



# Estudo fitoquímico preliminar e avaliação da toxicidade aguda do extrato etanólico bruto de *Caesalpinia echinata* Lam.

Phytochemical screening and evaluation of acute toxicity of crude ethanolic extract of *Caesalpinia echinata* Lam.

Recebido em 07/02/2011

Aceito em 06/08/2011

Isla Vanessa Gomes Alves Bastos<sup>1\*</sup>, Grace Kelly Cordeiro da Silva<sup>1</sup>, Guilherme Carvalho Ribeiro Rodrigues<sup>2</sup>, Cybelly Marques de Melo<sup>3</sup>, Haroudo Sátiro Xavier<sup>4</sup> & Ivone Antonia de Souza<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Arthur de Sá, s/n, Recife-PE-Brasil

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Recife-PE-Brasil

<sup>3</sup>Curso de Farmácia, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Arthur de Sá, s/n, Recife-PE-Brasil

<sup>4</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Arthur de Sá, s/n, Recife-PE-Brasil

<sup>5</sup>Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Recife-PE-Brasil

## RESUMO

*Caesalpinia echinata* Lam é uma espécie bastante estudada, na medicina popular é utilizada como adstringente e cicatrizante. Foi realizada uma prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada analítica para detectar os metabólitos secundários no extrato etanólico bruto (EEB) das flores de *C. echinata* Lam. Os resultados indicaram a presença de flavonóides, proantocianidinas condensadas, açúcares redutores, terpenos e esteróides. A dose letal 50% (DL<sub>50</sub>) do EEB foi obtida com base em ensaios toxicológicos por via oral (v.o.) e intraperitoneal (v.i.p.) utilizando camundongos albinos Swiss. O estudo da toxicidade aguda apresentou uma DL<sub>50</sub> de 1.825 mg/Kg quando administrado por v.i.p., enquanto a v.o. não apresentou óbito até a dose de 5g/Kg. Dos resultados obtidos verificou-se que o EEB de *C. echinata* mostrou toxicidade moderada quando utilizada por v.i.p., enquanto a administração por v.o. apresentou baixa toxicidade.

**Palavras-chave:** Plantas medicinais, toxicologia, DL<sub>50</sub>, *Caesalpinia echinata* Lam.

## ABSTRACT

*Caesalpinia echinata* Lam is a widely studied species, is used in folk medicine as an astringent and healing. Was performed a phytochemical screening by analytical thin layer chromatography to detect the secondary metabolites in crude ethanolic extract (EEB) from flowers of *C. echinata* Lam. The results of phytochemical screening indicated the presence of flavonoids, condensed proanthocyanidins, reducing sugars, terpenes and steroids. The 50% lethal dose (LD50) of EEB was obtained based on toxicological tests orally (v.o.) and intraperitoneal (v.i.p.) using Swiss albino mice. The acute toxicity study showed an LD50 of 1.825 mg / kg when administered by v.i.p., while v.o. showed no death to the dose of 5 g / kg. The results obtained it was found that the EEB *C. echinata* showed moderate toxicity when used by v.i.p., while v.o. administration showed low toxicity.

**Keywords:** Medicinal plants, toxicology, LD<sub>50</sub>, *Caesalpinia echinata* Lam.

## INTRODUÇÃO

Atualmente várias enfermidades têm sido tratadas por meio da utilização de plantas medicinais. No entanto, o uso popular, e mesmo o tradicional, não são suficientes para validar eticamente este recurso natural como medicamentos eficazes e seguros. (Turolla & Nascimento, 2006; Agra *et al.*, 2008)

Estudos toxicológicos têm a finalidade de avaliar a idéia de que plantas medicinais, por serem naturais, são isentas de efeitos tóxicos ou adversos. É fundamental, porém o estabelecimento da segurança, eficácia e garantia na

qualidade das preparações com esses vegetais, como também o conhecimento prévio da composição química para a confirmação da presença dos princípios ativos (Vendruscolo *et al.*, 2005; Craveiro *et al.*, 2008; Marlière *et al.*, 2008; Silveira *et al.*, 2008).

O ensaio para determinar a toxicidade aguda é definido como os efeitos adversos que ocorrem dentro de um período de 24 horas após a administração de uma única dose ou de doses múltiplas. A toxicidade aguda tem por objetivo determinar as reações adversas em curto prazo

\* **Contato:** Isla V. G. A., UFPE, Av. Arthur de Sá, s/n, CEP: 50740-521, Recife-PE-Brasil, e-mai: islabastos@yahoo.com.br

após a administração de um composto, bem como o binômio dose – efeito letal (Barros & Davino, 2003).

