

MIRIVALDO DE BARROS E SÁ

**AÇÃO ANTIBACTERIANA DO EXTRATO CLOROFÓRMICO DE *Amburana*
cearensis E SUA AÇÃO SOBRE A BIODISTRIBUIÇÃO DO
PERTECNETATO DE SÓDIO**

RECIFE

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

MIRIVALDO DE BARROS E SÁ

AÇÃO ANTIBACTERIANA DO EXTRATO CLOROFÓRMICO DE *Amburana*
cearensis E SUA AÇÃO SOBRE A BIODISTRIBUIÇÃO DO PERTECNETATO
DE SÓDIO

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biociência Animal
da Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como pré-requisito parcial
para obtenção do grau de Doutor em
Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Vitor Moreira Lima Filho

Recife-PE
2013

MIRIVALDO DE BARROS E SÁ

**AÇÃO ANTIBACTERIANA DO EXTRATO CLOROFÓRMICO DE *Amburana*
cearensis E E SUA AÇÃO SOBRE A BIODISTRIBUIÇÃO DO
PERTECNETATO DE SÓDIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biociência Animal da Universidade Federal Rural
de Pernambuco, como pré-requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal.

Tese defendida em 28 de Fevereiro de 2013

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Vitor Moreira Lima Filho
Depto. de Biologia, UFRPE/ Orientador

Profa. Dra. Isvânia Maria Serafim da Silva
Depto. de Biofísica, UFPE – Coorientadora

Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá
Depto. De Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE

Profa.Dra. Luciana de Oliveira Franco
Depto. de Biologia/ UFRPE

Profa.Dra. Tânia Maria Sarmiento da Silva
Depto. de Ciências Moleculares/ UFRPE

“E a vida? E a vida o que é?

Diga lá meu irmão!”

GONZAGUINHA

A LISTA

Faça uma lista de grandes amigos
Quem você mais via há dez anos atrás
Quantos você ainda vê todo dia
Quantos você já não encontra mais...

Faça uma lista dos sonhos que tinha
Quantos você desistiu de sonhar!
Quantos amores jurados pra sempre
Quantos você conseguiu preservar...

Onde você ainda se reconhece
Na foto passada ou no espelho de agora?
Hoje é do jeito que achou que seria
Quantos amigos você jogou fora?

Quantos mistérios que você sondava
Quantos você conseguiu entender?
Quantos segredos que você guardava
Hoje são bobos ninguém quer saber?

Quantas mentiras você condenava?
Quantas você teve que cometer?
Quantos defeitos sanados com o tempo
Eram o melhor que havia em você?

Quantas canções que você não cantava
Hoje assobia pra sobreviver?
Quantas pessoas que você amava
Hoje acredita que amam você?

Oswaldo Montenegro

Dedico

A DEUS (A) causa primária de todas as coisas, pelas provações e aprovações.

A toda minha família, base sólida da vida em toda sua extensão e, em especial aos meus pais em memória: Dolores e Pompeu (pais biológicos) Anna (mãe adotiva).

As minhas queridas irmãs (Mirian e Mirileuza) com grande admiração pelos ensinamentos, desprendimento e carinho. A minha amiga Josefa Carvalho.

Ao meu filho espiritual, Michel por todo o empenho ao meu progresso.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Vitor Moreira Lima Filho meu orientador, pela paciência e dedicação por todo embasamento Científico-Intelectual na construção desse estudo, minha profunda gratidão pelo grande aprendizado e disponibilidade de todas as horas e dias.

A Profa. Dra. Isvânia Maria Serafim da Silva minha coorientadora, pelo empenho e colaboração, na qual acrescentou alma nova nesse trabalho, como também em minha vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Clécio Souza Ramos pela realização do extrato ministrado e identificação dos constituintes químicos presentes, o meu muitíssimo obrigado.

À Profa. Dra. Suzene Izídio da Silva pela identificação e catalogação da *Amburana cearensis* do centro de Botânica da UFRPE.

À Profa. Dra. Márcia Moraes da UPE pela doação de cepas de *Klebsiella*.

Ao Prof. Dr. Diógenes Mota da UFPE pelo grande ensinamento nos estudos histológicos.

Ao Prof. Dr. Ulisses Montarroyos pelo apoio nos estudos estatísticos.

À Profa. Dra. Maria Teresa Jansen Catanho com sua serenidade e sabedoria, pelo imenso apoio no momento mais crucial desse curso, sem palavras...

Ao Prof. Dr. Valdomiro Júnior com quem muito aprendi com suas disciplinas durante o curso.

Ao Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto pela grande ajuda e incentivo no ingresso dessa Pós.

A colega Profa. Dra. Maria Goretti Soares pelo imenso estímulo e colaboração.

Ao Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá pela sua disponibilidade em contribuir.

A Edna Cheiras pelo compromisso profissional e humano.

Aos profissionais do Hospital das Clínicas da UFPE pela doação do Tecnécio.

A toda equipe científica principalmente do Ceará que vem incansavelmente se dedicando aos estudos com “Amburana”.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da UFRPE, em abrir as portas para mais um crescimento científico.

Ao CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro no último semestre deste curso.

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1 – *Amburana cearensis*: A) visão geral da árvore; B) coleta das cascas C) amostras das cascas; D) amostras de sementes. 20

Figura 2 – Distribuição de *Amburana cearensis* na América do Sul. 21

Figura 3 – Estruturas químicas de compostos identificados em *A. cearensis*. Quercetina (1), isocampferídeo (2), campferol (3), 4'-metoxi-fisetina (4), cumarina (5), aiapina (6), ácido 3,4-dihidroxi-benzóico (7) (ácido protocatecuico), ácido vanílico (8), amburosídeo A (9a), amburosídeo B (9b) biflavonóides (10 e 11), 3,4-dihidroxi-benzoato de 6-cumarila (12) afrormosina] (13), uma mistura de β -sitosterol e estigmasterol glicosilados (14 e 15), sacarose (16). Das sementes foram isolados o ácido o-cumárico (17), a 6-hidroxycumarina (18), ácido (E)-o-cumárico glicosilado (19), ácido (Z)-o-cumárico glicosilado (20), ácido p-hidroxi-benzóico (21), derivado esterificado do amburosídeo (22), afrormosina (AFM) (23). 30

Figura 4 – Gerador de ^{99}Mo - ^{99}Tc produzido pelo IPEN-TEC/SP. 32

Artigo 1

Figure 1. Chromatogram of chloroform extract of the stem bark of *A. Cearensis* 57

Artigo 2

Figure 1. Micrographs of organs of Swiss mice treated with chloroform extract of *A. cearensis*. A) Central lobular vein (CV), hepatocytes arranged in cords, as histological pattern, and sinusoids (arrow). HE, bar = 100 μm , B) Hepatocytes exhibiting steatosis. A central vein (V) is slightly congested with blood. HE, bar = 50 μm ; C) Kidneys, spinal region with tubules showing the structure preserved. HE, bar = 100 μm , D) Spleen with lymph nodes (N) in the white pulp and red pulp with trabeculae (arrows). HE, Bar = 100 μm . 76

LISTA DE TABELAS

Introdução

Tabela 1. Relatos do uso tradicional de *A. cearensis* em várias localidades do Brasil. 23

Tabela 2. Fitoquímicos relatados em extratos de *A. cearensis*. 28

Artigo 1

Table 1. Chemical compounds present in chloroform extract of *A. Cearensis*. 58

Table 2. Phytochemicals reported in extracts of *A. cearensis*. 59

Table 3. Antibacterial activity of chloroform extract of the stem bark of *A. cearensis*. 60

Table 4. Minimum inhibitory concentration (CIM) and minimum bacteric concentration (CBM) of the analogue 2-methoxy-4-methylphenol. 61

Artigo 2

Table 1 - Comparison of the control group treated with 0.9% saline (group A) and the group treated with the extract of *A. cearensis* (group C). 77

Table 2 - Comparison of the control group treated with 0.9% saline (gro and the group treated with 2-methoxy-4-methylphenol (group D). 78

Table 3 – Comparison of group treated with the extract of *A. cearensis* (group C) and with 2-methoxy-4-methylphenol (group D). 79

Table 4 – Comparison of the control group treated with 0.9% saline (group A) and the group treated with DMSO (group B). 80

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

% captação/g	→ Porcentagem de captação por grama
^{99}Mo	→ Molibidênio-99
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	→ Tecnécio-99 metaestável número de massa 99
$^{99\text{m}}\text{TcO}_4\text{Na}$	→ Pertecnetato de sódio
CEEA	→ Comitê de Ética em Experimentação Animal
CNEN	→ Comissão Nacional de Energia Nuclear
Cpm	→ Contagem por minuto
DMSO	→ Dimetil sulfóxido
ECAC	→ Extrato Clorofórmico de <i>Amburana cearensis</i>
EHA	→ Extrato Hidroalcoólico
IPEN	→ Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
MBq	→ megabequerel
OE	→ óleo Essencial

RESUMO

Amburana cearensis é popularmente conhecida como “imburana” e cumaru e rica em compostos fenólicos, sendo predominantemente encontrada em regiões de Caatinga do Nordeste Brasileiro. Este estudo avaliou a atividade antimicrobiana do extrato de *Amburana cearensis* e a ação sobre a biodistribuição do pertecnetato de sódio em camundongos. O extrato clorofórmico obtido foi analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM). A atividade antibacteriana foi avaliada pelo método de difusão em Agar e a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) avaliada em microplacas. A toxicidade do extrato foi avaliada com camundongos suíços. Para análise da influência do extrato clorofórmico de *A. cearensis* sobre a biodistribuição do radioisótopo, os camundongos (n=6) foram divididos em três grupos que receberam: a) solução salina a 0,9%; b) dimetilsulfóxido (diluyente do extrato); c) extrato clorofórmico da *A. cearensis* (400 mg/Kg) diariamente, por três dias, através de gavagem. Após 24h da última administração, o radioisótopo na forma de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) foi administrado através da veia caudal dos animais. Os resultados mostraram que o composto majoritário 4-metoxi-3-metilfenol (76, 7%) e compostos minoritários tais como tricicleno (3,9 %), α -pineno (1,0 %), β -pineno (2,2 %), ácido 4-hidróxido benzoico (3,1 %) também foram identificados no extrato. O extrato clorofórmico produziu halos inibitórios somente contra *P. aeruginosa* e *B. cereus*. O extrato não apresentou toxicidade letal em dosagens que variaram de 100 mg/kg à 1000 mg/kg, no intervalo de 24h. Mas a análise histopatológica demonstrou esteatose no fígado dos animais administrados com 1000 mg/Kg. Também não houve alteração na porcentagem de captação do $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ nos órgãos de animais administrados com o extrato da planta ($p > 0,05$).

Palavras-chaves: *A. cearensis*; CG-MS; atividade antimicrobiana; Pertecnetato de sódio.

ABSTRACT

Amburana cearensis (popular name: imburana and cumaru) is rich in phenolic compounds and predominantly found in regions of Caatinga of Northeastern Brazil. This study evaluated the antimicrobial activity of the extract *A. cearensis* and its influence on the biodistribution of sodium pertechnetate in mice. The chloroform extract obtained was analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS). The antibacterial activity was evaluated by agar diffusion method and the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) evaluated in microplates. The toxicity of the extract was evaluated in Swiss mice. The chloroform extract of *A. cearensis* were daily administered for three days by gavage for evaluation of biodistribution of the radioisotope. Swiss mice (n=6) were divided into three groups: a) saline 0.9%, b) dimethylsulfoxide (solvent extract), c) chloroform extract of *A. cearensis* (400 mg / kg). Twenty four hours after treatments, the radioisotope in the form of sodium pertechnetate ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) was administered through the tail vein of the animals. The results showed that the major compound 4-methoxy-3-methylphenol (76, 7%), and tricyclene (3.9 %), α -pinene (1.0 %), β -pinene (2.2 %), and 4-hydroxy benzoic acid (3.1 %) were identified in the extract. The chloroform extract produced inhibitory zones against *P. aeruginosa* and *B. cereus*. The extract did not show lethal toxicity at dosages ranging from 100 mg/ kg to 1000 mg/ kg trough 24h. But the histopathological analysis showed fatty liver of animals administered with 1000 mg/kg. No change in the percentage uptake of $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ was observed in organs from animals tested with the plant extract.

Key words: *A. cearensis*; GC-MS; antimicrobial activity; sodium pertechnetate.

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Plantas medicinais: Conhecimento e Tradição	15
2.2 <i>Amburana Cearensis</i>	19
2.2.1. Histórico, Descrição Botânica, distribuição geográfica	19
2.2.2. Uso na medicina popular	21
2.2.3. Relatos etnofarmacológicos	24
2.2.4. Fitoquímica de <i>Amburana cearensis</i>	27
2.2.5. Medicina nuclear	31
3. OBJETIVOS	
3.1. Objetivo Geral	33
3.2. Objetivos Específicos	33
4. REFERÊNCIAS	34
ANEXO	
5. ARTIGO 1: Phytochemistry and antibacterial activity of chloroform extract of <i>Amburana cearensis</i> AC Smith	
Abstract	46
Introduction	47
Material and Methods	47
Results and Discussion	51
References	52
6. ARTIGO 2: Influence of chloroform extract of <i>Amburana cearensis</i> on the biodistribution of sodium pertechnetate in mice	
Abstract	63
Introduction	64
Material and Methods	65
Results and Discussion	68
References	71

1.INTRODUÇÃO

As pesquisas voltadas para o estudo e avaliação de produtos naturais, principalmente extraídos de plantas, vem sendo estimuladas há décadas no Brasil, visando descobrir novas moléculas bioativas (NASCIMENTO, 2000). Muitas plantas do bioma Brasileiro e, particularmente, da caatinga nordestina, têm sido popularmente utilizadas no tratamento de várias patologias, incluindo infecções bacterianas (ALVES et al., 2000).

Amburana cearensis (Allemão) A.C. Smith é uma árvore de caule ereto com até 20 metros de altura e pertencente à família Fabaceae (LORENZI & MATOS, 2008). A espécie é também conhecida como cerejeira e, devido à qualidade de sua madeira, têm sido explorada na movelaria fina, esculturas e marcenaria em geral, estando listada como espécie ameaçada de extinção (IBAMA, 2012). É uma planta leguminosa conhecida no Nordeste brasileiro como “umburana-de-cheiro”, “imburana-de-cheiro”, “cumaru” e “cumaru-do-Ceará”, cumaré, cerejeira, cerejeira rajada (LORENZI & MATOS, 2008).

As cascas e sementes da *A. cearensis* tem extenso uso na medicina popular, principalmente no tratamento de bronquite, asma, gripe e resfriado, sendo utilizada na medicina popular na forma de chá fervido ou de banho com o cozimento das cascas (LORENZI & MATOS, 2008). Estudos relatam ainda o emprego da casca do caule como analgésico e espasmolítico, e na forma de banho, contra dores reumáticas (LEAL, 1995; MATOS, 2000). As sementes são utilizadas no alívio sintomático da dor-de-dente (SILVEIRA, 2005). Braga (1976) descreveu seu uso na forma de decocto e infuso como emenagogas e para o tratamento de doenças reumáticas.

Quanto ao potencial antibiótico de *A. cearensis*, destacam-se os resultados obtidos com óleos essenciais, alcalóides, cumarinas, entre outros que, em baixas concentrações, exerceram inibição do crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (RECIO & RÍOS, 1989). Tais resultados apontam para a importância da planta como fitoterápico, sendo que já existem alguns produtos comerciais cujo princípio ativo principal é a cumarina.

Além da cumarina, outros compostos pouco explorados em relação às suas atividades biológicas, tais como glicerídeos dos ácidos palmítico, linoleico, oleico e esteárico, obtidos da semente da planta, têm sido pesquisados

(LORENZI & MATOS, 2008). Recentemente, mais quatro compostos têm sido revelados em *A. cearensis*, o ácido p-hidroxibenzóico, aiapina, além dos estereoisômeros (E) e (Z) do ácido o-cumárico glicosilado também foram identificados, demonstrando seu potencial como recurso natural rico em substâncias bioativas (CANUTO, 2010).

Considerando o amplo uso tradicional e comercial de *A. cearensis* como antimicrobiano de afecções respiratórias, não são relatados estudos que avaliem a influência de seus extratos na Medicina Nuclear. Por exemplo, para realização de exames de cintilografias o radiofármaco tecnécio-99m na forma de pertecnetato de sódio, é administrado e se distribui pelos órgãos e tecidos do paciente. Entretanto, alguns fatores podem alterar sua biodistribuição normal, dentre eles o uso de medicamentos naturais e/ou sintéticos em paralelo com tratamentos que envolvem radioterapia (BERNARDO-FILHO, 2005).

Assim, diante dos fatos acima, o presente estudo foi desenvolvido no intuito de investigar o conhecimento sobre a composição química da *A. cearensis*, sua ação antimicrobiana contra patógenos do trato respiratório e sua ação sobre a biodistribuição do pertecnetato de sódio em modelos experimentais animais.

2. REVISAO DE LITERATURA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS: CONHECIMENTO E TRADIÇÃO

As primeiras civilizações da humanidade, tais como os mesopotâmicos, assírios e egípcios, já utilizavam as plantas tradicionalmente para o tratamento de várias enfermidades, desde distúrbios gastrointestinais a infecções bacterianas com preparados de decoctos simples, infuso, chás e outras formulações (HARBERSTEIN, 2005). Já no século I a.C., Crateus, publicou a primeira obra com ilustrações sobre plantas medicinais, o “Rhizotomikon”. Dioscórides, médico grego, no século I da era Cristã, enumerou, em seu tratado, “De Matéria Médica”, mais de 500 plantas medicinais e seus usos.

No Brasil no século XVI, os primeiros registros sobre o uso de plantas medicinais foram realizados por padres europeus da Companhia de Jesus,

chefiados por Nóbrega, os quais chegaram com Tomé de Souza para catequizar os índios. Foi assim produzida uma série de notificações fitológicas pelo padre José de Anchieta e outros jesuítas, que formularam receitas chamadas “Boticas dos Colégios”, à base de plantas, para o tratamento de doenças. Esse documento estava incluído no Código Farmacêutico Brasileiro em meados do século XVIII (JORGE, 2012).

