taxifolina (6) possuem forte atividade antioxidante quando comparados a outras substâncias (HALLIWELL; GUTTERIDGE; CROSS, 2000; YANG et al., 2001).

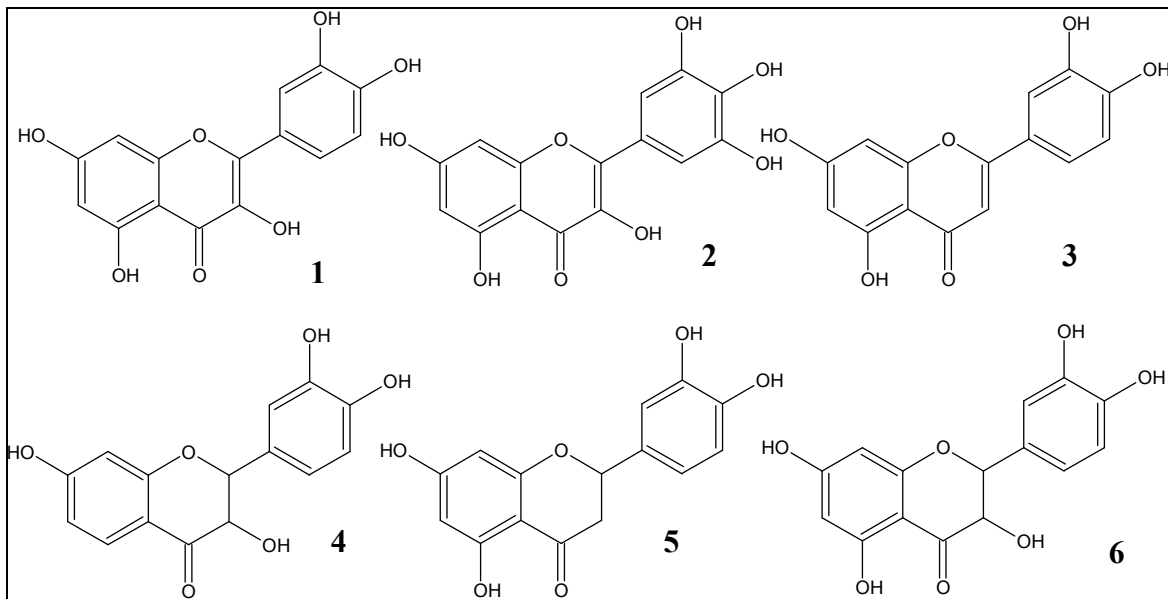


Figura 2- Flavonoides antioxidantes com múltiplas hidroxilas: quercetina (1), miricetina (2), luteolina (3), fustina (4), eriodictiol (5) e taxifolina (6).

2.5 ASPECTOS GERAIS DA INFLAMAÇÃO

O sistema imune destina-se a proteger o hospedeiro de patógenos invasores e eliminar a doença, ocorrendo resposta imune quando as células imunologicamente competentes são ativadas em resposta a organismos estranhos ou substâncias antigênicas. A resposta imune pode ser benéfica quando há fagocitose ou neutralização dos microrganismos invasores. No entanto, quando o resultado é deletério leva à inflamação crônica (KATZUNG, 2005).

O tratamento dos pacientes com inflamação envolve dois objetivos básicos que são aliviar a dor, que quase sempre constitui o sintoma inicial, e retardar ou interromper o processo responsável pela lesão tecidual (KATZUNG, 2005).

As lesões que dão origem ao processo inflamatório podem ser de origem química, física ou por meio de agentes biológicos. Estes danos resultam na produção e liberação de diversos mediadores químicos responsáveis pelas características macroscópicas da área inflamada e acompanham sinais clínicos que são eritema, edema, hipersensibilidade (hiperalgesia) e dor. As respostas inflamatórias ocorrem em três fases distintas: uma caracterizada por vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar que é a fase transitória aguda; a fase subaguda tardia, caracterizada notavelmente pela infiltração dos leucócitos e células fagocíticas e a fase proliferativa crônica, em que ocorrem degeneração tecidual e fibrose (RANG; DALE; RITTER, 2007).

A inflamação crônica envolve a liberação de diversos mediadores químicos responsáveis pelas características da inflamação. Um exemplo importante associado a esses mediadores é a artrite reumatóide, em que a inflamação crônica além de produzir dor, resulta em destruição da cartilagem e do osso podendo provocar grave incapacidade do indivíduo (KATZUNG, 2005). Outras doenças como a asma, esclerose múltipla, lúpus eritematoso sistêmico e doença pulmonar obstrutiva crônica também podem ocorrer devido ao efeito danoso causado pelo processo inflamatório desproporcional (RANG; DALE; RITTER, 2007).

Apesar dos efeitos indesejáveis da inflamação, os efeitos benéficos permitem ao indivíduo sobreviver com os efeitos do estresse de cada dia. Sem as respostas inflamatórias, feridas não curariam e infecções menores poderiam sobrepujar (ROCHA, 2006).

Quando a lesão celular associada à inflamação atua sobre as membranas celulares, os leucócitos liberam enzimas lisossômicas; a seguir há liberação de ácido araquidônico por compostos precursores e são sintetizados vários eicosanóides. No entanto, as prostaglandinas (PGs) produzidas pela via da ciclooxigenase do metabolismo do araquidonato exercem uma variedade de efeitos sobre os vasos sanguíneos, as terminações nervosas e as células envolvidas na inflamação. As descobertas das isoformas ciclooxigenase 1 (COX-1) que desempenha função homeostática e ciclooxigenase 2 (COX-2) que é induzida durante a inflamação e tende a facilitar a resposta inflamatória, levou ao desenvolvimento e comercialização de inibidores altamente seletivos da COX-2, com a suposição de que seriam mais seguros e teriam a mesma eficácia que os inibidores não seletivos da COX-1. Os leucotrienos, produzidos pela via lipoxigenase do metabolismo do araquidonato, promovem efeito quimiotático poderoso sobre os neutrófilos, macrófagos e eosinófilos além de promover broncoconstrição e alterações da permeabilidade vascular (KATZUNG, 2005).

Além disso, ocorre liberação de cininas, neuropeptídeos e histamina, bem como componentes do complemento, citocinas e outros produtos dos leucócitos e das plaquetas no local da lesão tecidual (KATZUNG, 2005).

As PGs, oriundas da cascata do ácido araquidônico, são produzidas no estágio inicial da lesão inflamatória. São ácidos graxos insaturados contendo 20 átomos de carbono e uma estrutura cíclica incorporada, e o entendimento da biossíntese desta substância é fundamental para a compreensão da ação dos fármacos anti-inflamatórios. A ação anti-inflamatória de muitos fármacos acontece pela inibição da síntese das PGs (GOOLDMAN e GILMAN, 1996).

As PGs estão particularmente associadas ao desenvolvimento da dor que acompanha inflamação ou lesão. Estudos envolvendo a mensuração eletrofisiológica da descarga nervosa sensorial na presença de PGs indicaram que quando as PGs foram administradas, os receptores da dor se tornaram mais sensíveis a estímulos químicos ou mecânicos (GOOLDMAN e GILMAN, 1996).

2.5.1 Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)

Os anti-inflamatórios de origem não esteróide (AINEs) estão entre os agentes farmacológicos mais utilizados e prescritos no mundo. A utilização cada vez mais freqüente e indiscriminada dessa classe de anti-inflamatórios tem aumentado significativamente os riscos de hemorragias gastrintestinais e úlceras pépticas na população mundial (AKARCA, 2005). Apesar dos avanços nas pesquisas de novos anti-inflamatórios; inibidores específicos da COX-2 (que teoricamente diminuiriam os riscos de lesões ulcerosas tão comuns nos demais anti-inflamatórios) possuem efeitos adversos como redução no processo de cicatrização da mucosa péptica e inibição dos fatores angiogênicos e de crescimento de fibroblastos, o que agravaria os danos à mucosa gastroduodenal (SANCHEZ-FIDALGO et al., 2004).

Os salicilatos e outros fármacos semelhantes compartilham a capacidade de suprimir os sinais e sintomas da inflamação. Esses fármacos também exercem efeitos analgésicos e antipiréticos, porém as suas propriedades anti-inflamatórias são de grande utilidade no tratamento de distúrbios em que a dor está relacionada à intensidade do processo inflamatório (KATZUNG, 2005).

A atividade anti-inflamatória dos AINEs é mediada principalmente pela inibição da biossíntese das PGs. Os AINEs diminuem a sensibilidade dos vasos sanguíneos à bradicinina e histamina, afetam a produção de linfocinas pelos linfócitos T e revertem a vasodilatação.

Em graus variáveis, todos os AINEs mais recentes são analgésicos, anti-inflamatórios e antipiréticos; todos inibem a agregação plaquetária (com exceção dos fármacos COX-2 seletivos, e dos salicilatos não acetilados). Além disso, todos são também irritantes gástricos, embora os componentes desse grupo tendem a causar menor irritação gástrica que o ácido acetilsalicílico. É comum ainda uma nefrotoxicidade causada por esses fármacos após seu uso mais amplo (NORTHEY et al., 1999).

2.5.2 Anti-inflamatórios esteroidais (corticosteroides)

Os corticosteróides são substâncias endógenas que estão quimicamente classificadas como esteróides. Os hormônios córtico-supra-renais consistem em moléculas de esteróides sintetizadas e liberadas pelo córtex supra-renal. Estes podem ser classificados como glicocorticóides, mineralocorticóides (exercem principalmente um atividade de retenção de sal) e os que apresentam uma atividade androgênica ou estrogênica. No ser humano, o principal glicocorticóide é o cortisol (ou hidrocortisona) que é sintetizado a partir do colesterol (KATZUNG, 2005).

Os glicocorticóides reduzem drasticamente as manifestações da inflamação. Isto se deve ao fato de apresentarem efeitos profundos sobre a concentração, a distribuição e a função de leucócitos periféricos, bem como supressão sobre as citocinas e quimiocitocinas inflamatórias e outros mediadores lipídicos e glicolipídicos da inflamação. A inflamação caracteriza-se pelo extravasamento e pela infiltração de leucócitos no tecido afetado, independentemente de sua causa. Esses eventos são mediados por uma complexa série de interações com moléculas de adesão celular, particularmente as que se encontram sobre as células endoteliais, que são inibidas pelos glicocorticóides (KATZUNG, 2005).

Em termos clínicos, a administração de corticosteróides no tratamento da inflamação é uma terapia paliativa, pois as manifestações anti-inflamatórias são suprimidas; no entanto, a causa da doença permanece. Essa característica de potentes anti-inflamatórios tornaram os corticosteróides agentes terapêuticos valiosos e, de fato, às vezes salvadores (GOODMAN e GILMAN, 1996). Os sinais e sintomas da inflamação são expressões do processo patológico que indica o diagnóstico e permite uma avaliação da eficácia do tratamento. Eles podem estar ausentes em pacientes tratados com glicocorticóides (GOODMAN e GILMAN, 1996).

2.6 ANTITUMORAIS

2.6.1 As neoplasias

Câncer é uma doença na qual, células com expressão gênica alterada crescem descontroladamente, podendo inclusive invadir e colonizar outros tecidos e alterar sua função normal (FENECH, 2002). O acúmulo dessas células anormais em um determinado tecido é crucial para a formação de um tumor ou neoplasma. Entretanto, se as células neoplásicas não se tornarem invasivas, o tumor é considerado benigno. O tumor será considerado um câncer apenas se for maligno, isto é, se suas células forem capazes de invadir tecidos adjacentes. Isto ocorre quando as células malignas migram do tecido de origem para outras regiões do organismo, via corrente sanguínea ou linfática, o que leva à formação de tumores secundários ou metástases (DE VITA JR et al., 1997). Metástase de câncer ocorre durante a progressão do tumor e causa morte em 90% dos casos (SOUZA et al., 2012).

As células cancerosas apresentam alterações que interferem na homeostase celular e tecidual, principalmente por não obedecer aos mecanismos normais de controle do ciclo celular. São 6 as principais classes de alterações que as classificam como um tumor maligno: autossuficiência em relação aos fatores de crescimento, insensibilidade a fatores inibitórios da proliferação, evasão da apoptose (morte celular programada), potencial replicativo infinito, angiogênese sustentada e invasão tecidual gerando metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2000). A formação de novos vasos sanguíneos, angiogênese, é essencial para que o tumor cresça além de um determinado tamanho. É através desses vasos sanguíneos que o tumor supre a quantidade necessária de oxigênio e nutrientes que necessita. Outra característica que contribui bastante para o crescimento do tumor é que as células cancerosas falham ao entrar em apoptose.

Duas categorias gênicas têm grande importância no desenvolvimento do câncer. Elas são responsáveis por uma sequência de eventos que regulam, direta ou indiretamente, o ciclo celular. Em geral, o processo de transformação maligna envolve mutações em proto-oncogenes e os genes supressores de tumor. Proto-oncogenes estimulam a progressão do ciclo celular, enquanto os genes supressores a inibem. Os proto-oncogenes codificam proteínas que atuam no controle positivo do ciclo celular (IRISH; BERNSTEIN, 1993). As células cancerosas, em geral, apresentam mutações em proto-oncogenes os quais passam a ser conhecidos como oncogenes. A ativação desses genes ocorre por meio de translocações

cromossômicas, ampliações gênicas ou mutações de ponto, de maneira que alterações em um único alelo são suficientes para transformá-los em oncogenes. A expressão dos oncogenes determina, portanto, aumento na taxa de proliferação e na formação da massa tumoral. Já os genes supressores de tumor, atuam como reguladores negativos do ciclo celular, ou seja, codificam proteínas que atuam como freios do ciclo celular, diminuindo a taxa de proliferação (VERMA; TRIANTAFILLOU, 1998). Quando ocorrem as mutações nos genes supressores de tumores, ao contrário do que ocorrem nos proto-oncogenes, seus produtos apresentam perda de função e, portanto, os mecanismos moleculares envolvidos na regulação negativa do ciclo celular ficam comprometidos contribuindo para o desenvolvimento de câncer (WEINBERG, 1991; RIVOIRE et al., 2006). A proteína p53 atua em resposta a danos no DNA e contribui para a parada do ciclo celular e indução de apoptose. O gene *p53* trata-se de um supressor de tumor e cerca de 50% dos cânceres humanos apresentam mutações no referido gene. A presença da proteína p53 normal em células tumorais correlaciona-se com uma resposta favorável à quimioterapia e em sistemas experimentais (HUANG; OLIFF, 2001).

Morte celular pode ser definida por critérios baseados nas características morfológicas, funcionais, bioquímicas e/ou imunológicas. Evasão da apoptose pode contribuir para progressão do tumor e resistência ao tratamento (FULDA, 2009). Os compostos naturais têm mostrado modularem várias vias moleculares envolvidas na morte celular, particularmente apoptose, reforçando sua contribuição para lidar com a resistência ao câncer e abrindo novas possibilidades de estratégias de tratamento (FULDA, 2010; MA; WANG, 2009).

2.6.2 Antitumorais derivados de plantas

Na utilização de drogas que, em geral, afetam o processo de divisão celular está a quimioterapia, que consiste em uma forma de tratamento sistêmico utilizado para destruição de células neoplásicas. No entanto, estes agentes antineoplásicos são tóxicos aos tecidos cancerosos ou normais que tem como características alta atividade mitótica, podendo ocorrer efeitos secundários importantes naquelas células normais de crescimento rápido, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico, causando náuseas, vômitos, diarreia, queda de cabelo e maior susceptibilidade às infecções (ALMEIDA et al., 2005)

O processo carcinogênico envolve três estágios: Iniciação, promoção e progressão. A iniciação é o primeiro estágio da carcinogênese, na qual os agentes cancerígenos são responsáveis por induzir as mutações iniciais. O segundo estágio é denominado promoção e

caracteriza-se pela intensa atividade proliferativa das células alteradas geneticamente. Durante a promoção, os sucessivos ciclos de divisão contribuem para a instabilidade genética, fenômeno crítico para a aquisição de novas mutações. A progressão representa o último estágio do processo carcinogênico, no qual as células acumulam novas mutações. Nessa fase, a taxa de proliferação é alta e as células tornam-se invasivas (GOMES-CARNEIRO et al., 1997). Os agentes conhecidos com ação anticâncer podem agir inibindo a iniciação do processo carcinogênico ou inibindo a proliferação celular durante as fases de promoção e progressão do câncer (NOBILI et al., 2009).

Dentre os agentes utilizados para a prevenção do câncer estão os flavonoides e compostos fenólicos presentes no chá verde, *Camellia sinensis*. Estudo mostrou que a incidência de câncer de cólon e mama é muito mais baixa no Oriente, onde o consumo de chá verde é frequente, quando comparada com dados do Ocidente. A atividade preventiva dos constituintes do chá tem sido demonstrada em muitos modelos animais incluindo câncer de pele, pulmão, cavidade oral entre outros (YANG et al., 2007).

Compostos naturais e seus derivados sintéticos capazes de modular interações proteína-proteína são talvez os melhores representantes da classe de agentes que inibem a mitose, comumente referidos como antimitóticos. Durante a mitose, a tubulina, proteína constituinte do microtúbulo, desempenha um papel central na formação do fuso mitótico, levando a uma correta biorientação dos cromossomos em dois conjuntos idênticos. Mudanças na dinâmica de polimerização dos microtúbulos são fortemente reguladas por propriedades que estão intrínsecas à tubulina, junto com outras proteínas que controlam sua polimerização. Uma estratégia bem sucedida para parar o desenvolvimento do câncer é interferir na atividade dos microtúbulos, induzindo assim uma parada mitótica prolongada e finalmente morte celular (JORDAN; WILSON, 2004; WOOK; CORNWELL; JACKSON, 2001).

Moléculas que atuam na dinâmica de polimerização dos microtúbulos são atrativas e promissoras como drogas anticancerígenas. O paclitaxel (Taxol®), demonstrado na FIGURA 3, está entre essa classe de fármacos e tem sido amplamente utilizado em tratamentos clínicos (ALTMANN & GERTSCH, 2007). O paclitaxel é um triterpeno poli-hidroxiado extraído de *Taxus brevifolia*, uma árvore do Pacífico, que foi isolado pela primeira vez em 1971 por Wall e colaboradores nos EUA, sendo sua configuração absoluta obtida por difração de raios X (WANI et al., 1971). O produto natural foi desenvolvido e comercializado pela companhia americana Bristol-Meyer Squibb com o nome de Taxol®, na década de 90, e atualmente está disponível como medicamento em mais de 60 países. Foi o primeiro medicamento no mercado capaz de impedir a despolimerização da tubulina, sendo usado com sucesso em

diferentes tipos de tumores. Gerou um faturamento de 1,6 bilhões de dólares no ano de 2000 para a empresa produtora, sendo que inúmeros análogos foram sintetizados em laboratório por diferentes grupos de pesquisa, com o objetivo de se identificar os grupos farmacofóricos (responsáveis pela atividade biológica), estabelecendo, assim, a relação estrutura-atividade na tentativa de se obter fármacos mais potentes (KINGSTON, 2000).

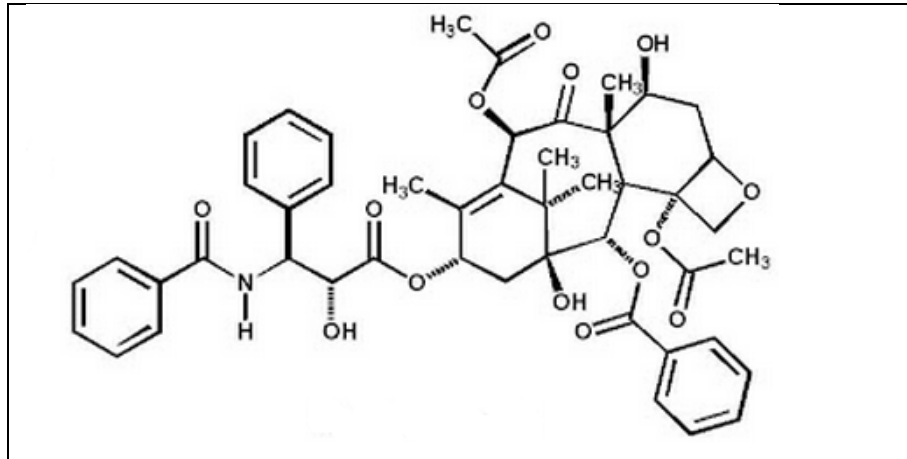


Figura 3 - Paclitaxel

Dentre os exemplos mais importantes de anticancerígenos de origem vegetal estão o *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, conhecida também como Vinca, utilizada pela população de Madagascar no tratamento de diabetes. Os extratos dessa espécie, durante os testes de atividade hipoglicemiante, produziram granulocitopenia em consequência da supressão da medula óssea dos animais. Devido a este fato, foram feitas avaliações usando como modelos linhagens de leucemias e linfomas que comprovaram sua atividade. Os alcalóides vincristina e vinblastina (FIGURA 4) foram então isolados, os quais apresentam atividade citotóxica por impedir a polimerização dos dímeros de tubulina. Esses alcalóides são de grande utilidade no tratamento de linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, câncer de ovário e testículos e leucemia linfoblástica aguda infantil (CARVALHO, 2006; MANN, 2002).

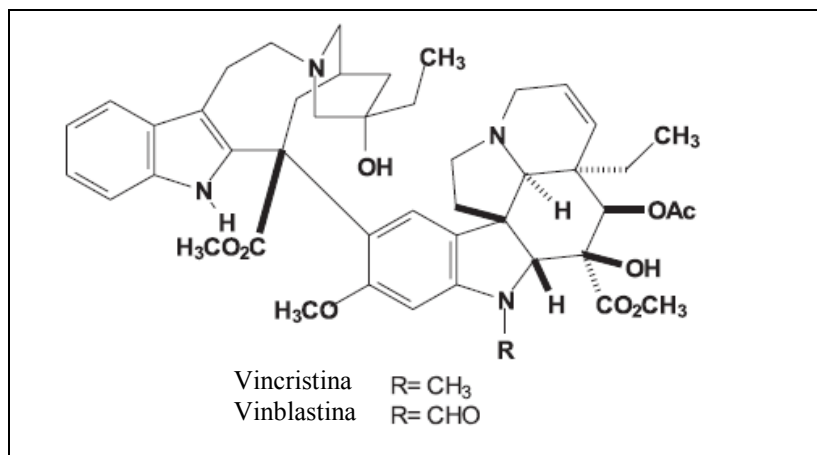


Figura 4 - Vincristina e Vinblastina

Outra descoberta importante foi a das substâncias presentes em espécies do gênero *Podophyllum*, tais como *P. peltatum* e *P. emodii*, utilizadas pelas populações nativas da América e da Ásia no tratamento do câncer de pele e verrugas. A partir da podofilotoxina, uma lignana ariltetralínica, foram obtidos o etoposídeo e o teniposídeo, cujos estudos experimentais permitiram a introdução desses na terapia do câncer (CARVALHO, 2006; MANN, 2002).

A camptotecina, que deu origem ao irinotecano e ao topotecano, é um alcalóide extraído e isolado de uma árvore ornamental chinesa, *Camptotheca acuminata* Decne. (Cornaceae) (MANN, 2002). Estes anticancerígenos atuam inibindo a enzima topoisomerase I, também conhecida como TOP I. As camptotecinas são fármacos ciclo celular específico da fase S que inibem a religação do DNA depois da quebra mediada pela TOP1. A TOP1 promove a quebra de uma das fitas de DNA e permite o giro da fita quebrada sobre a fita intacta, de forma a reduzir a tensão contorcional da molécula (EFFERTH et al., 2007).

O uso terapêutico das camptotecinas foi complicado inicialmente devido à baixa atividade anticancerígena observada em ensaios clínicos preliminares e ainda por apresentar nefrotoxicidade. A ineficiência *in vivo* foi atribuída à instabilidade do anel α -hidroxi- δ -lactônico em pH neutro. Contudo, ao entrar em contato com a urina (pH ácido) a molécula ativa era reestruturada causando danos nos túbulos renais. Somente em 1996, a *Food and Drug Administration* (FDA) concedeu ao análogo irinotecam a autorização para que fosse empregado no tratamento de câncer de cólon, sendo mais tarde usado também no combate ao câncer de pulmão e ovário (CHABNE; ROBERTS JR, 2005).

3 JUSTIFICATIVA

Desde os primórdios da civilização, a procura pelo tratamento e cura das principais doenças que acometem a humanidade tem sido uma preocupação constante. Os recursos terapêuticos que nossos ancestrais utilizavam eram basicamente os da natureza, notadamente nas plantas, animais e minerais.

Atualmente os compostos derivados de plantas são empregados na terapêutica moderna, além de terem um papel importante para a síntese de algumas moléculas mais complexas. Cerca de 30% dos medicamentos disponíveis na terapêutica, são derivados direta ou indiretamente de produtos naturais, principalmente das plantas. Em algumas doenças como o câncer, os medicamentos derivados de plantas chegam a 60% (NEWMAN et al., 2002; CLARDY; WALSH, 2004; BOLDI, 2004; KOEHN; CARTER, 2005).

