

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

MARCELO JOSÉ DIAS SILVA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DO
EXTRATO E FRAÇÕES DE *Mimosa caesalpinifolia* BENTH.
(MIMOSOIDEAE)**

**Alfenas - MG
2012**

MARCELO JOSÉ DIAS SILVA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DO
EXTRATO E FRAÇÕES DE *Mimosa caesalpinifolia* BENTH.
(MIMOSOIDEAE)**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Obtenção e avaliação da atividade biológica de insumos farmacêuticos. Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ap. da Silva

**Alfenas - MG
2012**

MARCELO JOSÉ DIAS SILVA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DO
EXTRATO E FRAÇÕES DE *Mimosa caesalpinifolia* BENTH.
(MIMOSOIDEAE)**

A Banca Examinadora abaixo assinada aprova o manuscrito apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Obtenção e avaliação da atividade biológica de insumos farmacêuticos.

Aprovada em: 20-06-2012

Assinatura:

Prof^a. Dr^a. Ana Hortência Fonsêca Castro (Titular 1)

Instituição: Universidade Federal de São João Del-Rei, UFSJ

Assinatura:

Prof^a. Dr^a. Amanda Latercia Tranches Dias (Titular 2)

Instituição: Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG

Assinatura:

Prof^o. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento (Suplente 1)

Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP Araraquara/SP

Assinatura:

Prof^o. Dr. Marcelo Henrique dos Santos (Suplente 2)

Instituição: Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG

***Essa Dissertação é
dedicada ao meu pai
Geraldo, à minha mãe
Irinê e aos meus irmãos.***

AGRADECIMENTOS

1 ✓ Ao meu orientador, professor Dr. Marcelo Ap. da Silva, meu agradecimento mais que especial, pelo apoio, compreensão. Sua confiança e orientação foram fonte de êxito neste trabalho. Muito obrigado.

1 ✓ Aos professores do Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, por todo o ensino, dedicação, em especial ao professor Dr. Geraldo Alves da Silva pela sua orientação e confiança no seu LPMF.

1 ✓ Aos alunos de Iniciação Científica, Lilian H. Endo, Tatiane R. Nassar, Ana Carolina M. Félix e Gabriela S. Lopes (Bolsa trabalho) por todo o apoio durante os trabalhos de laboratório.

2

3 ✓ Ao Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos, que me ensinou e me despertou o interesse com sua criatividade em explorar a Química dos Produtos Naturais. Sempre grato.

4

1 ✓ A Prof^a. Dr^a. Amanda L. T. Dias, Prof^a. Dr^a. Cibele M. C. P. Gouvêa e o Prof. Dr. Alexandre Giuste-Paiva pela colaboração neste trabalho. Aos meus colegas Ailton José da Silveira de Carvalho e Danielle Dias, que disponibilizaram tempo para me ensinar a realizar os ensaios propostos neste trabalho.

2

3 ✓ À Técnica do LPMF Sílvia Helena Martelli. Por sua coragem e dedicação em ajudar, muito obrigado.

1 ✓ À amiga e parceira Cláudia Q. Rocha. Por sua especial contribuição neste trabalho, muito obrigado. Sucesso sempre.

1 ✓ Enfim, agradeço a todos aqueles que contribuíram para a concretização deste trabalho.



Mimosa caesalpinifolia (Benth)

***“A mente que se abre
a uma nova ideia
jamais voltará ao
seu tamanho original”***

(Albert Einstein)

RESUMO

Mimosa caesalpiniiifolia (MIMOSOIDEAE), planta nativa e de grande ocorrência nas áreas semi-áridas do Brasil. É utilizada pelas populações locais como forrageira e na medicina caseira como cicatrizante, anti-inflamatório e males das vias respiratórias superiores. Espécies pertencentes a mesma família e gênero possuem atividades farmacológicas comprovadas experimentalmente, anticancerígena, anti-inflamatória e antimicrobiana, devido a presença de metabólitos secundários como taninos, ácidos fenólicos e flavonoides. No entanto, a maior parte dos constituintes químicos e atividades biológicas de *M. caesalpiniiifolia* permanecem desconhecidas. A obtenção do extrato deu-se pelo processo de percolação, utilizando como líquido extrator hidroalcoólico 70%. Na etapa farmacobotânica, foram realizados ensaios que buscaram o conhecimento botânico da espécie em estudo. Na etapa farmacognóstica, o extrato e as frações foram identificados por comparações com padrões autênticos e técnicas espectroscópicas usuais (HPLC-PDA e HPLC-MS). Na atividade antimicrobiana utilizou-se o método de microdiluição em caldo, o extrato e as frações exibiram atividade inibitória de crescimento frente aos microrganismos avaliados e em concentrações de 5 a 1000 µg/mL. Na avaliação da atividade anticancerígena os resultados demonstraram atividade antiproliferativa significativa. A análise morfológica a fração acetato de etila (Fr-EtOAc) foi considerada a fração mais ativa. No ensaio do granuloma, ocorreu uma redução na formação do tecido granulomatoso nos animais tratados com a fração acetato de etila e fração butanólica (Fr-BuOH) na dose de 100 mg/Kg, seguida pela fração aquosa (Fr-AqOH) e extrato hidroalcoólico 70% (EHM) de 300 mg/Kg. No modelo para teste da atividade antinociceptiva observou-se que as três doses 30, 100 e 300 mg/kg do EHM, foram capazes de produzir redução significativa da hipernocicepção mecânica induzida pela injeção de carragenina. No teste do campo aberto e toxicidade as amostras não influenciaram na atividade geral e morte dos animais. Esses resultados indicam que o extrato e as frações de *M. caesalpiniiifolia* testados, podem constituir alvo potencial no desenvolvimento de novos medicamentos para o controle farmacológico de processos inflamatórios, microbiológicos e anticancerígenos e para o conhecimento da química.

Palavras-chave: Antioxidantes. Produtos de ação antimicrobiana. Anti-inflamatórios. Anticancerígenos.

ABSTRACT

Mimosa caesalpinifolia Benth., native plant and high occurrence in semi-arid areas of Brazil. It is used by local populations as forage and is used in folk medicine as a healing, anti-inflammatory and upper respiratory tract. His family and gender have experimentally proven pharmacological activities such as anticancer activity, anti-inflammatory and antimicrobial, due to the presence of secondary metabolites such as tannins, phenolic acids and flavonoids. However, most of the chemical and biological activities of *M. caesalpinifolia* remain unknown. The obtained extract was due to the percolation process, using 70% hydroalcoholic liquid extractor. In step Pharmacobotany, tests were conducted seeking the botanical knowledge of the species under study. Pharmacognostic In step, the extract and the fractions were identified by comparison with authentic standards and the usual spectroscopic techniques (HPLC-PDA and HPLC-MS). Antimicrobial activity used in the broth microdilution method, the extract and the fractions showed growth inhibitory activity against microorganisms and evaluated at concentrations 5-1000 µg/mL. In anticancer activity results showed significant antiproliferative activity. The morphological analysis of the Fr-EtOAc was considered the most active fraction. In the assay of granuloma, a reduction in granuloma tissue formation in the animals treated with Fr-EtOAc and Fr-BuOH at a dose of 100 mg / kg, followed by Fr-AqOH EHM and 300 mg / kg. In the model was observed antinociceptive three doses 30, 100 and 300 mg / kg EHM, were able to produce significant reduction in mechanical hypernociception induced by injection of carrageenin. In the open field test and toxicity samples did not influence the general activity and death of animals. These results indicate that the extract and fractions of *M. caesalpinifolia* tested, may constitute a potential target in developing new drugs for the pharmacological control of inflammatory processes, and microbiological and anticancer knowledge of chemistry.

Keywords: Antioxidant. Products antimicrobial. Anti-inflammatory. Anti-cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	<i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth.. Fazenda do Rosa – Alfenas/MG....	24
Figura 2 -	Amostra de <i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth. depositada no Herbário da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG.....	25
Figura 3 -	<i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth.: A. Folhas compostas em folíolos ou pinas; B. Disposição dos acúleos, estípula e bainha; C. Presença de pulvino.....	50
Figura 4 -	Aspecto geral da superfície dos folíolos ou pinas de <i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth.: A. Face abaxial; B. Face adaxial.....	51
Figura 5 -	Folíolo ou pina de <i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth. demonstrando detalhes do padrão de nervação. Legenda: Np: nervura principal; Ns: nervura secundária. Barra: 1 cm.....	52
Figura 6 -	Vista frontal da epiderme do folíolo. A e B: Face adaxial. (Barra: 20 µm - MEV Barra: 100 µm), destacando o contorno poligonal das células. C e D: Face abaxial (Barra: 20 µm - MEV Barra: 100 µm). Legenda: Es: estômato; Nv: nervura; Cs: células epidérmicas.....	53
Figura 7 -	<i>M. caesalpinifolia</i> Benth., detalhe da face adaxial foliar, evidenciando cera epicuticular (MEV Barra: 10 µm).....	54
Figura 8 -	<i>M. caesalpinifolia</i> Benth.. Secção transversal do mesofilo dorsiventral, mostrando epiderme, parênquima paliçádico e fundamental, xilema e floema (Ep.s: epiderme superior; Ep.i: epiderme inferior; Pf: parênquima fundamental; Pp: parênquima paliçádico; Fl: floema; Xi: xilema). Barra=100µm	55
Figura 9 -	<i>M. caesalpinifolia</i> Benth. Secção transversal do mesofilo dorsiventral. (Eps: epiderme superior; Pp: parênquima paliçádico; Pl: parênquima lacunoso; Vs: feixes vasculares). *Espaços vasculares. Barra = 20 µm.....	55
Figura 10 -	<i>M. caesalpinifolia</i> Benth.. Microscopia eletrônica de varredura. Detalhe de um corte transversal de mesofilo. Tricoma tector sobre a epiderme da nervura mediana, face adaxial. (Ad: face adaxial; Fi: fibras; Pl: parênquima lacunoso; Pp: parênquima paliçádico; Tt: tricoma tector; Ep.s: epiderme superior; Ep.i: epiderme inferior). Barra: 100 µm.....	56
Figura 11 -	<i>M. caesalpinifolia</i> Benth.. Detalhe do tricoma tector. Barra = 50.....	57
Figura 12 -	Tamanho médio das partículas do pó das folhas de <i>M. caesalpinifolia</i>	61
Figura 13 -	Cromatograma do extrato e das frações de <i>M. caesalpinifolia</i> revelados com DPPH (4mg/100mL). Legenda: 1. Fr-AqOH, 2. Fr-BuOH. 3. Fr-EtOAc, 4. EHM, 5. Quercetina (padrão); 6. Ácido ascórbico.....	64
Figura 14 -	Comparações dos valores de IC50 do extrato e frações das folhas de <i>M. caesalpinifolia</i> Benth.. EHM = extrato hidroalcoólico 70%; Fr-	

	EtOAc = fração acetato de etila; Fr-BuOH = fração butanólica; Fr-AqOH = fração aquosa; AA = ácido ascórbico.....66
Figura 15 -	Cromatograma de separação dos constituintes químicos presentes no EHM das folhas de <i>Mimosa caesalpiniiifolia</i> Benth.. Clean-up por SPE-RP18, eluida com H2O: MeOH 9/1, v/v), obtidos por HPLC-PDA (Jasco®), Coluna Phenomenex® Synergi Hydro RP-18 (250 x 4,6mm i.d.; 4µm), fluxo 1,0 mL.min ⁻¹ , Solventes: A=H2O, B=MeOH ambos com TFA 0,05%. Sistema de eluição gradiente linear 0-100% de B em 60 minutos e espectros no UV das classes mais proeminentes presentes no EHM.....67
Figura 16 -	Cromatograma de separação dos constituintes químicos presentes no EHM das folhas de <i>Mimosa caesalpiniiifolia</i> Benth.. Clean-up por SPE-RP18, eluida com H2O: MeOH 9/1, v/v), obtidos por HPLC-PDA (Jasco®), Coluna Phenomenex® Synergi Hydro RP-18 (250 x 4,6mm i.d.; 4µm), fluxo 1,0 mL.min ⁻¹ , Solventes: A=H2O, B=MeOH ambos com TFA 0,05%. Sistema de eluição gradiente linear 0-100% de B em 60 minutos e espectros no UV das classes mais proeminentes presentes na Fr-EtOAc.....68
Figura 17 -	Cromatograma de separação dos constituintes químicos presentes na Fr-BuOH das folhas de <i>Mimosa caesalpiniiifolia</i> Benth.. Clean-up por SPE-RP18, eluida com H2O: MeOH 9/1, v/v), obtidos por HPLC-PDA (Jasco®), Coluna Phenomenex® Synergi Hydro RP-18 (250 x 4,6mm i.d.; 4µm), fluxo 1,0 mL.min ⁻¹ , Solventes: A=H2O, B=MeOH ambos com TFA 0,05%. Sistema de eluição gradiente linear 0-100% de B em 60 minutos e espectros no UV das classes mais proeminentes presentes na Fr-BuOH.....69
Figura 18 -	Cromatograma de separação dos constituintes químicos presentes na Fr-AqOH das folhas de <i>Mimosa caesalpiniiifolia</i> Benth.. Clean-up por SPE-RP18, eluida com H2O: MeOH 9/1, v/v), obtidos por HPLC-PDA (Jasco®), Coluna Phenomenex® Synergi Hydro RP-18 (250 x 4,6mm i.d.; 4µm), fluxo 1,0 mL.min ⁻¹ , Solventes: A=H2O, B=MeOH ambos com TFA 0,05%. Sistema de eluição gradiente linear 0-100% de B em 60 minutos e espectros no UV das classes mais proeminentes presentes na Fr-AqOH.....70
Figura 19 -	Espectros na região do UV para padrões de A) ácido gálico, B) quercetina.....71
Figura 20 -	Estrutura de um flavonol com sistema benzoil e cinamoil.....71
Figura 21 -	Espectros de massa full scan do extrato hidroalcoólico 70% (EHM) das folhas de <i>M. caesalpiniiifolia</i> Benth.....73
Figura 22 -	Espectro de massas de primeira-ordem, em modo full-scan da Fr-EtOAc de <i>M. caesalpiniiifolia</i> no modo positivo. Presença de catequinas (C ₁₅ H ₁₄ O ₆ ; PM: 290) e seus derivados (agliconas: C ₂₈ H ₃₆ O ₁₅ – PM: 612,8; C ₂₇ H ₃₄ O ₁₄ – PM: 582; pentose: C ₃₀ H ₂₆ O ₁₁ – PM: 562).....73
Figura 23 -	Fragmentação MS/MS do íon precursor de m/z 582,76 produziu o

	pico m/z 289,11 correspondente à aglicona da Fr-EtOAc74
Figura 24 -	Espectro de massas de primeira-ordem, em modo full-scan da Fr-BuOH de <i>M. caesalpiniiifolia</i> no modo positivo. Presença de catequinas (C ₁₅ H ₁₄ O ₆ ; PM: 290) e seus derivados (agliconas: C ₂₈ H ₃₆ O ₁₅ – PM: 612,8; C ₂₇ H ₃₄ O ₁₄ – PM: 582; pentose: C ₃₀ H ₂₆ O ₁₁ – PM: 562).....74
Figura 25 -	Espectro de massas de primeira-ordem, em modo full-scan da Fr-AqOH de <i>M. caesalpiniiifolia</i> no modo positivo. Presença de catequinas (C ₁₅ H ₁₄ O ₆ ; PM: 290) e seus derivados (agliconas: C ₂₇ H ₃₄ O ₁₄ – PM: 582).....75
Figura 26 -	Espectros de massa full scan de fragmentação das folhas de <i>M. caesalpiniiifolia</i> . Presença correspondem uma molécula desprotonada de catequina.....75
Figura 27 -	Diâmetro (µm) de células controle e tratadas por 48 h, com o a fração acetato de etila (Fr-EtOAc) das folhas de <i>M. caesalpiniiifolia</i> nas diferentes concentrações (5 - 320 µg mL ⁻¹).....81
Figura 28 -	Morfologia das células MCF-7 tratadas com Fr-EtOAc com 320 µg/mL por 48 h. (A) Microscopia de luz. Barra: 50µm. (B) Microscopia eletrônica de varredura. M.E.V. Barra: 20µm.....82
Figura 29 -	Efeito do EHM de <i>M. caesalpiniiifolia</i> na formação de granuloma em animais tratados com 30, 100 e 130 mg/Kg das frações Fr-EtOAc: Fração acetato de etila; Fr-BuOH: Fração butanólica e Fr-AqOH: Fração aquosa nas doses 30, 50 e 100 mg/Kg, com dexametaxona ou CMC(1%).**p<0,01 e ***p<0,01em relação ao controle.....85
Figura 30 -	Efeito da administração EHM ou Indometacina (INDO-10mg/kg) em hipernocicepção induzida pela injeção intraplantar de carragenina (100µg/pata) em camundongos detectada pelo Von Frey eletrônico. Cada ponto representa a média ±S.E.M. de dez animais por grupo. Os asteriscos denotam níveis de importância quando comparados com o grupo veículo: ** p <0,01 e *** p <0,001.....86
Figura 31 -	Tempo de parada (segundos) no teste do campo aberto, camundongos tratados com o extrato hidroalcoólico 70% (EHM), as frações Fr-EtOAc: Fração acetato de etila; Fr-BuOH: Fração butanólica e Fr-AqOH: Fração aquosa das folhas de <i>M. caesalpiniiifolia</i> .*Os resultados expressam as médias ± DM. Significância *p>0,05; **p>0,01; ***p>0,01 em relação ao veículo...90
Figura 32 -	Órgãos biopsiados de camundongo, após administração do extrato e frações de <i>M. caesalpiniiifolia</i> . (A) Fígado; (B) Pulmão; (C) Rins; (D) Coração.....92
Figura 33 -	Evolução do peso corporal de camundongos machos e fêmeas tratados com o extrato hidroalcoólico 70% (EHM), e as frações Fr-EtOAc: Fração acetato de etila; Fr-BuOH: Fração butanólica; Fr-AqOH: Fração aquosa das folhas de <i>M. caesalpiniiifolia</i> .*Os resultados expressam as Médias (g) ± DM.....93
Figura 34 -	Hábitos fisiológicos diários de camundongos machos e fêmeas

tratados com o extrato hidroalcoólico (EHM), as frações Fr-EtOAc: Fração acetato de etila; Fr-BuOH: Fração butanólica; Fr-AqOH: Fração aquosa das folhas de *M. caesalpinifolia*. *Os resultados expressam as Médias (mL) \pm DM. Significância $p > 0,05$94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Frequências percentuais, frequências cumulativas e tamanho médio das partículas na análise granulométrica de <i>M. caesalpiniiifolia</i> Benth.....	61
Tabela 2 -	Análises farmacognósticas do pó das folhas de <i>M. caesalpiniiifolia</i> Benth.....	62
Tabela 3 -	Triagem fitoquímica do extrato hidroalcoólico 70% (EHM) e das frações acetato de etila (Fr-EtOAc), butanólica (Fr-BuOH) e aquosa (Fr-AqOH) das folhas de <i>M. caesalpiniiifolia</i> Benth.....	63
Tabela 4 -	Atividade antioxidante do extrato, frações das folhas de <i>M. caesalpiniiifolia</i> Benth., padrão na redução do radical DPPH e o teor de polifenóis totais (PT).....	65
Tabela 5 -	Determinações das concentrações inibitórias (C ₅₀) e (IC ₁₀₀) para fungos.....	77
Tabela 6 -	Determinações do perfil de sensibilidade, concentrações inibitórias (IC ₅₀) e (IC ₁₀₀) para bactérias.....	78
Tabela 7 -	Inibição da proliferação (%) de células tratadas por 48 h, com o extrato hidroalcoólico 70% (EHM) e as frações acetato de etila (Fr-EtOAc), butanólica (Fr-BuOH) e aquosa (Fr-AqOH) das folhas de <i>M. caesalpiniiifolia</i> Benth. em diferentes concentrações (5-320µg/mL), estimada pelo teste de sulforrodamina B.....	80
Tabela 8 -	Diâmetro (µm) de células controle e tratadas por 48 h, com o extrato hidroalcoólico 70% (EHM) e as frações acetato de etila (Fr-EtOAc), butanólica (Fr-BuOH) e aquosa (Fr-AqOH) das folhas de <i>M. caesalpiniiifolia</i> em diferentes concentrações (5-320 µg/mL).....	81
Tabela 9 -	Efeito do EHM de <i>M. caesalpiniiifolia</i> Benth. e suas frações Fr-EtOAc: Fração acetato de etila; Fr-BuOH: Fração butanólica; Fr-AqOH: Fração aquosa na formação de granuloma em animais, com indometacina ou CMC (1%). Os resultados expressam as médias (mg) ± DM. **p<0,01e ***p<0,001em relação ao controle.....	84
Tabela 10 -	Número total de cruzamentos, número total de levantar, número de auto-limpeza, número de bolos fecais e tempo parado (segundos), no campo aberto de 60 minutos após o tratamento com veículo (C), extrato das folhas de <i>M. caesalpiniiifolia</i> Benth. (EHM) (30–300 mg/Kg), Fr-EtOAc (30–100 mg/Kg), Fr-BuOH (30–100 mg/Kg), Fr-AqOH (30–100 mg/Kg) ou diazepam (DZP, 5 mg/Kg). Os resultados são as médias±EPM (n=8).....	89
Tabela 11 -	Avaliação do efeito tóxico agudo do extrato hidroalcoólico 70% e das frações acetato de etila, butanólica e aquosa das folhas de <i>M. caesalpiniiifolia</i> Benth. (5000 mg/Kg, v.o.).....	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido ascórbico
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
Bcl-2	B-células linfoma 2
Benth	Bentham
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CIM	Concentração mínima inibitória
COX-2	Ciclo-oxigenase-2 ou prostaglandin-endoperoxide synthase 2
CP	Ciclofosfamida
DAINES	Drogas anti-inflamatórias não esteróides
DPPH	1,1-difenil-1-picril-hidrazila
DZP	Diazepam
E2 (PGE2)	Prostaglandina E2
EHM	Extrato hidroalcoólico 70% das folhas de <i>Mimosa caesalpinifolia</i>
Fr-AqOH	Fração aquosa
Fr-BuOH	Fração butanólica
Fr-EtOAc	Fração acetato de etila
FVF	Filamento de Von Frey
HELA	Linhagem de células epiteliais de carcinoma de colo de útero humano
HPLC/MS	High performance liquid chromatography-Mass spectrometry
HPLC/PDA	High performance liquid chromatography-Photodiode array
IC ₁₀₀	Concentração inibitória 100%
IC ₅₀	Concentração inibitória 50%
IL-1 β	Interleucina 1-beta
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IM	Intramuscular
Kc	Quimiocina derivado de queratinócitos
LME	Laboratório de Microscopia Eletrônica
LPMF	Laboratório de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
LPS	Lipopolissacarídeo
M.E.V.	Microscopia Eletrônica de Varredura
m/z	Relação massa/carga
MCF-7	Michigan Cancer Foundation - 7
NFKB	Fator nuclear Kappa B
NP/PEG	Natural product/Polyethylenoglicol reagent
PVPI	Iodopovidona ou Povidona-iodo
RDC	Resolução da Diretoria do Colegiado
SNC	Sistema nervoso central
TFA	Ácido trifluoroacético
TNF-R1	Fator receptor 1 de necrose tecidual
TNF- α	Fator alfa de necrose tecidual
UFLA	Universidade Federal de Lavras
UNESP	Universidade do Estado de São Paulo
UNIFAL/MG	Universidade Federal de Alfenas – Minas Gerais
UV	Ultra violeta
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais para o tratamento de muitas doenças está associado à medicina popular de diferentes partes do mundo. Diferentes culturas dos mais distintos lugares, desenvolvidas ou não, conhecem e utilizam o potencial terapêutico dos vegetais no tratamento de doenças. Práticas estas que acompanham o homem desde a pré-história e evoluíram com ele ao longo dos anos e constituíram a medicina do homem primitivo. Com a evolução do conhecimento científico, intensificaram-se os estudos das plantas medicinais, relacionando a sua composição química com os seus efeitos, confirmando, muitas vezes, a sua utilização popular (ARAÚJO e LEON, 2001). Apesar do longo tempo que se conhece o potencial curativo das plantas, apenas recentemente estas se tornaram objeto de estudo científico no que concerne às suas variadas propriedades medicinais.

Atualmente, é grande o interesse das indústrias farmacêuticas pelo uso da biodiversidade como fonte de novos medicamentos. Cerca de 30% dos fármacos disponíveis na terapêutica, são derivados direta ou indiretamente de produtos naturais, notadamente das plantas. Em algumas doenças como o câncer, os medicamentos derivados de plantas chegam a 60% (NEWMAN et al, 2002; BOLDI, 2004).

Nos últimos anos, a resistência de microrganismos patogênicos a múltiplas drogas tem aumentado devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos, comumente comercializados e usados no tratamento de doenças infecciosas. Em geral, bactérias têm a habilidade genética de adquirir e transmitir resistência às drogas utilizadas como agentes terapêuticos. O problema dos microrganismos resistentes está crescendo e a perspectiva para o uso de antibióticos é indefinida (NASCIMENTO et al., 2000; AMOROSO, 2002).

A necessidade de se encontrar novos compostos que possam combater efetivamente não só os microrganismos patogênicos, mas as doenças cancerígenas e anti-inflamatórias, tem forçado os cientistas à busca de novas drogas. Como os vegetais são uma excelente fonte de novas drogas antimicrobianas, anti-inflamatórias e anticancerígenas, por terem uma diversidade

molecular muito superior àquelas derivadas de produtos sintéticos, as plantas têm se tornado objeto de estudo científico no que concerne às suas variadas propriedades medicinais (NOVAIS, 2003).

Muitas espécies são usadas empiricamente, sem respaldo científico quanto à eficácia e segurança, o que demonstra que, em um país como o Brasil, com enorme biodiversidade, existe uma enorme lacuna entre a oferta de plantas e as poucas pesquisas. Desta forma, considera-se este um fator de grande incentivo ao estudo com plantas, especialmente para a espécie *Mimosa caesalpiniiifolia*, visando sua utilização como fonte de recursos terapêuticos, pois o reino vegetal representa, em virtude da pouca quantidade de espécies estudadas, um vasto celeiro de moléculas a serem descobertas.

A importância da integração das indústrias farmacêuticas com universidades nos estudos de bioprospecção de recursos naturais pode resultar em grandes vantagens e progressos para ambas as partes. As universidades possuem farmacêuticos/farmacologistas, químicos e médicos que podem conduzir a etapas pré-clínicas e clínicas necessárias para a validação de produtos vegetais usados pela população, assim como para o desenvolvimento de novos medicamentos fitoterápicos (MIRANDA, 2007).

A descoberta de quimioterápicos eficazes como vimblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®), podofilotoxina e os análogos etoposídeo (VP-16-213; Vepeside®) e teniposídeo (VM-26; Vumon®), camptotecina e taxol (placlitaxel; Taxol®), são exemplos da indústria farmacêutica que reativaram o interesse pelos medicamentos de origem vegetal, principalmente pela busca de substâncias com estruturas moleculares complexas, praticamente impossíveis de serem obtidas por um processo sintético de custo racional (MONTANARI e BOLZANI, 2001).

É dentro desse contexto que o Laboratório de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (LPMF) da UNIFAL-MG vem realizando trabalhos que envolvem estudos empregando fitoquímica clássica e atividade biológica de plantas que apresentem uso na medicina tradicional e parcerias com outros laboratórios de pesquisa da UNIFAL-MG e de outras instituições como o Instituto de Química – UNESP e o Departamento de Fitopalogia - UFLA.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar a caracterização farmacognóstica e avaliação biológica do extrato e frações de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. (Mimosoideae).

2.2 Objetivos específicos

- ❖ Fornecer dados farmacobotânicos da espécie *M. caesalpiniiifolia* Benth.;
- ❖ Fornecer dados químicos da espécie *M. caesalpiniiifolia* Benth.;
- ❖ Determinar a segurança do uso da *M. caesalpiniiifolia* Benth. por meio de estudo toxicológico aguda;
- ❖ Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro*;
- ❖ Avaliação da capacidade citotóxica *in vitro*;
- ❖ Avaliar a atividade antioxidante *in vitro*;
- ❖ Realizar ensaios farmacológicos utilizando extrato e frações obtidas das folhas da espécie para investigar o potencial de atividade anti-inflamatória e antinociceptiva;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

Mimosoideae é a segunda maior subfamília de Fabaceae, registrando 82 gêneros e um total de 3.275 espécies, superada apenas por Faboideae (STEVENS 2006). Quase dois terços das espécies pertencem a três gêneros: *Acacia* L. (960 espécies), *Mimosa* L. (480 espécies) e *Inga* Mill. (350 espécies), conforme citado por Elias (1974; 1981), Barroso et al., (1984) e Stevens (2006).

Espécies de Mimosoideae podem ser encontradas tanto em regiões tropicais e subtropicais, como também em zonas temperadas. Com espécies de porte arbóreo, arbustivo, herbáceo ou lianas (ELIAS, 1974; 1981; CRONQUIST 1981; BARROSO et al., 1984), as Mimosoideae apresentam folhas geralmente bipinadas e com nectários extraflorais; as flores são pequenas, normalmente agrupadas, actinomorfas, diclamídeas, com cálice e a corola de prefloração valvar e sementes com pleurograma e linha fissural (SOUZA e LORENZI 2005; STEVENS, 2006).