Ainda, a partir do conhecimento do hábito alimentar de várias espécies animais como, por exemplo, macacos e chimpanzés africanos que ingeriam folhas de *Aspilia mossambicensis* e *A. pluriseta*, foi possível a pesquisa e isolamento do metabólito secundário tiarubrina-A, com efeito antibacteriano, analgésico e antiinflamatório (RODRIGUEZ et AL., 1985). Neste sentido, MILLS & BONE (2000) descreve que há evidência de que as propriedades das plantas medicinais já eram utilizadas no período da pedra polida. Ainda, devido ao uso das plantas pelos egípcios 4.000 A.C, destaca-se a utilidade terapêutica do ópio como sedativo e calmante, extraído de papoulas (*Papaver ssp.*) .

Nesse contexto, outros pioneiros do conhecimento das plantas concluíram que se um vegetal é capaz de conduzir ao sono, sequencialmente poderia também acalmar em doses terapêuticas menores (LORENZI & MATOS, 2008). De maneira geral, sabemos atualmente que tais efeitos biológicos se devem aos tipos de compostos químicos presentes nos extratos utilizados. Contudo, ressalta MORS (1982), as plantas não produzem fitoquímicos secundários em função da humanidade, mas possivelmente para autopreservação, uma vez geralmente estão relacionados a mecanismos de defesa da planta contra patógenos e insetos. Diante disso, é imensurável a variedade de constituintes químicos das plantas, a maioria ainda inexplorada do ponto de vista etnofarmacológico (TAIZ e ZEIGER, 2009).

A pesquisa bioquímica vegetal divide-se em dois segmentos: a) estudo de metabólitos primários, tais como proteínas, carboidratos, lipídeos, os quais são condutores do desenvolvimento e manutenção da fisiologia vegetal; b) estudo de metabólitos secundários, tais como cumarinas, alcalóides, taninos, flavonoides e outros, geralmente associados aos mecanismos de atração e estímulo à polinização por insetos, dispersão de sementes e defesa contra fungos, bactérias e agentes físicos como radiação e evaporação (HARTMANN, 1996).

No século XIX, o Farmacêutico Ezequiel Corrêa, foi o primeiro desbravador no Brasil a identificar o alcalóide “pereirina”, obtida da casca do caule da planta Pau-pereira (*Platycyamus regnellii*), com efeito anti-malárico (SANTOS, 1854). Em meados dos anos de 1950, a “flavopereirina”, outro alcaloide, foi identificado na planta (RAPOPORT e HUGES, 1958). A ação de Pau-pereira contra a malária foi confirmada em laboratório por outros pesquisadores com o extrato etanólico da casca do caule (CARVALHO, 1950; CARRARA e MEIRELLES, 1996; ALMEIDA, 2007). Apesar disso, a doença ainda não possui cura nos dias atuais.

Ainda no século XIX, o Alemão Karl Friedrich Von Martius (Médico e naturalista), fez várias expedições pelo Brasil e elaborou uma coletânea sobre plantas medicinais utilizadas localmente por suas propriedades terapêuticas, tendo catalogado aproximadamente 6.000 espécies e produzido 20.000 exsicatas (MARTIUS, 2012). O pesquisador esteve na Bahia, Pernambuco, Piauí e Maranhão, ficando ciente do valor terapêutico das plantas a partir do conhecimento popular demonstrado pelo sertanejo no tratamento de enfermidades (MARTIUS, 2012).

A nova tendência global de preocupação com a biodiversidade e as ideias recentes de desenvolvimento sustentável, trouxeram novos ares ao estudo das plantas medicinais brasileiras e acabaram despertando novamente o interesse geral pela fitoterapia (LORENZI; MATOS, 2008). Contudo, há uma crença popular disseminada de que chás ou extratos de plantas medicinais, “se não fizerem bem, mal também não farão” (NASCIMENTO, 2003). Apesar do acúmulo de informação sobre o tema ao longo dos anos, o uso de fitoterápicos sem comprovação de eficácia aumenta as chances de intoxicações (PAULO; ZANINI, 1988).

A ingestão de extratos de plantas medicinais sem respaldo científico é mais perigosa que a ingestão de medicamentos alopáticos, considerando inclusive o desconhecimento sobre possíveis interações medicamentosas. Vários autores discutem a necessidade de se disseminar a ideia de que todo fitopreparado empregado com fins terapêuticos de prevenção, cura ou diagnóstico é um medicamento como outro qualquer. Isto implica entendê-lo com um potencial intrínseco de causar dano a quem utiliza e a necessidade de orientação profissional para seu uso racional (NASCIMENTO, 2003).

No caso dos medicamentos homeopáticos derivados de plantas medicinais, a crítica científica afirma que não passam de placebos, água ou álcool diluídos, uma vez que não se pode observar moléculas de substâncias medicamentosas em suas preparações farmacológicas. Os defensores da homeopatia elaboram sua crítica aos medicamentos alopáticos, associando-os ao crescimento de doenças crônicas e alterações do sistema imunológico (ALMEIDA, 1996). Já os remédios à base de plantas conhecidos como “florais”, possuem desenvolvimento e difusão mais recente que a homeopatia, tendo ganhado repercussão a partir da segunda metade da década de 1980.

Os florais foram desenvolvidos inicialmente na década de 1930, por Edward Bach (1886-1936), médico inglês especializado em bacteriologia e estudioso da homeopatia. Os remédios florais agem supostamente sobre os estados emocionais e mentais desequilibrados os quais, de acordo com Bach, originam as doenças (BARNARD, 1979; BACH, 1990). Bach propôs a utilização de 38 florais, e escreveu os fundamentos desta nova terapêutica, cuja simplicidade e ausência de efeitos tóxicos possibilitam inclusive a automedicação (NASCIMENTO, 2003).

Apesar do número de espécies de plantas ainda não estudadas da flora mundial ser significativa, a quantidade usada para fins medicinais é exorbitante (GOTTLIEB e STEFANELLO, 1991). Diante da miscelânea de informações de diversas fontes, a Organização Mundial de Saúde (OMS, 1998) definiu critérios para a comercialização de fitoterápicos. Dentre tais critérios, as plantas deveriam ter seu uso tradicional cientificamente comprovado e, no caso de possuir mais de uma atividade terapêutica, tais princípios ativos ou a sua farmacodinâmica devem ser conhecidos.

No Brasil, Souza et al. (2003) já demonstrava preocupação no controle de qualidade das plantas medicinais e fitoterápicos, fundamental para garantir sua aplicabilidade. Neste contexto, dentre os fitoterápicos comercializados em Curitiba-PR, 10 amostras constituídas de *Peumus boldus* (boldo) veiculadas na região, foram desclassificadas por elevados grau de impurezas e baixa concentração de princípios ativos, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BARBOSA et al., 2001).

Também, em 12 espécies de plantas analisadas em cinco mercados públicos do Maranhão, foi constatado mais de 80% de impurezas, umidade

além da recomendada, sendo que 82% estavam contaminadas por micro-organismos (ZARONI et al., 2004). Em outro caso, dentre oito amostras de *Chamomilla recutita* (Camomila) coletadas em drogarias, farmácias e ervários de Curitiba, cinco delas apresentaram componentes biológicos, físicos ou microbiológicos impróprios para o consumo (AMARAL et al., 2003).

Apesar dos problemas acima, o aumento na procura por tratamentos alternativos para diferentes tipos de enfermidades, especialmente patologias crônicas, tem crescido muito na última década atraindo a indústria farmacêutica (CALIXTO, 2005; NEWMANN e GRAGG, 2007). Atualmente, para a venda livre de fitoterápicos há legislação específica, como a Lei n 11.105/2005, que estabelece normas de segurança e fiscalização sobre a produção, transporte, armazenamento, consumo e outros (BRASIL, 2005).

O Ministério da Saúde (BRASIL, 2006), estabeleceu a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e a Política Nacional de práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde, visando garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, alertando para o uso sustentável da Biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional.

Dentre as diretrizes decretadas pela PNPMF para incluir os fitomedicamentos na produção e inovação em saúde, destacam-se:

- 1) Regular o cultivo, o manejo sustentável, a produção, a distribuição, e o uso de plantas medicinais e fitoterápicos, considerando as experiências da sociedade civil nas suas diferentes formas de organização;
- 2) Fomentar pesquisa, desenvolvimento tecnológico e inovação com base na biodiversidade brasileira, abrangendo espécies vegetais nativas e exóticas adaptadas, priorizando as necessidades epidemiológicas da população;
- 3) Promover a interação entre o setor público e a iniciativa privada, universidades, centros de pesquisa e Organizações Não Governamentais (ONG) na área de plantas medicinais e desenvolvimento de fitoterápicos;
- 4) Garantir e promover a segurança, a eficácia e a qualidade no acesso a plantas medicinais e fitoterápicos;

Dessa forma, a Organização Mundial da Saúde reconheceu o PNPMF do Ministério da Saúde do Brasil e tem recomendado seu uso global nas políticas referentes aos fitofármacos. Finalmente, em sua estratégia, a OMS

recomenda a todos os países o uso de recursos para a saúde mais acessíveis, com menos efeitos colaterais, mais econômicos, cientificamente identificados e testados.

2.2 *Amburana cearensis*

2.2.1 Histórico, descrição botânica e distribuição geográfica

Francisco Freire Cysneiro Allemão, Médico e botânico, quando transitou o estado do Ceará entre 1859 a 1861, construiu uma coletânea de 15 gêneros e aproximadamente 45 espécies de plantas de várias famílias, sendo que *Amburana cearensis* (sin. *Torresea cearensis*) era relatada como planta medicinal (MORAIS, 2005). Juntamente com seu sobrinho Manoel Freire, Allemão, procurou levantar plantas com potencial terapêutico e em posse do conhecimento de seus usos farmacológicos, publicou vários artigos que apresentaram pela primeira vez a espécie *Amburana cearensis* (PEREIRA, 1982).

Na região Nordeste do Brasil, *A. cearensis* é uma espécie arbórea que geralmente chega até 20 m de altura na Zona da Mata, e 10 m na Caatinga (Figura1). Possui tronco encoberto por uma casca amarelo-pardacenta espessa do tipo ritidoma esfoliativa, que se desloca em finas lâminas tênue. Folhas de 7-12 folíolos alternos ovados que varia de 2-3 cm de comprimento, no aspecto ecológico compreendendo o período de floração no começo da estação seca, entre maio-julho e, a frutificação acontece em agosto a outubro. As flores são brancacentas, pequenas e muito aromáticas. A vagem é achatada e rugosa tardiamente deiscente, contendo uma semente distal e ala proximal (LORENZI e MATTOS, 2008).

O comprimento da semente varia de 12,55 mm a 17,55 mm e a largura de 8,35 mm a 11,50 mm, apresentando o hilo bem visível, homócromo (sem a camada pulverulenta do endocarpo), localizado lateralmente, próximo à base da semente, numa região mais escura e mais proeminente (CUNHA; FERREIRA, 2003). Raramente há duas sementes na porção terminal (FELICIANO, 1989). De qualquer parte da planta, quando cortada, exala forte

cheiro característico da cumarina, daí o nome conhecido na cultura popular, o Cumaru do Ceará ou Cumaru de cheiro.

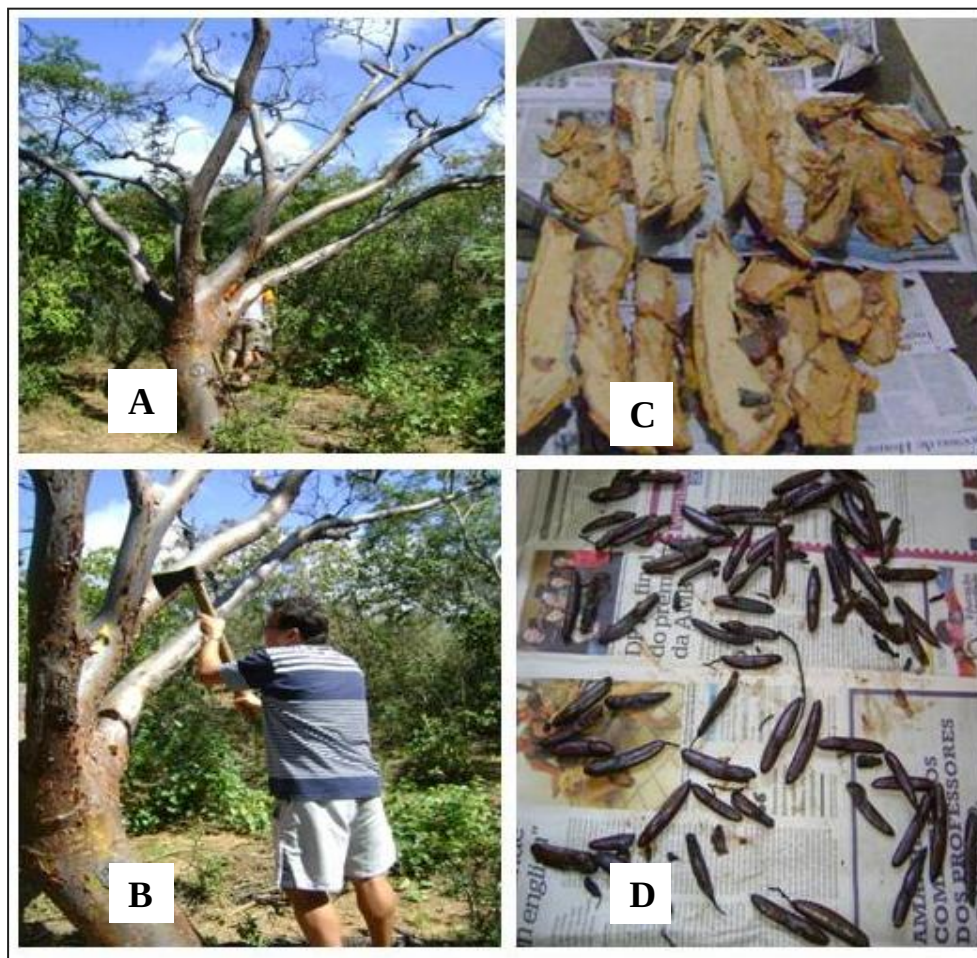


Figura 1. *Amburana cearensis*: A) visão geral da árvore; B) coleta das cascas; C) amostras das cascas; D) amostras de sementes.

Amburana cearensis é encontrada em diversas regiões na América do Sul (Figura 2), com característica de mata estacional, semi-decidual com poucos afloramentos rochosos. Na Argentina e Paraguai é popularmente conhecida como Palo trebol e Roble (LORENZI e MATTOS, 2002), sendo encontrada também na Bolívia, Paraguai e Peru (LEITE, 2005). No Brasil, ocorre desde a região de São Paulo, Amazonas, Rondônia e Acre, nos estados do Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, e na floresta pluvial de Minas Gerais e Tocantins (PEREIRA et al., 2003; AGRA et al., 2005).

Na região Nordeste é encontrada principalmente no bioma Caatinga (Savana-Estépica Gramínea-Lenhosa), adaptada a longos períodos de seca (LORENZI e MATTOS, 2008).



Figura 2. Distribuição da *Amburana cearensis* na América do Sul

2.2.2 Uso na medicina popular

Recentemente, Silva et al. (2012) investigou diversas plantas medicinais de 92 espécies do bioma Caatinga, utilizadas pela comunidade do povoado de Laços, município de Tanhaçu-Bahia. Objetivando identificar o conhecimento popular e suas respectivas finalidades de uso, 125 pessoas foram entrevistadas, sendo que a segunda planta mais relatada foi *A. cearensis* (28%), cujo uso era atribuído à cura dos sintomas de má digestão, diarreia, cólica intestinal, mordida de cobra e como cicatrizante. Nesses casos, as

cascas do caule, sementes e folhas eram preparadas por decocção, infusão ou maceração.

Já em Várzea Comprida das Oliveiras, Pombal, Paraíba-PB, estudo semelhante com 27 espécies diversas e 40 entrevistados, foi observado que *A. cearensis* era utilizada como remédio caseiro para inflamações, problemas respiratórios, tosse e gripe utilizando as sementes e casca do caule em suas preparações por decocção, infusão ou maceração (ANDRADE et al., 2012). Outra pesquisa com 40 idosos de 60 anos ou mais, foi evidenciado que 72% utilizaram remédios caseiros a base de plantas a mais de 10 anos. Dentre as 32 espécies citadas, foi observado que a *A. cearensis* era usada para combater enfermidades como disenteria, desconforto gástrico e inflamações, sendo consumido neste caso chás das cascas do caule (JUNIOR et al., 2012).

Pesquisa efetuada com 27 entrevistados com idades entre 20 a 87 em Quilombola da Barra II, situada a 13 km do município do Chapéu do estado da Bahia, visando conhecer os usos de plantas medicinais de 52 famílias de vegetais catalogadas nessa comunidade e as práticas terapêuticas tradicionais, mostraram que *A. cearensis* era indicada para inflamação, estômago e cólica menstrual, sendo utilizadas as cascas do caule, preparadas por infusão e decocto em forma de chá (SILVA et al., 2012).

Estudo realizado com 61 universitários em Mossoró-RN, originários de outros estados como Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e São Paulo, dentre outros, demonstrou que os informantes adquiriram material botânico com fins medicinais diretamente das árvores ou comprando no comércio local de sua região. *A. cearensis* era utilizada contra diarreia por meio do consumo de chás, para desobstrução nasal por inalação e contra inflamações com infusões preparadas com as cascas do caule fervido (PAULINO et al., 2011).

Outros estudos etnobotânicos sobre a planta são descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Relatos do uso tradicional de *A. cearensis* em várias localidades do Brasil.

Localidade	Uso tradicional	Parte da planta utilizada	Forma de preparo	Referência Bibliográfica
Nossa Senhora Aparecida, Cuiabá-MT	Asma, cicatrização de feridas, expectorante e tosse.	Não informado	decocção	BIESKI et al., 2012
Juazeiro do Norte, CE	Sinusites, bronquite e gripes	cascas do caule e sementes	chás, maceração e xarope	SOUZA, 2011
Teresina, PI	Afecções pulmonares, sinusite, bronquite, tosse, suspensão da menstruação, asma e dores reumáticas	cascas do caule	Não informado	CONCEIÇÃO et al., 2011
São Miguel, RN	Gripes, inflamações de garganta	cascas do caule	Infusão	FREITAS et al., 2011
Laginha, RN	Gripes, sinusite, tonteados, tosse, prisão de ventre, dor de cabeça, dores musculares	Não informado	xaropes, maceração, pó e "balas"	ROQUE et AL., 2010
Oeiras, PI	Afecções como gripe e bronquite; mordida de cobra, febre	Não informado	Infusão e decocto	OLIVEIRA et AL., 2010
Região do Cariri, PB	Tosses, bronquites, gastrites, distúrbios nervosos e dores de cabeça	cascas do caule	decoctos e o xarope (lambedor)	MARQUES, 2008
Petrolina/P E e Juazeiro/BA	Gripe, pressão alta e problemas estomacais	casca do caule	maceração e cozimento	GOMES et al., 2007
Alto Paraíso de Goiás	Icterícia, expectorante, fígado, vesícula e indigestão	Não informado	chás e garrafadas	SOUZA e FELFILI, 2006
Caucaia, CE	Asma, bronquite e tosse	cascas do caule	Chás	MORAIS et al. 2005.

