

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) PI0905584-3 A2



(51) Int.CI.:
A61K 36/24 2006.01
A61P 33/06 2006.01

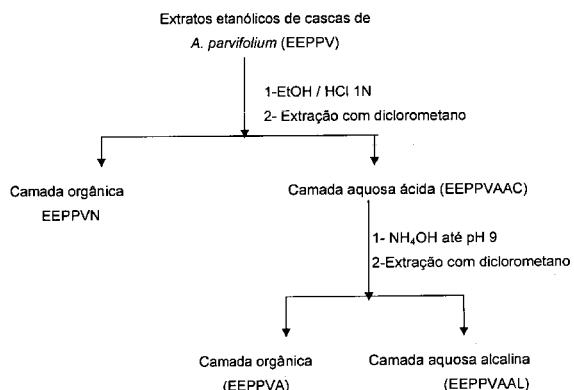
(22) Data de Depósito: 23/12/2009
(43) Data da Publicação: 23/08/2011
(RPI 2120)

(54) Título: EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE CASCAS DE ASPIDOSPERMA PARVIFOLIUM E/OU ULEÍNA E SUA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(73) Titular(es): Universidade Federal de Minas Gerais

(72) Inventor(es): Alaíde Braga de Oliveira, Fabiana Maria Andrade Gomes, Fabíola Dutra Rocha, Maria Fani Dolabela, Rosa Maria Taveira Neiva, Rose Lisieux Ribeiro Paiva Jácome

(57) Resumo: EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE CASCAS DE ASPIDOSPERMA PAR VIFOLIUM E SUA COMPOSIÇÃO FARMACEUTICA A presente invenção descreve o processo para obtenção de extrato e fração padronizados de Aspidosperma paivifolium, popularmente denominada "pau-pereira, guatambu ou peroba", além do isolamento e purificação da uleine. A invenção compreende, ainda, a obtenção de composições farmacêuticas que contêm o extrato, fração derivada e/ou uleine, bem como sua utilização para o tratamento da malária. O extrato, fração e uleine apresentados foram ensaiados e mostraram atividade antiplasmódica, particularmente contra Plasmodium falciparum.





PI0905584-3

**“EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE CASCAS DE
ASPIDOSPERMA PARVIFOLIUM E/OU ULEÍNA E SUA COMPOSIÇÃO
FARMACÊUTICA”**

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção descreve o processo para obtenção de extrato e fração padronizados de *Aspidosperma parvifolium*, popularmente denominada “pau-pereira, guatambu ou peroba”, além do isolamento e purificação da uleína. A invenção compreende, ainda, a obtenção de composições farmacêuticas que contêm o extrato, fração derivada e/ou uleína e seus derivados, bem como sua
10 utilização para o tratamento da malária.

O extrato, fração e uleína apresentados foram ensaiados e mostraram atividade antiplasmódica, particularmente contra *Plasmodium falciparum*.

ESTADO DA TÉCNICA

A quimioterapia da malária teve início no século XVII. Os jesuítas que
15 vieram para a América do Sul observaram que os índios do Peru utilizavam plantas do gênero *Cinchona* spp (família Rubiaceae), conhecidas popularmente por quinas, para o tratamento de doenças febris. Estudos fitoquímicos de *Cinchona* spp, realizados na Europa, levaram ao isolamento na França, por Pelletier e Caventou, no início do século XIX, da quinina, que apresentou
20 atividade antimarialária. A quinina constituiu um modelo para a síntese dos antimarialários como mefloquina e cloroquina.

A cloroquina foi utilizada por um longo período no tratamento da malária, mais recentemente houve a introdução de novos fármacos como a artemisinina e a atovacona.

25 A artemisinina é uma substância ativa da *Artemisia annua*, de uso milenar na China, tendo sido isolada em 1972. Derivados semi-sintéticos como artemeter, arteeter e artesunato de sódio também se encontram em uso clínico (ROSENTHAL, P.J. e GOLDSMITH, R.S. Antiprozoários. Farmacologia Básica & clínica. Editor: Katzung, B.G.C. Guanabara- Koogan, 8^a ed, capítulo: 53, p.
30 769-783, 2003.)

A atovacona é uma naftoquinona sintética, um análogo do lapachol, que é freqüente em espécies de *Tabebuia*, gênero ao qual pertencem os ipês, árvores que ocorrem na América do Sul (MIRAGLIA, M.C.M. Estudo químico de *Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nichols (Bignoniaceae) e síntese de 5 piranonaftoquinonas, furanonaftoquinonas e antraquinonas. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Minas Gerais, 1991).

Neste contexto, as plantas têm dado importante contribuição para a quimioterapia da malária, como a quinina e a artemisinina.

A atividade antiplasmódica de alcalóides tem sido amplamente relatada 10 na literatura, sendo que, no período de 1990 a 2000, mais de uma centena de substâncias ativas desta classe foram descritas, algumas mais potentes que a cloroquina, conforme revisão recente. (SAXENA S, PANT N, JAIN DC, BHAKUNI RS. Antimalarial agents from plant sources. Current Sci, v. 85, p.1314-1329, 2003).

Muitas vezes estes alcalóides foram isolados de plantas 15 tradicionalmente utilizadas para o tratamento da malária, em diferentes regiões do mundo. Um levantamento da literatura indicou que 1200 espécies vegetais são empregadas nos três continentes para o tratamento da malária (WILLCOX, M.L. e BODEKER, G. Traditional herbal medicines for malaria. BMJ, Nov 2004; 20 329: 1156 – 1159).

O gênero *Aspidosperma* pertence à família Apocynaceae que inclui cerca de 200 gêneros e 2000 espécies. Espécies deste gênero ocorrem em 25 regiões tropical e subtropical, desde o México até a Argentina, encontrando-se em diferentes habitats, como nos cerrados da região centro sul do Brasil, áreas inundadas nas margens de rios da Amazônia, Paraguai, Argentina, México e regiões em elevação do Perú e Bolívia (WOODSON, R.S. Studies in the Apocynaceae VIII. An interim revision of the genus *Aspidosperma* Mart & Zucc. Ann. Missouri Botanical Garden. v.38, p.119, 1951).

De espécies do gênero *Aspidosperma* já foram isolados cerca de 250 30 alcalóides indólicos (JÁCOME, R.L.R.P. Estudo químico de *Zeyheria montana* M. e *Aspidosperma parvifolium* A.DC. Quantificação, por CLAE de

naftoquinonas isoladas de *Z. montana*. Tese UFMG/ICEx/DQ. Belo Horizonte, 1998, 157p).

Em relação ao uso tradicional e à atividade farmacológica de espécies deste gênero muito pouco se encontra registrado na literatura. Levantamento 5 etnofarmacológico realizado no município de Igarapé Mirim (PA, Brasil) revelou que a população local utiliza cascas de *Aspidosperma*, entre as quais, *A. auriculatum*, para o tratamento de malária e febre. (BARBOSA, W.L.R.; TAVARES, J.C.C. e SOARES, D.C. Alcalóides de *Aspidosperma auriculatum* Standl. Rev. Bras. Farmacogn. 13 (supl), p.06-08, 2003).

10 De modo geral, na Amazônia, algumas espécies de *Aspidosperma* são utilizadas pelas populações indígenas e caboclas, para vários fins medicinais, como o tratamento de inflamações do útero e ovário, diabetes, câncer, como contraceptivo e tratamento da malária. (MILLIKEN, W. Plants for malaria for fever: medicinal species in Latin America-a bibliography survey. Kew: the Royal 15 Botanic Gardens. Monografia. The Royal Botanic Gardens, 27, 1997). As espécies mais utilizadas são *A. nitidum*, *A. marcgravianum*, *A. carapanauba* e *A. desmantun* .(BRANDÃO, M., GRANDI, T., ROCHA, E., SAWYER, D., KRETTLI, A. Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. Journal of Ethnopharmacology, v.36, p.175–182, 1992).

20 A espécie *A. quebracho-blanco* é usada como febrífugo, para o tratamento de asma, bronquite, enfisema e febre. (BOWN, D. Encyclopedia of herbs & their uses. Dorling, Kindersley, London, 1995). *A. excelsum* é indicada para problemas estomáquicos e indigestão (CHEVALIER, A. The encyclopedia of medicinal plants. Dorling Kindersley. London, 1996).

25 Foram isolados de *A. pyrifolium* e *A. megalocarpon* onze alcalóides com esqueleto aspidospermano e avaliada sua atividade antiplasmódica (cepas sensível e resistente a cloroquina) e citotoxicidade. Destes alcalóides, sete são tetracíclicos, apresentando grupo etila livre, e mostraram Cl_{50} entre 3,2 e 15,4 μM , após 72h de exposição. Entretanto, quatro alcalóides pentacíclicos 30 mostraram reduzida atividade antiplasmódica, isto é, Cl_{50} entre 22,6 e 52,6 μM Avaliou-se, também, a associação alcalóide e cloroquina, tendo observado sinergismo nas seguintes associações: cloroquina - N-formil-aspidospermidina

e cloroquina- aspidospermina . Em relação à citotoxicidade (células NiH 3T3), os alcalóides com alta atividade antiplasmódica apresentaram menor citotoxicidade. (MITAINE-OFFER, A.C.; SAUVAIN, M.; VALENTIN, A.; CALLAPA, J.; MALLIE, M. e ZECHES-HANROT, M.. Antiplasmodial activity of 5 *Aspidosperma* indole alkaloids. *Phytomedicine*, v.9(2), p.142-145, 2002).

Aspidosperma *parvifolium* é conhecida, popularmente, como guatambú, peroba ou pau-pereira. Em termos botânicos, esta espécie se caracteriza por possuir folhas glabras, membranáceas, de coloração prateada na parte inferior, de 5-10 cm de comprimento. A árvore possui 10-15 m de altura, com o tronco 10 de 40-60 cm de diâmetro. Produz, anualmente, grande quantidade de sementes que são amplamente disseminadas pelo vento. Floresce no final do mês de agosto com surgimento da nova folhagem. O desenvolvimento da planta no campo é rápido, podendo atingir 3,5-4,0 m aos 2 anos (LORENZI, H. Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas 15 Nativas do Brasil. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum,1992).

Do extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium* foram isolados os alcalóides N-metiltetraidroelipticina (BURNELL, R.H. e CASA, D.D. Alkaloids of *Aspidosperma vargasii* A.DC. *Can J Chem.*, v.45, p.89, 1967), uleína, epiuleína, aparcina, desmetiluleína, além de um triterpeno, o lupeol, e um esteróide, o 20 estigmasterol (JÁCOME, R.L.R; OLIVEIRA, A.B.; RASLAN, D.S. e WAGNER, H. Estudo químico e perfil cromatográfico das cascas de *Aspidosperma parvifolium* A. DC. ("Pau-Pereira"). *Química Nova*, v.27 (6), p.897-900, 2004)

A uleína já foi obtida de outras espécies de *Aspidosperma*, como *A. olivaceum* e *A. tomentosum*. (GILBERT, B.; DUARTE, A.P.; NAKAWAY, Y.; JOULE, J.A.; FLORES, S.E.; BRISSOLE, J.A.; CAMPELO, J.; CARRAZZONI, E.P.; OWELLEN, R.J.; BROSEY, E.C.; BROWN Jr.; K.S. e DJERASSI, C. 25 Alkaloids studies L-The alkaloids of twelve *Aspidosperma* species *Tetrahedron*, v.21, p.1141-1161, 1965).

O extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium* avaliado quanto à letalidade em *Artemia salina* e inibição de calos, induzidos por *Agrobacterium tumefaciens*, em discos de batatas, demonstrou um elevado potencial antitumoral, isto é, a concentração letal 50% (CL_{50}) foi 103,8 g/ml para a 30

5 *Artemia salina* e, nesta concentração, houve inibição de 94,4% da formação dos calos em discos de batata. Este extrato apresentou, também, atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. (DOLABELA, M.F. Triagem *in vitro* para atividade antitumoral e anti-*Trypanossoma cruzi* de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas. Belo Horizonte: Depto de Fisiologia e Farmacologia, ICB, UFMG, 1997. 130p. Dissertação de Mestrado). A toxicidade observada em *Artemia salina*, provavelmente está relacionada à presença de alcalóides indólicos.

10 Uma mistura de alcalóides indólicos, contendo predominantemente a uleína (53%) reduziu a secreção ácida no estômago de roedores, e esta redução pode estar relacionada ao bloqueio da bomba H+, K+-ATPase. (BAGGIO, C.H.; MARTINI OTOFUJI, G.; SOUZA, W.M.; MORAES SANTOS, C.A.; TORRES, L.M.; RIECK, L.; ANDRADE MARQUES, M.C. e MESIA-VELA, S. Gastroprotective mechanisms of indole alkaloids from *Himatanthus lancifolius*. *Planta Med*, v.71(8), p.733-8, 2005).

15 Outro alcalóide indólico, presente em *A. parvifolium*, a aparicina, foi submetido ao ensaio para atividade antifúngica, porém não foi observada inibição do crescimento do microorganismo. (HERNANDEZ, N.M.R. e PEREZ, C.D. Fungal activity of various alkaloids isolated from *Catharanthus roseus* G. 20 Don. *Rev Cubana Med Trop*, v.29(3), p.147-52, 1977).

Atualmente, encontramos disponíveis algumas patentes relacionadas a presente invenção:

O pedido de patente BE814772-A descreve a obtenção de novos alcalóides terapêuticos através da extração das cascas de *Aspidosperma spegazzinii*. A casca foi extraída com benzeno ou clorofórmio, o extrato resultante é lavado com solução ácida. A solução de lavagem é tratada com solução alcalina para precipitação dos alcalóides totais, que são separados posteriormente por cromatografia em alumina.

30 A patente FR2865652 relata a utilização de extratos de plantas ou ingredientes ativos isolados a partir destes, na preparação de composições farmacêuticas, de cosméticos e nutracêuticos, como agentes lipolíticos e anticelulites. Os extratos são selecionados a partir de plantas do gênero:

Aspidosperma; Catharanthus; Eschscholzia; Bocconia; Vismia; Orbignya; Terminalia; Entada; Hypericum; Ginkgo; Viburnum; Papaver e Butea.

A patente US3225053 relata o isolamento de quebranchidina e derivados a partir do extrato de *Aspidosperma quebracho-blanco* e sua utilização como psicosedativos e bloqueadores β adrenérgicos.

PROBLEMAS DO ESTADO DA TÉCNICA

Os fármacos disponíveis para o tratamento da malária nem sempre apresentam resultados satisfatórios. A cloroquina, por apresentar baixa toxicidade e ser economicamente viável, foi amplamente utilizada no tratamento da malária, durante muitos anos, porém, devido à crescente resistência dos parasitos, novos fármacos tiveram que ser introduzidos, como a artemisinina e a atovacona.

Porém, a atovacona, bem como a artemisinina e derivados são de custo elevado o que inviabiliza o seu uso em regiões endêmicas pobres, além da possibilidade de desenvolvimento de resistência dos parasitos a estes fármacos, o que já se observou para a artemisinina. Há, portanto, necessidade de novos agentes antimaláricos que sejam eficazes contra cepas do *P. falciparum* resistentes a cloroquina, promovendo a cura em tempo razoável para garantir adesão ao tratamento, sejam seguros e de baixo custo (FIDOCK, D.A.; ROSENTHAL, P.J.; CROFT, S.L.; BRUN, S. e NWAKA, S. Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. Nat Rev Drug Discov, Jun 2004; 3(6): 509-20).

VANTAGENS DA TECNOLOGIA

Embora existam no mercado composições farmacêuticas para o tratamento de malária, bem como seus processos de obtenção, nenhuma destas propõe um processo de obtenção e composições farmacêuticas de extrato padronizado de casas de *A. parvifolium*, fração rica em alcalóides e uleína com atividade antiplasmódica.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1: Extração ácido-base a partir do extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium*

Figura 2: Cromatograma da fração EEPPVA

5 Figura 3: Cromatograma de uleína

Figura 4: Cromatograma de EEPPVA + uleína

Figura 5: Espectro no IV de APT 13-16 (8) (uleína)

Figura 6: Espectro de massa por impacto eletrônico de APT 13-16 (8) (uleína)

DESCRIÇÃO DETALHADA DA TECNOLOGIA

10 A presente invenção descreve o processo para obtenção de extrato e fração padronizados de *Aspidosperma parvifolium*, popularmente denominada “pau-pereira, guatambu ou peroba”, além do isolamento e purificação da uleína. A invenção compreende, ainda, a obtenção de composições farmacêuticas que contêm o extrato, fração derivada e/ou uleína, bem como sua utilização para o
15 tratamento da malária.

A composição da presente invenção caracteriza-se pelo uso do extrato, fração ou uleína, combinados com excipientes farmaceuticamente aceitáveis. Exemplos de excipientes incluem água, solução salina, soluções tamponadas com fosfato, solução de Ringer, solução de dextrose, solução de Hank,
20 soluções salinas biocompatíveis contendo ou não polietilenoglicol. Veículos não aquosos, como óleos fixos, óleo de sésamo, oleato de etila, ou triglicerídeo também podem ser utilizados. Podem ser preparadas composições com um exciente ou mistura desses.

Os excipientes também podem conter quantidades menores de aditivos
25 como substâncias que aumentam a isotonicidade e estabilidade química de substâncias ou tampões. Exemplos de tampões incluem tampão fosfato, tampão bicarbonato e tampão Tris, enquanto exemplos de conservantes incluem timerosal, m- ou o-cresol, formalina e álcool benzílico. As composições

padrões podem ser líquidas ou sólidas. Desta forma, numa formulação sólida, o excipiente pode incluir dextrose, conservantes, para qual água ou solução salina estéril podem ser acrescentadas antes da administração. Além de aglutinantes, desintegrantes, diluentes, lubrificantes, tensoativos.

5 Essas composições podem ser administradas via intramuscular, intravenosa, subcutânea, oral, inalatória ou como dispositivos que possam ser implantados ou injetados, sendo preferencialmente administrados por via oral.

A presente invenção pode ser mais bem entendida através dos seguintes exemplos, não limitantes de tecnologia:

10 **Exemplo 1: Obtenção do extrato e fração padronizados de cascas de *Aspidosperma parvifolium***

As cascas pulverizadas de *A. parvifolium* foram submetidas à extração por percolação exaustiva, com etanol a 96°GL. Na seqüência, o extrato etanólico foi concentrado em evaporador rotatório, a 50 °C, sob pressão reduzida, até resíduo, sendo mantido em dessecador até peso constante.

O extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium* (EEPPV) (10,0 g) foi solubilizado em reduzido volume de etanol (<10ml) e HCL aquoso a 1N (250 ml) seguindo-se de extração com diclorometano (3 x 250 ml) ou éter dietílico, ou diclorometano ou acetato de etila, obtendo-se uma camada de diclorometano (EEPPVN) e uma camada aquosa ácida (EEPPVAAC). A esta adicionou-se NH₄OH até pH 9 e extraiu-se com diclorometano (3 x 250 ml), obtendo-se uma camada aquosa alcalina (EEPPVAAL) e uma camada orgânica (fração alcaloídica) (EEPPVA). O fluxograma destas extrações encontra-se na Figura 1.

25 Nas condições controladas, a fração rica em alcalóides (EEPPVA) foi padronizada para conter 45 a 60% m/m de uleína e também apresentou como constituintes epiuleína, desmetileléina e aparicina, segundo a impressão digital padronizada por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (Figura 2).

Exemplo 2: Isolamento e identificação da uleína

O extrato etanólico de *A. parvifolium* (EEPPV) foi submetido à extração ácido-base sendo obtida a fração alcaloídica (EEPPVA), desta fração, após cromatografias sucessivas em coluna de Sephadex LH-20 e sílica gel, 5 obtiveram-se as frações, APT 13-16 (7) e APT 13-16 (8) que apresentaram uma mancha única em CCDS (reveladores: anisaldeído-ácido sulfúrico e reagente de Dragendorff). As frações obtidas foram comparadas com amostra de uleína isolada por Jácome (1998), apresentando muita similaridade. (JÁCOME, R.L.R.P. Estudo químico de *Zeyheria montana* M. e *Aspidosperma parvifolium* A.DC. Quantificação, por CLAE de naftoquinonas isoladas de *Z. montana*. Tese UFMG/ICEEx/DQ. Belo Horizonte, 1998, 157p.)