A busca de novos medicamentos em plantas tropicais é uma esperança para os pacientes de doenças crônicas como as cardiovasculares e também para os que possuem doenças graves como o câncer.

Dentre as várias plantas empregadas na medicina tradicional brasileira, as pertencentes ao gênero *Caesalpinia* são utilizadas para cura de várias enfermidades. O gênero tem cerca de 30 espécies estudadas, o que é precário diante da quantidade de espécies conhecidas.

Dos representantes do gênero não há relatos sobre as atividades anti-inflamatória e antitumoral dos constituintes da espécie *Caesalpinia peltophoroides* e tão pouco dos compostos isolados. Um trabalho anterior, em nosso grupo, relatou a atividade anti-inflamatória dos extratos das flores, folhas e caule de *Caesalpinia peltophoroides*. Neste sentido e dando continuidade, este trabalho tem por objetivo o estudo químico das frações acetato de etila e hidroalcóolica das folhas (FAcCp e FAqCp, respectivamente), bem como a avaliação das atividades anti-inflamatória e antitumoral das mesmas. Outro objetivo proposto é a avaliação dos constituintes químicos e da atividade antitumoral do óleo essencial das flores desta espécie.

4 OBJETIVOS

A proposta deste trabalho consistiu na realização do estudo fitoquímico das folhas e avaliação do óleo essencial das flores de *Caesalpinia peltophoroides*. Os experimentos químicos realizados neste trabalho envolveram:

- ✓ Obtenção do extrato bruto etanólico e das partições acetato etílico e hidroalcoólica das folhas de *Caesalpinia peltophoroides*;
- ✓ Fracionamento dos extratos por meio de processos cromatográficos;
- ✓ Isolamento de constituintes químicos através de diferentes processos cromatográficos;
- ✓ Elucidação estrutural do composto isolado;
- ✓ Quantificação do composto isolado no extrato bruto e partições;
- ✓ Avaliação das atividades anti-inflamatória e antitumoral do extrato, partições e da substância isolada.
- ✓ Avaliação química e antitumoral do óleo essencial das flores de *Caesalpinia peltophoroides*;
- ✓ Contribuição para o conhecimento oriundo do gênero *Caesalpinia*.

5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 MATERIAIS, MÉTODOS E INSTRUMENTOS

- ✓ Nos processos de cromatografia em coluna (CC) utilizou-se gel de sílica 60 [70 a 230 Mesh (0,063 – 0,200 nm) ou 230 – 400 Mesh (0,200 – 0,360 nm), em coluna de vidro de diâmetro interno adequado para cada caso. Utilizou-se também Sephadex LH20 Sigma-Aldrich para a purificação dos compostos isolados.
- ✓ Nos processos de cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas placas de vidro com 0,25 mm de sílica gel 60, com indicador de fluorescência UV254.
- ✓ Como reveladores foram utilizados vapor de iodo; luz ultravioleta ($\lambda = 254$ ou 365 nm); solução etanólica de vanilina 1% solução de ácido sulfúrico 3% (1:1; v/v). Depois de borrifadas, as placas cromatográficas foram submetidas a aquecimento em estufa.
- ✓ O teor de flavonoides totais foi determinado utilizando espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu-2550), no laboratório de Fitoquímica e Química e Medicinal-LFQM- da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), de feixe duplo. As amostras foram analisadas em $\lambda = 425$ nm.
- ✓ Para caracterização das amostras foi utilizado Cromatógrafo líquido de alta eficiência Modelo DGU-20A₃ (HPLC Shimadzu) acoplado a detector de arranjo de foto diodos com faixa de varredura de 190-800nm modelo SPD-M20A, no laboratório de Fitoquímica e Química e Medicinal-LFQM- da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). O software LC solution foi utilizado durante a aquisição e processamento de dados cromatográficos. Foi utilizada coluna de fase reversa no modo analítico Shim-pack VP-ODS 150mm x 4,6mm x 5 μ m
- ✓ Para identificação dos componentes do óleo essencial foi utilizado Cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas Shimadzu GCMS-QP 2010 Plus,

detector por ionização de chama, injetor automático Shimadzu AOC-20i, coluna capilar RTX-5MS (5% fenil e 95% metilpolisiloxano, 30m x 0,25mm x 0,25 μ m) e tratamentos de dados através do software GC-MS Solution.

- ✓ No ensaio antiproliferativo dos extratos foi utilizado leitor de ELISA Anthos Zenyth 200, no Laboratório de Biologia Animal Integrada – Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL – M.G.
- ✓ O ensaio antiproliferativo do óleo essencial das flores de *C. peltophoroides* foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo - S.P.
- ✓ No teste de edema de pata foi utilizado Hidropletismômetro (Ugo Basile-Modelo 7150) e no teste de retirada de pata (von Frey eletrônico) foi utilizado Analgesímetro eletrônico Insight, modelo FEP-302 no Laboratório de Fisiologia, Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL – MG
- ✓ Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) unidimensional foram registrados em um espectrômetro da marca Bruker AVANCE-400 do Instituto de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) operando a 500 MHz para hidrogênio (RMN de ^1H) e 125 MHz para carbono (RMN de ^{13}C). Solvente utilizado foi CD_3OD .
- ✓ O espectro na região do infravermelho foi obtido em Espectrofotômetro, Perkin Elmer, modelo FT-IR no Laboratório de Química Farmacêutica, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

5.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

As folhas de *C. peltophoroides* foram coletadas em novembro de 2009 e as flores em novembro de 2011 na UNIFAL - M.G. (Campus Alfenas) Latitude: 21° 25' 45'' Sul e Longitude: 45° 56' 50'' Oeste. A identificação botânica foi realizada na Universidade Federal

de Alfenas pelo Prof. Dr. Marcelo Polo. A espécie encontra-se catalogada pela exsicata sob o número UALF-1634, depositada no herbário da Universidade Federal de Alfenas.

5.3 ESTUDO FITOQUÍMICO

5.3.1 Secagem

Após a coleta, o material vegetal das folhas foi distribuído uniformemente em bandejas de alumínio da própria estufa. Este foi submetido ao processo de secagem para a retirada de água, o que possibilita um maior tempo de armazenamento, por evitar a proliferação de microrganismos que possam degradar os constituintes existentes. A secagem foi realizada em estufa com circulação de ar por 72 horas em temperatura de 45°C.

5.3.2 Trituração

O material vegetal foi pulverizado em moinho de facas para garantir a homogeneidade do tamanho de partículas. Com a trituração cria-se uma maior superfície de contato para o arraste eficaz pelo solvente.

5.3.3 Pesagem

O material vegetal foi pesado com a finalidade de calcular o rendimento de extrato. O peso do material vegetal obtido foi de 3,2Kg.

5.3.4 Maceração

A maceração é, dentre outros, um procedimento utilizado para retirar os constituintes químicos existentes em plantas para estudos fitoquímicos. A técnica adotada faz utilização de álcool etílico absoluto (EtOH) para o arraste de substâncias presentes. O EtOH possui vasta afinidade e consegue solubilizar muitas classes de compostos. Foram realizadas 4 macerações, adotadas como padrão, para os constituintes. Para o total de 3,2 Kg de material vegetal foi utilizado 7,6 L de solvente. A solução constituintes/etanol foi concentrada em rota-

evaporador, originando 149,1 g do Extrato Etanólico das folhas de *Caesalpinia peltophoroides* (EECp), com rendimento de 4,65%.

5.3.5 Particionamento

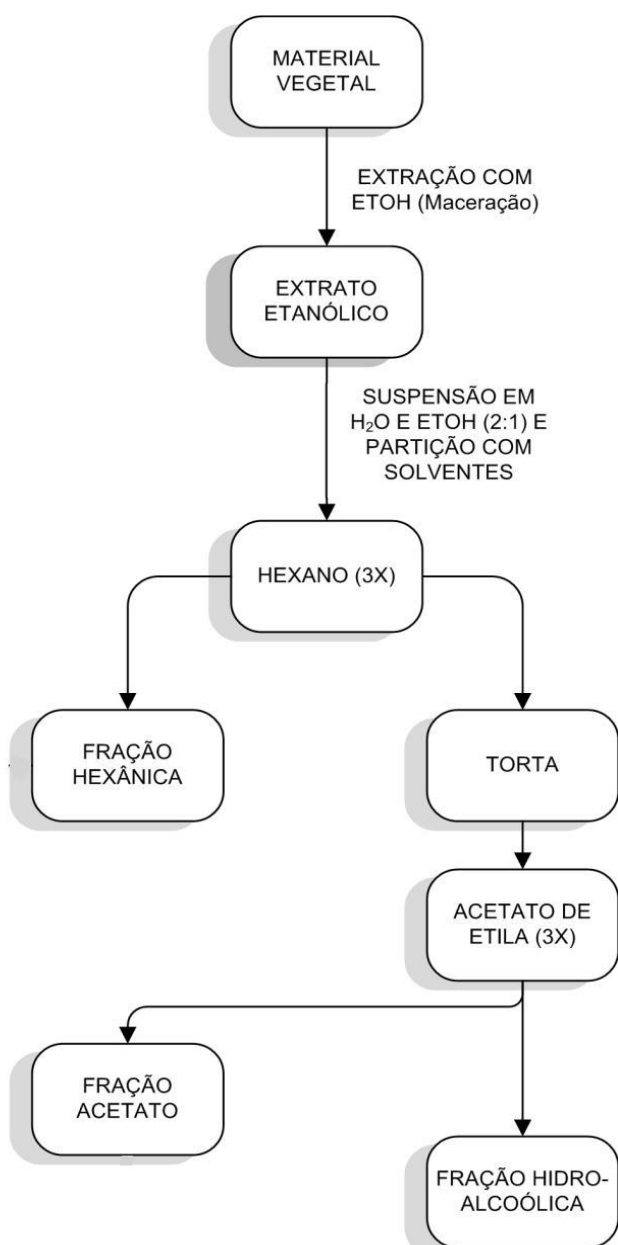
O fracionamento tem como função iniciar o trabalho de isolamento dos constituintes químicos e é importante para separar substâncias de mesma polaridade que os solventes utilizados. Os solventes adotados foram hexano (Hex) e acetato de Etila (AcOEt).

5.3.5.1 Obtenção das frações hexânica, acetato etílica e hidroalcoólica:

O extrato bruto etanólico das folhas de *C. peltophoroides* (65,6 g) foi suspenso em uma solução EtOH/H₂O (1:2) e transferido para um funil de separação de 1000 mL para a realização da técnica. Após a suspensão do extrato em EtOH/H₂O adicionou-se:

✓ 300 mL de Hexano, para a retirada de compostos apolares, onde podemos esperar encontrar compostos das classes dos hidrocarbonetos, Ácidos Graxos, Terpenos, Benzofenonas e Esteróides. O solvente foi concentrado em rota-evaporador e o mesmo foi transferido novamente o funil de separação. Este procedimento foi repetido 3 vezes obtendo assim a fração hexânica;

✓ Acetato de etila (3x), para a extração de compostos de polaridade intermediária, onde podemos citar exemplos ilustrativos de classes como triterpenos, flavonoides e xantonas. Utilizou-se volume de solvente de 300 mL, repetindo o procedimento utilizado para a partição hexânica, obtendo deste modo a Fração Acetato de Etila de *C. peltophoroides* (FACp);



- ✓ Concentração da torta remanescente (EtOH/H₂O), obtendo a Fração Hidroalcoólica de *C. peltophoroides* (FAqCp). Nesta fração estarão presentes os compostos mais polares, como exemplo, compostos glicosilados e saponinas.

Os resíduos das partições foram liofilizados para posterior fracionamento em coluna cromatográfica. A liofilização é largamente aplicada ao tratamento de extratos de plantas e é um processo que retira a água do produto por sublimação. Como a maioria dos extratos de plantas possui substâncias que podem ser degradadas ou convertidas pela ação de temperatura elevada, retirar solventes orgânicos e água em processos que são dependentes diretos de temperatura se torna arriscado, uma vez que a análise de constituintes químicos pode ser prejudicada, por não se ter conhecimento das propriedades físicas e químicas dos compostos presentes na matriz vegetal.

Após a liofilização, as frações foram pesadas podendo ser verificado na TABELA 2 o cálculo do rendimento a partir do EECp utilizado.

Tabela 2- Rendimento das partições obtidas a partir de 65,6 g do EECp.

Fração	Peso (g)	Rendimento
Hexânica	17,0	25,9%
Acetato de Etila	20,7	31,6%
Hidroalcoólica	27,9	42,5%

Das amostras obtidas foram feitos fracionamentos para isolamento e purificação dos constituintes químicos majoritários da fração acetato de etila de *C. peltophoroides* (FACp) e da fração hidroalcoólica de *C. peltophoroides* (FAqCp).

5.3.5.2 Isolamento dos constituintes químicos da FACp:

A FACp (10,2g) foi submetida a cromatografia em coluna (CC) filtrante, na qual usou-se como eluentes Hex, AcOEt e metanol (MeOH). Um total de 77 frações de 250 ml cada foram coletadas. As frações, após remoção do solvente, foram analisadas por CCD e, aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante foram reunidas. Sucessivos fracionamentos foram realizados por cromatografia em coluna usando sílica gel 60 [70 a 230]

Mesh (0,063 – 0,200 nm) ou 230 – 400 Mesh (0,200 – 0,360 nm) e Sephadex de alguns grupos.

Para identificação das substâncias foi adotado o seguinte sistema de siglas: “C” para coluna, “s” para Sephadex e letras em ordem alfabética para cada subcoluna fracionada. Exemplos: CA (coluna A), CB (coluna B), CCs (coluna C Sephadex), CD (coluna D) e assim sucessivamente.

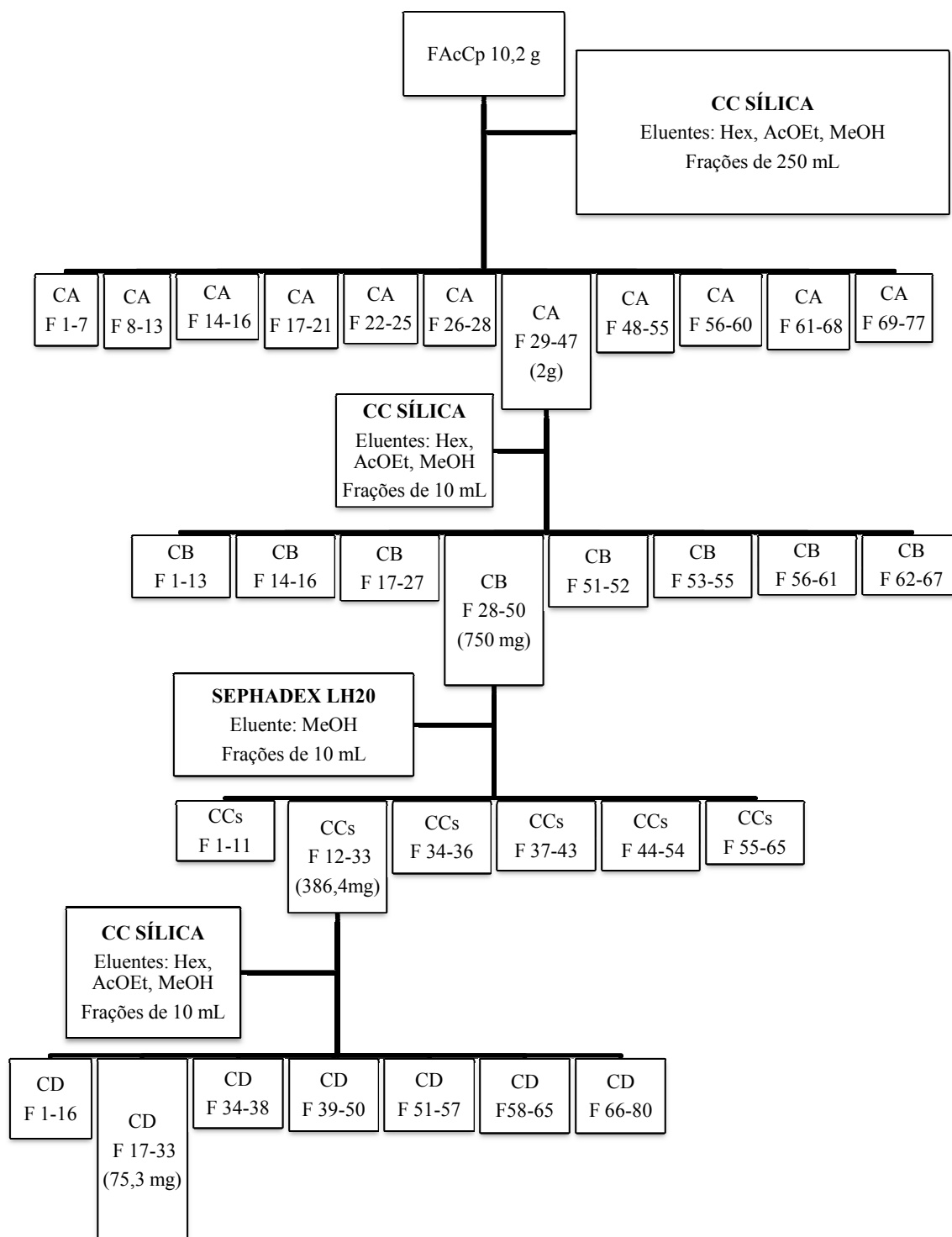


Figura 5- Fracionamento da FAcCp das folhas de *Caesalpinia peltophoroides*

Obtenção da CD (F 17-33)

As frações 17-33 obtidas da coluna D foram eluidas em Acetato de etila: Metanol (90:10), foram agrupadas por apresentarem o mesmo perfil cromatográfico por CCD e foram submetidas à análise em HPLC. Além disso, foi submetida à caracterização por RMN.

Foram realizados vários fracionamentos da FAcCp, conforme figuras, a fim de se obterem substâncias puras. As frações obtidas apresentaram mais de um componente através da análise por CCD utilizando-se diferentes eluentes, não sendo possível obter pureza de novos compostos.

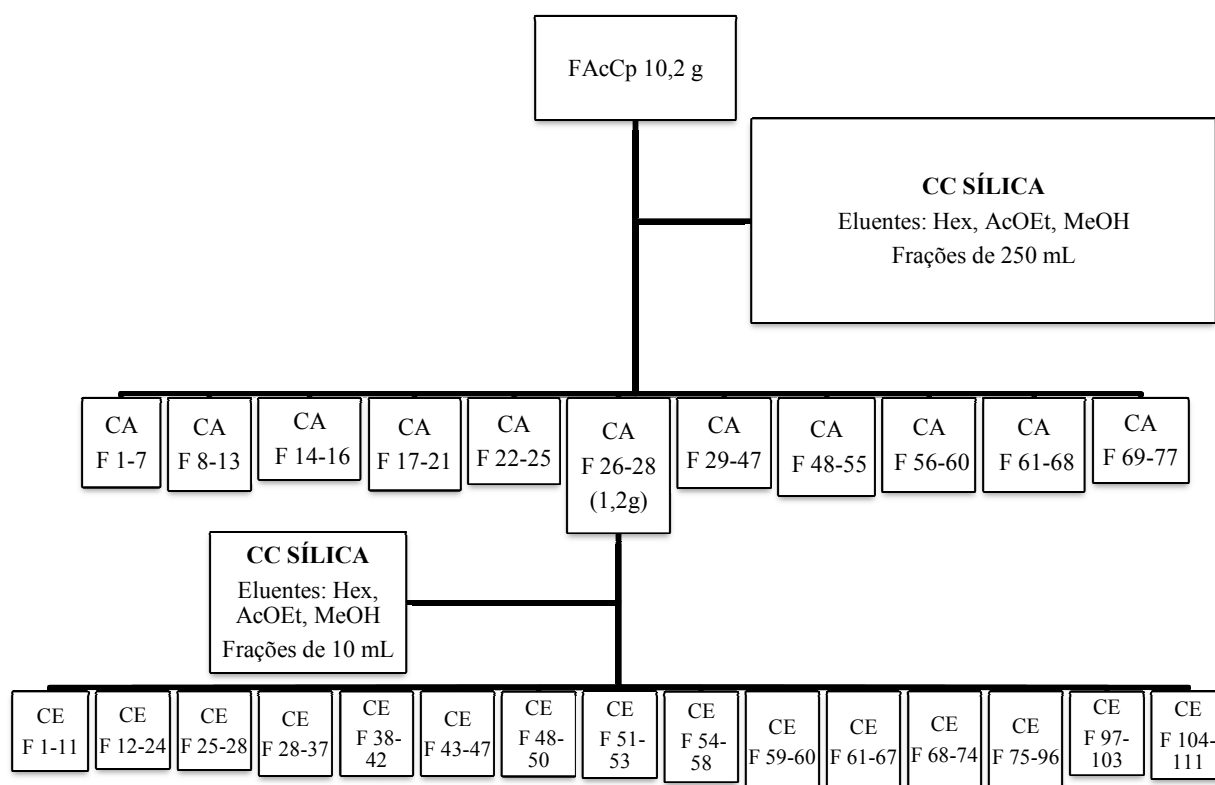


Figura 6- Fracionamento 2 da FAcCp de folhas de *Caesalpinia peltophoroides*.

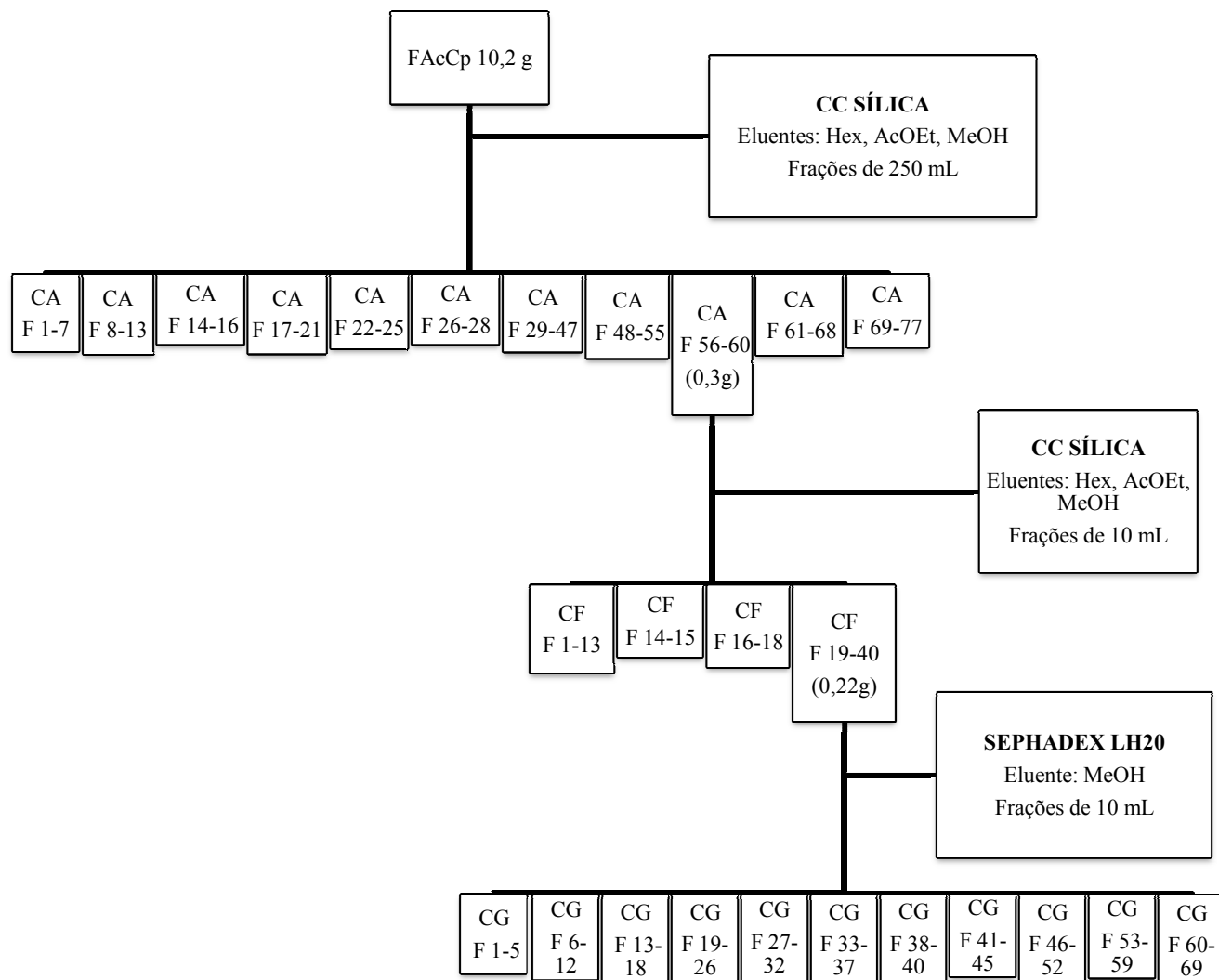


Figura 7- Fracionamento 3 da FAcCp de folhas de *Caesalpinia peltophoroides*.