Apesar dos vários relatos medicinais de *A. cearensis*, um estudo realizado em Campina Grande, PB, associou o consumo de uma bebida

alcoólica artesanal, composta por 26 ervas das cascas do caule de plantas, dentre elas o cumaru, diluídas em cachaça e adoçada com mel de rapadura, com casos de intoxicação. *A. cearensis* foi associada com sintomas de taquicardia, hipertensão e hipotensão arterial sistêmica (SANTOS e DANTAS, 2008). Dosagens excessivas da cumarina são conhecidas por paralisar o coração e deprimir o centro respiratório, sendo que em cascas mofadas a cumarina é transformada em dicumarol, de onde pode advir a toxicidade da planta (FIGUEREDO, 2005). A cumarina em doses elevadas também produz lesões hepáticas em cobaias (COHEN,1979).

Considerando a venda indiscriminada de preparações herbais, pesquisa realizada com comerciantes de feiras populares na região do Cariri, PB, analisaram 70 espécies de plantas utilizadas por 12 participantes. Dentre todas, *A. cearensis* se destacou com indicações para: gripes, tosses, bronquites, tônico, anorexia, úlcera externa, diarreia, asma e coqueluches, doenças hepáticas, infecções urinárias, inflamação ovariana e prostática (AGRA et al.,2007). As formulações sugeridas incluíram chás ou decoctos com as cascas do caule macerado e conservado em aguardente ou vinho branco. Para cascas secas e sementes, o pó triturado era indicado como “rapé” para tratamento da sinusite. Na maceração dos frutos n’água para infecções urinárias, as posologias variavam entre dosagens de hora em hora ou dose única, ou ainda uma colher de sopa de 8 em 8 horas até a extinção dos sintomas (AGRA et al.,2007).

2.2.3 Relatos etnofarmacológicos

A confirmação de várias das atividades biológicas atribuídas à *A. cearensis* tem sido realizadas por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*. Testes efetuados com extratos hidroalcoólicos das sementes da planta demonstraram efeito analgésico em camundongos, em tratamentos administrados por via oral, em animais inoculados com ácido acético (0,6% v/v salina, 10 ml/kg) via intraperitoneal (NOWACK et al., 2011). Na dose de 3000 mg/kg do extrato também foi evidenciado o efeito antiinflamatório no modelo do edema de pata do animal (NOWACK et al., 2011).

Pesquisa experimental utilizando as cápsulas do extrato seco de *A. cearensis* (CESAC), contendo amburosídio e cumarina e o isolado de um metabólico secundário, a afrormosina, obtido do extrato etanólico, demonstraram a atividade antiinflamatória (100-400 mg/kg por via oral) no modelo do edema de pata com carragenina e peritonite induzida por ovalbumina (LOPES, 2010). À afrormosina e ao CESAC foram também atribuídas atividades antioxidantes. As atividades terapêuticas encontradas nesse estudo, de acordo com os autores, confirma o uso de *A. cearensis* na medicina caseira como antiinflamatório no tratamento da asma.

Pesquisa avaliando os possíveis efeitos de antinocicepção e antiinflamatório do extrato etanólico das cascas do caule *A. cearensis*, mostrou que concentrações de 100, 200, 400 e 800 mg/kg, administrados por via oral em camundongos e ratos machos adultos, diminuiu as contorções abdominais induzidas com ácido acético a 0,85% v/v. O estudo conclui que o extrato da *A. cearensis* tem propriedades benéficas no tratamento da dor e inflamação (QUINTAS-JUNIOR, 2009). Em testes de nocicepção induzida pela formalina e carragenina em cobaias para promover o edema de pata, o extrato etanólico das partes aéreas de *A. cearensis* germinada, de 7 e 9 meses, apresentaram efeito antinociceptivo e antiedematogênica semelhante àquele descrito para os extratos etanólicos da casca do caule de plantas adultas (CANUTO, 2007).

A análise dos efeitos farmacológicos da cumarina no Sistema Nervoso Central (SNC) e em distúrbios de comportamentos em comparação com ansiolíticos, antidepressivos e sedativos em camundongos, mostrou efeitos neuroquímicos no córtex pré-frontal e hipocampo nos grupos tratados com a cumarina com 20 ou 40 mg/kg i.p ou diazepam 1 mg/kg i.p., relacionados à sedação e ação ansiogênica (LUCETTI, 2010).

Estudo realizado avaliando o efeito depressor no SNC utilizando *A. cearensis* com extrato bruto aquoso das cascas do caule em dose de 50, 100 e 500 mg/kg via i.p. ou oral em camundongos e ratos albinos machos, injetados com tiopental, mostrou catatonia, analgesia, resposta ao toque diminuída, perda do reflexo corneal, perda do tono muscular e da força para agarrar. Foi evidenciado que a *A. cearensis* na concentração de 100 mg/kg demonstrou efeito depressor no SNC (OMENA, 2007).

Usando as cascas do caule para obtenção do extrato etanólico do qual foi isolado o amburosídio (AMB- glucosídio fenólico) e o isocampferídico (ICPF- 3metil flavonol), com doses de 50, 100 e 200mg/ml, testados em animais (ratos e camundongos albinos) de ambos os sexos, e utilizando drogas indutoras de inflamação como as aminas biogênicas (serotonina, histamina, dextrano, carragenina e prostaglandinas), foi observado que o ICPF e o AMB possuem propriedades antiedematogênicas havendo inibição do edema de pata e prevenção do aumento vascular e acúmulo de células inflamatórias (LEAL, 2006). O AMB também teve efeito antioxidante e o ICPF e AMB ação miorrelaxante, neuroprotetora e broncodilatadora. A farmacodinâmica das drogas utilizadas esteve possivelmente relacionada com o bloqueio na síntese dos mediadores inflamatórios (LEAL, 2006).

A ação antinociceptiva com extrato hidroalcoólico da *A. cearensis* (EHAC) e a cumarina obtidas da casca do caule, administrado por via oral em ensaio de contorções abdominais induzida pelo ácido acético, por formalina ou teste de placa quente, mostrou que o efeito antinociceptivo obtido com cumarina se deu por mecanismos alheios à ativação de receptores opióides. Quando a nocicepção foi induzida pela carragenina no modelo do edema de pata em cobaias, a antinocicepção e ação antiedematogênica possivelmente ocorreram devido à liberação de substâncias quimiotáticas na cascata inflamatória (LTB₄ e IL-8 de macrófago) (LEAL et al., 1997).

Outro estudo realizado por CARVALHO (2009) analisou em um ensaio randomizado do tipo duplo cego a eficácia do xarope de *A. cearensis* em 42 pacientes com asma. No hospital, os pacientes eram acompanhados por um Pneumologista, sendo que 21 participantes ingeriram placebo e o outro grupo utilizava o xarope composto por 0,15 mg/mL de cumarina. O resultado encontrado demonstrou uma melhora na qualidade de vida dos asmáticos e não apresentou toxicidade.

Estudo avaliando a capacidade antimicrobiana de extratos etanólicos de seis plantas nativas do bioma caatinga nos estados de Pernambuco e Bahia, frente a 160 isolados de *Staphylococcus* ssp. de casos de mastite sub-clínica em ovinos e caprinos leiteiros, demonstraram *A. cearensis* inibir 88,1% dos isolados (PEIXOTO e COSTA, 2009).

Estudo recente que avaliou o potencial terapêutico antimicrobiano de *A. cearensis* com extrato etanólico das cascas do caule contra micro-organismos Gram positivo e negativo, tais como: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus equi*, *Listeria* spp., *Corynebacterium* spp., *Aeromonas* spp., *Proteus* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus intermedius*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus suis*, *Nocardia* spp., *Vibrio* spp., *Micrococcus* spp., *Staphylococcus caprie*, *Edwadiasiella* spp., todos de interesse veterinário, somente não exerceu ação inibitória contra *Proteus* spp., *Nocardia* spp., *S. caprae* e *S. agalactiae* (VARGAS et al., 2011).

Por outro lado, extratos hidroalcoólicos das cascas do caule de várias espécies de plantas, dentre elas *A. cearensis*, contra micro-organismos isolados de hospitais, tais como: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia* spp, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp coagulase negativa, e quatro bactérias catalogadas na American Type Culture Collection (ATCC), a saber: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhimurium*, demonstraram que apenas *Staphylococcus epidermidis* foi sensível, com halo de 13 mm nos testes de difusão em ágar (GONÇALVES, 2007).

2.2.4 Fitoquímica de *Amburana cearensis*

A casca do caule é composta principalmente por cumarina que é responsável pelo odor característico. Assim sendo, metabólitos secundários são descritos na progênie do vegetal obtidos com extrato etanólico das cascas do caule e sementes da espécie adulta, identificadas através de técnicas cromatográficas (CANUTO e SILVEIRA, 2010). Já foram descritas as cumarinas (6-hidroxi-cumarina e protocatecuato de 6-cumarila); Ácidos fenólicos- ácido vanílico e ácido (*E*)-*O*-cumárico; Flavonóides- quercetina, formononetina, e os biflavonóides amburanina A e B; Amburosídeos- amburosídio A, ferulato de 6-amburosila, protocatecuato de 6-amburosila, galato de 6-amburosila, acetato de 6-amburosila, sinapato de 6-amburosila e vanilato de 6-amburosila (CANUTO e SILVEIRA, 2010).

Já na fase de crescimento, as sementes foram germinadas em cultivo com partes aéreas e xilópodes, onde foi isolados com extratos etanólico utilizando a técnica partições líquido-líquido acompanhado por cromatografia Sephadex e LH-20/gel de sílica da fração diclorometano (Fpa-CH₂Cl), a cumarina, a aiapina, a amburanina B, o isocampferídio, o ácido vanílico e o ácido (E)-O-cumárico glicosilado, obtidos da parte aérea da planta. Do xilópode, cromatografia Sephadex LH-20 e CLAE (Cromatografia de alta eficiência) do extrato etanólico (Fx-H₂O), apresentou o ácido p-hidroxibenzóico, o ácido (Z)-O-cumárico glicosilado e o amburosídio B, dos quais a aiapina e estereoisômero Z do ácido O-cumárico glicosilado são inéditos identificados na fração hidrometanólica (Fx-H₂O/MeOH) (CANUTO e SILVEIRA, 2010).

Em outro estudo, o isolamento de compostos do metabolismo secundário no extrato hidroalcoólico das cascas do caule de *A. cearensis*, através de cromatografia em gel resultou na identificação de: cumarina, diidroocumarina, escopoletina, 3,4-dimetil trans-3,4-dimetoxicinamato de metila; cis-3,4-dimetoxi-cinamato de metila; 3-metoxi-4-hidroxi-cinamato de metila; 4-hidroxi benzoato de metila; 3,4-dihidroxi benzoato de metila; 3-hidroxi-4-metoxi benzoato de metila; catecol; guaiacol; a-etoxi-*p*-cresol; 4-hidroxi-benzenemetanol; 4-metoximetilfenol; 2,3-dihidrobenzofurano, antraquinona (crisofanol), triterpenóides (lupeol; α,β -amirinas; escaleno), esteróides (β -sitosterol; ergost-5-en-3 β -ol; 24,26-dimetilcholesta-5,22-dein-3 β -ol), compostos alifáticos (palmitato de metila; palmitato de etila; *n*-undeceno; eicosanoato de metila; 9(Z)-octadecenoato de metil; 9,17(Z)-octadecanodienal) (NEGRI et AL.,2004).

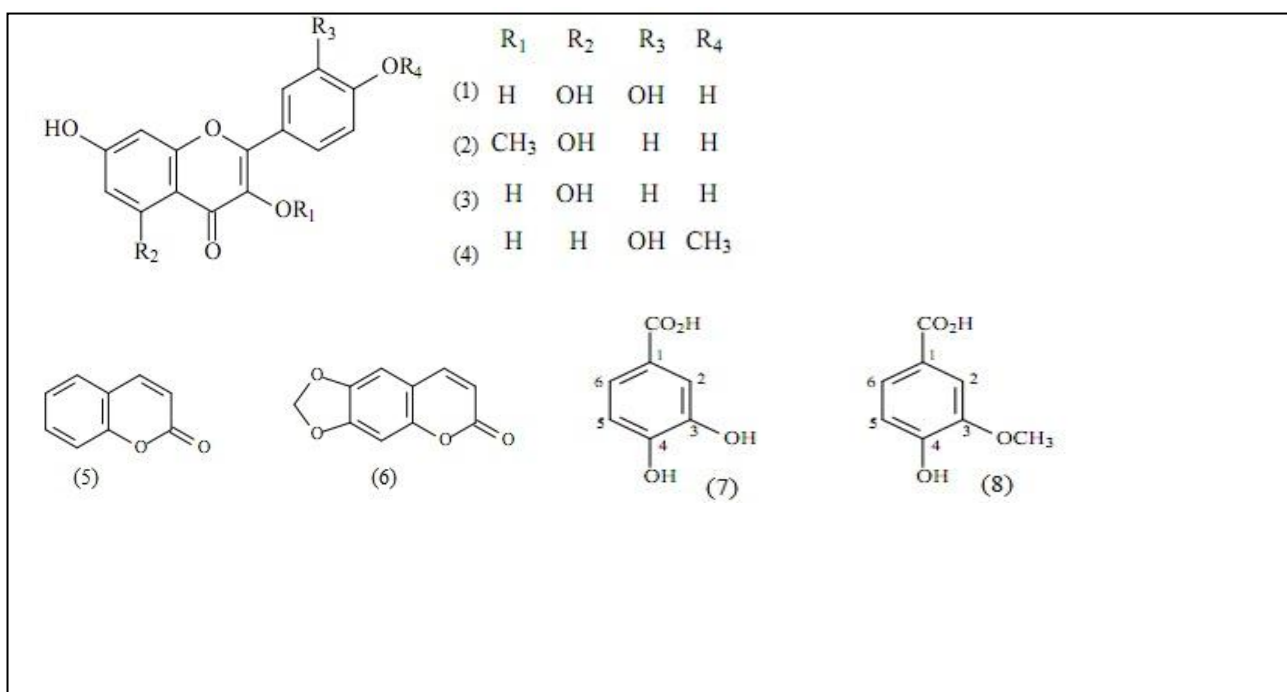
Além disso, uma série de estudos com as cascas, sementes e outros de *A. cearensis* têm evidenciado quimiotipos em diferentes regiões do Brasil, como demonstrado na tabela 1.

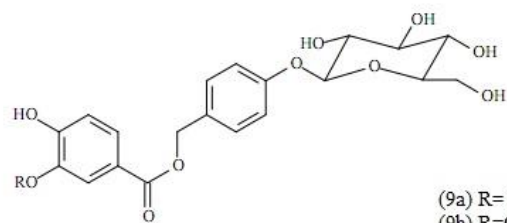
Tabela 2. Fitoquímicos relatados em extratos de *A. cearensis*.

Parte Usada	Solvente	Metabólitos Secundários	Método de Obtenção	Referência
Casca do Caule	Etanol	Cumarina e compostos Fenólicos (Isocampferídio e amburosídio A.)	Cromatografia em gel sílica shephadex LH - 20	LEAL, 2006
Casca do		Isofalvonóide	Cromatografia	

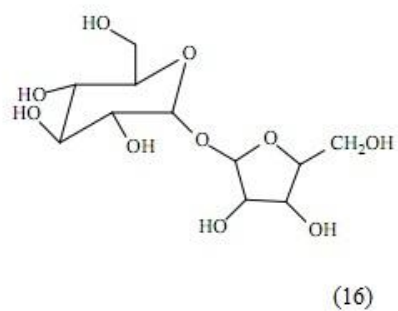
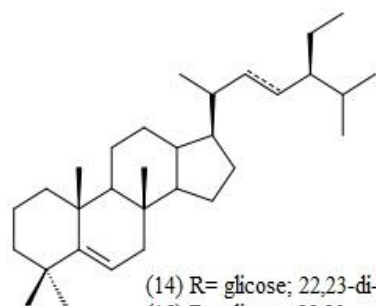
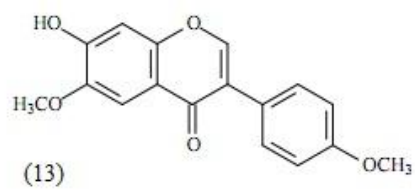
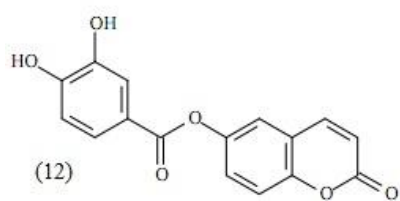
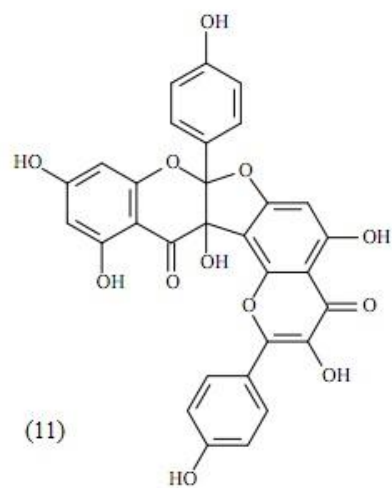
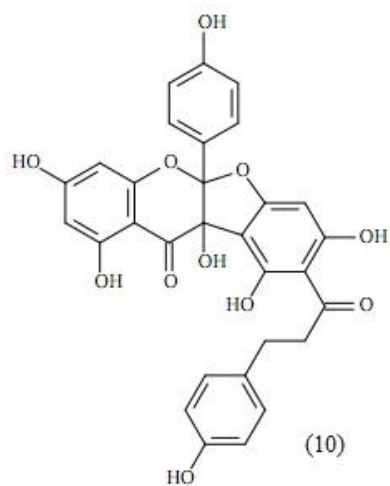
Caule	Etanol	(Afromorsina)	líquida de alta eficiência (CLE)	LOPES, 2010
Resina	Clorofórmico e Metanol	2',4,4' – Triidroxichalcona (Isoliquiritigenin) (1), 2',4', diitroxi – 3',4' - metoxichalcona (2), 7,8,3',4' – Tetrametoxiisoflavona	Cromatografia em gel sílica shephadex LH – 20; Espectrofotometria IV e RMN	BANDEIRA et al., 2011
Sementes	Butanol e Solução Hidroetanólica	Flavonóides, protantocianidinas, antocianidinas, carotenoides	Quantificação espectrofotométrica	JUNIOR et al., 2011
Aéreas e Xilopódios	Etanol	Ácido protocatecuico, ácido vanílico, Cumarina Amburosídio A	Cromatografia em gel de sílica e HPLC	CANUTO et al., 2008
Casca do Caule	Hexano e Clorofórmico	Cumarina (1,2 - benzopirona)	Cromatografia em gel sílica; Espectroscópica de ressonância magnética nuclear de H e C.	MARINHO et al., 2004
Madeira - Pó	Hidroetanólica	1 – Dodecanol; Ácido - 2 - etil – hexanico; Dihidrocumarina; Cumarina (1,2 benzopirona)	Espectrofotômetro UV/Vis	LEÃO, 2006
Casca do Caule e Folhas	Etanol	Antocianinas, antocianidinas, flavonas, chalconas, Auronas, leucoantocianidinas.	-Teste com solução de FeCl ₃ ; Acidulação HCl e alcalinização com NaOH,	SOUZA, 2011

As estruturas químicas de compostos identificados em *A. cearensis*, estão representadas na Figura 3.