Muitas espécies de Mimosoideae apresentam folhas com movimentos nictinásticos, em que os folíolos se dobram uns sobre os outros e a folha toda muda de posição, estimulada pela luz. *Mimosa pudica* L., a espécie com maior número de estudos a respeito desse assunto, apresenta também, movimentos seismonásticos, que ocorrem após um estímulo de toque (BARROSO et al., 1984). Esses movimentos ocorrem devido à presença de pulvinos e pulvínulos na base das folhas e dos folíolos respectivamente, que exercem essa atividade motora (SALISBURY e ROSS, 1992).

No que se refere à importância econômica, são menos relevantes que espécies de Faboideae, mas, mesmo assim, encontram-se muitos representantes úteis na extração de metabólitos secundários, espécies forrageiras e outras de valor ornamental indiscutível (ELIAS, 1974).

Mimosoideae apresentam caracteres que as aproximam mais de Caesalpinioideae do que de Faboideae (ELIAS, 1974; 1981) e, segundo Barroso et al., (1984), Faboideae é a subfamília considerada mais avançada do grupo.

Conforme relatado por Elias (1981), na primeira classificação de Mimosoideae feita por Linnaeus existiam apenas espécies do gênero *Mimosa*, com

exceção de *Adenantha pavonina* L., deixando clara, então, a origem da denominação da subfamília. Posteriormente, em 1805, Willdenow dividiu *Mimosa* em cinco gêneros, sendo eles *Acacia*, *Desmanthus* Willd., *Inga*, *Mimosa* e *Schrankia* Willd. Por volta de 1875, Bentham revisou a subfamília e segregou-a em seis tribos com 46 gêneros, baseado principalmente em caracteres florais e seminiais. Hutchinson (1964) distribuiu as espécies em seis tribos, sendo Acacieae, Adenanthereae, Ingeae, Mimoseae, Mimozyngatheae e Parkieae.

Segundo Lewis e Elias (1981), Mimosoideae é representada por membros arbóreos, trepadores, arbustivos ou raramente herbáceos, possuindo ou não espinhos, com folhas bipinadas, de filotaxia alterna ou oposta, apresentando numerosas flores agrupadas em glomérulos, espigas ou racemos. A tribo apresenta caracteres bem diversos, como pétalas livres ou não, estames levemente conatos na base ou não, eventualmente com uma glândula no ápice da antera, grão de pólen simples ou composto, ovário estipitado ou não, piloso ou glabro e com número variado de óvulos. O número de estames geralmente é o dobro do de pétalas e as anteras são minúsculas. Os frutos são bivalvos, normalmente comprimidos, também com outras variações, de consistência membranácea a lenhosa, deiscentes ou indeiscentes. As sementes, na maioria das vezes, apresentam pleurograma e raramente são cobertas por uma polpa fina, podendo ser albuminosas ou não.

A distribuição dos membros de Mimosoideae é mais restrita a regiões tropicais e subtropicais, com numerosas espécies na América do Sul e África tropical (LEWIS e ELIAS, 1981).

3.1 Características do gênero *Mimosa*

Mimosa distribui-se por todo o mundo, entretanto, exibe duas áreas de diversificação, os campos do sudeste do Brasil e os campos e regiões arbustivas do México (ELIAS 1974). De acordo com o levantamento fitogeográfico realizado por Simon e Proença (2000), *Mimosa* é bem distribuída no Cerrado, com 189 espécies. É o gênero mais abundante da subfamília nesse bioma, onde Mendonça et al., (1998) ainda registravam 97 espécies de *Mimosa* contra apenas 11 de *Acacia*. Segundo Simon e Proença (2000), 140 espécies de *Mimosa* (74%) são

restritas ao Cerrado e do total, 91 (50%) são endêmicas; o cerrado é, portanto, um importante centro de endemismo para o gênero.

Burkart (1979) descreveu as Mimosoideae encontradas no Estado de Santa Catarina, relatando a presença de 47 espécies de *Mimosa*, com flores pequenas e aglomeradas, rosado-lilazes, amarelas ou brancas, frutos do tipo lomento (craspédio), sementes ovais, achatadas, com endosperma mucilaginoso e tegumento com linha fissural em ferradura. Pertencente ao grupo *Piptadenia*, *Mimosa* possui flores em inflorescências do tipo capítulo ou espiga, com ovário glabro ou não, séssil ou preso por estípite longo, geralmente com emergências ou espinhos e formando frutos de diversos tipos (LEWIS e ELIAS 1981).

Mimosa caesalpinifolia Benth. (Figura 1), conhecida popularmente no Ceará e Pernambuco como sabiá; Minas Gerais: angiquinho-sabiá, sabiá, cerca-viva e sansão-do-campo e Piauí: unha-de-gato, cujos nomes comuns advêm, respectivamente, da semelhança da coloração da casca com a plumagem da ave do mesmo nome, acúleos agressivos e resistentes principalmente nos galhos jovens, e rápido crescimento. A planta alcança a altura de sete a oito metros e diâmetro de aproximadamente 20 centímetros. Tem aspecto entouceirado e boa capacidade de rebrota sendo bastante esgalhada, com ramos contendo acúleos de pontas agudas e recurvadas os quais desaparecem nos troncos de idade avançada, apesar de haver registros de mutantes inermes (LORENZI, 2000; MENDES, 2001; MAIA, 2004).

As folhas verdes ou secas são forrageiras. Sua folhagem é considerada valiosa fonte de alimento para grandes e pequenos ruminantes, principalmente durante a longa estiagem do sertão semi-árido. As folhas possuem alto valor nutricional, contendo aproximadamente 17% de proteína (LORENZI, 1992).

As flores são brancas, pequenas, apresenta odor agradável, melíferas, dispostas em inflorescências do tipo espigas cilíndricas de 5 a 10 cm de comprimento, axilares ou em panículas terminais.

O fruto é um craspédio plano com 7 a 10 cm x 10 a 13 mm x 1,0 a 1,2 mm (comprimento x largura x espessura) dividido em 5 a 9 artículos quadrangulares, presos por dois filamentos fibrosos laterais. A semente é pequena, lisa, lustrosa, dura, leve, de cor castanho claro, de 5 a 8 mm de diâmetro, de forma ovóide tendendo a orbicular (RIZZINI, 1995; LORENZI, 2000). O sistema radicular da

espécie é radial, superficial, concentrado nos primeiros vinte centímetros de profundidade do solo. A planta tem raízes espessas, longas e numerosas, que podem atingir os seis metros de comprimento, favorecendo a absorção de águas das chuvas e a produção de folhagem antes das outras espécies da Caatinga, e apresenta associação com bactérias e fungos (QUEIROZ, 1985; MENDES, 2001).



Figura 1 - *Mimosa caesalpinifolia* Benth.. Fazenda do Rosa - Alfenas/MG
Fonte: Do autor.

3.2 Ocorrência natural e descrição botânica da espécie *Mimosa caesalpinifolia*

Mimosa caesalpinifolia é nativa do Nordeste brasileiro, ocorrendo naturalmente nos Estados do Maranhão, Piauí, Ceará, e Rio Grande do Norte (BRAGA, 1976; COSTA, 1983; MENDES, 1989; LIMA, 1996; MAIA, 2004), além de ser encontrada em povoamentos artificiais do Maranhão à Bahia (RIZZINI, 1995). Foi introduzida com sucesso em regiões úmidas dos Estados da Paraíba (Brejo Paraibano), Rio de Janeiro (Baixada Fluminense e Planaltos Fluminenses), São Paulo (Vale do Paraíba do Sul e Planaltos Paulistas) e Minas Gerais (Norte e sul de Minas Gerais) (CAMPELO, 1973; GOMES, 1977; MENDES, 1989).

De acordo com o Sistema de Classificação de Cronquist, a posição taxonômica de *Mimosa caesalpinifolia* obedece à seguinte hierarquia apresentada abaixo:

Divisão: Magnoliophyta (Angiospermae)
Classe: Magnoliopsida (Dicotyledoneae)
Ordem: Fabales
Família: Mimosoideae (Fabaceae - Mimosoideae)
Gênero: *Mimosa*
Espécie: *Mimosa caesalpinifolia* Bentham
Sinonímia botânica: *Mimosa caesalpinifolia* sensu Bentham;
Mimosa punctulata sensu Glaziou.



Figura 2 - Amostra de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. depositada no Herbário da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG. Fonte: Do autor.

3.2 Estudos realizados com a família e outras espécies do gênero *Mimosa*

Poucos são os dados disponíveis na literatura sobre estudos químicos e atividades biológicas atribuídas a espécie *Mimosa caesalpinifolia*. Diante da escassez dos dados, analisamos resultados de trabalhos publicados sobre a família e o gênero *Mimosa*.

Plantas de outros gêneros, mas pertencentes à mesma família, como o barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville), são utilizadas popularmente nos casos de diarreias, hemorragias, hemorróidas, limpeza de ferimentos, hemorragias uterinas, feridas ulcerosas e no tratamento de pele excessivamente oleosa (BARREIRO et al., 2005).

O extrato bruto obtido por decocção ou infusão da casca e das folhas de barbatimão, é utilizado na medicina popular para o tratamento de leucorreia, diarreia, como antisséptico, para cicatrização de feridas e em inflamações. Trabalhos científicos demonstram inúmeras atividades biológicas do extrato de várias partes da planta (SANTOS et al., 1988). O extrato bruto da casca do barbatimão inibiu o crescimento de *Herpetomonas samuelpeessoai* (HOLETZ et al., 2005), *Candida albicans* (ISHIDA et al., 2006), a replicação de poliovírus e herpesvírus bovino e a síntese de antígenos virais (FELIPE et al., 2006). *S. adstringens* apresenta ainda diversas outras atividades demonstradas tais como: analgésica, anti-inflamatória, anticancerígena e protetora da mucosa gástrica (LIMA et al., 1998; AUDI et al., 1999).

As propriedades medicinais ou atividades farmacológicas do barbatimão podem ser atribuídas a sua composição química. A planta contém compostos fenólicos, sendo que a casca possui pelo menos 20% de taninos (MELLO et al., 1996), flavonóis, ácidos fenólicos, ésteres de ácido gálico e outros compostos fenólicos ligados a açúcares e ao ácido gálico (SANTOS et al., 2002). Presença de flavonoides também são evidentes com propriedades antihepatotóxica, anti-inflamatória, antiaterogênica, antialérgica e anticancerígena. Muitos dos efeitos farmacológicos dos flavonoides estão relacionados com a interação com várias enzimas e pela sua atividade antioxidante (SILVA et al., 2002).

Contem ainda diversas proantocianidinas, tais como prodelfinidinas 3-flavonóis, prorobinetidinas e proantocianidinas diméricas (MELLO et al., 1996), que possuem inúmeras atividades biológicas (JIN et al., 2012).

Algumas espécies do gênero *Mimosa* são utilizadas popularmente na forma de infuso, demonstrando atividade diurética e antihipertensiva; também são utilizadas na neurastenia, na deficiência nutricional infantil e em quadros de tosse com expectoração (LAN, 2008) e no tratamento de queimaduras, analgésico, acne, adstringente peitoral e inflamações (MAIA, 2004).

Trabalhos realizados no México avaliando as propriedades antimicrobianas do caule de *M. tenuiflora* demonstraram a ação inibitória dos extratos aquoso e etanólico contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos dermatófitos (LOZOYA et al., 1989).

Em estudos sobre a atividade antimicrobiana de algumas árvores nativas do Brasil, Gonçalves et al., (2005) observaram uma excepcional atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *M. tenuiflora* sobre *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp.

Estudos comparativos entre as espécies *Mimosa pudica* e *Mimosa rubicalis* desenvolvido por Genest et al., (2008) demonstraram a atividade antioxidante e antibacteriana frente à *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* ampicilina resistente, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. A espécie *Mimosa pudica* foi avaliada, também, quanto ao seu potencial terapêutico para o tratamento da psoríase, apresentando uma regeneração da taxa de crescimento celular normal, regulando o processo de apoptose celular (POLEO ARMERO e GAVIRIA, 2008).

É um gênero bem diversificado em relação ao número de espécies, porém pouco conhecido quimicamente, levando em consideração a importância que o mesmo apresenta. O quadro 1 reúne dados químicos e farmacológicos descritos na literatura de espécies do gênero *Mimosa*. Estudos etnofarmacológicos confirmaram indicações populares para diversas espécies desse gênero.

Quadro 1 - Propriedades farmacológicas e compostos químicos de espécies do Gênero *Mimosa*.

Espécies de <i>Mimosa</i>	Propriedades farmacológicas	Compostos químicos	Referências
<i>M. bimucronata</i>	Alimentação de ruminantes (sementes e folhas)	conteúdo fenólico	Kestring, et al., 2009.
<i>M. hamata</i>	Antimicrobiano e antiviral	ácido gálico; flavonoides; saponinas	Jain, et al., 2004.
<i>M. hostilis</i>	Induz alucinações (raízes)	diterpenos raminosídeos - mimosina B e C; n,n-dimetiltriptamina; taninos condensados	Ohsaki, et al., 2006.
<i>M. invisa</i>	Atividades antitumoral, antimicrobiano, diurético, anti- inflamatória e imunomoduladora (folhas)	composto fenólico; 4-hidroxi-3-metoxi benzaldeído; 4-hidroxi-3,5-dimetoxi benzaldeído; ácido 4-hidroxi-3-metóxi benzóico; lignana; pinoresinol; β -sitosterol; lupeol; α -amirina; caenferol; apigenina; acacetina.	Chandrika, et. al., 1987; Largo Júnior, et. al., 1997; Aguiar, 2006.
<i>M. opthalmocentra</i> Mart. ex Benth.	Propriedades antioxidantes (folhas); contra bronquite e tosse (casca do caule); alucinógeno (raiz)	esteróides β -sitosterol; n-metiltriptamina; hordenina	Batista, et al., 1999; David, et al., 2007; Agra, et al., 2007.
<i>M. paraibana</i>	Atividade citotóxica e antioxidante (partes aéreas)	esteróides β -sitosterol e estigmasterol; 15-hidroxi- feofitina A; 5,7-dihydroxiflavanona; 3,4,5- trihidroxibenzoato de etila; ácido <i>p</i> -cumárico	Nunes, et al., 2008.
<i>M. pigra</i>	Estimulam a proliferam de tímócitos em ratos e esplenócitos <i>in vitro</i> (folhas). Contraceptivo (raízes)	kaempferol; quercetina; apigenina; acacetina; triterpeno glicosídeo	Englert, et al., 1995; Yusuf, et al., 2003; Sanz-Biset, et al., 2009.
<i>M. scabrella</i>	Atividade antiviral (herpes e rotavirus) e citotoxicidade em células HELA (sementes); Alivia pruridos (cascas); Estimulante digestivo e para problemas circulatórios (folhas)	polissacarídeo galactomananas; glicídios; trigalactosil- pinitol; taninos; diclorometânico amoniaco triptamina; <i>n</i> -metiltriptamina; 2-metil,1,2,3,4-tetraidro- β -carbolina; n,n-dimetiltriptamina	Marquesini, et al.,1995; Moraes et al., 1990; Vendruscolo, et al., 2009; Chrestani. et al., 2009; Noletto, et al., 2009.
Espécies de	Propriedades farmacológicas	Compostos químicos	Referências

Mimosa			
<i>M. pudica</i>	Antimicrobiana e antioxidante (folhas); Atividade inibitória de letalidade; combate o edema, cicatrizante e anti-inflamatório (raízes e cascas); Regulador hormonal (raízes); Anticolinesterásica (planta inteira); Hiperglicemiante (folhas); Insônia, enxaqueca, problemas pulmonares e tuberculose (folhas, cascas)	c-glicosilflavonas; 2-flavonas glicosiladas; Presença de esteróides; taninos; mimosina; β -sitosterol; ácido linoléico mimopudine; 7,3, 4'-trihydroxy 3,8-dimetoxi flavona; <i>p</i> -cumárico; lupeol	Ueda, et al., 1999; Amalraj, et al., 2002; Lobstein, et al., 2002; Jeong, et al., 2004; Bum, et al., 2004; Arima, et al., 2006; Ganguly, et al., 2007; Yuan, et al., 2007; Sukanya et al., 2009; Meenatchisundaram, et al., 2009; Kokane, et al., 2009.
<i>M. somians</i> e <i>M. lutens</i>	Propriedades psicoativas (planta inteira)	triptamina; n-metiltriptamina	Gupta, et al., 1979.
<i>Mimosa sp.</i>	Antioxidante (folhas) Antitumoral (folhas, frutos e caule)	flavonoide aglicona; quercetina 7-metil, éter	Yusuf, et al., 2003; Schmourlo, et al., 2005
<i>M. tenuiflora</i>	Combate a ulceração de veias e cicatrizante (cascas); Antimicrobiano (pequenos ramos); Anti-inflamatório (folhas) e contra bronquite e tosse (casca do caule)	arabinogalactana; chalcona; saponina esteroidal monodesmospídica; triterpenos	Dominguez, et al., 1989; Jiang, et al., 1991; Ameida, et al., 2005; Agra, et al., 2007; Rivera-Arce, et al., 2007; Souza, et al., 2008; Zippel, et al., 2009;
<i>M. verrucosa</i> e <i>M. negra</i>	Tratamento da asma, efeitos narcotizantes, sedativo e propriedades antioxidantes (folhas, cascas do caule)		Desmarchelier, et al., 1999.

3.2 ANTI-INFLAMATÓRIOS E ANALGÉSICOS

Os medicamentos anti-inflamatórios e analgésicos constituem um grupo heterogêneo de compostos que, em muitos casos, não estão relacionados quimicamente, porém compartilham de algumas ações terapêuticas e efeitos colaterais. O protótipo é a aspirina que foi introduzida na medicina em 1899 por Dreser. O nome aspirina parece ter sido derivado da *Spiraea*, espécie de planta a partir da qual o ácido salicílico foi preparado durante algum tempo (GOODMAN e GILMAN, 2007).

Embora existam evidências seguras de que as doses terapêuticas da aspirina reduzem a biossíntese das prostaglandinas nos seres humanos e haja uma correlação razoavelmente direta entre a potência desse medicamento como inibidor da ciclooxigenase e sua atividade anti-inflamatória, a indometacina é uma exceção notável porque ela é mais potente nos testes anti-inflamatórios do que no ensaio de inibição enzimática. No entanto, muitos estudos indicam que a inibição da síntese das prostaglandinas é o mecanismo principal das ações terapêuticas dos medicamentos anti-inflamatórios (GOODMAN e GILMAN, 2007).

As drogas anti-inflamatórias não esteroidais (DAINES), além de anti-inflamatórios, são analgésicos suaves sendo eficazes somente contra dor moderada. Este efeito é analgésico provavelmente devido à prevenção da sensibilização do nociceptor, já que reduz a liberação dos mediadores químicos. O uso de DAINES para reduzir a dor e a inflamação de condições tais como artrite reumatóide e osteoartrite também é benéfico sob o ponto de vista de uso a curto prazo (SIDDALL e COUSINS, 1995).

Segundo Calixto e colaboradores (2005), o objetivo de conhecer melhor a inflamação iniciou as tentativas de reproduzir o fenômeno experimental. Observações microscópicas permitiram entender a participação da circulação e das células sanguíneas no fenômeno, logo a utilização de modelos experimentais, a aplicação de culturas de células para reproduzir *in vitro* alguns fenômenos inflamatórios e a utilização de técnicas de biologia molecular permitiu caracterizar melhor o processo inflamatório e as substâncias químicas que dele participam.

3.5 CÂNCER E INFLAMAÇÃO

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) o câncer é o nome dado a um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos, os quais podem espalhar-se para outras regiões do corpo. Porém a definição bioquímica para esta doença é uma perda do controle dos mecanismos de proliferação, diferenciação e morte celular (MOFFAT et al., 2000).

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente e o mais comum entre as mulheres. A cada ano, cerca de 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama. Já em homens o tipo mais frequente é o câncer de próstata. Em termos de valores absolutos, o câncer de próstata é o sexto tipo de câncer mais comum no mundo e o mais prevalente em homens, representando cerca de 10% do total de câncer (INCA, 2010).

Em 1863, Virchow propôs que o câncer se desenvolve em locais de inflamação crônica, e desde então as relações potenciais entre câncer e inflamação foram estudadas. Isto pode ser exemplificado pela observação do maior risco de desenvolvimento do câncer nos pacientes afetados por diversas doenças crônicas inflamatórias do aparelho gastrointestinal, como por exemplo, gastrite causada pelo *Helicobacter pylori* e hepatite viral (KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2004).

Por outro lado, estudos epidemiológicos demonstram que anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) diminuem o risco de câncer pela inibição da COX-2. A elevada expressão da COX-2 em células tumorais tem efeitos como alteração das células de adesão da matriz extracelular, desregulação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e resistência da indução à apoptose (SUBHASHINI, 2005). Recentes estudos demonstram uma possível correlação entre a superexpressão da COX-2 e a perda da regulação da apoptose em resposta à superexpressão desta enzima (SUBHASHINI et al., 2005).

A correlação entre a inflamação e carcinogênese ocorre da seguinte maneira: fosfolípidios de membrana são convertidos em ácido araquidônico pela

enzima fosfolipase. A COX-2 converte este em prostaglandinas e tromboxanos. Estes mediadores da inflamação formados podem ativar a carcinogênese uma vez que aumentam a expressão de Bcl-2 (uma das proteínas antiapoptóticas), VEGF (mediador que exerce papel chave na angiogênese) e metaloproteinases (também associadas ao processo de vascularização do tecido tumoral) (DEMPKE et al., 2001; WARIS, SIDDIQUI, 2005). Além disso, a elevação da produção de Prostaglandina E2 (PGE2) reduz a morte celular e pode regular positivamente a proliferação de células tumoral (LIM et al., 2001; DEMPKKE et al., 2001).

Sendo assim a alta expressão da COX-2, a qual é ativada pelo fator de transcrição NFkB, sinaliza para a sobrevivência celular (resistência à apoptose), produção de mediadores inflamatórios e proliferação celular (expressão de ciclinas) (WARIS, SIDDIQUI, 2005).

Em termos de avanços moleculares da oncologia, tem sido centrado interesse nessa modulação da atividade e expressão da COX-2. O potencial dos inibidores de COX-2 em induzir a apoptose, inibir a angiogênese e o crescimento tumoral têm sido descrito por muitos trabalhos, sendo, portanto importante alvo molecular para novas terapias antitumorais. (KOKOGLU et al., 1998; SHONO et al., 2001; LIM et al., 2001).

3.6 ANTIMICROBIANOS

Antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias. Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (GUIMARÃES et al., 2010).

A partir de 2000, poucos antibióticos foram introduzidos para a terapêutica antimicrobiana. Em 2001, apenas um antibiótico de origem sintética da classe das oxazolidinonas foi introduzido no mercado farmacêutico, a linezolida. Os programas de descoberta de antibióticos de fontes naturais têm sido retomados em algumas indústrias farmacêuticas, levando à aprovação do lipopeptídeo natural daptomicina pelo FDA em 2003 (GUIMARÃES et al., 2010). O Fluconazol, droga padrão utilizada no ensaio para fungos, apresenta boa atividade antifúngica sobre

as espécies de *Candida* e *Cryptococcus neoformans*, porém há relatos de diminuição de sensibilidade de algumas espécies de *Candida não-albicans*, frente ao fluconazol. Apesar de sua utilização ser bem tolerada no tratamento de pacientes, o fluconazol pode desencadear a síndrome de Stevens-Johnson principalmente em população portadora do HIV com alto risco de desenvolver AIDS e pacientes oncológicos (CATÁLAN; MONTEJO, 2006), sendo o primeiro medicamento de escolha no tratamento da candidíase em imunodeprimidos devido à alta tolerabilidade e limitado número de interações medicamentosas (EGIMANN et al., 2003).

O Cloranfenicol, segundo a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), tem sido usado no tratamento de infecção por enterococos resistentes à vancomicina. Pode também ser utilizada nas salmoneloses, principalmente na febre tifóide. É alternativa no tratamento de meningite bacteriana e epiglote, artrite séptica e osteomielite por *Haemophilus influenzae* em pacientes alérgicos aos β -lactâmicos. Indicado no tratamento de rickettsioses ou erlichiose. No entanto, pode exibir como efeitos colaterais, toxicidade hematológica com reticulocitopenia, podendo evoluir para anemia, granulocitopenia e trombocitopenia. Também pode apresentar-se como anemia aplástica irreversível e outras formas graves de toxicidade, como a Síndrome do Bebê Cinzento (BRASIL, 2011).

Portanto, a avaliação do potencial biológico dos produtos naturais tem sido uma alternativa para tratamento de enfermidades, e tem despertado grande interesse por parte dos pesquisadores, em decorrência dos crescentes problemas associados ao uso indiscriminado de antibióticos, seus efeitos colaterais, bem como o aumento da resistência de microrganismos pelo uso do mesmo, o alto custo, entre outros paradigmas da saúde pública (DAVIS, 1994). Não somente os pesquisadores objetivam descobrir novos antimicrobianos, mas também as indústrias farmacêuticas têm incentivado essa busca, pois os medicamentos produzidos a partir de plantas medicinais são desenvolvidos em menor tempo, por metodologias menos complexas, e na maioria das vezes, possui menor custo que os sintéticos. Vale ressaltar que também, são possíveis candidatos a protótipos para produção de novos fármacos (FERREIRA, 2001).

4 PARTES EXPERIMENTAIS

Folhas de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Mimosoideae) foram coletadas em fevereiro de 2010 próximas as localidades da Fazenda do Rosa, situado no município de Alfenas-MG (21°24'44,1" S, 45°55'19,9" W). O material foi coletado sob duas formas: a) material florido para preparação de exsiccatas e envio para a identificação taxonômica que foi realizada pelo Herbário da Universidade Federal de Alfenas (Departamento de Taxonomia) onde as mesmas foram depositadas sob o número 695. b) coleta das folhas para as etapas farmacobotânica, farmacognóstica e biológica previstos no projeto.

As partes coletadas da espécie vegetal foram previamente divididas, separadas e dispostas em camadas finas sendo submetidas à secagem em estufa de ar circulante a 45°C. A temperatura da estufa foi controlada por um termostato e um termômetro, os quais garantiram uma homogeneidade na temperatura utilizada durante a secagem. A perda da água foi monitorada por pesagens consecutivas em balança analítica, até que o peso permaneceu constante.

4.1 ETAPA FARMACOBOTÂNCIA

A caracterização macroscópica das folhas foi realizada à vista desarmada e por meio de observação com o auxílio de microscópio estereoscópico, quando necessário, segundo os parâmetros descritos por Oliveira et al. (1998) e por Oliveira & Akisue (2000), avaliou-se a textura, coloração, tamanho, cheiro e nervações.

Para análise microscópica foram confeccionadas lâminas semipermanentes e permanentes. As lâminas semipermanentes foram preparadas a partir de material seccionado nos sentidos transversal, longitudinal e paradérmicas, à mão livre, com lâmina cortante, em folíolos adultos e os cortes corados com Azul de Toluidina (O'BRIEN et al., 1964) ou com Azul de Astra (ROESER, 1972). Para o preparo de lâminas permanentes utilizou-se a técnica de inclusão em glicolmetacrilato (FEDER & O'BRIEN, 1968), de acordo com as indicações do fabricante (Leica®), onde as secções foram clarificadas com

hipoclorito de sódio a 20%, lavadas em água destilada, coradas com de Azul de Astra (O'BRIEN et al., 1964) e montadas entre lâmina e lamínula com glicerina a 50%. Após a montagem, procedeu aos estudos anatômicos com auxílio de microscópio luz.

A análise em Microscopia Eletrônica de Varredura foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-estrutural (LME) no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, MG, seguindo o protocolo padrão do laboratório descrito por Alves (2004). Amostras de *M. caesalpiniiifolia* foram colocados em microtubos com capacidade para 1,5mL, contendo fixador Karnovisksy até cobrir as amostras e levados para geladeira por um período mínimo de 24 horas. Após, esses foram retirados do fixador e transferidos para glicerol 30% por 30 minutos. Em seguida, imersos em recipiente plástico contendo nitrogênio líquido e cortados com bisturi sobre uma placa de metal, imersa em um recipiente plástico, também contendo nitrogênio líquido. Seccionadas transversalmente, as amostras (aproximadamente 15 secções) foram colocadas em microtubos contendo água destilada. Posteriormente, foram imersas em tetróxido de ósmio 1% em tampão por duas horas à temperatura ambiente. Subseqüentemente as amostras foram lavadas com água destilada por três vezes e desidratadas em uma série de acetona (25%, 50%, 75%, 90% 10 minutos cada e 100%, por três vezes de 10 minutos). Em seguida, levadas ao aparelho de ponto crítico Balzers CPD 030, para substituição da acetona por CO₂ com o objetivo de completar a secagem. Sem umidade, as amostras foram cuidadosamente montadas em Stubs (cilindro de alumínio com 12 mm de diâmetro, coberto com fita de carbono para aderência das amostras) e submetidas à metalização com ouro, no vaporizador Balzers SCD 050, para aumentar a condutividade dos elétrons no momento das análises com MEV Leo Evo 40.

4.2 ETAPA FARMACOGNÓSTICA

O material passou por uma divisão grosseira seguida por uma pulverização obtida em moinho de facas com uma peneira de 3 mm de diâmetro, dando origem a 3071,52 g de pó. Este processo objetivou reduzir o tamanho das partículas de modo a aumentar, posteriormente, seu contato com o líquido extrator.