*Caesalpinia echinata* Lam (Fabaceae, Caesalpinoideae) é uma espécie arbórea nativa da Mata Atlântica, explorada ostensivamente desde o descobrimento do Brasil e possui importância cultural, econômica e ambiental. A medicina popular atribui a este vegetal algumas propriedades farmacológicas, sendo o extrato de seu lenho utilizado como: adstringente, cicatrizante, odontológico e tônico (Xavier *et al.*, 1995; Silva, 2001).

O gênero *Caesalpinia* é bastante estudado em todo o mundo, porém a avaliação do potencial tóxico das flores de *C. echinata* Lam é escassa. Logo, esse estudo avaliou o perfil fitoquímico e as propriedades tóxicas através da determinação da toxicidade aguda do extrato etanólico bruto das flores de *C. echinata* Lam por via oral e intraperitoneal.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material botânico e obtenção da matéria-prima

Amostras das flores de *C. echinata* foram coletadas no Campus da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife/ PE, Brasil e posteriormente identificadas pela botânica Dr<sup>a</sup> Marlene Barbosa. Uma exsicata foi depositada no Herbário UFP – Geraldo Mariz da UFPE, sob o número 63.023. O material (1.104 g) foi pesado em balança eletrônica semi-analítica (modelo BG 400, Gehaka®).

### Extração

Foram preparados 6 litros de solução extrativa etanólica (100%). A mistura foi mantida sob a temperatura ambiente durante sete dias e posteriormente filtrada com filtro de celulose adaptado a funil montado em suporte específico. O volume final obtido de extrato etanólico foi de 3,25 litros.

### Concentração do extrato

O material botânico sob a forma de extrato etanólico (EE) foi concentrado em evaporador rotativo (TE 120, Tecnal®, Brasil) acoplado a bomba a vácuo sob temperatura constante de 45-50°C para eliminação do solvente orgânico e obtenção do extrato bruto.

### Abordagem Fitoquímica

Os perfis fitoquímicos foram obtidos por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), utilizando-se placas cromatográficas de gel de sílica (Merck-Alemanha, art. 105554), nas quais foram aplicadas alíquotas de 10 µL do extrato previamente preparados. As fases móveis e reveladores foram selecionados de acordo com o grupo de moléculas a ser pesquisado com base nos estudos de Harbone (1998) e Wagner & Bladt (1996).

Foram analisadas a presença dos seguintes metabólitos secundários: alcalóides, açúcares redutores, polifenóis (cumarinas, derivados cinâmicos, fenilpropanoglicosídeos, flavonóides, proantocianidinas condensadas, leucoantocianidinas, ácido gálico), terpenóides (monoterpenóides, sesquiterpenóides, diterpenóides, triterpenóides, esteróides, iridóides e saponinas).

### Toxicidade aguda do extrato e determinação da DL<sub>50</sub>

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (protocolo número 23076.011798/2010-17). O trabalho experimental foi desenvolvido no Biotério do Departamento de Antibióticos da UFPE a partir da seleção de camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) machos, com pesos e idade aproximados, divididos em grupos de seis animais cada previamente marcados e pesados. Todos os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, em condições controladas de iluminação (ciclo 12 horas claro/escuro) e temperatura de 22± 2 °C, com alimentação suspensa 12 horas antes do ensaio e liberação de água *ad libitum*. O extrato etanólico bruto (EEB) foi pesado e dissolvido em solução fisiológica 0,9% de NaCl (p/v). O ensaio foi realizado pela via de administração intraperitoneal e oral. A avaliação da toxicidade aguda e determinação da DL<sub>50</sub> foram realizadas de acordo com a metodologia preconizada por Karber & Behrens (1964) efetuada em duas fases, uma preliminar e uma definitiva. Na fase preliminar foram administradas doses crescentes do EEB de *C. echinata* Lam. para definir a D<sub>1</sub> (maior dose de sobrevivência) e D<sub>2</sub> (menor dose capaz de determinar 100% de letalidade dos animais). Os dados obtidos na fase preliminar delinearão a fase definitiva. Os animais receberam doses entre D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> seguindo a progressão geométrica de razão 1,2 com determinação da DL<sub>50</sub> (Dose letal para 50% dos roedores), todos permaneceram em observação durante 48 horas. Os parâmetros observados pelas vias de administração foram às diversas reações comportamentais como: deambulação, alterações da frequência respiratória, diurese, óbitos, entre outros. O cálculo da DL<sub>50</sub> foi obtido com a seguinte fórmula:

$$DL_{50} = DF - \frac{\sum (A.B)}{n}$$

Onde: DF = dose mínima capaz de matar todos os animais, A = diferença entre duas doses consecutivas, B = número de animais mortos entre duas doses consecutivas, n = número total de animais por lote.

A classificação da toxicidade relativa dos agentes químicos de acordo com a DL<sub>50</sub> seguiu a proposta de Schuartsman (1980) grau 6 (DL<sub>50</sub> < 5 mg Kg<sup>-1</sup>) = supertóxico; grau 5 (DL<sub>50</sub> = 5-50 mg Kg<sup>-1</sup>) = extremamente tóxico; grau 4 (DL<sub>50</sub> = 50-500 mg Kg<sup>-1</sup>) = muito tóxico; grau 3 (DL<sub>50</sub> = 0,5-5 g Kg<sup>-1</sup>) = moderadamente tóxico; grau 2 (DL<sub>50</sub> = 5-15 g Kg<sup>-1</sup>) = pouco tóxico; grau 1 (DL<sub>50</sub> >15 g Kg<sup>-1</sup>) = praticamente atóxico.

## RESULTADOS

Conforme demonstrado na tabela 1, a abordagem fitoquímica da espécie *C. echinata* Lam. realizada com extrato metanólico bruto (EMB) das flores do vegetal, indicou a presença de flavonóides, proantocianidinas condensadas, açúcares redutores, triterpenos e esteróides.

Na fase preliminar, do teste de toxicidade aguda por via intraperitoneal, foram administradas doses variadas onde se determinou a D<sub>1</sub> (dose máxima isenta de mortalidade)

de 1.000 mg Kg<sup>-1</sup> e D<sub>2</sub> (dose mínima capaz de levar a óbito 100% dos animais) de 2.160 mg Kg<sup>-1</sup>.

Os sinais de toxicidade da fase definitiva foram observados após administração do EEB de *C. echinata* Lam. que apresentaram efeitos estimulantes como reações de fuga, movimentos circulares, saltos, movimentos estereotipados, ereção de cauda, movimentos de vibrissas, tremores finos/grosseiros, expansão e movimentação do pavilhão auricular.

Tabela 1. Metabólitos encontrados no extrato metanólico das flores de *Caesalpinia echinata* Lam.

Classe de Metabólitos	Extrato bruto
Alcalóides	-
Cumarinas	-
Derivados Cinâmicos	-
Fenilpropanoglicosídeos	-
Flavonóides	+
Proantocianidinas condensadas	+
Monoterpenóides, Sesquiterpenóides e Diterpenóides	-
Triterpenos e Esteróides	+
Iridóides	-
Saponinas	-
Açúcares redutores	+

+ Presença; - Ausência

Após o período de estimulação foi verificado uma diminuição desses sinais ativos em todas as doses (1.000, 1.200, 1.650, 2.160) tais como abaixamento dos membros posteriores, acomodação e agrupamento.

Além desses foram observados efeitos sobre o trato gastrointestinal como: distensão abdominal, contorções e aumento da excreção fecal. Piloereção, diurese, espasmos, palidez, refluxos e edema de focinho foram verificados em grande parte dos animais de cada grupo. Esses efeitos periféricos se acentuaram nas doses mais elevadas.

A taxa de mortalidade do extrato etanólico de *C. echinata* cresceu progressivamente com o aumento da dose como demonstrado na curva dose-resposta (Figura 1): a taxa de mortalidade de 0% com 1.000 mg/kg elevou-se gradualmente para 100% com 2.160 mg/kg. A partir dos dados encontrados, foi calculada a DL<sub>50</sub>, que resultou em 1.825 mg/kg de peso corpóreo do animal.

A análise da toxicidade aguda por via oral demonstrou ação estimulante em todas as doses (2.000, 4.000 e 5.000 mg Kg<sup>-1</sup>). Os animais apresentaram sinais de intensa agitação, reações de fuga, sibilo, movimentos circulares, tremores finos / grosseiros, movimentos estereotipados, postura em garra, aumento da frequência respiratória, movimentos de vibrissas, expansão do pavilhão auricular e ereção de cauda.