Os cromatogramas por CLAE-FR acoplado a um detector UV confirmaram tratar-se da uleína, sendo observados picos com TR 25,820 min para a uleína de referência (Figura 3) e 25, 556 min para a uleína presente no 15 EEPPVA (Figura 2). A identificação do pico correspondente à uleína no cromatograma do EEPPVA foi confirmada por co-injeção com uleína de referência (Figura 4) e pelos espectros no UV registrados online que apresentam um máximo de absorção em 304,2 nm.

O espectro no IV de APT 13-16 (8) (Figura 5) apresentou absorções 20 correspondentes a deformação axial de ligações C-H (3176 cm^{-1}), estiramento N-H (3040 cm^{-1}), estiramento da ligação C=C em sistema aromático (1535 e 1613 cm^{-1}) e deformação de ligações C-H em anel benzênico orto-dissubstituído, sendo esta a mais intensa do espectro (730 cm^{-1}). Este espectro mostrou muita semelhança com o da uleína (JÁCOME, R.L.R.P. Estudo 25 químico de *Zeyheria montana* M. e *Aspidosperma parvifolium* A.DC. Quantificação, por CLAE de naftoquinonas isoladas de *Z. montana*. Tese UFMG/ICEEx/DQ. Belo Horizonte, 1998, 157p.), como era esperado.

O espectro de massa de APT 13-16 (8) apresentou o íon molecular esperado, em m/z 266, correspondendo à uleína (Figura 6).

Exemplo 3: Avaliação da atividade antiplasmódica

A atividade antiplasmódica do extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium* (EEPPV), fração alcaloídica (EEPPVA) e uleína [APT 13-16 (8)] foi testada pelo método tradicional (RIECKMAN, K.H.; SAX, L.J.; CAMPBELL, 5 G.H.; MRENA, J.F. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An *in vitro* microtechnique. *Lancet*, v.i, p.22-23, 1978./ CARVALHO, L.H. *Quimioterapia experimental com extratos brutos de plantas e compostos quimicamente definidos*).

A avaliação através do método tradicional apresentou os seguintes 10 resultados: no clone W2 (resistente à cloroquina), o extrato etanólico de *A. parvifolium* (EEPPV) apresentou $Cl_{50} 32,75 \pm 1,06 \mu\text{g/ml}$. A fração de alcalóides (EEPPVA) e a uleína mostraram-se ativas ($Cl_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$). No clone 15 3d7(sensível à mefloquina), o extrato etanólico (EEPPV) apresentou atividade antiplasmódica moderada, já a fração alcaloídica (EEPPVA) e a uleína foram ativas ($Cl_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$) (Tabela 1)

Tabela 1: Atividade antiplasmódica, *in vitro*, pelo método tradicional, do extrato etanólico de cascas de *A. parvifolium* (EEPPV), fração de alcalóides (EEPPVA) e uleína

	W2(resistente à cloroquina)		3d7(sensível à mefloquina)	
	$Cl_{50}(\mu\text{g/ml}) \pm$ DP	$Cl_{90}(\mu\text{g/ml}) \pm$ DP	$Cl_{50}(\mu\text{g/ml}) \pm$ DP	$Cl_{90}(\mu\text{g/ml}) \pm$ DP
Cloroquina	$0,02 \pm 0,002$	ND	$0,0013 \pm 0,0001$	$0,0020 \pm 0,0001$
Mefloquina	$0,0165 \pm 0,002$	$0,0895 \pm 0,002$	$0,048 \pm 0,0007$	$0,0975 \pm 0,007$
EEPPV	$32,75 \pm 1,06$	$74,50 \pm 1,34$	$20,51 \pm 0,70$	$38,00 \pm 4,26$
EEPPVA	$1,25 \pm 0,35$	$6,25 \pm 0,76$	$2,45 \pm 1,55$	$8,50 \pm 0,71$
Uleína	$0,75 \pm 0,10$	$1,91 \pm 0,10$	$11,90 \pm 0,10$	$23,25 \pm 2,50$

Exemplo 4: Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

20 A avaliação da citotoxicidade *in vitro* foi realizada através do ensaio colorimétrico do MTT (TWENTYMAN, P.R., LUSCOMBE, M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. British J. Cancer, v. 56, p. 279-285, 1987.)

- EEPPV mostrou-se pouco tóxico para células VERO ($CC_{50} > 500 \mu\text{g/ml}$), enquanto que a fração de alcalóides (EEPPVA) e a uleína mostraram uma citotoxicidade moderada ($100 < CC_{50} < 500 \mu\text{g/ml}$). Quando se determinou o índice de seletividade ($IS = CC_{50}/Cl_{50}$) utilizando-se as Cl_{50} obtidas para o clone 5 W2 (Tabela 1) observou-se que, quanto mais pura a amostra, maior seu índice de seletividade, isto é, a uleína apresentou IS mais alto do que o extrato(EEPPV) e a fração (EEPPVA). Porém quando se utilizam os resultados obtidos com o clone 3d7 (Tabela 1), as alterações nos IS são discretas e menos favoráveis (Tabela 2).
- 10 **Tabela 2:** Citotoxicidade (CC_{50}) e índice de seletividade (IS) de extrato etanólico de cascas de *Aspidosperma parvifolium* (EEPPV), fração de alcalóides (EEPPVA) e uleína.

	$CC_{50}(\text{mg/ml})$	IS (W2)	IS (3d7)
EEPPV	>500	>15,27	>24,38
EEPPVA	299,7	305,82	39,28
Uleína	374,6	499,47	31,47

Exemplo 5: Avaliação da toxicidade *in vivo*

- Os efeitos tóxicos do extrato alcoólico (EEPPV) e da fração rica em 15 alcolóides (EEPPVA) foram avaliados em camundongos após administração aguda (triagem observacional, avaliação da coordenação motora, atividade motora e toxicidade aguda) e em ratos após administração repetida de 28 dias (avaliação comportamental, hematologia, bioquímica sérica e anatomoatrológica). Na triagem observacional, onde os extratos foram 20 administrados oralmente nas doses de 10, 100 e 1000 mg/kg, verificou-se maior toxicidade para a fração EEPPVA.

Os estudos toxicológicos realizados com o extrato EEPPV e a fração EEPPVA indicam certo grau de toxicidade destes extratos quando em doses elevadas, mas boa tolerabilidade em baixas doses, ou seja, até 250 mg/kg 25 (agudo) ou 150 mg/kg (crônico) no caso do EEPPV; ou 75 e 50 mg/kg (agudo e crônico, respectivamente) do EEPPVA.

REIVINDICAÇÕES

- 1- EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE CASCAS DE **ASPIDOSPERMA PARVIFOLIUM**, caracterizado por compreender fração padronizada rica em alcalóides contendo uma faixa de 45 a 60% m/m de uleína, além dos constituintes epiuleína, desmetiluleína e aparcina;
- 2- EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE CASCAS DE **ASPIDOSPERMA PARVIFOLIUM**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender a padronização baseada na otimização dos processos de extração e fracionamento, bem como na atividade antiplasmódica determinada para o principal marcador químico da fração: uleína;
- 3- EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE CASCAS DE **ASPIDOSPERMA PARVIFOLIUM** de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado pela referida fração padronizada enriquecida em alcalóides, e pelo perfil por CLAE característico apresentando, semelhante àquele selecionado da Fig. 3;
- 4- COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DE EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE CASCAS DE **ASPIDOSPERMA PARVIFOLIUM** E/ OU ULEÍNA E SEUS DERIVADOS, caracterizado por compreender fração padronizada rica em alcalóides contendo uma faixa de 45 a 60% m/m de uleína, além dos constituintes epiuleína, desmetiluleína e aparcina e pelo menos um excipiente farmacêutica e farmacologicamente aceitável;
- 5- COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DE EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE CASCAS DE **ASPIDOSPERMA PARVIFOLIUM** E/OU ULEINA E SEUS DERIVADOS de acordo com a reivindicação 4, caracterizada por apresentar atividade antiplasmódica;
- 6- COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DE EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE CASCAS DE **ASPIDOSPERMA PARVIFOLIUM** E/OU ULEINA E SEUS DERIVADOS de acordo com as reivindicações 4 e 5, caracterizada por ser administrada pelas vias oral, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, transdérmica ou como dispositivos que possam ser implantados ou injetados; sendo preferencialmente administrada por via oral;

7- COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DE EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE CASCAS DE *ASPIDOSPERMA PARVIFOLIUM* E/OU ULEINA E SEUS DERIVADOS de acordo com as reivindicações 4 a 7, caracterizada por ser na preparação de medicamentos para tratar malária;

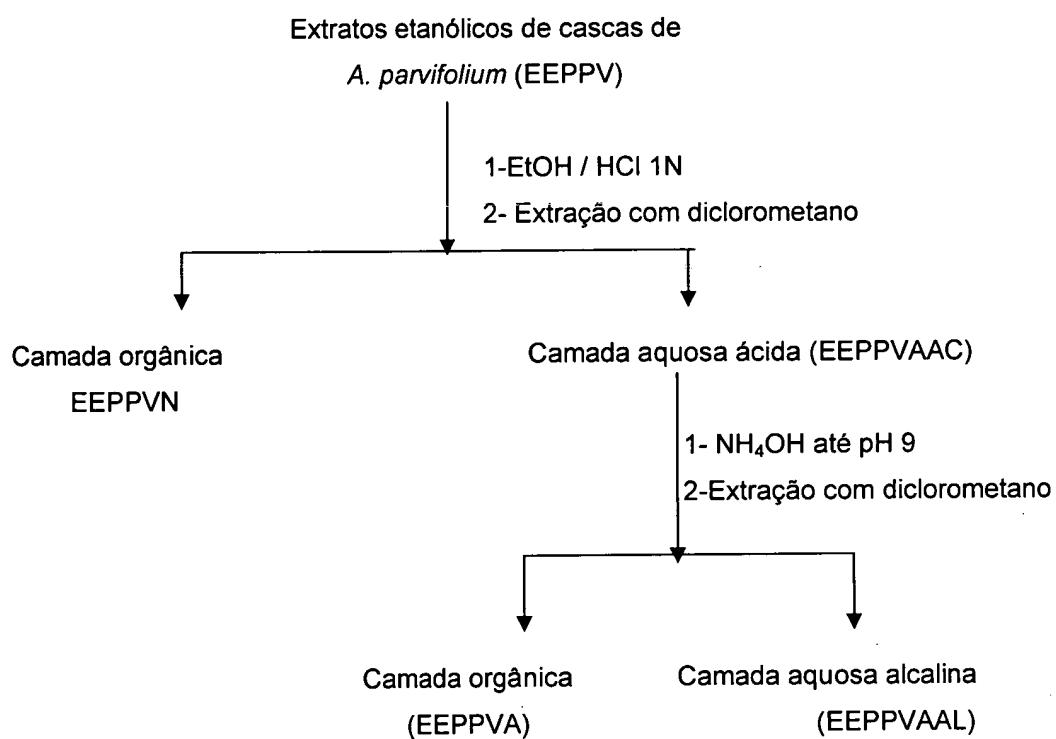
FIGURAS

Figura 1

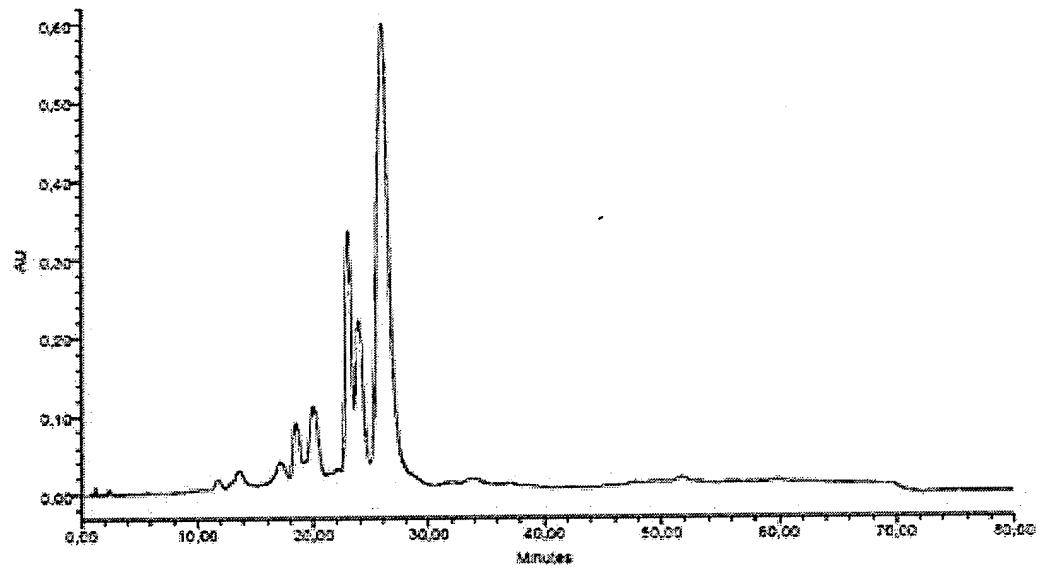


Figura 2

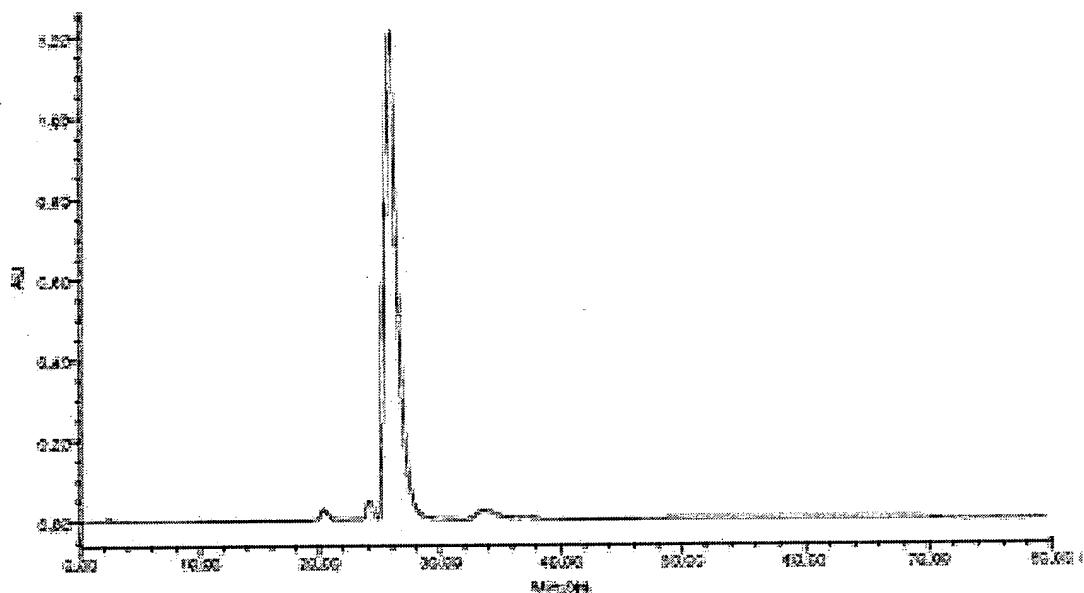


Figura 3

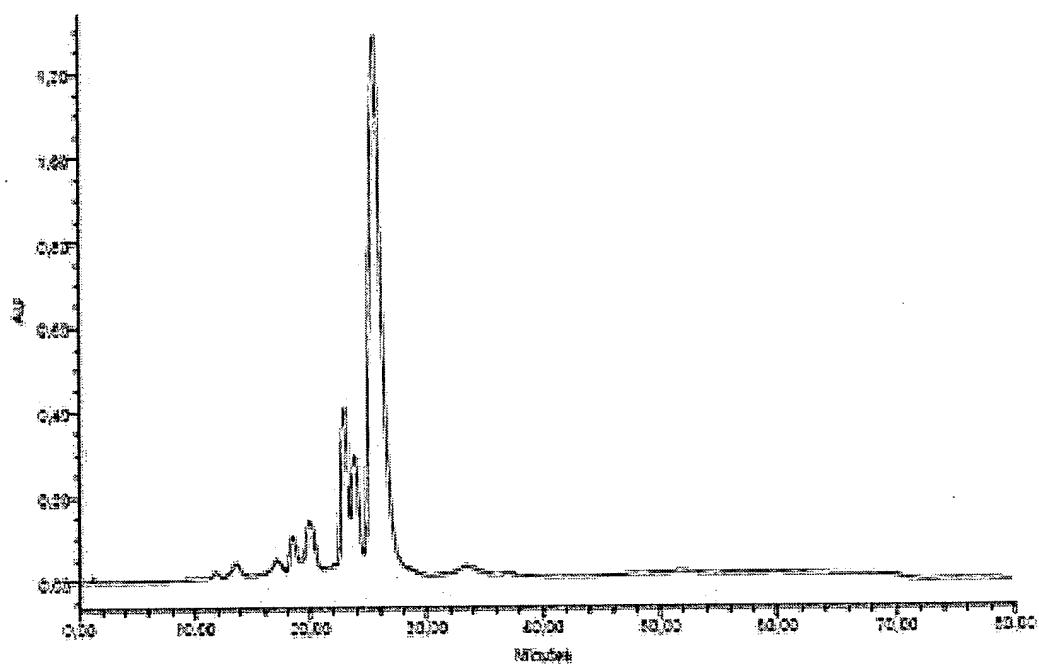


Figura 4

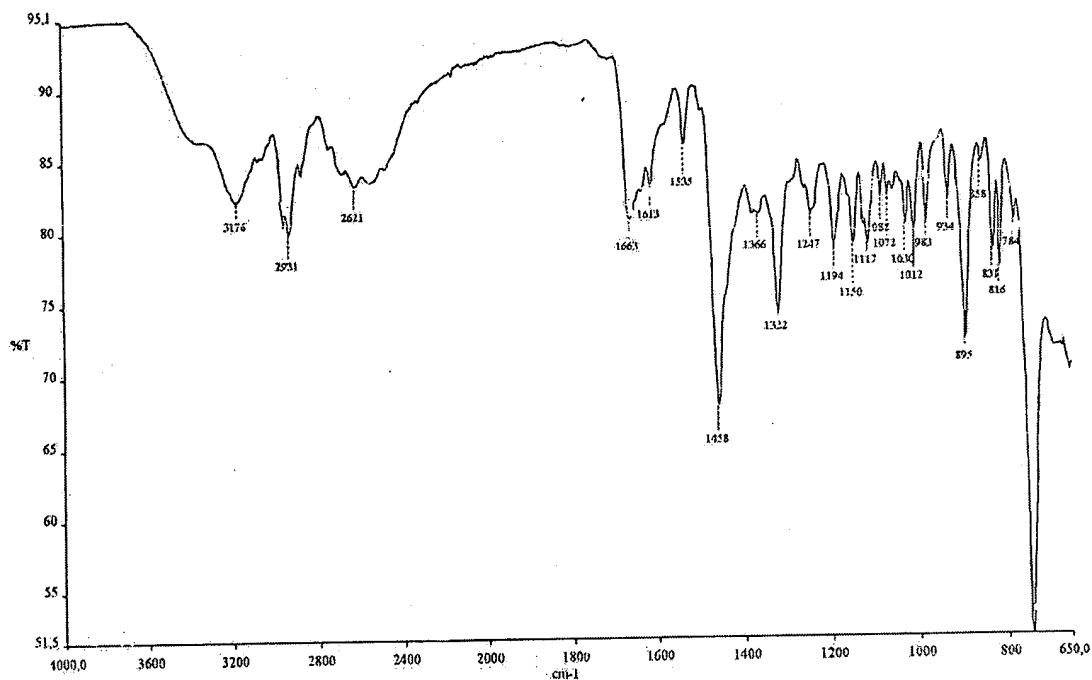


Figura 5

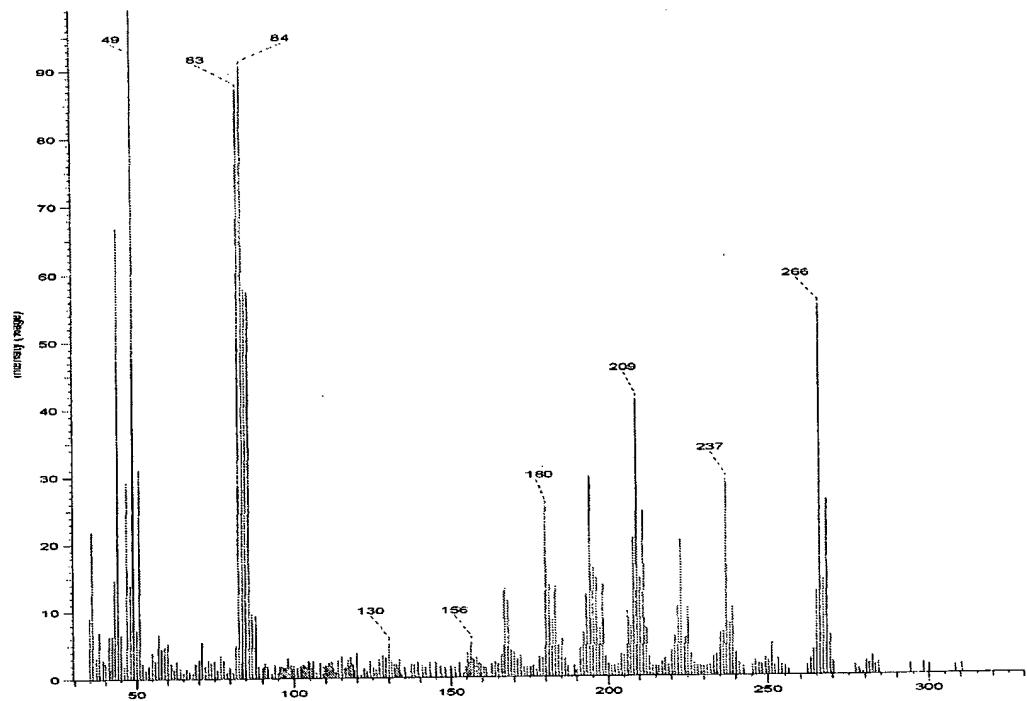


Figura 6

PT0905584-3

RESUMO

"EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE CASCAS DE ASPIDOSPERMA PARVIFOLIUM E SUA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA"

A presente invenção descreve o processo para obtenção de extrato e fração padronizados de *Aspidosperma parvifolium*, popularmente denominada "pau-pereira, guatambu ou peroba", além do isolamento e purificação da uleína. A invenção compreende, ainda, a obtenção de composições farmacêuticas que contêm o extrato, fração derivada e/ou uleína, bem como sua utilização para o tratamento da malária.