4.2.1 Caracterização física do pó das folhas de *M. caesalpinifolia*

A análise granulométrica do pó foi baseada na Farmacopéia Brasileira (2010) e com o objetivo de analisar a granulometria do pó obtido do material vegetal, foi utilizado 85,13 g do pó das folhas moídas e foram submetidos à passagem forçada por vibração, através de tamises com abertura de malhas correspondentes a 125; 180; 250; 500; 710 e 850 μm , utilizando-se o Agitador de Peneiras – Eletromagnético (ErTel®), para a análise granulométrica o pó passou por várias escalas de vibrações e tempo, sendo a escala nove do aparelho a melhor apresentada, devido o pó possuir uma espessura semi-fina, num tempo de quinze minutos. Após este processo, as frações foram retiradas dos tamises e do coletor e quantificadas quanto às suas proporções. Este procedimento foi realizado em triplicata. Para os estudos de passagem e retenção a partir da quantidade de pó recolhida de cada tamis, foram elaboradas planilhas no software Excel®, onde foram calculadas as frequências percentuais e também as frequências percentuais cumulativas.

4.2.2 Densidade aparente do pó - Método da proveta

O pó das folhas foi transferido para uma proveta de 25 mL, com peso conhecido, até completar o volume de 15 mL. Durante a transferência foram removidas as partículas de ar que estavam presentes entre o pó da planta. Em seguida, a proveta contendo o pó foi pesada, e pela diferença de pesos, foi obtida a quantidade de pó contido na proveta. Com essas informações, o peso do pó dividido pelo volume (15 mL), foi calculado a densidade. Este procedimento foi realizado em triplicata (LACHMAN, 2001).

4.2.3 Método do peso médio das cápsulas

Para determinar a densidade aparente do pó, foram amostrados 50 g do pó, os quais foram distribuídos em encapsulador contendo 25 cápsulas de tamanho 00. Em seguida, o peso foi determinado e a densidade calculada pela relação massa/volume do pó. Este procedimento foi repetido três vezes com três amostras distintas (MARTINS & SACRAMENTO, 2004).

4.2.4 Perda por secagem das folhas frescas de *M. caesalpinifolia*

Cerca de 10,0 g, exatamente pesados, das folhas fresca do vegetal foram colocados a secagem em estufa de ar circulante a 45°C. Foram pesados diariamente até peso constante. Os resultados foram expressos em perda de substâncias voláteis e/ou água percentual, pela média de cinco determinações (MELLO e PETROVICK, 2000).

4.2.5 Determinação da perda por dessecação do pó obtido após a moagem das folhas de *M. caesalpinifolia*

Amostras de 2,0 g de droga vegetal pulverizadas foram exatamente pesadas, em pesa-filtros previamente tarados, e colocadas em estufa por 2 horas, à temperatura de 105°C. Após resfriamento em dessecador, os pesa-filtros foram pesados e recolocados em estufa por mais 30 minutos. Este procedimento foi repetido até que peso não variasse mais que 0,25%. Os resultados foram expressos em porcentagem (p/p) pela média de três determinações (MELLO e PETROVICK, 2000).

4.2.6 Determinação do teor de cinzas totais

Foi calcinado previamente o cadinho de porcelana em mufla à 450°C por 30 minutos. O mesmo foi resfriado em dessecador (15 minutos) e seu peso foi determinado em balança analítica. Foram pesados exatamente 3,0 g do material

vegetal triturado, os quais foram distribuídos de maneira uniforme e, submetidos à calcinação em mufla à temperatura de 450°C por duas horas. Foi deixado em dessecador para arrefecimento durante 30 minutos e pesagem posterior. Os resultados foram expressos em porcentagem em peso de cinzas na droga seca (% p/p) e representando a média de três determinações (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

4.2.7 Determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido

A cinza obtida no item 5.5.3, foi fervida com 25 mL de ácido clorídrico a 10%, e o precipitado foi recolhido em um papel de filtro isento de cinza e lavado com água quente. O papel de filtro mais o resíduo foram incinerados a uma temperatura de 800°C até peso constante. O resultado foi expresso em porcentagem em peso de cinzas insolúveis em ácido (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

4.2.8 Determinação do teor de resíduo seco

Uma amostra de 20,0 g da solução extrativa foi exatamente pesada em pesa-filtro, previamente tarado, e evaporada até seca em banho de água, sob agitação constante. O pesa-filtro foi colocado em estufa por 2 horas à temperatura de 105°C. Passado duas horas, o pesa-filtro foi resfriado em dessecador e pesado novamente. O resultado foi expresso em relação a 100 g do extrato, pela média de três determinações (USP, 2003).

4.2.9 Determinação do teor de extrativos em etanol

Exatamente 2 g de pó vegetal foram transferidos para o cartucho de um extrator de Soxhlet, previamente tarado e seco. No balão do extrator foram colocados 200 mg de hidróxido de sódio e 500 mL de etanol absoluto. Após cinco horas, quando o processo de extração foi encerrado, o cartucho com o resíduo foi retirado e seco em estufa a 105 °C, por 30 min. Pesou-se o resíduo seco e

calculou-se o teor de substâncias extraíveis por etanol por diferença entre o peso da amostra e o peso do resíduo seco (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

4.2.10 PREPARO DO EXTRATO E OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES

Para a obtenção do extrato bruto utilizou-se o método de extração exaustivo de percolação simples desenvolvida segundo Prista et al. (2002). O líquido extrator utilizado foi mistura hidroalcoólica a 70% (v/v). O percolado obtido foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida com temperatura máxima de 40 °C até completa eliminação do solvente orgânico e depois foi liofilizado até eliminação da água.

Para obtenção das frações, aproximadamente quatro gramas do extrato seco foram dissolvidas em 300 mL de água. A mistura foi submetida ao processo de extração líquido-líquido (partição). O acetato de etila (Fr-EtOAc) (100 mL por três vezes) foi o primeiro solvente a ser parcionado com a mistura (água + extrato), em seguida foi feito o mesmo procedimento com o butanol (Fr-BuOH) (100 mL por três vezes) e finalmente a fração aquosa (Fr-AqOH). Após a extração a Fr-EtOAc, Fr-BuOH foram eliminadas por rotavapores e a Fr-AqOH liofilizada.

4.2.11 ANÁLISES QUÍMICAS DAS FOLHAS *M. caesalpinifolia*

As análises cromatográficas foram feitas em placas de sílica gel 60 em diferentes sistemas de solventes clorofórmio/metanol/*n*-propanol/água, 5:6:1:4 (v:v:v:v) e clorofórmio/metanol 85:15 (v:v).

Os flavonoides foram identificados por sua coloração intensa em luz UV (254 nm) quando revelados com NP/PEG no sistema de solventes clorofórmio/metanol (85:15, v:v) (WAGNER et al., 1984). Foram utilizados padrões autênticos (Sigma) dos flavonoides (quercetina, catequina e rutina). Os testes para taninos foram realizados segundo os procedimentos descritos por Simões et al. (2006) por meio da reação com a gelatina e Schneider (1990) na reação com sais de ferro. Utilizou-se também, vapores de iodo e soluções de CeSO₄ (saponinas e terpenoides), Iodoplatinato (alcaloides), vapores de amônia (antraquinonas e

cumarinas) e anisaldeído/ácido sulfúrico (flavonoides, saponinas, terpenos, esteroides, ácidos gálico e catequinas) (WAGNER et al., 1984).

4.2.12 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A avaliação do poder seqüestrante de radicais DPPH desenvolveu-se a metodologia semelhante à proposta na literatura (BOUCHET et al., 1998; CAVIN et al., 1998). As amostras foram depositadas em placas cromatográficas e os resultantes foram então autografados com solução de β -caroteno a 0,05% (Sigma) em clorofórmio (Merck). Após cerca de três horas, o β -caroteno é oxidado pelo oxigênio atmosférico, numa reação fotoquímica, e a placa cromatográfica volta à sua cor original, com exceção das manchas onde existem substâncias com atividade antioxidante, que continuam com a coloração amarela, evidenciando o efeito protetor dessas substâncias sobre o β -caroteno. Outro ensaio realizado para investigar a propriedade antioxidante de substâncias envolvendo o uso de radical livre DPPH também foi realizado, a placa foi pulverizada com solução de DPPH (4 mg/100mL) em metanol, segundo Wagner et al., 1984 e Simões et al., 2006. A fase móvel utilizada foi a MeOH/CHCl₃/H₂O/nPOH.

No ensaio espectrofotométrico a atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico 70% as folhas de *Mimosa caesalpinifolia* (EHM) e as Fr-EtOAc, Fr-BuOH e Fr-AqOH foram avaliadas pelo método do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) (YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007; AMAROWICZ et al., 2004). Nesse método é preparada uma solução de 45 μ g/mL de DPPH em metanol. As amostras são preparadas adicionando-se 1 mL desta solução de DPPH a 2,5 mL de soluções das fases diluídas em metanol a concentrações de 5, 10, 25, 50, 125 e 250 μ g/mL. Após 30 minutos, a absorbância da solução resultante foi lida em espectrofotômetro em 517 nm. Foram utilizados como padrão o ácido ascórbico (AA) e como branco o BHT (2 mg de BHT em 4 mL de MeOH com 0,5 mL de solução de DPPH). Todas as leituras foram realizadas em triplicata e, com a média dos dados obtidos foi calculada a diferença de absorbância entre a amostra e o controle negativo e as atividades antioxidantes percentuais foram obtidas por regressão linear, logarítmico ou exponencial para cada fase, chegando-se assim à

concentração necessária para se obter 50 % do efeito antioxidante máximo estimado de 100 % (IC₅₀) (MENSOR et al., 2001).

As atividades seqüestrastes de DPPH das fases foram expressas em porcentagem, segundo a equação:

$$(\%) = 100 - [(Ac - At) \times 100] / Ac$$

Onde: Ac = absorvância do controle; At = absorvância das amostras com diferentes concentrações.

4.2.13 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS EM EXTRATO DE HIDROALCOÓLICO 70% (EHM) E DAS Fr-EtOAc, Fr-BuOH E Fr-AqOH OBTIDOS DAS FOLHAS DE *M. caesalpinifolia*

O teor de polifenóis totais (PT) no EHM, Fr-EtOAc, Fr-BuOH e Fr-AqOH foi estimado por ensaio colorimétrico baseado nos procedimentos descritos por Glasl, (1983), com algumas modificações (YAMAGUTI-SASAKI, 2007). Cerca de 0,134 g de EHM, 0,086g de Fr-EtOAc, 0.027g de Fr-BuOH e 0,123g de Fr-AqOH foram dissolvidos em água (250 mL; SM), respectivamente. Uma alíquota de 5 mL foi diluída em água para 25 mL. Uma alíquota de 2 mL foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL com 1 mL de reagente fenol de Folin-Ciocalteu e 10 mL de água, e o volume completado com solução de carbonato de sódio a 14%. Após 15 minutos foi medida a absorvância a 691 nm (PT). A água foi utilizada como branco. A porcentagem de polifenóis totais foi determinada, em triplicata, como segue:

$$PT (\%) = 15625 \cdot Abs / 100 \cdot m$$

Onde: PT = polifenóis totais (%); Abs = absorvância; m = massa (g) de EHM, Fr-EtOAc, Fr-BuOH ou Fr-AqOH.

4.2.14 Detector de arranjo de fotodiodo

O EHM, Fr-EtOAc, Fr-BuOH e Fr-AqOH das folhas de *M. caesalpinifolia* foram submetidos ao *clean up*. Para tal 15,0 mg de cada um deles foram ressuspensos

em 1 mL de H₂O/MeOH (9:1, v/v) e submetidas à extração em fase sólida (SPE) em cartuchos (Supelco®) de fase reversa (C18) com 500 mg de adsorvente, ativados com 4 mL de MeOH e equilibrados com 5 mL de H₂O. Coletou-se-se a fração eluída em H₂O/MeOH (9:1, v/v). O volume final da fração foi de 5 mL. Em seguida, a fração do extrato e das frações foram filtradas em disco de 0,45 µm de poro (Millipore®) e analisadas por HPLC-PDA no Laboratório do Instituto de Química – IQ da UNESP de Araraquara/SP.

4.2.15 Espectrômetro de massas

Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro de massas LCQ Fleet da Thermo Analítica, equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo contínuo (FIA). O EHM e as Fr-EtOAc, Fr-BuOH e Fr-AqOH foram analisadas no modo de ionização por electrospray (ESI) e as fragmentações em múltiplos estágios (MS₂, MS₃) realizadas em uma interface do tipo ion-trap (IT). O modo negativo foi escolhido para a geração e análise dos espectros de massas em primeira-ordem (MS), bem como para os demais experimentos em múltiplos estágios (MS_n), sob as seguintes condições: voltagem do capilar -4 V, voltagem do spray -5 kV, temperatura do capilar 280 °C, gás de arraste (N₂) fluxo 60 (unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi m/z 50-1000, com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectrômetro de massas LCQ. O primeiro evento foi uma varredura completa (full-scan) do espectro de massas para adquirir os dados dos íons na faixa m/z estabelecida. Os demais eventos foram experimentos MS_n realizados a partir dos dados da primeira varredura para íons precursores pré-selecionados com energia de colisão entre 25 e 30% da energia total do instrumento. O software Xcalibur versão 1.0 (Thermo Scientific®) foi utilizado durante a aquisição e processamento dos dados espectrométricos, análise realizado no Laboratório do Instituto de Química – IQ da UNESP de Araraquara/SP.

4.3 ETAPA BIOLÓGICA

Na avaliação microbiológica foi avaliada as concentrações inibitórias de 50% do crescimento (IC_{50}) e 100% (IC_{100}). As determinações do perfil de sensibilidade foram realizadas de acordo com a metodologia de microdiluição em meio RPMI 1640 para leveduras conforme protocolo M27A3 (CLSI, 2008) e microdiluição em caldo Mueller Hinton para bactérias conforme protocolo M7A6 (CLSI, 2003).

4.3.1. Derivados analisados

Extrato hidroalcoólico 70% das folhas (EHM) (10%, m/v); Frações acetato de etila (Fr-EtOAc), butanólica (Fr-BuOH) e aquosa (Fr-AqOH) do extrato etanol 70% das folhas. As amostras foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO). As soluções em DMSO foram diluídas 100 vezes no meio de cultura utilizado no ensaio, reduzindo a concentração final do solvente para 1%. O DMSO nesta concentração e sem os derivados foi utilizado no ensaio como controle da diluição.

As amostras foram testados em 10 concentrações ($\mu\text{g/mL}$): 1000; 500; 250, 125, 100, 80, 40, 20, 10 e 5.

4.3.2 Microrganismos avaliados

Os ensaios foram realizados sobre leveduras e bactérias padrões *American Type Culture Collection* (ATCC).

Leveduras do gênero *Candida*: *Candida albicans* ATCC 64548, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida tropicalis* ATCC 750.

- **Bactérias Gram positivas:** *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538); *Bacillus cereus* (ATCC 11778).

- **Bactérias Gram negativas:** *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027).

As amostras de bactérias foram mantidas em agar BHI e os fungos, em agar Sabouraud, a 8°C, até o momento de realização dos testes.

4.2.3 Controles do ensaio

Os meios de cultura RPMI 1640 e Mueller Hinton acrescidos de DMSO nas mesmas concentrações finais propostas para os derivados foram utilizados como controle negativo. As drogas padrões utilizadas como controle positivo no teste foram o antifúngico Fluconazol (nas concentrações em µg/mL: 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125) e o antibiótico Cloranfenicol (nas concentrações em µg/mL: 125; 62,5; 31,2; 15,6; 3,9; 1,95; 0,975; 0,487; 0,122; 0,06). Os ensaios foram realizados em duplicata.

4.3.4 AVALIAÇÃO CITOTÓXICA PARA ADENOCARCINOMA MAMÁRIO HUMANO MCF-7

Para a realização dos experimentos foram utilizadas linhagens em cultura de células tumorais humanas de mama MCF-7. As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI, com 20% de soro fetal bovino e 100 U/mL de penicilina. Estas foram cultivadas em placas de 96 poços (1×10^5 cel/mL) e inativada à 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

4.3.4.1 Citotoxicidade celular

Foram inoculados 100 µL de células em RPMI SFB, nas suas respectivas densidades de inoculação, em placas de 96 compartimentos e incubadas à 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após 24 horas, o EHM e as Fr-EtOAc, Fr-BuOH e Fr-AqOH foram adicionadas em concentrações de 5, 20, 80, 160 e 320 µg/mL. Após 48 horas as células foram fixadas com 50 µL de ácido tricloroacético à 50% à 4 °C e incubadas por 1 hora à 4 °C. Em seguida as placas foram lavadas com água destilada e mantidas em temperatura ambiente até a secagem. A coloração foi então realizada pela adição de 50 µL de sulforrodamina B (proliferação) à 0,4 % dissolvido em ácido acético à 1%, durante um período de 30

minutos. As placas foram incubadas à 4 °C, lavadas quatro vezes com ácido acético à 1% e secas novamente em temperatura ambiente. O corante foi solubilizado com solução de Trizma base (10 µM, pH 10,5) e a leitura espectrofotométrica realizada em 540 nm em um leitor de microplacas (VICHAI, 2006). A coloração com hematoxilina-eosina foi feita para a análise morfológica (PEDRO, 2006). A análise em Microscopia Eletrônica de Varredura foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-estrutural (LME) no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, MG, seguindo o protocolo padrão do laboratório descrito por Alves (2004).

4.3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNIFAL-MG e mantidos em câmaras com temperatura controlada ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) em ciclos claro-escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*. Foram utilizados ratos *Wistar* machos adultos (160-170g) aclimatados às condições do laboratório por 7 dias, sendo agrupados ao acaso, em grupos de até 6 animais submetidos a jejum de 12 horas.

4.3.5.1 Teste do granuloma

Grupos de seis animais foram divididos em:

- Grupo tratado com EHM 30, 100 e 300 mg/kg;
- Grupo tratado com Fr-EtOAc 30 e 100 mg/kg;
- Grupo tratado com Fr-EtOAc 30 e 100 mg/kg;
- Grupo tratado com Fr-AqOH 30 e 100 mg/kg;
- Grupo controle positivo tratado com dexametasona 5 mg/kg e
- Grupo controle negativo administrado solução salina.

Administrou-se por via oral, através de sonda intragástrica respectivamente durante sete dias para todos os grupos tratados. Os animais durante o estudo foram mantidos a uma temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, e umidade relativa 50-70% em um ciclo de claro e escuro de 12/12 horas. Tiveram livre acesso ao alimento (dieta padrão para roedores) e água. Todos os procedimentos

foram realizados segundo recomendações do Comitê Internacional para os cuidados dos animais e estão em acordo com os regulamentos nacionais estabelecidos para a experimentação animal.

Implante dos blocos de algodão

Os blocos de algodão com peso aproximado de 40 ± 5 mg foram secos a 60°C durante 18 horas em estufa, posteriormente foram anotados os pesos e esterilizados em autoclave. Utilizando a metodologia descrita por Bailey (1982), os animais foram pesados e em seguida, injetados tiletamina (50 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg) por animal, por via IM. A região abdominal do rato foi lavada com sabão, raspada e desinfetada com solução anti-séptica PVPI. Fez-se uma incisão em torno de 6 mm na linha média da zona ventral, posteriormente separou-se cuidadosamente a derme da parede do peritônio e com o auxílio de uma pinça hemostática reta realizou-se túneis até as laterais, de uma amplitude aproximada de 1 cm e longitudinalmente de 5 cm, pela qual se introduziu o bloco de algodão.

Uma vez situado o bloco no final do túnel, o mesmo foi fechado com um ponto externo para que o bloco de algodão não se deslocasse. Repetiu-se o procedimento anterior para as quatro extremidades do abdômen do rato, foram implantados quatro blocos de algodão em cada animal. Ao final dos implantes suturou-se a incisão inicial com pontos de seda cirúrgica. Em seguida, aplicou Nitrofurazona (ungüento) para evitar o canibalismo e proteger os animais de possíveis infecções. Após o ato cirúrgico, os animais foram colocados imediatamente em incubadora a 37°C durante 3 horas (recuperação da anestesia). Posteriormente foram colocados no local de permanência nas condições padrão de trabalho. Para evitar infecções foram mantidos em viruta estéril.

Extração do granuloma

Sete dias depois da implantação do bloco de algodão, os animais foram novamente pesados, e procedeu-se a eutanásia para a extração dos granulomas. Após serem cuidadosamente extraídos, os mesmos foram lavados com solução

fisiológica e colocados em placas de petri. Os granulomas foram secos em estufa a 60°C por 18 horas, e em seguida pesados em balança analítica.

4.3.6 AVALIAÇÃO ANTINOCICEPTIVA

Foram utilizados camundongos *Swiss* (20-25 g) machos e fêmeas provenientes do Biotério da UNIFAL-MG. Os animais fornecidos foram mantidos em câmaras com temperatura controlada ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) em ciclos claro-escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*. Dez horas antes da realização das experiências, os animais foram privados de ração.

4.3.6.1 Teste de Von Frey eletrônico

Nesse ensaio a intensidade do estímulo foi automaticamente registrada quando os animais retiram as patas do transdutor. O estímulo da pata foi repetido até que se conseguisse duas medidas similares. Colocou-se cada camundongo em uma caixa de acrílico (12x10x17 cm de altura) por 30 minutos antes do teste. Durante esse período de adaptação, as patas dos animais foram tocadas 2-3 vezes com a ponta do transdutor e após esse período, a leitura basal foi realizada.

O EHM foi solubilizados em CMC (1%, v/v) e administrado por via oral 1 hora antes da injeção intraplantar de carragenina 100 µg/pata e registrou-se a sensibilidade nociceptiva de cada animal depois de uma e três horas da aplicação da carragenina (CUNHA et al., 2004). As doses administradas do extrato foram de 30, 100 e 300 mg/Kg peso de camundongo (n = 10).

4.3.7 TESTE DA ATIVIDADE EXPLORATÓRIA - TESTE DO CAMPO ABERTO

O modelo do campo aberto tem importante valor para testar agentes farmacológicos que produzem depressão do sistema nervoso central, podendo ainda indicar atividades mais específicas como ação ansiolítica. O procedimento utilizado foi descrito por Walsh & Cummins e colaboradores (1976). O aparato consiste em uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm. O chão da caixa foi dividido em 12 quadrados iguais e os animais foram observados durante 5 minutos,

sendo avaliados a atividade exploratória (número de quadrados cruzados com todas as patas de cruzamentos), o número total do levantar, o número de auto-limpeza e o tempo em que os animais permaneceram parados. Camundongos foram tratados com o EHM (30, 100 e 300 mg/kg, v.o), Fr-EtOAc (30, 50 e 100 mg/kg, v.o), Fr-BuOH (30, 50 e 100 mg/kg, v.o), Fr-AqOH (30, 50 e 100 mg/kg, v.o), diazepam (5 mg/kg, v.o) ou veículo (10 mL/kg, v.o).

4.3.8 TESTE DA TOXICIDADE AGUDA E “SCREENING HIPOCRÁTICO”

Camundongos *swiss* foram divididos em dois grupos de animais adultos e saudáveis (seis machos e seis fêmeas-nulíparas e não grávidas). Em seguida, foram administrados separadamente o EHM e as Fr-EtOAc, Fr-BuOH e Fr-AqOH. Os animais foram tratados com uma dose única de 5000 mg/Kg por animal e o grupo controle foi tratado com salina (10 mL/Kg). Logo em seguida à administração, os animais foram observados durante, 30, 60, 120, 240 e 360 minutos. Após essas observações preliminares, os animais foram acompanhados por um período de 14 dias; nesse período os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais para controle do consumo de água, ração e da excreção de fezes e urina. Foi avaliada diariamente a ocorrência de morte, alterações no peso corporal, pelo e nas mucosas, assim como a presença de diarréias, estereotipia, convulsões ou estado de depressão ou estimulação central. Ao final do ensaio os animais foram sacrificados em câmaras de CO₂ e alguns órgãos biopsiados. Fígado, pulmão, coração e rins foram removidos, analisados macroscopicamente quanto à forma e a possível coloração diferente dos órgãos dos animais controle. Os órgãos foram também pesados em balança analítica para avaliar possíveis alterações em relação ao grupo controle (SOUZA BRITO, 1995).

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em termos de média \pm E.P.M. As comparações entre as médias foram realizadas através da ANOVA uma via, seguida do pós-teste de Student-Newman-Keuls ou Dunnett. Valores de *p* menores

que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. As análises foram realizadas por software estatístico (GraphPad InStat®).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados e discussões visam as etapas Farmacobotânica, Farmacognóstica e Biológica das folhas de *M. caesalpinifolia* Benth..

5.1 ETAPA FARMACOBOTÂNICA

Do ponto de vista macroscópico as características das folhas recompostas e folíolos citadas para a espécie *Mimosa caesalpinifolia* Benth., em levantamento realizado por Carvalho (2007), foram confirmadas neste trabalho. As folhas recompostas e folíolos apresentam características próprias, contudo exibindo tamanhos e formas variadas. São constituídos por pecíolo, peciólulo, caule, raque, folíolos, limbo que constitui a parte da folha propriamente dita (Figura 3A), bainha, estípula e normalmente com presença de acúleos (Figura 3B) e pulvino (Figura 3C).

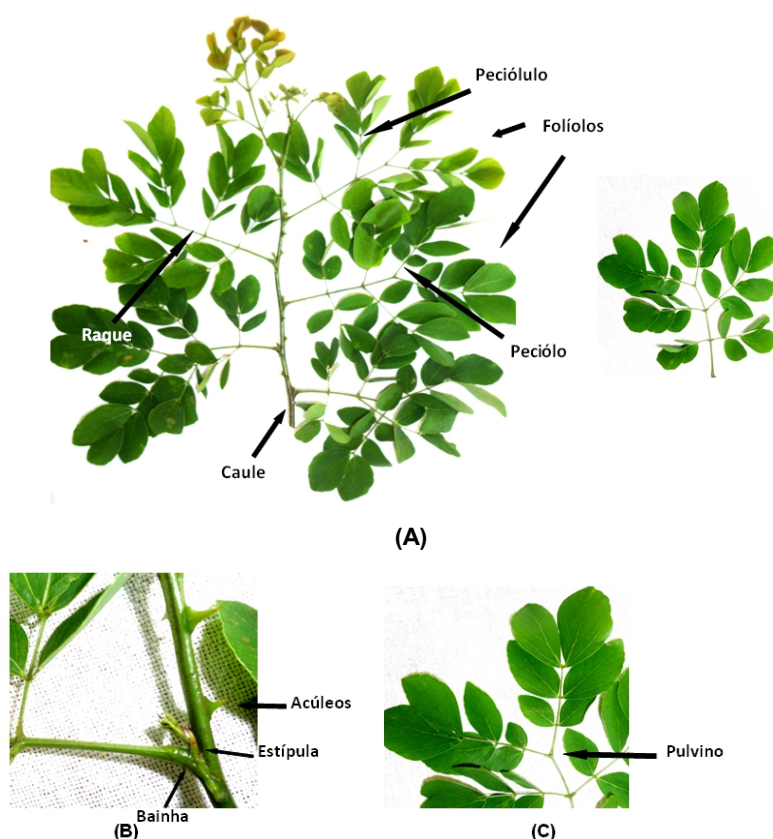


Figura 3 - *Mimosa caesalpinifolia* Benth.: A. Folhas compostas em folíolos ou pinas; B. Disposição dos acúleos, estípula e bainha; C. Presença de pulvino.

O pulvino (Figura 3C), estrutura responsável por movimentos foliares, rápidos ou lentos, em resposta a estímulos externos ou endógenos, constituem uma característica marcante das leguminosas. Os ajustes no posicionamento foliar representam um mecanismo eficiente que permite a maximização da fotossíntese em condições adversas. Segundo Rodrigues e Machado, (2006), a maioria das informações sobre a estrutura de pulvino refere-se a poucas espécies de leguminosas, especialmente aquelas que apresentam movimentos rápidos.

Os folíolos são duplamente divididas com desenhos que lembram cauda de peixe. Os folíolos partem da nervura central ou raque, conferindo à planta aspecto característico, o que ajuda na identificação da *M. caesalpinifolia*. Cada folíolo comumente provida de quatro a oito folíolos glabros, opostos e discolors, medindo de 3 cm a 8 cm de comprimento (Figura 3A) e quando amassadas entre os dedos liberam um odor característico.

O pecíolo, continuação da bainha, possui comprimentos de 2 cm a 5 cm e formas variadas. Alguns pecíolos são curtos e outros longos. Apresenta corte transversal arredondado na parte inferior e côncavo na superior e com margens lisas. O limbo ou lâmina é à parte da folha, responsável pela fotossíntese e que apresenta desenhos característicos da família. As estípulas subuladas medem quase 3 mm; os peciólulos medem de 2 mm a 3 mm; apresenta acúleos recurvados presentes ou não (Figuras 3A e 3B).

Em média, seus folíolos basais são ovados e os apicais irregularmente obovados (em cada pina), entre membranáceos e subcoriáceos e medem entre 5 cm a 6 cm, apresentam margem lisas e com pequenas ondulações (Figura 4), os folíolos quando submetidos a secagem em estufa de ar circulante à 45°C permaneceram com as mesmas características morfológicas relatadas acima.