(9a) R=H
(9b) R=CH₃



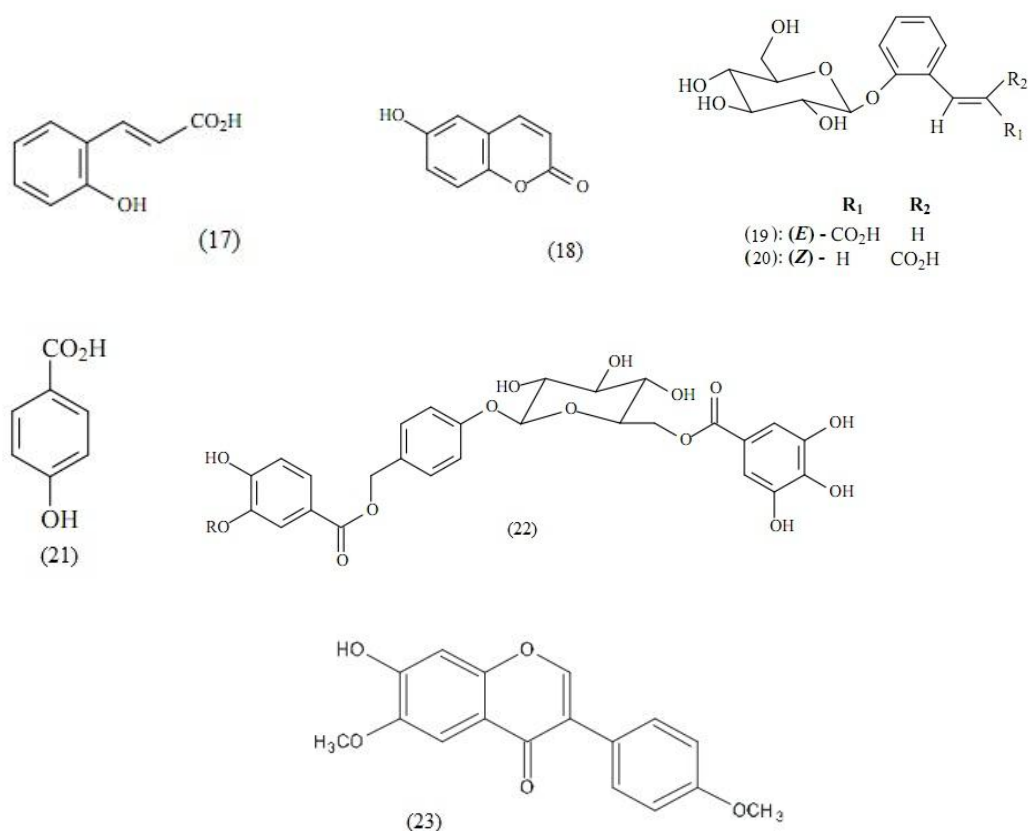


Figura 3. Estruturas químicas de compostos identificados em *A. cearensis*. Quercetina **(1)**, isocampferídeo **(2)**, campferol **(3)**, 4'- metoxi-fisetina **(4)**, cumarina **(5)**, aiapina **(6)**, ácido 3,4-dihidroxi-benzóico **(7)** (ácido protocatecuico), ácido vanílico **(8)**, amburosídeo A **(9a)**, amburosídeo B **(9b)** biflavonóides **(10 e 11)**, 3,4-dihidroxi-benzoato de 6-cumarila **(12)** afmosina **(13)**, uma mistura de β -sitosterol e estigmasterol glicosilados **(14 e 15)**, sacarose **(16)**. Das sementes foram isolados o ácido o-cumárico **(17)**, a 6-hidroxycumarina **(18)**, ácido (E)-o-cumárico glicosilado **(19)**, ácido (Z)-o-cumárico glicosilado **(20)**, ácido p-hidroxi-benzóico **(21)**, derivado esterificado do amburosídeo **(22)**, afmosina (AFM) **(23)** (Fonte: CANUTO e SILVEIRA, 2010).

2.2.5 MEDICINA NUCLEAR

A Medicina Nuclear é uma especialidade médica com finalidade diagnóstica e terapêutica, através de investigação com uso de radionuclídeos

adicionados a outros compostos químicos ou fármacos, constituindo radiofármacos, os quais são administrados *in vivo* e se distribuem em determinados órgãos (BERNARDO-FILHO et al., 2005). Geralmente o fármaco é escolhido com base no órgão que se acumula ou colabora na função fisiológica, enquanto que o radionuclídeo é escolhido pelo tipo de energia, radiação e tempo de decaimento. Estes são administrados principalmente como drogas injetáveis, orais ou inalatórias, obedecendo à cascata da farmacocinética (absorção, distribuição, metabolização e excreção) (OLIVEIRA et al., 2006).

Nas aplicações diagnósticas, a distribuição do radiofármaco em humanos é identificada a partir de imagens bidimensionais (planares) ou tomográficas, que possibilita que algumas enfermidades sejam diagnosticadas antes do seu manifesto. Os procedimentos são de alta eficiência, de forma que a maior ou menor captação dos compostos permite avaliar anormalidades em estrutura dos órgãos e, ainda identificar a involução ou evolução de certas patologias, com vantagem sobre técnicas radiológicas que avaliam externamente a absorção da radiação (OLIVEIRA et al., 2006; LEE et al., 2010).

Na medicina nuclear, a dose necessária dos radiofármacos é pequena em relação aos exames de contraste que pode provocar toxicidade e desencadear alergias. Outros métodos diagnósticos, como Ressonância Magnética Nuclear (RMN), apesar de apresentarem melhor resolução, são menos específicas do que os métodos da medicina nuclear, que permite uma melhor avaliação funcional. Os radiofármacos são compostos radioativos sem ação farmacológica, pois não mostram relação dose-resposta e nessa concepção se diferenciam dos fármacos sintéticos tradicionais. Além de aplicados em diagnóstico e terapia, são utilizados para radioesterilização de materiais médico hospitalares (LEE et al., 2010).

Ensaio de biodistribuição são essenciais para uma melhor compreensão dos fatores que influenciam no resultado das imagens geradas para fins diagnósticos utilizados na medicina nuclear. Tais fatores podem ser decorrentes das atividades biológicas de produtos naturais e seus derivados bioativos, drogas sintéticas ou semissintéticas, e também interações entre elas (HOLANDA et al., 2008).

O radioisótopo mais utilizado para a preparação de radiofármacos é o ^{99}Tc (Tecnécio), tendo sido o primeiro elemento produzido artificialmente. O Tecnécio é obtido com o decaimento radioativo do Molibdênio (^{99}Mo) a aproximadamente 90% dos átomos, que desintegram após emissão de radiação β -gama. No processo também é formado ^{99}Ru (estável), sendo que nessa reação o Molibdênio forma com o Tecnécio um par radioativo em equilíbrio transiente, já que o tempo de meia-vida física do Molibdênio é de 66 horas e do Tecnécio é de 6 horas. Tais compostos são separados por eluição, onde o material eluído constitui a substância radiofarmacêutica e pode ser utilizada diretamente em aplicações clínicas (SAHA, 2005).

O equilíbrio Molibdênio/Tecnécio possibilitou a fabricação de um sistema gerador de radionuclídeo de ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$. O gerador é um sistema fechado, composto por uma coluna cromatográfica de óxido de alumínio (Al_2O_3), na qual é depositada uma atividade conhecida de ^{99}Mo (Figura 4). Dentro deste sistema, o ^{99}Mo decai dando origem ao ^{99}Tc que pode ser eluído com uma solução de NaCl 0,9% e coletado na forma de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$), enquanto o ^{99}Mo permanece adsorvido à coluna de alumina (SAHA,2005). Assim, o elemento $^{99\text{m}}\text{Tc}$ pode ser facilmente disponibilizado no hospital ou serviço de Medicina Nuclear.

A distribuição, a fixação e a eliminação de radiofármacos em um organismo dependem de vários fatores, tais como o fluxo sanguíneo, o metabolismo tecidual e a ligação aos elementos sanguíneos (HLADIK et al., 1987; SAMPSON, 1996). Vários autores têm demonstrado que a biodisponibilidade de radiofármacos pode ser modificada por produtos naturais e sintéticos (OLIVEIRA et al.,2000; SANTOS-FILHO et al.,2004; HOLANDA et al.,2009; CORREIA et al.,2010).



Figura 4. Gerador de ^{99}Mo - ^{99}Tc produzido pelo IPEN-TEC/SP.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Investigar a ação antimicrobiana do extrato clorofórmico de *Amburana cearensis* e sua ação sobre a biodistribuição do pertecnetato de sódio.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a composição fitoquímica do extrato clorofórmico da casca do caule de *A. cearensis*;
- Identificar o potencial antibacteriano do extrato clorofórmico da casca do caule de *A. cearensis*;
- Estabelecer a concentração mínima inibitória e bactericida do 4-metoxi-3-metilfenol, identificado no extrato clorofórmico da casca do caule de *A. cearensis*, contra isolados clínicos resistentes a antibióticos;
- Avaliar a toxicidade do extrato clorofórmico da *A. cearensis* em camundongos suíços;
- Estudar o efeito do extrato clorofórmico de *A. cearensis* na biodistribuição do pertecnetato de sódio;
- Verificar o efeito do 4-metoxi-3-metilfenol na biodistribuição do pertecnetato de sódio;

REFERÊNCIAS

AGRA, M.F.; FRANÇA, P.F.; CÂMARA, C.A.; SILVA, T.M.S.; ALMEIDA, R.N.; AMARAL, F.M.M.; ALMEIDA, M.Z.; MEDEIROS, I.A.; MORAES, M.O.; BARBOSA-FILHO, J.M.; NURIT, K.; OLIVEIRA, F.S.; FREIRE, K.R.L.; MORAIS, L.C.S.L.; RÊGO, T.J.A S.; BARROS, R.F.M. (2005) Medicinais e produtoras de princípios ativos. In: SAMPAIO, E.V.S.B. (ed.). Espécies da flora nordestina de importância econômica potencial. P.135-198. Recife: Associação Plantas do Nordeste.

AGRA, M. F., BARACHO, G.S., BASILIO, I. J. D., NURIT, K., COELHO, P. C., BARBOSA, D.A., (2007) – Sinopse da flora Medicinal do Cariri Paraibano. Oecol. Brasil., 11(3): 323-330.

ALMEIDA, E.V.A. (1996) As razões da terapêutica. Tese de Doutorado em Saúde Coletiva. Rio de Janeiro: IMS/UERJ.

ALMEIDA, M. R. (2007) – Pereirina: O primeiro alcaloide no Brasil? Caracterização de alcaloides em extrato etanólico de *Geissospermum velosii* por CLAE e EM-IES. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

ALVES, T.M.A., SILVA, A.F., BRANDÃO, M., GRANDI, T.S.M., SMÂNIA, E.F.A., SMÂNIA JÚNIOR, A., ZANI, C.L. (2000) Biological screening of Brazilian medicinal plants. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 95 n.3, p. 367-373.

AMARAL, F.M.M.; COUTINHO, D.F.; RIBEIRO, M.N.S.; OLIVEIRA, M.A., (2003) - Avaliação da qualidade de drogas vegetais comercializadas em São Luís/ Maranhão. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 13, n. 1, p.27-30.

ANDRADE, S.M.O.; MARACAJÁ, P.B.; SILVA, R.A.; FREIRES, G.F.; PEREIRA, A.M. (2012) - Estudo etnoveterinário de plantas medicinais na comunidade Várzea comprida das Oliveiras, Pompal, Paraíba, Brasil. Rev. Verde de Agroecologia e desenvolvimento sustentável.

BACH, E. (1990) Os remédios florais do Dr. Bach. São Paulo: Pensamento.

BARNARD, J. (1979) Um guia para os remédios florais do Dr. Bach. São Paulo: Pensamento.

BANDEIRA, P.N.; FARIAS, S.S.; LEMOS, T.L.G; FILHO, R.B; SANTOS, H.S; ALBUQUERQUE, M.R.J.R.; COSTA, S.M.O. (2011) - New derivatives of isoflavone and other flavonoids from the resin *Amburana cearensis*. J. Braz. Chem. Soc. Vol. 22, n.2. São Paulo.

BARBOSA, M.C.S.; BELLETTI, K. M. da S.; CORRÊA, T. F.; SANTOS, C.A. de M. (2001) - Avaliação da qualidade de folhas de boldo-do-chile (*Peumus boldus Molina*) comercializadas em Curitiba/ PR. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.11, n. 1, p. 1-4.

BERNARDO-FILHO, M.; SANTOS-FILHO, S.D.; MOURA, E. G., MAIWORM, A.I.; ORLANDO, M.M.C.; PNAS, M.E., CARDOSO, V.N.; BERNARDO, L.C.; BRITO L.C.; (2005) - Drug interaction with radiopharmaceuticals: a review. Braz Arc Biol Technol.; 48:13-27.

BIESKI, I.G.C.; SANTOS, F.B.; OLIVEIRA, R.M.; ESPINOSA, M.M.; MACEDO, M.; ALBUQUERQUE, U.P.; MARTINS, D.T.O. (2012) - Ethnopharmacology of Medicinal Plants of the Pantanal Region (Mato Grosso, Brazil). Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.

BRAGA, R.(1976) - Plantas do Nordeste especialmente do Ceará. 3a Ed. Fortaleza: Imprensa Oficial, p. 219.

BRASIL. Ministério da Saúde. (2005) - Lei Biossegurança (Lei nº 11.105/2005). Política nacional de biossegurança. Brasília: Ministério da Saúde.

BRASIL. Ministério da Saúde. (2006) - Política Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde.

CALIXTO, J. B. (2005). Twenty-five years of research on medicinal plants in latin América. A personal view. Journal of Ethnopharmacology, 100: 131-134.

CANUTO, K.M. (2007) – Aspecto do estudo interdisciplinar (Química-Agronomia-Farmacologia) de *Amburana cearensis* A.C Smith. Tese. Universidade Federal do Ceará-UFC.

CANUTO, K.M.; SILVEIRA, E.R.; BEZERRA, A.M.E.; LEAL, L.K.A.M.; VIANA, G.S.B. (2008) – Uso de plantas jovens de *Amburana cearensis* A.C. Smith: Alternativas para Preservação e exploração Econômica e Exploração Econômica da Espécie. Embrapa; Embrapa semi-árido. P. 24.

CANUTO, K.M.; SILVEIRA, E.R. (2010) – Estudo fitoquímico de espécimens cultivadas de cumaru (*Amburana cearensis* A.C. SITH). Quim. Nova, vol. 33, n.3, 662-666.

CARRARA, Jr.; e MEIRELLES, H. (1996) – A Indústria Química e o desenvolvimento do Brasil. Metalivros. São Paulo.

CARVALHO, J.C. (1950) – Ezequiel Correia dos Santos (1801-1864). Tribuna Farmacêutica, v.17, p.125-134.

CARVALHO, E.M. Xarope de Cumaru como terapia complementar na Asma persistente Leve. (2009). Tese de doutorado. Departamento de Fisiologia e Farmacologia – Universidade Federal do Ceará (UFC)- Fortaleza. p.180.

CONCEIÇÃO, G. M.; RUGGIERI, A. C.; ARAÚJO, M. F. V.; CONCEIÇÃO, T,T,M,M.; CONCEIÇÃO, M. A. M. M.; (2011) – Plantas medicinais do Cerrado: Comercialização, uso e indicação terapêutica fornecida pelos raizeiros e vendedores, Teresina,Piauí. Scientia Plena. Vol. 7, n. 12.

COHEN, A. J. (1979) – Critical of the toxicology of coumarin with special reference to interspecies differences in metabolism and hepatotoxic response and their signicace to man. Food and Cosmetic Toxicology, v. 17, p. 277-289.

CORREIA, M.B.L.; MAGNATA, S.S.L.P.; SILVA, I.M.S.; CATANHO, M.T.J.A.; LIMA, F.F. (2010). Biokinetics and dosimetric studies about ^{99m} tc(v)- dmsa distribution. Cellular and Molecular BiologyTM 56, N°2.

CUNHA, M.C.L.; FERREIRA, R.A. (2003) Aspectos morfológicos da semente e do desenvolvimento da planta jovem de *Amburana cearensis* (Arr. Cam.) A.C. Smith – cumaru – Leguminosae – Papilionoideae. Revista Brasileira de Sementes, Pelotas, v. 25, n. 2, p. 89-96.

FELICIANO, A.L.P. (1989) Estudo da germinação de sementes e desenvolvimento da muda, acompanhado de descrições morfológicas de dez espécies arbóreas ocorrentes no semi-árido nordestino. Viçosa: UFV, 114p. (Dissertação Mestrado).