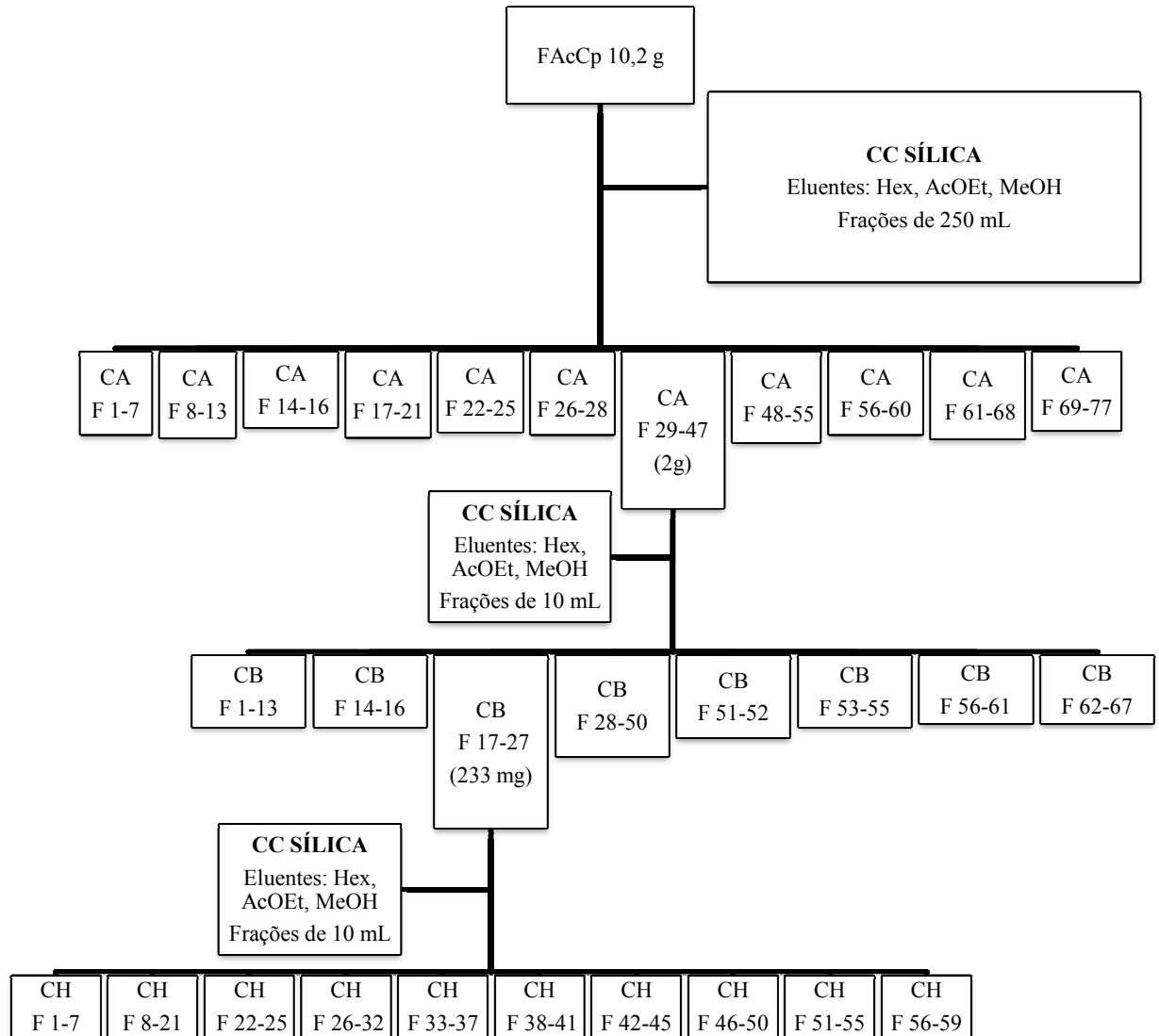


Figura 8- Fracionamento 4 da FAcCp de folhas de *Caesalpinia peltophoroides*.

5.3.5.3 Isolamento dos constituintes químicos da FAqCp:

A FAqCp (10,0g) foi submetida a cromatografia em coluna (CC) filtrante, na qual usou-se como eluentes Hex, AcOEt e MeOH. Um total de 46 frações de 250 ml cada foi coletado. As frações, após remoção do solvente foram analisadas por CCD e, aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante foram reunidas.

Para identificação das substâncias foi adotado o mesmo sistema de siglas adotado na FAcCp.

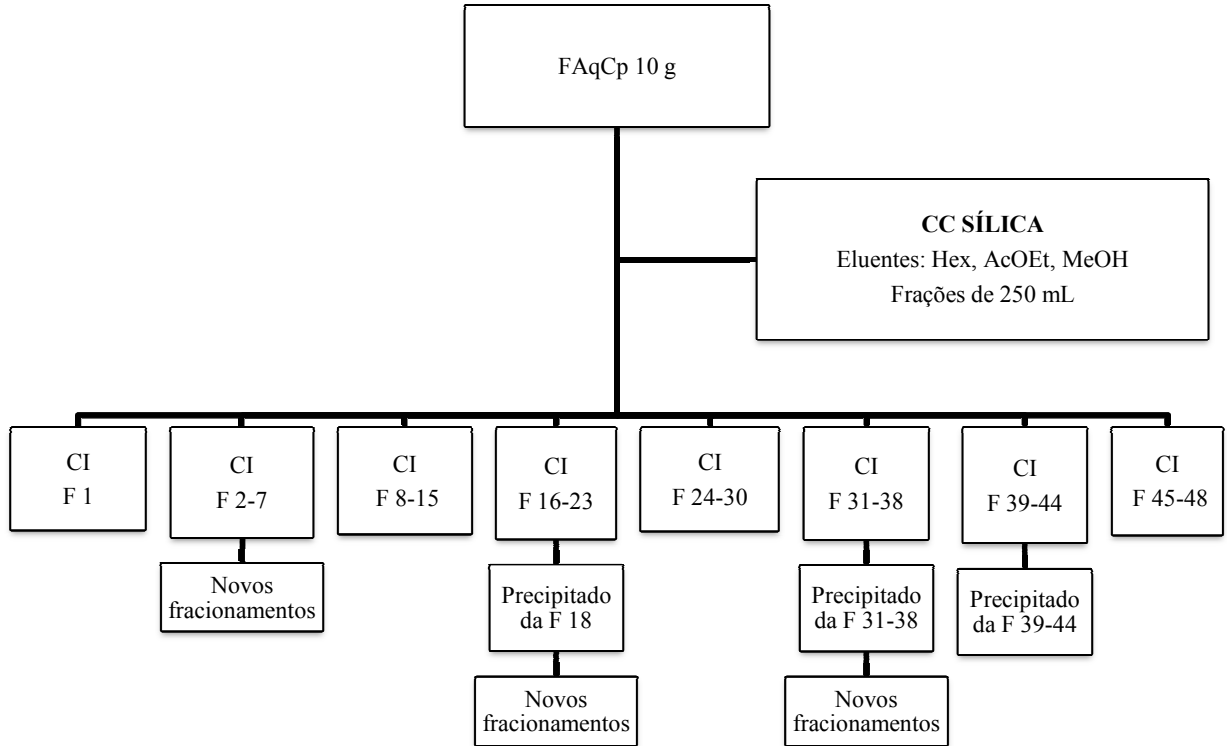


Figura 9- Fracionamento da FAqCp de folhas de *Caesalpinia peltophoroides*.

Obtenção da CI (Precipitados da F 18, F 31-38 e F 39-44)

Os precipitados obtidos da F18 e F31-38 (coluna I) foram eluídos com 100% de Acetato de etila e o precipitado da F39-44 (coluna I) eluído com AcOEt/MeOH (70:30). O primeiro precipitado apresentou-se como uma substância sólida amarela clara e os outros dois um precipitado de cor branca. Estes foram submetidos à caracterização em HPLC. Além disso, foram submetidos à caracterização por RMN, no entanto não foi possível determinar a estrutura dos compostos devido à pequena quantidade obtida destes compostos.

Foram realizados outros fracionamentos da FAqCp a fim de se obter novas substâncias, mas as frações obtidas apresentaram mais de um componente através da análise por CCD, não conseguindo assim isolamento de novos compostos.

5.4 DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES E SAPONINAS

5.4.1 Determinação de flavonoides totais

A determinação da concentração de flavonoides totais foi realizada de acordo com a metodologia descrita por (KALIA et al., 2008) com algumas modificações. Para preparação da curva de calibração foram utilizadas soluções de quercetina em etanol nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 µg/mL. 0,5 mL de cada solução foi diluído com 1,5 mL de etanol e acrescentado 0,1 mL de solução de cloreto de alumínio a 10% p/v, 0,1 mL de solução de acetato de potássio 1 mol/L e 2,8 mL de água destilada. Depois de 30 minutos a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 425nm.

Foi determinada concentração de flavonoides do EECp, FAcCp e FAqCp utilizando uma concentração das amostras de 0,5 mg/mL realizando o mesmo procedimento descrito para preparação dos padrões da curva de calibração. A análise foi realizada em triplicata e o conteúdo total de flavonoides foi expresso como mg de equivalente de quercetina/g do extrato da planta.

5.4.2 Detecção de saponinas

O teste para verificação da presença de saponinas foi realizado com EECp, FAcCp e FAqCp. O extrato e frações foram pesados (1 g) e solubilizados em 100 mL de água. Os tubos contendo as soluções foram agitados por 15 segundos (2 vezes), sendo que a presença de um anel persistente com pelo menos 1 cm de altura de espuma, por mais de 15 minutos, indicou a presença de saponinas (BRUNETON, 2001; COSTA, 1987).

5.5 CARACTERIZAÇÃO POR HPLC

O extrato (EECp), frações (FAcCp e FAqCp) e as substâncias obtidas (CD F17-33 e precipitados da CI: F18, F31-38, F39-44) foram pesados e diluídos na concentração de 1mg/mL, sendo o extrato, frações e a CD F17-33 diluídos em Metanol e as substâncias obtidas da CI diluídas em mistura de metanol e tetrahydrofurano. As amostras foram filtradas em membranas com poro de 0,45µm, sendo o filtrado coletado em vial.

Foram preparados também alguns padrões, que são comumente encontrados em plantas, para comparação do perfil cromatográfico, tempo de retenção, assim como o espectro UV dos mesmos juntos às substâncias encontradas nas folhas de *Caesalpinia peltophoroides*. Os padrões também foram preparados na concentração 1mg/mL, diluídos em metanol sendo que dos padrões injetados foram avaliados: Rutina, Quercetina, Apigenina, Canferol, Ácido ferúlico, Catequina e Ácido cumárico.

A avaliação do perfil cromatográfico foi feita empregando eluição gradiente com variação do solvente orgânico B na faixa de composição de 10-100% em 47 minutos (TABELA 3). As duas fases utilizadas na eluição gradiente, Água destilada (Fase A) e Metanol (Fase B), foram acidificadas com 0,1% de ácido acético. Utilizou-se fluxo de 1,0mL min⁻¹ e as amostras foram injetadas em HPLC Shimadzu acoplado a detector de arranjo de foto diodos com faixa de varredura de 190-800nm, sendo o volume injetado de 25µL e o comprimento de onda (λ) utilizado para avaliação do perfil de 254nm. Foi utilizada coluna de fase reversa no modo analítico Shim-pack VP-ODS 150mm x 4,6mm x 5µm.

Tabela 3 - Gradiente de eluição cromatográfica empregado na eluição dos metabólitos encontrados nas folhas de *Caesalpinia peltophoroides*.

Tempo (minutos)	Composição da fase B
0	10%
10	40%
20	100%
40	100%
42	10%
47	10%

5.5.1 Quantificação da CD F17-33

Determinou-se o teor da substância CD F17-33 presente no extrato (EECp) e frações (FAcCp, FAqCp) utilizando o sistema de eluição gradiente descrito na TABELA 3. A construção da curva de calibração foi feita utilizando padrão de Rutina (Sigma-Aldrich) obtendo as concentrações de 9, 18, 27, 36, 45 e 54µg/mL.

O extrato e frações foram preparados nas concentrações de 1mg/mL. Todas as soluções foram diluídas em metanol e injetadas em triplicata.

5.6 ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FLORES POR GC-MS

As flores frescas de *C. peltophoroides* (300 g) foram submetidas à hidrodestilação em aparelho de Clevenger por 4 h, com rendimento de 0,01% obtendo 0,03 g de óleo essencial após secagem com sulfato de sódio anidro.

As análises por GC-MS foram realizadas em um cromatógrafo à gás Shimadzu acoplado ao espectrômetro de massas GCMS-QP 2010 Plus, com injetor automático (Shimadzu AOC-20i), coluna capilar RtX-5 (5% fenil e 95% metilpolisiloxano, 30m, 0,25mm, 0,25µm) e tratamento de dados através do software GC-MS Solution. Essas análises foram realizadas pela injeção de 1,0 µL de uma solução 1,0 mg/mL de óleo volátil em acetato de etila em um modo split (1:30) empregando hélio como gás carreador (1 mL/min) sob as seguintes condições: temperaturas do injetor e detector de 220°C e 250°C respectivamente, temperatura programada do forno de 60-246°C a 3°C/min, mantendo 5 minutos a 246°C. A condição de operação foi temperatura da fonte de 230°C, temperatura da interface de 280°C, voltagem de ionização de 70eV.

5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANALGÉSICA

Para o teste de avaliação da atividade anti-inflamatória e analgésica *in vivo*, EECp (30, 100, e 300 mg/kg) e frações FAcCp e FAqCp (10, 30 e 100 mg/Kg) foram administrados por via oral aos camundongos, uma hora antes do experimento na forma de suspensão em solução de carboximetilcelulose (CMC) 0,5% p/v. O extrato e frações foram submetidos à agitação em ultra-som a fim de garantir a homogeneização da suspensão. Os animais do grupo controle receberam o mesmo tratamento dos animais dos grupos testes, exceto em relação à substância administrada (CMC 0,5%, 10 mL/Kg). Como substância de referência foi utilizada solução de indometacina (10 mg/Kg, p.o.).

5.7.1 Animais

Foram utilizados camundongos “Swiss” machos (30 ± 5g) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG. Os animais foram tratados com ração comercial e água *ad libitum*, durante todo experimento, garantida sua adaptação em sala

climatizada a $23 \pm 2^\circ \text{C}$, em caixas de polipropileno adequadas à sua manutenção e foram mantidos sob regime de luz com ciclo claro-escuro de 12 h. Ao término de cada experimento, os animais foram sacrificados com halotano.

5.7.2 Teste de retirada de pata (von Frey eletrônico)

Em uma sala silenciosa, os animais foram colocados em gaiolas de acrílico (12 x 10 x 17 cm de altura) com um piso de grade de arame 30 min antes do teste. O teste consistiu de evocar uma flexão da pata posterior com um transdutor de força manual (Analgesímetro eletrônico Insight, modelo FEP-302), adaptado com uma ponta de polipropileno de $0,5 \text{ mm}^2$. A pata posterior do animal foi tocada pela ponta de polipropileno de forma perpendicular à área central da pata e aplicou-se uma pressão com um aumento gradual. Durante este período de adaptação, as patas foram tocadas 3 vezes e antes de cada leitura os animais estavam quietos, sem movimentos exploratórios ou defecação e não descansavam sobre as patas. O estímulo da pata foi repetido até que o animal apresentasse duas medidas semelhantes (CUNHA et al., 2004). Veículo, EECp, FAcCp, FAqCp ou indometacina foi administrado por via oral 1 h antes da injeção ipl. (intraplantar) de carragenina ($100 \mu\text{g}/\text{pata}$). Os resultados são expressos pelo limiar de retirada delta (Δ) (em g), calculado subtraindo-se as medições no tempo-zero dos valores médios nos horários indicados após a injeção de carragenina.

5.7.3 Teste de edema de pata induzido por carragenina

O edema de pata foi induzido pela injeção de $800 \mu\text{L}/\text{pata}$ de carragenina em salina estéril e administrada na região subplantar da pata direita dos camundongos. Veículo, FAcCp, FAqCp, EECp ou indometacina foi administrado por via oral uma hora antes da injeção de carragenina. Após uma, duas, três e quatro horas da administração da carragenina, cada pata do animal foi imersa até a região tíbio-társica com o uso de um pletismômetro para aferir o volume (HENRIQUEZ, 1987).

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados do teste *in vivo* foram expressos como média \pm erro desvio padrão da média. Para comparação de três ou mais médias foi utilizada a análise de variância (One-way)

seguida do pós-teste de Newman-Keuls, quando foi apropriado. O nível estatístico para rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5% ($p < 0.05$).

5.9 ATIVIDADE ANTITUMORAL

5.9.1 Avaliação da atividade citotóxica das frações

5.9.1.1. *Linhagens celulares*

Os testes foram realizados em linhagens celulares derivadas de tumores humanos: MCF-7 (adenocarcinoma mamário), HepG2 (carcinoma hepatocelular), A549 (carcinoma de pulmão) e HT144 (melanoma).

5.9.1.2 *Condições de cultivo*

As células foram cultivadas em Meio Mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma, MO) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Cultilab, SP, Brasil). Estas foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera controlada (95% de ar e 5% de CO₂) e subculturas foram obtidas por digestão enzimática (tripsina a 0,05% e EDTA a 0,02%). Estoques foram congelados na presença de 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) e mantidos em biofreezer (-80°C).

5.9.1.3 *Tratamento*

As células foram semeadas em placas de 96 poços, cujo inóculo inicial foi de 1×10^4 células/poço para as linhagens MCF7, HepG2 e HT144 e 5×10^3 células/poço para a linhagem A549. Após aderência, as células foram tratadas com as frações FAcCp e FAqCp nas concentrações de 0.25 µg/mL, 2.5 µg/mL, 25 µg/mL e 250 µg/mL. O composto isolado CD (F 17-33) foi utilizado para tratar as células da linhagem A549 nas concentrações de 25 µM, 50 µM, 100 µM e 200 µM. As frações e a CD (F 17-33) foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO). A partir das soluções-estoque, novas diluições foram realizadas em meio de cultura, imediatamente antes do uso, para obtenção das concentrações de uso. A concentração final de DMSO não ultrapassou 0.1% (v/v).

5.9.1.4 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada utilizando-se o Kit “Cell Titer 96™” da Promega®. Esse ensaio detecta a quantidade de formazan produzido a partir de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)2-(4 sulfofenil)-2H-tetrazólio (MTS) pelas desidrogenases de células metabolicamente ativas. O produto é solúvel em meio de cultura e a quantidade produzida é detectada em Leitor de Elisa a 490nm. A absorbância aferida é diretamente proporcional ao número de células vivas e, portanto, a viabilidade foi determinada comparando-se os valores de absorbância entre culturas não tratadas e tratadas. Os dados apresentados representam a média obtida a partir de triplicatas. O CI_{50} foi determinado usando o software GraphPad Prism.

5.9.2 Avaliação da atividade citotóxica do óleo essencial

5.9.2.1. Linhagem celular

Células B16F10-Nex2 foram utilizadas no presente estudo, as quais são derivadas da linhagem B16F10 (melanoma de murino). A referida sublinhagem foi originalmente obtida no Instituto Ludwig de Pesquisas sobre o câncer (São Paulo – Brasil), contudo sua caracterização foi realizada na Unidade de Oncologia Experimental (UNIFESP, Universidade Federal de São Paulo) onde foi verificado que as células B16F10-Nex2 apresentam baixa imunogenicidade e virulência.

5.9.2.2 Condições de cultivo

As células foram cultivadas em Meio RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado com 10mM de HEPES (Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2'-etanossulfônico) (Sigma, St. Louis, MO), 24mM de bicarbonato de sódio (Sigma), 40 mg/L de gentamicina (Schering-Plough, São Paulo, Brasil) e 10% de soro fetal bovino (Invitrogen) - pH 7.2. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera controlada (95% de ar e 5% de CO₂).

5.9.2.3 *Tratamento*

As células foram semeadas em placas de 96 poços, cujo inoculo inicial foi de 1×10^4 células/poço. O óleo essencial foi dissolvido em DMSO para obtenção da solução-estoque (10mg/mL). A partir desta, uma série de diluições foram realizadas em meio de cultura RPMI contendo 10% de soro fetal bovino para obtenção das soluções de uso (25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g/mL}$).

5.9.2.4 *Viabilidade celular*

A viabilidade celular foi avaliada utilizando-se o Cell Viability and Proliferation MTT da Sigma-Aldrich. Este ensaio detecta a quantidade de formazan produzido à partir do reagente Brometo de 3- (4,5 dimetiltiazol-2-il)-2-5-difenil-tetrazólio (MTT) pelas enzimas desidrogenases. O produto é solubilizado em isopropanol uma vez que o formazan é insolúvel em meio aquoso, sendo a absorbância medida espectrofotometricamente. A absorbância aferida é diretamente proporcional ao número de células vivas e, portanto, a viabilidade foi determinada comparando-se os valores de absorbância entre culturas não tratadas e tratadas. Os dados apresentados representam a média obtida a partir de triplicatas. O CI_{50} foi determinado usando o software GraphPad Prism.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ENSAIOS DE DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES E SAPONINAS

6.1.1 Teor de flavonoides

Este ensaio consistiu em determinar o teor de substâncias pertencentes à classe dos flavonoides.

Os flavonoides absorvem radiação eletromagnética na região do ultravioleta (UV) e do visível e, dessa maneira, apresentam um papel de defesa das plantas frente à radiação solar. Além disso, desempenham um papel importante na saúde humana por suas reconhecidas propriedades anti-inflamatórias, antialérgicas, antimicrobianas, hepatoprotetoras e por sua ação antioxidante ao minimizar a peroxidação lipídica e o efeito dos radicais livres (KALIA et al., 2008).

O método para determinar o teor de flavonoides em uma planta ou material vegetal se baseia no uso de cloreto de alumínio e de uma substância padrão, como a quercetina. O cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonoides em metanol ou etanol, ocorrendo, na análise espectrofotométrica, um desvio da absorbância para comprimentos de onda maiores e uma intensificação da absorção (KALIA et al., 2008).

O total de flavonoides nos extratos foi determinado pela equação de regressão da curva de calibração e expresso como mg de equivalente de quercetina por g do extrato da planta.

Tabela 4 - Teor de flavonoides em miligrama de quercetina por grama do extrato, sendo o coeficiente de correlação obtido na curva de calibração de 0,9994.

Extrato	Teor de flavonoides mg/g
EE Cp	44,6
FAC Cp	51,1
FAq Cp	50,9

As frações FAC Cp e FAq Cp apresentaram praticamente os mesmos teores de flavonoides. Esperou-se encontrar essa classe de compostos nas duas frações, sendo que para

fração acetato de etila é provável encontrar flavonoides e para a fração aquosa espera-se encontrar flavonoides glicosilados.

6.1.2 Detecção qualitativa de saponinas

Este ensaio consistiu em verificar a presença de saponinas no extrato (EECp) e frações (FAcCp e FAqCp).

As saponinas são um vasto grupo de glicosídeos amplamente distribuídos nas plantas superiores. São classificados em saponinas esteroidais ou saponinas triterpênicas. Muitas saponinas têm propriedades farmacológicas e são utilizadas em fitoterapia e em indústria cosméticas, sendo algumas atividades farmacológicas relatadas como anti-inflamatória, inseticida e antibiótica (SPARG et al., 2004).

O teste qualitativo para verificação da presença de saponinas consiste em verificar a presença de um anel persistente de espuma por mais de quinze minutos. As saponinas se dissolvem em água para formar soluções coloidais que, sob agitação, formam espuma.

A FAqCp apresentou uma espuma persistente por mais de 15 minutos sob agitação, sendo que a espuma formada tinha mais de 1 cm de altura. O anel persistente de espuma para a FAcCp foi inferior a 1 cm de altura, chegando a medir metade da altura apresentada na FAqCp. O anel de espuma encontrado no EECp, apesar de persistente, apresentou uma altura mínima, inferior ainda ao apresentado na FAcCp. Estes dados indicaram a presença de saponinas na Fração Hidroalcoólica. É possível que haja saponinas também na FAcCp e no EECp, no entanto, estas são encontradas em quantidade muito inferior quando comparadas à FAqCp.

6.2 AVALIAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO E ELUCIDAÇÃO DA CD F17-33

6.2.1 Perfil cromatográfico dos extratos e substâncias obtidas

O objetivo da avaliação do perfil cromatográfico foi obter uma metodologia baseada em análises por HPLC-DAD na tentativa de realizar a identificação direta dos metabólitos secundários presentes nos extratos estudados empregando experimentos de comparação do tempo de injeção e espectro UV dos principais padrões encontrados em plantas, ou ainda por experimentos de co-injeção.

Foram obtidos os perfis cromatográficos do extrato (EECp) e frações (FACp e FAQp), sendo que nas mesmas condições foram injetados os padrões de Rutina, Quercetina, Apigenina, Canferol, Ácido ferúlico, Catequina e Ácido cumárico, sendo estes comparados às subfrações: CD F17-33 e precipitados da coluna I (F18, F31-38 e F39-44).