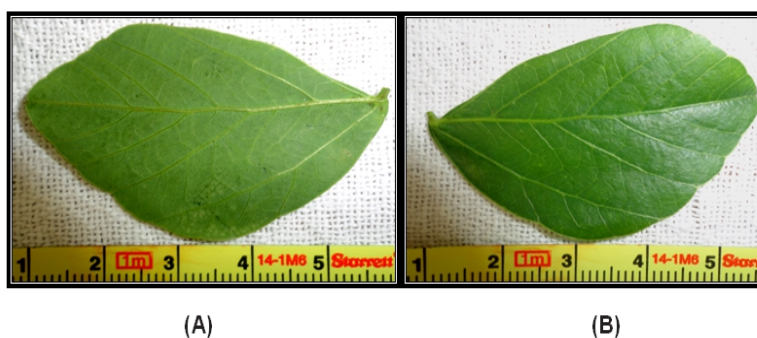


Figura 4 - Aspecto folíolos geral da superfície dos ou pinas de *Mimosa caesalpinifolia* Benth.: A. Face abaxial; B. Face adaxial.

Quanto à nervação, as nervuras primárias e secundárias são salientes na face abaxial e impressas na face adaxial, possui nervações reticuladas, na qual sua venação não possui orientação determinada e não permite distinguir a ordem terciária em relação a quaternária. O padrão de nervação é do tipo craspedódroma simples, onde as nervuras secundárias e demais ordens finalizam na margem do folíolo (Figura 5). Apresenta látex branco nos ramos e nas folhas jovens.

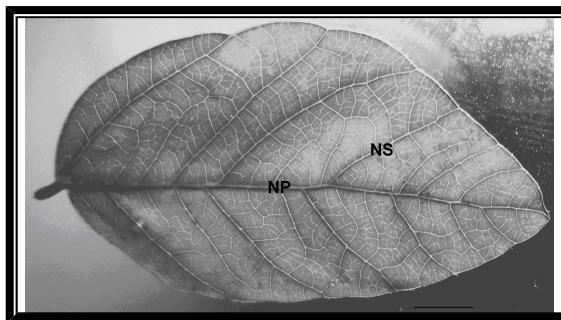


Figura 5 - Folíolo ou pina de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. demonstrando detalhes do padrão de nervação. Legenda: NP: nervura principal; NS: nervura secundária. Barra: 1 cm.

Os caracteres anatômicos dos órgãos vegetativos das plantas servem como dados adicionais às características morfológicas externas, podendo ser usados para resolver problemas taxonômicos (METCALFE e CHALK, 1950). Em uma planta, a folha é o órgão vegetativo que apresenta maior variação estrutural, e as variações em seus caracteres estruturais têm sido interpretadas como adaptações a condições ambientais. Revela grande valor o exame das epidermes, não só pela forma e grandeza das suas células, mas particularmente pelos outros elementos ali encontrados, de estruturas muito variadas, em particular os estômatos, pelos e glândulas externas (COSTA, 1975).

A morfoanatomia vegetal constitui-se em um instrumento eficaz, pois, através do aspecto descritivo, pode-se também colaborar para detecção de fraudes ou ao uso de plantas erroneamente identificadas. Há escassez de estudos sobre morfologia e anatomia de espécies de Leguminosae, como as descrições apresentadas por Solereder (1908) e Metcalfe e Chalk (1950), que apresentam características anatômicas de relevância taxonômica nas principais famílias das dicotiledôneas. Embora caracteres anatômicos da família Leguminosae, Caesalpinioideae, Mimosoideae tenham sido estudados por alguns outros autores (RODRIGUES e MACHADO, 2006; CARVALHO, 2007), as espécies do gênero *Mimosa* carecem de estudos anatômicos.

Das espécies sul-brasileiras, foram publicados estudos descritivos apenas para *Mimosa bimucronata* (MARCHIORI, 1980, 1993), *Mimosa cruenta* Benth. (MARCHIORI, 1985), *Mimosa daleoides* Benth. (MARCHIORI, 1982), *Mimosa eriocarpa* Benth. (CARNIELETTO e MARCHIORI, 1993), *Mimosa scabrella* Benth. (RICHTER e CHARVET, 1973, MARCHIORI, 1980) e *Mimosa sparsa* Benth. (MACCARI e MARCHIORI, 1994).

A estrutura anatômica dos folíolos de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. é desconhecida, existindo poucas referências sobre a mesma. O presente estudo visa suprir esta lacuna e contribuir para o melhor conhecimento taxonômico do gênero a que pertence.

Anatomicamente o folíolo, em vista frontal, apresenta células epidérmicas da face adaxial, da região intercostal, com paredes anticlinais levemente sinuosas (Figura 6A e 6B). Na face abaxial, as células são comparativamente mais sinuosas (Figura 6C e 6D).

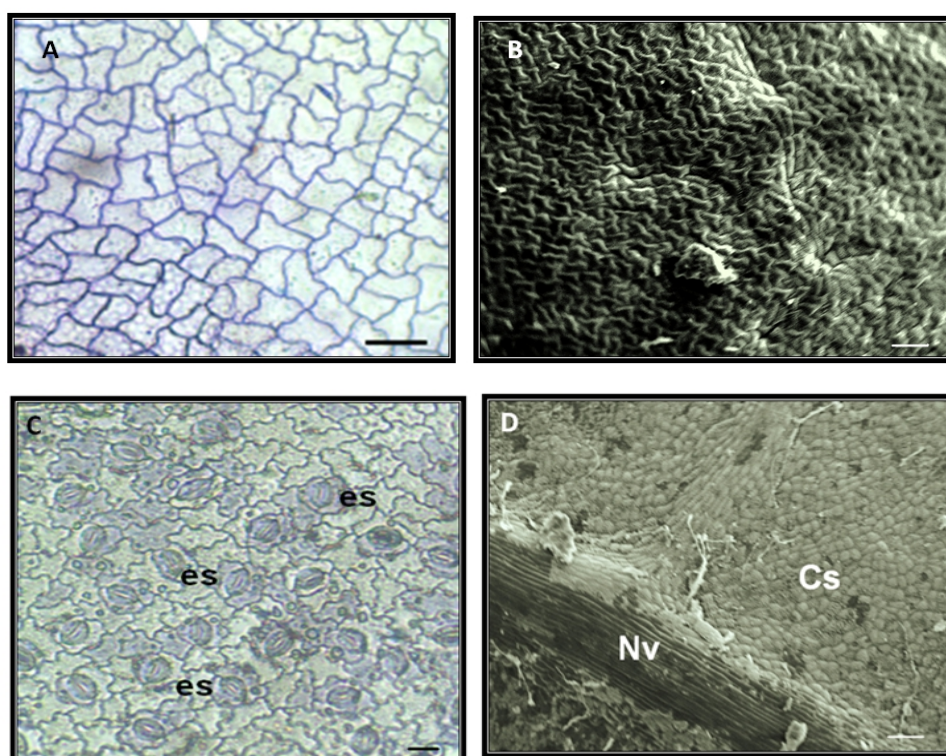


Figura 6 - Vista frontal da epiderme do folíolo. A e B: Face adaxial. (Barra: 20 μm - MEV Barra: 100 μm), destacando o contorno poligonal das células. C e D: Face abaxial (Barra: 20 μm - MEV Barra: 100 μm). Legenda: Es: estômato; Nv: nervura; Cs: células epidérmicas.

Os estômatos são do tipo ranunculáceo (anomocíticos), lateados por três ou mais células paraestomáticas (Figura 6C), encontram-se exclusivamente na

face abaxial, caracterizando o folíolo como hipoestomático, quando se compara com os estudos de Rodrigues & Machado, (2006) as espécies *Mimosa rixosa* e *Mimosa flexuosa* não apresentaram estômatos.

Na face adaxial, a cutícula que reveste a epiderme é relativamente delgada e levemente estriada e apresenta cera epicuticular com aspecto de pequenas escamas (Figura 7).

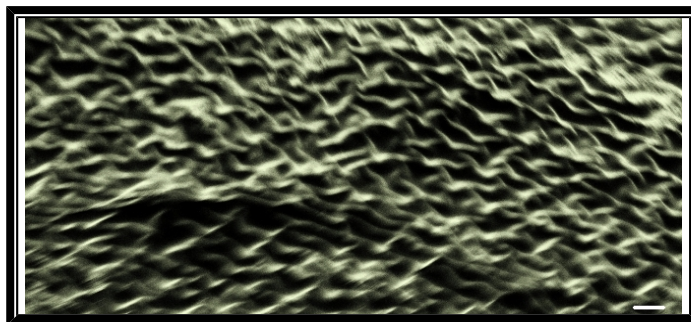


Figura 7 - *M. caesalpinifolia* Benth., detalhe da face adaxial foliar, evidenciando cera epicuticular (MEV Barra: 10 μ m).

Em secção transversal, o folíolo apresenta mesofilo heterogêneo dorsiventral com epiderme uniestratificada em ambas as faces. O floema é constituído por elementos de tubo crivado, células companheiras e células de parênquima axial, além de células de parênquima radial. Os raios parenquimáticos que atravessam o xilema e o floema e atingem a bainha de fibras septadas são poucos nítidos o que confirma em estudos com espécies de Mimosaceae (RODRIGUES et al., 2006) (Figura 8 e 9).

Em secção transversal, o folíolo apresenta mesofilo heterogêneo assimétrico com epiderme uniestratificada em ambas as faces. O floema é constituído por elementos de tubo crivado, células companheiras e células de parênquima axial, além de células de parênquima radial. Os raios parenquimáticos que atravessam o xilema e o floema e atingem a bainha de fibras septadas são poucos nítidos o que confirma em estudos com espécies de Mimosoideae (RODRIGUES et al., 2006) (Figura 8 e 9).

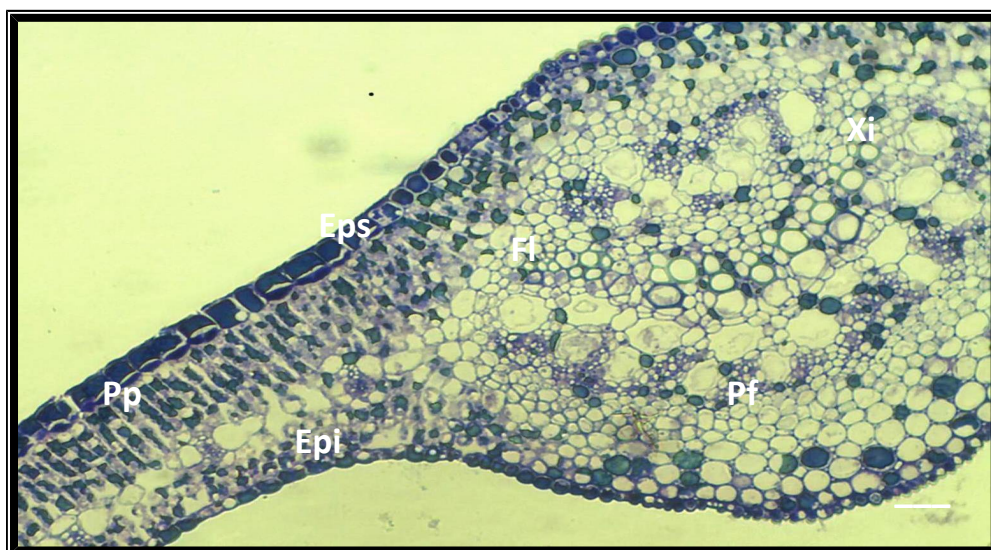


Figura 8 - *M. caesalpinifolia* Benth.. Secção transversal do mesofilo dorsiventral, mostrando epiderme, parênquima paliçádico e fundamental, xilema e floema (Ep.s: epiderme superior; Ep.i: epiderme inferior; Pf: parênquima fundamental; PP: parênquima paliçádico; Fl: floema; Xi: xilema). Barra = 100 μ m .

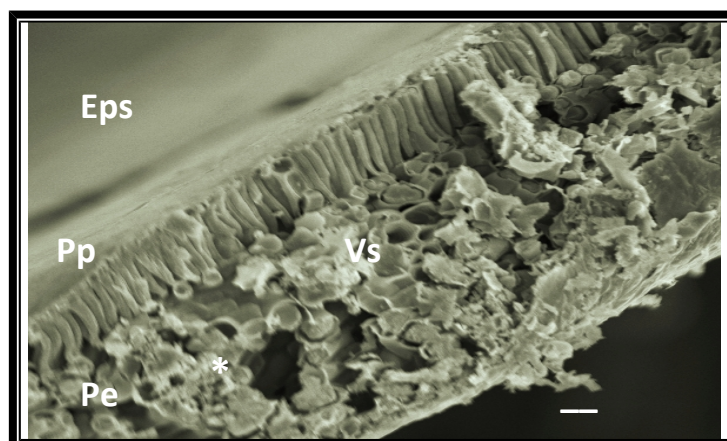


Figura 9 - Foto de *M. caesalpinifolia* Benth. Secção transversal do mesofilo dorsiventral. (Eps: epiderme superior; Pp: parênquima paliçádico; Pe: parênquima esponjoso; Vs: feixes vasculares). *Espaços vasculares. Barra = 20 μ m .

O parênquima paliçádico é constituído de células alongadas, porém são células pequenas e não se apresentam tão justapostas. O parênquima lacunoso, apresenta de cinco a sete camadas de células de tamanhos variados e espaços irregulares (Figura 8 e 9), onde ocorre grande quantidade de idioblastos fenólicos ao longo de toda a estrutura foliar, nas células dos parênquimas paliçádico e fundamental do mesofilo e no parênquima cortical da nervura central e presença de células volumosas com núcleos conspícuo. Estes conteúdos fenólicos nos vacúolos das células epidérmicas foram relatados em estudos de Rodrigues et al., (2006) nas espécies de Mimosoideae, especificamente em *Mimosa rixosa* e

Mimosa flexuosa, na qual se mostrou abundante, evidenciado com a coloração pelo azul de toluidina e pelo teste com o cloreto férrico. Cristais de oxalato de cálcio na forma de drusas não foram observados nas células endodérmicas dos folíolos de *M. caesalpinifolia*.

O sistema vascular é constituído por um feixe colateral maior na nervura central e feixes colaterais menores no restante do folíolo. Seus tricomas tectores foram evidenciados na face abaxial, sendo constituídos de células alongadas e de paredes espessas e ponta aguda na qual são apêndices variáveis da epiderme e podem ser utilizados para fins taxonômicos (Figura 10 e 11). A presença de tricomas é importante na adaptação a ambientes xéricos, pois eles mantêm uma superfície saturada em vapor d'água sobre a folha, o que ajuda na diminuição da temperatura e transpiração foliar, que interferem na assimilação de CO₂ (FHAN, 1986; EHLERINGER e MOONEY, 1978).

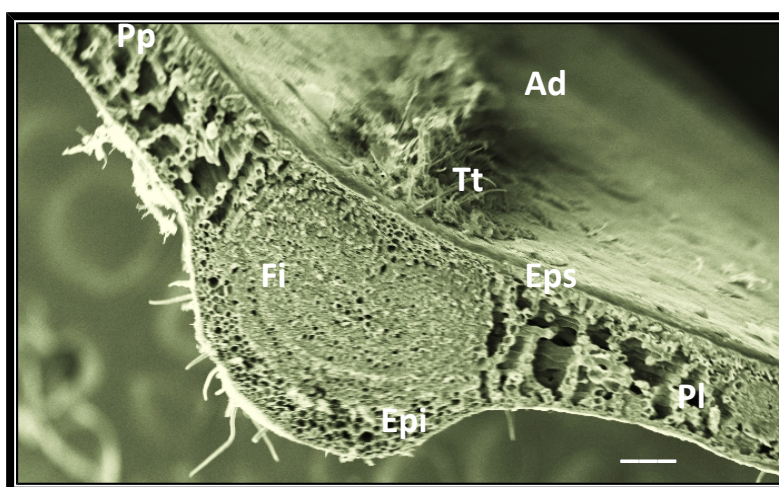


Figura 10 - *M. caesalpinifolia* Benth.. Microscopia eletrônica de varredura. Detalhe de um corte transversal de mesofilo. Tricoma tector sobre a epiderme da nervura mediana, face adaxial. (Ad: face adaxial; Fi: fibras; Pl: parênquima lacunoso; Pp: parênquima paliçádico; Tt: tricoma tector; Ep.s: epiderme superior; Ep.i: epiderme inferior). Barra: 100 µm.



Figura 11 - *M. caesalpinifolia* Benth.. Detalhe do tricoma tector. Barra = 50 μ m.

De acordo com Esaú (1985), células epidérmicas com paredes sinuosas ocorrem em decorrência das condições ambientais com luz e umidade. Alvarez et al., (2005) afirmam que as diferenças no grau de sinuosidade das paredes das células epidérmicas e na estrutura das paredes celulares são comuns nas espécies de cerrados e podem estar relacionadas com a economia de água, o que foi evidenciado nos caracteres morfoanatômicas dos folíolos de *M. caesalpinifolia* Benth.. Medri e Lleras (1980) concordaram que a menor sinuosidade da parede celular pode estar relacionada às características adaptativas contra a perda excessiva de água, sendo encontrada nas espécies mais expostas a radiação solar. Segundo Watson (1942) em plantas de sol e de ambientes xéricos as células epidérmicas, especialmente as da face adaxial apresentam contorno reto e, nessas folhas a cutícula e as paredes celulares se espessam e ficam rígidas mais rapidamente, ao contrário do que ocorre nas folhas de sombra, nas quais as paredes celulares permanecem delicadas, favorecendo o desenvolvimento de acentuadas ondulações.

Em ambientes xerofíticos, como a caatinga, as plantas desenvolvem caracteres morfoanatômicos próprios que as permitam sobreviver sob condições especiais, sobretudo com elevada luminosidade. As estratégias estruturais visam à diminuição dos efeitos danosos causados pela irradiação solar direta sobre a folha e atuam como refletores da luminosidade excessiva (FAHN e CUTLER, 1992).

Segundo Silva et al., (2011), em estudos de espectrorradiometria foliar a espécie *Mimosa* sp., apresenta comportamento espectral em valores de

absorbância na região do azul, nas faixas compreendidas entre 400 e 500 nm (azul) e 600 a 700nm (vermelho), diferenciando de modo mais evidente na região do vermelho, onde esta espécie destacou pela maior absorção. A reflectância de *Mimosa* sp., além de ser maximizada pela participação de cristais, é auxiliada pelos espaços existentes entre as células do parênquima lacunoso. De acordo com Sims e Gamon (2002) e Carrielo et al. (2003), o aumento da reflectância também pode ser consequência do aumento na quantidade e dimensões dos espaços intercelulares e do tamanho das células do tecido clorofiliano.

Essas estratégias funcionais de reflectância, parecem ser facilitadas pela presença de tricomas e cristais (drusas) e maior quantidade de espaços intercelulares e cristais (monohídricos) (SILVA et al., 2011), o que podemos também sugerir estas estratégias de reflectância nos folíolos de *M. caesalpineafolia*, uma vez que apresentou estruturas com espaços intercelulares e presença de tricomas.

As folhas de *M. caesalpinifolia* Benth. são ecologicamente adaptadas, além de suas propriedades medicinais, são também consumidas pelos animais em pastejo, pois possuem alto teor de proteína bruta. A presença de maiores quantidades de tecidos vasculares lignificados ou esclerenquimáticos proporciona menores taxas de digestibilidade ou redução na área degradada por microorganismos ruminais (WILKINS; 1972). Segundo, AKIN et al., (1973) constataram que a presença ou a quantidade de determinados tecidos influencia na digestibilidade de uma forrageira, sugerindo diferenciadas taxas de degradação, em relação aos diferentes tecidos vegetais o que contribui para a melhor compreensão dos fatores morfoanatomicos da espécie em estudo.

Na epiderme dos folíolos de *M. caesalpinifolia* Benth. perceber-se que as células adaxiais são maiores que as abaxiais. Entre essas epidermes destacam-se os feixes secundários, o que dificulta o transito de microorganismos entre as células do mesofilo. Visivelmente, a parede das células adaxiais é mais grossa que as paredes das células abaxiais, sendo mais um indício de que a digestão dos folíolos de *M. caesalpinifolia* Benth. inicia-se pela região abaxial.

As características da cutícula e das formações epicuticulares são marcadores anatômicos relevantes na diferença entre espécies vegetais (DICKSON, 2000; FAHN, 1990). Em *M. caesalpinifolia* a cutícula, presente nos

folíolos, é evidenciada em toda a sua extensão e apresenta espessura significativa. Esta característica a diferencia de plantas medicinais como *Mimosa rixosa* Mart. e *Mimosa flexuosa*, em que a cutícula se mostra menos espessada nas diferentes regiões da epiderme foliar (RODRIGUES et al., 2006).

A ocorrência de vacúolos com conteúdo fenólico nas células epidérmicas nos folíolos de *M. caesalpinifolia* Benth., e das espécies de Caesalpinioideae e Mimosoideae pode estar relacionada com a manutenção da estrutura e integridade de células e tecidos, além da proteção contra a radiação solar elevada (LARCHER 2000, MACHADO e RODRIGUES 2004), condição típica do Cerrado. Além disso, substâncias fenólicas podem fornecer proteção contra herbivoria (LANGENHEIM et al., 1982). Segundo diversos autores, substâncias fenólicas, especialmente taninos e flavonoides compostos presente nos folíolos de *M. caesalpinifolia* Benth., estão presentes nos vacúolos das células motoras dos vegetais e intervêm na estocagem e liberação de íons, especialmente do potássio (TORIYAMA e KOMADA 1971, CAMPBELL et. al., 1979, FLEURAT-LESSARD 1988, MOYSSET & SIMÓN 1991) e do cálcio, o qual está envolvido na agregação dos componentes do citoesqueleto, particularmente dos microfilamentos de actina (KAMEYAMA et al., 2000, YAMASHIRO et al., 2001).

Os caracteres morfoanatômicos dos folíolos de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. permitem concluir a formulação das estruturas anatômicas que são altamente evolutivas, típica da família Fabaceae, indicando a inserção da espécie na sub-família Mimosoideae e contribuindo de modo efetivo no controle de qualidade da droga vegetal, a qual será utilizada, futuramente, para a produção de medicamentos fitoterápicos.

5.2 ETAPA FARMACOGNÓSTICA

Seguindo as exigências da resolução ANVISA - RDC nº 14/2010, e a ausência de estudos de avaliação da qualidade, foram realizados testes na droga vegetal das folhas de *Mimosa caesalpinifolia*, em consonância com as exigências legislativas, para que possa colaborar com preceitos da qualidade para a droga vegetal proposta, visando obter um produto com maior segurança.

Após a identificação, etapa importante na avaliação da qualidade da droga vegetal, o material botânico foi submetido à secagem. A secagem tem por finalidade a conservação da droga vegetal, uma vez que a retirada de água impede possíveis reações de hidrólise e o crescimento microbiano (SIMÕES et al., 2006).

5.2.1. Caracterização física, físico-química e química do pó das folhas de *M. caesalpinifolia*

A moagem possibilitou reduzir mecanicamente o material vegetal a pequenas dimensões, preparando-o, assim, para a próxima etapa, a extração. Partículas com pequenas dimensões aumentam a área de contato entre o material sólido e o líquido extrator, tornando, desta forma, mais eficiente a operação de extração (DÄR, 1981; SIMÕES et al., 2006). As folhas de *M. caesalpinifolia* foram submetidas à moagem em moinho de facas.

A determinação da distribuição granulométrica do pó das folhas de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Mimosaceae), além de contribuir como análise de caracterização da matéria prima vegetal, demonstrou especificações de acordo com a Farmacopéia Brasileira V (2010).

A Tabela 1 e figura 12 mostram que o diâmetro médio de partículas situou-se entre 250 ± 16 μ m, caracterizando um pó semi-fino (WHO, 1998). Segundo a literatura (LIST e SCHMIDT, 2000), o tamanho das partículas da droga pulverizada representa uma influência direta sobre a eficiência no processo extrativo, pois para aqueles que envolvem filtração, o pó muito fino (abaixo de 125 μ m) pode favorecer o entupimento do filtro.

Tabela 1 - Frequências percentuais, frequências cumulativas e tamanho médio das partículas na análise granulométrica de *M. caesalpinifolia*.

Abertura da malha (mm)	Abertura média (mm)	Fração retida acumulada (%)	Teor de amostra (%)	dav ± DP (mm)
0	62,5	3,26	23,71	14,821±834010,330
125	153,5	19,67	16,41	25,018±156067,690
180	215	40,04	20,37	43,799±25004,686
250	375	72,46	32,42	121,587±506333,633
500	605	78,46	6,00	36,312±5756270,280
710	780	79,48	1,01	7,894±284268,118
850	850	79,55	0,07	0,600± 25417,820
Tamanho médio				250 ± 16

dav : Média, fórmula de VOIGT (1993).

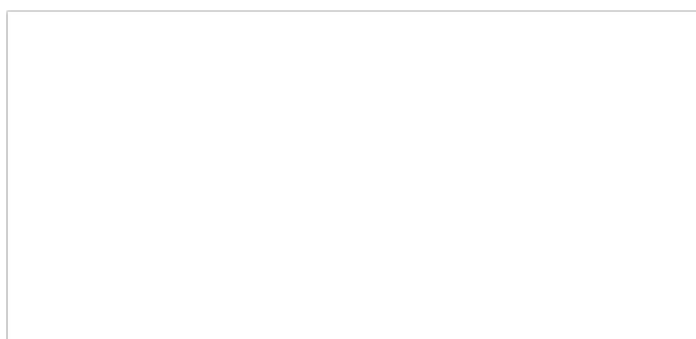


Figura 12 - Tamanho médio das partículas do pó das folhas de *M. caesalpinifolia*.

É importante que a matéria prima vegetal esteja suficientemente pulverizada para que se consiga um rendimento ótimo no processo de extração dos constituintes químicos de interesse farmacêutico. A granulometria da matéria prima vegetal é o parâmetro que determina a superfície de contato disponível para a interação com o solvente utilizado na obtenção de preparações intermediárias líquidas, como tintura e extratos.

Na tabela 2 aborda os parâmetros farmacognósticos do pó das folhas de *M. caesalpinifolia*.

Tabela 2 - Análises farmacognósticas do pó das folhas de *M. caesalpinifolia*.

Parâmetro	Resultados obtidos
------------------	---------------------------

Densidade do pó	
1) Método da proveta	0,312±0,01 g/mL
2) Peso das cápsulas	0,323±0,004 g/mL
Perda por secagem	91,5%±0,06
Perda por dessecação	7,05%±0,07
Teor de cinzas totais	5,1%±0,08
Teor de cinzas insolúveis em ácido	1,25%±0,03
Teor de resíduo seco	2,3%±0,04
Teor de extrativos em etanol	10,12%±0,62

A densidade foi de 0,312±0,01 pelo método da proveta e de 0,323±0,004 pelo método do peso médio das cápsulas, não sendo observada diferença significativa ($p = 0,2028$, teste t -Student) entre os valores obtidos pelos dois métodos.

O teor de água foi de 7,05%±0,07, estando dentro dos limites aceitáveis (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010), pois alto teor de água residual no pó da planta pode propiciar a contaminação por microrganismos e degradação dos componentes químicos. Pode-se afirmar que os valores característicos da perda por dessecação, além de informação importante do ponto de vista tecnológico, servem também como parâmetro de avaliação da qualidade.

Quanto à determinação do teor de cinzas totais e insolúveis, utilizou-se *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (folhas), como um parâmetro comparativo, devido a presença de taninos e flavonoides que esta espécie possui, visto que essas classes de compostos químicos estão presentes nas folhas de *M. caesalpiniiifolia* e são responsáveis por atividades farmacológicas (TOLEDO, 2002). Os teores encontrados foram: 6,3±0,03% e 1,5±0,05% para *S. adstringens* e 5,1% ±0,08% e 1,2±0,03% para a *M. caesalpiniiifolia*. Em se tratando de drogas vegetais, o principal objetivo deste tipo de ensaio é a verificação de impurezas inorgânicas não-voláteis que podem estar presentes como contaminantes (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010; SIMÕES et al, 2006). O teor de resíduo seco foi de 2,3%±0,04 e teor de extrativos em etanol (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010) foi de 10,12% ±0,62.

Plantas medicinais produzem diferentes classes de substâncias químicas (alcaloides, taninos, flavonoides, saponinas, entre outras) e a fazem em diferentes proporções, dependendo do habitat, do regime de chuvas, da insolação, do solo, enfim, das características edáfo-climáticas. Entretanto, algumas substâncias químicas são bastantes características para um determinado vegetal, e desta forma podem servir como parâmetro para sua caracterização e identificação.

As análises fitoquímicas preliminares, realizadas com o EHM e as Fr-EtOAc, Fr-BuOH e Fr-AqOH das folhas de *M. caesalpinifolia*, mostram grupos de substâncias químicas que podem ser empregadas para a caracterização da matéria-prima (Tabela 3).

A presença de taninos e flavonoides, por exemplo, no barbatimão, *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, é uma característica de identificação do vegetal, visto que essa classe de compostos químico o responsável pela atividade farmacológica (SOULIMANI et al., 1997; TOLEDO, 2002).

Tabela 3 - Triagem fitoquímica do extrato hidroalcoólico 70% (EHM) e das frações acetato de etila (Fr-EtOAc), butanólica (Fr-BuOH) e aquosa (Fr-AqOH) das folhas de *M. caesalpinifolia* Benth..