O extrato, fração e uleína apresentados foram ensaiados e mostraram atividade antiplasmódica, particularmente contra *Plasmodium falciparum*.

NILDA MARIA ALVES

**ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E DA TOXICIDADE EXPERIMENTAL
(AGUDA E SUBAGUDA) DO EXTRATO ETANÓLICO DA CASCA DO
GUATAMBU (*Aspidosperma subincanum* Mart.)**

**BRASÍLIA
2007**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E DA TOXICIDADE EXPERIMENTAL
(AGUDA E SUBAGUDA) DO GUATAMBU (*Aspidosperma subincanum* Mart.)**

NILDA MARIA ALVES

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Ciências da
Saúde, Faculdade de Ciências da
Saúde, Universidade de Brasília, como
um dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Ciências da Saúde.

**BRASÍLIA
2007**

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho, fruto de muito trabalho e ausências, aos meus pais José Augusto e Nila (in memorian),

*Ao meu filho Gabriel Augusto,
Às minhas irmãs Maria José e Neide e aos meus sobrinhos Cássio e Fábio.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo seu infinito amor e bondade em nos conceder o dom da sabedoria.

Ao meu filho Gabriel Augusto, pelos ensinamentos, companheirismo, amor e estímulo.

Aos meus pais José Augusto e Nila, ausentes materialmente, mas pela força do amor, presença constante em minha vida.

As minhas queridas irmãs Maria José e Neide, meus queridos sobrinhos Cássio e Fábio, minhas queridas tias Helena e Neli, pelo apoio e amizade sempre presente.

Minha gratidão, reconhecimento e agradecimentos especiais à Prof^a. Dr^a. Dâmaris da Silveira e ao Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha, pela doação de si mesmos, pelo empenho incansável na orientação e co-orientação, pelo exemplo de profissionalismo, por terem acreditado em mim e sempre me incentivado. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. José Realino de Paula, por todo o seu conhecimento e indispensável ajuda na concretização deste trabalho.

À Prof^a. MSc. Leonice Manrique Faustino Tresvenzol, pelas informações e sugestões.

Aos laboratórios Salute de Goiânia e Diagnose de Rio Verde e toda equipe de funcionários, o meu muito obrigado pela valiosa cooperação.

À Prof^a. Dr^a. Clévia Ferreira Duarte Garrote, diretora da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, por gentilmente ter cedido toda a estrutura física para a realização deste trabalho.

À FESURV – Universidade de Rio Verde, UnB – Universidade de Brasília e toda direção, grandes responsáveis por este momento.

Aos bolsistas e colegas do NEPET-UFG – Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas da Universidade Federal de Goiás e à aluna de iniciação científica Raquel Goloni, pela contribuição neste trabalho.

Às mais que amigas, companheiras de luta, Helemi e Ângela, pela brilhante contribuição profissional e sobre tudo, pelo ombro amigo nos momentos de angústia.

E a todos os amigos, colegas de trabalho, professores e alunos, que de uma forma ou de outra me ajudaram. Obrigada! Valeu! A vitória é nossa.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADA – Associação Americana de Diabetes
ALT - L-alanina-aminotransferase
ALP – Fosfatase alcalina
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST – L-aspartato-aminotransferase
Cpe – Células pétreas
CPK – Creatinina fosfoquinase
Cpr – Cristais prismáticos
Cs – Canal secretor
DL50 - Dose letal 50%
DLA – Dose Letal Aproximada
DM – *Diabetes mellitus*
DMSO – Dimetilsulfóxido
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
EEAS – Extrato etanolílico de *Aspidosperma subincanum*
e.p.m – Erro padrão da média
Esc – Células esclereides
EtOH – Etanol
Fg – Fibras gelatinosas
Fl- Fibras lignificadas
g – Grama
Ga – Grãos de amido
GGT – Gama-glutamiltransferase
GGP – Gama-glutamilpeptidase
Gl – Gota de material lipídico
g/L – grama por litro
HB - Hemoglobina

HCM – Hemoglobina Corpuscular Média
HEM – Hemáceas
HT - Hematócrito
IA – Índice Afrosimétrico
ICB – Instituto de Ciências Biológicas
i.p. – Via intraperitoneal
MCHC – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
mg/kg – Miligramma por quilograma
mL – Mililitro
nm – Nanômetro
OECD – Organisation for Economic Cooperation and Development
OMS – Organização Mundial de Saúde
p.o. – Per os
PMN – Polimorfonucleares
p/v – Peso por volume
RDC – Resolução de Diretoria Colegiada
Rp – Raios parenquimáticos
SR – Solução reagente
Su - Súber
TGP – L-alanina-aminotransferase
TGO – L-aspartato-aminotransferase
UFG – Universidade Federal de Goiás
UNICEF – Fundo das Nações Unidas para a Infância
UV – Ultravioleta
VCM – Volume Corpuscular Médio

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	Ácido aristolóquico.	x
FIGURA 2 –	Ácido ginkgólico.	xi
FIGURA 3 –	Epiisopilosina.	xiv
FIGURA 4 –	Vimblastina.	xvii
FIGURA 5 –	Sulfato de vincristina.	xvii
FIGURA 6 –	Trigonelina.	xviii
FIGURA 7 –	Conofilina.	xix
FIGURA 8 –	Epicatequina.	xx
FIGURA 9 –	Catequina.	xx
FIGURA 10 –	Epigalocatequina.	xx
FIGURA 11 –	Ácido tânico.	xxi
FIGURA 12 –	Metoxibenzoazazolinona.	xxi
FIGURA 13 –	Ácido escopárico A.	xxii
FIGURA 14 –	Ácido escopárico B.	xxii
FIGURA 15 –	Ácido escopárico C.	xxii
FIGURA 16 –	Ácido escopadúlcico A.	xxii
FIGURA 17 –	Ácido escopadúlcico B.	xxii
FIGURA 18 –	Geissospermmina.	xxiv
FIGURA 19 –	Geissosquizolina (pereirina)	xxiv
FIGURA 20 –	Velosina.....	xxv
FIGURA 21 –	Uleína.	xxv
FIGURA 22 –	β -ioimbina.	3
FIGURA 23 –	Alcalóides de <i>Aspidosperma spruceanum</i>	4
FIGURA 24 –	Lupeol.....	5
FIGURA 25 –	Estigmasterol.....	5
FIGURA 26 –	Epiuleína.....	5
FIGURA 27 –	Desmetiluleína.....	

FIGURA 28 –	Apariciina.....	5
FIGURA 29 –	Ramiflorina A	6
FIGURA 30 –	Ramiflorina B	6
FIGURA 31 –	10 Methoxygeissoschizol	6
FIGURA 32 –	Usambarina.	7
FIGURA 33 –	Usambaresina.	8
FIGURA 34 –	Caureno	8
FIGURA 35 –	Linalol.	8
FIGURA 36 –	β -Cariofileno.....	8
FIGURA 37 –	α -Copaeno.....	8
FIGURA 38 –	Ioimbina.....	10
FIGURA 39 –	Alcalóides presentes em <i>Aspidosperma pyrifolium</i>	10
FIGURA 40 –	Alcalóides presentes em <i>Aspidosperma megalocarpom</i>	11
FIGURA 41 –	Alcalóides presentes em <i>Aspidosperma subincanum</i>	12
FIGURA 42 –	Alcalóides presentes em <i>Aspidosperma subincanum</i>	12
FIGURA 43 –	Alcalóides presentes em <i>Aspidosperma subincanum</i>	13
FIGURA 44 –	Procedimento para o teste de classificação de toxicidade iniciando com dose de 2000 mg/kg (OECD Guia 423).	28
FIGURA 45 –	Procedimento para o teste de classificação de toxicidade iniciando com dose de 5000 mg/kg (OECD Guia 423).	29
FIGURA 46 –	Secção transversal da casca de <i>Aspidosperma subincanum</i> submetidas ao reagente de Etzold. A - Região de súber e parênquima cortical. B e C – Região de parênquima cortical. D – Região floemática. Su – súber, Cpe – células pétreas, Cpr – cristais prismáticos, Fg - fibras gelatinosas, Fl – fibras lignificadas, Esc – esclereides, Cs – canal secretor, Rp – raios parenquimáticos, Ga – grãos de amido.....	39
FIGURA 47 –	Secções transversal e longitudinal radial da casca de <i>Aspidosperma subincanum</i> submetidas ao reagente de Steinmetz. A – Secção transversal da região cortical mostrando a presença de canal secretor (Cs) com material lipídico. B - Secção transversal da região floemática. C – Secção longitudinal radial da região cortical. Cs –	40

canal secretor, Gl – gota de material lipídico, Fl – fibra lignificada. .	
FIGURA 48 – Secções longitudinais radiais da casca de <i>Aspidosperma subincanum</i> submetidas ao reagente de Etzold. A – Região de parenquima cortical. B – Região floemática Fg – fibra gelatinosa, Fl – fibra lignificada.	41
FIGURA 49 – Microscopia do pó da casca de <i>A. subincanum</i> submetido ao reagente de Steinmetz. Fl – fibra lignificada envolvida por bainha cristalífera, Fg – fibra gelatinosa, Cpe – célula pétreia, Ga – grãos de amido, Cpr – cristal prismático.	42
FIGURA 50 – Efeito EEAS (125, 250 e 500 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros bioquímicos da urina ($X \pm DP$) em ratos Wistar adultos tratados por 30 dias consecutivos. (p.o.; n=8).....	51
FIGURA 51a – Efeito EEAS 125, 250 e 500 mg/kg administrado por via oral sobre os parâmetros hematológicos em ratos Wistar adultos tratados por 30 dias consecutivos. (p.o.; n=8).....	57
FIGURA 51b- Efeito EEAS 125, 250 e 500 mg/kg administrado por via oral sobre os parâmetros hematológicos em ratos Wistar adultos tratados por 30 dias consecutivos. (p.o.; n=8).....	58
FIGURA 52- Análise Histopatológica – Órgãos afetados durante o Teste de Toxicidade Subaguda.....	61
FIGURA 53- Análise Histopatológica dos animais do grupo satélite – Reversibilidade da integridade tecidual.....	62
FIGURA 54- Efeito EEAS 125, 250 e 500 mg/kg administrado por via oral sobre peso dos ratos Wistar adultos tratados por 30 dias consecutivos. (p.o.; n = 8).....	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Espécies constantes na Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos (RE 89/2004).....	xiii
TABELA 2 - Protocolo de diluição e administração do EEAS em camundongos para determinação da toxicidade aguda.....	31
TABELA 3 - Prospecção fitoquímica a partir do pó da casca de <i>Aspidosperma subincanum</i> . Mart.	43
TABELA 4 – Efeito EEAS 125, 250 e 500 mg/kg administrado por via oral sobre peso dos ratos Wistar adultos tratados por 30 dias consecutivos. (p.o.; n = 8).....	47
TABELA 5 – Efeito EEAS (125, 250 e 500 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros bioquímicos da urina ($X \pm DP$) em ratos Wistar adultos tratados por 30 dias consecutivos. (p.o.; n = 8).....	49
TABELA 6 – Efeito EEAS (125, 250 e 500 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros hematológicos em ratos Wistar adultos tratados por 30 dias consecutivos. (p.o.; n = 8).....	55
TABELA 7 – Efeito EEAS (125, 250 e 500 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros bioquímicos do sangue em ratos Wistar adultos tratados por 30 dias consecutivos. (p.o.; n = 8).....	56
TABELA 8 - Metodologia e equipamentos utilizados na realização dos exames laboratoriais.....	34

SUMÁRIO

LISTA DE IATURAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	vi
INTRODUÇÃO	vii
1. Plantas medicinais utilizadas como antidiabéticas	xiv
1.1 Diabetes Tipo 1.....	xv
1.2 Diabetes Tipo 2.....	xv
OBJETIVOS	1
1. Objetivo geral	1
1.1 Objetivos específicos.....	1
CAPÍTULO 1: GÊNERO <i>ASPIDOSPERMA</i>: QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA	2
1. O gênero Aspidosperma	3
1.1 Aspidosperma subincanum Mart.....	11
1.1.1 Descrição botânica (GOMES, S. M. 1997)	13
1.1.2 Sinonímia: Aspidosperma subincanum Mart.	13
CAPÍTULO 2: PARTE EXPERIMENTAL	15
1. Material Botânico	15
2. Obtenção do Extrato	15
3. Estudos Farmacognósticos	15
3.1 Reagentes gerais	15
3.1.1 Reagente de Steinmetz (OLIVEIRA et al., 2005)	15
3.1.2 Reagente de Etzol (ETZOL, 1993).....	16
3.1.3 Reativo de Liebermann-Burchard (SHARAPIN, 2000).....	16
3.1.4 Solução alcoólica de Brucina (COSTA, 1982).....	17
3.1.5 Reagente de Bertrand (COSTA, 1982).....	17
3.1.6 Solução de Cloreto Férrico (p/v) (COSTA, 1982)	17
3.1.7 Solução de Acetato de Chumbo (p/v) (COSTA, 1982).....	17
3.1.8 Solução de NaOH (p/v) (COSTA, 1982)	17
3.1.9 Solução de Gelatina a 2,5% (p/v) em solução de NaCl a 5% (p/v) (COSTA, 1982)	17
3.1.10 Reagente de Mayer (COSTA, 1982)	17
3.1.11 Reagente de Dragendorff (COSTA, 1982).....	18
3.1.12 Reagente de Bouchardat (COSTA, 1982)	18
3.1.13 Reagente de Hager (COSTA, 1982).....	18
3.1.14 Ácido Tânico a 1% (p/v) (COSTA, 1982).....	18
3.1.15 Ácido Tânico 0,5% (p/v) (COSTA, 1982)	18
3.1.16 Reagente de Kedde (COSTA, 1982)	18
3.1.17 Reagente Oxalo-Bórico (COSTA, 1982).....	19
3.2 Análise Macroscópica	19
3.3 Análise Microscópica	19
3.4 Microscopia de Pó	19
3.5 Prospecção Fitoquímica.....	19

3.5.1 Heterosídeos Antraquinônicos.....	20
3.5.2 Esteróides e Triterpenóides	20
3.5.2.1 Reação de Liebermann-Burchard	20
3.5.2.2 Reação para Núcleo Esteroidal.....	21
3.5.2.3 Reação de Keller-Kiliani	21
3.5.3 Reação de Kedde	21
3.5.4 Flavonóides.....	21
3.5.4.1 Reação de Shinoda	21
3.5.4.2 Reação Oxalo-bórica	22
3.5.4.3 Reação com Hidróxidos Alcalinos	22
3.5.4.4 Reação com o AlCl ₃	22
3.5.4.5 Reação com FeCl ₃	22
3.5.5 Índice de Espuma	23
3.5.6 Taninos	23
3.5.7 Alcalóides	24
3.5.8 Cumarinas.....	24
3.5.9 Resinas.....	24
3.5.10 Testes de Pureza	24
3.5.10.1 Determinação do Teor de Umidade (perda por dessecção)	25
3.5.10.2 Determinação do Teor de Cinzas Totais.....	25
3.5.10.3 Determinação de Cinzas Sulfúricas	25
4. Ensaios Biológicos	26
4.1 Animais.....	26
4.2 Fármacos/Reagentes	26
4.3 Toxicidade Aguda	26
4.3.1 Teste de Toxicidade Aguda	29
4.4 Toxicidade Subaguda	31
4.4.1 Tratamento dos animais.....	31
4.4.2 Observações realizadas.....	32
4.4.3 Exames Laboratoriais	33
4.4.3.1 Exames hematológicos e bioquímicos.....	33
4.4.4 Exames Histopatológicos	34
4.4.4.1 Processamento do material para microscopia de luz:.....	34
5. Análises Estatísticas	35
CAPÍTULO 3: RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
1 Perfil Farmacognóstico.....	37
1.1 Análise macroscópica da casca.....	37
1.2 Análise microscópica da casca	38
1.3 Prospecção fitoquímica	43
1.4 Testes de pureza	44
1.4.1 Determinação do teor de umidade	44
1.4.2 Determinação do teor de cinzas totais	44
1.4.3 Determinação do teor de cinzas insolúveis.....	45

2 Avaliação da toxicidade de EEAS.....	45
2.1 Toxicidade aguda.....	45
2.2 Toxicidade subaguda	46
2.2.1 Análise laboratorial	49
2.2.1.1 Análise dos parâmetros bioquímicos e celulares da urina.....	49
2.2.1.2 Análise hematológicos.....	52
2.2.1.3 Análise histopatológica	59
CAPÍTULO 4: CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS LIOGRÁFICAS.....	66

RESUMO

Embora no Brasil existam normas e legislação para garantir a segurança e qualidade dos fitoterápicos, para muitas das plantas utilizadas popularmente, não há registros facilmente disponíveis de suas características macroscópicas ou de marcadores químicos. Dessa forma, informações que possam fornecer subsídios para a correta identificação e garantia dos três princípios fundamentais para um medicamento – qualidade, eficácia e segurança – são necessárias, principalmente para aquelas espécies que têm uso mais evidente no Brasil. O cerrado goiano é muito rico em espécies medicinais, que se devidamente utilizadas podem trazer benefícios substanciais, sobretudo às populações mais carentes. Uma das espécies utilizadas na região é o guatambu (*Aspidosperma subincanum* Mart.) no tratamento do diabetes e da hipercolesterolemia. Sendo assim, os objetivos deste estudo foram o de realizar a caracterização farmacognóstica e avaliar a toxicidade pré-clínica (toxicidade aguda e subaguda) do extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum* Mart.(EEAS). A caracterização farmacognóstica do guatambu, além de ser uma contribuição para a informação sobre plantas medicinais brasileiras, *per si*, forneceu parâmetros a serem empregados no controle de qualidade do guatambu utilizado como matéria prima na preparação de fitoterápicos. Os efeitos da administração oral aguda e subaguda do extrato etanólico de *Aspidosperma subincanum* Mart. foram investigados pelo método *screening* hipocrático, pelos parâmetros hematológicos e bioquímicos e pela análise histopatológica em ratos Wistar adultos e machos. Na avaliação da toxicidade aguda os animais foram tratados com doses únicas de EEAS (500, 1000, 2000, 3000 e 5000 mg/kg de peso) e observados por 24 horas, sendo que não foi observado qualquer sinal de toxicidade ou morte, o que sugere que o EEAS é praticamente atóxico em exposição aguda a altas doses. No estudo da toxicidade subaguda, os ratos foram tratados durante 30 dias consecutivos com EEAS por via oral nas doses de 125, 250, 500 mg/kg de peso. Os resultados mostraram que durante o período de tratamento, o EEAS provocou poucas alterações nos níveis séricos, assim como não houve modificações nos pesos dos animais. Na avaliação histopatológica EEAS provocou alterações celulares nos rins, pulmões e fígado em todas as doses avaliadas, caracterizando que tais órgãos foram lesados pela administração de EEAS. Entretanto, tais sinais de toxicidade demonstraram reversibilidade após 30 dias. Assim, nas condições experimentais, EEAS apresentou uma baixa toxicidade.