FIGUEREDO, A.C. (2005), Apostila de Fitoterapia. Universidade Federal da Paraíba, centro de ciências da saúde- núcleo de estudo e pesquisa homeopática e Fitoterápicos. João Pessoa-PB.

FREITAS, A. V. L.; COELHO, M. F.B; MAIA, S. S. S.; AZEVEDO, R. A . B. (2011) – Plantas medicinais: Um estudo etnobotânico nos quintais do Sítio

Cruz, São Miguel, Rio Grande do Norte, Brasil. Ver. Bras. Bioc., Porto Alegre, v.10, n.1, p.48-59.

GOMES, E.C.S.; BARBOSA, J.; VILAR, F.C.R.; PEREZ, J.O.; RAMALHO, R.C. II (2007) Congresso de Pesquisa e Inovação Norte e Nordeste de Educação Tecnológica- João Pessoa-PB.

GONÇALVES, A.L. – (2007)-Estudo da atividade antimicrobiana de algumas árvores medicinais nativas com potencial de conservação/recuperação de florestas tropicais. 209p. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas – Universidade Estadual Paulista.

GOTTLIEB, O.R.E.; STEFANELLO, M.E.A. (1991) Comparative ethnopharmacology: a rational method for the search of bioactive compounds in plants. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v.63, p.23-31.

HARBERSTEIN, RA. (2005) Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. Annals of epidemiology, v.15, n.9, p. 686-99.

HARTMANN, T.(1996) Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. Entomologia Experimentalis et Applicata, v.80, n.1, p. 177-88.

HLADIK III W.B.; SAHA G.B.; Study KT.(1987) Essentials of Nuclear Medicine Science. Baltimore-London; Williams & Wilkins.

HOLANDA, C. M. C. X.; OLIVEIRA, E. H.; ROCHA, L. G.; BARBOSA, V. S. A.; SPYRIDES, M. H. C.; ARAGÃO, C. F. S.; MEDEIROS, A. C.(2008) Effect of Paclitaxel (Taxol®) on the Biodistribution of Sodium Pertechnetate (Na^{99m}TcO₄) in Female Wistar Rats. Braz. Arch. Biol. Technol., v. 51, p. 191 – 196,

HOLANDA, C. M. C. X.; BARBOSA, V. S. A et al. (2009)- Effect of an extract of *Aloe Vera* on the Biodistribution of Sodium Pertechnetate ($\text{Na}^{99\text{mTcO}_4$) in Rats. *Cir. Braz.* 24(5):383-6.

IBAMA. Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçada de extinção. Portaria nº.37-N de 3 de abril de 1992. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br>>. Acesso em: dezembro 2012.

JORGE, S.S.A. Plantas medicinais coletânea de saberes. Disponível em: <<http://www.docstoc.com/docs/50561792/Plantas-Medicinais-Colet%C3%82Nea-desaberes>>. Acesso em: 19 Dez. 2012

JUNIOR, R. G. O.; LAVOR, E. M.; OLIVEIRA, M. R.; SOUZA, E. V.; SILVA, M. A.; SILVA, M. T. N. M.; NUNES, L. M. N. (2012) – Plantas medicinais utilizadas por um grupo de idosos do Município de Petrolina, Pernambuco. *Revista Eletrônica de Farmácia* Vol. IX (3), 16 – 28.

JÚNIOR, N.O.R.; FERNANDEZ, L.G.; CASTRO, R.D.; SILVA, L.C.; GUALBERTO, S.A.; PEREIRA, M.L.A.; SILVA, M.V. (2011) – Bioactive compounds and antioxidant activity of crude extract of brushwood vegetable species. *Braz. J. Food Technol.*, Campina/SP. V.14, n.1, p. 50-57.

LEAL, L.K.A.M. (2006) Contribuição para a validação do uso medicinal de *Amburana cearensiis* (cumarú): estudos farmacológicos com o isocampferídio e o amburosídeo 179 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará.

LEAL, L.K. A.M. (1995) - Estudos farmacológicos do extrato hidroalcoólico e constituintes químicos de *Torresea cearensis* Fr. Allem. 128 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará.

LEAL, L.K.A.M.; MATOS, M.E.; MATOS, F.J.A.; RIBEIRO, R.A.; FERREIRA, F.V.; VIANA, G.S.B. (1997) Antinociceptive and antiedematogenic effects of the

hydroalcoholic extract and coumarin from *Torresea cearensis* Fr. All.
Phytomedicine, 4: 221-227.

LEÃO, M.M. (2006) – Influência do tratamento na composição química da madeira de amburana (*Amburana cearensis*), bálsamo (*Myroxylon balsamum*) e Carvalho (*Quercus sp.*) e o impacto no aroma de uma solução modelo de cachaça. Dissertação de mestrado - Universidade de São Paulo- Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

LEE, S.; XIE, X. (2010) – Peptide-based probes for targeted molecular imaging. Biochem. V.49, n. 7, p. 1364-1376.

LEITE E.J. (2005) - State-of-knowledge on *Amburana cearensis* (Fr. Allem.) A.C. Smith (Leguminosae: Papilionoideae) for genetic conservation in Brazil. Journal for Nature Conservation 13(1): 49-65.

LOPES, A.A. (2010) – A valiação da atividade antiinflamatória e antioxidantes das cápsulas do estrato seco padronizado e da Afromosina isoflavonóide, obtidos de *Amburana cearensis* A.C SMITH. Dissertação de Mestrado da Universidade Federal do Ceará.

LORENZI, H., MATOS, F.J.A. (2002) - Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa. São Paulo: Instituto Plantarum. p.298.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. (2008) - Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa. São Paulo: Instituto Plantarum. p.275.

LUCETTI, E.C.P. (2010) – Efeitos centrais da cumarina (1,2- benzopirona): Estudo comportamental e neuroquímico em córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos. Dissertação de mestrado da Universidade Federal do Ceará- UFC.

MARINHO, M.G.V.; BRITO, A.G.; CARVALHO, K.A.; SANTOS, C.R.B.; ANDRADE, J.M.B.; PIUVEZAM, M.R. (2004) – *Amburana cearensis* e

Cumarina Imunomodulam os níveis de anticorpos antígenos-específicos em camundongos BALB/c sensibilizados com Ovalbumina. *Acta. Farm. Bonarense* 2391: 47-52.

MARQUES, J.B., (2008). Comercio e conservação de três espécies vegetais da Caatinga ameaçadas de extinção e de uso medicinal em duas áreas do Cariri Oriental Paraibano. Dissertação de Mestrado.

MARTIUS, Carl Friedrich Philipp Von. *Flora brasiliensis*. Disponível em: <<http://flora.brasiliensis.cria.org.br/info?biographies>>. Acesso em: 26 de novembro 2012.

MATTOS, D. M. M.; GOMES, M. L.; FREITAS, R. S.; BOASQUEVISQUE, E. M.; CARDOSO, V. N.; PAULA, E. F.; BERNARDO-FILHO, M.(2000) The effect of vincristine on the biodistribution of technetium-99m DTPA, GHA, and DMSA in balb/c female mice. *J. of Nuc. Med. Techn.*, v. 28, n. 4, p. 271 – 274.

MORAIS, R. C. J. (2005) - Nos verdes campos da ciência: A trajetória Acadêmica do Médico e Botânico Francisco Freire-Allemão (1797-1874). Dissertação de Mestrado, Casa de Oswaldo Cruz.

MORAIS, S.M.; DANTAS, J.D.P.; SILVA, A.R.A.; MAGALHÃES, E.F. (2005)- Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. *Brazilian Journal of pharmacology*. 15(2): 169-177.

MORS, W.B. (1982) – Plantas medicinais: uma visão de um químico. VII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, livro de Resumo, p. 550-552.

MILLS, S.; e BONE, K. (2000) – *Principles and Practice of Phytotherapy*. Churchill livingstone. Edinburgh.

NASCIMENTO, G.G.F. (2000) Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.31, n.2, p.247-256.

NASCIMENTO, A. C. “Ao Persistiram os Sintomas o Médico deverá ser consultado”. Isto é regulação? Rio de Janeiro. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) (2003) – Instituto de Medicina Social, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, p. 124.

NEGRI, G.; OLIVEIRA.; A.F.M.; SALATINO, M.L.F.; SALATINO, (2004) - A. Chemistry of the stembark of *Amburana cearensis* (Allemão) (A.C.SM.). Revista Brasileira de Plantas Medicinais. 6:1-4.

NEWMANN, D.J.; CRAGG, G. M. (2007)- Natural products as source of new drugs over the last 25 years. J. Nat. Prod., v. 70, p. 461-477.

NOWACKI, L.; SOUZA, W.M.; VALENTE, N. R S.; SANTOS, L.C. (2011) – Avaliação dos efeitos analgésicos e antiinflamatório do Extrato bruto de *Amburana cearensis* em camundongos. Ver. Elet. Biociência, Biotecnologia e Saúde.

OLIVEIRA, F.C.S.; BARROS, R.F.M.; MOITA NETO, J.M. (2010) - Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. Rev.Bras. Pl. Med., Botucatu, v.12, n.3, p.282-301.

OLIVEIRA J.F.; BRAGA A.C.S.; ÁVILA A.S.R.; ARAÚJO A.C.; CARDOSO, V.N.;BEZERRA R.J.A.C.; BERNARDO-FILHO M.(2000) Assessment of the effect of *Maytenus ilicifolia* (espinheira santa) extract on the labeling of red blood cells and plasma proteins with technetium-99m. J.Ethnopharmacol ; 72:179-84.

OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; FERREIRA, D.; COELHO, P. VEIGA, F.(2006) Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. Rev. Bras. Ciênc. Farmac., v.42, p. 151-165.

OMENA, M.L.A. (2007) – Ensaio etnofarmacológico de espécies vegetais com ação no sistema nervoso central, originárias do bioma caatinga. Saúde e Ambiente em Revista, v.2, n.2, p.92-107.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS), (1998) – Relatório Annual. Genebra.

PAULINO, R.C.; HENRIQUES, G.P.A.; COELHO, M.F.B.; MAIA, S.S.S.S. - 2011- Conhecimento sobre plantas medicinais entre alunos da Universidade Federal do Semi Árido, Mossoró-RN. Rev. Verde, v.6, n.4, p.78-90.

PAULO, G.L.; ZANINI, A. C. Automedicação no Brasil.(1988) Rev. Ass Med Brasil, 34 (2): 69-75.

PEIXOTO, R.M.; COSTA, M.M. (2009) - Mastite em pequenos ruminantes: etiologia, fatores de risco, diagnóstico e sensibilidade aos antimicrobianos e extratos de plantas/ Rodolfo Moraes Peixoto. Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNVASF/PE.

PEREIRA, N.A. (1982) – A contribuição de Manuel Freire Allemão de Cysneiros para o conhecimento de nossos fitoterápicos. Publicação da Faculdade de Farmácia da UFRJ. Rio de Janeiro.

PEREIRA, S.C.; GAMARRA, R.C.; LIMA, M.; GALLINDO, F.A.T. (2003) - Plantas úteis do Nordeste do Brasil. Recife: Associação Plantas do Nordeste.

QUINTAS-JUNIOR, L.J.; OLIVEIRA, R.R.B.; GÓIS, R.M.O.; SIQUEIRA, R.S.; ALMEIDA, J.R.G.S.; LIMA, J.T.; NUNES, X. P.; OLIVEIRA, V.R.; SIQUEIRA, J. S. (2009) – Antinociceptive effect of the ethanolic extract of *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Simth. Fabaceae: , in rodents. Bras. Journal of pharmacognosy. 19(3):672-676.

RAPOPORT, H.; ONAK, T.P.; HUGHES, N.A.; REINECKE, M.G. (1958) – Alkaloids of *Geissospermum velossi*. Journal of the American Chemical Society, v.80, p. 1601-1604.

RODRIGUEZ, E.; AREGULIN, M.; NISHIDA, T.; UEHARA, S.; WRANGHAM, R.; ABRAMOWSKI, Z.; FINLAYSON, A.; TOWERS, G. H. (1985) – Thiarubrine A, a bioactive constituents of *Aspilia* (Asteraceae) consumed by wild chimpanzees. *Experientia*, v.41, p. 419-420.

ROQUE, A.A.; ROCHA, R.M.; LOIOLA, M.I.B. (2010). Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, v.12, n.1, p.31-42.

RECIO, M.C.; RÍOS, J.L. (1989) A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988. *Phytotherapy Research*, v. 3, p.117-125.

SAHA, G. B. (2005) - Fundamentals of Nuclear Pharmacy, 5th edition, Springer-Verlag, New York, 383 pages.

SAMPSON, C.B. (1996) Complications and difficulties in radiolabelling blood cells: a review. *Nucl Med Commun*; 17:648-58.

SANTOS-FILHO, S.D.; DIRÉ G.L.; LIMA E.; OLIVEIRA M., BERNARDO-FILHO, M.(2004)- Effect of *Mentha crispa* (mint) extract on the labeling of blood elements with technetium-99m a possible evaluation of free radicals. *J Biol Sci* ; 4: 266-70.

SANTOS, E.C. – (1854) – Monografia do Geissospermum Velossi (pau-pereira). *Rev. Pharmaceutica*, v. 4, p.17-21.

SANTOS, A.M.; DANTAS, I.C., (2008)- Possíveis efeitos tóxicos das plantas que constituem a bebida “PAU-DO-ÍNDIO”. *Biofar*, n.2, vol.2.

SILVA, S.L.C.; GUALBERTO, S.A.; MACEDO, G.E.L.; SILVEIRA, T.C.; SILVA, D.C. – (2012) – Plantas medicinais usadas pela comunidade do povoado de

Laços (Tanhaçu/BAHIA) e encontradas na floresta nacional contendas do Sincora. Ver. Caatinga, v.25, n.3, p. 130-136.

SILVA, N.C.B.; REGIS, A.C.D.; ESQUIEBEL, M.A.; SANTOS, J.E.S.; ALMEIDA, M.Z. (2012) – Uso de plantas medicinais na comunidade Quilombola da Barra II – Bahia, Brasil. Bol. Latinoam Caribe Plant Med. Aromat. 11(5): 435-453.

SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O.D.L. (2005) Constituintes micromoleculares de plantas do nordeste com potencial farmacológico: com dados de RMN 13C. Fortaleza: Expressão Gráfica e Editora, 216p.

SOUZA, D.E.; PEREIRA, M.O.; BERNARDO, L.C.; CARMO, F.S.; FONSECA, A.S.; BERNARDO-FILHO, M. (2011) - An experimental model to study the effects of a senna extract on the blood constituent labeling and biodistribution of a radiopharmaceutical in rats. CLINICS 66(3):483-486.

SOUZA, O.V.; OLIVEIRA, M.S.; CUNHA, R.O.; COSTA, B.L.S.; ZANCANELLA, C.R.; LEITE, M.N. (2003) - Avaliação da qualidade de matérias-primas de ruibarbo utilizadas em formulações farmacêuticas. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.13, supl., p.30-34.

SOUZA, L. G. P. R. – (2011) – Estudos Etnobotânicos e Prospecção fitoquímica de Plantas medicinais do Horto, Juazeiro do Norte – Ceará. Dissertação de Mestrado.

SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. – (2006) – Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. Acta bot. bras. 20(1). 135-142 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. - (2009) Fisiologia vegetal. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 819p.

VARGAS, A.C.; ALMEIDA, J.R.G.S.; KREWER, C.C.; PEIXOTO, R.M.; SÁ, M.C.A. – (2011)- Antimicrobial activity of caatinga biome ethanolic plant

extract against gram negative and positive bacteria. R. Bras. Ci. Vet., v.18, n. 2/3, p. 62-66.

ZARONI, M.; PONTAROLO, R.; ABRAHÃO, W.S.M.; FÁVERO, M.L.D.; CORREA JÚNIOR, C.; STREMEL, D.P. (2004) - Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no estado do Paraná. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.14, n.1, p. 29-39.

Phytochemistry and antibacterial activity of chloroform extract of *Amburana cearensis*
AC Smith

Sá M.B.^a, Ralph, M.T.^a, Nascimento, D.C.O.^a, Ramos, C.S.^b, Silva, I.M.S.^c,

Lima-Filho, J.V.^{a *}

^a Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, Brasil;

^b Departamento de Ciências Moleculares, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, Brasil;

^c Departamento de Biofísica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil;

* Corresponding author: José Vitor Lima-Filho, Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, R.

Dom Manoel de Medeiros s / n, Campus Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, CEP 52171-900, Brasil. E-mail: jvitor@db.ufrpe.br - Tel: + 55 31 81 3320.6312

ABSTRACT

Preparations made from *Amburana cearensis* (popular name: cumaru) are widely used in folk medicine to treat respiratory infections. In the present study, the chloroform extract of the stem bark of *Amburana cearensis* was chemically characterized and tested for antibacterial activity. The extract was analyzed by gas chromatography and mass spectrometry. The main compounds identified were 4-methoxy-3-methylphenol (76.7%), triclene (3.9%), α -pinene (1.0%), β -pinene (2.2%) and 4-hydroxy benzoic acid (3.1%). Preliminary antibacterial tests through the agar-well diffusion assay revealed that the extract was inhibitory against *P. aeruginosa* and *B. cereus*. The MIC was evaluated in 96-well microplates at concentrations ranging from 6.7 to 6,900 $\mu\text{g/mL}$. The results showed that *A. cearensis* chloroform extract was not inhibitory or bactericidal until the maximum concentration of 6,900 $\mu\text{g/mL}$. An analogue of the major compound 4-methoxy-3-methylphenol identified in plant extracts was purchased commercially and also investigated. In this case, the analogue produced MICs ranging from 215 to 431 $\mu\text{g/mL}$, and was bactericidal (431 $\mu\text{g/mL}$) against four strains of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. We conclude that *A. cearensis* is a good source of methoxy-methylphenol analogues, which could be screened for antibacterial activity against multiresistant bacteria from different species.

Keywords: benzenoids; *Klebsiella pneumoniae*; multiresistant bacteria.

Introduction

Preparations made from *Amburana cearensis* AC Smith (Fabaceae) are widely used in folk medicine to treat nervous disorders, headaches, asthma, sinusitis, bronchitis, flu and rheumatic pain (3, 6). The plant is known in Brazil's northeast region as "cumaru", where the bark and seeds are commonly consumed as tea or infusion preparations. The stem bark is rich in coumarin (1,2-benzopyrone), whose pharmacological properties include anti-inflammatory, antinociceptive and bronchodilator effects (9, 10, 11, 12).