Classes de compostos	<i>EHM</i>	<i>Fr-EtOAc</i>	<i>Fr-BuOH</i>	<i>Fr-AqOH</i>
	Presença/Ausência	Presença/Ausência	Presença/Ausência	Presença/Ausência
<i>Flavonoides</i>	++	++	++	++
<i>Triterpenos</i>	+	-	-	-
<i>Esteroides</i>	-	-	-	-
<i>Ácido gálico</i>	++	++	++	++
<i>Catequinas</i>	++	++	++	++
<i>Saponinas</i>	-	-	-	-
<i>Alcaloides</i>	-	-	-	-
<i>Antraquinonas</i>	-	-	-	-
<i>Cumarinas</i>	-	-	-	-

(+) Fraco positivo; (++) Forte positivo; (-) Ausência.

5.2.2 Atividade antioxidante

Existem diferentes modelos para avaliação da atividade captora de radicais e da atividade antioxidante, principalmente envolvendo reações químicas *in vitro*. Nos modelos utilizados são ensaios químicos *in vitro*, de baixo custo, simples, rápidos e com boa reprodutibilidade para a pesquisa de novos compostos antioxidantes e captadores de radicais livres (IOSET et al., 2001; VICENTINO e MENEZES, 2007; NUNES et al., 2008; MORAIS et al., 2009).

A propriedade antioxidante do EHM, Fr-EtOAc, Fr-BuOH e Fr-AqOH (1 µg) na autografia, mostraram ação protetora significativa sobre β-caroteno, uma vez que esta atividade é mais específica a compostos fenólicos do tipo flavonoides, enquanto Fr-AqOH apresentou baixa intensidade ativa.

Na triagem cromatográfica o DPPH apresenta coloração violeta, tendo absorção em 517nm. Quando reduzido torna-se amarelo. A redução ocorre quando existem substâncias capazes de doar hidrogênio radicalar ao DPPH dando origem a outro estável, o que é associado à propriedade antioxidante (BLOIS, 1958). Podem-se observar manchas/rastros amarelos indicativos de atividade antioxidante no EHM bem como nas frações acetato de etila (Fr-EtOAc) e butanólica (Fr-BuOH), sendo que a fração aquosa (Fr-AqOH) apresentou baixa atividade, comparando-se com os padrões quercetina e ácido ascórbico (Figura 13).

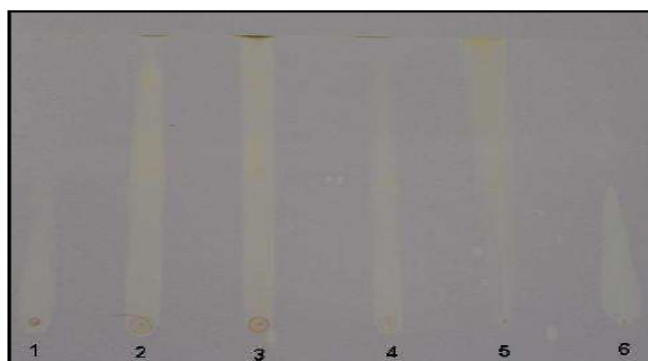


Figura 13 - Cromatograma do extrato e das frações de *M. caesalpinifolia* Benth. revelados com DPPH (4mg/100mL). Legenda: 1. Fr-AqOH, 2. Fr-BuOH, 3. Fr-EtOAc, 4. EHM, 5. Quercetina (padrão); 6. Ácido ascórbico (padrão).

Os resultados mostraram que a capacidade antioxidante pelo método quantitativo do radical DPPH foi diretamente proporcional ao teor de polifenóis totais (Tabela 4 e Figura 14). A Fr-EtOAc apresentou alto teor em polifenóis totais e

uma correlação direta com a capacidade antioxidante em termos de IC_{50} , quando comparada ao padrão de ácido ascórbico (AA), sendo este valor significativo com os relatos na literatura para outras mimosáceas. Ao contrário desta observação é a correlação com a fase aquosa, que demonstrou uma baixa capacidade antioxidante (IC_{50}) com um baixo teor em polifenóis totais.

Tabela 4 - Atividade antioxidante de extrato, frações das folhas de *M. caesalpinifolia* Benth., padrão na redução do radical DPPH e o teor de polifenóis totais (PT).

[] $\mu\text{g/mL}$	<i>EHM</i>	<i>Fr-EtOAc</i> *	<i>Fr-BuOH</i> *	<i>Fr-AqOH</i>	<i>AA</i>
5	23,45±1,4	12,45±0,3	25,56±0,3	66,43±0,43	70,85±2,1
10	37,91±1,1	23,78±1,3	36,13±0,8	66,50±0,32	75,06±0,94
25	63,74±0,8	54,52±2,1	59,42±1,0	71,32±1,7	92,03±1,1
50	78,02±2,2	58,32±0,9	75,03±0,33	76,13±2,2	93,01±0,34
125	75,72±1,3	56,12±1,2	70,32±0,93	82,43±2,6	93,32±1,5
250	65,82±0,4	42,05±1,6	62,91±1,0	83,02±1,0	94,21±1,1
IC_{50}	28,51±1,54	20,08±0,30	26,05±0,42	38,35±1,10	6,82±0,48
<i>PT</i>	65,90±0,64	72,29±1,10	67,57±0,11	21,32±0,41	--

*ANOVA, estatisticamente significativa $P < 0,01$; **EHM** = extrato hidroalcoólico; **Fr-EtOAc** = fração acetato de etila; **Fr-BuOH** = fração butanólica; **Fr-AqOH** = fração aquosa; **AA** = ácido ascórbico; **IC_{50}** = expressa a quantidade de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH; **PT** = polifenóis totais.

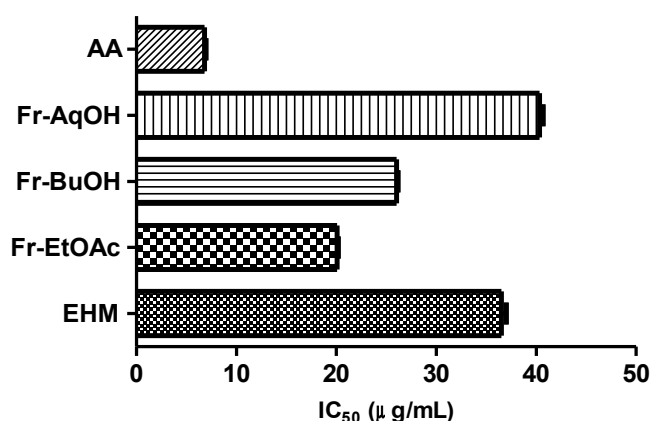


Figura 14 - Comparações dos valores de IC_{50} do extrato e frações das folhas de *M. caesalpinifolia* Benth.. **EHM** = extrato hidroalcoólico 70%; **Fr-EtOAc** = fração acetato de etila; **Fr-BuOH** = fração butanólica; **Fr-AqOH** = fração aquosa; **AA** = ácido ascórbico.

Os métodos utilizados para avaliação do potencial antioxidante do extrato de folhas de *M. caesalpiniiifolia* demonstraram resultados concordantes entre si, sendo possível afirmar que a Fr-EtOAc apresenta maior capacidade antioxidante, significativa para $P < 0,01$, em comparação as Fr-BuOH, EHM e Fr-AqOH, devido, possivelmente, ao conteúdo maior em substâncias polifenólicas. A capacidade antioxidante relativa ou total da Fr-EtOAc foi estatisticamente comparável com o ácido ascórbico, o que denota o potencial desta fração, provavelmente pela presença marcante dos taninos condensados e flavonoides o que se evidencia nos espectros de massas realizados. Estes dados demonstram que quanto maior o número de hidroxilas fenólicas presentes na substância, maior é a capacidade de seqüestro de radicais livres, principalmente, em substâncias com propriedades diméricas (MELLO et al., 1996).

O potencial antioxidante e o teor de polifenóis totais podem promover investigações úteis e correlacionar, por exemplo, com a atividade anti-inflamatória. Vários trabalhos na literatura sugerem uma correlação entre antioxidante e anti-inflamatório, ou seja, alguns extratos vegetais reduzem inflamações e o recrutamento de células polimorfonucleares (PMN), presentes nos tecidos inflamados (RODENAS et al., 2000; THAMBI et al., 2006), além destas propriedades há um grande interesse na possibilidade de serem utilizadas em várias doenças degenerativas, como envelhecimento prematuro, cicatrizante, câncer, entre outras (HASLAM et al., 1992).

Assim, é possível estabelecer correlações entre a capacidade antioxidante do extrato/frações de *M. caesalpiniiifolia* e a atividade de seqüestro de radicais livres de espécies vegetais contendo taninos e flavonoides, demonstrando a eficiência desta classe de compostos na captura destes radicais.

5.2.3 Detector de arranjo de fotodiodo

As figuras 15, 16 17 e 18 a seguirem mostram os perfis cromatográficos com os respectivos espectros representativos das classes de substâncias obtidos no UV. Cada cromatograma foi processados em um comprimento de onda em que

apareceram um maior número de substâncias, ou seja, os comprimentos de onda selecionados são os que melhor representam o extrato e frações.

11

4

Figura 15 - Cromatograma de separação dos constituintes químicos presentes no EHM das folhas de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth.. Clean-up por SPE-RP18, eluída com H₂O: MeOH 9/1, v/v), obtidos por HPLC-PDA (Jasco®), Coluna Phenomenex® Synergi Hydro RP-18 (250 x 4,6mm i.d.; 4µm), fluxo 1,0 mL.min⁻¹, Solventes: A=H₂O, B=MeOH ambos com TFA 0,05%. Sistema de eluição gradiente linear 0-100% de B em 60 minutos e espectros no UV das classes mais proeminentes.

3

6

Figura 16 - Cromatograma de separação dos constituintes químicos presentes na Fr-EtOAc das folhas de *Mimosa caesalpinifolia* Benth.. Clean-up por SPE-RP18, eluída com H₂O: MeOH 9/1, v/v), obtidos por HPLC-PDA (Jasco®), Coluna Phenomenex® Synergi Hydro RP-18 (250 x 4,6mm i.d.; 4µm), fluxo 1,0 mL.min⁻¹, Solventes: A=H₂O, B=MeOH ambos com TFA 0,05%. Sistema de eluição gradiente linear 0-100% de B em 60 minutos e espectros no UV das classes mais proeminentes.



Figura 17 - Cromatograma de separação dos constituintes químicos presentes na Fr-BuOH das folhas de *Mimosa caesalpinifolia* Benth.. Clean-up por SPE-RP18, eluída com H₂O: MeOH 9/1, v/v), obtidos por HPLC-PDA (Jasco®), Coluna Phenomenex® Synergi Hydro RP-18 (250 x 4,6mm i.d.; 4µm), fluxo 1,0 mL.min⁻¹, Solventes: A=H₂O, B=MeOH ambos com TFA 0,05%. Sistema de eluição gradiente linear 0-100% de B em 60 minutos e espectros no UV das classes mais proeminentes.

3

9

Figura 18 - Cromatograma de separação dos constituintes químicos presentes na Fr-AqOH das folhas de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth.. Clean-up por SPE-RP18, eluída com H₂O: MeOH 9/1, v/v), obtidos por HPLC-PDA (Jasco®), Coluna Phenomenex® Synergi Hydro RP-18 (250 x 4,6mm i.d.; 4µm), fluxo 1,0 mL.min⁻¹, Solventes: A=H₂O, B=MeOH ambos com TFA 0,05%. Sistema de eluição gradiente linear 0-100% de B em 60 minutos e espectros no UV das classes mais proeminentes.

Com o auxílio do detector de arranjo de fotodiodos (PAD) acoplado ao sistema HPLC, detectou-se que o extrato e frações das folhas de *Mimosa caesalpiniiifolia*, apresentam grande complexidade e diversidade na composição química da matriz, avaliada pelo grande número de picos eluídos ao longo da corrida cromatográfica.

Com o auxílio do HPLC-PAD, pôde-se processar os dados cromatográficos e obter os cromatogramas em comprimentos de onda seletivos para uma determinada classe de metabólito secundário. A verificação da presença de flavonoides e derivados de ácidos fenólicos foi constatada pela presença de espectros com bandas características dessas classes em todas as amostras analisadas.

Derivados de ácidos fenólicos apresentam uma única banda de absorção referente ao sistema benzílico, com máximo na região do UV variando entre 260-280 nm (Figura 19; STICHER et. al., 2008). Flavonoides, por sua vez, são reconhecidos por apresentarem no geral, duas bandas de absorção referentes aos dois sistemas aromáticos encontrados em agliconas; a Banda II, com máximos na faixa espectral de 240-290 nm, atribuída ao anel A e a Banda I, com máximos na faixa espectral de 300-390 nm, atribuída ao anel B (Figura 20; MERKEN e BEECHER, 2000). A Banda I é associada à absorção do Anel B, que possui o sistema cinamoil com maior extensão da conjugação eletrônica. A banda II é atribuída ao Anel A, que envolve a absorção do sistema benzoil de menor conjugação (Figura 20).



Figura 19 - Espectros na região do UV para padrões de A) ácido gálico, B) quercetina.



Figura 20 - Estrutura de um flavonol com sistema benzoil e cinamoil.

O perfil cromatográfico traçado por HPLC-PDA é de grande utilidade no estudo de extratos polares, pois com o perfil é possível não só determinar a classe de substâncias, mas também identificar substâncias conhecidas através da comparação do tempo de retenção (T_r) e espectro no UV com padrões autênticos (comerciais ou já isolados).

5.2.4 Espectrometria de massas

Inúmeros trabalhos descritos na literatura mostram que a espectrometria de massas (MS), na maioria das vezes acoplada a um sistema HPLC, tem se destacado como uma poderosa ferramenta de estudos de biodiversidade (ZEEB et al., 2000). Ela é empregada em aplicações de ordem qualitativa e quantitativa para analitos de baixo e/ou alto peso molecular, encontrados em matrizes complexas em que o HPLC é o sistema de separação de escolha e o espectrômetro de massas fornece a seletividade e sensibilidade para gerar a informação quantitativa e/ou informação estrutural que não pode ser obtida com outros tipos de detectores.

Catequinas e taninos condensados são frequentemente analisados nos modos positivo (WU et al., 2005) e negativo (GU et al., 2003) e várias são as interfaces empregadas para a geração desses íons, sendo a ionização por electrospray (ESI) a interface mais utilizada. Ela é reconhecida como uma técnica de ionização branda e possibilita a investigação dos mais diversos tipos de matrizes em fase gasosa, incluindo analitos que exibem alta polaridade, viabilizando assim a caracterização estrutural com quantidades mínimas de uma determinada amostra (ARDREY, 2003), as figuras de 21 a 26 representam os espectros de massas acoplada a um sistema HPLC.

Claudiavilegas_F1_esipos20V_0206201101_110516162641 #2 RT: 0,01 AV: 1 NL: 4,60E2
T: ITMS + c ESI Full ms [75,00-1500,00]

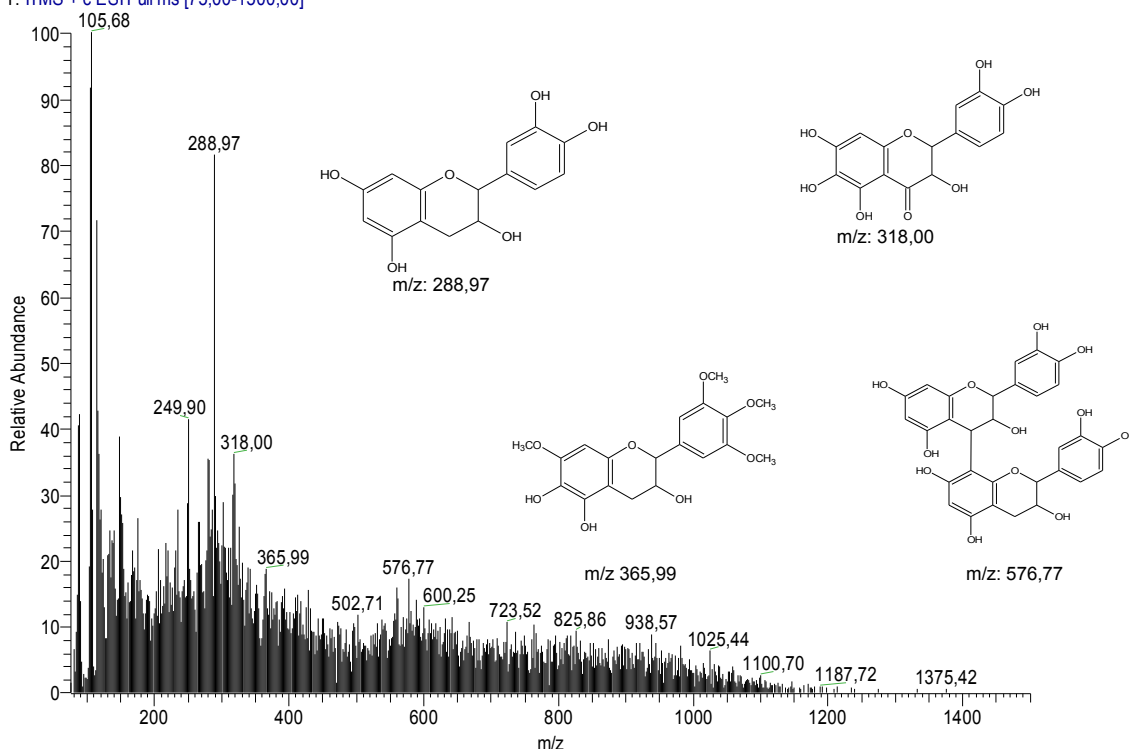


Figura 21 - Espectro de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan* do EHM de *M. caesalpinifolia* no modo positivo. Presença de catequinas ($C_{15}H_{14}O_6$; PM: 290) e seus derivados.

Claudiavilegas_F2_esipos20V_0206201101_110516162641 #1 RT: 0,00 AV: 1 NL: 6,97E2
T: ITMS + c ESI Full ms [75,00-1500,00]

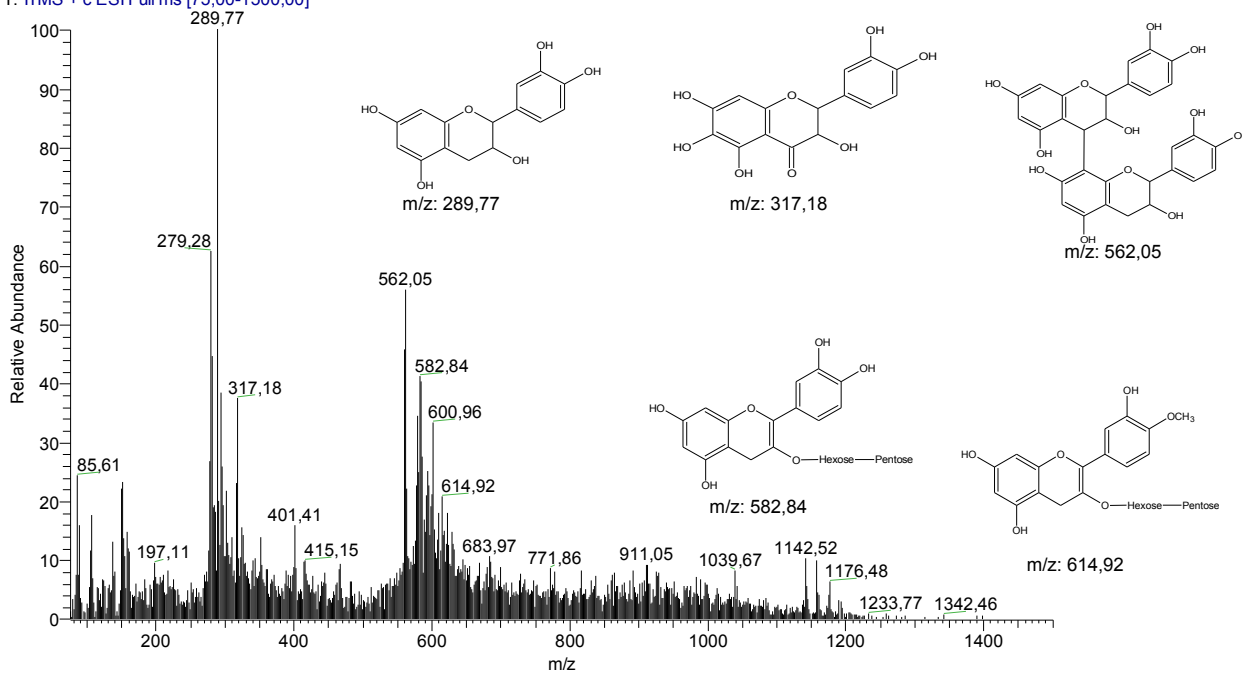


Figura 22 - Espectro de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan* da Fr-EtOAc de *M. caesalpinifolia* no modo positivo. Presença de catequinas ($C_{15}H_{14}O_6$; PM: 290) e seus derivados (agliconas: $C_{28}H_{36}O_{15}$ – PM: 612,8; $C_{27}H_{34}O_{14}$ – PM: 582; pentose: $C_5H_8O_5$ – PM: 150; hexose: $C_6H_{12}O_6$ – PM: 180).

Figura 23 - Fragmentação MS/MS do íon precursor de m/z 582,76 produziu o pico m/z 289,11 correspondente à aglicona da Fr-EtOAc.

Claudiavilegas_F3_esipos20V_0206201101_110516162641 #19 RT: 0,21 AV: 1 NL: 7,35E2
T: ITMS + c ESI Full ms [75,00-1500,00]

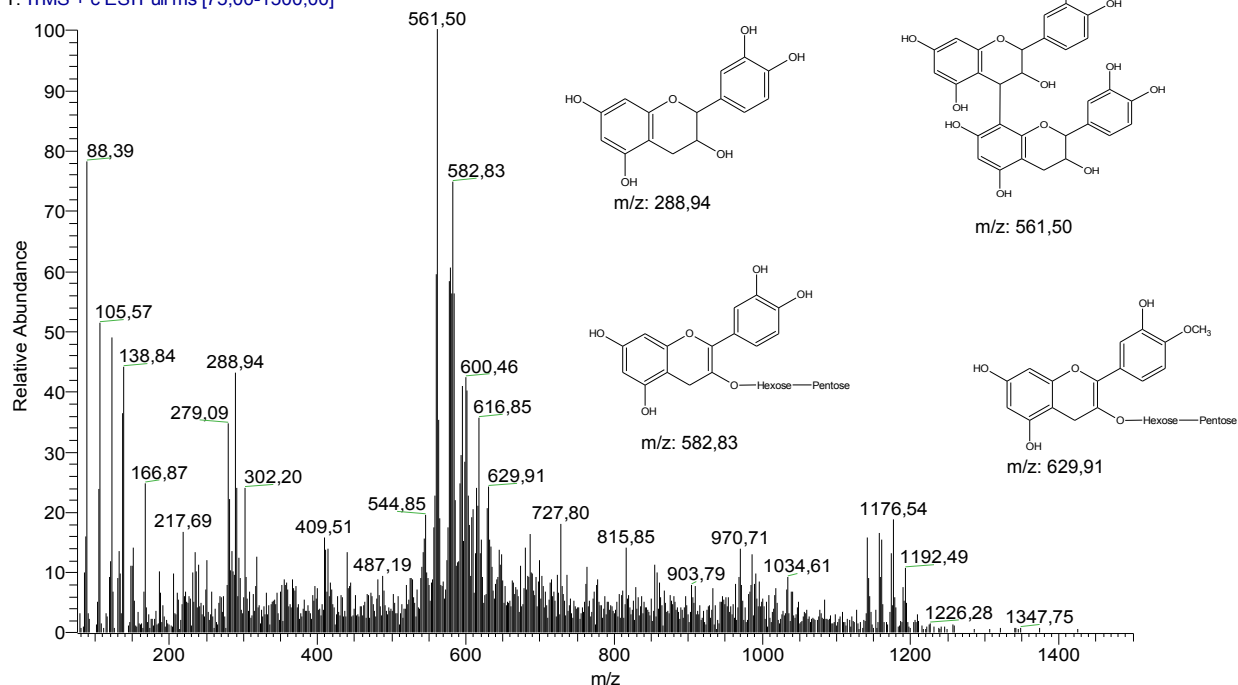


Figura 24 - Espectro de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan* da Fr-BuOH de *M. caesalpinifolia* no modo positivo. Presença de catequinas ($C_{15}H_{14}O_6$; PM: 290) e seus derivados (agliconas: $C_{28}H_{36}O_{15}$ – PM: 612,8; $C_{27}H_{34}O_{14}$ – PM: 582; pentose: $C_{30}H_{26}O_{11}$ – PM: 562).

Claudiavilegas_F4_esipos20V_0206201101_110516162641 #1 RT: 0,00 AV: 1 NL: 2,17E2
T: ITMS + c ESI Full ms [150,00-1500,00]

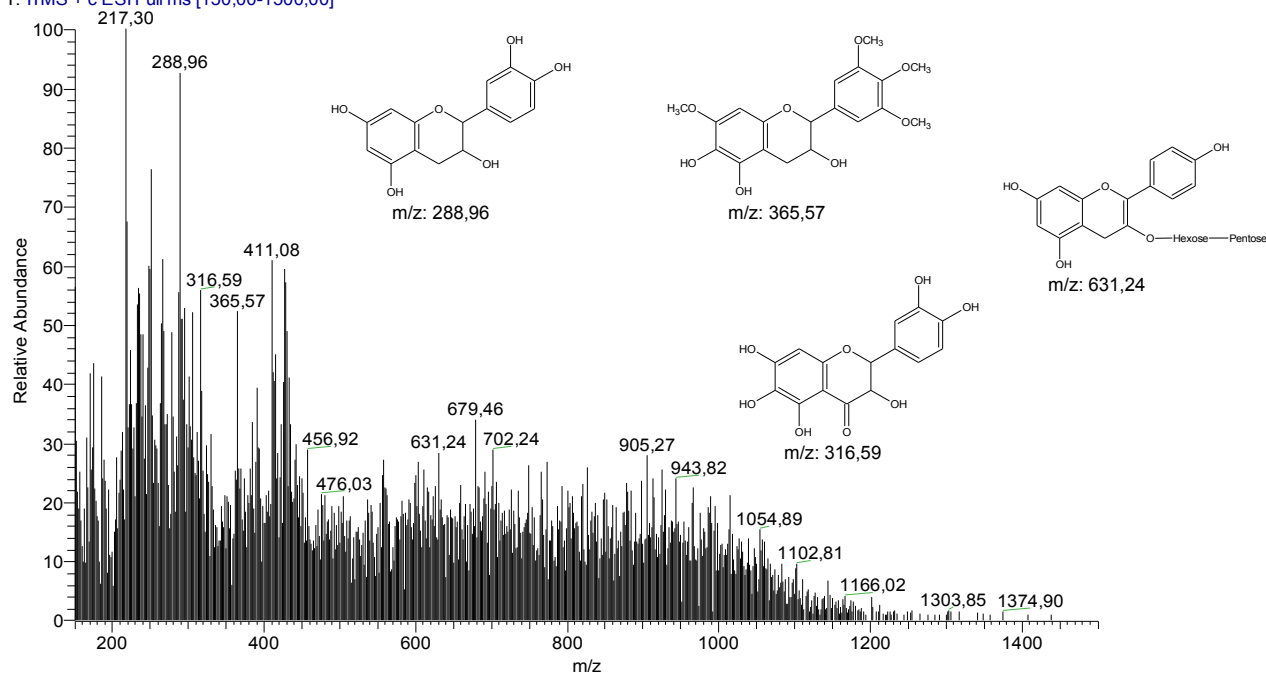


Figura 25 - Espectro de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan* da Fr-AqOH de *M. caesalpiniiifolia* no modo positivo. Presença de catequinas ($C_{15}H_{14}O_6$; PM: 290) e seus derivados (agliconas: $C_{27}H_{34}O_{14}$ – PM: 582).

Claudiavilegas_F4_filhosesipos_0206201101_110516162641 #81 RT: 1,22 AV: 1 NL: 1,40
T: ITMS + c ESI Full ms2 365,60@cid10,00 [100,00-700,00]

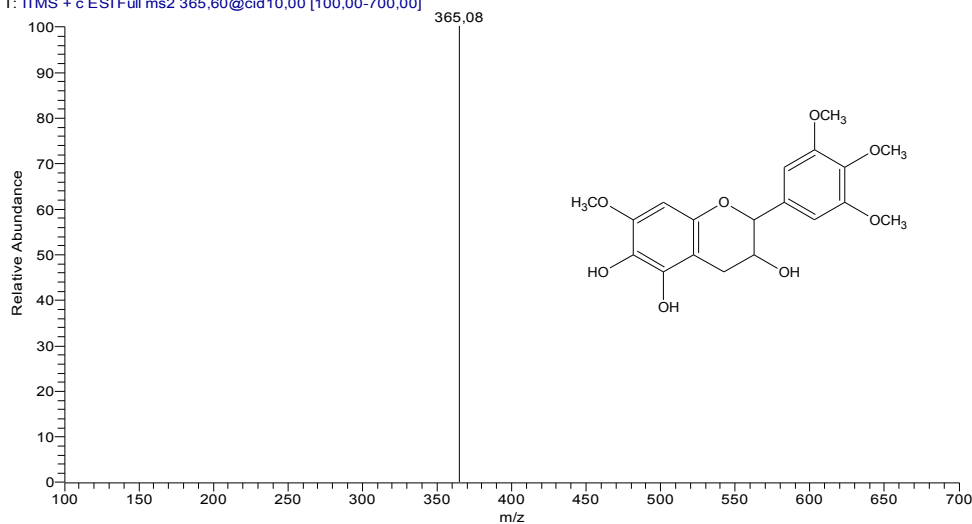


Figura 26 - Espectros de massa *full scan* de fragmentação das folhas de *M. caesalpiniiifolia*. Presença correspondem uma molécula desprotonada de catequina.