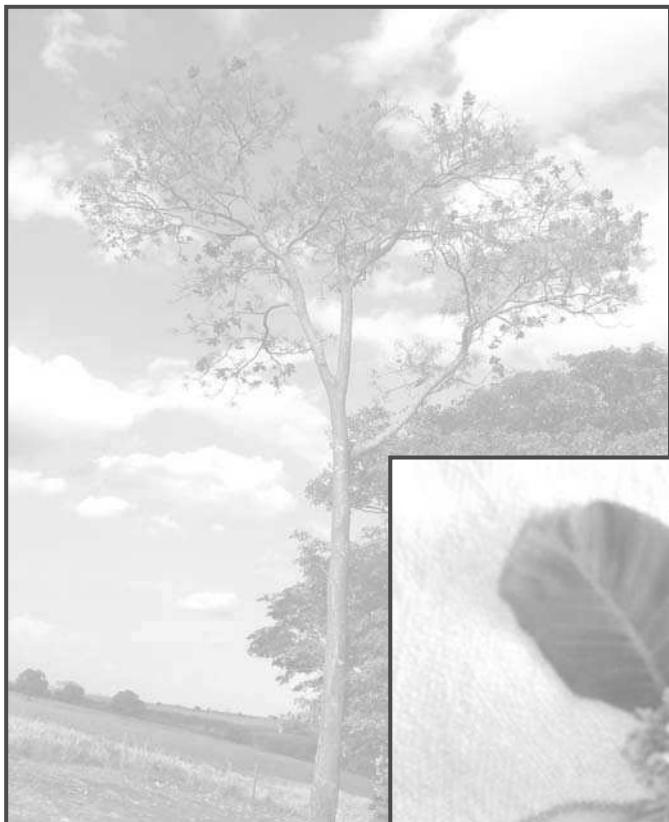
Palavras-chave: Guatambu, *Aspidosperma subincanum* Mart., Farmacognosia, Toxicidade

ABSTRACT

Although in Brazil there are norms and legislation to guarantee the safety and quality of the phytotherapeutic, for many of the plants used popularly, there are not easily available registrations of their macroscopic characteristics or of chemical markers. In that way, information that can provide subsidies for the correct identification and guarantee of the three fundamental principles for a medicine is necessary - quality, effectiveness and safety - mainly for those species that have more evident use in Brazil. The savannah from the state of Goiás, Brazil, is very rich in medicinal species that, if properly used, can bring substantial benefits, especially to the poor populations. One of the species used in the area it is the *guatambu* (*Aspidosperma subincanum Mart.*) in the treatment of the diabetes and of the hypercholesterolemia. Thus, the objectives of this study were to accomplish the pharmacognostic characterization and to evaluate the pre-clinic toxicity (acute and sub-acute toxicity) of the ethanolic extract of the peel of the stem of *Aspidosperma subincanum Mart.* (EEAS). The pharmacognostic characterization of the *guatambu*, besides being a contribution for the information on Brazilian medicinal plants, itself, provided parameters to be applied in the quality control of the *guatambu* used as raw material in the preparation of the phytomedicinel. The effects of the acute and sub-acute oral administration of the ethanolic extract of *Aspidosperma subincanum Mart.* were investigated by the hippocratic screening method, by the hematological and biochemical parameters and by the histopathological analysis in Wistar mice - adults and males. In the evaluation of the acute toxicity the animals were treated with only doses of EEAS (500, 1000, 2000, 3000 and 5000 mg/kg of weight) and observed for 24 hours, considering that no sign of toxicity or death was observed, which suggests that EEAS is practically non-toxicant in acute exhibition to high doses. In the study of the sub-acute toxicity, the mice were treated orally for 30 consecutive days with EEAS in the doses of 125, 250, 500 mg/kg of weight. The results showed that during the treatment period, EEAS provoked few alterations in the serical levels, as well as there were not modifications in the weights of the animals. In the histopathological evaluation EEAS provoked cellular alterations in the kidneys, lungs and liver in all the doses evaluated, characterizing that such organs were harmed by the administration of EEAS. However, such toxicity signs demonstrated reversibility after 30 days. So, in the experimental conditions, EEAS presented a low toxicity.

Key words: Guatambu, *Aspidosperma subincanum* Mart., Farmacognosy, Toxicity

INTRODUÇÃO



INTRODUÇÃO

Sabe-se que o uso de plantas medicinais sobre várias formas de apresentação é bastante comum em várias camadas da população brasileira. Tal hábito parte do pressuposto de que as plantas medicinais, além de possuírem atividade terapêutica, são desprovidas de efeitos tóxicos. Este aspecto é importante se considerarmos que o conhecimento sobre plantas medicinais é de domínio popular e em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos, contém um forte componente social e cultural, pois estas plantas muitas vezes representam o único recurso terapêutico de muitas comunidades.

Em geral as plantas medicinais utilizadas possuem pouca ou nenhuma comprovação científica de suas propriedades farmacológicas. Apesar da crescente importância dos fitoterápicos, relativamente poucos estudos foram realizados a fim de comprovar sua eficácia e segurança, sendo que muitas plantas ainda são utilizadas com base somente no conhecimento popular bem estabelecido (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que cerca de 80% da população de países em desenvolvimento não têm acesso a qualquer atendimento primário à saúde seja pela distância dos centros de saúde ou por falta de recursos financeiros e, desta forma, possuem as plantas medicinais como única fonte de cuidados básicos à saúde. Assim, conhecer sobre possíveis efeitos indesejáveis que esse arsenal terapêutico possa apresentar, torna-se de suma importância. Nesse sentido, a OMS e o Fundo das Nações Unidas para a Infância (Unicef), promoveram a Conferência internacional sobre a Atenção Primária em Saúde em Alma-Ata (Genebra, 1978), a partir da necessidade de ação urgente dos governos, profissionais das áreas de saúde, bem como da comunidade mundial, para proteger e promover a saúde dos povos no mundo. A Declaração de Alma-Ata apoiou o emprego de fitoterápicos de eficácia comprovada em políticas nacionais de medicamentos.

A OMS desempenhou um papel ativo na identificação e na promoção de fitoterápicos seguros e eficazes para uso na atenção primária à saúde, e apoiou com firmeza o emprego de medicamentos à base de plantas medicinais para promover a saúde das comunidades, formulando para isso uma série de diretrizes para aprovar e permitir a venda de produtos fitoterápicos sem prescrição médica (OMS, 1991).

No intuito de estabelecer as diretrizes para a atuação do governo brasileiro na área de plantas medicinais e fitoterápicos, foi elaborada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que constitui parte essencial das políticas públicas de saúde, meio ambiente, desenvolvimento social e econômico como um dos elementos fundamentais de transversalidade na implementação de ações capazes de promover melhorias na qualidade de vida da população brasileira. Essa política foi aprovada por meio do Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006 (BRASIL, 2006).

Por sua vez, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS, pactuada na Comissão Intergestores Tripartite, aprovada pelo Conselho Nacional de Saúde no ano de 2005 e publicada por meio da Portaria Nº 971, de 03 de maio de 2006, propôs a inclusão de plantas medicinais, fitoterapia, homeopatia, medicina tradicional chinesa, acupuntura e termalismo social/crenoterapia como opções terapêuticas no sistema público de saúde (BRASIL, 2006). Esse documento trouxe, dentre suas diretrizes para plantas medicinais e fitoterapia, a elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais e de Fitoterápicos (Rename-Fito), e o provimento do acesso a plantas medicinais e fitoterápicos aos usuários do SUS (BRASIL, 2006).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tem elaborado normas para a regulamentação dos medicamentos fitoterápicos. A Resolução de Diretoria Colegiada, RDC nº 48 de 16 de março 2004 tem como base principal a garantia da qualidade do medicamento para o consumidor por meio de vários critérios que abrangem avaliação farmacêutica, padrões para o material vegetal bruto, composição das preparações fitoterápicas, estabilidade do produto final e comprovação da eficácia e segurança (BRASIL, 2004).

Anterior à RDC 48, a Resolução RE nº 88, de 20 de janeiro de 2004, estabeleceu uma lista de referências bibliográficas para a avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos a ser utilizada no registro de novos medicamentos. A

publicação de tal lista veio acompanhada pela publicação de uma lista de espécies (TABELA 1) (RE nº 89/2004) para os quais é dispensada a comprovação de eficácia e

segurança através da consideração de uma série de documentações de um longo período de uso (BRASIL, 2004a).

A toxicidade das plantas medicinais pode parecer trivial quando comparada com aquela apresentada pelos dos medicamentos convencionais; entretanto, não é verdade. A toxicidade de plantas medicinais é um problema de saúde pública. Os casos de efeitos nefro e hepatotóxicos ocasionados pela utilização do confrei (*Symphytum officinale* L., Boraginaceae) tiveram repercussão nacional. Outro exemplo é o cipó-mil homens, (*Aristolochia cymbifera* Mart & Zucc., Aristolochiaceae) que contém ácido aristolóquico (FIGURA 1), que pode causar deficiência renal com alta taxa de mortalidade (SIMÕES *et al.*, 2003).

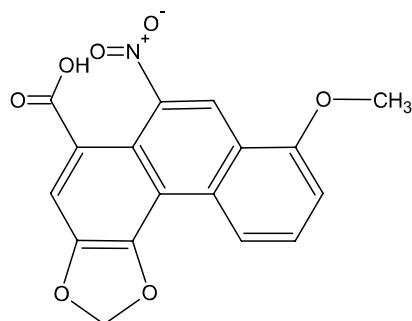


FIGURA 1 – ácido aristolóquico

Uma das espécies encontradas na lista da RE 89/2004 é a *Calendula officinalis* (Asteraceae), que é utilizada mundialmente como antiinflamatório e cicatrizante e para a qual podem ser encontrados vários estudos quanto à atividade biológica e à toxicidade. A administração de extratos hidroalcoólicos em ratas não alterou os parâmetros bioquímicos e hematológicos, bem como a massa dos órgãos. Porém, foi observado o aumento nos níveis séricos de uréia e alanina aminotransferase (ALT), sugerindo sobrecarga renal e hepática (SILVA *et al.*, 2005). Em 2001, o International Journal of Toxicology publicou o relatório final sobre a segurança de *C. officinalis* (Final Report on the Safety Assessment of Calendula Officinalis Extract and Calendula Officinalis), no qual foi concluído que, até aquele momento, não havia dados suficientes para

assegurar a segurança do uso dessa espécie e seu extrato em formulações cosméticas (anônimo, 2001).

Sobre o *Ginkgo biloba* (Ginkgoaceae), também na lista de registro simplificado, há relatos de casos de efeitos tóxicos em pessoas idosas, como hemorragia intracerebral espontânea, hematoma subdural lateral, hemorragia parietal, dentre outras (CUPP, 2000).

O ácido ginkgólico (FIGURA 2), alquilfenóis e outros compostos presentes nos extratos de ginkgo apresentam um alto nível de potencial tóxico (BARON-RUPPERT; LUEPK, 2001).

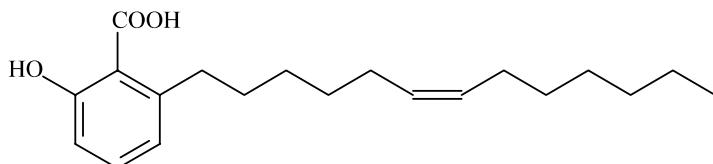


FIGURA 2 – ácido ginkgólico

Uma rápida busca na literatura sobre os efeitos tóxicos sobre a kava-kava (*Piper methysticum*), revelou uma série de efeitos indesejáveis que o uso dessa planta pode proporcionar. Sedação, diminuição do estado de alerta, fadiga, problemas gastrointestinais, alterações visuais e de equilíbrio são algumas delas. Pode potencializar os efeitos de depressores do sistema nervoso central, tais como etanol e barbituratos. Pode ter efeitos aditivos a inibidores da MAO tipo B (PEPPING, 1999; WOOLTORTON, 2002)

Apesar disso, Turolla e Nascimento (2006), num levantamento da literatura existente sobre a toxicidade de dez plantas medicinais comercializadas com maior freqüência na forma de medicamentos fitoterápico encontraram poucas informações referentes à toxicidade pré-clínica sobre maracujá (*Passiflora incarnata* L., Passifloraceae), ginkgo (*Ginkgo biloba* L. Ginkgoaceae), castanha da índia (*Aesculus hippocastanum* L, Hippocastanaceae), plantago (*Plantago ovata* Forsk, Plantaginaceae), ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer, Araliaceae), kava-kava (*Piper methysticum* G. Forst, Piperaceae), valeriana (*Valeriana officinalis* L. Valerianaceae), erva de São João (*Hypericum perforatum* L., Hypericaceae), erva de São Cristóvão (*Cimicifuga*

racemosa (L) Nutt, Ranunculaceae), cáscara sagrada (*Rhamnus purschiana* D.C., Rhamnaceae). As monografias da Organização Mundial de Saúde e da Comissão E contemplam as dez plantas, porém apresentam poucos dados sobre as informações pesquisadas.

A *Mentha crispa* (Lamiaceae), conhecida popularmente como hortelã-da-folha-miúda, é explorada comercialmente como amebicida e giardicida, podendo ser

encontrada em diversos fitoterápicos. Dimech *et al.* (2006) observaram que o extrato alcoólico de *M. crispa* não apresentou sinais de toxicidade e não alterou os índices reprodutivos dos ratos machos. Entretanto, algumas espécies de menta, como a *M. arvensis*, apresentaram efeitos adversos sobre a fertilidade de ratos fêmeas e machos, como alterações da viabilidade dos espermatozoides, ausência de espermatozóide na cauda do epidídimo, redução da prole e da massa dos órgãos reprodutivos em ratos (KANJANAPOTHI *et al.*, 1981; MATHUR, 1991).

Esses exemplos sinalizam que, quando não há estudos toxicológicos detalhados, a experiência documentada do uso de longo prazo sem evidências de problemas de segurança pode ser um indicativo para a avaliação do risco, mas sem constituir uma base para afirmar a segurança incondicional do uso de determinada planta/ fitoterápico. E considerando que qualquer substância ingerida em excesso é potencialmente prejudicial, nenhum material de origem vegetal é exceção a esse princípio geral (ELDIN, DUNFORD, 2001).

Segundo informes epidemiológicos do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), o número de adultos e crianças vítimas de intoxicações pelo uso indevido de plantas tem aumentado muito nos últimos anos (SINITOX, 1991).

A *Jatropha gossypiifolia* L. (Euphorbiaceae), conhecida como pinhão roxo, é catalogada como planta tóxica, mas várias partes da planta são utilizadas na medicina popular para o tratamento de diversas doenças, como úlceras pépticas, diabetes, neoplasias, diarréias e ainda como remédio cicatrizante e diurético. Estudos pré-clínicos de dose única desta planta em ratos sugeriram uma baixa toxicidade. Os sinais de toxicidade observados foram: ptose palpebral, perda de peso e paralisia do trem posterior (MARIZ *et al.*, 2006).

Entretanto, casos de intoxicação como os citados não devem ser motivo para que plantas medicinais e/ou fitoterápicos sejam banidos do arsenal terapêutico. Ao contrário, devem servir de estímulo para que os estudos sobre a atividade farmacológica e a toxicidade sejam rotineiros e uma exigência para o registro de fitoterápicos.

A *Tabebuia avellanedae* (Bignoniaceae), conhecida popularmente como pau-d'arco é utilizada na medicina popular da região nordeste do Brasil como analgésico, antiinflamatório, antineoplásico e diurético. A administração do extrato aquoso da

entrecasca desta planta apresentou atividade antinociceptiva e antiedemogênica e baixa toxicidade aguda (MIRANDA *et al.*, 2002).

TABELA 1 – Espécies constantes na Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos (RE 89/2004)

Espécie	Sinonímia popular
<i>Aesculus hippocastanum</i> L.	Castanha da Índia
<i>Allium sativum</i> L.	Alho
<i>Aloe vera</i> (L.) Burm f.	Babosa ou aloe
<i>Arctostaphylos uva-ursi</i> Spreng.	Uva-ursi
<i>Arnica montana</i>	Arnica
<i>Calendula officinalis</i> L.	Calêndula
<i>Centella asiatica</i> (L.) Urban, <i>Hydrocotile asiatica</i> L.	Centela, Gotu kola
<i>Cimicifuga racemosa</i> (L.) Nutt.	Cimicífuga
<i>Cynara scolymus</i> L.	Alcachofra
<i>Echinacea purpurea</i> Moench	Equinácea
<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalipto
<i>Ginkgo biloba</i> L.	Ginkgo
<i>Hamamelis virginiana</i>	Hamamelis
<i>Hypericum perforatum</i> L.	Hipérico
<i>Matricaria recutita</i> L.	Camomila
<i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reiss.	Espinheira-Santa
<i>Melissa officinalis</i> L.	Melissa, Erva-cidreira
<i>Mentha piperita</i> L.	Hortelã-pimenta
<i>Mikania glomerata</i> Sprengl.	Guaco
<i>Panax ginseng</i> C. A. Mey.	Ginseng

Passiflora incarnata L	Maracujá, Passiflora
Paullinia cupana H.B.&K.	Guaraná
Peumus boldus Molina	Boldo, Boldo-do-Chile
Pimpinella anisum L.	Erva-doce, Anis
Piper methysticum Forst. f.	Kava-kava
Polygala senega	Polígala
Rhamnus purshiana DC.	Cáscara Sagrada
Salix alba L.	Salgueiro branco
Senna alexandrina Mill.	Sene
Serenoa repens (Bartram) J.K. Small	Saw palmetto
Symphytum officinale L.	Confrei
Tanacetum parthenium Sch. Bip.	Tanaceto
Valeriana officinalis	Valeriana
Zingiber officinale Rosc.	Gengibre

Fonte: Visa Legis (2006)

O teste de toxicidade aguda em ratos, pelo método de classes, da espécie *Eucalyptus saligna* (Myrtaceae), mostrou que o extrato aquoso das folhas na dose de 2000 mg/kg provocou sonolência, letargia e diminuição de resposta a estímulos sem, contudo, levar a óbito (PADILLA *et al.*, 1999).

O jaborandi, *Pilocarpus microphyllus* Stapf. (Rutaceae), tradicionalmente conhecido como fonte da pilocarpina, fármaco utilizado no tratamento de glaucoma, contém vários alcalóides secundários que são estimulantes do sistema nervoso parassimpático, semelhante à pilocarpina. Um desses alcalóides, a episipilosina (FIGURA 3), utilizado em avaliações farmacológicas para a determinação da DL₅₀ e em screening hipocrático, utilizando o camundongo como modelo experimental, apresentou DL₅₀ duas vezes maior que a da pilocarpina; e em doses acima de 300 mg/kg pode causar tremores e convulsões (LUCIO *et al.*, 2000).