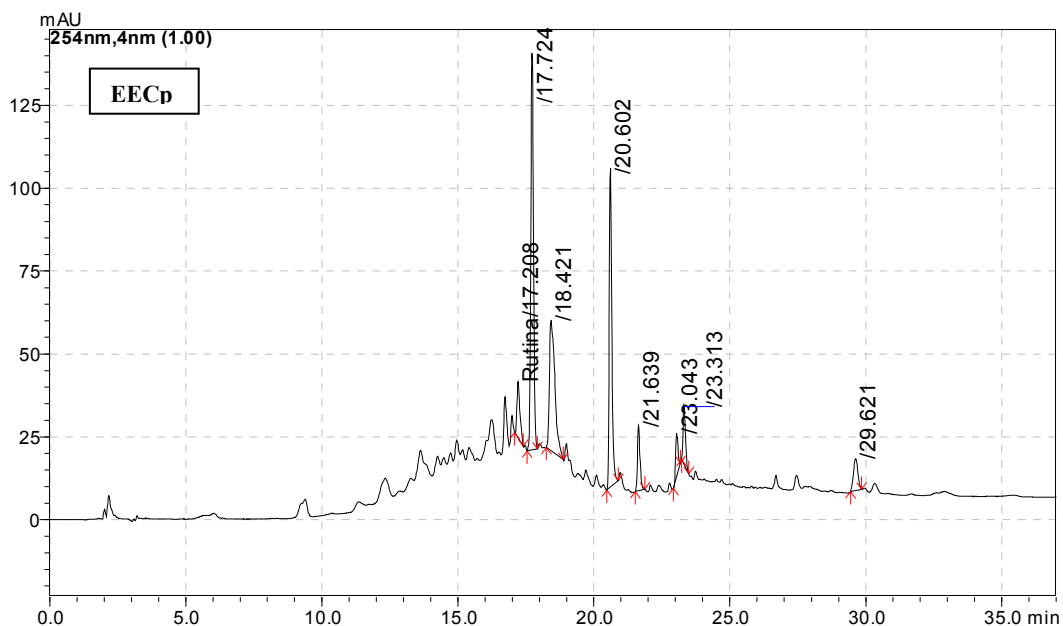


Figura 10 - Perfil cromatográfico do EECp obtido por HPLC-DAD.

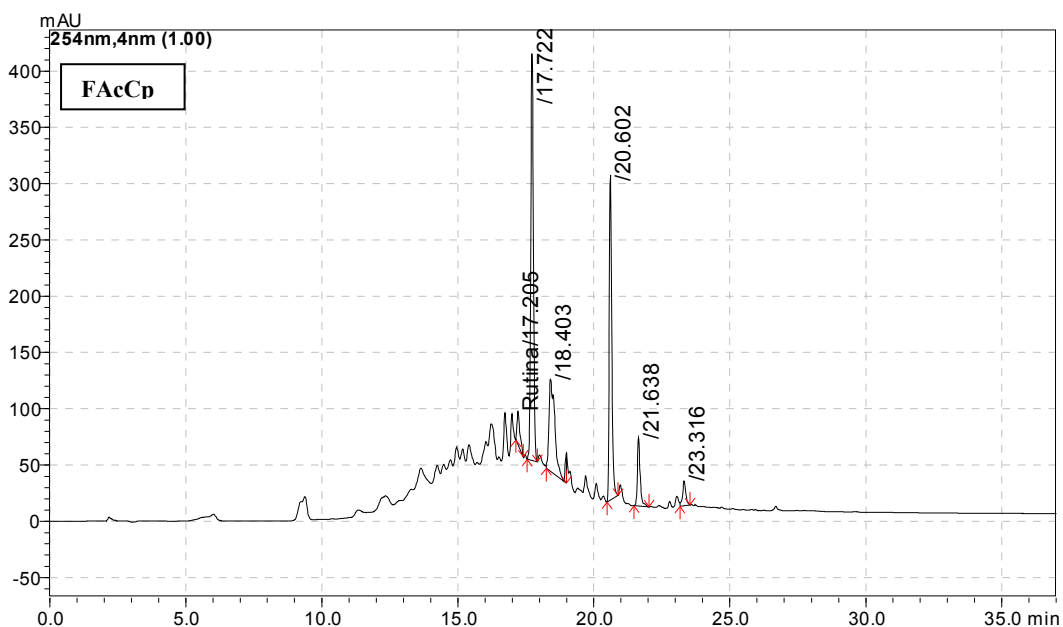


Figura 11- Perfil cromatográfico da FACp obtido por HPLC-DAD.

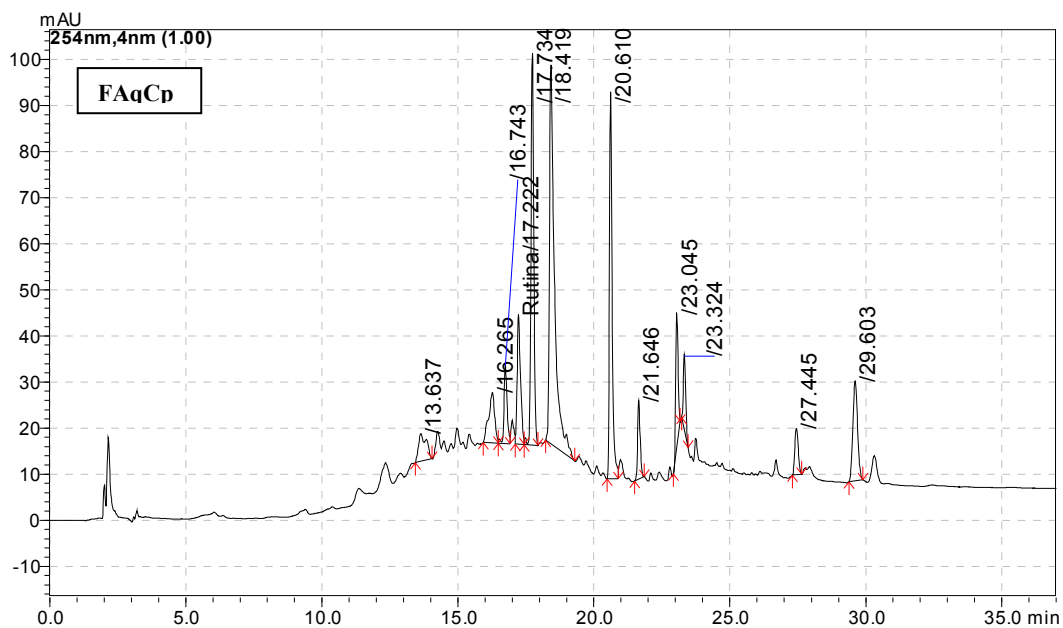


Figura 12- Perfil cromatográfico da FAqCp obtidos por HPLC-DAD

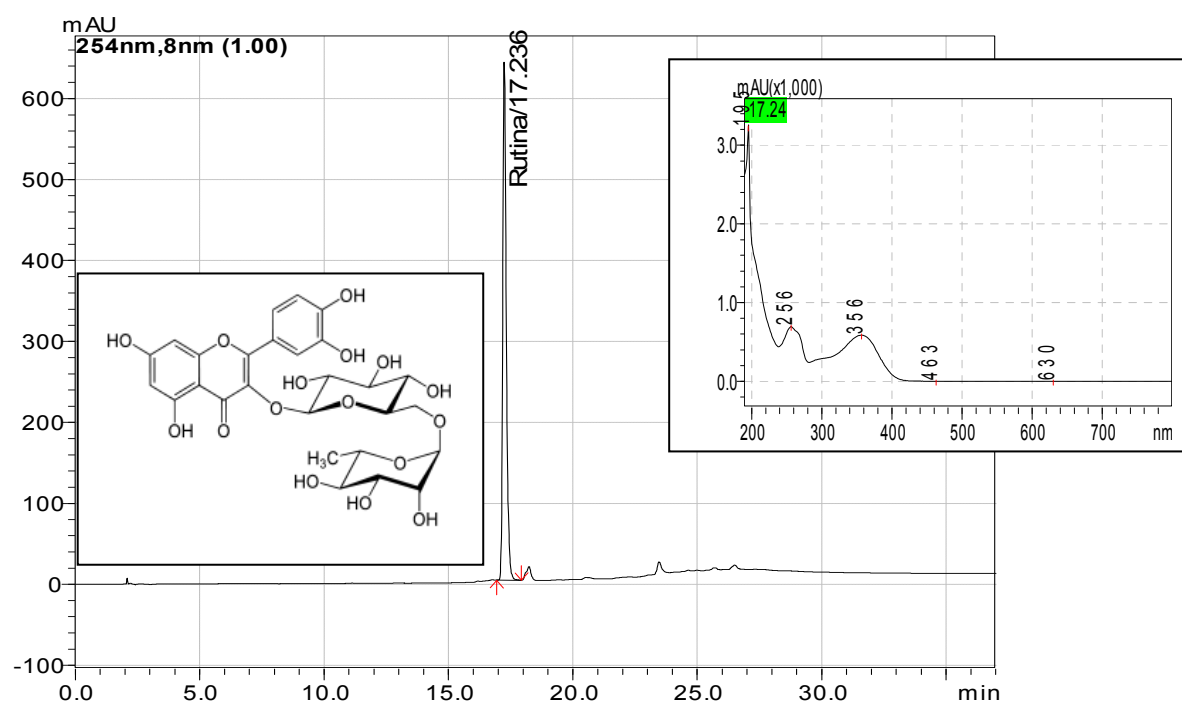


Figura 13- Estrutura química da Rutina; cromatograma e espectro UV do padrão de Rutina (Sigma-aldrich) obtidos por HPLC-DAD.

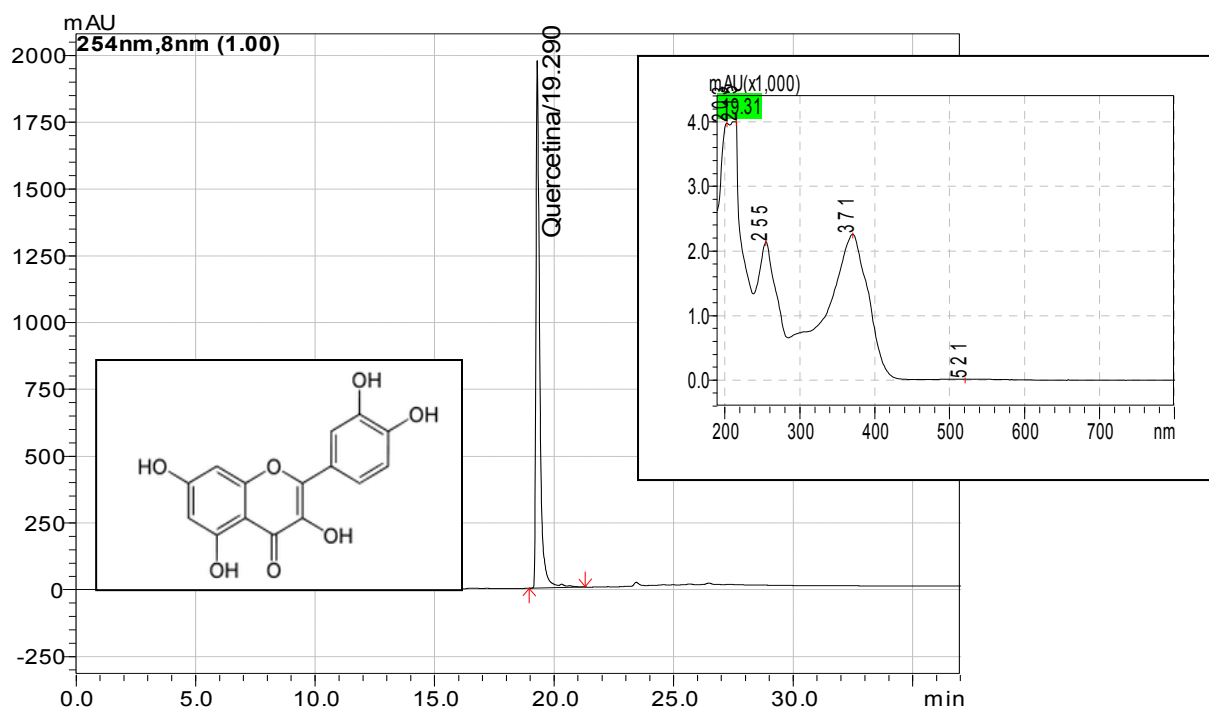


Figura 14 - Estrutura química da Quercetina; cromatograma e espectro UV do padrão de Quercetina (Sigma-aldrich) obtidos por HPLC-DAD.

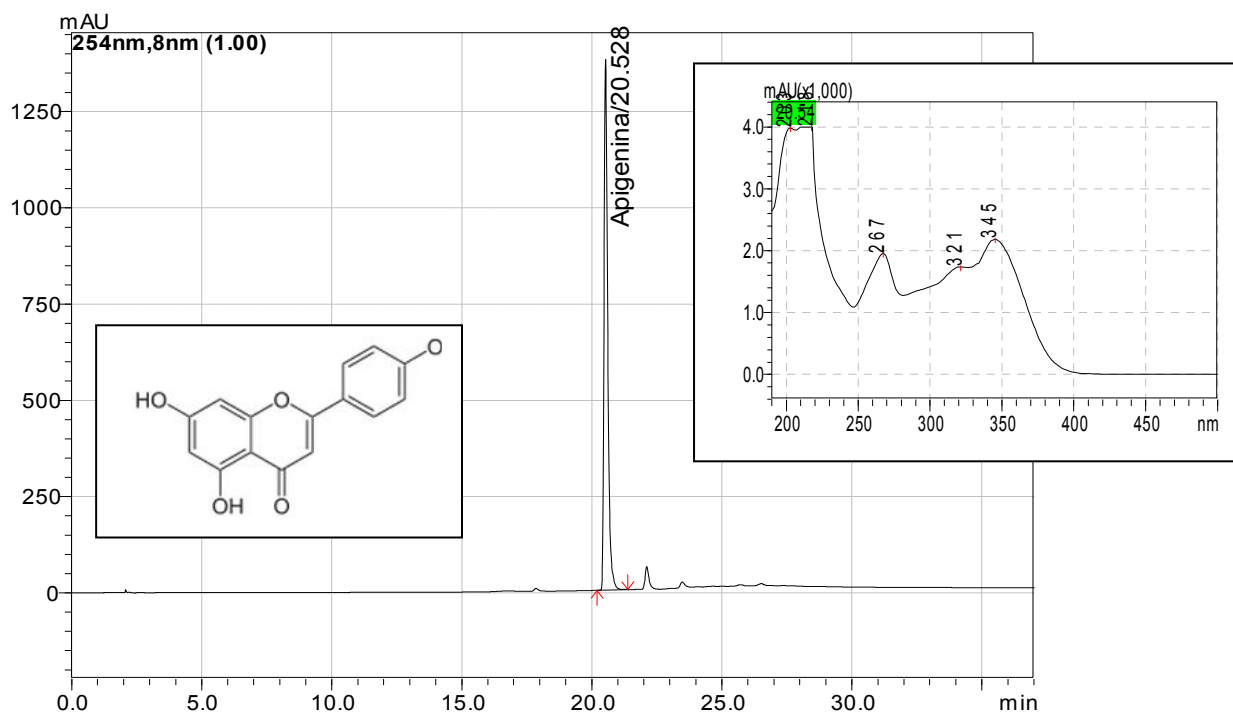


Figura 15 - Estrutura química da Apigenina; cromatograma e espectro UV do padrão de Apigenina (Sigma-aldrich) obtidos por HPLC-DAD.

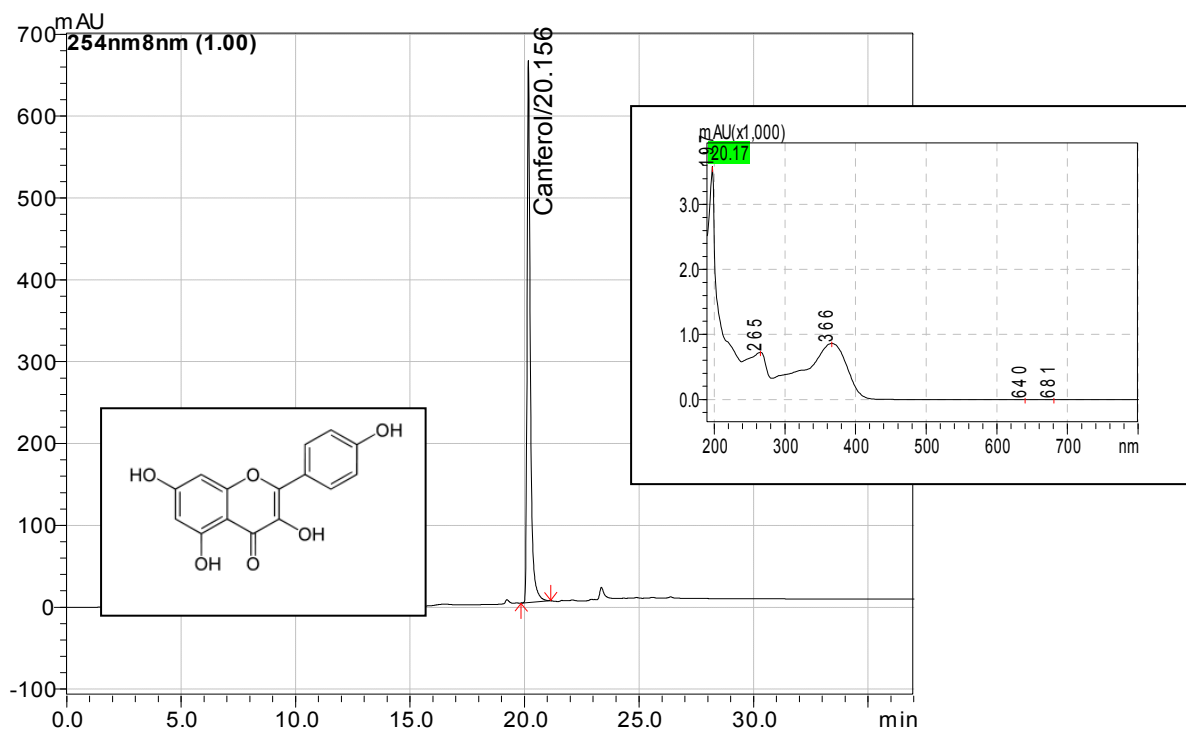


Figura 16 - Estrutura química do Canferol; cromatograma e espectro UV do padrão de Canferol (Sigma) obtidos por HPLC-DAD.

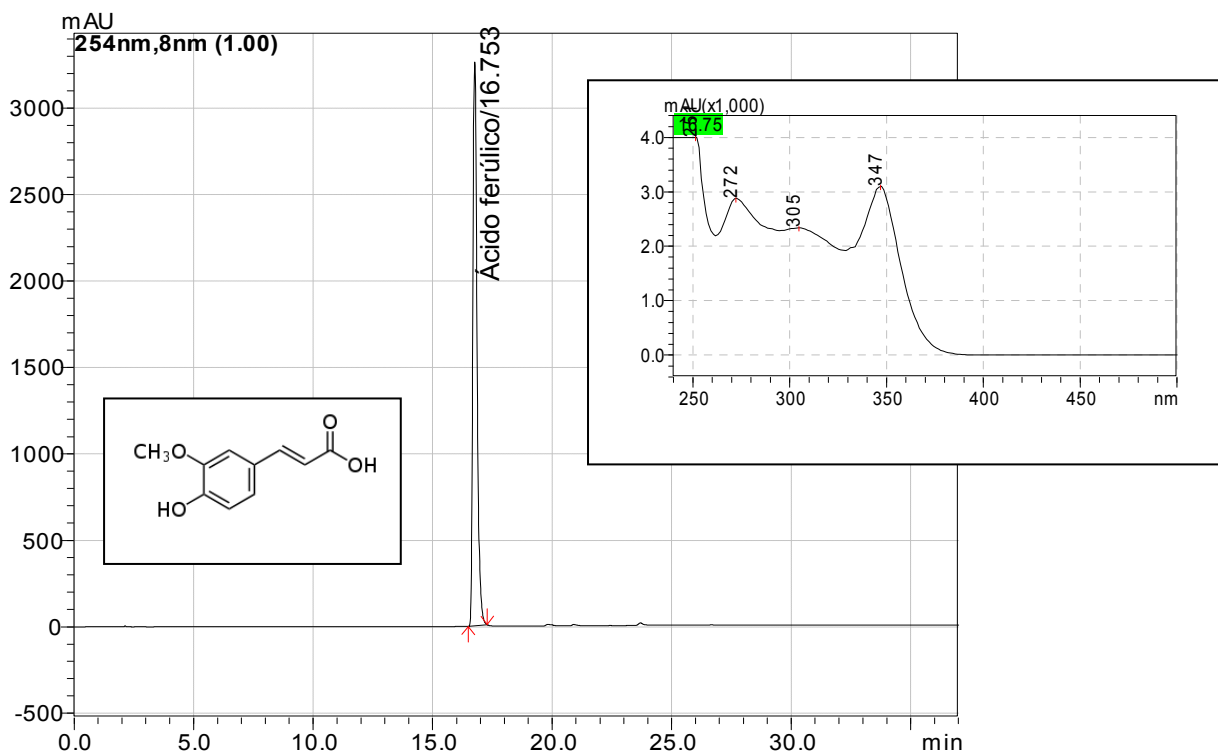


Figura 17 - Estrutura química do Ácido Ferúlico; cromatograma e espectro UV do padrão de Ácido Ferúlico (Fluka) obtidos por HPLC-DAD.

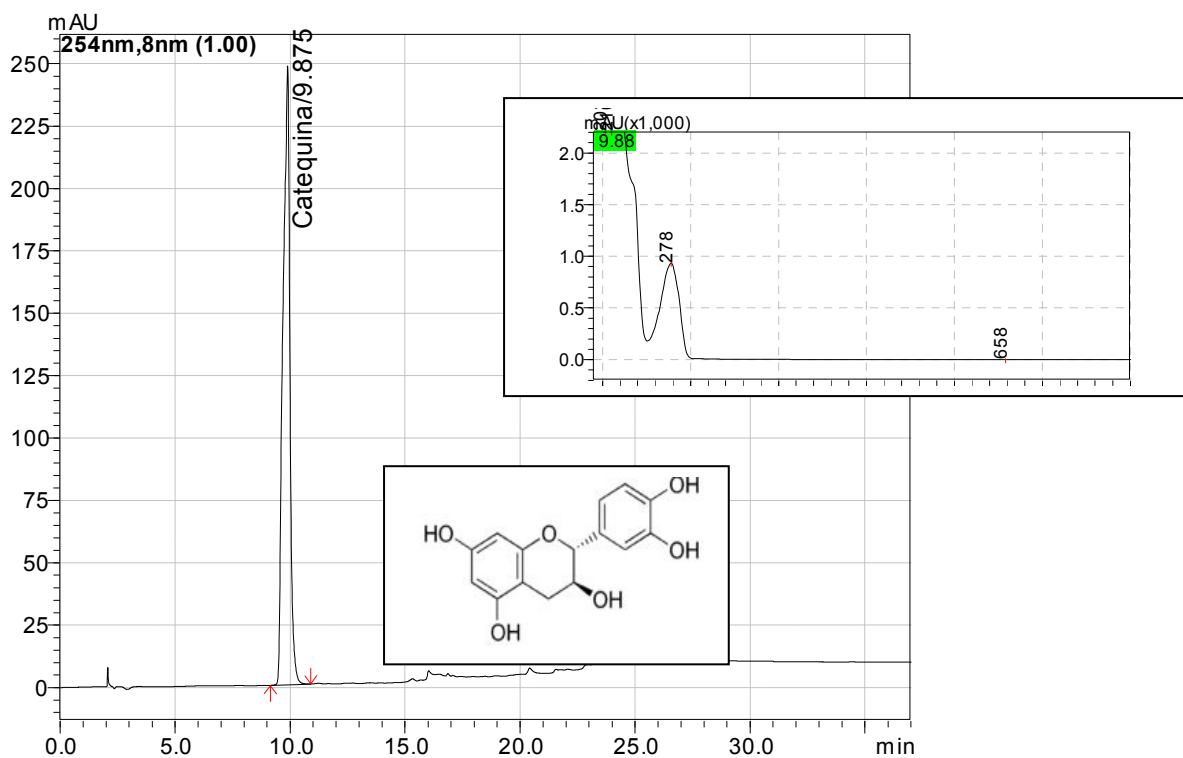


Figura 18 - Estrutura química de Catequina; cromatograma e espectro UV do padrão de Catequina (Sigma) obtidos por HPLC-DAD.