Efeitos depressores também foram visualizados nas doses estudadas tais como prostração e abaixamento do trem posterior. Além destes, outros sinais comportamentais como refluxo, espasmos, petéquias, excreção fecal, piloereção, diurese e coceira foram detectados.

Quando administrado por via oral, não foi verificado letalidade nos animais com a dose mais elevada (5.000 mg/kg).

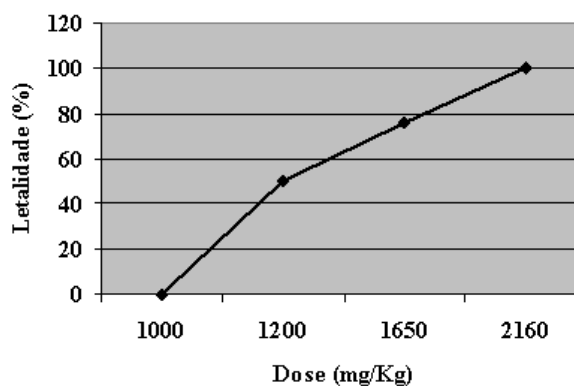


Figura 1. Curva Dose-Resposta da toxicidade aguda por via intraperitoneal do extrato etanólico bruto das flores de *C. echinata* Lam.

## DISCUSSÃO

O conhecimento da composição química das plantas aplicado na medicina popular envolve o estudo de interações do organismo com os efeitos das inúmeras classes de compostos e moléculas que podem existir numa única planta. Esse conhecimento permite identificar a espécie vegetal, conjuntamente com ensaios de atividade biológica, de modo que se podem caracterizar mais facilmente as frações ou substâncias bioativas (Toledo *et al.*, 2003).

Luna *et al.* (2005), relataram a presença de fenóis, flavononas, flavonas, flavonóides, esteróides, triterpenos, antraquinonas e antrons no extrato etanólico das folhas de *C. echinata* Lam.

Silva (2006) realizou uma abordagem fitoquímica do extrato etanólico bruto do cerne de *C. echinata* Lam, indicando marcante presença de flavonóides. Cumarinas e taninos catéquicos estiveram presentes em pequenas quantidades.

A partir do perfil fitoquímico, foi possível identificar metabólitos secundários de interesse farmacológico presente no extrato em estudo. A presença de flavonóides na caracterização química do extrato das flores está de acordo com a literatura, que relata a presença deste composto como o metabólito mais observado em espécies do gênero *Caesalpinia* (Rezende *et al.*, 2004).

As reações comportamentais observadas após administração do EEB das flores de *C. echinata* Lam. tanto por via oral quanto por via intraperitoneal, são sugestivas de substâncias que alteram o equilíbrio entre as vias inibitória e excitatórias do Sistema Nervoso Central (SNC), visto que foi observado um período inicial de estimulação seguido por uma fase depressiva (Silva, 2006). Inicialmente os efeitos estimulantes observados devem-se a presença de compostos que promovem a liberação dos neurotransmissores excitatórios e/ou inibição da recaptção desses. A inibição da recaptção aumenta a concentração dos neurotransmissores em contato com os receptores, o que leva ao aumento da atividade do circuito neuronal. Os sinais depressores, embora poucos evidentes sugerem fadiga neuronal que ocorre normalmente após uma intensa fase excitatória, ou através da metabolização do(s) princípios ativos da planta ter resultado em algum composto que promova a estimulação direta de neuro-

transmissores inibitórios, ou ainda pelo esgotamento parcial dos neurotransmissores excitatórios (Bloom, 2006; Silva, 2002).

De acordo com a DL<sub>50</sub>, baseados na classificação de Schuartsman (1980) o extrato etanólico das flores de *C. echinata* Lam. quando administrado por via intraperitoneal, pode ser considerado moderadamente tóxico. Na avaliação da DL<sub>50</sub> por via oral, não verificamos óbito até a dose limite de 5.000 mg/kg, indicando que quando administrado por esta via o extrato bruto apresenta baixa toxicidade. Resultados semelhantes foram descritos por Silva (2006), utilizando o extrato etanólico bruto do cerne de *C. echinata* cujo valor da DL<sub>50</sub> por via intraperitoneal foi de 995,57 mg/kg e por via oral foi atóxica até a dose de 4.000 mg/Kg.