Na identificação dos metabólitos secundários de *M. caesalpiniiifolia*, foi possível detectar a presença de flavonoides e outros compostos fenólicos em geral. O espectro de massas do extrato e suas frações apresentaram fragmentos correspondentes a compostos como a catequina (Figuras 21 a 26). Foi possível

observar o íon m/z 289 em todas as frações de *M. caesalpinifolia*, os quais estão de acordo com a fórmula molecular $C_{15}H_{14}O_6$ que correspondem uma molécula desprotonada de catequina.

O conjunto de dados fornecido pelo espectro de massas corroboram com dados da literatura (PESSUTO et al., 2009) em que confirmam a identificação de catequinas e seus derivados em outras espécies de *Mimosa*, podemos citar *M. arenosa* e *M. tenuiflora* que apresentam taninos condensados que são constituídos por monômeros do tipo catequina (PIZZI, 1993). Essas informações são relevantes, pois até o momento não há estudos que evidencie a presença desses metabolitos nas folhas de *M. caesalpinifolia*. Esses dados podem vir a serem úteis nos estudos quimiotaxonômico da espécie.

5.3 ETAPA BIOLÓGICA

Na avaliação microbiológica as concentrações inibitórias de 50% do crescimento (IC_{50}) e 100% (IC_{100}) do extrato e frações da *Mimosa caesalpinifolia* foram determinadas sobre leveduras, bactérias Gram positivas e Gram negativas. Todos exibiram atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados e em concentrações variando de 5 a 1000 $\mu\text{g/mL}$.

No ensaio em leveduras (Tabela 5), observou que o IC_{50} do extrato das folhas e suas frações, seguem a seguinte ordem decrescente de atividade: fração acetato de etila < extrato da folha < fração aquosa < fração butanólica. A concentração mínima inibitória de 100 % (IC_{100}) foi observada para a Fr-EtOAc, a qual apresentou valores menores de IC_{100} quando comparado com a Fr-AqOH = Fr-BuOH = EHM (exceto, na concentração 500 $\mu\text{g/mL}$ para *C. krusei*, e não houve ação sobre *C. albicans*).

Tabela 5 - Concentrações inibitórias (IC₅₀) e (IC₁₀₀) para leveduras.

		C. albicans ATCC 10231	C. albicans ATCC 64548	C. glabrata ATCC 90030	C. krusei ATCC 6258	C. parapsilosis ATCC 22019	C. tropicalis ATCC 75
Fluconazol	IC ₅₀	1	2	Sem ação	Sem ação	16	1
	IC ₁₀₀	40	40	5	20	1000	1000
EHM 10% (µg/mL)	IC ₅₀	Sem ação	Sem ação	1000	500	1000	1000
	IC ₁₀₀	40	40	10	20	20	80
Fr-EtOAc (µg/mL)	IC ₅₀	1000	1000	20	40	1000	1000
	IC ₁₀₀	40	40	1000	1000	1000	1000
Fr-BuOH (µg/mL)	IC ₅₀	1000	1000	1000	1000	1000	1000
	IC ₁₀₀	80	80	10	20	40	100
Fr-AqOH (µg/mL)	IC ₅₀	1000	1000	1000	1000	1000	1000
	IC ₁₀₀						

EHM = extrato hidroalcoólico 70% das folhas; **Fr-EtOAc** = fração acetato de etila; **Fr-BuOH** = fração butanólica; **Fr-AqOH** = fração aquosa.

No ensaio sobre bactérias Gram positivas na tabela 6, pode se observar que a ação bactericida ocorre nas mesmas concentrações tanto para o extrato da folha, quanto para a fração aquosa. Estes valores podem ser indicativos de que possivelmente ao fazer a partição, o(s) componente(s) responsável(is) pela ação bactericida, presente no extrato bruto, também pode estar presente na fração aquosa. Evidencia sugerida pela ação obtida sobre as bactérias.

Tabela 6 - Determinações do perfil de sensibilidade, concentrações inibitórias (IC₅₀) e (IC₁₀₀) para bactérias.

		S. aureus	B. cereus	E. coli	P. aeruginosa
		ATCC 6538	ATCC 11778	ATCC 25922	ATCC 9027
Fluconazol	IC ₅₀	1.95	0.06	0.48	16.5
	IC ₁₀₀	15.6	15.6	3.9	125
EHM 10% (µg/mL)	IC ₁₀₀	5	5	1000	500
	IC ₅₀	1000	1000	1000	Sem ação
Fr-EtOAc (µg/mL)	IC ₁₀₀	100	500	500	1000
	IC ₅₀	1000	1000	1000	Sem ação
Fr-BuOH (µg/mL)	IC ₁₀₀	250	40	1000	1000
	IC ₅₀	500	1000	Sem ação	Sem ação
Fr-AqOH (µg/mL)	IC ₁₀₀	5	5	1000	500
	IC ₅₀	1000	1000	Sem ação	1000

EHM = extrato hidroalcoólico 70% das folhas; **Fr-EtOAc** = fração acetato de etila; **Fr-BuOH** = fração butanólica; **Fr-AqOH** = fração aquosa.

Segundo alguns autores, a presença de taninos e flavonoides pode conferir atividade antimicrobiana a um extrato (MENDES et al., 2011). Sendo assim, a presença destes compostos nos extratos e frações de *M. caesalpinifolia* leva à expectativa da presença de uma atividade antimicrobiana nos mesmos, a qual foi relatada nos estudos para fungos e bactérias.

As propriedades antimicrobianas dos taninos são bem conhecidas. Essas substâncias poliméricas de origem fenólicas como, por exemplo, os elagitaninos, são capazes de formar complexos com proteínas, através de ligações de hidrogênio, ligações hidrofóbicas e ligações covalentes (COWAN, 1999). Conseqüentemente, há a inativação de adesinas microbianas, inibição de enzimas bacterianas, ou à formação de complexos com os substratos dessas enzimas, alterando a estrutura e função. Outra forma é a possibilidade de atuar sobre as membranas celulares dos microrganismos, causando a ruptura do sistema de transporte de proteínas celulares (HASLAM, 1996). Os taninos também podem

complexar com íons metálicos, resultando na diminuição da disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano (SCALBERT, 1991).

A Fr-BuOH apresentou ação bactericida na concentração de 500 µg/mL, sobre *Staphylococcus aureus* (ATCC6538) e 1000 µg/mL sobre *Bacillus cereus* (ATCC11778). Comparando a ação do EHM com outras partes da planta (raiz, caule e casca do caule) em outros estudos realizados a inibição de bactérias Gram positiva, observou que somente o EHM demonstrou ação bactericida.

O extrato da espécie estudada demonstraram pouca eficácia para Gram negativas. Isto pode ter ocorrido devido à composição diferenciada da parede das bactérias Gram negativas em relação à Gram positivas. A parede celular de Gram negativas possui um componente adicional, uma membrana externa, que corresponde a uma segunda bicamada lipídica, que adere firmemente à camada de peptidoglicano, conferindo maior rigidez. A face externa da membrana externa é rica em lipopolissacarídeos (LPS), o que a torna mais lipofílica a substâncias exógenas (TORTORA et al., 2005).

Portanto, componentes do extrato com caráter mais lipofílico ou outros afins, poderão atravessar ou agir sobre a membrana, desencadeando, então, ação bacteriostática e/ou bactericida. Somente o EHM e a Fr-EtOAc agem inibindo 100% o crescimento da *Escherichia coli* (ATCC 25922) – 1000 µg/mL. Para *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), a Fr-AqOH foi o que demonstrou inibição de crescimento de 100%. A família Mimosoideae, possui na constituição química da grande maioria de suas espécies, flavonoides, alcaloides e substâncias tânicas (MECKES-LOZOYA et. al., 1990). A capacidade da espécie *Mimosa caesalpiniiifolia* de exibir atividade antimicrobiana pode ser devido à presença de compostos como flavonoides e taninos, em diferentes graus de distribuição na planta. Isto pode ser reforçado quando analisamos a Fr-EtOAc, que concentra grande parte dos flavonoides do extrato da folha extraídos por afinidade com o solvente utilizado na partição. A Fr-EtOAc apresentou valores promissores de inibição de crescimento frente aos fungos, *Candida glabrata* (ATCC 90030), e *C. krusei* (ATCC 6258), com concentrações de 20 e 40 nM/mL, respectivamente.

Os flavonoides apresentam a habilidade de inativar enzimas e complexarem-se com proteínas extracelulares, proteínas solúveis e com a parede celular das bactérias, configurando os prováveis mecanismos de ação

antimicrobiana. A total ruptura de membranas microbianas pode ser dada por flavonoides de caráter lipofílico (CHABOT et al., 1992). Assim, é possível estabelecer correlações entre os resultados anteriormente obtidos da capacidade antioxidante dos testes microbiológicos do extrato e frações de *M. caesalpinifolia* de espécies vegetais contendo taninos e flavonoides demonstrando a eficiência destes compostos na captura destes radicais e na ação antimicrobiana. Este estudo reafirma a importância de dados etnofarmacológicos na seleção de plantas para triagem de bioatividade uma vez que os resultados apresentaram uma expressiva contribuição para a identificação de atividades biológicas de extratos vegetais da flora brasileira utilizados na medicina popular.

5.3.1 AVALIAÇÃO CITOTÓXICA PARA ADENOCARCINOMA MAMÁRIO HUMANO MCF-7

Os resultados da avaliação da atividade antitumoral *in vitro* do extrato EHM e frações Fr-EtOAc, Fr-Bu e Fr-AqOH, frente às linhagens celulares, estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7 - Inibição da proliferação (%) de células tratadas por 48 h, com o extrato hidroalcoólico 70% (EHM) e as frações acetato de etila (Fr-EtOAc), butanólica (Fr-BuOH) e aquosa (Fr-AqOH) das folhas de *M. caesalpinifolia* em diferentes concentrações (5–320 $\mu\text{g mL}^{-1}$), estimada pelo teste de sulforrodamina B.

Tratamento ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Inibição da Proliferação (%)			
	<i>EHM</i>	<i>Fr-EtOAc</i>	<i>Fr-BuOH</i>	<i>Fr-AqOH</i>
5	91,7±0,9 ^a	95,3±0,2 ^a	92,7±0,8 ^a	77,6±1,3 ^a
20	92,8±1,3 ^a	96,5±0,1 ^a	92,9±0,4 ^a	81,4±0,7 ^b
80	94,1±1,4 ^a	97,3±0,1 ^a	95,4±0,3 ^b	80,8±0,4 ^b
160	96,5±0,6 ^b	98,0±0,1 ^b	96,7±0,3 ^b	81,7±0,6 ^b
320	96,8±0,4 ^b	98,6±0,2 ^b	97,3±0,3 ^b	82,6±0,3 ^b

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,01$) pelo teste de Tukey.

Na análise morfológica observou-se que o tratamento induziu alterações nas células, houve perda dos prolongamentos celulares, condensação da cromatina, formas arredondadas e intensa fragmentação celular, além da diminuição significativa ($p < 0,01$) do diâmetro das células, com o aumento da

concentração e do tempo de incubação, sugerindo morte celular causada pelo extrato e frações (Tabela 8 e Figura 27).

Tabela 8 - Diâmetro (μm) de células controle e tratadas por 48 h, com o extrato hidroalcoólico 70% (EHM) e as frações acetato de etila (Fr-EtOAc), butanólica (Fr-BuOH) e aquosa (Fr-AqOH) das folhas de *M. caesalpiniiifolia* em diferentes concentrações (5-320 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Tratamento ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Diâmetro (μm)			
	<i>EHM</i>	<i>Fr-EtOAc</i>	<i>Fr-BuOH</i>	<i>Fr-AqOH</i>
Controle	10,70 \pm 0,45 ^a	10,70 \pm 0,45 ^a	10,70 \pm 0,45 ^a	10,70 \pm 0,45 ^a
CP	5,90 \pm 0,20 ^b	5,90 \pm 0,20 ^b	5,90 \pm 0,20 ^b	5,90 \pm 0,20 ^b
5	6,62 \pm 0,18 ^b	5,57 \pm 0,22 ^b	5,92 \pm 0,26 ^b	6,14 \pm 0,27 ^b
20	6,06 \pm 0,16 ^b	4,88 \pm 0,16 ^c	5,08 \pm 0,17 ^b	5,23 \pm 0,17 ^c
80	5,29 \pm 0,16 ^b	3,92 \pm 0,24 ^c	4,20 \pm 0,24 ^c	4,50 \pm 0,25 ^d
160	4,47 \pm 1,8 ^c	2,73 \pm 0,21 ^c	2,79 \pm 0,20 ^d	2,99 \pm 0,22 ^e
320	2,66 \pm 0,16 ^d	0,55 \pm 0,13 ^d	0,71 \pm 0,15 ^e	0,72 \pm 0,16 ^f

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,01$) pelo teste de Tukey. **CP**: ciclofosfamida.

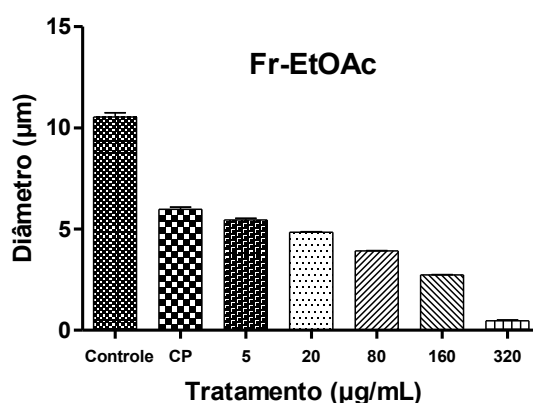


Figura 27 - Diâmetro (μm) de células controle e tratadas por 48 h, com o a fração acetato de etila (Fr-EtOAc) das folhas de *M. caesalpiniiifolia* nas diferentes concentrações (5 - 320 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Logo nos primeiros testes realizados de citotoxicidade, observamos que as frações e o extrato hidroalcoólico (EHM) de uma planta do gênero *Mimosa* apresentaram significativa atividade, contra as células de mama (MCF-7). O extrato e as frações Fr-EtOAc, Fr-BuOH e Fr-AqOH foram mais potentes que o controle

positivo contra células de mama, com média de inibição de proliferação de 91% ou mais para o extrato EHM, Fr-EtOAc e Fr-BuOH e $77,6\pm 1,3\%$ para a fração Fr-AqOH, o que seria resultado da presença de flavonoides e taninos nas amostras.

Na análise morfológica pode-se sugerir que a dose máxima testada (320 $\mu\text{g/mL}$) apresentou atividade antitumoral considerável, quando os dados são comparados aos do controle negativo (Figura 28). Uma comparação entre os dados apresentados para o extrato e as frações, revela que mais uma vez, Fr-EtOAc foi considerado a fração mais ativa, seguida da Fr-BuOH e Fr-AqOH. Ainda, verificou-se que na dose mínima testada (5 $\mu\text{g/mL}$), o extrato e as frações apresentaram resultados significativos que apontassem para uma atividade antitumoral. Os resultados sugerem maior eficácia nas doses testadas mais elevadas, uma vez que a inibição do crescimento tumoral mostrou clara atividade antitumoral nestas doses. Destaca-se que todas as doses testadas inibiram o crescimento tumoral.

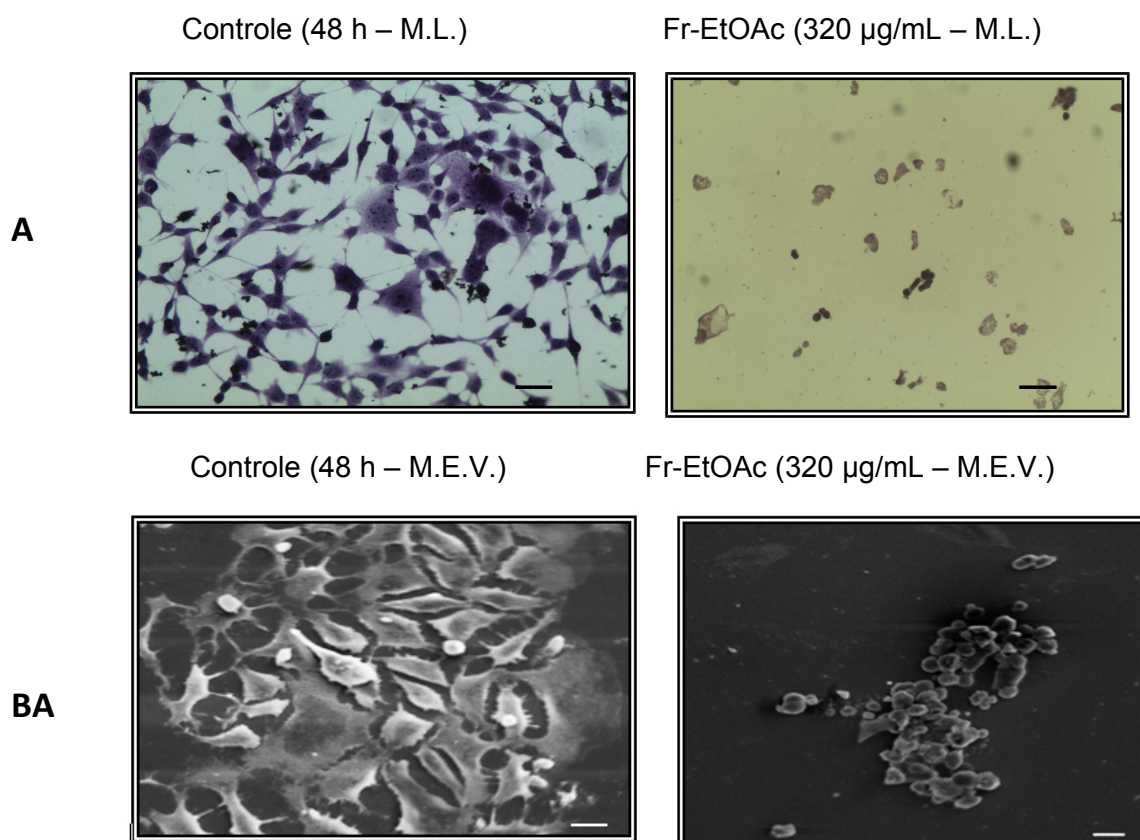


Figura 28 - Morfologia das células MCF-7 tratadas com Fr-EtOAc com 320 $\mu\text{g/mL}$ por 48 h. (A) Microscopia de luz. Barra: 50 μm . (B) Microscopia eletrônica de varredura. M.E.V. Barra: 20 μm .

Sendo assim, pode-se verificar que a Fr-EtOAc seguida da Fr-BuOH mostraram promissoras como protótipo para atividade antitumoral, pois os mesmos apresentaram maiores efeitos citotóxicos e tendência de redução de proliferação celular nesse estudo.

O estudo de atividade-guiada evidenciou forte atividade antiproliferativa e indutora de morte celular no extrato e frações das folhas de *Mimosa caesalpiniiifolia*. Estes resultados revelam a importância da bioprospecção sistemática de plantas e confirmam que este é um caminho promissor para o desenvolvimento de novos agentes anti-câncer.

5.3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

O modelo de granuloma em ratos tem sido utilizado para avaliação da reação inflamatória crônica e pode ser utilizado de maneira crônica ou sub-crônica na investigação de substâncias anti-artríticas (SPECTOR, 1960).

A formação do granuloma no local do implante do *pellet* de algodão está relacionada com o acúmulo de fluído, material protéico e com infiltração de neutrófilos. Ao final do experimento de sete dias, o granuloma pode ser caracterizado pela formação de uma cápsula fibrosa, vascularizada, contendo fibroblastos e apresentando, ainda, infiltração de células polimorfonucleares. Assim, quanto menor for a formação dessa cápsula, maior será a atividade anti-inflamatória do fármaco (LE BARS et al., 2001).

Sendo assim, o uso de extratos e frações terapêuticas em modelos experimentais animais constitui um dos caminhos fundamentais para obtenção de insumos farmacêuticos de produtos naturais para uma ação eficaz e segura, garantido dessa forma, o uso na terapêutica humana e veterinária.

O tratamento dos animais durante 7 dias levou a uma redução significativa no peso do granuloma nas doses testadas do extrato hidroalcoólico 70% (EHM) obtido das folhas de *M. caesalpiniiifolia* e das suas respectivas frações. Nos experimentos realizados, o peso dos granulomas dos animais tratados com dexametasona, Fr-EtOAc e Fr-BuOH na dose de 100 mg/Kg tiveram a menor média, seguida pela Fr-AqOH e EHM de 300 mg/Kg (Tabela 9 e Figura 29).

Tabela 9 - Efeito do EHM de *M. caesalpiniiifolia* e suas frações **Fr-EtOAc**: Fração acetato de etila; **Fr-BuOH**: Fração butanólica; **Fr-AqOH**: Fração aquosa na formação de granuloma em animais, com dexametaxona ou CMC (1%). Os resultados expressam as médias (mg) \pm DM. **p<0,01e ***p<0,1 em relação ao controle.

Peso médio do granuloma (mg)	
Veículo	0,5754 \pm 0,03
EHM 30	0,4112 \pm 0,02***
EHM 100	0,2410 \pm 0,01***
EHM 300	0,1570 \pm 0,01***
Fr-EtOAc 30	0,2898 \pm 0,02***
Fr-EtOAc 50	0,1837 \pm 0,01***
Fr-EtOAc 100	0,1412 \pm 0,01***
Fr-BuOH 30	0,3681 \pm 0,02***
Fr-BuOH 50	0,2080 \pm 0,01***
Fr-BuOH 100	0,1460 \pm 0,01***
Fr-AqOH 30	0,4465 \pm 0,04**
Fr-AqOH 50	0,2277 \pm 0,02***
Fr-AqOH 100	0,1794 \pm 0,02***
DEXA	0,1339 \pm 0,01***

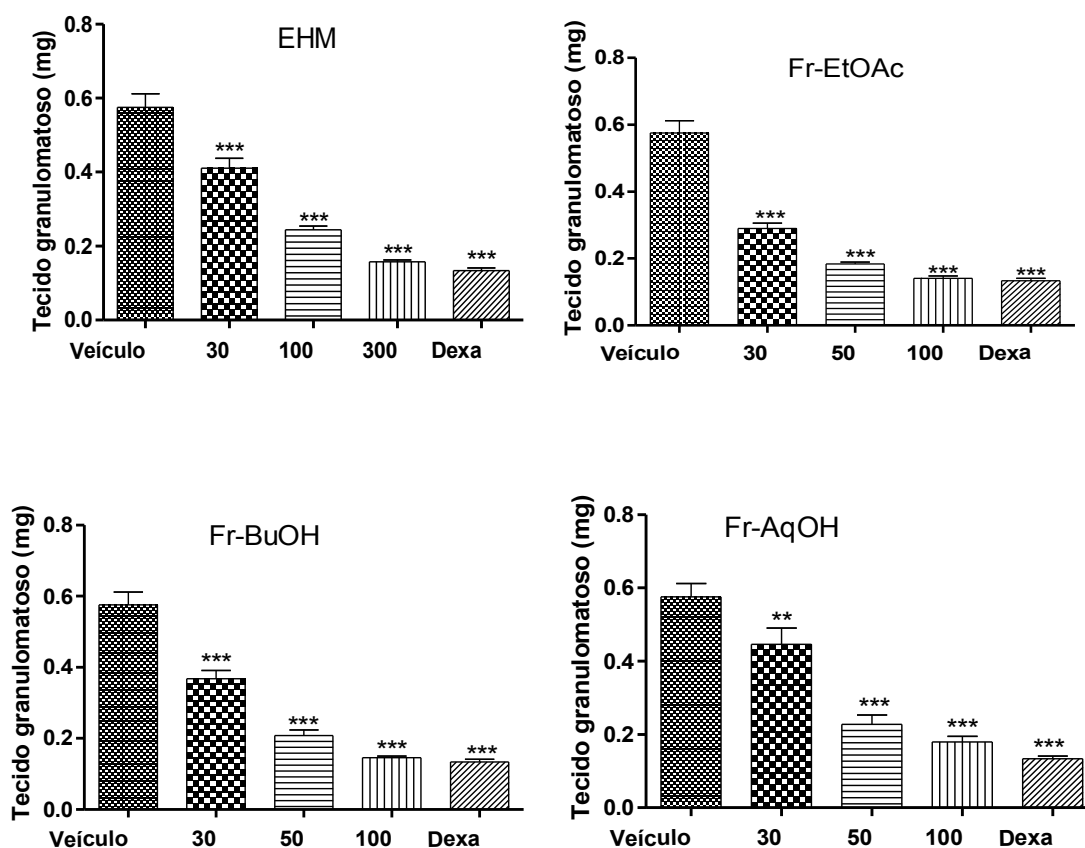


Figura 29 - Efeito do EHM de *M. caesalpinifolia* na formação de granuloma em animais tratados com 30, 100 e 130 mg/Kg das frações **Fr-EtOAc**: Fração acetato de etila; **Fr-BuOH**: Fração butanólica e **Fr-AqOH**: Fração aquosa nas doses 30, 50 e 100 mg/Kg, com dexametaxona ou CMC(1%). **p<0,01 e ***p<0,01em relação ao controle.

Este modelo avalia tanto a fase transudativa quanto a fase proliferativa da inflamação crônica. Substâncias anti-inflamatórias como por exemplo a dexametasona interferem no processo de formação do granuloma suprimindo a fase inicial de infiltração de neutrófilos no granuloma (BAILEY, 1982).

A atividade constatada pode ser relacionada aos constituintes químicos de substâncias presentes nas amostras, uma vez que a literatura descreve alguns trabalhos que demonstram significativa atividade anti-inflamatória dos compostos como: lupeol (GEETHA e VARALAKSHMI, 2001), sitosterol, β -amirina, catequina e taninos condensados (SENATORE, 1989; GOMEZ, 1999). Uma vez detectada catequina e taninos condensados no extrato e frações das folhas de *M. caesalpinifolia* podemos evidenciar resultados significativos no teste proposto.

5.3.3 AVALIAÇÃO ANTINOCICEPTIVA

Com o intuito de avaliar o efeito terapêutico do EHM foi realizado o modelo experimental de hipernocicepção, induzida pela injeção intraplantar de carragenina e os efeitos antinociceptivos das drogas utilizadas nos tratamentos é medido pelos filamentos de von Frey.

Os animais tratados com carragenina apresentaram hipernocicepção mecânica significativa quando comparado com as medidas basais realizadas antes do teste, como indicado pela redução do limiar basal em resposta à estimulação do filamento de Von Frey (FVF) da pata injetada ($p < 0,001$). As três doses 30-300 mg/kg de EHM, administradas oralmente, foram capazes de produzir redução significativa da hipernocicepção mecânica induzida pela injeção de carragenina. Este efeito foi sustentado em 1 hora após a administração (Figura 30). Os animais, quando tratados com a droga controle-positivo indometacina (10 mg/kg), demonstraram redução significativa e persistente do quadro hipernociceptivo.

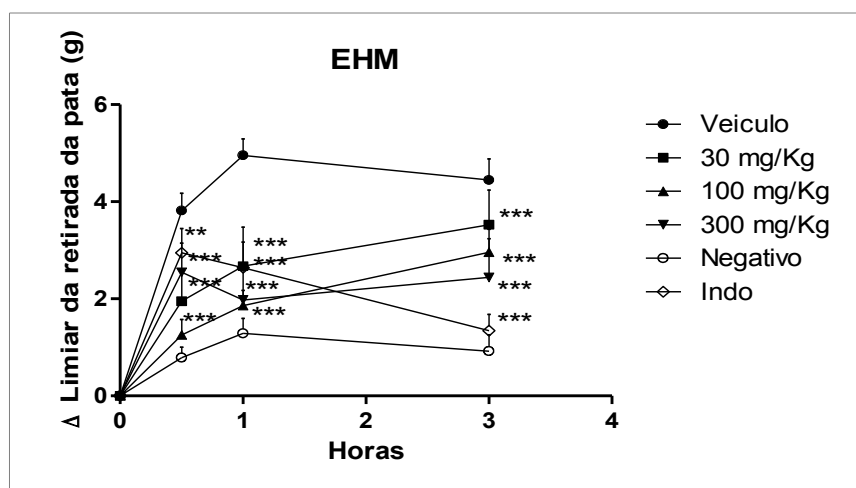


Figura 30 - Efeito da administração EHM ou Indometacina (INDO-10mg/kg) em hipernocicepção induzida pela injeção intraplantar de carragenina (100µg/pata) em camundongos detectada pelo Von Frey eletrônico. Cada ponto representa a média \pm S.E.M. de dez animais por grupo. Os asteriscos denotam níveis de importância quando comparados com o grupo veículo: ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Este método eletrônico tem várias vantagens clássicas ao longo dos filamentos de Von Frey, podemos citar a redução do número de tentativas necessárias para avaliar o limiar nociceptivo e a estimulação de áreas de igual

tamanho (a área varia com o diâmetro dos filamentos de Von Frey) (CUNHA et. al., 2004).