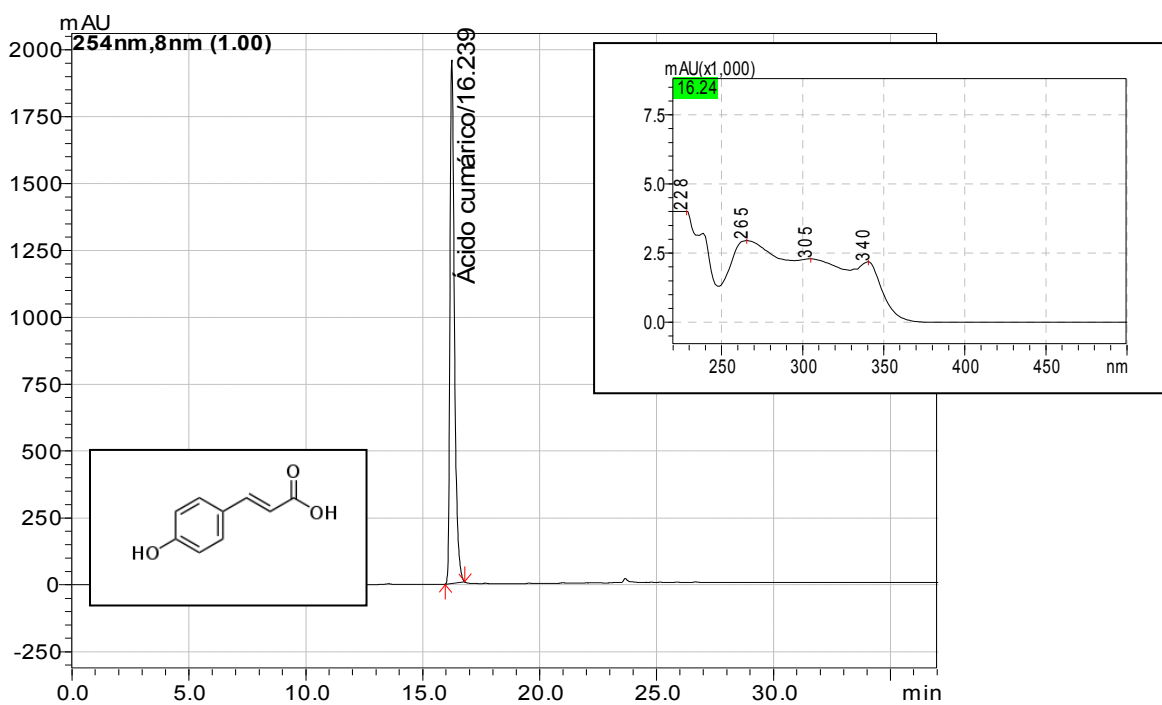


Figura 19 - Estrutura química de Ácido cumárico; cromatograma e espectro UV do padrão de Ácido cumárico (Sigma) obtidos por HPLC-DAD.

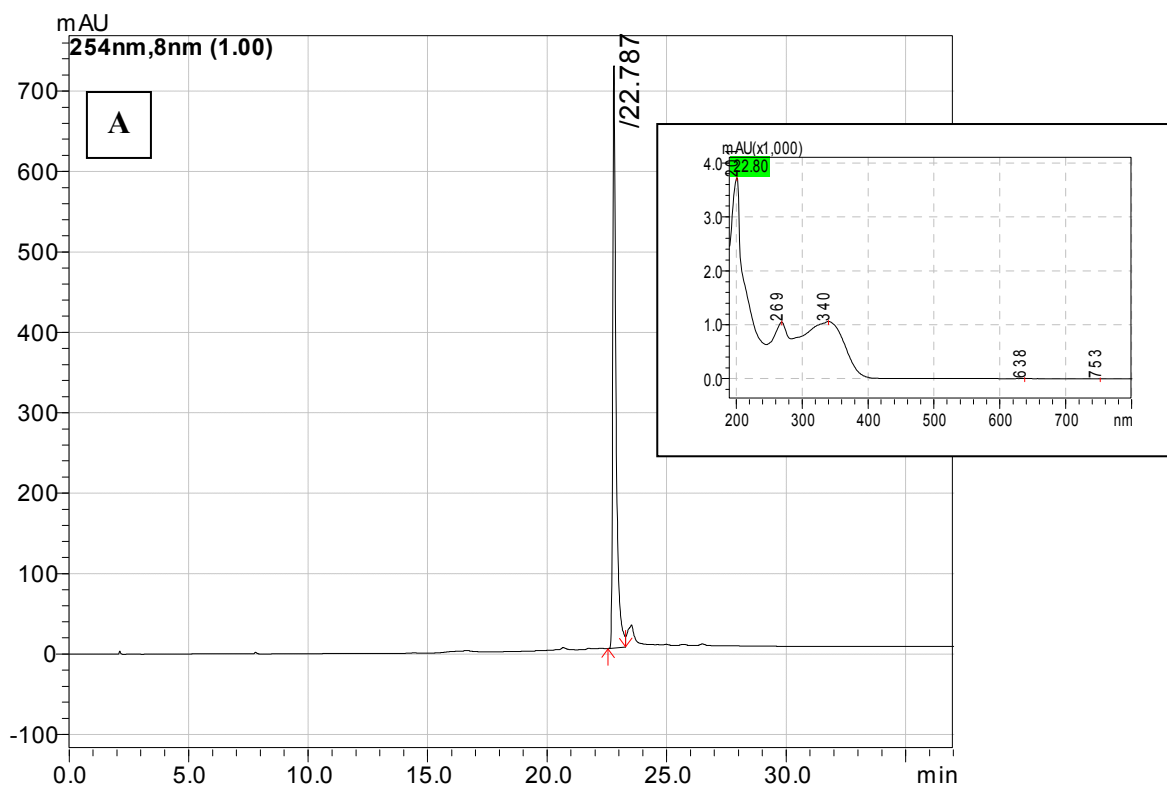


Figura 20 - Cromatograma do precipitado obtido da CI F18 (A) por HPLC-DAD e espectro UV do pico obtido.

O precipitado da CI F18 apresentou-se como um único pico cromatográfico no tempo de 22,7 minutos, sendo o tempo de injeção diferente de todos os padrões injetados. Não foi possível identificação da substância já que a quantidade isolada foi suficiente apenas para realizar o perfil cromatográfico.

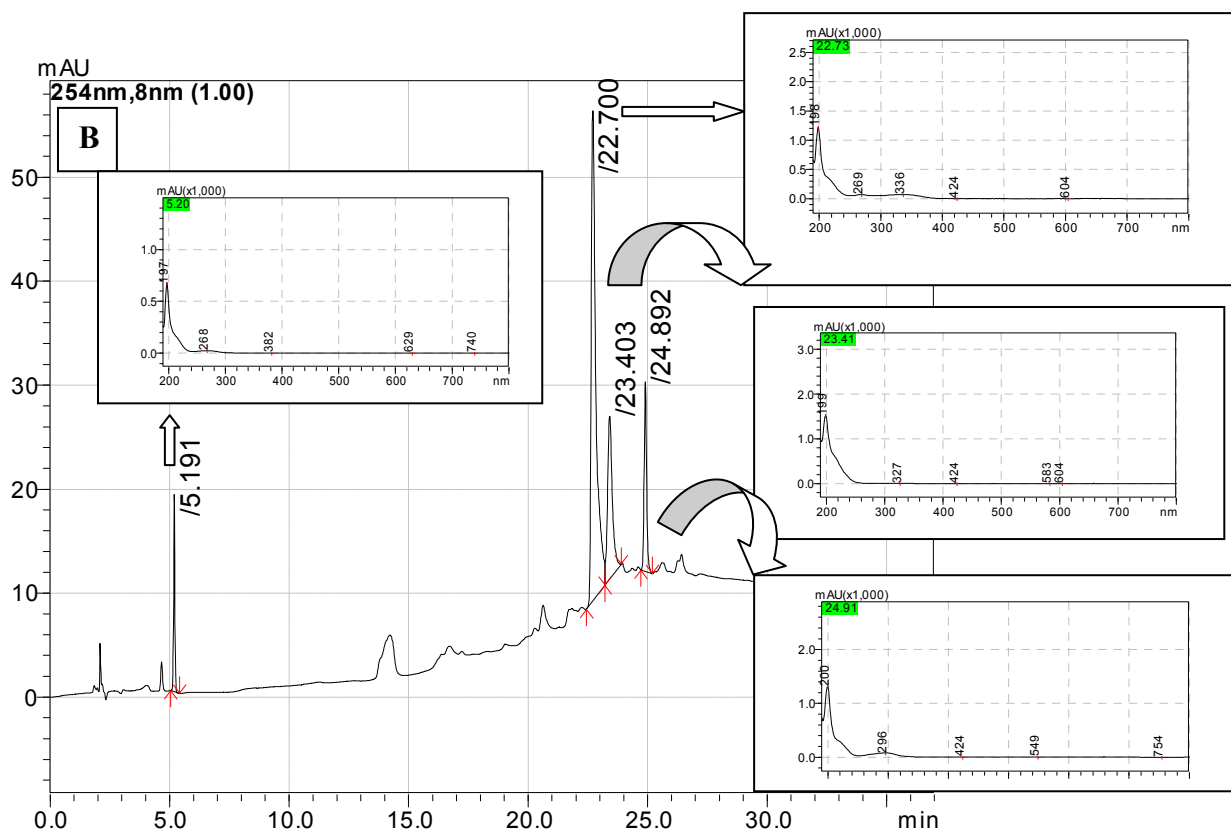


Figura 21 - Perfil cromatográfico do precipitado obtido da CI F31-38 (B) por HPLC-DAD.

O precipitado da CI F31-38 apesar de apresentar somente uma mancha cromatográfica na CCD eluido com diferentes eluentes, apresentou vários picos na análise HPLC-DAD, não apresentando a pureza esperada.

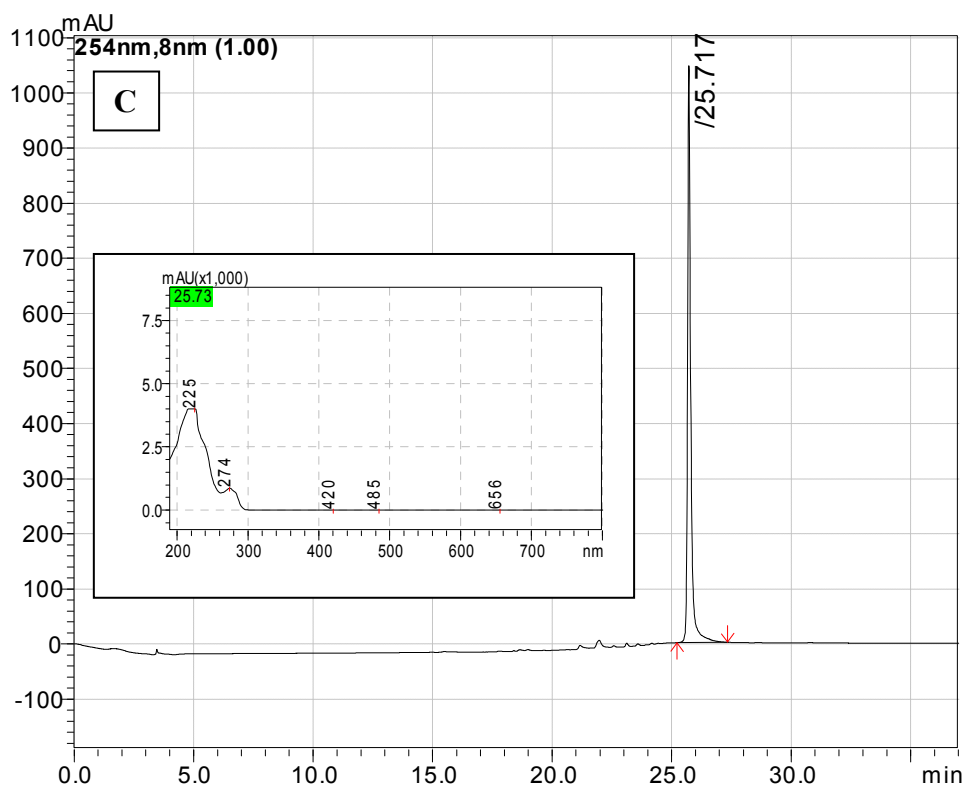


Figura 22 - Cromatograma do precipitado obtido da CI F39-44 (C) por HPLC-DAD

O precipitado da CI F39-44 apresentou-se como um único pico cromatográfico no tempo de 25,7 minutos, sendo o tempo de injeção diferente de todos os padrões injetados. Não foi possível identificação da substância já que a quantidade isolada foi suficiente apenas para realizar o perfil cromatográfico.

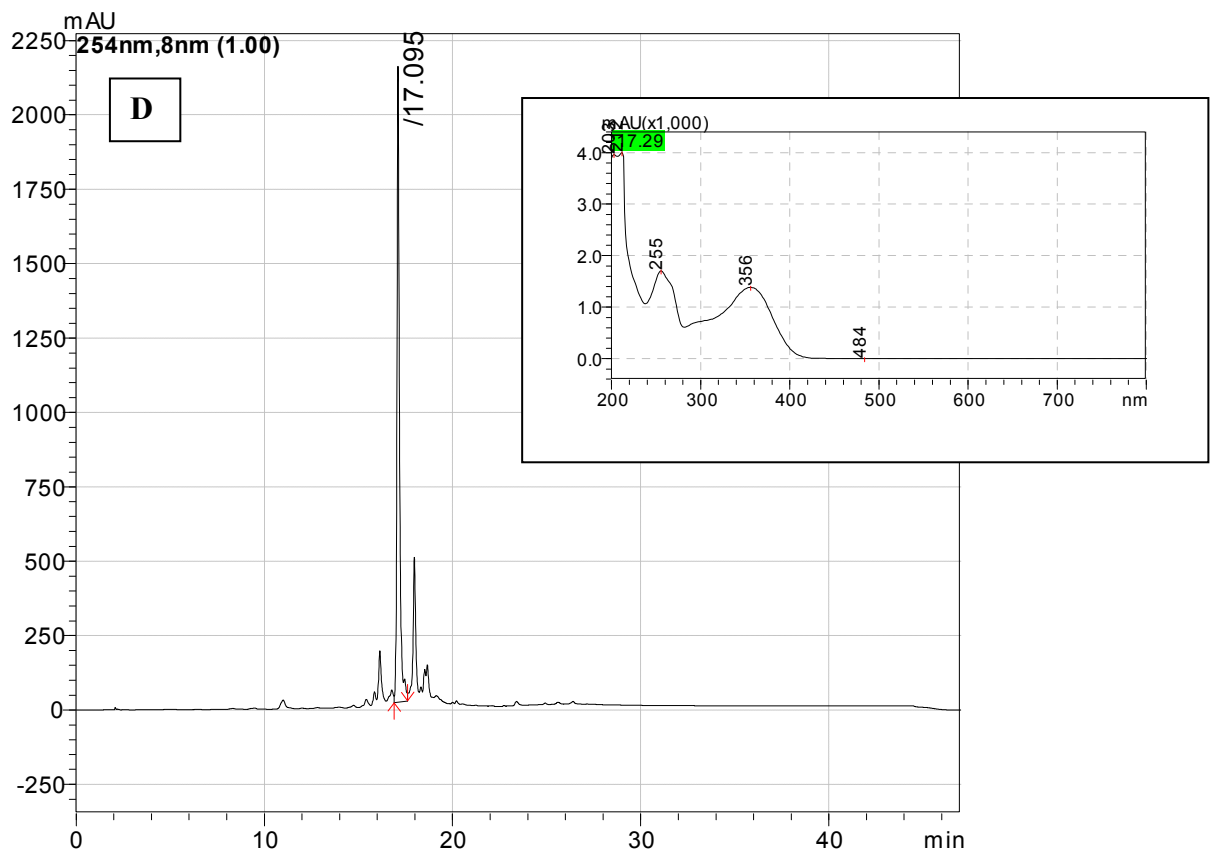


Figura 23 - Perfil cromatográfico da CD F17-33 (D) por HPLC-DAD e espectro UV do pico majoritário.

O pico majoritário da CD F17-33 apresentou o mesmo tempo de retenção do padrão Rutina. Devido a essa característica o espectro UV da substância foi analisado e comparado ao do padrão de Rutina. O espectro do composto majoritário de CD F 17-33 apresentou máximos de absorção em 255nm e 356 nm. Esses dados sugerem tratar-se de um flavonoide, sendo os valores compatíveis com os descritos para flavonas e flavonóis. Flavonoides possuem dois sistemas de conjugação distintos, denominados de Banda I (300 a 380 nm) e Banda II (240 a 280 nm) (MARBY et al., 1970; MARKHAM; MARBY, 1975). O espectro UV do pico majoritário da CD F17-33 apresentou valores compatíveis com a Rutina, conforme demonstrado na FIGURA 24. A partir dessas análises efetuadas da comparação do tempo de retenção e espectro UV, propõe-se que o composto majoritário seja a Rutina.

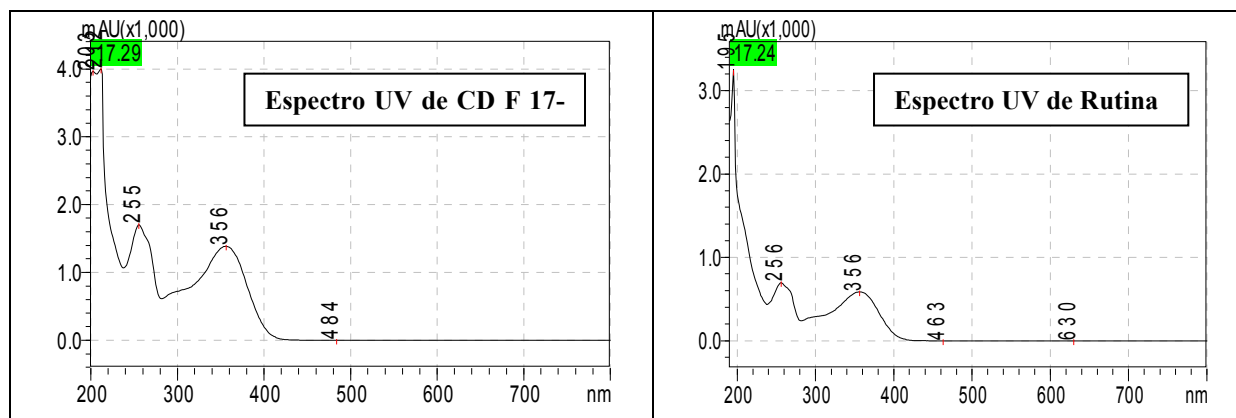


Figura 24 - Espectro UV da CD F17-33 e da Rutina

Através da co-injeção da amostra CD F17-33 com o padrão Rutina pode-se reforçar a suposição de que o pico majoritário presente na amostra seja a Rutina. A área obtida do pico majoritário foi de 17073654 (CD F17-33) e 49306440 (CD F17-33+Rutina), como demonstrados na FIGURA 25.

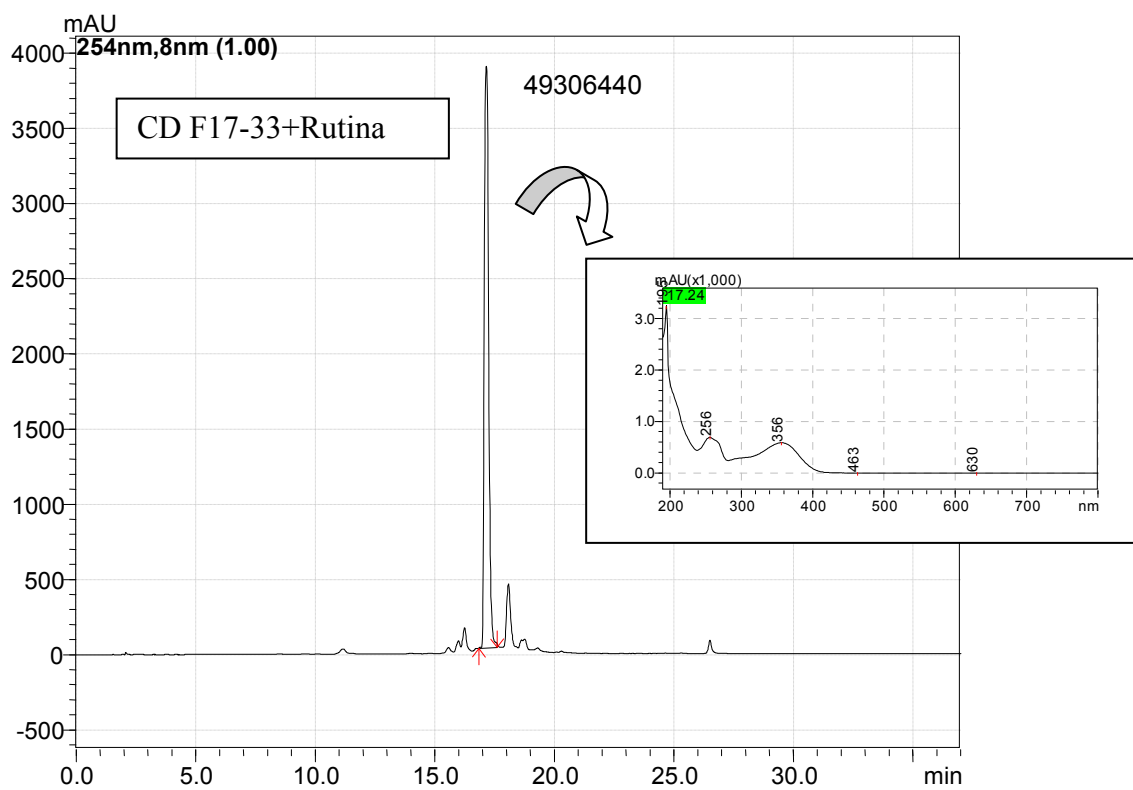
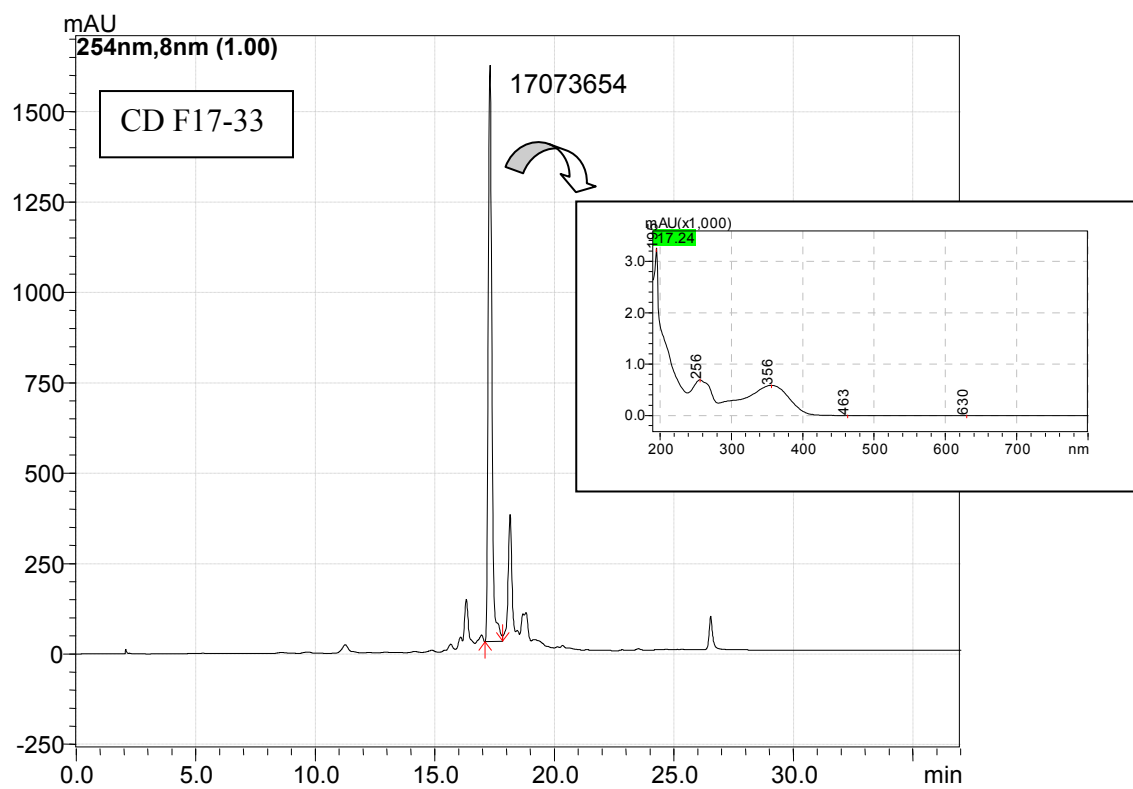


Figura 25 - Cromatograma da co-injeção da amostra CD F17-33 com o padrão Rutina

6.2.2 Determinação estrutural da CD F17-33

A CD F17-33 foi obtida da FAcCp a partir de vários fracionamentos em coluna aberta de sílica e Sephadex. A Fração 17-33 obtida da coluna D foi eluída na proporção Acetato de etila: Metanol (90:10).

A análise do espectro de absorção no infravermelho de CD F17-33 (FIGURA 26) confirmou a natureza aromática da substância, evidenciada pela presença de bandas de absorção no intervalo de 1603 a 1443 cm^{-1} , características do estiramento C=C de aromático, bem como de bandas atribuídas à deformação angular no plano e fora do plano de C-H aromático, observadas respectivamente na região de 1060 cm^{-1} e no intervalo de 934 e 799 cm^{-1} . A banda em 1.651 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento de carbonila com sistema α,β -insaturado cíclico. A banda larga centrada em 3216 cm^{-1} foi atribuída às vibrações de estiramento O-H de hidroxila. O caráter fenólico de CD F17-33 foi evidenciado pelo aparecimento de bandas no intervalo de 1198 a 1169 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento C-O de carbono aromático. (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; PAVIA et al, 2011).