Recently, four additional compounds, p-hydroxybenzoic acid, aiapin and two stereoisomers of o-coumaric acid glycoside, were also identified, showing the plant's repertory of potential bioactive substances (5). The stem bark of *A. cearensis* is also reported to contain antibacterial compounds active against *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., , *Enterobacter aerogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Shigella flexneri* (12, 24). However, most studies have investigated plant's ethanol extracts.

Hospital acquired-infections caused by gram-negative and facultative anaerobic *Klebsiella pneumoniae* (Enterobacteriaceae) have increased in recent years (8, 28). The

risk in intensive care units is higher for carbapenemase-producing strains, which are capable of hydrolyzing carbapenems, penicillins, cephalosporins and aztreonam (29). In the present study, a chloroform extract of the stem bark of *A. cearensis* was analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry, and its antibacterial activity was investigated against clinical isolates of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*.

Material and Methods

Collection and botanical identification

The stem bark of *A. cearensis* were collected in the city of Salgueiro, Pernambuco (Latitude 08°04'27" South and longitude 39°07'09" West). The plant identification was made by comparing the aerial parts with exsiccate samples (no. 46090) deposited in the collection of Vaconcelos Sobrinho Herbarium, Department of Biology, Federal Rural University of Pernambuco, under the care of Dr. Suzene Izidio da Silva.

Plant extract

Fresh plant material was collected and dried in oven at a temperature range of 45 °C to 50 °C for 48 h. The dried material was ground in a blade mill to obtain a fine homogeneous powder. This material was weighed and extracted by maceration using chloroform (P.A.) as solvent extractor in the ratio of 1:3 (w: v). The resulting mixture remained for 48 hours under agitation every two hours, and then was filtered. The extracts were concentrated in a rotary evaporator under reduced pressure at a temperature of 45 °C for complete solvent removal. Stock solutions were prepared with extracts using dimethyl sulfoxide (DMSO) as solvent (1000 mg/ mL), which were kept in a refrigerator at -20 °C until use (21).

Analysis by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GS/ MS)

The plant extract was analyzed by GS/MS using a Varian 431-GC chromatograph coupled to a Varian 220-MS mass spectrometer, equipped with a J & W Scientific DB5 fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 mm). The temperature of the injector and detector was set at 260 °C with the furnace temperature programmed in a range of 60-240 °C at 3 °C/ min. The mass spectra were obtained with a 70 eV electron impact, 0.84 scan /sec m/z 40-550. The carrier gas used was helium at a flow rate of 1 mL/min. A solution of the chloroform extract (2 mg/mL) was prepared and 1.0 µL was injected. The identification of the constituents and *A. cearensis* was performed by direct comparison of the spectra with spectra stored in libraries and the NIST21, NIST107 equipment as well, with the spectra and retention times of authentic compounds for comparison.

Micro-organism and growth conditions

Escherichia coli, *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* belong to the collection of the Laboratory of Microbiology and Immunology of Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE). Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains were obtained from human clinical cases and kindly provided by Dr. Marcia Moraes (University of Pernambuco). The bacteria were kept in the refrigerator at 8 °C until use.

Agar-well diffusion assay

Preliminary antimicrobial assays with extracts were carried out by the agar-well diffusion method (23). The bacterial species were cultured in the dishes (10^8 cells/ mL - 0.5 of the MacFarland standard) and the wells were topped up with 20 µL of extracts at

concentrations of 12.5, 25, 50 and 100 mg/mL (w/v) in DMSO. The results were expressed as mean $\pm$ SD of the growth inhibition zone in millimeters. Differences between inhibition zones (mean $\pm$ SD) produced by distinct dosages of the extract were compared by the Student t-test or ANOVA with $P < 0.05$. All assays were performed in duplicate.

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC)

The MIC of the plant extract was determined by the microdilution method in 96-well plates at concentrations ranging from 6.7 to 6,900 μ g/mL (25). In addition, the analogue 2-methoxy-4-methylphenol of the compound identified in plant extracts (4-methoxy-3-methylphenol) was purchased commercially (Sigma) and also investigated. The density of the bacterial suspension was adjusted to approximately 10^5 CFU/ml, and the results were read after an incubation period of 24 hours at 37 °C. The MIC was the lowest concentration causing inhibition of visible growth. In this case, aliquots of 0.1 mL were transferred to plates containing Mueller-Hinton agar. The minimum bactericidal concentration (MBC) was considered the lowest concentration that resulted in no growth after incubation for 24 h at 37 °C. All assays were performed in duplicate.

Results and Discussion

Plants are excellent sources of biologically active phytochemicals that also have biodegradable properties (11). The GC/MS data showed a major peak at the retention time of 7.8 min with relative concentration of 76.7% (Figure 1). The interpretation of the mass spectra in comparison with spectra reported in the literature led to identification of the benzenoid 4-methoxy-3-methylphenol. Other compounds included triclene (3.9%), α -pinene (1.0%), β -pinene (2.2%) and 4-hydroxy benzoic acid (3.1%). The complete list of compounds identified in the plant extracts is reported in Table 1.

Although several compounds have been identified in the bark of *A. cearensis*, such as trans -3,4-methyl dimetoxicinamate; cis -3,4-dimethoxy-methyl cinnamate; 3-methoxy-4-hydroxy-methyl cinnamate; 4-hydroxy methyl benzoate; 3,4 - dihydroxy methyl benzoate; 3-hydroxy-4-methoxy methyl benzoate; catechol; guaiacol; a-ethoxy-p-cresol; benzenemetanol 4-hydroxy; 4-methoxy-methylphenol; 2,3-dihydrobenzofuran; and anthraquinone (chrysophanol), the predominance of coumarins is often reported (18). In contrast, the compound 4-methoxy-3-methylphenol was prevalent in the chloroform extract of *A. cearensis*.

The chemical composition of plant extracts varies in different geographic regions, under the influence of seasonal and climatic conditions (1). The chemical compounds commonly identified in extracts of *A. cearensis* also change according to the type of solvent used, as shown in Table 2. Even though analogues of 4-methoxy-3-methylphenol have been found in such plant species, we are not aware of studies with isolated compounds tested as antimicrobials.

The agar-well diffusion assay revealed that the chloroform extract of *A. cearensis* was inhibitory against *P. aeruginosa* and *B. cereus* (Table 3). *P. aeruginosa* is responsible for different etiological processes in immunocompetent and immunocompromised patients in hospitals whereas *B. cereus* is an opportunistic pathogen (19, 26). However, the plant extract was not inhibitory or bactericidal at the maximum concentration of 6,900 µg/ mL. On the other hand, the analogue 2-methoxy-4-methylphenol showed broad spectrum activity against all bacteria tested (Table 4). The minimum inhibitory concentration ranged from 215 to 431 µg/mL, and the compound was bactericidal (431 µg/mL) against four strains of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*.

Carbapenems imipenem, meropenem and ertapenem are often used against multiresistant pathogens as last therapeutic choices (22). However, the widespread use of these drugs has caused the development of resistant bacteria among those from indigenous microbiota, which reinforces the urgency for discovery of new drugs. Thus, we have shown that *A. cearensis* is a good source of methoxy-methylphenol analogues, which could be screened for antibacterial activity against multiresistant bacteria from different species. Experiments to determine novel antimicrobial compounds in such plant species are being conducted.

REFERENCES

- 1 - Auricchio, M.T.; Bacchi, E.M. Folhas de *Eugenia uniflora* (pitanga): Propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. (2003) *Ver Inst Adolfo Lutz*, 62: 55-61.
- 2 - Bandeira, P.N.; Farias, S.S.; Lemos, T.L.G.; Filho, R.B.; Santos, H.S.; Albuquerque, M.R.J.R.; Costa, S.M.O. (2011). New derivatives of isoflavone and other flavonoids from the resin *Amburana cearensis*. *J Braz Chem Soc* Vol. 22, n.2. São Paulo.
- 3 - Bieski, I.G.C.; Santos, F.B.; Oliveira, R.M.; Espinosa, M.M.; Macedo, M.; Albuquerque, U.P.; Martins, D.T.O. (2012) Plants of the Pantanal Region (Mato Grosso, Brazil). Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. *Ethnopharmac med*, 2012: 36.
- 4 - Canuto, K.M.; Silveira, E.R. (2010) Estudo fitoquímico de espécimes cultivadas de cumaru (*Amburana cearensis* A.C. SMITH). *Quim Nova*, 33: 662-666.
- 5 - Canuto, K.M.; Silveira, E.R.; Bezerra, A.M.E.; Leal, L.K.A.M.; Viana, G.S.B. (2008) Uso de plantas jovens de *Amburana cearensis* A.C. Smith: Alternativas para Preservação e exploração Econômica e Exploração Econômica da Espécie. Embrapa; Embrapa semi-árido. P. 24.
- 6 - Conceição, G.M.; Ruggieri, A.C.; Araújo, M.F.V.; Conceição, T.T.M.M.; Conceição, M.A.M.M. (2011) Plantas medicinais do Cerrado: Comercialização, uso e indicação terapêutica fornecida pelos raizeiros e vendedores, Teresina, Piauí. *Sc Plena*. 7: 12.

- 7 - Gonçalves, A.L. (2007) Estudo da atividade antimicrobiana de algumas árvores medicinais nativas com potencial de conservação/recuperação de florestas tropicais, 209p. (Tese de Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Paulista).
- 8 - Hamouda, T. B.; Foulon, T.; Masmoudi, A. B. C.; Fendri, C.; Belhadj, O.; Mahrez, K. B. (2003) Molecular epidemiology of an outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a Tunisian neonatal ward. *J Med Microbiol.*, 52: 427-433.
- 9 - Hoult, J.R.S.; Paya, M. (1996) Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential. *Gen Pharmac Vasc Syst*, 27(4): 713-722.
- 10 - Leal, L.K.A.M.; Matos, M.E.; Matos, F.J.A.; Ribeiro, R.A.; Ferreira, F.V.; Viana, G.S.B. (1997) Antinociceptive and antiedematogenic effects of the hydroalcoholic extract and coumarin from *Torresea cearensis* Fr. All. *Phytomedicine*, 4: 221-227.
- 11 - Leal, L.K.A.M.; Ferreira, A.A.G.; Bezerra, G.A.; Matos, F.J.A.; Viana, G.S.B. (2000) Antinociceptive, antiinflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. *J Ethnopharmac*, 70: 151-159.
- 12 - Leal, L.K.A.M.; Oliveira, F.G.; Fontenele, J.B.; Ferreira, M.A.D.; Viana, G.S.B. (2003) Toxicological study of the hydroalcoholic extract from *Amburana cearensis* in rats. *Pharmac Biol*, 41: 308-314.

13 - Leal, L.K.A.M. (2006) Contribuição para a validação do uso medicinal de *Amburana cearensiis* (cumaru): estudos farmacológicos com o isocampferídio e o amburosídio 179 p. (Tese Doutorado em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará).

14 - Leal, L.K.; Pierdoná, T.M.; J.G.S.; Fonseca, K.S.; Canuto, K.M.; Silveira, E.R.; Bezerra, A.M.E.; Viana, G.S.B.A. (2011) Compative chemical and pharmacology study of Standardized extract and vanillic *Amburana cearensis*. *Phytomedicine*. 18: 230-233.

15 - Leão, M.M. (2006) Influência do tratamento na composição química da madeira de amburana (*Amburana cearensis*), bálsamo (*Myroxylon balsamum*) e Carvalho (*Quercus sp.*) e o impacto no aroma de uma solução modelo de cachaça. (Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo- Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz).

16 - Lopes, A.A. (2010) A valiação da atividade antiinflamatória e antioxidantes das cápsulas do estrato seco padronizado e da Afrormosina isoflavonóide, obtidos de *Amburana cearensis* AC SMITH. (Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará).

17 - Marinho, M.G.V.; Brito, A.G.; Carvalho, K.A.; Santos, C.R.B.; Andrade, J.M.B.; Piuvezam, M.R. (2004) *Amburana cearensis* e cumarina imunomodulam os níveis de anticorpos antígenos-específicos em camundongos BALB/c sensibilizados com Ovalbumina. *Acta. Farm. Bonarense* 2391: 47-52.

18 - Negri, G.; Oliveira, A.F.M.; Salatino, M.L.F.; Salatino, A. (2004) Chemistry of the stem bark of *Amburana cearensis* (Allemão) (A.C.S.M.). *Rev Bras Plant Med*, 6:1-4.

19 – Onguru, P., Erbay, A., Bodur, H., Baran, G., Akinci, E., Balaban, N., Cevik, M.A.(2008) Imipenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Risk Factors for Nosocomial Infections. *J Korean Med Sci*. 23: 982–987.

20 - Poh, C. L.; Yap, S. C.; Yeo, M. (1993) Pulsed-field gel electrophoresis for differentiation of hospital isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *J Hosp Infect.*, 24, 123-128.

21 - Ramos, C.S. Ecologia química de insetos e espécies de Piperaceae. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo 2006. p.274. Tese de Doutorado em Química.

22 - Rodloff A. C., Goldstein E. J. C. E, Torres A. (2006) Two decades of imipenem therapy *J. Antim Chem*, 58, 916–929.

23 - Silva, A.B.; Silva, T.; Franco, E.S.; Rabelo, S.A.; Lima, E.R.; Mota, R.A.; Câmara, C.A.G.; Pontes-Filho, N.T.; Lima-Filho, J.V. (2010) Atividade antibacteriana, composição química, e citotoxicidade do óleo essencial das folhas da árvore de pimenta do Brasil (*Schinus terebinthifolius*, Raddi). *Braz J Microbiol*, 41: 158-163.

24 - Souza, L.G.P.R. (2011) Estudos Etnobotânicos e Prospecção fitoquímica de Plantas medicinais do Horto, Juazeiro do Norte – Ceará, p.87, Paraíba (Dissertação de Mestrado, Univ. Federal de Campina Grande).

25 - Suffredini, I.B.; Sader, H.S.; Gonçalves, A.G.; Reis, A.O.; Gales, A.C.; Varella, A.D.; Younes, R.N. (2004) Screening of antibacterial active extracts obtained from plants native to Brazilian Amazon rain forest and Atlantic forest. *Braz J Med Biol Res*, 37: 379-384.

26 - Turnbull, P.C.; Jørgensen, K.; Kramer, J.M.; Gilbert, R.J.; Parry, J.M. (1979) Severe clinical conditions associated with *Bacillus cereus* and the apparent involvement of exotoxins. *J Clin Pathol*. 32: 289–293.

27 - Vargas, A.C.; Almeida, J.R.G.S.; Krewer, C.C.; Peixoto, R.M.; Sá, M.C.A. (2011) Antimicrobial activity of caatinga biome ethanolic plant extract against gram negative and positive bacteria. *Rev Bras Cir Vet*, 18: n2/3, 62-66.

28 - Walther-Rasmussen, J.E.; Hoiby, N. (2006) OXA-type carbapenemases. *J Antim Chem.*, 57: 373–383.

29 - Zhang, R.; Yang, L.; Cai, J. C.; Zhou, H. W.; Chen, G. X. (2008) High-level carbapenem resistance in a *Citrobacter freundii* clinical isolates is due to a combination of KPC-2 producing and decreased porin expression. *J Med Microbiol.*, 57: 332-337.

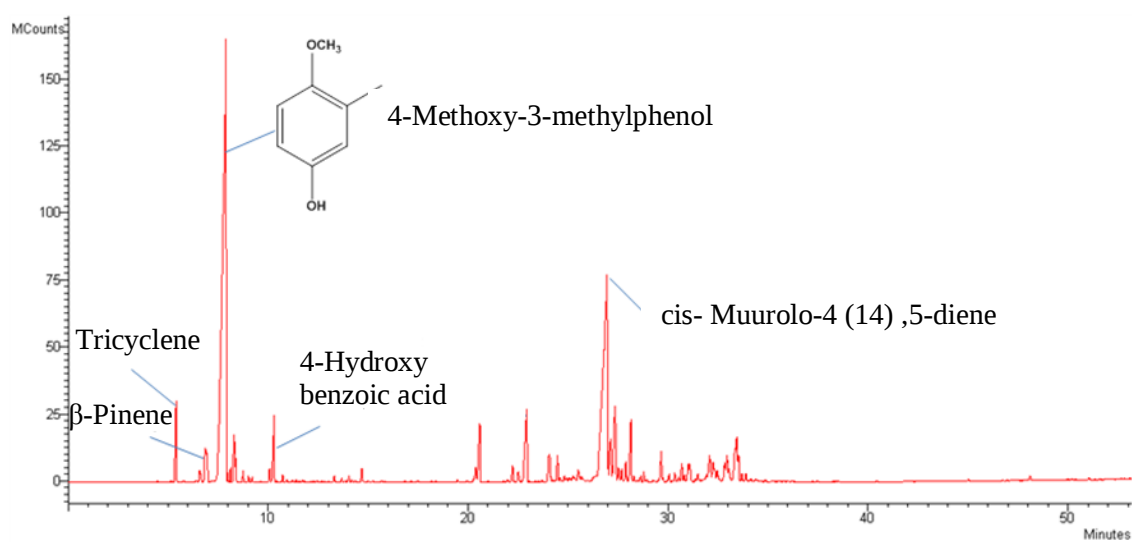


Figure 1. Chromatogram of chloroform extract of the stem bark of *A. cearensis*.

Table 1. Chemical compounds present in chloroform extract of *A. cearensis*.

Compounds	Retention time (min)	Relative%
Tricyclene	5.4	3.9
α -Pinene	6.6	1.0
β -Pinene	6.8	2.2
6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimethyl	6.9	2.3
4-Methoxy-3-methylphenol	7.8	76.7
Cyclohexane 3-methyl-6-(1-methylethylidene)	7.9	0.3
1,3,8 p-Mentatrieno	8.1	0.5
2-Methyl-cis-3a, 4,7,7 a-tetraidroindane	8.3	2.6
4-Hydroxy benzoic acid	10.3	3.1
Longifolene	23.0	1.7
cis- Muurolo-4 (14) ,5-diene	26.9	3.2
Total		97.5

Table 2. Phytochemicals reported in extracts of *A. cearensis*.