Estudos têm demonstrado que a hipernocicepção induzida pela carragenina em camundongos é dependente de duas citocinas chave, o TNF- α e o KC. Ambas atuam através da liberação de IL-1 β , a qual age liberando prostanoídes. Ademais, o KC atua por meio de aminas simpatomiméricas, enquanto os eventos relacionados ao TNF- α são dependentes do receptor TNF-R1. Cunha et al., (2005), demonstraram que existem uma diferença funcional na sequência de liberação das citocinas em ratos e camundongos, no entanto o efeito final é indireto e mediado pela liberação de prostanoídes e aminas simpatomiméticas.

Flavonoides e compostos fenólicos têm demonstrado múltiplos efeitos biológicos como atividade antioxidante (BORS, SARAN, 1987), atividade antinociceptiva *in vivo* (DELORME, et al., 1977; MILLS; BONE, 2000), ação anti-inflamatória (MOREIRA et al., 2000; RAO et al., 2003) e inibição da liberação de células histamínicas (AMRESH et al., 2007) o que evidencia a presença destes efeitos, especificamente na atividade antinociceptiva do extrato obtido das folhas de *M. caesalpinifolia*, contribuindo, com isso, para o desenvolvimento de novos analgésicos, bem como para a investigação dos mecanismos da dor inflamatória.

5.3.4 TESTE DA ATIVIDADE EXPLORATÓRIA - TESTE DO CAMPO ABERTO

Drogas que melhoram a atividade motora ou induzem sedação podem fornecer resultados falso-positivo/negativo (RODRIGUES et al., 2002). Dessa forma avaliou-se o EHM obtido das folhas de *M. caesalpinifolia* e suas frações causavam relaxamento muscular ou sedação. Camundongos foram submetidos ao teste do campo aberto.

A avaliação da performance motora tem por objetivo detectar a ocorrência de incoordenação motora, permitindo uma interpretação mais acurada dos resultados obtidos nos testes para determinação da atividade antinociceptiva. Portanto, drogas que promovem relaxamento ou sedação alteram a performance motora e podem interferir na resposta, sem serem necessariamente antinociceptivas (LAPA, 2008).

Os cinco parâmetros avaliados: o número total de cruzamentos, que avalia a atividade exploratória do animal, podendo ser afetada por fármacos com ação no SNC ou relaxantes musculares periféricos; o número total do levantar, número de auto-limpeza e o tempo parado, que avaliam o grau de sedação ou medo (ansiedade), podem ser alterados por fármacos com atividade ansiolítica, ansiogênica; bem como o número de bolos fecais, que podem ser alterado por diferentes grupos de fármacos, tais como ansiolíticos, ansiogênicos, dentre outros, como espasmolíticos ou espasmogênicos (ARCHER, 1973; SIEGEL, 1946).

O EHM e as frações não alteraram a movimentação espontânea dos camundongos. Este efeito foi demonstrado pelo número total de cruzamentos em 5 minutos no campo aberto. A tabela 10 mostra que as doses de 30, 100 e 300 mg/Kg do EHM e nas doses de 30, 50, 100 mg/Kg das frações Fr-EtOAc, Fr-BuOH e Fr-AqOH não alterarão com significância estatística, o número total de cruzamentos, o número total do levantar, nem o número de auto-limpeza. Descartando, com isso, uma ação do EHM e das frações, nas doses utilizadas, na atividade locomotora dos animais. O grupo diazepam (5mg/kg) - fármaco padrão, porém, teve o número total do levantar diminuído, mas não apresentou alterações no número de auto-limpeza.

Tabela 10 - Número total de cruzamentos, número total de levantar, número de auto-limpeza, número de bolos fecais e tempo parado (segundos), no campo aberto de 60 minutos após o tratamento com veículo (C), extrato das folhas de *M. caesalpiniiifolia* (EHM) (30-300 mg/Kg), Fr-EtOAc (30-100 mg/Kg), Fr-BuOH (30-100 mg/Kg), Fr-AqOH (30-100 mg/Kg) ou diazepam (DZP, 5 mg/Kg). Os resultados são as médias±EPM (n=8).

	N° total de cruzamentos	N° total de levantar	N° de auto-limpeza	N° de bolos fecais	Tempo parado (segundos)
Controle	61,05±2,19	12,25±0,83	33,63±2,65	3,00±1,00	25,16±1,14
EHM 30	67,15±1,82	11,13±0,91	38,75±3,49	1,00±0,00***	57,98±2,84***
EHM 100	66,10±2,09	13,38±0,98	42,00±3,77	2,00±0,00***	107,0±4,40***
EHM 300	66,63±2,36	12,50±0,86	41,50±4,28	1,00±0,00***	129,1±5,99***
Fr-EtOAc 30	66,88±2,65	11,88±1,14	36,88±3,53	1,00±0,00***	67,04±1,61***
Fr-EtOAc 50	64,38±2,36	12,63±1,17	45,25±3,43	1,00±0,00***	123,1±5,78***
Fr-EtOAc 100	65,50±2,54	11,38±0,86	41,88±4,54	1,00±0,00***	152,5±1,84***
Fr-BuOH 30	64,46±2,91	10,25±0,75	38,38±3,81	1,00±0,00***	69,45±1,43***
Fr-BuOH 50	65,26±3,14	10,63±0,86	42,50±3,91	1,00±0,00***	131,0±4,41***
Fr-BuOH 100	64,46±2,77	9,625±0,75	42,38±4,43	1,00±0,00***	149,1±1,99***
Fr-AqOH 30	65,66±1,95	10,75±0,86	39,38±3,79	2,00±0,00	35,87±3,22*
Fr-AqOH 50	65,19±2,12	12,25±0,95	42,75±3,45	1,00±0,00***	39,35±2,56*
Fr-AqOH 100	65,50±2,36	12,63±0,67	44,00±3,94	2,00±0,00	42,71±3,47**
DZP	59,00±3,29	5,25±0,36***	27,38±0,90	00,00±0,00***	169,6±3,54***

*Estatisticamente diferente dos grupos tratados com o veículo ($p < 0,05$).

**Estatisticamente diferente dos grupos tratados com o veículo ($p < 0,01$).

***Estatisticamente diferente dos grupos tratados com o veículo ($p < 0,001$).

O EHM das folhas de *M. caesalpiniiifolia* nas doses utilizadas, não alterou o número total de cruzamentos, descartando uma ação, na atividade locomotora dos animais. O tempo parado, porém, foi diminuído, o que é indicativo de uma atividade depressora mais específica no SNC, sugerindo uma ação ansiolítica sem comprometimento motor, que ainda deve ser melhor investigada através de outras metodologias, tais como o labirinto em cruz elevado ou caixa claro/escuro. O número de bolos fecais diminuído pode também sugerir uma ação ansiolítica nas doses estabelecidas.

As frações Fr-EtOAc, Fr-BuOH e Fr-AqOH não alteraram, com significância estatística ($p > 0,05$), o número total de cruzamentos, o número total do levantar, nem o número de auto-limpeza, resultado semelhante ao observado com o EHM, que também mostrou que as frações não alteraram a atividade locomotora

dos animais. O tempo parado na Fr-AqOH foi diminuído nas doses de 30 e 50 mg/kg que apresentou $p < 0,05$ e na dose de 100 $p < 0,01$, enquanto o seu número de bolos fecais foi aumentada na dose 30 e 100 mg/Kg. Estes foram os únicos parâmetros alterados, tanto pelo EHM como pelas frações (Figura 31).

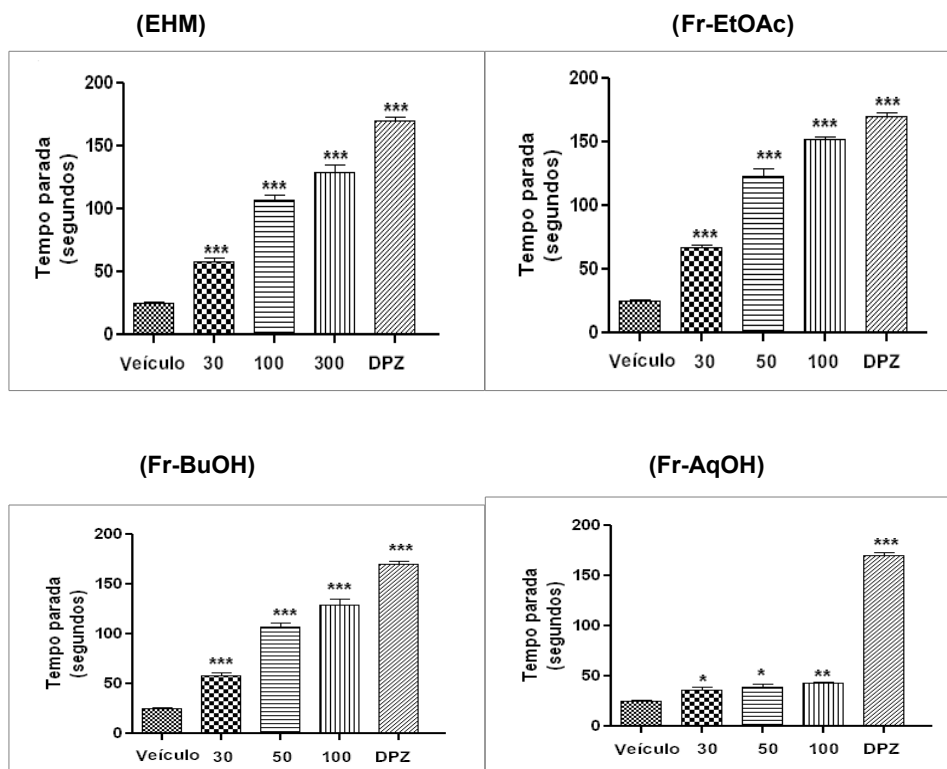


Figura 31 - Tempo de parada (segundos) no teste do campo aberto, camundongos tratados com o extrato hidroalcoólico 70% (EHM), as frações **Fr-EtOAc**: Fração acetato de etila; **Fr-BuOH**: Fração butanólica e **Fr-AqOH**: Fração aquosa das folhas de *M. caesalpiniiifolia*.*Os resultados expressam as médias \pm DM. Significância * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao veículo.

5.3.5 TESTE DA TOXICIDADE AGUDA E “SCREENING HIPOCRÁTICO”

Os produtos isolados de plantas compõem uma vasta gama de compostos orgânicos naturais, produtos do metabolismo primário e secundário, que podem exercer efeitos benéficos ou maléficos sobre o organismo. As reações adversas que as plantas desencadeiam, são de seus próprios componentes, causados pela presença de contaminantes ou, até mesmo, pelas preparações empíricas duvidosas (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006). Para assegurar o uso desses produtos, é necessário submetê-los a testes de segurança. Os testes de segurança são recomendados por legislações específicas. As informações

toxicológicas pré-clínicas são obtidas a partir de pesquisas em animais de laboratório padronizados (BRASIL, 2004). Apesar do uso disseminado de plantas medicinais, as pesquisas que avaliam a toxicidade desses produtos são escassas (TUROLA e NASCIMENTO, 2006).

Para melhor entendimento do uso de plantas, é necessária a avaliação da relação risco/benefício do seu uso, por meio de estudos farmacodinâmicos e toxicológicos. Portanto, o uso pela medicina popular baseado no conhecimento tradicional, não são suficientes para validar as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros (FARIAS, 2007).

Considerando que o uso de plantas é prática prevalente em ampla faixa populacional brasileira, incluindo as populações de áreas rurais, e também a inclusão de plantas na Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS fica evidente a importância dos estudos toxicológicos das espécies. Assim, a necessidade de pesquisas que avaliem as potencialidades toxicológico de *Mimosa caesalpiniiifolia*. O estudo se mostra ainda mais necessário, pois não foram encontrados relatos de estudos envolvendo ensaios de toxicidade da espécie. Diante dessa realidade, o teste proposto tem o objetivo de efetuar uma avaliação estimativa e preliminar das propriedades tóxicas extrato e das frações acetato de etila, butanólica e aquosa obtidas a partir do extrato etanólico 70%.

Após o teste “t” Student, verificou-se a não existência de diferença significativa ($p>0,05$) entre animais tratados com salina e aqueles tratados com o extrato e as frações de *M. caesalpiniiifolia* (Tabela 11). A sobrevivência de todos os animais e a ausência de quaisquer alterações macroscópicas (Figura 32) nos órgãos indicam que o extrato e as frações não apresentaram sinais de toxicidade em camundongos, quando administrado em uma única dose de 5000 mg/Kg, por via oral. Desta forma, sugere-se que a dose administrada não apresenta efeitos tóxicos que possam comprometer a utilização do extrato.

Tabela 11 - Avaliação do efeito tóxico agudo do extrato e das frações acetato de etila, butanólica e aquosa das folhas de *M. caesalpinifolia* (5000 mg/Kg, v.o.).

Tratamento	Mortalidade	Rins *	Fígado*	Coração*	Pulmão*
Machos					
Salina	0/6	0,33 ± 0,05	1,15 ± 0,27	0,12 ± 0,01	0,14 ± 0,03
EHM	0/6	0,39 ± 0,43	1,35 ± 0,49	0,12 ± 0,02	0,15 ± 0,03
Fr-EtOAc	0/6	0,37 ± 0,17	1,24 ± 1,11	0,13 ± 0,08	0,15 ± 0,06
Fr-BuOH	0/6	0,40 ± 0,21	1,36 ± 0,78	0,14 ± 0,11	0,14 ± 0,07
Fr-AqOH	0/6	0,39 ± 0,38	1,38 ± 0,90	0,13 ± 0,19	0,16 ± 0,19
Fêmeas					
Salina	0/6	0,39 ± 0,15	1,10 ± 0,17	0,12 ± 0,12	0,14 ± 0,06
EHM	0/6	0,33 ± 0,03	1,29 ± 0,39	0,13 ± 0,01	0,15 ± 0,07
Fr-EtOAc	0/6	0,34 ± 0,11	1,20 ± 1,01	0,15 ± 0,05	0,15 ± 0,02
Fr-BuOH	0/6	0,37 ± 0,16	1,35 ± 0,52	0,14 ± 0,03	0,16 ± 0,09
Fr-AqOH	0/6	0,38 ± 0,13	1,36 ± 0,73	0,13 ± 0,08	0,14 ± 0,12

EHM: Extrato hidroalcoólico 70%. **Fr-EtOAc:** Fração acetato de etila; **Fr-BuOH:** Fração butanólica; **Fr-AqOH:** Fração aquosa. *Os resultados expressam as Médias (g) ± DM. Significância $p > 0,05$.

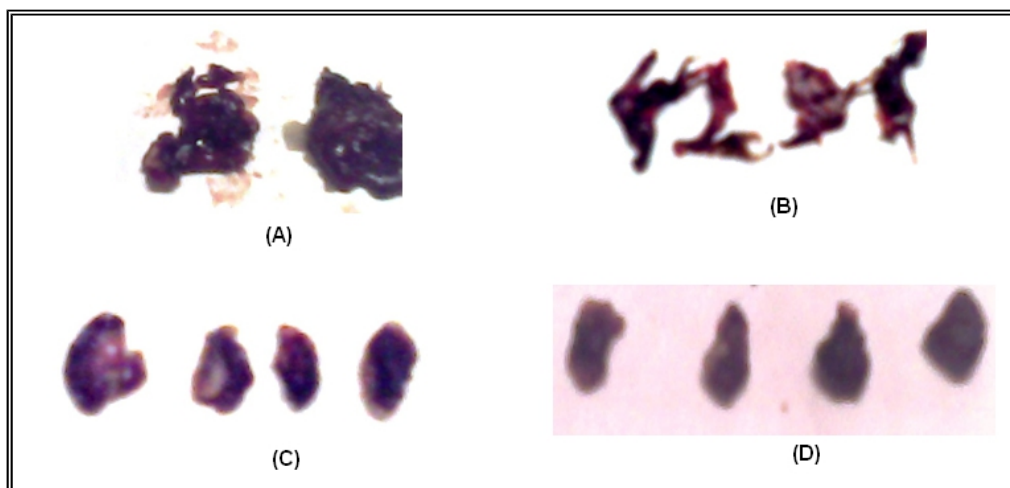


Figura 32 - Órgãos biopsiados de camundongo, após administração do extrato e frações de *M. caesalpinifolia*. (A) Fígado; (B) Pulmão; (C) Rins; (D) Coração.

O monitoramento diário dos pesos, não indicou variação em relação ao controle negativo (Figura 33).

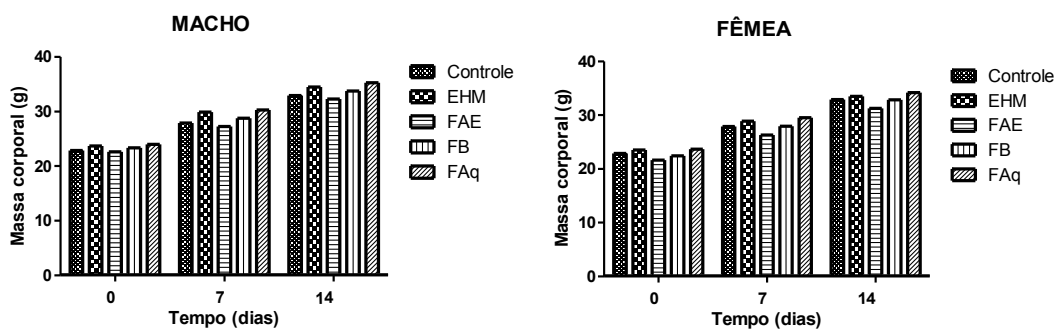


Figura 33 - Evolução do peso corporal de camundongos machos e fêmeas tratados com o extrato hidroalcoólico 70% (EHM), e as frações **Fr-EtOAc**: Fração acetato de etila; **Fr-BuOH**: Fração butanólica; **Fr-AqOH**: Fração aquosa das folhas de *M. caesalpinifolia*. *Os resultados expressam as Médias (g) \pm DM.

Em relação às observações que visam ao estado de depressão ou estimulação central o extrato e suas frações não demonstraram influenciar na atividade geral e consciência dos animais. Nos hábitos fisiológicos diários (consumo de água, ração e produção de fezes e urina), também não houve variação significativa entre os grupos tratados em relação ao grupo controle (Figura 34).

O estudo da toxicidade pré-clínica deve indicar qual o grau de confiança a ser depositado em um preparado farmacêutico a ser administrado à espécie humana.

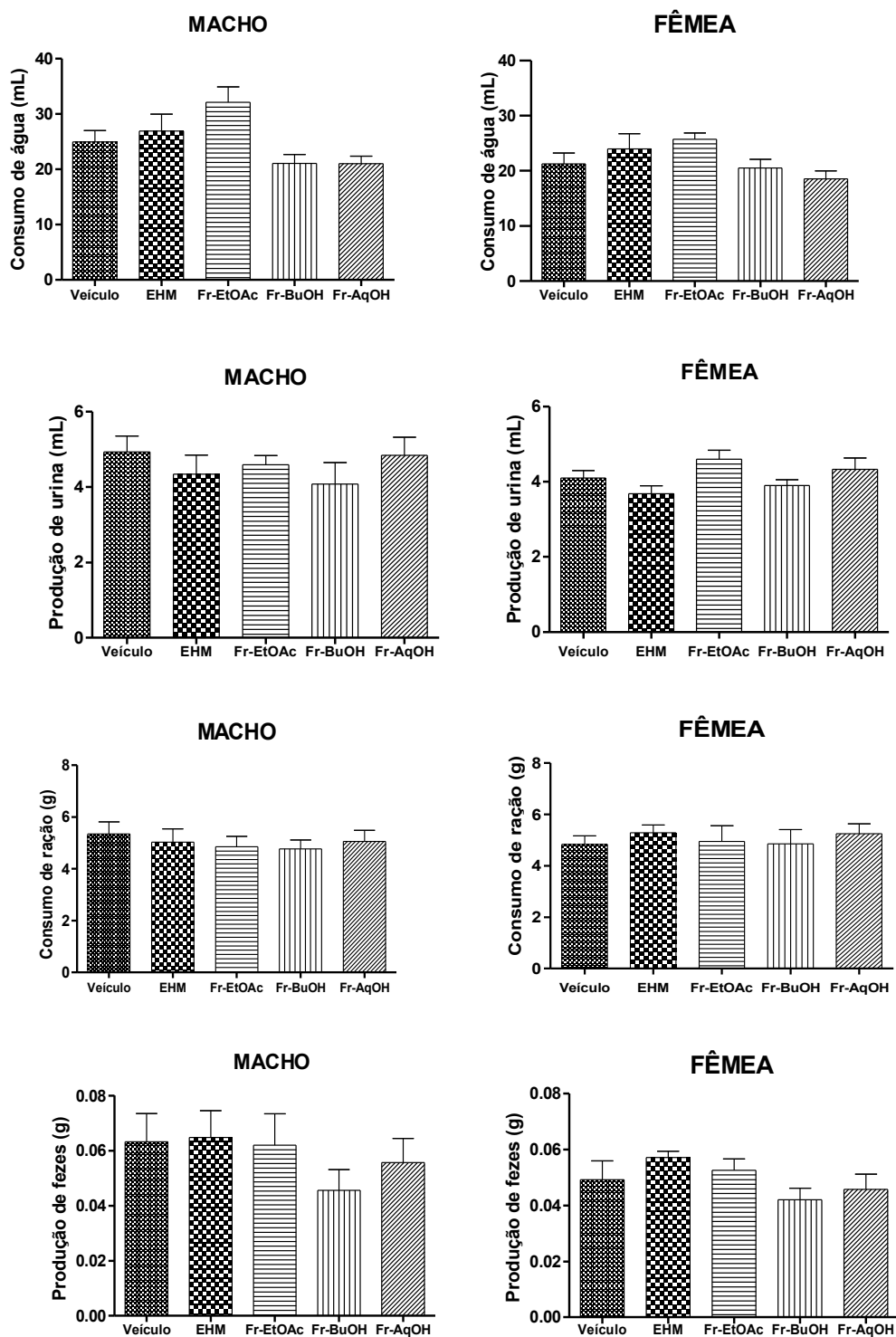


Figura 34 - Hábitos fisiológicos diários de camundongos machos e fêmeas tratados com o extrato hidroalcoólico (EHM), as frações **Fr-EtOAc**: Fração acetato de etila; **Fr-BuOH**: Fração butanólica; **Fr-AqOH**: Fração aquosa das folhas de *M. caesalpinifolia*. *Os resultados expressam as Médias (mL) \pm DM. Significância $p > 0,05$.

A literatura não apresenta relatos de nenhum estudo toxicológico desenvolvido anteriormente para a planta *Mimosa caesalpinifolia*. Porém, ressalta-se a necessidade que seja realizada outras pesquisas que possibilitem comparar os resultados utilizando outras vias de administração, além de estudos que envolvam as análises anato-patológico dos órgãos obtidos dos animais. Esses processos são necessários para comprovar a segurança do uso da espécie por humanos e animais.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Com os estudos realizados podemos avaliar os constituintes químicos do extrato e frações polares e de média polaridade da espécie pertencente à família Mimosaceae. A partir da análise fitoquímica da espécie *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. foram caracterizadas e identificadas substâncias já conhecidas, porém referenciadas pela primeira vez nesta espécie;
- Uma vez que nenhum estudo da avaliação de qualidade fora feito com as folhas de *M. caesalpiniiifolia* Benth., os resultados obtidos nos ensaios farmacognósticos e farmacobotânicos conferem um padrão para eventuais pesquisas futuras.
- O EHM de *M. caesalpiniiifolia* Benth. e as frações Fr-EtOAc, Fr-BuOH e Fr-AqOH foram submetidas a testes biológicos para averiguar a sua toxicidade aguda, atividade microbiológica, citotoxicidade celular, anti-inflamatória e antinociceptiva. Além desses testes biológicos, foram realizados também ensaios para avaliar a atividade antioxidante do extrato e das frações e a quantificação de fenóis totais. Esses ensaios visaram colaborar no esclarecimento do possível mecanismo de ação do extrato e das frações obtidas da espécie.
- No ensaio de toxicidade aguda, o extrato e as frações não apresentaram efeitos tóxicos aparentes, com a administração de 5000 mg/Kg (v.o). Não houve também alterações fisiológicas ou comportamentais, tampouco ocorreram mortes dos animais tratados com o extrato e as frações.
- Os resultados obtidos a partir da avaliação microbiológica, citotoxicidade celular e anti-inflamatória de EHM e da Fr-EtOAc, Fr-BuOH e Fr-AqOH confirmam e estendem os dados descritos na literatura e mostram claramente que os compostos fenólicos, flavonoides e taninos apresentam uma importante ação antinociceptiva e anti-cancerígena.
- Em conjunto, os resultados do presente estudo indicam 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 para o controle farmacológico de processos inflamatórios, cancerígenos e microbiológicos.

REFERÊNCIAS

- ARDREY, R. E. **Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction**. San Francisco: John Wiley, 2003. p. 289.
- AGRA, M. F. et al. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 383-395, 2007.
- AGUIAR, R. M.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. In: 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ. **Anais Fenólicos do extrato clorofórmico de *Mimosa invisa***. São Paulo, 2006. p. 234.
- AKIN, D. E.; BURDICK, D.; MICHAELS, G. E. Rumen bacterial interrelationships with plant tissue during degradation revealed by transmission electron microscopy. **Applied Microbiology**, v. 27, n.6, p.1149-1156, 1973.
- ALMEIDA, C. F. C. B. R. et al. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). **Journal of Arid Environments**, v. 62, p. 127-142, 2005.
- ALVAREZ, J. M.; ROCHA, J. F.; MACHADO, S. R. Estrutura foliar de *Loudetiopsis Chrysothrix* (Ness) Conert e *Tristachya leiostachya* Ness (Poaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 28, n. 12, p.23-37, 2005.
- ALVES, E. **Curso introdutório à microscopia eletrônica de varredura**. 1 ed. Lavras, MG: UFLA-FAEPE. 2004. p.43.
- ALVES, H. M. Plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n: 3, p. 01-06, 2001. Disponível em: < <http://sbqgensino.foco.fae.ufmg.br>.> Acesso em 10 abr. 2012.
- AMALRAJ, T.; IGNACIMUTHU, S. Hyperglycemic effect of leaves of *Mimosa pudica* Linn. **Fitoterapia**, v. 73, p. 351-352. 2002.
- AMAROWICZ, R. et al. Plantas medicinais. **Chem. Pharm. Bull**, v.37, p. 2016. 1989.
- AMOROSO, M. C. M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.16, p. 189-203, 2002.
- AMRESH, G. et al. SINGH, P. N. Evaluation of anti-inflammatory activity of Cissampelos pareira root in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p. 526-531, 2007.
- ARAÚJO, C. A. C; LEON L. L. Biological activities of *Curcuma longa* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, p.723-728, 2001.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Anim. Behav.**, v.21, n.2, p.205-235, 1973.
- ARIMA, S.; SATO, N.; HARIGAYA, Y.; J. Steroids and Terpenoid from *Mimosa pudica* Roots. **Indian Chem. Soc**, v. 83, p.10,1044-1046, 2006.
- AUDI, E. A. et al. Antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens* in rats. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 3, p. 264-266,1999.
- BAILEY, P. J.; STURM, A. LOPES-RAMOS. A biochemical study of the cotton pellet granuloma in the rat. Effects of dexametasone and indomethacin. **Biochemical Pharmacology**, v.31, p. 1213-1218, 1982.

- BAILEY, P.J. Antiinflammatorische Wirkungen und Pharmakokinetik eines standardisierten Kiefernextraktes. **Biochem. Pharmacol**, v.31, p.1213-1222, 1982.
- BARREIRO, A. P.; DELACHIAVE, M. E. A.; SOUZA, F. S. Efeito alelopático de extratos de parte aérea de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] na germinação e desenvolvimento da plântula de pepino. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu**, v. 8, n. 1, p. 4-8, 2005.
- BARROSO, G. M. et al. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa, Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, v.2. 1984.
- BATISTA, L. M. et al. Isolation and identification of putative hallucinogenic constituents from the roots of *Mimosa ophthalmocentra*. **Pharmaceutical Biology**, v. 37, n: 1, p. 50-53. 1999.
- BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, v. 181, p.1199-1200, 1958.
- BOLDI, A.M. Libraries from natural product-like scaffolds. **Curr Opin Chem Biol**, v.8, p.281-286, 2004.
- BORS, W.; SARAN, M. Radical scavenging by flavonoid antioxidants. **Free radical research communication**, v.2, n. 131, 1987.
- BOUHCET, N.; BARRIER, L. ; FAUCHONEAU, B. Radical scavenging activity and antioxidant properties of tannins from *Guiera senegalensis* (Combretaceae). **Phytother Res.**, v.12, p.159-62. 1998.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 3. ed. Mossoró: ESAM, 1976. p. 540.
- BRASIL. 2011. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Antimicrobianos – Principais grupos disponíveis para uso clínico**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/cloranfenicol6.htm> Acesso em: 7 de jul. 2011.
- BUM, E. N. et al. Anticonvulsant activity of *Mimosa pudica* decoction. **Fitoterapia**, v. 75, p. 309-314, 2004.
- BURKART, A. Leguminosas mimosóideas. Pp. 1-299. In: P.R. Reitz (ed.). **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí, Herbário Barbosa Rodrigues. 1979.
- CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **J. Ethnopharmacol**, v.100, p.131-134, 2005.
- CAMPBELL, N. A., STIKA, K. M.; MORRISON, G. H. Calcium and potassium in the motor organ of the sensitive plant: localization by ion microscope. **Science**, v. 204, p. 185-187, 1979.
- CAMPELO, C. H.; CAMPELO, A.B. Contribuição ao estudo do sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.). In: CONGRESSO DE BOTÂNICA, 24, 1973, Pelotas. **Resumos...** Pelotas: Sociedade de Botânica do Brasil, 1973.
- CARNIELETTO, C.; MARCHIORI, J. N. C. Anatomia da madeira de *Mimosa eriocarpa* Benth. **Ciência Florestal**, v. 3, n.1, p. 107-120, 1993.
- CARRIELO, F. et al. Uso da Transmitância na caracterização espectral de folhas verdes, **Anais do XI Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**, Belo Horizonte, INPE, p. 2451-2457, 2003.
- CARVALHO, R. F. Alguns dados fenológicos de 100 espécies florestais, ornamentais e frutíferas, nativas ou introduzidas na EFLEX de Saltinho, PE. **Brasil Florestal**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 25, p. 42-44, 2007.