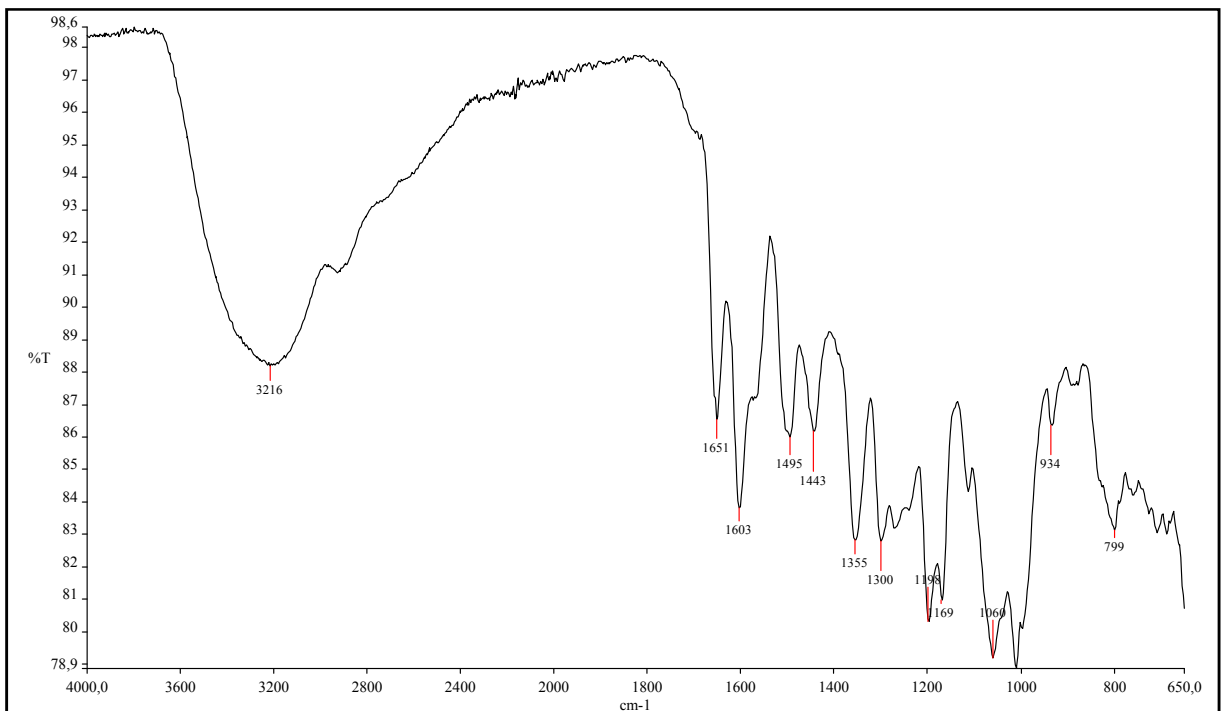


Figura 26 - Espectro de infravermelho para a CD 17-33 (KBr, cm^{-1}).

A análise do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) obtido para CD F17-33 (TABELA 5) revelou a presença de quatro dupletos e de um dupletos duplo na região de deslocamentos químicos característicos de hidrogênios aromáticos (δ 6,0 a 8,0 ppm). Os dois

dupletos, centrados em δ 6,22 e 6,41 ppm, apresentaram valor de J característico de acoplamento *meta* ($J = 1,9$ Hz) e foram atribuídos a H-6 e H-8, respectivamente. Os sinais correspondentes aos dupletos em δ 6,89 ppm ($J = 8,5$ Hz) e δ 7,74 ppm ($J = 2,0$ Hz) e ao duplete duplo em δ 7,61 ppm com constantes de $J_{(H6'-H2')} = 2,0$ Hz; $J_{(H6'-H5')} = 8,5$ Hz foram atribuídos aos hidrogênios H5', H2' e H6' respectivamente.

O espectro de RMN de ^1H de CD F17-33 apresentou intensa sobreposição de sinais na região de δ 3,3 a 3,9 ppm, não sendo possível realizar sua atribuição. Essa região é característica de sinais de hidrogênio de carbonos oximetínico, sugerindo a presença de cadeia heterosídica.

O duplete em δ 5,27 ppm foi atribuído a hidrogênio anomérico de glicose (H1''), na posição axial, em função do valor de J característico de acoplamento trans-diaxial ($J_{ax,ax} = 7,6$ Hz), caracterizando ligação β -D-glicosídica. O duplete em δ 1,31 ppm ($J = 6,9$ Hz indica presença de ramnose em CD F17-33, sendo atribuído a H6''' (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; PAVIA et al., 2011; NIASSY et al., 2004; MOURA; VILEGAS; SANTOS, 2011).

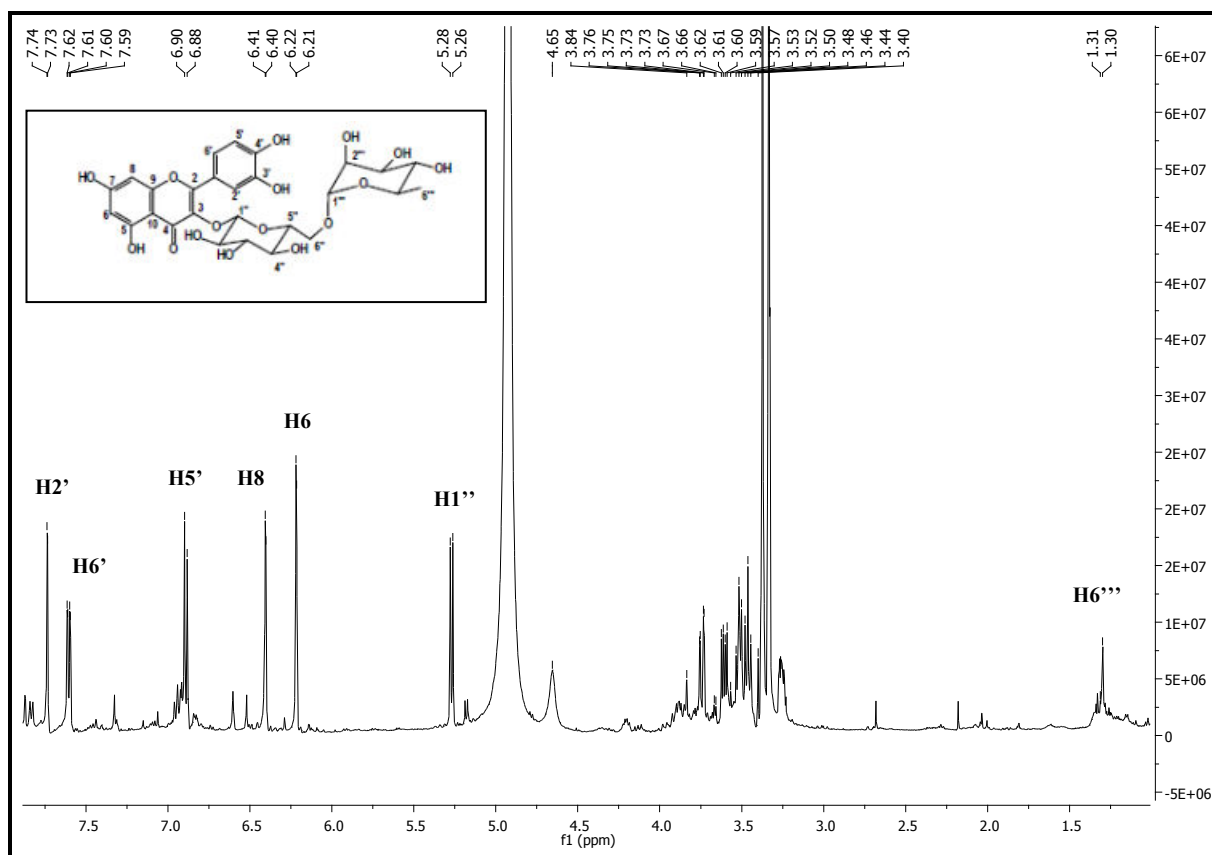


Figura 27 - Espectro RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de CD 17-33.

Tabela 5 - Atribuição do espectro de RMN ^1H para CD F17-33.

Atribuição	CD F17-33 (δppm) mult, J (Hz)	Rutina (δppm), mult, J (Hz)
H1''	5,27 (d) $J=7,6$ (1'', 2'')	5,34 (d) $J=7,1$ (1'', 2'')
H1'''		4,38 (d) $J=1,1$ (1''', 2''')
H2'	7,74 (d) $J=2,0$ (2', 6')	7,52 (d) $J=1,9$ (2', 6')
H5'	6,89 (d) $J=8,5$ (5', 6')	6,83 (d) $J=9,0$ (5', 6')
H6	6,22 (d) $J=1,9$ (6, 8)	6,19 (d) $J=1,9$ (6, 8)
H6''	7,61 (dd) $J=8,5$ (6', 5') $J=2,0$ (6', 2')	7,53 (dd) $J=9,0$ (6', 5') $J=2,2$ (6', 2')
H6'''	1,31 (d) $J=6,9$ (6''', 5''')	0,98 (d) na
H8	6,41 (d) $J=1,9$ (8, 6)	6,38 (d) $J=1,9$ (6, 8)
H açúcares	3,4 a 3,9 (m)	3,2 a 3,7

Legenda: CD F17-33= dados obtidos no presente trabalho (500 MHz, CD_3OD). Rutina= dados relatados por Niassy et al. (2004) (200 MHz, CD_3OD) **d**: duplete. **dd**: duplete duplo. **m**: multiplete. **J**: constante de acoplamento escalar, unidade Hertz. na: não atribuído

O espectro de RMN de ^{13}C – DEPT (125 MHz, CD_3OD) de CD F 17-33 (TABELA 6) apresentou sinal em δ 61,12 ppm que foi atribuído ao carbono metilênico C-6'', e outros quatorze sinais de carbonos metínicos e dez sinais referentes a carbonos não hidrogenados. A presença do sinal em δ 61,12 ppm confirma a presença de glicose na cadeia heterosídica de CD F 17-33. Observou-se, também, sinal em δ 178,07 ppm referente à carbonila C-4. O sinal em δ 102,91 ppm foi atribuído aos carbonos anoméricos da ramnose (C1''') e da glicose (C1''). Os carbonos aromáticos também foram atribuídos através da análise do espectro RMN de ^{13}C – DEPT, incluindo C8 (δ 93,33 ppm), C6 (δ 98,51 ppm), C5' (δ 116,16 ppm), C2' (δ 114,72 ppm) e C6' (δ 121,64 ppm). Os sinais em: C3 (δ 134,22 ppm), C5 (δ 161,61 ppm), C7 (δ 164,61 ppm), C9 (δ 157,61 ppm), C10 (δ 104,28 ppm), C1' (δ 121,83 ppm), C3' (δ 148,46 ppm) e C4' (δ 144,50 ppm) foram atribuídos a carbonos não hidrogenados. (NIASSY et al., 2004; MOURA; VILEGAS; SANTOS, 2011).

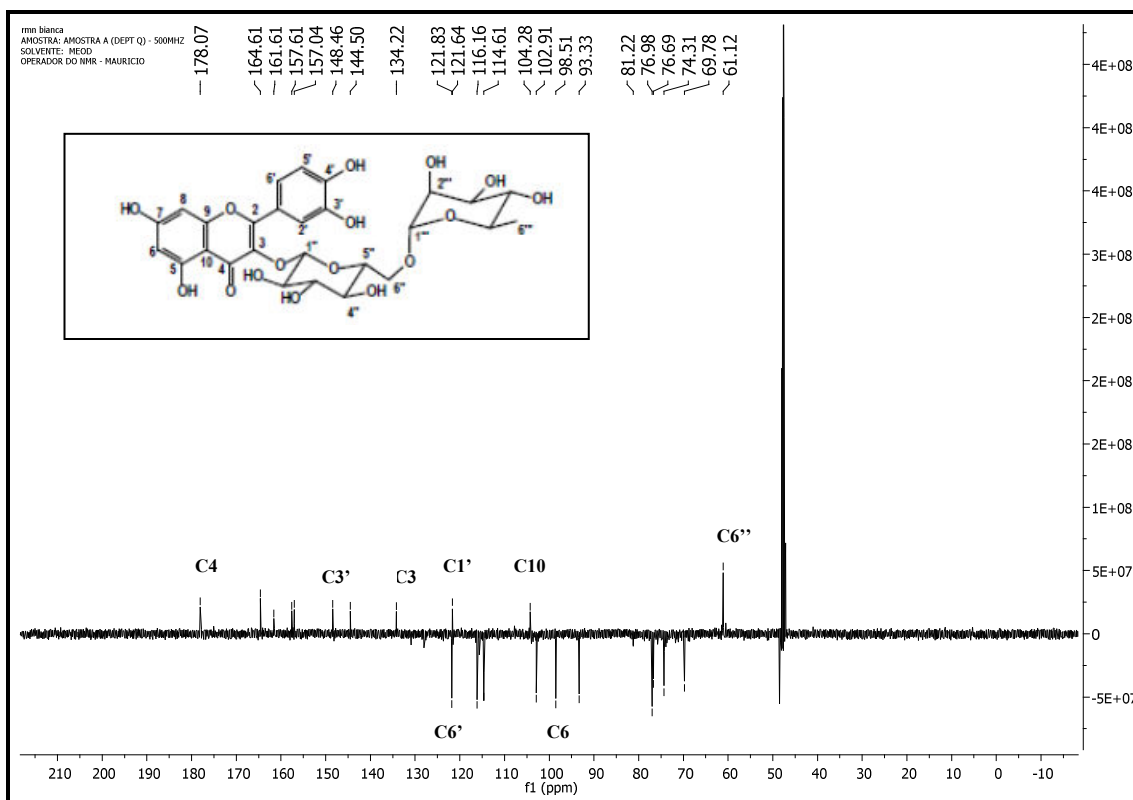


Figura 28 - Espectro RMN de ^{13}C – DEPT (125 MHz, CD_3OD) do composto CD 17-33.

Tabela 6 - Atribuição do espectro de ^{13}C (DEPT) para CD F17-33.

Atribuição	CD F17-33 (δ ppm)	Rutina (δ ppm)
2	157,04 (C)	156,7 (C)
3	134,22 (C)	133,4 (C)
4	178,07 (C)	177,4 (C)
5	161,61(C)	161,3 (C)
6	98,51 (CH)	98,7 (CH)
7	164,61 (C)	164,1 (C)
8	93,33 (CH)	93,7 (CH)
9	157,61 (C)	156,5 (C)
10	104,28 (C)	104,0 (C)
1'	121,83 (C)	121,3 (C)
2'	114,61 (CH)	116,4 (CH)
3'	148,46 (C)	144,8 (C)
4'	144,5 (C)	148,4 (C)
5'	116,16 (CH)	115,2 (CH)
6'	121,64 (CH)	121,7 (CH)
1''	102,91 (CH)	102,0 (CH)
2''	76,98 (CH)	74,9 (CH)
3''	76,69 (CH)	77,4 (CH)
4''	74,31 (CH)	70,5 (CH)
5''	Não observado (CH)	76,0 (CH)
6''	61,12 (CH ₂)	69,3(CH ₂)
1'''	102,91 (CH)	101,6(CH)
2'''	76,98 (CH)	70,7 (CH)
3'''	76,69 (CH)	70,5 (CH)
4'''	81,22 (CH)	71,9 (CH)
5'''	69,78 (CH)	68,4 (CH)
6'''	Não observado (CH ₃)	17,3 (CH ₃)

Legenda: CD F17-33 = dados obtidos no presente trabalho (125 MHz, CD₃OD). Rutina = dados relatados por Niassy et al. (2004) (50 MHz, CD₃OD).

A análise dos dados espectrais de RMN de ^1H e de ^{13}C obtidos para CD F17-33 e a comparação com valores relatados na literatura (NIASSY et al., 2004; MOURA et al., 2011) possibilitaram elucidar a estrutura de CD F17-33 como sendo a rutina (FIGURA 29) [quercetina-3-*O*-(6-*O*- α -L-ramnopiranosil)- β -D-glicopiranosídeo].

Foi anteriormente descrita para o gênero *Caesalpinia*, a presença de rutina na espécie *Caesalpinia pyramidalis* (SANTANA et al., 2012). Entretanto, a ocorrência deste flavonoide é relatada pela primeira vez na espécie *Caesalpinia peltophoroides*.

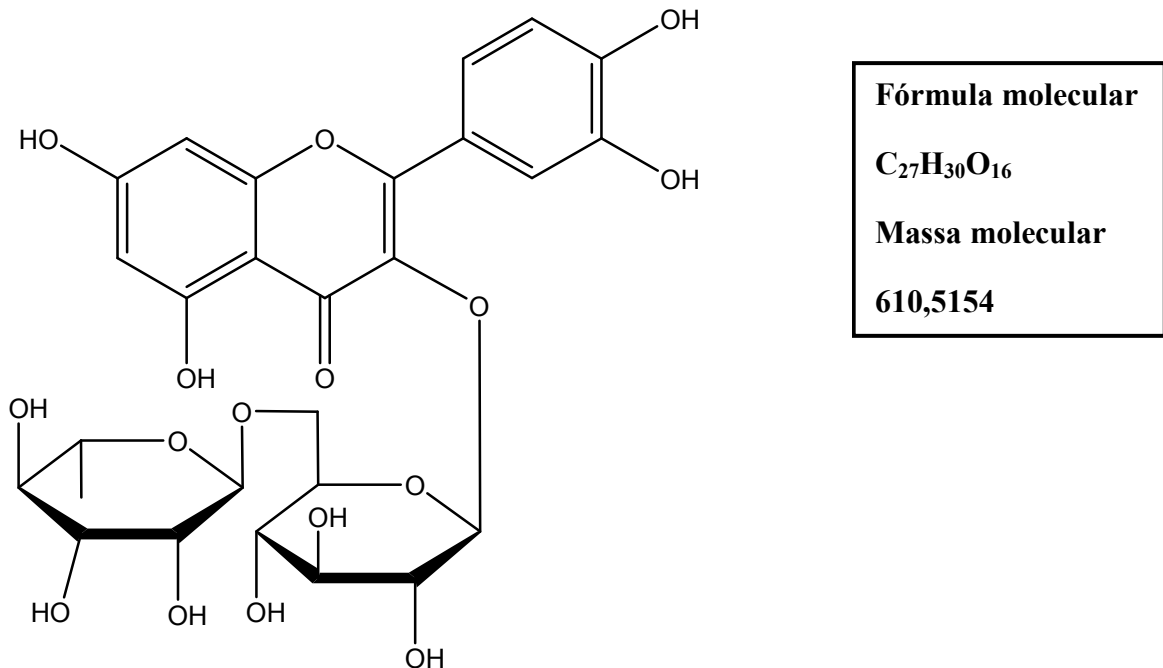


Figura 29 - quercetina-3-O-(6-O- α -L-ramnopiranosil)- β -D-glicopiranosídeo

6.2.3 Análise do Teor da CD F17-33 presente nos extratos

Este ensaio consistiu em determinar o teor de Rutina (CD F17-33) presente nos extratos (EECp, FAcCp e FAqCp).

A rutina é um bioflavonoide pertencentes ao sub-grupo dos flavonóis. Têm uma ação terapêutica em patologias que envolvem radicais livres e não são tóxicos.

O teor de rutina nos extratos foi determinado empregando o método de calibração externa, sendo que a área sob os picos cromatográficos dos padrões foi calculada e os valores obtidos interpolados em função da concentração usando regressão linear. O valor de rutina no extrato foi expresso em porcentagem.

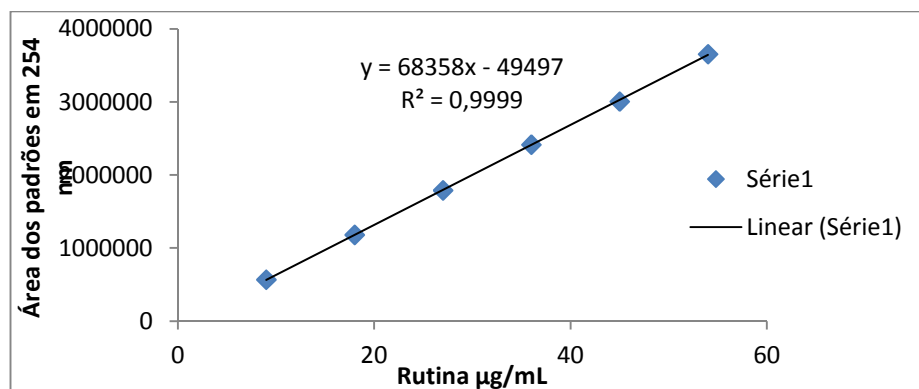


Figura 30 - Curva analítica obtida pelo método de calibração externa a partir de injeções em triplicata das soluções padrões de rutina.

Tabela 7 - Teor de Rutina expresso em porcentagem presente nos extratos, sendo o coeficiente de correlação obtido na curva de calibração de 0,9999.

Extrato	Teor de rutina (%)
EECp	1,27
FAcCp	3,63
FAqCp	0,95

6.3 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FLORES

O óleo essencial das flores de *Caesalpinia peltophoroides* foi obtido através do método de extração por arraste a vapor, utilizando o aparato Clevenger.

O óleo foi analisado por GC-MS e a identificação dos compostos individuais foi determinada com base na análise e comparação de seus espectros com a biblioteca espectral do NIST08 (NIST/EPA/NIH), bem como pela comparação dos índices de retenção com a literatura. Os valores de índice de retenção de Kováts foram calculados baseando-se na injeção de uma mistura de *n*-alcanos nas mesmas condições de análise descritas (ADAMS, 2009).

Quimicamente, o óleo essencial mostrou ser composto de 27 derivados, correspondendo a 79.27% do total de compostos voláteis identificados (TABELA 8). Os maiores constituintes são álcoois de cadeias longa *n*-dodecanol (14.17%) e *n*-tetradecanol (19.27%) bem como metil ésteres derivados dos ácidos tetradecanóico (7.41%) e hexadecanóico (12.71%). As maiores classes de compostos são álcoois (39.09%), hidrocarbonos e ésteres (30.42%) seguido pelos sesquiterpenos oxigenados (5.28%).

Tabela 8 - Composição química do óleo essencial de flores de *Caesalpinia peltophoroides*.

Composto	Índice Kováts	Área %
n-nonanal	1100	0.31
n-dodecanol	1470	14.17
diethylftalato	1590	3.23
n-hexadecano	1600	0.34
α -cadinol	1654	0.25
6z-pentadecen-2-ona	1668	0.26
n-tetradecanol	1672	19.27
germacrone	1693	0.78
n-heptadecano	1700	0.38
amorfa-4,9-dien-14-ol	1704	0.32
metil tetradecanoato	1723	7.41
benzil benzoato	1760	0.57
2,7(14)-Bisaboladien-12-ol	1761	0.93
α - costol	1774	1.44
n-pentadecanol	1774	5.65
criptomeridiol	1813	1.68
metil hexadecanoato	1921	12.71
1-eicosene	1987	0.58
n-eicosano	2000	0.22
brasilato de etileno	2010	1.28
n-heneicosano	2100	0.22
nezukol	2133	1.72
1-docosene	2189	4.46
n-docosano	2200	0.27
n-tricosano	2300	0.19
n-tetracosano	2400	0.20
n-pentacosano	2500	0.43
<i>Sesquiterpenos oxigenados</i>		5.28
<i>Diterpenes oxigenados</i>		1.72
<i>Hidrocarbonos e ésters</i>		30.42
<i>Álcoois</i>		39.09
<i>Outros compostos</i>		2.76
TOTAL		79.27

6.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANALGÉSICA

6.4.1 Teste de von Frey eletrônico

No teste de retirada de pata a hipernocicepção é induzida pela injeção intraplantar de carragenina e os efeitos antinociceptivos das substâncias testadas são medidos por um analgesímetro eletrônico, que quantifica a intensidade da dor inflamatória *in vivo*. Este teste consiste em aplicar uma força no centro da pata traseira do animal com uma ponteira em polipropileno adaptada ao transdutor de força manual até provocar um reflexo de flexão dessa pata (CUNHA et al., 2004).

Para induzir a dor inflamatória foi utilizada a injeção intraplantar de solução de carragenina (100 µg/pata). A carragenina é um polissacarídeo extraído de algas marinhas (*Chondrus crispus*), e quando administrada na pata do animal produz uma reação inflamatória aguda (VINEGAR et al., 1987). A utilização de carragenina não acarreta efeitos sistêmicos e apresenta elevado grau de reprodutibilidade (SLUKA; WALSH, 2003). A carragenina provoca um aumento da sensibilidade frente a um estímulo mecânico indolor (hiperalgesia) ou doloroso térmico (NANTEL et al., 1999). A resposta inflamatória da carragenina é descrita como bifásica, sendo a fase inicial aos 20 minutos, sem alterações celulares perceptíveis histologicamente, com edema resultante da liberação de serotonina e prostaglandinas no meio; a seguir ocorre uma resposta fagocitária intensa, que caracteriza a segunda fase (VINEGAR et al., 1987). Um estudo mais recente demonstrou que a carragenina pode apresentar uma resposta dose dependente com hiperalgesia máxima em 3 horas após a sua injeção (FRANCISCHI et al., 2002).