Part Used	Solvent	Secondary Metabolites	Antibacterial activity	Reference
Resin	Methanol and chloroform	Chalcone 2', 4,4' - trihydroxy (isoliquiritigenin) (1); 2', 4', dihydroxy - 3', 4' – methoxy (2), 7,8,3', 4' – tetramethoxy isoflavone	Not reported	(2)
Aerial parts and Xylopodium	Ethanol	Protocatechuic acid, vanillic acid, coumarin, amburoside	Not reported	(4)
Stem Bark	Ethanol	Not reported	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(7)
Seeds	Butanol and hydroethanol	Flavonoids, proanthocyanidins, anthocyanins, carotenoids	Not reported	(9)
Stem Bark	Ethanol	Coumarin and phenolic compounds (isokaempferide and amburoside)	Not reported	(14)
Wood Powder	Hydroethanol	1 - Dodecanol; 2-ethyl-hexane acid; Dihydrocoumarin;	Not reported	(15)

		Coumarin (1.2 benzopyrone)		
Stem Bark	Ethanol	Isoflavonoid (afromorsin)	Not reported	(16)
Stem Bark	Hexane and chloroform	Coumarin (1.2 - benzopyrone)	Not reported	(17)
Stem bark and leaves	Ethanol	Anthocyanins, anthocyanidins, flavones, chalcones, aurones, leucoanthocyanidins.	Not reported	(18)
Stem bark	Ethanol	Not reported	Cocci strains, enterobacteria, nor-fermentig bacteria	(24)

Table 3. Antibacterial activity of chloroform extract of the stem bark of *A. cearensis*.

Bacteria	100	50	25	12.5	CIM ^a	CBM
	(mg/ mL)				(µg/mL)	
	Growth inhibition zones in millimetres					
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	NT ^b	NT
<i>Salmonella</i> Sor. Typhimurium	-	-	-	-	NT	NT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9,5 ± 0,5	7,5 ± 0,5	-	-	> 6900	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	NT	NT
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-	NT	NT
<i>Bacillus cereus</i>	8,0 ± 0,0	7,5 ± 0,5	7,0 ± 0,0	6,5 ± 0,5	> 6900	-

^a Minimum inhibitory concentration (CIM) and minimum bactericidal concentration (CBM);

^b NT - Not tested.

Table 4. Minimum inhibitory concentration (CIM) and minimum bactericidal concentration (CBM) of the analogue 2-methoxy-4-methylphenol.

Bacteria	2-methoxy-4-methylphenol		Ciprofloxacin	
	CIM	CBM (µg/ mL)	CIM	CBM
<i>Salmonella enterica</i> Thyphimurium	215	431	< 6,7	< 6,7
<i>Escherichia coli</i>	215	431	< 6,7	< 6,7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	431	> 6900	< 6,7	< 6,7
<i>Bacillus cereus</i>	431	3450	< 6,7	107
<i>Listeria monocytogenes</i>	215	862	< 6,7	< 6,7
<i>Staphylococcus aureus</i>	215	862	< 6,7	< 6,7
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC(+) 201	215	431	< 6,7	< 6,7

<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC(+) 199	215	431	< 6,7	< 6,7
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC (+)	215	431	< 6,7	215
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC (+)278	215	431	< 6,7	431

Influence of chloroform extract of *Amburana cearensis* on the biodistribution of sodium pertechnetate in mice

Mirivaldo Barros de Sá^b, Danielle Cristina de Oliveira Nascimento^b, Maria Taciana Ralph^b, Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho^a, José Vitor Lima-Filho^b, *Isvânia Maria Serafim da Silva^a

^aDepartamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brazil;

^bDepartamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, Brazil;

*Corresponding author: Laboratório de Biofísica Celular e Molecular, Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de

Pernambuco, R. Prof. Moraes Rêgo, 1235, Recife, Pernambuco, CEP 50670-920, Brazil.

E-mail: isvania@gmail.com - Tel: + 55 31 81 21268535 - Fax: + 55 31 81 21268560.

Amburana cearensis on the biodistribution

Keywords: *Amburana cearenses*, Biodistribution, 2-methoxy-4-methylphenol.

ABSTRACT

Purpose: To evaluate the biodistribution in mice treated with the extract of *A. cearenses*, and with the 2-methoxy-4-methylphenol, an analogue of the major compound identified in the plant extract.

Materials and methods: We conducted the acute toxicity test of the extract of *A. cearensis* at concentrations up to 1000 mg/kg. For biodistribution, four groups were created: group A (control, 0.9% saline), group B (dimethyl sulfoxide, solvent extract), group C (400 mg/kg of chloroform extract of *A. cearenses*) and group D (10 mg/kg of 2-methoxy-4-methylphenol). All groups were treated for three days and the biodistribution was performed 24 hours after the end of treatment.

Results: The histopathology showed fatty livers in animals treated with 1000 mg/kg. In the biodistribution, the extract did not alter the percentage of radioactivity per gram (%ATI/g) of sodium pertechnetate in the organs, but in the animals treated with 2-methoxy-4-methylphenol, the %ATI/g in the right and left kidneys were respectively, 35.2 ($\pm$ 2.5) and 35.1 ($\pm$ 1.6), while in the control group they were 23.2 ($\pm$ 3.1) and 21.4 ($\pm$ 5.1), with $p < 0.05$.

Conclusions: The extract of the bark of *A. cearenses* demonstrated liver toxicity at 1000 mg/kg. 2-methoxy-4-methylphenol significantly increased kidney uptake.

INTRODUCTION

Amburana cearensis is found in several regions of South America, and in the state of Ceará, Brazil, *Amburana cearensis* A. C. Smith (Fabaceae) is popularly known as “cumarú”, “amburana” or “amburana-de-cheiro”. Preparations from its trunk bark and seeds are traditionally used for their antispasmodic, anti-inflammatory and antitussive effects, and especially for the treatment of asthma (Lorenzi and Matos, 2008)

Several compounds have been isolated from the trunk bark of *A. cearensis*. Coumarin (1,2 - benzopyrone) is one of the major compounds of *A. cearensis*. It has many pharmacological properties described in the literature, including antioxidant activity (Leal, 2011; Rêgo Júnior et al., 2011).

The antioxidant characteristic of *A. cearensis* indicates that it may be a radiomodifier, altering the metabolism and uptake of radiopharmaceuticals during biodistribution, which can lead to diagnostic errors in nuclear medicine.

Nuclear medicine is a medical specialty for diagnostic and therapeutic purposes that uses radiolabeled target-specific drugs, which are administered in vivo and are distributed to certain organs (Bernardo-Filho et al., 2005). The radioisotope most widely used for the preparation of radiopharmaceuticals is ^{99}Tc (technetium-99m). It was the first artificially produced element, obtained from the radioactive decay of ^{99}Mo (molybdenum-99) (Saha, 2005).

For diagnosis in nuclear medicine, a radiopharmaceutical is administered and distributed to the patient's organs and tissues. However, some factors can alter the biodistribution pattern, including the use of natural medicines alone or together with synthetic treatments involving radiation (Bernardo-Filho, 2005). Such compounds can change the connections of the radiopharmaceutical to its receptors, an interaction that

can lead to hypo-or hyperabsorption in a particular organ, causing inaccurate diagnosis or mistaken results, thus requiring the patient to repeat the tests, resulting in an unnecessary additional radiation dose (Holanda et al., 2006).

The present study aimed to evaluate the ability of the extract of *Amburana cearensis* and 2-methoxy-4-methylphenol, an analogue of the major compound identified in the plant extract (4-methoxy-2-methylphenol), to alter the uptake of technetium-99m in biodistribution tests with mice.

MATERIAL AND METHODS

Experimental animals

Swiss albino mice of both sexes (35-45g), obtained from the vivarium of the Keizo Asami Immunopathology Laboratory (LIKA) of Pernambuco Federal University (UFPE), received food and water ad libitum, and were kept at room temperature (22 °C), with a photoperiod of 12h light and 12h dark. The trials were approved by the ethics committee of the Center for Biological Sciences of Pernambuco Federal University (Protocol 437/2012), which adheres strictly to Brazilian law and the international rules established by the National Institute of Health Care Guide for and Use of Laboratory Animals related to animal experimentation.

Botanical material

The stem bark of *A. cearensis* was collected in the municipality of Salgueiro, Pernambuco, located in the states central region (latitude 08°04'27" South and longitude 39° 07'09" West), at an altitude of 420 meters, where the surrounding vegetation consists of mainly of shrubs (*caatinga*). The plant identification was carried out by Dr.

Suzene Izídio da Silva (Biology Department, Pernambuco Federal Rural University - UFRPE), by comparison with a voucher specimen of this species (no. 46090) deposited in the collection of that university's Vaconcelos Sobrinho Herbarium.

Plant extract

Extracts of the stem bark of *A. cearensis* were obtained in the Echochemistry and Organic Synthesis Laboratory of the Molecular Sciences Department of UFRPE, under the supervision of Dr. Clécio Souza Ramos, according to a previously established protocol (Ramos, 2006). Fresh plant material was collected and dried in an oven at a temperature range of 45 °C to 50 °C for 48 h. The dried material was ground in a blade mill to obtain a fine homogeneous powder. This material was weighed and extracted by maceration using chloroform (P.A.) as solvent extractor in the ratio of 1:3 (w:v). The resulting mixture remained for 48 hours under agitation every two hours, and then was filtered. The extracts were concentrated in a rotary evaporator under reduced pressure at a temperature of 45 °C for complete solvent removal. Stock solutions were prepared with extracts using dimethyl sulfoxide (DMSO) as solvent (1000 mg/ mL), which were kept in a refrigerator at -20 °C until use (Ramos, 2006).

4-methoxy-2-methylphenol

The phytochemical analysis of the chloroform extract of *A. cearensis* was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GS/MS) using a Varian 431-GC chromatograph coupled to a Varian 220-MS mass spectrometer, equipped with a J & W Scientific DB5 fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 mm). The analogue of the major compound identified in plant extract (4-methoxy-

2-methylphenol) was obtained commercially (Sigma) and used in experiments to assess the biodistribution of sodium pertechnetate.

Acute toxicity test

The toxicity of the chloroform extract of *A. cearensis* was evaluated in male Swiss mice of approximately 35 g. An aliquot of the extract dissolved in DMSO was diluted in 3% Tween 80 (v/v in saline phosphate) to produce concentrations of 100, 225, 300, 375, 500 and 1000 mg/Kg. Then, 0.2 mL was administered intraperitoneally to the mice (n = 6/group/dose). The control group (n=6) received only 3% DMSO + Tween. At the end of the experiments, the animals were euthanized with isoflurane (Halocarbon Laboratories, USA) and subjected to histopathological examination.

Histopathology

To obtain material for histological study, thoraco-laparotomy was performed and perfusion via the left cardiac ventricle with 0.9% saturated sodium chloride, and once with 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4). After perfusion, small fragments (1cm x 1cm x 1cm) of the liver, spleen and kidneys were immersed in the same fixative overnight at 4 °C. After this period, the samples were processed routinely for inclusion in Paraplast (Paraplast Plus, Sigma-Aldrich). The sections (5µm thick) were produced with a Spencer microtome and stained with hematoxylin and eosin in the Quantitative Cytology and Histology Laboratory of the Department of Pharmaceutical Sciences, under the supervision of Dr. Diogenes Luiz da Mota). A trinocular light microscope (Olympus BX-41®) fitted with a Sony camera connected to a computer was used for analysis and documentation.

Assay of biodistribution of sodium pertechnetate

The animals were divided into four groups (n = 6) and treated orally (gavage) for three consecutive days: group A (control, 0.9% saline), group B (dimethyl sulfoxide, solvent extract), group C (400 mg/kg of chloroform extract of *A. cearensis*) and group D (10 mg/kg of 2-methoxy-4-methylphenol). The sodium pertechnetate ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) was obtained from the generator $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ from Hospital das Clínicas de Pernambuco, produced in the radiopharmacy center of the Institute for Energy and Nuclear Research (IPEN/CNEN) of São Paulo, Brazil. Twenty-four hours after the end of treatment, the radioisotope was given (0.37 MBq or 10 μCi) in a volume of 50 μL intravenously through the tail vein. After 30 minutes, the animals were euthanized with inhaled isoflurane and blood was collected by cardiac puncture. The lungs, liver and kidneys were washed with 0.9% saline and weighed on a precision balance. The quantitative determination of radiation was performed with a Canberra Packard Cobra II gamma counter at the Endocrinology and Metabolism Laboratory of the Department of Physiology and Pharmacology of UFPE, to obtain the counts per minute (cpm) of radioactivity. The radioactivity present in each organ was converted to percentage of radioactivity per gram (%ATI/g) in the organs.

Statistical analysis

The values presented are the mean $\pm$ standard deviation of the samples studied and p was calculated by the Kruskal-Wallis test, with $p < 0.05\%$ accepted as statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

The biodistribution of radiopharmaceuticals in diagnostic procedures can be identified by single-photon emission computed tomography (SPECT) or positron emission tomography (PET). Thus, according to the degree of uptake of the compounds, it is possible to evaluate abnormalities in organ structure and identify the regression or progression of certain pathologies (Oliveira et al., 2006; Lee et al., 2010). Extracts of *A. cearensis* are widely marketed as herbal medicines for the treatment of respiratory diseases, especially in northeastern Brazil (Leal et al., 2009). This study was performed due to the lack of data in the literature on the influence of these extracts on the results of diagnostic imaging examinations that use radiopharmaceuticals.

Initially, toxicity tests with the extract of *A. cearensis* showed no lethality at the doses administered. Also, histological analysis of the liver of control animals revealed no significant changes in both the parenchyma and stroma, which showed lobules with preserved morphology. The hepatocytes exhibited characteristic cytoplasm and nucleus and were displayed in a cordon, interspersed with sinusoidal capillaries (Figure 1A). Regarding the portal spaces, they also presented their normal structural elements - interlobular portal triad with normal pattern (data not shown). The animals in the groups treated with the chloroform extract of *A. cearensis* showed significant changes in the liver parenchyma at the dose of 1000mg/kg. There were no areas with steatosis and vascular congestion in the center-lobular and interlobular veins (Figure 1B). The kidneys and spleen of both the control and experimental animals at the concentrations tested showed histological structures in accordance with the normal patterns (Figures 1C and 1D).

Diniz et al. (1998) found that coumarin, the main bioactive compound extracted from the stem bark of the plant, showed LD₅₀ of 300 mg/kg (ip) in mice. In turn, Leal et al. (2003) reported that the alcoholic extract at a dose of 500 mg/kg (oral), given 30 to

50 days in Wistar rats, showed no teratogenic effect, and further indicated that the LD₅₀ of hydroalcoholic extract given orally was 1790 ± 120.0 mg/kg, showing no significant toxic effect on the sub-chronic and chronic evaluation. In another study, volunteers who consumed cumaru syrup at a daily dose of 20 mL for 30 consecutive days showed no change in clinical and laboratory parameters (Leal, 2006). However, Carvalho (2009) reported that this same syrup increases the blood concentration of aspartate aminotransferase (AST), but not alanine aminotransferase (ALT). Despite the absence of published data on the toxicity of chloroform extracts of *A. cearensis*, it has been concluded that dosages up to 500 mg/kg had no significant risk of toxicity. Thus, the concentration established for testing the biodistribution of sodium pertechnetate in this study was 400 mg/kg.

The results showed that the chloroform extract of *A. cearensis* (group C) did not significantly alter the percentage of radioactivity per gram (%ATI/g) of sodium pertechnetate in the organs studied, compared to the control (group A), although apparently there was a slight but not significant ($p > 0.05$) reduction in right lung, left and right kidneys and blood (Table 1). Administration of 2-methoxy-4-methylphenol (group D) changed the %ATI/g only in the left and right kidneys, with $p < 0.0105$ and $p < 0.0361$, respectively (Table 2). The percentages in the right and left lungs, liver and blood did not change between groups (Table 2).

Due to a slight reduction was not significant ($p > 0.05$) in %ATI/g occurred in organs (right and left lungs, right kidney and blood) of the animals treated with the extract of *A. cearensis* (group C), and the biased non-significant increase ($p > 0.05$) in the organs (right and left kidneys, and blood) of those treated with 2-methoxy-4-methylphenol (group D) compared to control (group A), we observed that 2-methoxy-4-methylphenol (group D) significantly increased the % ATI/g in the right kidney (p

<0.0047), left kidney ($p < 0.0235$) and blood ($p < 0.0469$) compared with treated with the extract of *A. cearensis* (group C). There was no significant change ($p > 0.05$) between the two groups for the right and left lungs and liver (Table 3). Also, the diluent (DMSO) did not affect the biodistribution of the extract of *A. cearensis* or 2-methoxy-4-methylphenol, since the results were equivalent to those observed in the control (group A) for all organs ($p > 0.05$) (Table 4).

Some studies have shown that extracts of medicinal plants and their secondary metabolites can interfere with the biodistribution of sodium pertechnetate (Diniz et al., 2008; Moreno et al., 2008; Rebello et al., 2008; Souza et al., 2011; Santos-Filho et al., 2012). For example, the hydroalcoholic extract of *Artemisia vulgaris*, used in folk medicine for the treatment of dyspepsia, asthenia, menstrual disorders and epilepsy, increases the radioisotope uptake in the kidneys and liver (Silva et al., 2008). The aqueous extract of *Aloe vera*, used as a healing agent in the treatment of gastrointestinal and urinary tract infections, caused a significant increase in the uptake in the blood and kidneys (Holland et al., 2009). The aqueous extract of *Coriandrum sativum* (coriander) also resulted in significant change in uptake in plasma and erythrocytes (Frederick et al., 2012). However, studies with *A. cearensis* to evaluate biodistribution have not been previously described in the literature.

The use of medicinal plants has increased worldwide, generating the possibility of complications to human and animal health (González-Stuart, 2011). These side effects should be evaluated particularly in popular natural products with claimed indications for various illnesses. *In vivo* tests need to be conducted with experimental models both with these products and with single compounds contained in them (Sulaiman et al., 2008). This will also produce better knowledge of the physical parameters of the extract in question, such as absorption spectra, electrical conductivity

(Carmo et al., 2011) and pH (Ameh et al., 2010). Recently, we demonstrated the antimicrobial potential of 2-methoxy-4-methylphenol against strains of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (data accepted for publication in the Brazilian Journal of Microbiology). However, the results of this study show that although the extract of *A. cearensis* has no effect on the biodistribution of the radioisotope sodium pertechnetate, the compound 2-methoxy-4-methylphenol, the main analogue compound identified in the plant extract, can interact with tissue/organ structures and influence the outcome of diagnostic nuclear medicine.