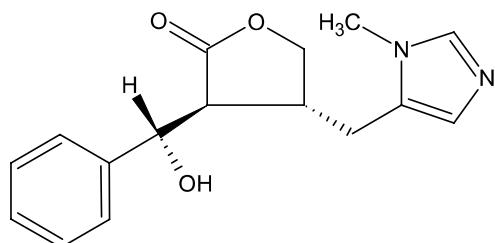


FIGURA 3 – epiisopilosina

1. Plantas medicinais utilizadas como antidiabéticas

O *Diabetes mellitus* (DM) compreende um grupo de doenças metabólicas, com etiologias diversas, caracterizado por hiperglicemia que resulta de uma deficiente secreção de insulina pelas células *B* do pâncreas ou resistência periférica à ação da insulina, ou ambas. A hiperglicemia crônica do diabetes freqüentemente está associada com dano, disfunção e insuficiência de vários órgãos, principalmente olhos, rins, coração e vasos sanguíneos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2005).

Atualmente o DM é um dos problemas de saúde pública de maior relevância, seja pelo número de pessoas afetadas, seja pelas complicações que comprometem a produtividade, a qualidade de vida e a sobrevida dos indivíduos, tudo isso ainda, aliado aos altos custos para seu controle metabólico e tratamento de suas complicações.

A prevalência e incidência do DM estão crescendo em proporções epidêmicas. Atualmente existem cerca de 120 milhões de diabéticos no planeta e estima-se que no ano 2025 serão aproximadamente 300 milhões de pacientes acometidos (WINER; SOWERS, 2004; LEFEBVRE; PIERSON, 2004).

O DM pode ser dividido em tipos e sua classificação, de acordo a Associação Americana de Diabetes (ADA) e baseia-se na etiologia da doença, a saber:

1.1 Diabetes Tipo 1

Neste tipo a hiperglicemia permanente se manifesta quando 90% das ilhotas são destruídas. Acredita-se que o processo seja desencadeado pela agressão das células beta por fator ambiental (sobretudo infecções virais), em indivíduos geneticamente susceptíveis (TRUCCO, 2005; EISENBARTH, 2004).

Em geral, os pacientes acometidos por esse tipo têm índice de massa corpórea normal, mas a presença de obesidade não exclui o diagnóstico. Apresentam ainda, como

característica marcante, a tendência à cetose, requerendo obrigatoriamente, insulina como tratamento (NEWTON; RASKIN, 2004).

No Brasil, a incidência anual é estimada em torno de 8,4/100.000 (REWERS *et al.*, 2004). Cerca de 80% dos casos surgem antes dos 18 anos, podendo, contudo, surgir em qualquer idade, inclusive na oitava e na nona década de vida.

1.2 Diabetes Tipo 2

O DM do tipo 2 se caracteriza, em geral, por graus variáveis de resistência à insulina e deficiência relativa de secreção de insulina. Acomete habitualmente, a pacientes com mais de 40 anos, embora possa ocorrer mais cedo, mais raramente em adolescentes. Na maioria dos casos, o paciente tem excesso de peso e a cetoacidose ocorre apenas em situações especiais. É responsável por 80% a 90% de todos os casos de diabetes no mundo (POERTER; BARRETT, 2004).

Aproximadamente 80% a 90% dos pacientes com DM tipo 2 apresentam também síndrome metabólica, que tem como característica fatores que implicam em risco cardiovascular elevado, tais como dislipidemia, obesidade abdominal, resistência insulínica, tolerância alterada à glicose e hipertensão (LAAKSONEN *et al.*, 2004).

Os principais mecanismos fisiopatológicos que levam à hiperglicemia no DM tipo 2 são: a resistência periférica à ação insulínica nos adipócitos e, principalmente, no músculo esquelético; a secreção deficiente de insulina pelo pâncreas e o aumento da produção hepática de glicose, resultante da resistência insulínica no fígado (ALBERTI *et al.*, 2004; VINER *et al.*, 2004).

O tratamento medicamentoso inicial no DM tipo 2 é feito com hipoglicemiantes ou anti-hipoglicemiantes orais, ressaltando aí a importância de se fazer, concomitante ao tratamento medicamentoso, uma reeducação alimentar, modificações no estilo de vida, que incluem suspensão do fumo, baixo consumo de bebidas alcoólicas e aumento da atividade física, uma vez que após o aparecimento do DM, há uma degeneração progressiva do controle glicêmico, independente do emprego de agentes antidiabéticos (UKPDS, 1998), o que leva a pelo menos 30% dos indivíduos afetados requererem insulinoterapia para a obtenção de um controle glicêmico

adequado. Isso ocorre, basicamente devido à resistência à insulina e à produção deficiente da mesma, caracterizando o DM 2 como uma doença evolutiva (VILAR, 2006).

Sendo uma doença crônica, muitos pacientes procuram alternativas à farmacoterapia tradicional e não raro utilizam plantas medicinais para “baixar o açúcar do sangue”, muitas vezes buscando o conhecimento acumulado na sua herança cultural familiar, ou indicações de conhecidos e, mais recentemente, seguindo os modismos alimentados pela propaganda, explícita ou não.

A Etnobotânica e estudos experimentais relatam o uso de muitas espécies de plantas para o tratamento dos sintomas de diabetes, tais como *Allium sativum* L. (Liliaceae), *Aloe sp.* L. (Liliaceae), *Catharanthus roseus* L. (Apocynaceae), *Baccharis genistelloides* var *trimera* Less. (Asteraceae), *Allium cepa* L. (Liliaceae); *Annona muricata* L. (Annonaceae), *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae); *Bauhinia forficata* L. (Caesalpiniaceae), *Phyllanthus sp.* L. (Euphorbiaceae), *Brumelia sartorum* Roem. & Schut. (Sapotaceae), *Punica granatum* L. (Punicaceae), *Bowdichia virgiliooides* Kunth (Fabaceae), dentre outras (CARVALHO *et al.*, 2005).

Negri (2005) relatou que há um grande número de plantas hipoglicemiantes utilizadas popular ou experimentalmente que apresentam grande variação filogenética indicando a natureza variada de constituintes ativos utilizados como antidiabéticos.

A espécie *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae) conhecida popularmente como cipó-pucá, anil-trepador, cortina ou insulina é utilizada para o tratamento de diabetes e outras doenças como epilepsia e reumatismo. Um estudo utilizando o extrato aquoso de folhas desta planta durante sete dias, mostrou ser este capaz de diminuir os níveis de glicose no sangue em ratos com diabetes induzido por aloxana. O extrato mostrou-se eficiente nas doses de 100 e 200 mg/kg a partir do quarto dia e não apresentou efeitos hepatotóxicos, sugerindo seu potencial terapêutico para o diabetes tipo II (VIANA *et al.*, 2004).

A espécie *Catharanthus roseus* L. (Apocynaceae) é conhecida por apresentar alcalóide indólicos, dos quais talvez os mais importantes sejam a vimblastina (FIGURA 4) e a vincristina (FIGURA 5), potentes para o tratamento de linfomas e leucemias. Além desta atividade terapêutica, a medicina popular indiana utiliza chá das folhas desta planta para o tratamento de diabetes. Ensaios pré-clínicos em coelhos com diabetes

induzidas por aloxanoa, comprovaram a atividade anti-hiperglicemiante deste chá, possivelmente por estimular o aumento da secreção de insulina (NAMMI *et al.*, 2003).

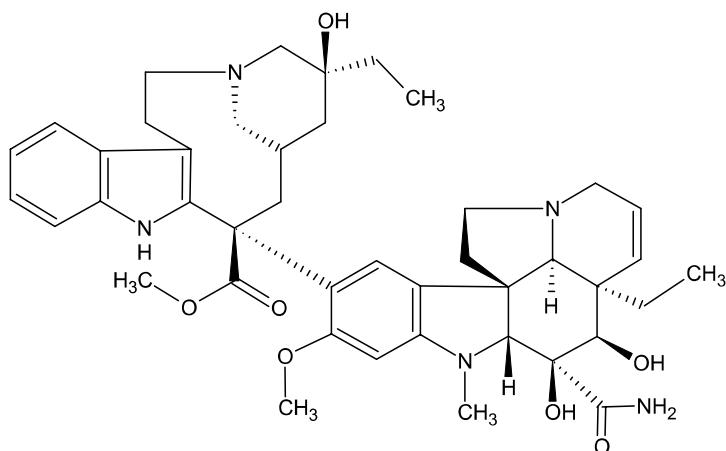


FIGURA 4 – vimblastina

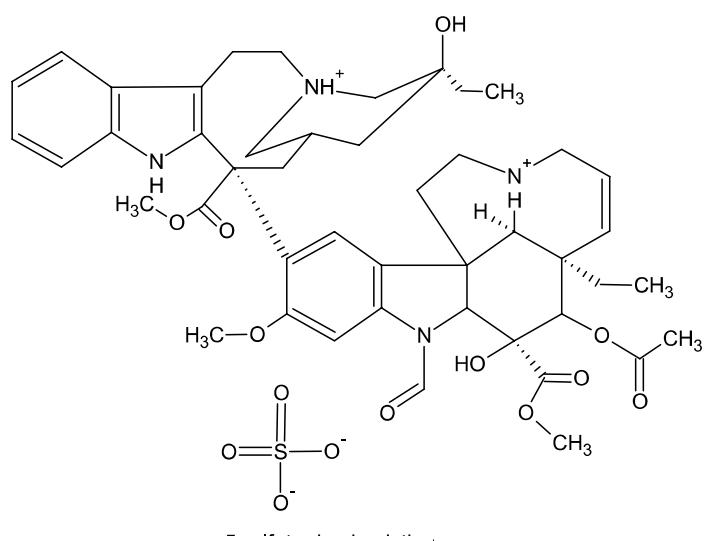


FIGURA 5 – sulfato de vincristina

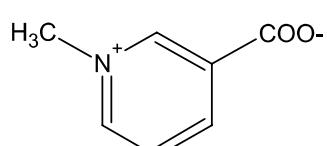


FIGURA 6 – trigonelina

Em um estudo de revisão, Silva e Cechinel Filho (2002) relataram que espécies do gênero *Bauhinia* (Caesalpiniaceae), conhecidas popularmente como pata-de-vaca ou unha-de-boi são amplamente utilizadas no Brasil e em outros países no tratamento de infecções, dor e diabetes. A ação hipoglicemiante de plantas medicinais deste gênero é uma das suas atividades farmacológicas mais conhecida popularmente e também investigada cientificamente. Os estudos utilizando as espécies *B. divaricata*, L., *B. candicans* Benth e *B. forficata* L. mostraram efeitos hipoglicemiantes em modelos experimentais como diabetes induzidos por aloxano ou estreptozotocina, sendo que na espécie *B. candicans* o efeito foi atribuído ao alcalóide trigonelina (FIGURA 6). Além de alcalóides, terpenos, esteróides, estilbenos e flavonóides já foram isolados neste

gênero, mas ainda há poucos estudos que correlacionam os compostos até agora isolados com seus efeitos biológicos.

Pesquisadores da Universidade de Brasília verificaram que o chá da folha da planta conhecida como pata-de-vaca (*Bauhinia variegata*, L. Caesalpiniaceae), utilizado comumente como hipoglicemiante, ativa o receptor PPAR-gama, um potente estimulador da insulina. Entretanto sua ação não é seletiva, atuando em outros receptores como o de estrogênio, podendo aumentar o risco de câncer de útero e mama (COSTA, 2005).

Um estudo no qual compostos de origem natural e sintética foram avaliados quanto à capacidade de modificarem células fazendo com que adquiram a capacidade de produzir insulina, a conofilina (FIGURA 7) um alcalóide da *Catharanthus roseus* L.

(Apocynaceae) mostrou uma atividade dose-dependente interessante. No mesmo trabalho os autores determinaram a relação estrutura-atividade e concluíram que a estrutura dimérica dos alcalóides aspidospermínicos contendo o anel diidofurano central é essencial para tal atividade indutora de diferenciação celular (UMEZAWA *et al.*, 2003).

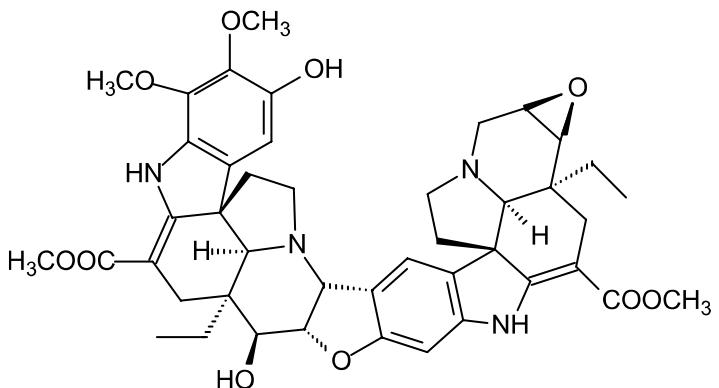


FIGURA 7 – conofilina

O chá do lenho de *Picrasma crenata* (Vell) Engl (Simaroubaceae), conhecida como quássia-do-Brasil, cedro-branco, quássia amarga, pau-tente, pau-amarelo, pau-rosa, quássia, reduziu a glicemia tanto em camundongos com diabetes induzido por estreptozotocina, quanto em camundongos normais. Essa ação ocorreu pela diminuição da absorção e pelo aumento da excreção renal da glicose (IKEGAME; PEREIRA, 2003).

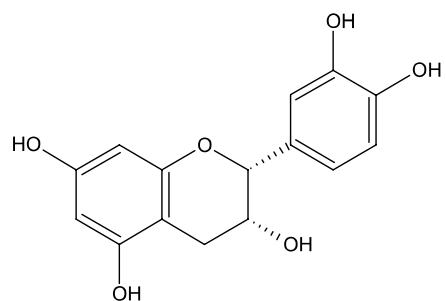


FIGURA 8 – epicatequina

Além do efeito hipoglicemiante, extratos de espécies ricas em determinados metabólitos secundários, dos quais se destacam os derivados fenólicos epicatequina, catequina e epigalocatequina, e ácido tântico (FIGURAS 8 - 11), isoflavonas e saponinas (por exemplo, a glicirrizina), diminuem as complicações do DM advindas do estresse oxidativo e, consequentemente, a destruição tecidual (ROCHAL *et al.*, 2006).

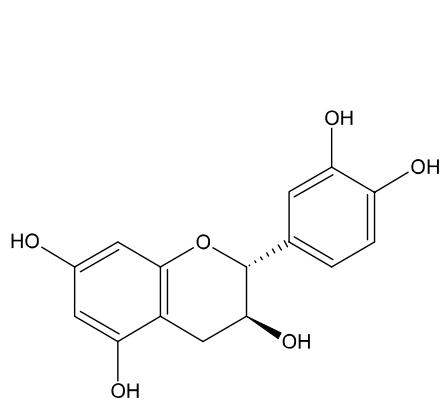


FIGURA 9 – catequina

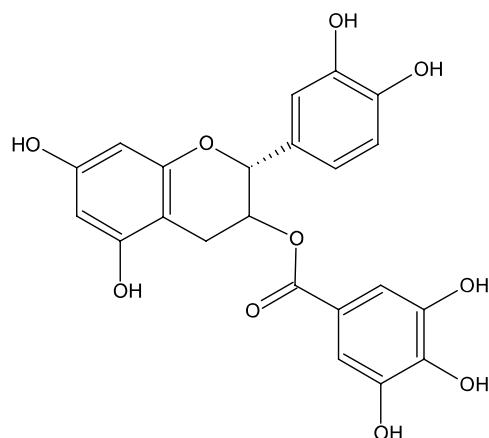


FIGURA 10 – epigalocatequina

As atividades antioxidante e antidiabética da espécie *Scoparia dulcis* (Scrophulariaceae), conhecida com vassourinha doce, utilizada na etnomedicina para o tratamento de diabetes, foi investigada em cérebro de ratos com diabetes induzido por estreptoziotocina. Os autores monitoraram a atividade das enzimas antioxidantes catalase, glutationa peroxidase, glutationa-S-transferase e da glutationa e os níveis de lipoperóxidos (TBARS) e hidroperóxido, além da concentração de insulina no soro e

glicose no sangue. O extrato aquoso da planta inteira provocou redução na formação de lipoperóxidos e hidroperóxidos no cérebro, estimulou a atividade da insulina, reduzindo a glicose e aumentando a atividade das enzimas, mostrando que a planta é hipoglicemiante e estimulante de enzimas varredoras de radicais livres. Estudos mostraram que esta planta é rica no alcaloide 6-metoxibenzoazolinona (6-MBOA) (FIGURA 12) e terpenóides como ácidos escopárico A, B e C e ácidos escopadúlcico A e B (FIGURA 13 - 17), que parecem ser os responsáveis pela depleção de radicais livres (PARI; LATHA, 2004).

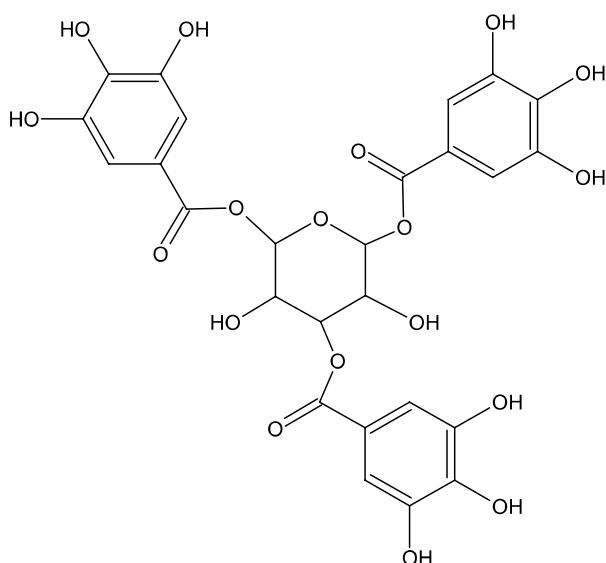


FIGURA 11 – ácido tânico

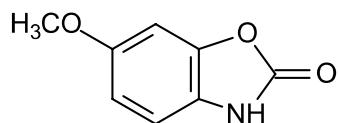


FIGURA 12 – metoxibenzoxazolinona

Uma das plantas medicinais utilizadas no Brasil para o tratamento do DM é o guatambu, nome popular de várias espécies do gênero *Aspidosperma* (*A. macrocarpon*, *A. australe*, *A. ramiflorum*, *A. polyneuron*, *A. olivaceum*, *A. subincanum*) (Apocynaceae) (CASTELON, 2001; GUARIN NETO; MORAIS et. al.; 2006), que também são comercializadas com outros nomes populares, como pau-pereira, peroba, guatambu amarelo.

A mesma sinonímia para diversas espécies do gênero faz com que, muitas vezes, seja praticamente impossível a identificação correta das espécies utilizadas como plantas medicinais.

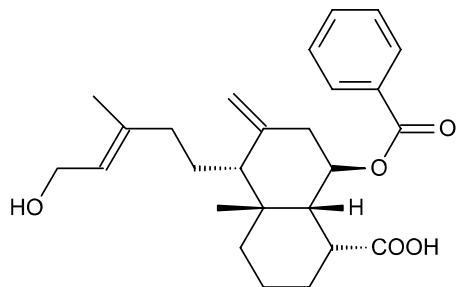


FIGURA 13 – ácido escopárico A

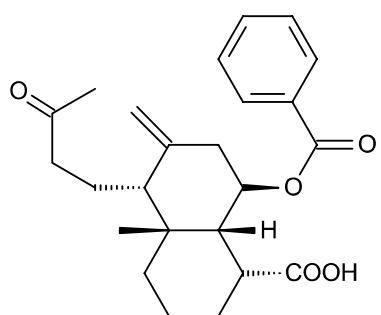


FIGURA 14 – ácido escopárico B

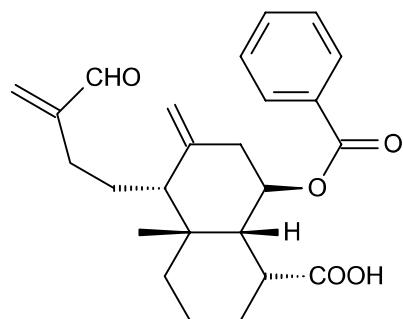


FIGURA 15 – ácido escopárico C

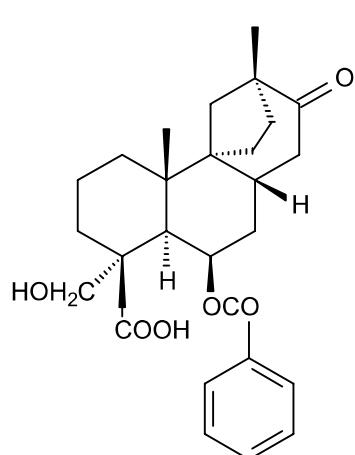


FIGURA 16 – ácido escopadúlcico A

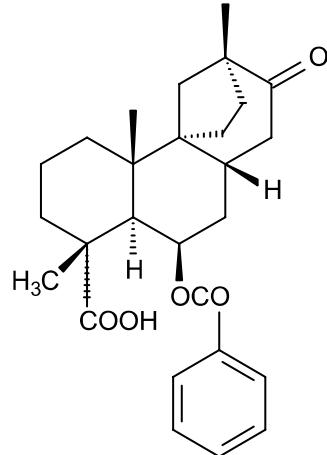


FIGURA 17 – ácido escopadúlcico B

Em um programa de levantamento florístico (Biota), no interior de São Paulo, região característica de Mata Atlântica e Cerrado, foram analisadas cerca de 300 plantas com propriedades farmacológicas diferentes, dentre as quais se encontra a espécie *Aspidosperma olivaceum*, com ação antibiótica. Esta espécie, à semelhança de outras espécies do gênero, também é conhecida popularmente como guatambú e peroba, no entanto com propriedade farmacológica divergente destas (CASTELON, 2001).