CATALAN, M.; MONTEJO, J. C. Antiifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. **Rev. Ib. de Micolog.**, v.23, p. 39-49. 2006.

CAVIN, A.; HOSTETTMANN, K.; DYATMYRO, W.; POTTERAT, O. Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*. **Planta Med.**, v. 64, p. 393-396, 1998.

CHABOT, S. et al. Hyphal growth promotion in vitro of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*, by the activity of structurally flavonoid compounds under CO₂-enriched conditions. **New Phytother.**, v.122, p. 461-467, 1992.

CHANDRIKA, R.; SHAILA, M. S. Isolation and properties of a lectin from the seeds of *Mimosa invisa* L. **J. Biosci.**, v. 12, n. 4, p. 383-391, 1987.

CHRESTANIA, F. et al. In vitro antiherpetic and antirotaviral activities of a sulfate prepared from *Mimosa scabrella* galactomannan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, p. 453-457, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard – Sixth edition. M7-A6. Wayne, PA, USA: CLSI, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Approved Standard-Third Edition. M27-A3. Wayne, PA, USA: CLSI, 2008.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1975. v. 1, p.1031.

COSTA, M. G. **O sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.)**. Boletim Técnico, n. 4, p. 16, 1983.

COWAN, M. M. Plant Product as Antimicrobial agents. **Clin Microb Revi.**, v.12, p. 564-82, 1999.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York, Columbia University Press, 1981, p. 35.

CUNHA, T. M. et al. A..An electronic pressuremeter nociception paw test for mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v .37, p. 401-407. 2004.

CUNHA, T. M. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **PNAS**, v. 102, n. 5, p.1755-1760, 2005.

DÄR, A. **Tecnologia Farmacêutica**. Zaragoza: Acribia, 1992. p.141-142, 144-152, 366.

DAVID, J. P. et al. Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. **Fitoterapia**, v. 78, p. 215-218, 2007.

DAVIS J. Inactivation of the antibiotics and dissemination of resistance genes. **Science**, v. 264, p. 375-382, 1994.

DELORME, P; JAY, M.; FERRY, S.. Inventaire phytochimique des *Boraginaceae indigenes*. **Planta Medical**, v.11, p. 5-11, 1977.

DEMPKE, W.; RIE. C.; SCHMOLL, A. G. H. Ciclooxygenase-2: a novel target for câncer quimioterapia?. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, n. 127, p 411-417, 2001.

DESMARCHELIER, C. et al. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the 'Caatinga' region in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 69-77, 1999.

DICKSON, W. C. **Integrative plant anatomy**. San Diego: Academic Press. 2000. p. 38.

- DOMINGUESZE, X. A.; GARCIA, S. G. Kukulkanins a and b, new chalcones from *Mimosa tenuifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 52, n.4, p. 864-867, 1989.
- EGIMANN P.; GARBINO J.; PITTET, D. Management of *Candida* species infections in critically ill patients. **The Lancet Infect Diseases**, 2003. p. 772-785.
- EHLERINGER, J. R.; MOONEY, H. A. Leaf hairs: effect on physiological activity and adaptative value to a desert shrub. **Oecologia**, v. 37, p. 183-200, 1978.
- ELIAS, T. S. Mimosoideae. In: R.M. Polhill & P.H. Raven (eds.). **Advances in Legume Systematics**. Kew, Royal Botanic Garden, 1981. p.143-152.
- ELIAS, T. S. The genera of Mimosoideae (Leguminosae) in the Southeastern United States. **Journal of the Arnold Arboretum**, v. 55(1), p. 67-87, 1974.
- ENGLERT, J.; ENIGER, B.; Triterpenoid saponins from *Mimosa pigra*. **Journal of Natural Products**, v.5, n.8, p.1265-1269, 1995.
- ESAÚ, K. **Anatomia Vegetal**. 3. ed. Omega, Barcelona. 1985. p. 779.
- FAHN, A. **Plant anatomy**. Oxford: Pergamon Press. 1990. p. 345.
- FAHN, A. Structural and functional properties of trichomes of xeromorphic leaves. **Annals of Botany**, v. 57, p. 631-637, 1986.
- FAHN, A.; CUTLER, D. **Xerophytes**. Berlin: Gebruder Borntraeger, 1992. p. 176.
- FARIAS, E. M. F. G. Avaliação da toxicidade aguda do extrato metanólico de folhas de *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 2007, Natal, RN. **Anais...** Natal: Sociedade Brasileira de Química. 2007. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2007/trabalhos/777-600-50.htm>>. Acesso em: 10 fev. 2012.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010. p. 345- 348.
- FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **Am J Bot.**, v. 55, p. 123-142, 1968.
- FELIPE, A. M. M. et al. Antiviral effect of *Guazuma ulmifolia* and *Stryphnodendron adstringens* on poliovirus and bovine herpesvirus. **Biological & Pharmaceutical Bulletin. Pharmaceutical Society of Japan**, v. 29, n. 6, p. 1092-1095, 2006.
- FERREIRA, S. H. Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil. Disponível: <<http://www.abc.org.br/arquivos/medicamentos.pdf>. p.142. 2001>. Acesso: em 13 mar. 2012.
- FLEURAT-LESSARD, P. et al. Effects of colchicine, vinblastine, cytochalasin B and phalloidin on the seismonastic movement of *Mimosa pudica* leaf and on motor cell ultrastructure. **Journal of Experimental Botany**, v.39, p. 209-221, 1988.
- GANGULY, M. et al. Effect of *Mimosa pudica* root extract on vaginal estrous and serum hormones for screening of antifertility activity in albino mice. **Contraception**, v. 76, p. 482-485, 2007.
- GEETHA, T.; VARALAKSHMI, P. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. **Jornal of Ethnopharmacology**, v.76, n. 1, p. 77-80, 2001.
- GENEST, S. et al. **Comparative bioactivity studies on two *Mimosa* species**. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas, v. 7, n. 1, p. 38-43, 2008.
- GLASL, H. Zur photometrie in der drogenstandardisierung – 3. Gehealtsbestimmung von gerbstoffdrogen. **Dtsch Apoth Ztg**, v.123, p. 1979-1987, 1983.
- GOMES, P. **Forragens fartas na seca**. 4. ed. São Paulo: Nobel, 1977. p. 236.

GOMEZ, M. A. A study of the topical anti-inflammatory activity of *Achillea ageratum* on chronic and acute inflammation models. **Journal of Biosciences**, v.54, n. 11, p. 937, 1999.

GOODMAN, H. G. GILMAN **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2007. p. 424-431.

GU, L. et al. Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric studies of proanthocyanidins in foods. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 38, n. 12, p. 1272-1280, 2003.

GUPTA, I. P.; ARIAS, T. D. The occurrence of Tryptamine and n-methyltryptamine in *Mimosa somnians*. **Journal of Natural Products**, v. 42, n. 2, 1979.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drug: possible modes of action. **J of Natu Prodc.**, v. 59, p. 205-215, 1996.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drug: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 205-215, 1996.

HASLAM, E. et al. E. Practical Polyphenolics from structure to molecular recognition and physiological action, Cambridge University Press: Cambridge, **Clinica Medica**, 1992. p.119-598.

HOLETZ, F. B. et al. Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpeessoai*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 4, p. 397 – 401, 2005.

LANG, Y. J.; AAG-BERRURIERR, M.; NTON, O. Structure of a new saponin from the bark of *Mimosa tenuiflora*. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 54, p. 1247-1253, 1991.

Instituto Nacional de Câncer (INCA), Ministério da Saúde (2009) Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2010. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=1>. Acesso em 20 de jan.2012.

IOSET, J. R. et al. A methylflavan with free radical scavenging properties from *Pancratium littorale*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 35-39, 2001.

JAIN, S. C.; JAIN, R.; VLIETIINCK. *In vivo* and *in vitro* antimicrobial efficacy of *Mimosa hamata*. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 271-274, 2004.

KAMEYAMA, K. et al. Tyrosine phosphorylation in plant bending. **Nature**, v. 407, p. 37, 2000.

KESTRING, D.; LUCIANA, C. C. R.; NOSSI, M. N. Relationship Among Phenolic Contents, Seed Predation, and Physical Seed Traits in *Mimosa bimucronata* Plants. **Journal Planta Biologica**, v. 52, p. 569-576, 2009.

KOKANE, D. D et al. Evaluation of wound healing activity of root of *Mimosa pudica*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 311-315, 2009.

KOKOGLU, E. et al. Prostaglandin E2 levels in human brain tumor tissues and arachidonic acid levels in the plasma membrane of human brain tumors. **Cancer Letters**, v. 132, p.17-21, 1998.

KUMAR, V. et al. **Pathology basis of disease**. 7. ed. China:WB Saunders, 2004. p.1552.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Calouste Gulbenkian. 2001. p. 341.

LAN, Z. Health-care tea for promoting diuresis, removing hemostasis and for treating insomnia, cough, hypertension and irregular menstruation comprises given range of peanuts, **Nelumbo lutea**, **cajuput**, **Ziziphora**, **Mimosa** and **sativa**. 2008. p. 321.

- LANGENHEIM, J. H. et al. Evolutionary implications of leaf resin pocket patterns in the tropical tree *Hymenaea* (Caesalpinioideae: Leguminosae). **American Journal of Botany**, v. 69, p. 595-607, 1982.
- LAPA, A. J. et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre/Florianópolis. Editora da Universidade, 2002. p.183-199.
- LAPA, A. **Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica**. SBPC-Campinas-SP, 2008.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. RiMa, São Carlos. 2000.
- LARGO JUNIOR, G.; RIDEOUT, J.A.; RAGASA, C.Y. A. Bioactive carotenoid from *Mimosa invisa*. **Philippine-Journal-of-Science**, v.126, n.1, p.107-15, 1997.
- LE BARS, D.; GOZARIU. M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacology**, v.53, p. 597-652, 2001.
- LEWIS, G. P.; ELIAS. T. S. Mimoseae Bronn. Pp. 155-168. In: R.M. Polhill; P.H. Raven . **Advances in Legume Systematics**. Kew, Royal Botanic Garden. 1981.
- LIM, J. W.; KIM, H.; KIM, K. H. Nuclear factor-kappaB regulates ciclooxigenase-2 expression and cell proliferation in human gastric cancer cells. **Lab Invest.**, v. 81, p. 349-360, 2001.
- LIMA, J. L. S. **Plantas forrageiras das caatingas: usos e potencialidade**. Petrolina-PE:EMBRAPA-CPTSA/PNE/RBG-KEW, 1996. p. 43.
- LIMA, P. M.. **Avaliação da atividade de extratos de folhas de *Momordica charantia*, *Auxemma oncocalyx* e *Ziziphus joazeiro* sobre bactérias e larvas de *Culex quinquefasciatus***. Mossoró: 2008. p. 13.
- LIN, A. et al. Characterization of proanthocyanidins in pea (*Pisum sativum* L.), letil (*Lens culinaris* L.), and faba bean (*Vicia faba* L.) seeds. **Food Research International**, v. 46, p. 528-535, 2012.
- LIST P. H.; SCHMIDT P. C. **Phytopharmaceutical technology**, CRC Press: Boca Raton, 2000. p. 54.
- LOBSTEIN, A. et al. 4-Hydroxymaysin and cassiaoccidentalin B, two unusual C-glycosylflavones from *Mimosa pudica* (Mimosaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 375-377, 2002.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Platarum, 2000. v. 1, p. 351.
- LOZOYA, X. et al. E. Experimental evaluation of *Mimosa tenuiflora* (Willd) poir (tepescohuite) I - Screening of the antimicrobial properties of bark extracts. **Arch de Invest Med.**, v. 20(1), p. 87-93, 1989.
- MACCARI, A.; MARCHIORI, J. N. C. Estudo anatômico do xilema secundário de *Mimosa sparsa* Benth. **Ciência Florestal**, v. 4, n. 1, p. 145-155, 1994.
- MACHADO, S. R.; RODRIGUES, T. M. Anatomia e ultra-estrutura do pulvino primário de *Pterodon pubescens* Benth. (Fabaceae-Faboideae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, p. 135-147, 2004.
- MAIA, G. N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo: D&Z Computação Gráfica e Editora, 2004. p. 413.
- MARCHIORI, J. N. C. Anatomia da madeira e casca do maricá, *Mimosa bimucronata* (DC.) O. Ktze. **Ciência Florestal**, v. 3, n. 1, p. 85-106, 1993.

- MARCHIORI, J. N. C. **Estudo anatômico do xilema secundário e da casca de algumas espécies dos gêneros *Acacia* e *Mimosa*, nativas no Estado do Rio Grande do Sul**. Curitiba - PR. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal do Paraná. p.186. 1980.
- MARCHIORI, J. N. C. A estrutura do xilema secundário de *Mimosa daleoides* Benth. (*Leguminosae Mimosoideae*). **Ciência e Natura**, v. 4, p. 107-113, 1982.
- MARCHIORI, J. N. C. Anatomia da madeira de *Mimosa cruenta* Benth. (*Leguminosae-Mimosoideae*). **Ciência e Natura**, v. 7, p. 73-81, 1985.
- MARQUESINI, N. R. Plantas usadas como medicinais pelos índios do Paraná e Santa Catarina, sul do Brasil: guarani, kaingáng, xokleng, ava-guarani, kraô, cayuá. p. 361. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 1995.
- MARTINS, A. B.; SACRAMENTO, L. V. S. Análise microscópica e física para controle de qualidade primária de matéria prima vegetal pulverizada. **16º Congresso de Iniciação Científica UNESP**. Ilha Solteira, Brasil. 2004.
- MECKES-LOZOYA, M. M.; LOZOYA, X.; GONZALES, J. L.; [Pharmacological properties *in vitro* of various extracts of *Mimosa tenuiflora* (tepescohuite)]. **Arch de Invest Med.**, 21(2) p. 163-169, 1990.
- MEDRI, M. E.; LLERAS, E. Aspectos da anatomia ecológica de folhas de *Hevea brasiliensis* Muell. **Arg. Acta Amazônica**, v.10, p. 463-493, 1980.
- MEENATCHISUNDARAM, S. et al. Flavan-3ols and prodelphinidins from *Stryphmodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v.41, n. 3, p. 807-813, 1996.
- MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. Quality control of *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae) hydroalcoholic extracts. **Acta Farm Bonaerense**, v.19, p. 211-215, 2000.
- MENDES, L. P. M et al. Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica Aplicadas**, v. 32(1), p. 121-125, 2011.
- MENDES, B. V. **Sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.)**: valiosa forrageira arbórea e produtora de madeira das caatingas. Mossoró: ESAM, (Coleção Mossoroense, 660, Série B). (Coleção Mossoroense, 660, Série B), 1989. p. 31.
- MENDES, I. D. A. & PAVIANI, T. I. Morfo-anatomia comparada das folhas do par vicariante *Plathymenia foliosa* Benth. e *Plathymenia reticulata* Benth. (Leguminosae-Mimosoideae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 20(2), p. 185-195, 2001.
- MENDONÇA, R. C. et al. Flora vascular do cerrado. Pp. 298-556. In: S.M. Sano & S.P. Almeida (eds.). **Cerrado. Ambiente e flora**. Planaltina, Embrapa-CPAC. 1998.
- MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytother Resert**, v.15, p. 127-130, 2001.
- MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high- performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 577-599, 2000.
- METCALFE, C. F.; CHALK, L. Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and Wood in relation to taxonomy with note on economic uses, Vol. I – Clarendon Press, Oxford. 1950.
- MILLS, S.; BONE, K. **Principles and Practice of Phytotherapy**. Churchill Livingstone, Edinburgh, 2000. p. 23-24, 31-34, 229-331.
- MINHO, A.P. **Efeito anti-helmíntico de taninos condensados sobre nematódeos gastrintestinais em ovinos**, Tese de Doutorado – Centro de Energia nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006. p. 168.

- MIRANDA, R. R. S. **Estudo fitoquímico e avaliação do potencial farmacológico de *Maytenus salicifolia* Reissek**. 2007. Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEx, UFMG. Tese de Doutorado, 2007. p. 351.
- MOFFAT, J. et al. Apoptosis induced by 1'-acetoxychavicol acetate in Ehrlich ascite tumor cells is associated with polyamine metabolism and caspase-3- action. **Carcinogenesis**, v.21, n. 12, p. 2151-2157, 2000.
- MONTANARI Jr., I. Aspectos da produção comercial de plantas medicinais nativas. 2001. Disponível no site: < <http://www.cpqba.unicamp.br/plmed/index.html>>. Acesso em 11 de jan. 2012.
- MORAES, E. H. F. As bases nitrogenadas de *Mimosa scabrella* Benth. **Química Nova**, v.13, n.4, p.308-9, 1990.
- MORAIS, S. M. et al. L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.19, p. 315-320, 2009.
- MOREIRA, A. S. et al. Anti-inflammatory activity of extracts and fractions from the leaves of *Gochnatia polymorpha*. **Phytotherapy Research**, v.14, p. 638-640, 2000.
- MOYSSET, L.; SIMÓN, E. Secondary pulvinus of *Robinia pseudoacacia* (Leguminosae): structural and ultrastructural features. **American Journal of Botany**, v. 78, p. 1467-1486, 1991.
- NASCIMENTO, G. G. F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic – resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p. 247-56, 2000.
- NEWMAN, D.J. Natural products and derivatives as leads to cell cycle pathway targets in cancer chemotherapy. **Curr. Cancer Drug Targets**, v.2, p. 279-308, 2002.
- NOLETO, G. R. et al. Two galactomannan preparations from seeds from *Mimosa scabrella* (bracatinga): Complexation with oxovanadium(IV/V) and cytotoxicity on HeLa cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, p. 749-757, 2009.
- NOVAIS, T. S. et al. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, p. 05-08, 2003.
- NUNES, X. P. et al. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 18, p. 718-723. 2008.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E.; Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, p. 368-373, 1964.
- OGA, S. **Fundamentos da Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 3. ed. 1996. p. 515.
- OHSAKI, A. et al. Two Diterpene Rhamnosides, Mimosasides B and C, from *Mimosa hostilis*. **Chem. Pharm.**, v. 54(12), p. 1728-1729, 2006.
- OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica**. 2. ed. São Paulo: Atheneu. 2000.
- OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu. 1998.
- PEDRO, M. et al. **Toxicologia**, v. 164, p. 24-36, 2006.
- PESSUTO, M. B. et al. Atividade Antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 412-416, 2009.
- PIZZI, A. Tanin-based adhesives. In: **Wood adhesives: chemistry and technology**. New York: M. Dekker, 1993. p. 177-246.

POLEO ROMERO, A.; GAVIRIA, R. **Ointment or cream for topical treatment of psoriasis, comprises antioxidants of vegetable origin, where product is supplemented with creamy base formed by cetyl alcohol, sterile alcohol, liquid paraffin, vaseline and distilled water.** 2008.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. R. **Tecnologia Farmacêutica.** 6. ed., v.1. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002. p. 177-246.

PROTEINS. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 43, 422-427, 2004.

QUEIROZ, A. C. SILVA, D.J.; **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos.** 3. ed. Viçosa: UFV, 1985. p. 177-246.

RAO, C. H. V. et al. Analgesic, anti-inflammatory and antiulcerogenic activity of unripe fruits of *Aegle marmelos*. **Acta Pharmaceutica Túcica**, v.45, p. 85-91, 2003.

RDC nº 14/2010. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/visualiza/index.jsp?data=22/09/2011&jornal=1&pagina=690&totalArquivos=772>>. Acesso em 21 de mai. 2011.

RICHTER, H. G; CHARVET, L. M. Estudo e pesquisa sobre *Mimosa scabrella*. **Floresta**, Curitiba, v. 4, n. 2, p. 68-69, 1973.

RIVERA-ARCE, E. et al. Therapeutic effectiveness of a *Mimosa tenuiflora* cortex extract in venous leg ulceration treatment. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p.523–528, 2007.

RIZZINI, C.T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil.** 2. ed. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda., 1995. p. 294.

RÓDENAS, J.; CARBONELL, T.; MITJAVILA, M. T. Different roles for nitrogen monoxide and peroxy nitrite in lipid peroxidation induced by activated neutrophils. **Free Radical Bio Med.**, v. 28, p. 374-380, 2000.

RODRIGUES M. et al. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais.** São Paulo: UNIFESP/EPM. 2002.

RODRIGUES, A. et al. Changes on floristic composition of Flooding Pampa rangeland by the use of glyphosate. In: **21 International Grassland Congress; 8 International Rangeland Congress.** IGC-IRC Organizing Committee Huhhot, China, 2008. p. 115.

RODRIGUES, T. M.; MACHADO, S. R. Anatomia comparada do pulvino primário de leguminosas. **Revista Brasileira de Botânica**, v.29, p. 709-720, 2006.

ROESER, K. R. Die Nadel der Schwarzkiefer-Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos**, v. 61, p. 33-36, 1972.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant Physiology.** California, Wadsworth Publishing Company. 1992.

SANTOS, C. A. M.; TORRES, K. R.; LEONART, R. **Plantas medicinais herbarium, flora et scientia.** 2.ed. São Paulo: Ícone, 1988. p. 160.

SANZ-BISET, J. et al. A first survey on the medicinal plants of the Chazuta valley (Peruvian Amazon). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, p. 333-362, 2009.

SCALBERT, A. et al. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 1991; 30:3875-3883.
Simon MF. & Proença C. Phytogeographic patterns of *Mimosa* (Mimosoideae, Leguminosae) in the Cerrado biome of Brazil: an indicator genus of high-altitude centers of endemism? **Biological Conservation**, v. 96, p. 279-296. 2000.

SCHMOURLO, G. et al. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 563-568, 2005.

SCHNEIDER, G. **Arzneidrogen-ein kompendium für pharmazeuten, biologen und chemiker**. Mannheim: Wissenschaftsverlag. 1990.

SENATORE, F. Steroidal constituents and anti-inflammatory activity of the horse chestnut (*Aescullus hippocastanum* L.) bark. **Biologia Sperimentale**, v. 65, n.2, p.137-41, 1989.

SHONO, T. et al. Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations. **Cancer research**, v.11, p. 4375-4381, 2001.

SIDALL, P. J.; COUSINS, M. J. Pain mechanisms and management: an update. **Clin. And Exper. Pharmacol. And Physiol.**, v.22, p.679-688, 1995.

SIELGEL, P. S. A simple electronic device for the measurement of gross bodily activity of small animals. **J. Psychol.**, v. 21, p.227-236, 1946.

SILVA, M. D. et al. Espectrorradiometria foliar de espécies dominantes em um fragmento de caatinga, Pernambuco. **Anais XV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto - SBSR**, Curitiba, PR, Brasil, 30 de abril a 05 de maio de 2011, INPE, p.8623.

SILVA, M. M. et al. Structure-antioxidante activity relationships of flavonoids: a re-examination. **Free Radical Res.**, v. 36, n. 11, p. 1219-1227, 2002.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 5. ed. Porto Alegre, Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS, Ed. da UFSC, 2006. p. 820-821.

SIMON, M. F.; PROENÇA, C. Phytogeographic patterns of *Mimosa* (Mimosoideae, Leguminosae) in the *Cerrado* biome of Brazil: an indicator genus of high-altitude centers of endemism? **Biological Conservation**, v. 96, p. 279-296, 2000.

SIMS, D. A.; GAMON, J. A. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. **Remote Sensing of Environment**, v. 81, p. 337-354, 2002.

SOULIMANI, R. et al. Behavioural effects of *Passiflora incarnate* L. and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse. **J. Ethnopharmacol.**, v.57, n.1, p.11-20, 1997.

SOUZA BRITO, A. R. M. **Manual de Ensaios Toxicológicos In vivo**. UNICAMP, Campinas. São Paulo, 1995. p.122.

SOUZA, R. S. O. et al. Jurema-Preta (*Mimosa tenuiflora* [Willd.] Poir.): a Review of its Traditional Use, Phytochemistry and Pharmacology. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 5, p. 937-947, 2008.

SOUZA, V. C.; LORENZi, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa, Editora Plantarum. 2005.

SPECTOR, W. G. The inflammatory response. **J. Path. Bact.**, v.84, p.391-403, 1960.

STEVENS, P. F. **Angiosperm phylogeny website**. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research>>. Acesso em 5 de dez. 2011.

STICHER, O.; ERDEMEIER, C. A. J. **Planta Medica**, v.5, p.407-9,1985.

SUBHASHINI, J; MAHIPAL, S. V. K.; REDDANNA, P. Anti-proliferative and apoptotic effects of celecoxib on human chronic myeloid leukemia *in vitro*. **Cancer Letters**, p.31-43, 2005.

- SUKANYA, S. L. et al. Antimicrobial activity of leaf extracts of Indian medicinal plants against clinical and phytopathogenic bacteria. **African Journal of Biotechnology**, v. 8 (23), p. 6677-6682, 2009.
- THAMBI, P. T. et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the flowers of *Tabernaemontana coronaria* (L) R. Br. **Indian J Pharm Sci.**,v. 68, p. 352-355, 2006.
- TOLEDO, C. E. M. **Estudos anatômico, químico e biológico das cascas e extratos de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, Leguminosae.** 2002. p. 2-28. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Uiversidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2002.
- TORIYAMA, H.; KOMADA, Y. The recovery process of the tannin vacuole in the motor cell of *Mimosa pudica* L. **Cytologia**, v. 36, p. 690-697, 1971.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Editora: Artmed. 2005.
- TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.2, p.289-306, 2006.
- UEDA, M.; YAMAMURA, S. leaf--opening substance of *Mimosa pudica* L.; chemical studies on the other leaf movement of Mimosa. **Tetrahedron Letters**, v. 40, p. 353-356, 1999.
- UNITED STATES PHARMACOPEIA. Ed. Rockville: United States **Pharmacopeial Convection**, 26, p. 1877-1879, 2003.
- VELMURUGAN, A. et al. Antitoxin activity of *Mimosa pudica* root extracts against *Naja naja* and *Bangarus caeruleus* venoms. **Bangladesh J Pharmacol**, v. 4, p. 105-109, 2009.
- VENDRUSCOLO, C. W. et al. Physicochemical and mechanical characterization of galactomannan from *Mimosa scabrella*: Effect of drying method. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p. 86-93, 2009.
- VICENTINO, A. R. R.; MENEZES, F. S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.17, 384-387, 2007.
- VICHAI, V.; KIRTIKARA, K. **Nat Protoc.**, v.1, p. 1112-1116, 2006.
- VOIGT, R. **Pharmazeutische Thechnologie**. ed. 7. Auflage. Berlin: Ullstein Mosby, 1993.
- WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKY, E. **Plant Drug Analysis**. Springer, Berlin. 1984.
- WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A.; The open-field test: a critical review. **Psychol Bull.**, v. 83, p. 482-504, 1976.
- WARIS, G.; SIDDIQUI, A. Hepatitis C virus stimulates the expression of cicloxygenase-2 via oxidative stress: role of prostaglandin E2 in RNA replication. **Journal of Virology**, v. 79, n.15, p. 9725-9734, 2005.
- WATSON, R. W.. Effect of cuticular hardening on the formo f epidermal cells. **New Phytologist**, v. 41, p. 223-229, 1942.
- WHO - World Health Organization. **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneva. 1998.
- WILKINS, R. J. The potential digestibility of cellulose in grasses and its relationship with chemical and anatomical parameters. **Journal of Agricultural Science**, v.78, p.457-464, 1972.
- YAMAGUTI-SASAKI, E. et al. **Molecules**, v. 12, p.1950, 2007.
- YAMASHIRO, S. et al. The gelsolin/fragminfamily protein identified in the higher plant *Mimosa pudica*. **Journal of Biochemistry**, v. 130, p. 243-249. 2001.

YUAN, K.; LU, J. L.; JIA, A.; ZHU, J. X. Two new C-glycosylflavones from *Mimosa pudica*. **Chinese Chemical Letters**, v.18, p. 1231-1234, 2007.

YUSUF, U. K. et al. Flavonoid glycosides in the leaves of *Mimosa* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 443-445, 2003.

YUSUF, U. K. et al. Flavonoid glycosides in the leaves of *Mimosa* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 443-445, 2003.

WU, Q.; WANG, M.; SIMON, J. E. Determination of proanthocyanidins in fresh grapes and grape products using liquid chromatography with mass spectrometric detection. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, n. 14, p. 2062-2068, 2005.

ZEEB, D. J. et al. Separation and identification of twelve catechins in tea using liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 20, p. 5020-5026, 2000.

ZIPPEL, J.; DETERS, A.; HENSEL, A. Arabinogalactans from *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret bark as active principles for wound-healing properties: Specific enhancement of dermal fibroblast activity and minor influence on HaCaT keratinocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p.391-396, 2009.