REFERENCES

AGRA, M.F.; FRANÇA, P.F.; CÂMARA, C.A.; SILVA, T.M.S.; ALMEIDA, R.N.; AMARAL, F.M.M.; ALMEIDA, M.Z.; MEDEIROS, I.A.; MORAES, M.O.; BARBOSA-FILHO, J.M.; NURIT, K.; OLIVEIRA, F.S.; FREIRE, K.R.L.; MORAIS, L.C.S.L.; RÊGO, T.J.A S.; BARROS, R.F.M. Medicinais e produtoras de princípios ativos. In: SAMPAIO, E.V.S.B. (ed.). 2005. Espécies da flora nordestina de importância econômica potencial. Recife: Associação Plantas do Nordeste, p.135-198, 2005.

AMEH, S.J.; TARFA, T.; ABDULKAREEM, T.M.; IBE, M.C.; ONANUGA, C.; OBODOZIE, O.O. Physicochemical analysis of the aqueous extracts of six nigerian medicinal plants. Trop. J. Pharm. Res, v.9, p.119-125, 2010.

BERNARDO-FILHO, M.; SANTOS-FILHO, S.D.; MOURA, E.G.; MAIWORM, A.I.; ORLANDO, M.M.C.; PNAS, M.E.; CARDOSO, V.N.; BERNARDO, L.C.; BRITO, L.C. Drug interaction with radiopharmaceuticals: a review. Braz Arc Biol Technol, v.48,p. 13-27, 2005.

CARMO, F.S.; DINIZ, C.L.; PEREIRA, M.O.; SANTOS-FILHO, S.D.; BERNARDO-FILHO, M. Characterization of physicochemical parameters and the effect on the labeling of blood constituents with technetium-99m of a *Solanum melongena* commercial extract. J. Med. Plants Res, 5 (23): p.5598-5604, 2011.

CARVALHO, E.M. Xarope de Cumaru como terapia complementar na Asma persistente Leve. Departamento de Fisiologia e Farmacologia – Universidade Federal do Ceará (UFC)- Fortaleza. Tese de doutorado, p.180, 2009.

DE, K.; CHANDRA, S.; MISR, M. Assessment of the effect of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. Extract on the labeling of blood elements with technetium-99m and on the morphology of red blood cells. *Braz. J. Pharmacognos.* v.19 (3): p.664-671, 2009.

DINIZ, L.C.; CARMO, F.S.; ALMEIDA, D.S.; SANTOS-FILHO, S.D.; MISSAILIDIS, S.; FONSECA, A.S.; BERNARDO-FILHO, M. Effect of an Extract of *Centella asiatica* on the Biodistribution of Sodium Pertechnetate ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) and on the Fixation of Radioactivity on Blood Constituents. *az. arch. biol. Technol*, v.51, p. 215-219, 2008.

DINIZ, M.F.F.M.; OLIVEIRA, R.A.G.; MEDEIROS, A.C.D.; MALTA-JÚNIOR, A. *Memento Fitoterápico: As plantas como alternativa terapêutica: aspectos populares e científicos*. 1.ed. João Pessoa: Ed. Universitária. p.202, 1998.

FREDERICO, E.H.F.F.; CARMO, F.S.; DINIZ, C.L.; DANTAS, M.P.; AMORIM, L.F.; SANTOS-FILHO, S.D.; BERNARDO-FILHO, M. Influence of an aqueous extract of *Coriandrum sativum* leaves on the labeling of blood constituents with technetium-99m and determination of some of its physical parameters. *J Medicinal Plants Research*, v.44, p.5651-565, 2012.

GONZÁLEZ-STUART, A. Herbal product use by older adults. *Maturitas*, v.68, p. 52-55, 2011.

HOLANDA, C.M.C.X.; LEITE, R.C.H.; NUNES, R.A.S.; OLIVEIRA, H.A.; CATANHO, M.T.J.A.; SOUZA, G.M.L.; BERNARDO-FILHO, M. Effect of antimalarial drugs on the bioavailability of the methylenediphosphonic acid labeled with technetium99m ($^{99\text{m}}\text{Tc-MDP}$) in Wistar rats. *Braz Arch Biol Technol*, v.49, p. 207-14, 2006.

HOLANDA, C.M.C.X.; BARBOSA, V.S.A. Effect of an extract of *Aloe Vera* on the Biodistribution of Sodium Pertechnetate ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) in Rats. *Cir. Braz.*, v.24,p. 383-6, 2009.

IBAMA. Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçada de extinção. Portaria nº.37-N de 3 de abril de 1992. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br>>. Acesso em: dezembro 2012.

LEAL, L.K.; PIERDONÁ, T.M.; J.G.S.; FONSECA, K.S.; CANUTO, K.M.; SILVEIRA, E.R.; BEZERRA, A.M.E.; VIANA, G.S.B. A comparative chemical and pharmacology study of Standardized extract and vanillic *Amburana cearensis*. *Phytomedicine*. V.18, p. 230-233, 2011.

LEAL, L. K.; CANUTO, K. M.; DA SILVA COSTA, K. C.; NOBRE-JÚNIOR, H. V.; VASCONCELOS, S. M.; SILVEIRA, E. R.; FERREIRA, M. V.; FONTENELE, J. B.; ANDRADE, G. M.; DE BARROS VIANA, G. S. Effects of amburoside A and isokaempferide, polyphenols from *Amburana cearensis*, on rodent inflammatory processes and myeloperoxidase activity in human neutrophils. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, Copenhagen, v. 104, n. 3, p. 198-205, 2009.

LEAL, L.K.A.M.; FERREIRA, A.A.G.; BEZERRA, G.A.; MATOS, F.J.A.; VIANA, G.S.B. - Antinociceptive, antiinflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. *J Ethnopharmac*, v.70, p.151-159, 2000.

LEAL, L.K.A.M., OLIVEIRA, F.G., FONTENELE, J.B., FERREIRA, M.A.D; VIANA, G.S.B.- Toxicological study of the hydroalcoholic extract from *Amburana cearensis* in rats. *Pharmac Biol*, v. 41, p.308-314, 2003.

LEAL, L.K.A.M. - Contribuição para a validação do uso medicinal de *Amburana cearensis* (cumaru): estudos farmacológicos com o isocampferídio e o amburosídeo - Universidade Federal do Ceará. Tese de Doutorado.p.179, 2006.

LEE, S.; XIE, X. 2010 – Peptide-based probes for targeted molecular imaging. Biochem. V.49, n. 7, p. 1364-1376.

LEITE, E.J. State-of-knowledge on *Amburana cearensis* (Fr. Allem.) A.C. Smith (Leguminosae: Papilionoideae) for genetic conservation in Brazil. Journal for Nature Conservation., v.13, p. 49-65, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova odessa. São Paulo: Instituto Plantarum. p. 298, 2002.

LORENZI, H., MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova odessa .São Paulo: Instituto Plantarum. p.275, 2008.

MAIA, V. Técnicas histológicas. 2 ed. São Paulo,p.246,1979.

MORENO, S.R.F.; CARVALHO, J.J.; NASCIMENTO, A.L.; ARNÓBIO, A.; TIMÓTEO, M.O.; ARAÚJO, L.Q.; OLEJ, B.; BERNARDO-FILHO, M.; CALDAS, L.Q.A. Ultrastructural Analysis of Kidney, Liver and Duodenum Isolated from Treated Rats with Ginkgo Biloba Extract and Effects of this Medicinal Plant on the Biodistribution of the Radiopharmaceutical Sodium Pertechnetate . Braz. arch. biol. technol. V.51, p. 185-190, 2008.

MORENO, S. R.; SILVA, A.L.; DIRÉ, G.; HONEYCUT, H.; CARVALHO, J.J.; NASCIMENTO, A.L.; PEREIRA, M.; ROCHA, E.K.; OLIVEIRA-TIMÓTEO, M.; ARNOBIO, A.; OLEJ, B.; BERNARDO-FILHO, M.; CALDAS, L.Q. Effect of oral ingestion of an extract of the herb *Uncaria tomentosa* on the biodistribution of sodium pertechnetate in rats. Braz J Med Biol Res., v.40, p. 77-80, 2008.

OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; FERREIRA, D.; COELHO, P. VEIGA, F.(2006) Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. Rev. Bras Ciênc Farmac, v.42, p. 151-165.

RAMOS, C.S.; Ecologia química de insetos e espécies de Piperaceae. São Paulo; Instituto de Química, Universidade de São Paulo. Tese de Doutorado em Química. p. 274, 2006.

REBELLO, B.M.; MORENO, S.R.F.; RIBEIRO, B.M.; NEVES, R.F.; FONSECA, A.S.; CALDAS, L.Q.A.; BERNARDO-FILHO, M.; MEDEIROS, A.C. Effect of a Peel Passion Fruit Flour (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) extract on the labeling of blood constituents with technetium-99m and on the morphology of red blood cells. *Braz Arch Biol Technol*. v.50, p. 153-159, 2008.

RÊGO-JÚNIOR, N.O.; FERNANDEZ, L.G.; CASTRO, R.P.; SILVA, L.C.; GUALBERTO, S.A.; PEREIRA, M.L.A.; SILVA, M.V. Compostos bioativos e atividade antioxidante de extratos brutos de espécies vegetais da caatinga. *Braz J Food Technol*, Campinas, v.14, p. 50-57, 2011.

SAHA, G.B. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*, 5th edition, Springer-Verlag, New York. p. 383, 2005.

SANTOS-FILHO, S.D.; MAIWORM, A.I.; PRESTA, G.A.; PAOLI, S.; GIANI, T.S.; BERNARDO-FILHO, M. Aqueous extract of the medicinal plant *Mentha crispata* alters the biodistribution of the radiopharmaceutical sodium pertechnetate in Wistar rats *Medicinal Chemistry Research*, v.16, p. 230-237, 2012.

SILVA, R.P.; HOLANDA, C.M.C.X.; BARBOSA, V.S.A.; OLIVEIRA, D.P.; LIMA, N.A.; CÂMARA, A.C.J.; CONSTANTINO, M.H.S. Effect of medicinal plants on the Parasitemia of *Trypanosoma cruzi* and on the Biodistribution. *Braz Arco Biol Tecno*, p.51, 2008.

SOUZA, D.E.; PEREIRA, M.O.; BERNARDO, L.C.; CARMO, F.S.; FONSECA, A.S.; BERNARDO-FILHO, M.; An experimental model to study the effects of a *Senna* extract on the blood constituent labeling and biodistribution of a radiopharmaceutical in rats. *Clinics*, v.66, p. 483-486, 2011.

SULAIMAN, M.R.; HUSSAIN, M.K.; ZAKARIA, Z.A.; SOMCHIT, M.N.; MOIN, S.; MOHAMAD, A.S.; ISRAF, D.A. Evaluation of the antinociceptive activity of *Ficus deltoidea* aqueous extract. *Fitoterapia*, v.79, p. 557-561, 2008.

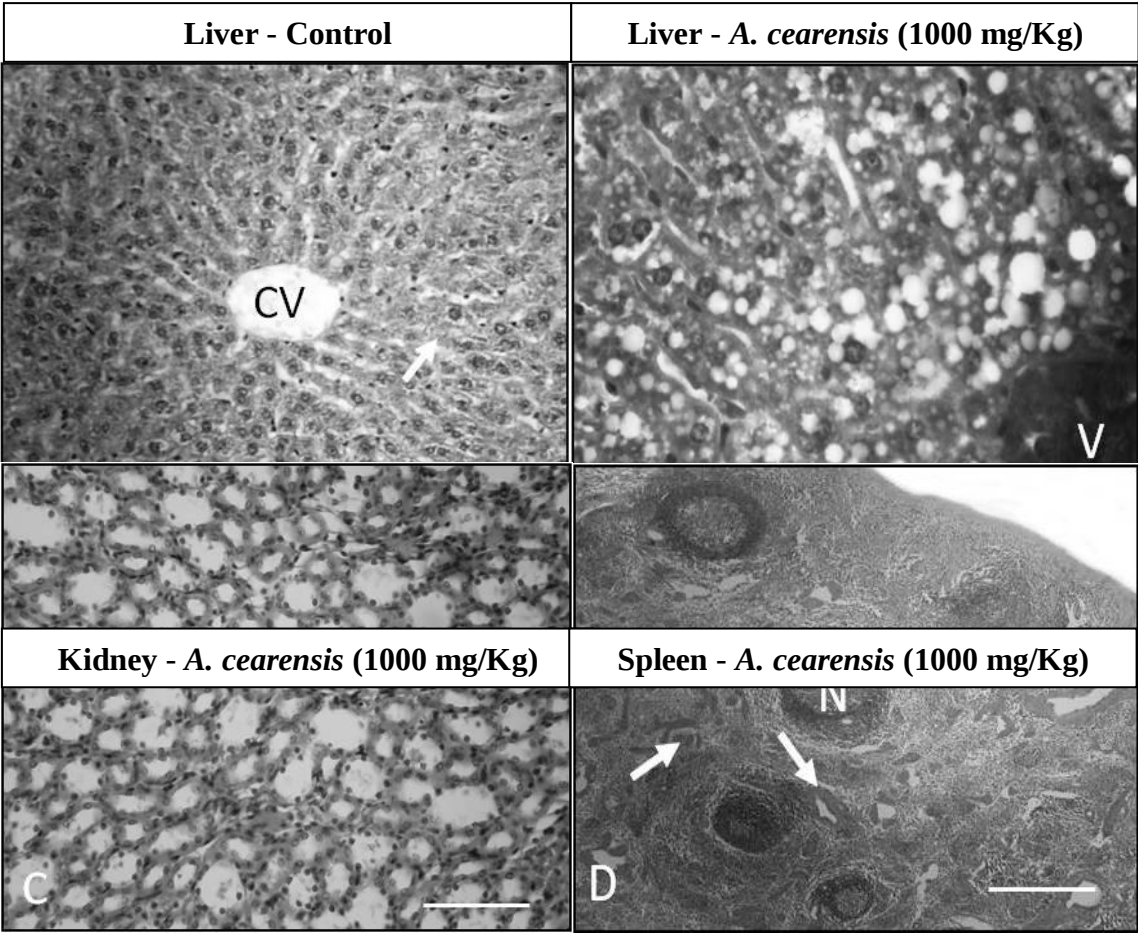


Figure 1. Micrographs of organs of Swiss mice treated with chloroform extract of *A. cearensis*. A) Central lobular vein (CV), hepatocytes arranged in cords, as histological pattern, and sinusoids (arrow). HE, bar = 100µm, B) Hepatocytes exhibiting steatosis. A central vein (V) is slightly congested with blood. HE, bar = 50µm; C) Kidneys, spinal region with tubules showing the structure preserved. HE, bar = 100µm, D) Spleen with lymph nodes (N) in the white pulp and red pulp with trabeculae (arrows). HE, Bar = 100µm.

Table 1 - Comparison of the control group treated with 0.9% saline (group A) and the group treated with the extract of *A. cearensis* (group C).

Organ	%ATI/g		p-value
	(group A)	(group C)	
	Control Saline 0.9%	Extract of <i>A. cearensis</i>	
Right lung	31.7 ± 2.9	24.1 ± 5.0	>0.05
Left lung	32.7 ± 5.0	27.9 ± 5.2	>0.05
Liver	30.9 ± 1.5	33.8 ± 4.5	>0.05
Right kidney	23.2 ± 3.1	20.1 ± 3.7	>0.05
Left kidney	21.4 ± 5.1	23.9 ± 0.4	>0.05
Blood	61.5 ± 3.5	56.3 ± 3.4	>0.05

The values presented are the mean ± standard deviation (n = 6) and p calculated by the Kruskal-Wallis test. *p<0.05.

Table 2 - Comparison of the control group treated with 0.9% saline (group A) and the group treated with 2-methoxy-4-methylphenol (group D).

Organ	%ATI/g		p-value
	(group A)	(group D)	
	Control – 0.9% Saline	2-methoxy-4-methylphenol	
Right lung	31.7 ± 2.9	33.4 ± 5.4	>0.05
Left lung	32.7 ± 5.0	35.3 ± 5.4	>0.05
Liver	30.9 ± 1.5	35.8 ± 1.5	>0.05
Right kidney	23.2 ± 3.1	35.2 ± 2.5	<0.0361*
Left kidney	21.4 ± 5.1	35.1 ± 1.6	<0.0105*
Blood	61.5 ± 3.5	66.1 ± 4.1	>0.05

The values presented are the mean ± standard deviation (n = 6) and p calculated by the Kruskal-Wallis test. *p<0.05.

Table 3 – Comparison of group treated with the extract of *A. cearensis* (group C) and with 2-methoxy-4-methylphenol (group D).

Organ	%ATI/g		p-value
	(group C)	(group D)	
	Extract of <i>A. cearensis</i>	2-methoxy-4-methylphenol	
Right lung	24.1 ± 5.0	33.4 ± 5.4	>0.05
Left lung	27.9 ± 5.2	35.3 ± 5.4	>0.05
Liver	33.8 ± 4.5	35.8 ± 1.5	>0.05
Right kidney	20.1 ± 3.7	35.2 ± 2.5	<0.0047*
Left kidney	23.9 ± 0.4	35.1 ± 1.6	<0.0235*
Blood	56.3 ± 3.4	66.1 ± 4.1	<0.0499*

The values presented are the mean ± standard deviation (n = 6) and p calculated by the Kruskal-Wallis test. *p<0.05.

Table 4 – Comparison of the control group treated with 0.9% saline (group A) and the group treated with DMSO (group B).

Organ	%ATI/g		p-value
	(group A)	(group B)	
	Control – 0.9% Saline	DMSO	
Right lung	31.7 ± 2.9	28.3 ± 4.1	>0.05
Left lung	32.7 ± 5.0	35.7 ± 6.0	>0.05
Liver	30.9 ± 1.5	34.5 ± 6.1	>0.05
Right kidney	23.2 ± 3.1	24.3 ± 1.3	>0.05
Left kidney	21.4 ± 5.1	23.7 ± 2.6	>0.05
Blood	61.5 ± 3.5	59.8 ± 8.7	>0.05

The values presented are the mean ± standard deviation (n = 6) and p calculated by the Kruskal-Wallis test. *p<0.05.