Em um relato a respeito da vida, dos costumes e cultura da região de uma senhora raizeira chamada Dona Flor, do Povoado de Moinho no município de Alto Paraíso, Goiás, Attuch (2006) observou que as espécies *A. macrocarpon* e *A. tomentosun* são conhecidas na região com os nomes de peroba, amargoso, bolsinha, orelha-de-elefante, pereiro, peroba-amargosa, peroba-cetim, peroba-comum, peroba-mirim, peroba miúda, peroba-do-rio, peroba-rosa, peroba-de-são-paulo e peroba-do-cerrado.

Estudos realizados por Tresvenzol *et al.* (2006) apontam que em Goiânia é muito comum a presença do “raizeiro” em feiras livres, mercados municipais, praças e avenidas. Neste trabalho, algumas plantas, como por exemplo, chapéu de couro (*Echnodorus* sp.), pata de vaca (*Bauhinia* sp.), assa-peixe (*Vernonia* sp.) foram identificadas apenas quanto ao gênero, pois diferentes espécies são utilizadas como apresentando as mesmas propriedades terapêuticas; no caso da planta conhecida como vergateza não se conseguiu identificar nem o gênero. Estes fatos evidenciam a necessidade das autoridades sanitárias regulamentarem o comércio destas plantas, reforçando o cuidado quanto a identificação botânica da espécie comercializada.

O papel dos raizeiros deve ser valorizado, pois seus conhecimentos são fundamentais na pesquisa etnobotânica e etnofarmacológica. Porém, nos últimos anos, em função do desemprego, várias pessoas com pouca experiência têm sido levadas para esta atividade, descaracterizando-a e gerando pseudo-raizeiros, que acabam levando a indicações incorretas das plantas ditas medicinais e com tradição na fitoterapia popular (TRESVENZOL *et al.*, 2006).

Apesar de utilizado por portadores de uma enfermidade que apresenta um quadro bastante complicado, e que usualmente requer o uso concomitante de vários medicamentos, ainda pouco se sabe sobre a composição química e as atividades

farmacológica e toxicológica dessas espécies utilizadas e comercializadas como guatambu.

A comercialização de um fitoterápico denominado Tintura de “pau-pereira”, em Belo Horizonte, foi objeto de estudo comparativo com o extrato de *Aspidosperma parvifolium*, popularmente conhecido como “pau-pereira”. Segundo a bula do fitoterápico, o mesmo tratava-se de uma tintura de cascas de *Geissospermum vellosii* (Apocynaceae), também conhecido como “pau-pereira”, contendo os alcalóides geissospermina, pereirina e velosina (FIGURA 18 – 20). O estudo mostrou que *Aspidosperma parvifolium*, não estava presente na tintura de “pau-pereira”, uma vez que a uleína (FIGURA 21), um marcador químico da espécie, não foi detectada no fitoterápico (JÁCOME *et al.*, 2003).

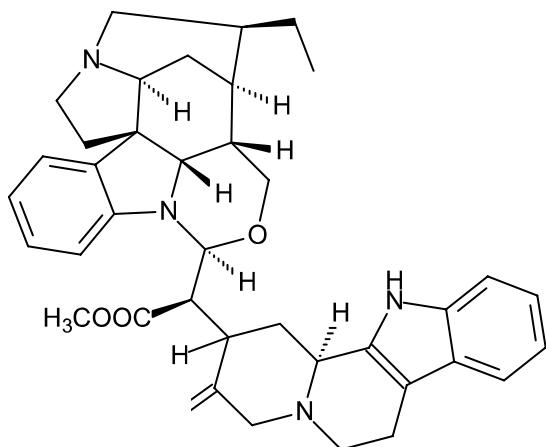


FIGURA 18 – geissospermina

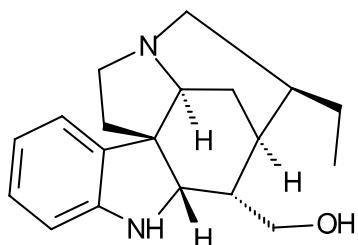


FIGURA 19 – geissosquizolina (pereirina)

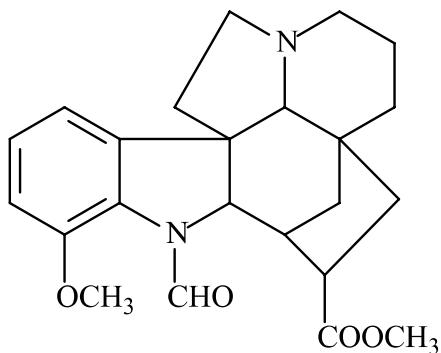


FIGURA 20 – velosina

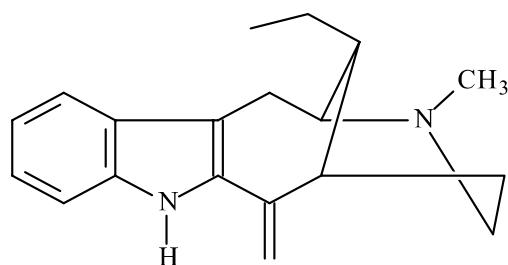


FIGURA 21 - uleína

Nos países em desenvolvimento, bem como nos mais desenvolvidos, os apelos da mídia para o consumo de produtos naturais aumentam a cada dia. Os ervanários, farmácias e lojas de produtos naturais prometem saúde e vida longa, com base no argumento de que plantas usadas há milênios são seguras para a população. Nos Estados Unidos e na Europa há controle no registro e na comercialização dos produtos obtidos de plantas. Nesses países, as normas para a certificação e o controle de qualidade de preparações vegetais são mais rígidos; contudo, vale ressaltar que esta comercialização se dá por preparações produzidas, em geral, a partir de plantas cultivadas, diferentemente daquelas preparações que se utiliza, quase sempre de plantas da flora nativa em que a coleta quase sempre é feita por pessoas pouco preparadas ao reconhecimento das espécies, mais susceptíveis a trocas (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005).

OBJETIVOS

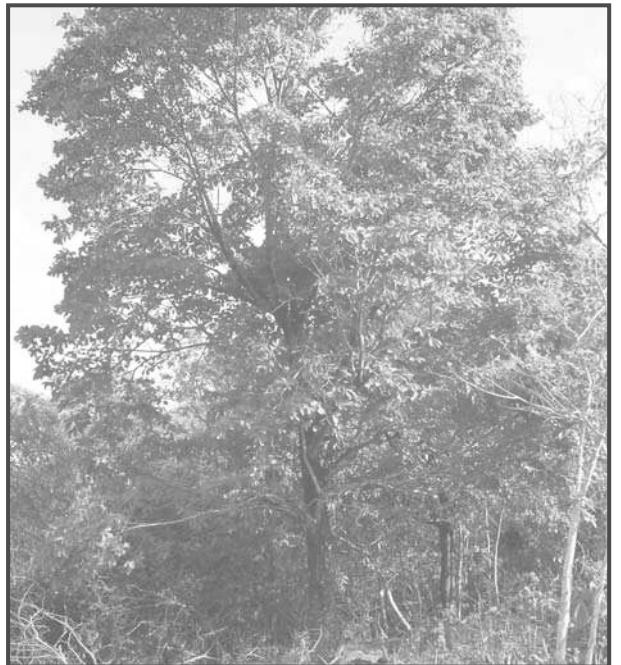
1. Objetivo geral

- Estudo farmacognóstico e toxicológico de *Aspidosperma subincanum* Mart..

1.1 Objetivos específicos

- Realizar o estudo farmacognóstico da casca do caule *Aspidosperma subincanum* Mart.
- Avaliar a toxicidade pré-clínica (toxicidade aguda e subaguda) do extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma subincanum* Mart.

**CAPÍTULO 1: GÊNERO
ASPIDOSPERMA: QUÍMICA E
ATIVIDADE BIOLÓGICA**



CAPÍTULO 1:**GÊNERO *ASPIDOSPERMA*: QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA.****1. O gênero *Aspidosperma***

A família Apocynaceae é composta por cerca de 200 gêneros e 2000 espécies, distribuídas em todos os continentes, nas regiões tropicais e subtropicais e caracteriza-se pela presença de alcalóides. O gênero *Aspidosperma*, por sua vez, é constituído por cerca de 260 espécies que podem ser encontradas desde o México até a Argentina, e é caracterizado por ser fonte de alcalóides indólicos, substâncias nitrogenadas com potentes ações biológicas (JACOME, 2004).

Espécies de *Aspidosperma* são utilizadas popularmente em diversas regiões da América do Sul para finalidades medicinais diversas, que vão desde ação antiprotozoária até atividade antitumoral. A espécie *Aspidosperma illustrum*, por exemplo, é conhecida popularmente como tambu-pequiá. O estudo químico do extrato metanolico das cascas do caule desta espécie, mostrou que ela contém alcalóide indólico β-ioimbina (FIGURA 22), eficaz para o tratamento de impotência sexual masculina, em tratamento com mulheres diabéticas e como complemento para tratamento de pacientes depressivos (BARBOSA *et al.*, 2003).

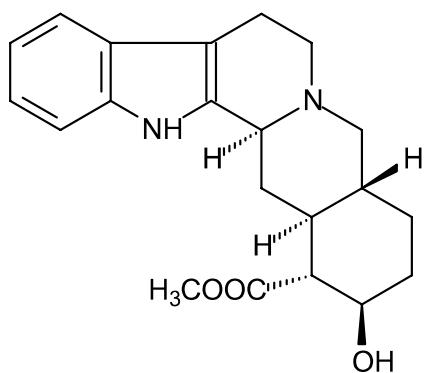


FIGURA 22 – β-ioimbina

O estudo dos extratos hexânico das cascas do caule e metanólico das sementes *in natura* de *Aspidosperma spruceanum* permitiu isolar seis alcalóides (FIGURAS 23) (OLIVEIRA *et al.*, 2006)

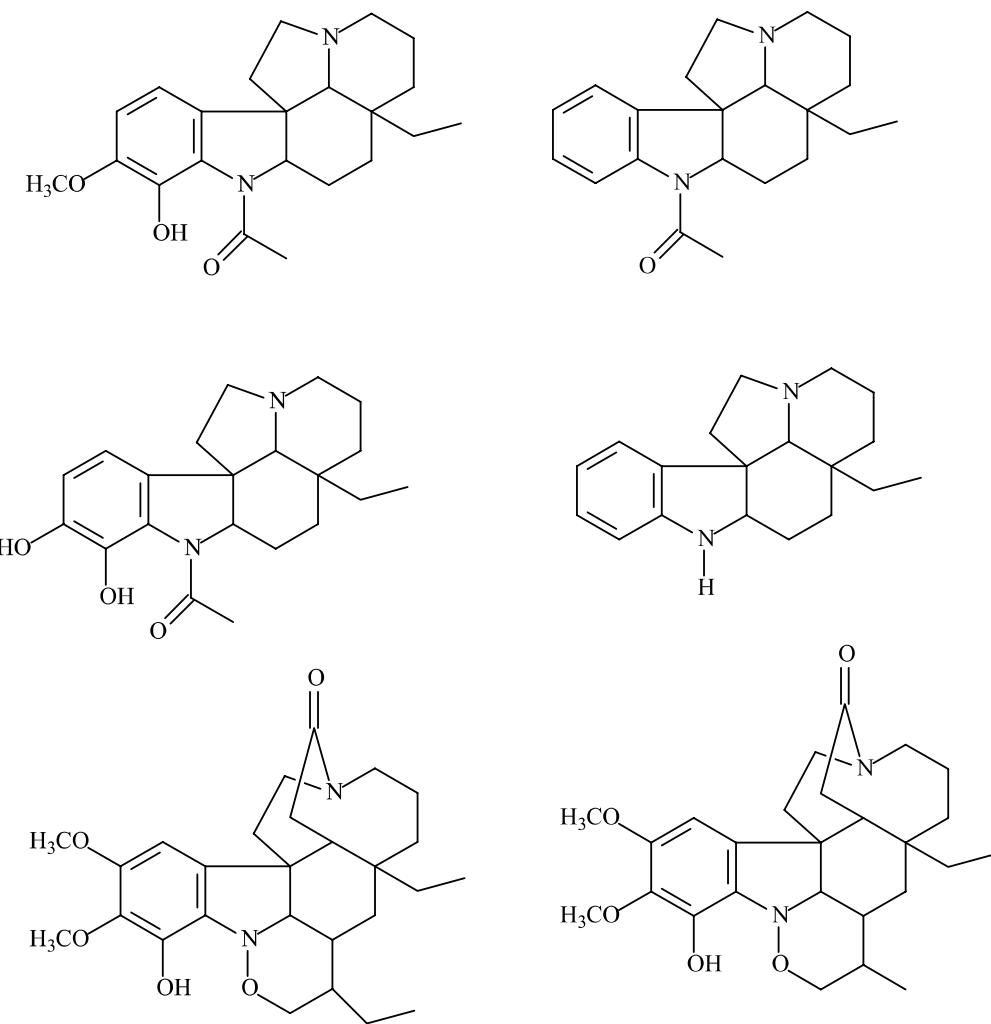


FIGURA 23: Alcalóides de *Aspidosperma spruceanum* (Oliveira *et al.*, 2006).

A análise da composição química de *A. cylindrocarpon*, usado popularmente como febrífugo, mostrou que esta planta apresenta mais de trinta componentes ativos de natureza diversa, tais como hidrocarbonetos, monoterpenos e sesquiterpenos (CORNÉLIO *et al.*, 2005).

A espécie *A. parvifolium*, conhecida popularmente por guatambu, peroba ou pau-pereira, é uma planta medicinal, mas pouco se sabe sobre seu uso popular. O estudo fitoquímico desta espécie permitiu identificar lupeol (FIGURA 24), estigmasterol

(FIGURA 25) e quatro alcalóides, a uleína (FIGURA 21), epiuleína (FIGURA 26), desmetiluleína (FIGURA 27) e apariciina (FIGURA 28) (JACOME et al., 2004).

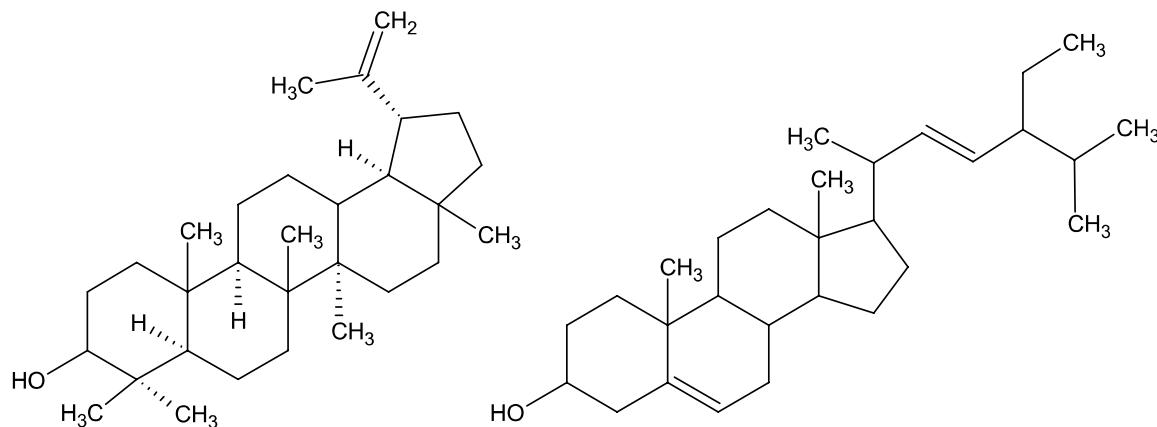


FIGURA 24 – lupeol

FIGURA 25 – estigmasterol

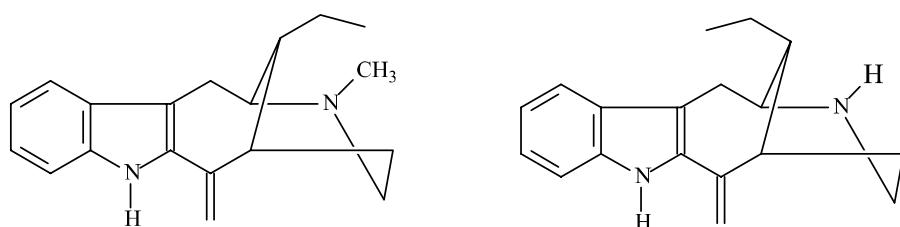


FIGURA 26 – epiuleína

FIGURA 27 – desmetiluleína

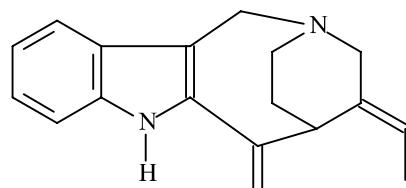


FIGURA 28 – apariciina

A composição da casca e sementes de *Aspidosperma ramiflorum* foi estudada inicialmente por Marques *et al.* (1996) que identificaram os alcalóides bis-indólicos ramiflorina A (FIGURA 29) e B (FIGURA 30) no extrato clorofórmico das cascas e a

beta-ioimbina (FIGURA 22) e 10-metoxigeissoschizol (FIGURA 31) no extrato etanólico das sementes.

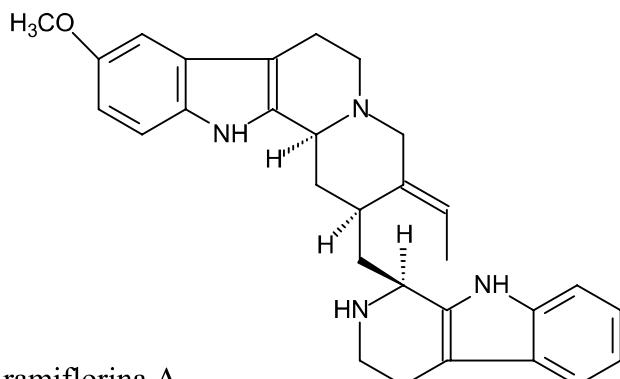


FIGURA 29 – ramiflorina A

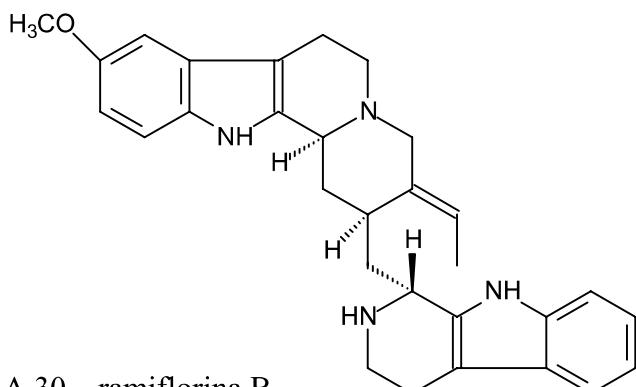


FIGURA 30 – ramiflorina B

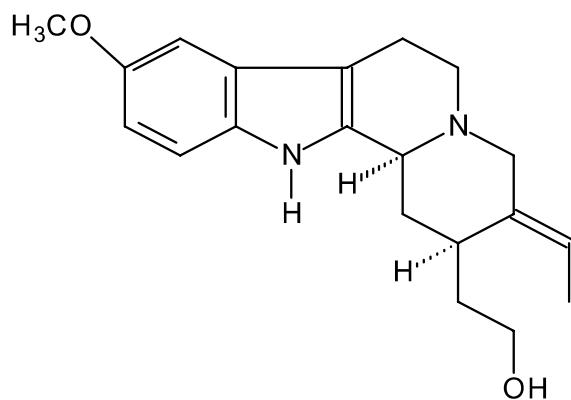


FIGURA 31: 10-methoxygeissoschizol

A avaliação da atividade bactericida de extratos alcoólicos da casca de *A. ramiflorum* e seus constituintes isolados mostrou que apresentam atividade contra bactérias gram positivas, mas foram inativos contra bactérias gram negativas. Frações deste extrato contendo os compostos representados nas FIGURAS 29 e 30 apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* (TANAKA *et al.*, 2006). O extrato metanólico bruto dos galhos mostrou atividade moderada contra os fungos *Cryptococcus neoformans*, *Trycophyton rubrum*, *Ttrycophyton mentagrophytes* e *Microsporum canis*. As frações contendo ramiflorina A (FIGURA 29) apresentaram-se mais ativas contra *C. neoformans* e a ramiflorina B (FIGURA 30) contra os outros dermatófitos testados. Uma fração menos ativa contra fungos era composta por 10-metóxigeissoschizol (FIGURA 31) (SOUZA *et al.*, 2006).