Após a injeção da carragenina os animais foram submetidos ao estímulo com o analgesímetro 30, 60 e 180 min e o resultado foi registrado como sendo a diferença da força necessária para retirada da pata antes do estímulo nociceptivo subtraída pela força aplicada pós-carragenina, em gramas. Desta forma tanto o EECp como as frações apresentaram atividade antinociceptiva. Na FIGURA 31 está representado o resultado para EECp. Observa-se uma diminuição significativa no limiar da retirada da pata, proporcional à dose, quando em contato com o analgesímetro após três horas da injeção da carragenina nas três doses 30-300 mg/kg de EECp, assim também como para o grupo que recebeu tratamento com indometacina 10 mg/kg. O EECp na dose de 300 mg/kg chegou a inibir 61% o limiar da retirada da pata aos 180 minutos após a injeção de carragenina em relação ao grupo controle ($p < 0.001$).

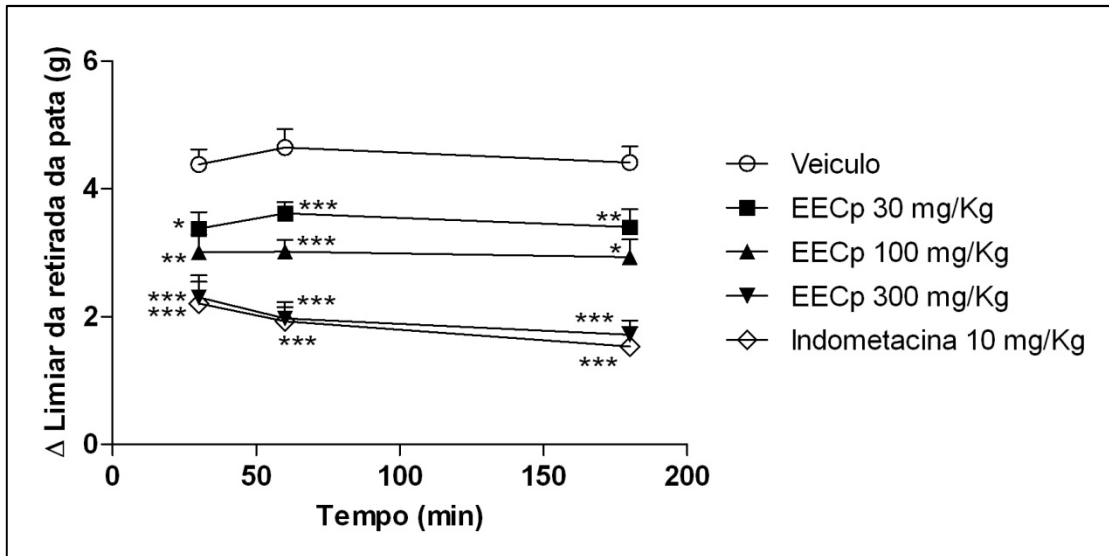


Figura 31 - Efeito da administração de veículo, EECp ou indometacina no teste de hipernocicepção induzida pela injeção intraplantar de carragenina (100 µg/pata) em camudongos. Cada ponto representa a média \pm S.E.M. de sete animais por grupo. Os asteriscos denotam níveis de significância quando comparados com o grupo veículo: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

As frações, da mesma forma que o extrato etanólico bruto (EECp), apresentaram atividade. A fração acetato de etila (FAcCp) apresentou maior atividade na dose de 100 mg/Kg chegando a inibir o limiar de retirada da pata em 56% aos 60 min após a injeção de carragenina em relação ao grupo controle ($p < 0.01$, FIGURA 32). A fração aquosa (FAqCp) também se mostrou ativa, diminuindo significativamente o limiar de retirada da pata, chegando a inibir o limiar de retirada da pata em 61% aos 180 min na dose de 100 mg/Kg após a injeção de carragenina em relação ao grupo controle ($p < 0.001$, FIGURA 33).

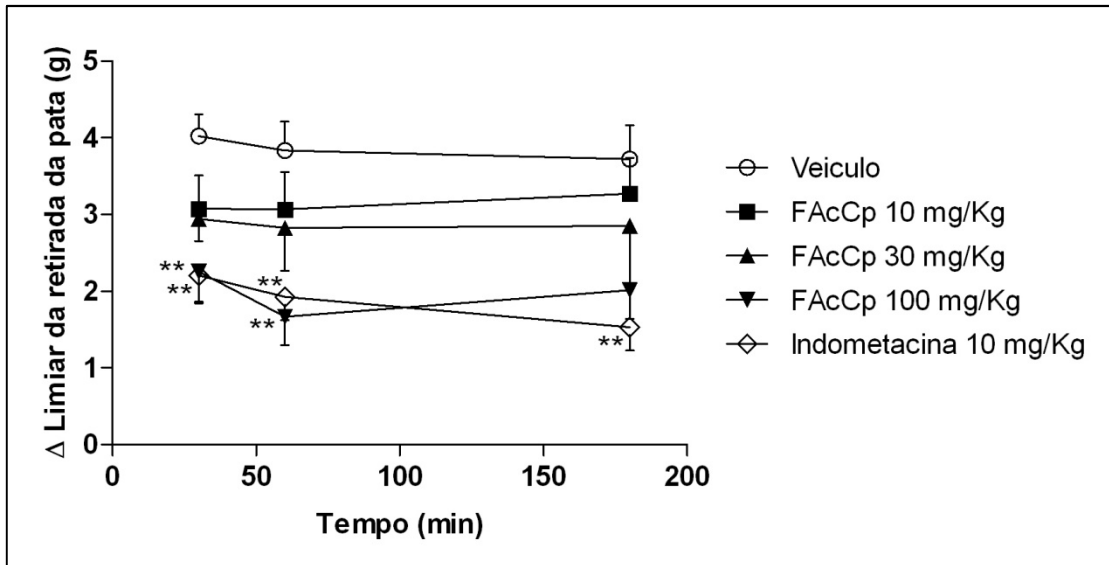


Figura 32 - Efeito da administração de veículo, FAcCp ou indometacina no teste de hipernocicepção induzida pela injeção intraplantar de carragenina (100 µg/pata) em camudongos. Cada ponto representa a média ± S.E.M. de sete animais por grupo. Os asteriscos denotam níveis de significância quando comparados com o grupo veículo: ** $p < 0.01$.

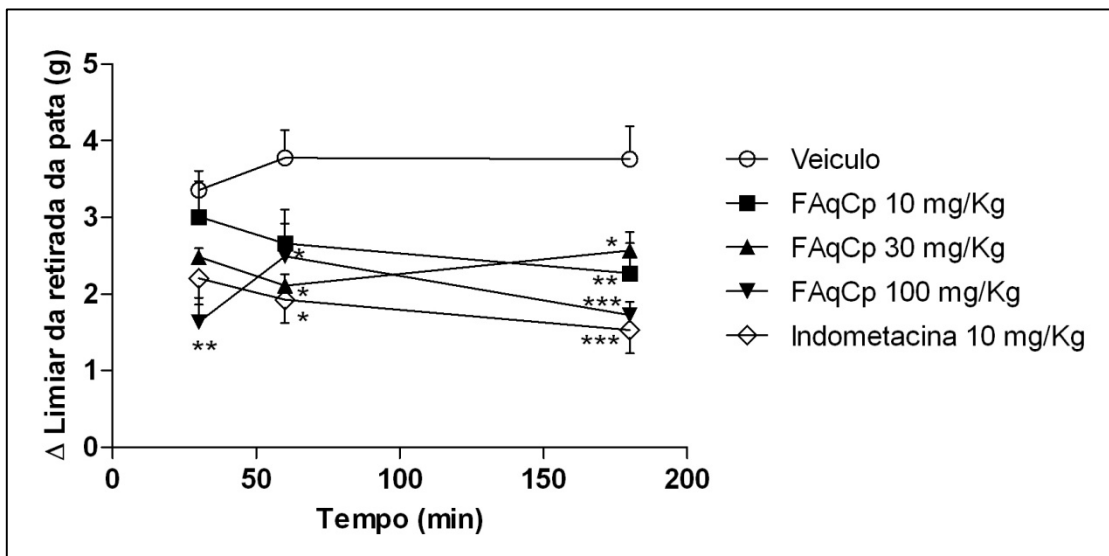


Figura 33 - Efeito da administração de veículo, FAqCp ou indometacina no teste de hipernocicepção induzida pela injeção intraplantar de carragenina (100 µg/pata) em camudongos. Cada ponto representa a média ± S.E.M. de sete animais por grupo. Os asteriscos denotam níveis de significância quando comparados com o grupo veículo: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

6.4.2 Ensaio de inibição do edema da pata induzido por carragenina

A inflamação é um mecanismo natural de defesa contra qualquer agressão. É caracterizada por reação de diversos vasos sanguíneos, acumulando fluidos e apresentando leucócitos hábeis na diluição e isolamento de agentes lesivos (RANG et al., 2007). No estudo de edema de pata de camundongos utilizou-se, como agente inflamatório, carragenina. A resposta edematogênica é um dos sinais do processo inflamatório decorrente do aumento da permeabilidade vascular, que ocorre na microcirculação, devido à ação dos mediadores liberados (RANG; DALE; RITTER, 2007).

A injeção subcutânea de carragenina aplicada na pata dos animais induz um aumento agudo e progressivo do volume da pata. Este é um parâmetro útil na avaliação anti-inflamatória de novos compostos já que o edema provocado é proporcional à inflamação. O edema resulta da ação de vários mediadores inflamatórios. A partir da terceira hora é mantido principalmente pela ação das prostaglandinas (DI ROSA; WILLOUGHBY, 1971; WILLIAMS, 1979).

Os tratamentos com as substâncias (uma hora antes da aplicação do estímulo edematogênico - carragenina) inibiram o edema na terceira hora, sugerindo um mecanismo de ação baseado no envolvimento de metabólitos do ácido araquidônico (CARVALHO, 2004). Diante dessas observações, pode-se supor que estas substâncias foram capazes de inibir a síntese de prostaglandinas, indicando assim a presença de constituintes com ação anti-edematogênica.

O teste do edema de pata de rato induzido por carragenina para EECp apresentou resultados significativos pela comparação entre grupo controle e o grupo tratado com o extrato bruto na dose de 300mg/kg que produziu uma inibição no pico máximo do edema (3h) de 83% ($p < 0.001$), em relação ao grupo controle. Contudo, o extrato nas doses de 30 e 100 mg/kg não foi significativo. Entretanto, indometacina (10 mg/kg) produziu uma inibição do edema de 59% na terceira hora ($p < 0.01$).

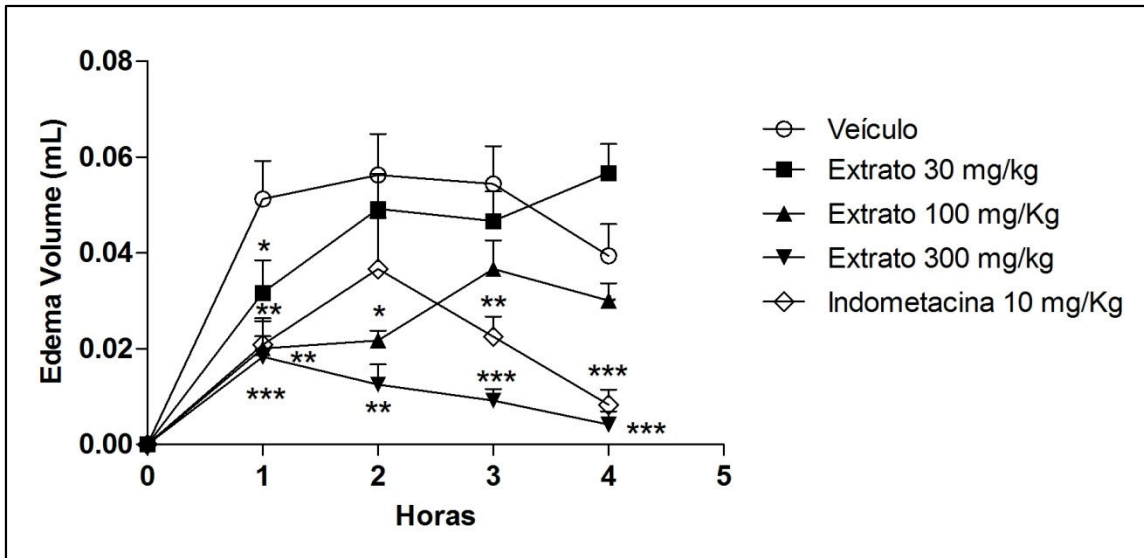


Figura 34 - Efeito da administração de veículo, EECp ou indometacina no teste de edema de pata induzido por carragenina (800 μ g/pata) em camundongos. Cada ponto representa a média \pm S.E.M. de sete animais por grupo. Os asteriscos denotam níveis de significância quando comparados com o grupo veículo: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

A FIGURA 35 representa o resultado do edema induzido por carragenina. Nele, a fração acetato nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg não foram capazes de inibir o processo inflamatório. A indometacina (controle positivo) foi capaz de inibir o processo inflamatório em 63 % na terceira hora ($p < 0.01$).

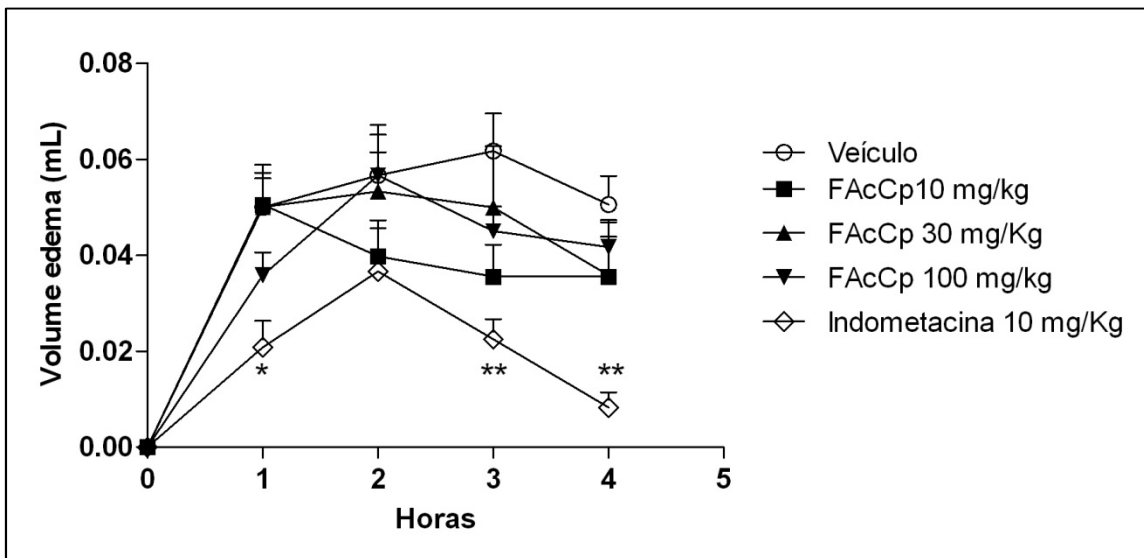


Figura 35 - Efeito da administração de veículo, FAcCp ou indometacina no teste de edema de pata induzido por carragenina (800 μ g/pata) em camundongos. Cada ponto representa a média \pm S.E.M. de sete animais por grupo. Os asteriscos denotam níveis de significância quando comparados com o grupo veículo: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

A FIGURA 36 mostra o edema de pata induzido por carragenina. A fração aquosa nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg foram capazes de inibir o processo inflamatório na terceira hora em 46, 36 e 36%, respectivamente ($p < 0.01$) em relação ao grupo controle (CMC 0,5%pv). O controle positivo (indometacina, 10 mg/kg) apresentou redução significativa em 66 % ($p < 0.001$) nesta mesma hora, mantendo-se distinto também nas primeira e quarta horas do experimento.

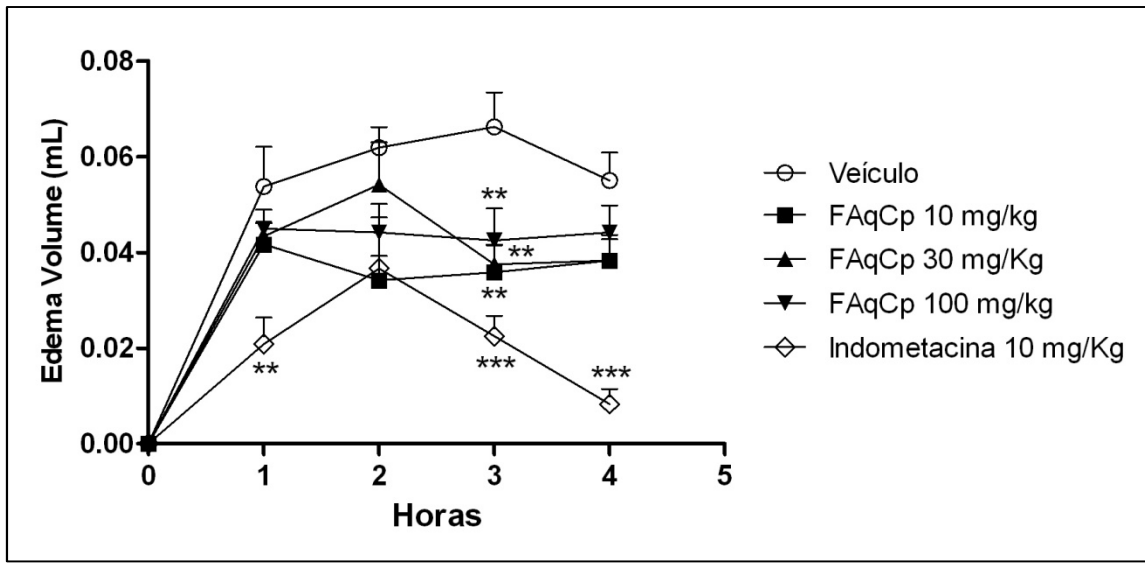


Figura 36 - Efeito da administração de veículo, FAqCp ou indometacina no teste de edema de pata induzido por carragenina (800 μ g/pata) em camundongos. Cada ponto representa a média \pm S.E.M. de sete animais por grupo. Os asteriscos denotam níveis de significância quando comparados com o grupo veículo: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Em ambos os testes, edema de pata induzido por carragenina e teste da retirada da pata, o EECp e FAqCp apresentaram atividade, com resultados significativos. No entanto a FAcCp apresentou atividade somente no teste da retirada da pata, na dose de 100 mg/Kg chegando a inibir o limiar de retirada da pata em 56%.

As frações FAcCp e FAqCp são um pouco distintas em relação à sua composição, no entanto, tanto a FAqCp como a FAcCp apresentaram cerca de 50 mg/g de flavonoides. Sabe-se que os flavonoides possuem inúmeras atividades, sendo que para muitos deles já foi descrita atividade anti-inflamatória. A Rutina, isolada da FAcCp, está presente tanto no extrato como nas duas frações e existem relatos que a Rutina diminuiu o edema de pata induzido pela injeção de carragenina produzido na fase aguda e crônica da inflamação (GUARDIA et al., 2001; SELLOUM et al., 2003).

Através do ensaio qualitativo para detecção de saponinas pode-se verificar a presença desta classe de compostos na FAqCp. Borgi e colaboradores (2008) relataram o efeito de frações enriquecidas (fração de saponinas e fração de flavonoides) sobre o edema de pata de ratos induzido por carragenina. As frações enriquecidas com flavonoides e saponinas obtidas de casca de raiz foram capazes de reduzir o edema de pata em 75% e 90% respectivamente enquanto que as frações enriquecidas com flavonoides e saponinas obtidas de folhas reduziram o edema em 47% e 65% respectivamente. Os resultados obtidos sugeriram que a atividade anti-inflamatória pode ser relacionada à presença de flavonoides e saponinas.

Há um grande número de relatos de saponinas com propriedades anti-inflamatórias. Muitas saponinas isoladas de fontes de plantas produzem inibição da inflamação no ensaio de edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina em ratos. Foi reportado que saponinas isoladas de *Bupleurum rotundifolium* L. tem atividade anti-inflamatória contra edema de orelha induzido por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) e inflamação crônica de pele (NAVARRO et al., 2001). O isolamento de duas saponinas de *Kalopanax pictus* (kalopanaxsaponin A e pictoside A) apresentaram significativa atividade anti-inflamatória em uma dose oral de 50 mg/mL (LI et al., 2002).

A partir desses relatos é possível supor que a rutina assim como outros flavonoides estejam contribuindo para a atividade anti-inflamatória. No entanto, o efeito de outros compostos, como as saponinas, presentes na FAqCp, ou até mesmo o efeito sinérgico dos flavonoides com as saponinas podem estar contribuindo para uma melhor resposta da atividade anti-inflamatória encontrada nesta fração.

6.5 AVALIAÇÃO ANTITUMORAL

6.5.1 Avaliação da atividade citotóxica das frações

Os resultados obtidos na investigação da atividade citotóxica das frações de *C. Peltophoroides* (FAcCp e FAqCp) sobre células tumorais humanas permitiram observar que o efeito das FAcCp e FAqCp sobre a viabilidade celular diferem considerando a linhagem celular e as concentrações utilizadas (FIGURA 37). A viabilidade celular não foi afetada quando células A549 (carcinoma de pulmão), HT144 (melanoma) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama) foram tratadas por 3 dias com FAqCp; contudo, o percentual de células viáveis foi cerca de 20% menor nas culturas HepG2 tratadas com FAqCp na concentração de 250 µg/mL.

Ao contrário, da fração FAqCp, a fração FAcCp não alterou a viabilidade das células na linhagem HepG2; entretanto esta mesma fração contribuiu para diminuir o percentual de células vivas em cerca de 50%, 30% e 10%, respectivamente, nas linhagens A549, HT144 e MCF-7 tratadas com 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Os resultados mostram que a linhagem MCF-7 foi a menos responsiva ao tratamento, enquanto o efeito citóxico foi mais expressivo na linhagem A549.

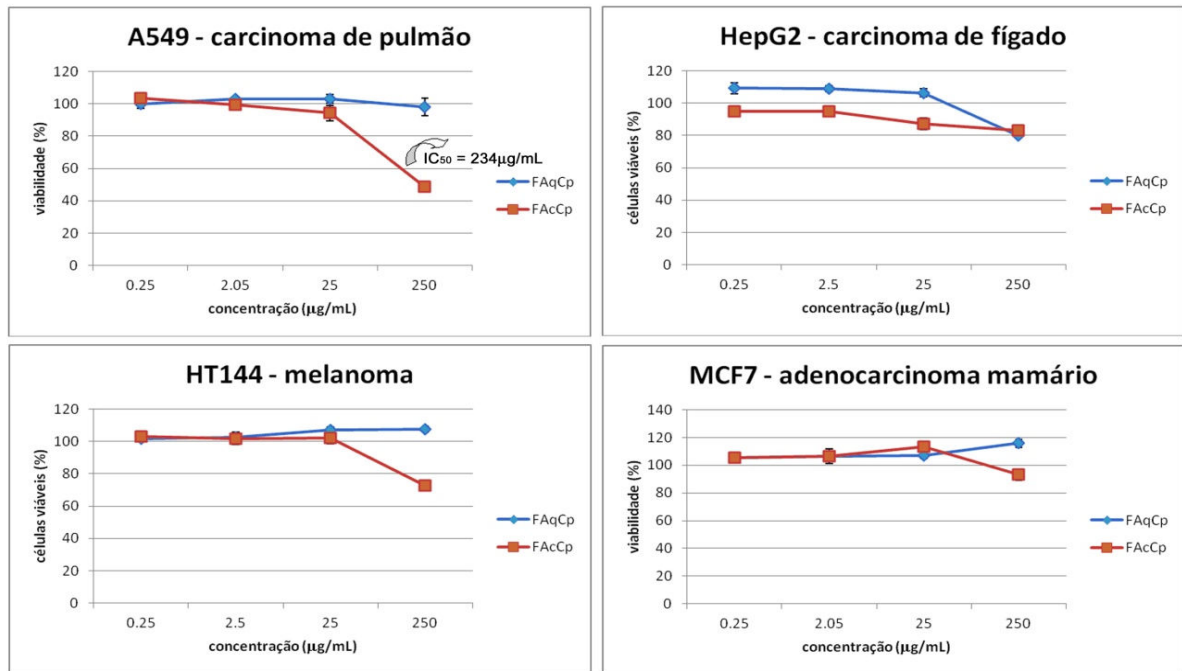


Figura 37 - Efeitos das FAqCp e FAcCp sobre a viabilidade celular após 3 dias de tratamento. A viabilidade foi determinada por MTS e expressa em percentual de células viáveis em relação ao controle.