Esta ausência de letalidade pode estar relacionada aos mecanismos farmacocinéticos de absorção no trato intestinal como pH, superfície de absorção, motilidade intestinal, irrigação sanguínea (Klaassen & Watkins, 2001) e/ou por biotransformação, que possivelmente diminuíram os níveis séricos necessários para provocar efeito letal nos indivíduos, no entanto sinais clínicos de toxicidade foram observados (Silva, 2006).

## CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico preliminar do extrato etanólico bruto das flores de *C. echinata* Lam. demonstrou a presença de flavonóides, proantocianidinas condensadas, açúcares redutores e terpenóides.

O extrato bruto apresentou efeitos sugestivos de toxicidade moderada quando utilizada por via intraperitoneal, enquanto que a administração oral l apresentou toxicidade muito baixa.

## REFERÊNCIAS

Agra MF, Basílio IJLD, Silva KN, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 18(3): 472-508, 2008.

Barros SB & Davino SC. Avaliação da toxicidade. In: Oga S, Camargo MMA & Batistuzzo JAO. (Org.). Fundamentos de toxicologia. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 57-68.

Bloom FE. Neurotransmission and the central nervous system. In: Goodman & Gilman. (Org.). Pharmacological Basis of Therapeutics. 11 ed. New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division, 2006. p. 330-331.

Craveiro ACS, Carvalho DMM, Nunes RS, Fakhouri R, Rodrigues AS, Silva FT. Toxicidade aguda do extrato aquoso de folhas de *Erythrina velutina* em animais experimentais. *Rev Bras Farmacogn* 18(Supl.): 739-743, 2008.

Harbone JB. Phytochemical methods. 3 ed. London: Chapman & Hall, 1998. 228 p.

Karber G & Behrens B. Statistical methods in biological assay. 2 ed. London: Charles Griffin, 1964. 219 p.

Klaassen CD & Watkins JB. Absorção, distribuição e excreção dos tóxicos. In:\_\_\_\_\_. Toxicologia: a

ciência básica dos tóxicos de Casarett e Doull. 5 ed. Lisboa: McGraw- Hill, 2001. p. 79-100.

Luna JS, Santos AF, Lima MRF, Omena MC, Mendonça FAC, Bieber LW, Sant'Ana AEG. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. *J Ethnopharmacol* 97(2): 199-206. 2005.

Marlière LDP, Ribeiro AQ, Brandão MGL, Klein CH, Acurcio FA. Utilização de fitoterápicos por idosos: resultados de um inquérito domiciliar em Belo Horizonte (MG), Brasil. *Rev Bras Farmacogn* 18(Supl.): 754-760, 2008.

Rezende CM, Corrêa VFS & Costa AVM. Constituintes Químicos Voláteis das Flores e Folhas do Pau-Brasil (*Caesalpinia echinata*, Lam.). *Quím Nova*. 27(3): 414-416, 2004.

Silva RC. Plantas medicinais na saúde bucal. Vitória: Artgraf, 2001. 136 p

Silva P. Farmacologia. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2002. 334 p.

Silva ECB. Avaliação biológica da *Caesalpinia echinata* Lam. Fabaceae- Caesalpinoideae. Usos e riscos. 2006. Recife. 116 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Pernambuco. Recife.

Silveira PF, Bandeira MAM & Arrais PSD. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. *Rev Bras Farmacogn* 18(4): 618-626, 2008.

Schuartsman S. Produtos químicos de uso domiciliar: segurança e riscos toxicológicos. São Paulo: Almed, 1980. 92 p.

Toledo ACO, Hirata LL, Da Cruz M, Buffon M, Miguel MD, Miguel OG. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. *Revista Lecta* 21(1): 7-13, 2003.

Turolla MSR & Nascimento ES. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Rev Bras Cien Farm* 42(2): 189-306, 2006.

Vendruscolo GS, Rates SMK & Mentz LA. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Rev Bras Farmacogn* 15(4): 361-372, 2005.

Wagner H & Bladt S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. 2 ed. Berlim: Springer Verlag, 1996. 384 p.

Xavier MN, Ramos INC & Xavier LF. A Fitoterapia no Combate as Afecções Buciais. João Pessoa: Idéia. 1995. 101 p.