O extrato alcaloídico de *Aspidosperma ramiflorum* apresentou atividade leishmanicida contra *Leishmania braziliensis* e *L. amazonensis*. Esse extrato continha os alcalóides ramiflorina A e B (FIGURAS 29 e 30), e usambarina e usambarensina (FIGURAS 32 e 33) (FERREIRA *et al.*, 2004).

A ação antipromastigota mostrou ser devida a presença dos alcalóides ramiflorina A e B (TANAKA *et al.*, 2006).

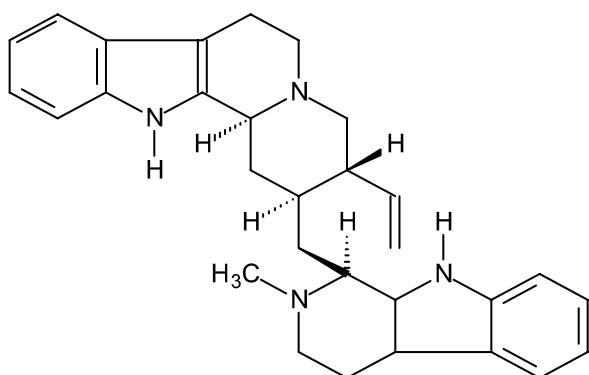


FIGURA 32 – usambarina

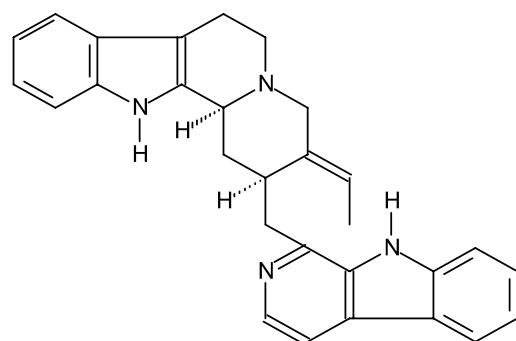


FIGURA 33 – usambaresina

A espécie *Aspidosperma polyneuron* encontra-se distribuída na região de cerrado do sudeste do Brasil e é utilizada pela medicina popular como bactericida. A análise da composição do óleo extraído de suas folhas por hidrodestilação mostrou que é composto principalmente por caureno (FIGURA 34) (73,7%) e outros componentes em menor quantidade, tais como linalol (FIGURA 35), β -cariofileno (FIGURA 36) e α -copaeno (FIGURA 37). Foram detectados também diferentes derivados de ácidos graxos como pentadecanal, hexenol e hexadecanona (CORNÉLIO *et al.*, 2004).

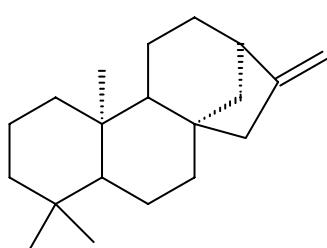


FIGURA 34 – caureno

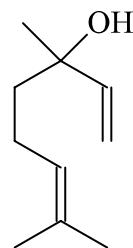
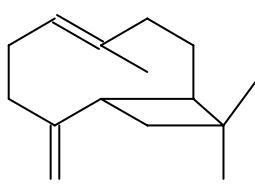
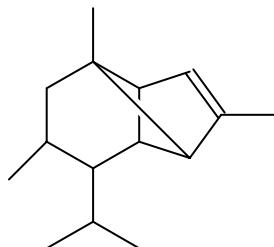


FIGURA 35 – linalol

FIGURA 36 – β -cariofilenoFIGURA 37 – α -copaeno

Em testes de inibição bioquímica e eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) de folhas jovens *Aspidosperma polyneuron*, foram identificadas 14 isozimas esterases, sendo diferenciadas em alfa e beta-esterases de acordo com seus substratos de preferência. Nesse estudo foi demonstrado que inseticidas organofosforados são capazes de inibir seletivamente estas esterases, sugerindo que elas podem ser utilizadas para o monitoramento de poluentes no ambiente (CARVALHO *et al.*, 2003).

A espécie *Aspidosperma tomentosum* foi avaliada quanto a sua atividade tripanossomicida e foi verificado que a fração do extrato etanólico do caule dessa espécie contendo o alcalóide uleína (FIGURA 21) apresenta maior atividade (OLIVEIRA *et al.*, 2001).

O extrato da casca da espécie *Aspidosperma carapanauba* apresentou propriedades gastroprotetoras em ratos com úlceras induzidas por indometacina (SILVA *et al.*, 2006).

O gênero *Aspidosperma* é também comumente utilizado pela população para disfunção erétil. Esta propriedade foi verificada na espécie *Aspidosperma ulei*.

Uma fração alcaloídica extraída da casca da raiz desta espécie, apresentou efeito estimulante do sistema nervoso central e pró-erétil em camundongos. Este efeito foi verificado por meio do tempo de indução de sono por pentobarbital, diminuição do tempo de imobilidade em teste de natação forçada e *parâmetros erection-like*. Este efeito pode estar relacionado com a ativação de dopamina central e bloqueio de adrenoceptores pré-sinápticos alfa-2 com subsequente aumento da liberação de óxido nítrico pelos nervos e artérias penianas (CAMPOS *et al.*, 2006).

Várias espécies do gênero *Aspidosperma* são conhecidas como antimaláricas, por exemplo, *A. album* (Vahl) Benoit (GRENDAND *et al.*, 1987), *A. discolor* DC., (SCHULTES, 1979) *A. excelsum* Benth., *A. polyneuron* Muell. (WASICKY *et al.*, 2001) e *A. nitidum* Benth. (SCHULTES, 1979; BRANDÃO *et al.*, 1992), cujas cascas são utilizadas por índios brasileiros contra a malária (BRANDÃO *et al.*, 1992).

Os extratos de *A. macrocarpum* apresentaram atividade *in vitro* contra *Plasmodium falciparum*, com baixa citotoxicidade (BRANDÃO *et al.*, 1992).

Isoceño-Guarani é um grupo étnico que vive na Província Cordilheira em Santa Cruz no sudeste da Bolívia. Esta população é composta por cerca de 9.000 pessoas que vivem espalhadas em uma área de cerca de 70 km. Dentre as várias espécies estudadas

nesta região, a *Aspidosperma quebracho-blanco*, conhecida por estes índios por sua ação antidiarreica, apresentou também em testes *in vitro* propriedades antimalária (BOURDY *et al.*, 2004).

Uma das propriedades medicinais atribuídas à espécie *Aspidosperma quebracho*, utilizada há mais de cem anos na América do Sul e Europa, é no tratamento da disfunção erétil. Um estudo utilizando alfa-1 e alfa-2-adrenoceptores penianos humanos, bem como alfa-1 e alfa-2 adrenoceptores clonados, mostrou que a fração contendo ioimbina (FIGURA 38) apresentou efeito inibitório sobre os adrenoceptores (SPERLING *et al.*, 2002).

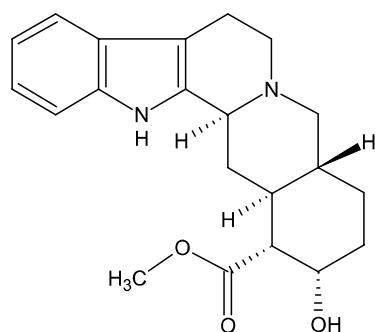


FIGURA 38 – ioimbina

A atividade antimalária de doze alcalóides presentes em *A. pyrifolium* e *A. megalocarpon*, contendo esqueleto aspidospermano foi avaliada *in vitro* sobre cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes ou não à cloroquina. O uso concomitante dos alcalóides (FIGURAS 39 e 40), com cloroquina sobre a cultura de *P. falciparum* mostrou a potenciação da atividade antimalária (MITAINE-OFFER *et al.*, 2002).

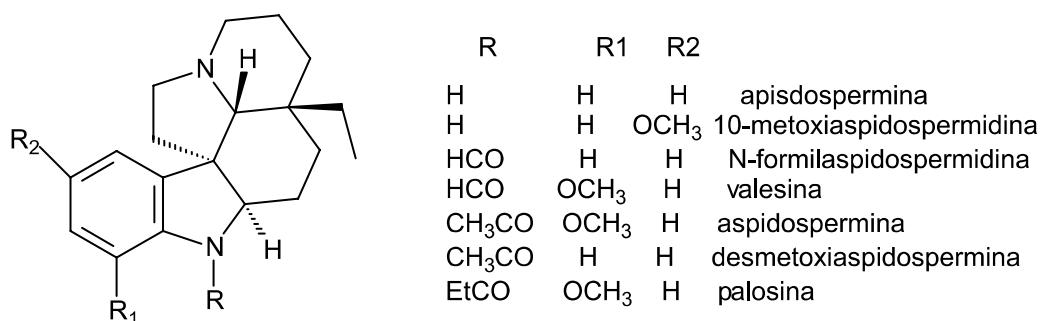


FIGURA 39 – Alcalóides presentes em *Aspidosperma pyrifolium*

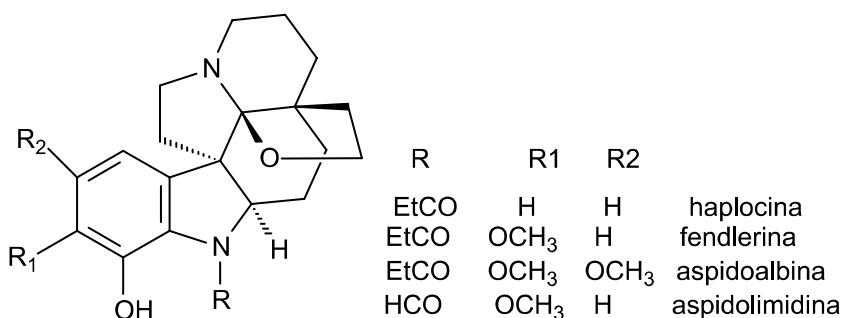


FIGURA 40 – Alcalóides presentes *Aspidosperma megalocarpom*

A atividade antiprotozoária de várias espécies medicinais utilizadas pela população do sudoeste da Colômbia foi testada e *Aspidosperma megalocarpon* apresentou boa atividade antimarialária tanto para cepas não resistentes à cloroquina quanto para as resistentes. Porém não apresentou atividade contra cepas de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* sp (WENIGER *et al.*, 2001).

1.1 *Aspidosperma subincanum* Mart.

A espécie *Aspidosperma subincanum* Mart., conhecida como guatambu e objeto desse estudo, é usada popularmente como planta medicinal em várias regiões do Brasil e em alguns outros países. Em um levantamento realizado em Goiânia e cidades vizinhas, Tresvenzol *et al.* (1997), mostraram que 60% dos raizeiros entrevistados citaram o guatambu como sendo útil para o tratamento tanto do diabetes quanto da hipercolesterolemia.

Poucos estudos sobre a composição micromolecular dessa espécie foram realizados até o momento. Alcalóides indólicos parecem ser o grupo de metabólitos secundários mais evidentes nessa espécie. Kobayashi *et al.* (2002) descreveram os subincanadinos A-G (FIGURAS 41 e 42). Ishiyama *et al.* (2005) isolaram ainda a pausperadina A (FIGURA 42)

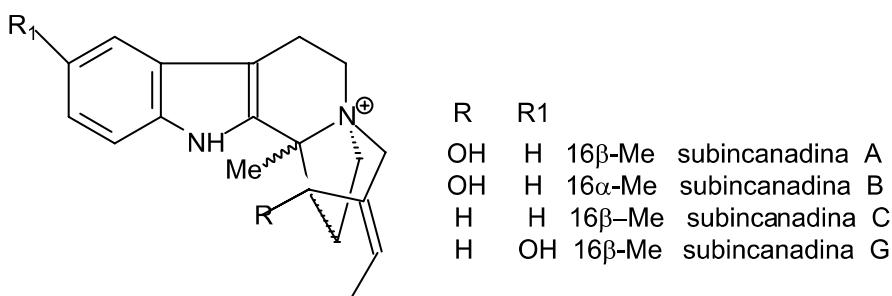
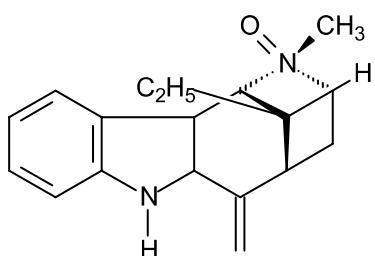
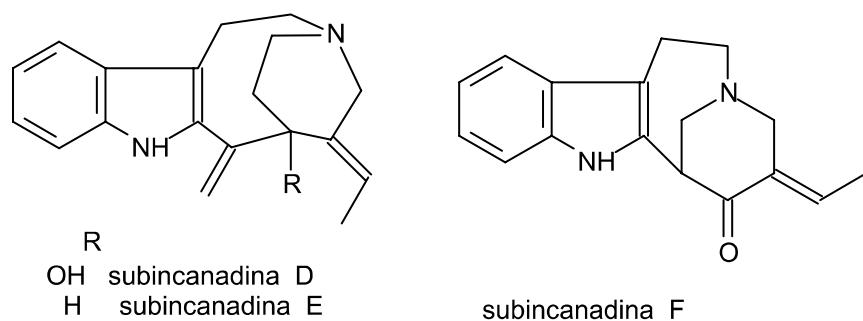


FIGURA 41 – Alcalóides presentes em *Aspidosperma subincanum* (KOBAYASHI et al., 2002; ISHIYAMA et al., 2005).

Lino e Garrote (2005) isolaram uma mistura de alcalóides de extratos das cascas de *A. subincanum*. As análises espectrométricas preliminares sugeriram a presença de 3 alcalóides, correspondentes a subincanadinas A e C (FIGURA 41), nas frações oriundas do material solúvel em butanol e subincanadinas D e F (FIGURA 42) nas frações oriundas do material solúvel em acetato de etila.

Gaskell e Joule (1970) isolaram uleína (FIGURA 21), epiuleína (FIGURA 26), dasicarpidona e epidasicarpidona (FIGURA 43) de extratos de *A. subincanum*.



pausperadina A

FIGURA 42 – Alcalóides presentes em *Aspidosperma subincanum* (KOBAYASHI et al., 2002; ISHIYAMA et al., 2005).

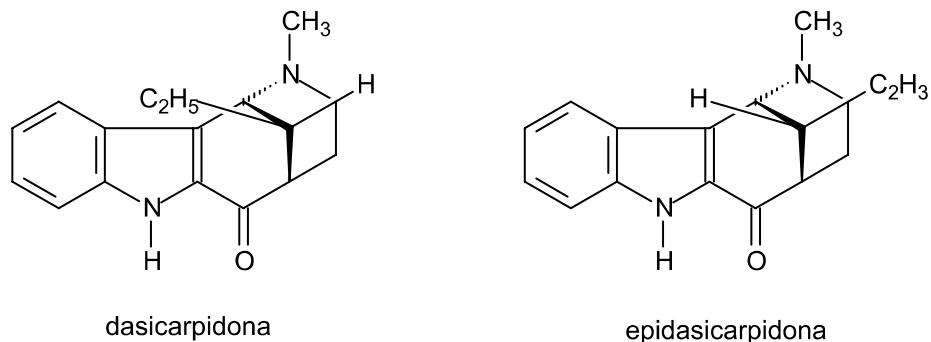


FIGURA 43 – Alcalóides presentes em *Aspidosperma subincanum* (GASKELL; JOULE, 1970)

Uma pesquisa etnobotânica foi realizada na localidade de Mimoso, situada no município de Santo Antônio do Leverger, Pantanal de Barão de Melgaço, no Estado de Mato Grosso, e teve, como um dos propósitos, a caracterização das plantas utilizadas pela comunidade mimoseana. Neste trabalho foram identificadas quatro etnocategorias de uso das espécies levantadas, das quais 53% são de uso medicinal, 48% de diversas benfeitorias, como construções de cercas, casas, móveis, pontes e utensílios. A espécie *A. subincanum* foi citada apenas como sendo útil em construção em geral, tábuas, cabo de ferramentas em geral, canoa e lenha (SCHWENK; SILVA, 2000).

1.1.1 Descrição botânica (GOMES, 1997)

1.1.2 Sinonímia: *Aspidosperma subincanum* Mart.

O habitat desta espécie é a de sub-bosque ou de florestas com transição para cerrado. É uma árvore decídua, de médio porte, medindo de 15-20 m de altura, com tronco reto de cor creme. Os ramos são castanho-escuros com folhas agrupadas no ápice. As folhas são alternadas 1/5, verde-escuras na superfície adaxial e acinzentadas na abaxial, ambas as superfícies glabras a glabrescentes ou esparsamente pubéras; nervuras craspedódromas simples, secundárias adaxialmente impressas, bem definidas, congestas no ápice dos ramos, com pecíolo de 1,5- 5 cm, limbo 5,7-21x3,3-12,5 cm membranáceo, não-bulado, largamente elíptico ou oboval, ápice agudo, obtuso, arredondado ou mucronado; margem inteira, plana, base atenuada ou aguda, decorrente

ligeiramente assimétrica; As inflorescências possuem de 1,8-6 cm de comprimento, em grupos de 1-3, são axilares ou extra-axilares, bracteosas, 2-3 ramos basais di ou tricasiais e os terminais umbelóides, densifloras; pedúnculo 0,3-3 cm de comprimento; pedicelos 0-2 mm comprimento; bractéolas inconspícuas; botões obtusos. As sépalas possuem de 1-1,5 mm, 1-2 vezes mais compridas que largas, diferentes entre si, ovais a deltoides, ápice agudo, às vezes plicado, base arredondada, externamente tomentosas, internamente glabras. A corola possui 5-7 mm, de coloração esbranquiçada, externamente glabra nas regiões superpostas dos lobos e basal do tubo, esparsamente curto-tomentosa nas regiões mediana dos lobos e distal do tubo, internamente com tomentos muito esparsos nos lobos, na fauce e atrás das anteras, tufo de tricomas logo abaixo dos estames, restante do tubo pubérulo; lobos deflexos, ovais, pouco carnosos, 2-3 mm de comprimento, 1,5-3 vezes mais compridos que largos, 0,5-1 vez compridos tubo, ápice agudo, obtuso ou arredondado, base externamente arredondada e com lóbulo interno; fauce não calosa, sem anel; tubo 2,8-4 mm de comprimento, abruptamente estreito na região distal. Estames até 1/3 do tubo; anteras 1 mm de comprimento, ápice rente ou distante 0,2 mm, tecas iguais, ¼ basal livre; filetes 0,1 mm de comprimento. Pistilo 0,8-2,5 mm de comprimento, ovário 0,8-1 mm de comprimento, súpero, carpelos adnatos, tomentoso, cônico, ápice atenuado, óvulos 5-6 por lóculo, em 2 colunas, estilete glabro, séssil ou subséssil a 1,5 vezes comprimento do ovário; clavuncula globosa, tricomas nos apículos. Folículos 5,5-8x2,5-3,5 cm gêmeos, às vezes isolados, dolabriformes, achatados, densamente pubérulos, castanhos a pardacentos, superfície regular, lenticelas contrastantes, mucro ausente, ápice deflexo ca.60°, costa evidente; estipe 15-20 mm de comprimento. Sementes 5-6 por folículo, 4,5x3 cm, iguais entre si, circulares; alas concêntricas, 0,3-1 cm de comprimento; cotilédones ovais a elípticos, 2-2,5 cm de comprimento; funículo basal, 0,5-0,8 cm de comprimento (GOMES, 1997).