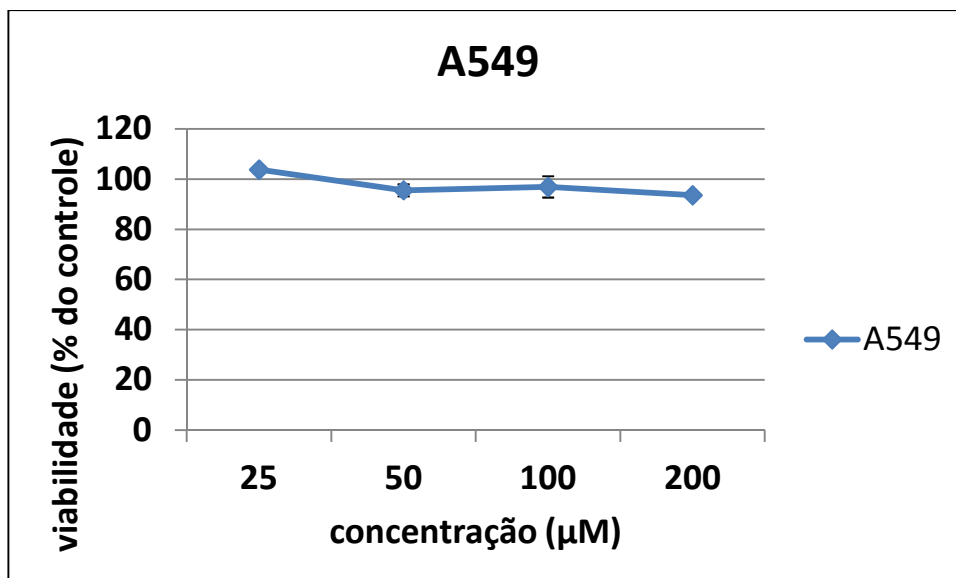


Figura 38 - Efeitos da CD (F 17-33) sobre a viabilidade das células A549. A viabilidade foi determinada por MTS e expressa em percentual de células viáveis em relação ao controle.

Considerando que a linhagem A549 foi a mais afetada pelo tratamento com a fração FAcCp e que desta fração resultou o isolamento da CD (F17-33) identificado como sendo o flavonoide Rutina, novos testes foram realizados para verificar se o composto isolado estava relacionado à atividade citotóxica observada após o tratamento com a referida fração. Assim sendo, células da linhagem A549 foram tratadas por 3 dias com a CD (F 17-33) nas concentrações de 25 μM , 50 μM , 100 μM e 200 μM . Os resultados mostraram que a viabilidade celular não foi alterada sugerindo que o composto CD (F17-33), identificado como sendo a Rutina, não foi o responsável pela atividade citotóxica observada anteriormente quando as células foram submetidas ao tratamento com FAcCp.

A Rutina é um flavonoide, pertencente à subclasse dos flavonóis. É um diglicosídeo da quercetina, um flavonol que apresenta um dissacarídeo (raminose + glicose) (PEDRIALI, 2005). Foi demonstrado que a rutina é hidrolizada por glicosidases produzidas pelas enterobactérias dando origem a Quercetina 3-glicosídica e Quercetina aglicona (MANACH et al., 1997; WALLE et al., 2004; ERLUND et al., 2000). Estudos para avaliar a biodisponibilidade de rutina e quercetina em ratos demonstraram que durante o período de 12-24 h após a ingestão de Rutina, esta foi completamente hidrolizada em Quercetina (MANACH et al., 1997). WALLE et al. (2000) relataram que em pacientes com ileostomia, a absorção de quercetina monoglicosilada e quercetina diglicosilada (rutina) foram completamente hidrolizadas no intestino delgado pelas β -glicosidases, sendo mais rapidamente absorvidas que a forma aglicona.

No presente trabalho, a Rutina não apresentou qualquer efeito citotóxico sobre as células A549 nas concentrações estudadas, ao contrário da quercetina que teve efeito citotóxico concentração-dependente com CI_{50} por volta de 57,76 μM (dados não mostrados). Resultados similares foram obtidos por ROBASZKIEWICZ e colaboradores (2007) que verificaram a atividade citotóxica da quercetina quando utilizada em concentrações superiores a 50 μM . Com base neste estudo, ainda que a Rutina não tenha apresentado atividade citotóxica sobre as células A549, não podemos descartar a possibilidade de sua contribuição em induzir morte celular quando utilizada *in vivo*, uma vez que é metabolizada originando a quercetina como metabólito. Em contraste ao nosso estudo, LEE e colaboradores (2004) descreveram efeito citotóxico da Rutina sobre as células oriundas de carcinoma de pulmão humano (NCI-H889) em uma concentração de 50 μM utilizando ensaio MTT, contudo essa linhagem tem diferente origem da linhagem A549, utilizada no presente trabalho.

ALÍA e colaboradores (2006) relatam que os flavonoides Rutina e Quercetina tem efeito sobre o crescimento das células derivadas de carcinoma de fígado (HepG2). A

Quercetina inibiu cerca de 60% a proliferação celular depois de 24 h em meio de cultura. A Rutina somente apresentou efeitos citotóxicos após período de incubação mais longo (48 h). No entanto, a extensão de inibição do crescimento celular por Rutina foi menor que com Quercetina. MASCARINI e colaboradores (2011) descreveram que altas concentrações de Rutina (810 μM) apresentaram efeito citotóxico sobre células derivadas de hepatoma de murino (HTC) após 72 h de tratamento. A diminuição da proliferação e viabilidade celular com altas concentrações de Rutina (810 μM) está relacionada não somente ao efeito tóxico no metabolismo, mas também pela capacidade da Rutina de induzir apoptose. Em relação à linhagem HepG2 testada, as frações FAcCp e FAqCp inibiram cerca 20% a viabilidade celular somente na concentração de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esta mínima redução na viabilidade celular provavelmente deve-se a outro componente presente no extrato, já que a atividade antiproliferativa da Rutina sobre essas células é demonstrada somente em tempos de incubação mais longos e em altas concentrações. Estudos relatam que a Quercetina é tóxica para as células oriundas de carcinoma de fígado (HepG2) e que a concentração que produz 50% de inibição no crescimento é de 50 μM após 24 horas (MUSONDA; HELSBY; CHIPMAN, 1997). Esses dados encontrados permitem supor que a Rutina é um composto com potencial atividade antitumoral a ser investigado. No entanto é necessária a realização dos ensaios de citotoxicidade *in vivo* para avaliar o efeito do composto sobre o crescimento das células tumorais de fígado .

6.5.2 Avaliação da atividade antitumoral do óleo essencial

O potencial citotóxico do óleo essencial das flores de *C. peltophoroides* foi avaliado contra células de melanoma murino B16F10-Nex2, que apresenta baixa imunogenicidade e moderada virulência. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento por 24 hs foi efetivo, diminuindo a viabilidade celular de B16F10-Nex2 de maneira dose-dependente. O valor obtido de CI_{50} foi $69 \pm 5 \mu\text{g}/\text{mL}$, indicando o alto potencial do óleo em relação ao controle positivo cisplatina ($53 \pm 4 \mu\text{g} /\text{mL}$).

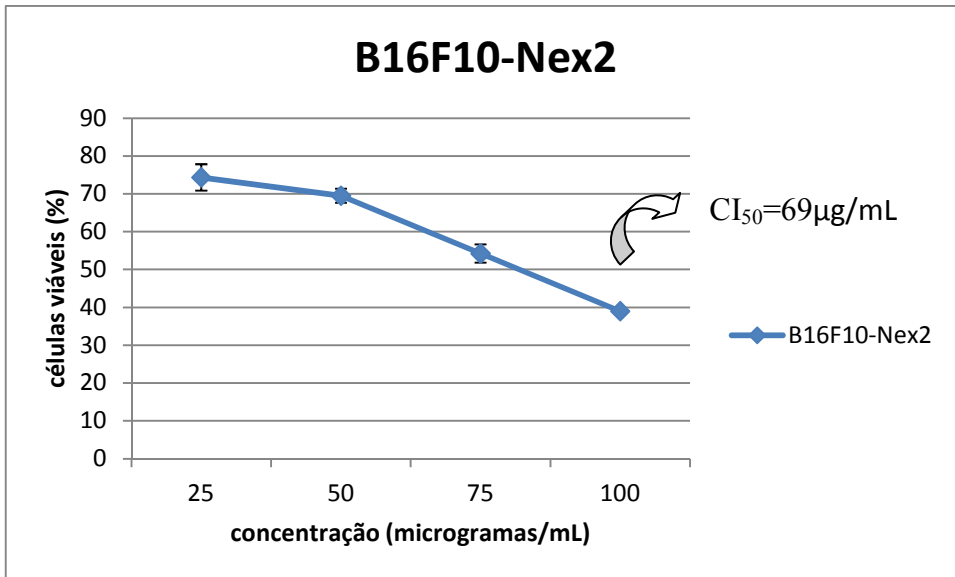


Figura 39 - Efeito do óleo essencial de flores de *C. peltophoroides* sobre a viabilidade das células B16F10-Nex2 determinada pelo ensaio MTT.

Os sesquiterpenos são outra classe de compostos que apresentam atividade antitumoral, sendo que para vários destes compostos a atividade já foi descrita em literatura (LEGAULT et al., 2003; LOIZZO et al., 2007; LAMPRONTI et al., 2006).

Estudos relatam que óleo essencial e extrato etanólico com elevados teores de germacrona inibem a viabilidade em duas linhagens celulares provenientes de carcinoma mamário (MCF-7 e MDA-MB-231). A germacrona é capaz de inibir a viabilidade celular por indução da apoptose e parada no ciclo celular (ZHONG et al., 2011; CHEN et al., 2011). A atividade citotóxica do óleo essencial das flores de *C. peltophoroides* pode ser relacionada aos sesquiterpenos, já que estes estão presentes no óleo. A germacrona, sesquiterpeno identificado no no óleo essencial das flores de *C. peltophoroides* (TABELA 8, pag. 69), apesar de não ser o constituinte majoritário, pode estar contribuindo para a atividade citotóxica encontrada no óleo essencial.

7 CONCLUSÃO

Como não há na literatura estudo sobre a espécie *Caesalpinia peltophoroides*, os resultados apresentados neste trabalho são inéditos para este representante do gênero *Caesalpinia*.

Os extratos de *C. peltophoroides* apresentam resultados significativos para tratamento da dor e inflamação em modelos animais sendo que a FAqCp foi a fração mais ativa.

A FAcCp reduziu a viabilidade celular de carcinoma de pulmão e desta fração foi isolada e identificada a rutina. O ensaio antiproliferativo *in vitro* demonstrou que o óleo essencial das flores desta espécie apresenta grande potencial citotóxico. Estes dados preliminares ajudarão a selecionar compostos com potenciais propriedades antineoplásicas para estudos futuros.

O presente estudo indicou que os extratos e compostos obtidos de produtos naturais, especialmente aqueles obtidos de plantas medicinais, ainda têm e continuarão tendo um lugar importante no processo de descoberta de novos medicamentos, particularmente no desenvolvimento de fármacos com ação analgésica e anti-inflamatória.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography, mass spectrometry**. 4. ed. Carol Stream, Ill.: Allured Business Media, 2009. 804 p.

AKARCA, U.S. Gastrointestinal effects of selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Curr. Pharm. Des.**, v. 11, n. 14, p. 1779-1793, 2005.

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

ALÍA, M. et al. Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). **European Journal of Nutrition**, v. 45, n. 1, p. 19-28, 2006.

ALMEIDA, V. L. et al. Cancer and cell cycle-specific and cell cycle nonspecific anticancer DNA-interactive agents: an introduction. **Química Nova**. v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ALTMANN, K. H.; GERTSCH, J. Anticancer drugs from nature-natural products as a unique source of new microtubule-stabilizing agents. **Natural Products Reports**. v. 24, p. 327-357, 2007.

- ARDREY, R. E. **Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction**. San Francisco: John Wiley & Sons, 2003.
- ARIF, T. et al. In vitro and in vivo antimicrobial activities of seeds of *Caesalpinia bonduc* (Lin.) Roxb. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, n. 1, p. 177-180, 2009.
- ATA, A.; GALE, E. M.; SAMARASEKERA, R. Bioactive chemical constituents of *Caesalpinia bonduc* (Fabaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 2, n. 3, p. 106-109, 2009.
- BOLDI, A. M. Libraries from natural product-like scaffolds. **Current Opinion Chemical Biology**, v. 8, n. 3, p. 281-286, 2004.
- BORGI, W. et al. Anti-inflammatory and analgesic activities of flavonoid and saponin fractions from *Zizyphus lotus* (L.) Lam. **South African Journal of Botany**, v. 74, n. 2, p. 320-324, 2008.
- BRUNETON, J. **Farmacognosia: fitoquímica, plantas medicinales**. 2. ed. Zaragoza (España): Acribia, 2001.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.
- CALIXTO, J. G.; SIQUEIRA JUNIOR, J. M. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**. v. 78, n. 1, p. 98-106, 2008.
- CARVALHO, J. E. **Multiciência: construindo a história dos produtos naturais**, 7, 1, 2006.
- CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. São Paulo: Tecmedd , 2004. 480 p.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimizaçãoda atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.
- CHABNE, B. A.; ROBERTS JR, T. G. Timeline: Chemotherapy and the war on câncer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 5, n. 1, p. 65-72, 2005.
- CHE, C. T. et al. Pulcherralpin, a new diterpene ester from *Caesalpinia pulcherrima*. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 4, p. 561-569, 1986.
- CHEN, X. et al. Anti-tumor potential of ethanol extract of *Curcuma phaeocaulis* Valetton against breast cancer cells. **Phytomedicine**, v. 18, n. 14, p. 1238-1243, 2011.
- CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, p. 829-837, 2004.
- COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1987.

- CUNHA, T. M. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 401-407, 2004.
- DE VITA JR., V. T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. **Cancer: Principles of Oncology**. Lippincott-Raven Publishers; Philadelphia, 1997.
- DI ROSA, M.; WILLOUGHBY, D. A. Screens for anti-inflammatory drugs. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 23, n. 4, p. 297-298, 1971.
- EFFERTH, T. et al. From traditional Chinese medicine to rational cancer therapy. **Trends in Molecular Medicine**, v. 13, n. 8, p. 353-361, 2007.
- ERLUND, I. et al. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. **European Journal Clinical Pharmacology**, v. 56, n. 8, p. 545-553, 2000.
- FENECH, M. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. **Drug Discov Today**, v. 7, p. 1128-1137, 2002.
- FRANCISCHI, J. N. et al. Selective inhibitors of cyclo-oxygenase-2 (COX-2) induce hypoalgesia in a rat paw model of inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v.137, p. 837- 844, 2002.
- FULDA, S. Tumor resistance to apoptosis. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 3, p. 511-515, 2009.
- FULDA, S. Modulation of apoptosis by natural products for cancer therapy. **Planta Medica**, v. 76, n. 11, p. 1075-1079, 2010.
- GARATTINI, S. New approaches to cancer therapy. **Annals of Oncology**, v. 14, p. 813–816, 2003.
- GOMES-CARNEIRO, M. R.; RIBEIRO-PINTO, L. F.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Fatores de risco ambientais para o câncer gástrico: a visão do toxicologista. **Cad Saúde Pública**, 13(supl 1), p. 27-38, 1997.
- GOODMAN e GILMAN **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1996. 1436 p.
- GUARDIA, T. et al. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. **IL Farmaco**, v. 56, p. 683–687, 2001.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; CROSS, C. E. The antioxidant paradox. **The Lancet**, v. 355, p. 1179-1180, 2000.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.
- HENRIQUEZ, M. G. et al. Mouse paw edema: A new model for inflammation? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 20, n. 2, p. 243-249, 1987.

HUANG, P.; OLIFF, A. Signaling pathways in apoptosis as potential targets for cancer therapy. **Trends in Cell Biology**, v. 11, n. 8, p. 343-348, 2001.

IRISH, J.C.; BERNSTEIN, A. Oncogenes in head and neck cancer. **Laryngoscope**, v. 103, p. 42-52, 1993.

JOLY, A. B. **Botânica: Chaves de identificação das famílias de plantas vasculares que ocorrem no Brasil: baseadas em chaves de Franz Thonner**. 3. ed. SP: Nacional, 1977.

JORDAN, M. A.; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. **Natural Reviews Cancer**, v. 4, p. 253-265, 2004.

KALIA, K. et al. Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *Potentilla atrosanguinea* Lodd. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 21, p. 10129-10134, 2008.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica & Clínica**. 9. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

KINGSTON, D. G. I. Recent Advances in the Chemistry of Taxol. **J. Nat. Prod.**, v. 63, p. 726-734, 2000.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 3, p. 206-220, 2005.

LAMPRONTI, I.; SAAB, A. M.; GAMBARI, R. Antiproliferative activity of essential oils derived from plants belonging to the Magnoliophyta division. **International Journal of Oncology**, v. 29, n. 4, p. 989-995, 2006.

LEE, C. S. et al. Effect of change in cellular GSH levels on mitochondrial damage and cell viability loss due to mitomycin c in small cell lung cancer cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, n. 9, p. 1857-1867, 2004.

LEGAULT, J. et al. Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by alpha-humulene as possible mechanism of action. **Planta Medica**, v. 69, n. 5, p. 402-407, 2003.

LI, D. W. et al. Activity-guided isolation of saponins from *Kalopanax pictus* with anti-inflammatory activity. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, n. 7, p. 900-903, 2002.

LOIZZO, M. R. et al. Cytotoxic activity of essential oils from Labiatae and Lauraceae families against in vitro human tumor models. **Anticancer Research**, v. 27, p. 3293-3299, 2007.

MA, X.; WANG, Z. Anticancer drug Discovery in the future: na evolutionary perspective. **Drug Discovery today**, v. 14, p. 1136-1142, 2009.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas Mediciniais, a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quimica Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

- MANACH, C. et al. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 409, p. 12-16, 1997.
- MANN, J. Natural products in câncer chemotherapy: past, present and future. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, n. 2, p. 143-148, 2002.
- MARKHAM, K. R.; MARBY, T. J. Ultraviolet and próton magnetic resonance spectropy of flavonoids. In: HARBONE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. (Ed.) **The flavonoids**. New York: Academic Press, 1975. p. 45 - 77.
- MARCARINI, J. C. et al. Investigation of cytotoxic, apoptosis-inducing, genotoxic and protective effects of the flavonoid rutin in HTC hepatic cells. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 63, n. 5, p. 459-465, 2011.
- McPHERSON, D. D. et al. Peltogynoids and homoisoflavonoids from *Caesalpinia pulcherrima*. **Phytochemistry**, v. 22, p. 2835-2838, 1983.
- MOURA, A. C. S. ; VILEGAS, V. ; SANTOS, L. C. Identificação de alguns constituintes químicos de *Indigofera hirsuta* LINN. (Fabaceae) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antirradicalar. **Química Nova**, v. 34, n. 7, S1-S8, 2011.
- MUSONDA, C. A.; HELSBY, N.; CHIPMAN, J. K. Effects of quercetin on drug metabolizing enzymes and oxidation of 2',7-dichlorofluorescin in HepG2 cells. **Human & Experimental Toxicology**, v. 16, p. 700–708, 1997.
- NANTEL, F. et al. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenaninduced inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 128, n. 4, p. 853-859, 1999.
- NAVARRO, P. et al. In vivo anti-inflammatory activity of saponins from *Bupleurum rotundifolium*. **Life Sciences**, v. 68, n. 10, p. 1199–1206, 2001.
- NEWMAN, D.J. et al. Natural products and derivatives as leads to cell cycle pathway targets in cancer chemotherapy. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 2, n. 4, p. 279-308, 2002.
- NIASSY, B. et al. Flavonoides de *Tephrosia deflexa* et *Tephrosia albifoliolis*. **Comptes Rendus Chimie**, v. 7, p. 993 - 996, 2004.
- NIJVELDT, R. J. et al. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Society for Clinical Nutrition**, v. 74, p. 418-25, 2001.
- NIRANJAN REDDY, V. L. et al. Inhibitory activity of homoisoflavonoids from *Caesalpinia sappan* against *Beauveria bassiana*. **Fitoterapia**, v. 74, p. 600-602, 2003.
- NOBILI, S. et al. Natural compounds for cancer treatment and prevention. **Pharmacological Research**, v. 59, n. 6, p. 365-378, 2009.
- NANTEL, F. et al. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 128, n. 2, p. 853-859, 1999.

- PATEL, A. D. et al. Pulcherrimins A-D, novel diterpene dibenzoates from *Caesalpinia pulcherrima* with selective activity against DNA repair-deficient yeast mutants. **Tetrahedron**, v. 53, p. 1583-1592, 1997.
- PAVIA, D. L. et al. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. USA: Thomson Learning, 2011.
- RAGASA, C. Y.; HOFIENÑA, J. G.; RIDEOUT, J. A. New Furanoid Diterpenes from *Caesalpinia pulcherrima*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 1107-1110, 2002.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**, 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.
- RIVOIRE, W. A. et AL. Biologia molecular do câncer cervical. Rev. Bras. Saúde Matern. Infant., Recife, v. 6, n. 4, p. 447-451, 2006.
- ROBASZKIEWICZ, A.; BALCERCZYK, A.; BARTOSZ, G. Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. **Cell Biology International**, v. 31, n. 10, p. 1245-1250, 2007.
- ROCHA, A. A. **Obtenção e avaliação das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato hidroalcoólico bruto da Arnica brasileira (*Solidago microglossa*, DC)**. 2006. 71f. Dissertação. (Metrado em Química), UNIFRAN, Franca, 2006.
- SANCHEZ-FIDALGO, S. et al. Angiogenesis, cell proliferation and apoptosis in gastric ulcer healing. Effect of a selective COX-2 inhibitor. **European Journal of Pharmacology**, v. 505, p. 187-194, 2004.
- SANTANA, D. G. et al. Beneficial effects of the ethanol extract of *Caesalpinia pyramidalis* on the inflammatory response and abdominal hyperalgesia in rats with acute pancreatitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 445-455, 2012.
- SCHUG, S.A; GARRET, W.R; GILLESPIE, G. Opioid and non-opioid analgesics. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**. v. 17, n. 1, p. 91-110, 2003.
- SELLOUM, L. et al. Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 54, p. 313-318, 2003.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis, Porto Alegre: Ed. da UFSC: Ed. da UFRGS, 2007.
- SKIBOLA, C. F.; SMITH, M. T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. **Free Radical Biologic Medicine**. v. 29, p. 375-83, 2000.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7.ed. Rio de Janeiro, LTC, 2007.
- SLUKA, K.A.; WALSH, D. Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation: Basic Science Mechanisms and Clinical Effectiveness. **The Journal of Pain**, v. 4, p. 109-121, 2003.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1997.

SOUZA, A. C. et al. Seek and destroy: The Use of Natural Compounds for Targeting the Molecular Roots of Cancer. **Current Drugs Target**, v. 13, n. 8, p. 1072-1082, 2012.

SOUZA, M. V. N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 308-312, 2004.

VEIGA JR., V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL; M. A. M, Plantas medicinais, cura segura? **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

VENTURELLA, P. ; BELLINO, A. Oxidation of 2-hydroxychalcones. The Algar—Flynn—Oxyamada reaction on chalcones with a methoxyl in position 6. **Annali di Chimica (Rome)**, v. 50, p. 202-219, 1960.

VINEGAR, R. et al. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. **Federation Proceedings**, v. 46, p. 118-126, 1987.

VERMA, R. S.; TRIANTAFILLOU, N. G. Oncogenetic map of human genome. **Cancer genetics and Cytogenetics**, v. 100, n. 1, p. 88-90, 1998.

WANI, M. C. et al. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, n. 9, p. 2325-2327, 1971.

WALLE, T. Serial Review: Flavonoids and Isoflavones (Phytoestrogens): Absorption, Metabolism, and Bioactivity. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, n. 7, p. 829-837, 2004.

WALLE, T. et al. Quercetin glucosides are completely hydrolyzed in ileostomy patients before absorption. **The Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2658-2661, 2000.

WEINBERG, R. A. Tumor suppressor genes. **Science**, v. 254, p.1138-1145, 1991.

WILLIAMS, T. J. Prostaglandin E₂, Prostaglandin I₂, and the vascular changes of inflammation. **British Journal of Pharmacology**. v. 65, n. 3, p. 517-524, 1979.

WOOK, K. W.; CORNWELL, W. D.; JACKSON, J. R. Past and future of the mitotic spindle as an oncology target. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 1, p. 370-377, 2001.

YANG, B. et al. Relationship of electrochemical oxidation of catechins on their antioxidant activity in microsomal lipid peroxidation. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 49, n. 6, p. 747-751, 2001.

YANG, C. S. et al. Tea and Cancer Prevention: Molecular Mechanisms and Human Relevance. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 224, n. 3, p. 265-273, 2007.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.

ZANIN, J. L. B. **Estudo Químico e bioprospecção de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides***. 2012, 138f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2012.

ZANIN, J. L. B. et al. The genus *Caesalpinia* L. (Caesalpiniaceae): phytochemical and pharmacological characteristics. **Molecules**, v. 17, p. 7887-7902, 2012.

ZHONG, Z. et al. Germacrone inhibits the proliferation of breast cancer cell lines by inducing cell cycle arrest and promoting apoptosis. **European Journal of Pharmacology**, v. 667, p. 50–55, 2011.