A *Aspidosperma subincanum* Mart. é muito comum em regiões de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso e Goiás, além de localidades circunscritas ao atual estado de Tocantins. Fornecem madeira de lei própria para a construção civil e naval, dormentes, cabos de ferramentas e de instrumentos para a agricultura, xilografia, marcenaria, etc. É conhecida também como: Guatambu-vermelho, Pereira, Pereira-branca, Peroba e Perobinha.

CAPÍTULO 2: PARTE EXPERIMENTAL



CAPÍTULO 2: PARTE EXPERIMENTAL

1. Material Botânico

Cascas de *Aspidosperma subincanum* Martius foram coletadas na região de Goiânia/GO em agosto de 2005 e identificadas pela Dra. Irani Fernandes Pereira Campos (ICB/UFG). Um espécimen testemunha encontra-se depositado no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Goiás (UFG), sob o número UFG 21.147. As cascas foram dessecadas em estufa de ventilação forçada, a 40º C, por 72 horas. Em seguida, foram moídas em moinho de facas. O pó resultante da moagem foi armazenado em sacos de papel e acondicionados em sacos de polietileno.

2. Obtenção do Extrato

O extrato foi obtido no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da UFG. Foram utilizados 600g de material botânico pulverizado ao qual foi adicionado etanol a 95%, na proporção de 1:3 (p/v). A mistura foi submetida a agitação mecânica por 4 horas, sendo posteriormente filtrada em papel de filtro qualitativo. O processo de maceração dinâmica foi repetido por três vezes consecutivas.

A solução extractiva foi submetida à evaporação sob vácuo a temperatura de inferior a 40 ºC, até a remoção do solvente e obtenção do extrato etanólico bruto de *Aspidosperma subincanum* (EEAS).

3. Estudos Farmacognósticos

3.1 Reagentes gerais

3.1.1 Reagente de Steinmetz (OLIVEIRA *et al.*, 2005)

Utilizado nas reações histoquímicas, é empregado diretamente na observação de cortes histológicos e de drogas pulverizadas, sem a necessidade de clareamento prévio, pois apresenta a característica de descorar a estrutura ao mesmo tempo que promove a coloração diferencial dos tecidos.

A fórmula deste reativo é:

Cloral hidratado	40,00 g
Alúmen de ferro	3,00 g
Sulfato de anilina	1,00 g
Iodo	0,45 g
Sudan III	0,10 g
Etanol	30,00 mL
Água destilada	30,00 mL
Glicerina	25,00 mL

O cloral hidratado e o alúmen de ferro foram dissolvidos em 15 mL de água. O sulfato de anilina foi dissolvido a quente nos outros 15 mL de água restante. O iodo, por sua vez, foi dissolvido no álcool e a seguir as 3 soluções foram reunidas. O Sudan III foi dissolvido a quente na glicerina e após arrefecimento, essa solução foi adicionada ao conjunto. Essa mistura ficou em repouso por 24 horas e posteriormente filtrada em lã de vidro.

3.1.2 Reagente de Etzold (ETZOLD, 1993)

Reagente também utilizado nas reações microquímicas, empregado diretamente na dupla coloração de cortes histológicos, sem a necessidade de clareamento prévio.

Foram pesados 10 mg de fucsina básica, 40 mg de safranina, 150 mg de azul astra e adicionados de 100 mL de água destilada e 2 mL de ácido acético glacial, até completa homogenização.

3.1.3 Reativo de Liebermann-Burchard (SHARAPIN, 2000).

Esse reagente é utilizado na identificação de esteróides e triterpenóides.

A 1 mL de clorofórmio foi adicionado 1 mL de anidrido acético. Após completa homogeneização da solução foram acrescentadas 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado.

3.1.4 Solução alcoólica de Brucina (COSTA, 1982)

Esse reagente é utilizado nas reações de caracterização de taninos e baseia-se na propriedade dos taninos de formar precipitados ao reagir com alcalóides.

O reagente é composto de uma solução de brucina a 1% em etanol.

3.1.5 Reagente de Bertrand (COSTA, 1982)

Esse reagente é utilizado nas reações de caracterização dos alcalóides por precipitação. O reagente é composto de uma solução aquosa de ácido sílicotungstico a 5%.

3.1.6 Solução de Cloreto Férrico (p/v) (COSTA, 1982)

Esse reagente é utilizado nas reações de caracterização de compostos fenólicos. O reagente é composto de uma solução aquosa de cloreto férrico a 4,5%.

3.1.7 Solução de Acetato de Chumbo (p/v) (COSTA, 1982)

Reagente utilizado nas reações de caracterização dos galhotaninos.

O reagente é composto de uma solução aquosa a 10% de acetato de chumbo.

3.1.8 Solução de NaOH (p/v) (COSTA, 1982)

Essa solução é utilizada nas reações de caracterização das cumarinas. O reagente é composto de uma solução aquosa a 20% de NaOH.

3.1.9 Solução de Gelatina a 2,5% (p/v) em solução de NaCl a 5% (p/v) (COSTA, 1982)

Esse reagente é utilizado nas reações de caracterização dos taninos. Baseia-se na propriedade dessa classe de compostos em precipitar proteínas. O reagente foi obtido pela dissolução de 2,5 g de gelatina, sob aquecimento, em 100 mL de uma solução aquosa de NaCl a 5%.

3.1.10 Reagente de Mayer (COSTA, 1982)

Esse reagente é utilizado nas reações de caracterização dos alcalóides por precipitação.

Foram pesados 2,8 g de cloreto de mercúrio e 10 g de iodeto de potássio e adicionados de 100 mL, até completa homogenização, sendo posteriormente filtrada.

3.1.11 Reagente de Dragendorff (COSTA, 1982)

Esse reagente é utilizado nas reações de caracterização dos alcalóides por precipitação.

Foram dissolvidos 8g de subnitrito de bismuto em ácido nítrico a 30% (p/v). Uma segunda solução foi preparada contendo 22,8 g de iodeto de potássio em quantidade suficiente para 100 mL de água destilada. A seguir a primeira solução foi adicionada, pouco a pouco, à segunda. A mistura ficou em repouso por duas horas, logo após foi filtrada.

3.1.12 Reagente de Bouchardat (COSTA, 1982)

Esse reagente é utilizado nas reações de caracterização dos alcalóides por precipitação.

Foram pesados 4 g de iodeto de potássio e 2 g de iodo e adicionados de 100 mL de água destilada, até completa homogenização.

3.1.13 Reagente de Hager (COSTA, 1982)

Esse reagente é utilizado nas reações de caracterização dos alcalóides por precipitação.

O reagente é composto por uma solução aquosa a 2% de ácido pícrico.

3.1.14 Ácido Tântico a 1% (p/v) (COSTA, 1982)

Esse reagente é utilizado nas reações de caracterização dos alcalóides com compostos à base de ácidos orgânicos.

O reagente é composto por uma solução aquosa a 1% de ácido tânico.

3.1.15 Ácido Tântico 0,5% (p/v) (COSTA, 1982)

Esse reagente é utilizado como padrão positivo para taninos. O reagente é composto por uma solução aquosa a 0,5% de ácido tânico.

3.1.16 Reagente de Kedde (COSTA, 1982)

Esse reagente é utilizado nas reações relacionadas com o anel γ -lactônico dos compostos cardiotônicos. O reagente é composto por uma solução etanólica de ácido 3,5-dinitrobenzóico 1%.

3.1.17 Reagente Oxalo-Bórico (COSTA, 1982)

Esse reagente é utilizado nas reações de caracterização do núcleo fundamental dos flavonóides. O reagente é composto por uma mistura de 3 mL de solução de ácido bórico e 1 mL de solução de ácido oxálico (p/v).

3.2 Análise Macroscópica

As cascas secas de *Aspidosperma subincanum* Mart. foram analisadas quanto ao seu aspecto geral: forma, características das superfícies externa e interna e da secção transversal, de acordo com Oliveira *et. al* (2005).

3.3 Análise Microscópica

A caracterização anatômica foi realizada através da análise de secções transversais e longitudinal-radial. Para tal foram feitos cortes da casca da planta submetida ao amolecimento prévio em solução aquosa de etilenodiamina a 10% (v/v) por 3 dias (KRAUS; ARDUIN, 1997) e colorações específicas pelo reagente de Steinmetz (OLIVEIRA *et al.*, 2005) e Etzold (ETZOLD, 1993).

3.4 Microscopia do Pó

Uma alíquota do pó das cascas de *Aspidosperma subincanum* Mart., foi colocada em uma lâmina com auxílio de uma espátula. Uma gota do reagente de Steinmetz foi adicionada e a seguir foi coberta com lamínula para observação sob microscópio.

3.5 Prospecção Fitoquímica

Uma amostra de pó de cascas de *Aspidosperma subincanum* Mart., foi submetida a testes de prospecção fitoquímica segundo as técnicas adaptadas de Costa (1982) e Matos (1988), conforme descrito a seguir:

3.5.1 Heterosídeos Antraquinônicos

Foi feita a extração com 1 g da amostra com 30 mL de álcool a 75% v/v, com aquecimento durante 3 min. A solução foi filtrada a quente, através de algodão. Parte do filtrado (10 mL) (I) foi acidificado utilizando 0,5 mL de HCl SR e aquecida à ebulação por 2 min; parte do filtrado (10 mL) (II) foi aquecida a ebulação por 2 min.

As soluções I e II, após arrefecimento, foram submetidas à partição com éter etílico. A 5 mL da fase etérea de I e II foram adicionados 4 mL de hidróxido de amônio SR, Após 5 minutos, o aparecimento de coloração rósea na fase amoniacal é indicativa da presença de heterosídeos antraquinônicos.

3.5.2 Esteróides e Triterpenóides

A amostra de pó (2,5 g) foi adicionada de 25 mL de mistura EtOH: H₂O (1:1) e 10 mL de solução de acetato de chumbo a 10%. A mistura foi submetida à ebulação por 4 min. Após arrefecimento, o volume da mistura foi completado para 25 mL e submetido à filtração. Ao filtrado foram adicionados 15 mL de clorofórmio, com agitação após a adição do mesmo. A fase clorofórmica foi então separada para ser utilizada nos ensaios seguintes.

3.5.2.1 Reação de Liebermann-Burchard

Uma alíquota da fração clorofórmica (3 mL) foi transferida para um tubo de ensaio e submetida à evaporação até a secura. Ao resíduo, foi adicionado 1 mL do Reativo de Liebermann-Burchard, recém preparado. Em seguida a mistura foi homogeneizada e deixada em repouso por 5 minutos. O aparecimento de coloração verde escura é indicativa da presença de esteróides; coloração castanho escura é indicativa da presença de triterpenos.

3.5.2.2 Reação para Núcleo Esteroidal

Uma alíquota da solução clorofórmica (3 mL) foi transferida para uma cápsula de porcelana e submetida à evaporação a secura. Ao resíduo resfriado, foram adicionadas 6 gotas de H_3PO_4 e a solução foi observada sob luz UV (365nm). A presença de fluorescência verde-amarelada é indicativa de reação positiva.

3.5.2.3 Reação de Keller-Kiliani

Uma alíquota da solução clorofórmica (5 mL) foi transferida para um tubo de ensaio, e evaporada à secura. O resíduo foi adicionado de 3 mL de ácido acético glacial e 0,1 mL de solução de $FeCl_3$ 9%. Após dissolução, a solução foi vertida lentamente em um tubo de ensaio contendo 2 mL de H_2SO_4 . A formação de cor castanha-avermelhada na fase de contato indica reação positiva, assim como o desenvolvimento, na camada acética, e de uma coloração esverdeada.

3.5.3 Reação de Kedde

Uma alíquota da solução clorofórmica obtida no item 3.1.16 (6 mL) foi transferida para um tubo de ensaio e evaporada à secura. Ao resíduo foram adicionados 2 mL de mistura EtOH: H_2O (1:1), 2 mL de reagente de Kedde, recém preparado, e 2L de solução de KOH 0,1M. A mistura foi deixada em repouso por 5 minutos. O desenvolvimento de coloração castanha-avermelhada a vermelho violeta é indicativo de reação positiva para anel lactônico dos heterosídeos digitálicos.

3.5.4 Flavonóides

O material botânico pulverizado (7 g) foi adicionado de 60 mL de mistura EtOH: H_2O (7:3) e aquecido à ebulação por 5 min. Em seguida, a mistura foi submetida à filtração em papel umedecido com mistura EtOH: H_2O (7:3). O extrato hidroalcoólico (filtrado) foi utilizado nos ensaios seguintes.

3.5.4.1 Reação de Shinoda

Uma alíquota do filtrado (3 mL) foi transferida para um tubo de ensaio e adicionada de fragmentos de fita de magnésio. Em seguida foi adicionado, cuidadosamente, 1 mL de HCl 6M. O aparecimento de coloração vermelha escura é indicativo de teste positivo.

3.5.4.2 Reação Oxalo-bórica

O filtrado (5 mL) foi submetido a aquecimento à secura, em cápsula de porcelana. Ao resíduo foram adicionados 4 mL de solução oxalo-bórica, essa mistura foi submetida à evaporação à secura. Ao resíduo, foram adicionados 7 mL de éter etílico e observado sob luz UV (365 nm). A presença de fluorescência verde ligeiramente amarelada é indicativa de reação positiva.

3.5.4.3 Reação com Hidróxidos Alcalinos

Uma alíquota do filtrado (3 mL) foi transferida para um tubo de ensaio e adicionada de 1 mL de solução de NaOH 20% (p/v). O aumento na intensidade da coloração amarela é indicativo da presença de flavonóides.

3.5.4.4 Reação com o AlCl₃

O filtrado (5 mL) foi aquecido em cápsula de porcelana até redução do volume à metade. Em seguida, a solução concentrada foi utilizada para embeber um pedaço de papel de filtro. A uma parte do papel umedecido, foi adicionada solução de AlCl₃ 5% (p/v) e observado sob luz UV (365 nm). O aparecimento de fluorescência na região com adição de AlCl₃ indica reação positiva.

3.5.4.5 Reação com FeCl₃

Uma alíquota do filtrado (3 mL) foi transferida para um tubo de ensaio e adicionada de 2 gotas de solução de FeCl₃ 4,5% (p/v). O aparecimento de coloração escura indica reação positiva para fenóis.

3.5.5 Índice de Espuma

O material botânico (0,1 g) foi extraído por decocção, com 100 mL de água destilada, durante 5 min. Uma solução de carbonato de sódio a 1% foi adicionada até a neutralização. A solução obtida foi filtrada por algodão e o volume foi completado para 100 mL com água destilada.

Uma bateria com 10 tubos de ensaio de tamanhos e diâmetros iguais foi montada. Os tubos foram marcados com duas graduações: a primeira correspondente a 10 mL e a segunda 1 cm acima desta marca. No primeiro tubo foi adicionado 1 mL de solução extrativa mais 9 mL de água destilada. No segundo, 2 mL de solução extrativa e 8 mL de água destilada. No terceiro, 3 mL de solução extrativa e 7 mL de água destilada, e assim por diante. No último tubo foi adicionada a solução extrativa (10 mL). Cada tubo foi agitado por 20 segundos, e deixado em repouso por 10 min. A altura da camada de espuma formada foi medida.

3.5.6 Taninos

O material botânico (2 g) foi extraído por infusão utilizando 50 mL de água destilada. Após filtração a quente, o volume foi completado para 100 mL.

Para este teste foram utilizados 6 tubos de ensaio, contendo 5 mL da solução extrativa em cada um. No primeiro tubo, foram adicionadas 4-5 gotas de solução de gelatina (2,5 g de gelatina em 100 mL de solução de NaCl 5%). O desenvolvimento de precipitado branco característico indica teste positivo.

No segundo tubo, foram adicionadas 4-5 gotas de solução de sulfato de quinina 1%. O desenvolvimento de precipitado branco indica teste positivo.

No terceiro tubo, foram adicionadas 4-5 gotas de solução alcoólica de brucina a 1%. O desenvolvimento de precipitado branco indica teste positivo.

No quarto tubo, foram adicionadas 3-5 gotas de solução de acetato de cobre a 10%. O desenvolvimento de precipitado indica teste positivo.

No quinto tubo, foram adicionadas 3-5 gotas de cloreto férrico a 2%. A formação de cor enegrecida indica teste positivo.

3.5.7 Alcalóides

Ao material botânico (2 g) foram adicionados 20 mL de solução de H_2SO_4 5% e a mistura foi aquecida a ebulação por 5 minutos. A solução obtida foi submetida a filtração por algodão. Após arrefecimento, a solução extrativa foi distribuída em 7 tubos de ensaio, nos quais foram adicionadas 3-9 gotas dos reagentes gerais dos alcalóides, a saber:

- 1- Reagente de Mayer.
- 2- Reagente de Dragendorff.
- 3- Reagente de Bouchardat.
- 4- Reagente de Bertrand.
- 5- Ácido Tântico a 1%

A formação de precipitado em todos os tubos indica teste positivo.

3.5.8 Cumarinas

Uma solução extrativa foi obtida com 5 g de amostra e 20 mL de água quente. Após filtração, foi adicionada de 1 mL de HCl 1M, até pH 1. A solução acidificada foi submetida à partição líquido-líquido com 10 mL de éter etílico. A fase etérea foi concentrada até metade de seu volume e a mesma foi aplicada em duas manchas sobre um pedaço de papel de filtro. Em uma das manchas foi adicionada uma gota de NaOH 1M, sendo esta observada à luz UV (365 nm), o aparecimento de fluorescência é indicativo de presença de cumarinas.

3.5.9 Resinas

Ao material botânico (2 g) foram adicionados 30 mL de EtOH e a mistura foi aquecida a ebulação por 3 minutos. A solução obtida foi submetida a filtração por algodão e ao filtrado foram adicionados 10 mL de água. A presença de turvação indica teste positivo.

3.5.10 Testes de Pureza

Os teores de umidade, de cinzas totais e de cinzas insolúveis em ácido foram determinados segundo a Farm. Bras. IV Parte I, 1988.

3.5.10.1 Determinação do Teor de Umidade (perda por dessecção)

Cerca de 2 g da amostra foram exatamente pesados, em triplicata, em cadiinhos de porcelana previamente dessecados em estufa a 100-105°C, por 30 minutos e resfriados em dessecador. Cada cadiño foi pesado individualmente. A amostra foi adicionada aos cadiinhos e dessecada em estufa a 100-105°C, durante 5 horas e posteriormente resfriada em dessecador e pesada. A dessecção em estufa foi repetida por 1 hora, a amostra foi deixada arrefecer em dessecador, após o que foi realizada uma nova medida de peso. O ensaio foi concluído, quando duas pesagens sucessivas não diferiram entre si significativamente (menor que 5 mg de diferença). A porcentagem de água em relação ao material seco ao ar foi calculada.

3.5.10.2 Determinação do Teor de Cinzas Totais

Cerca de 2 g da amostra foram exatamente pesados, em triplicata, em cadiinhos previamente calcinados em mufla a 500°C, por duas horas e resfriados em dessecador. Cada cadiño foi pesado individualmente. As amostras foram carbonizadas em um fogareiro e transferidas para a mufla, que foi então programada para aquecimento a 450°C. Após 5 horas, os cadiinhos foram resfriados e pesados.

3.5.10.3 Determinação de Cinzas Sulfúricas

Ao resíduo obtido na determinação de cinzas totais foram adicionados 25 mL de ácido clorídrico (70 g/L) SR em cadiño coberto com vidro de relógio. A seguir o vidro de relógio foi lavado com 5 mL de água quente, e a água de lavagem foi adicionada ao cadiño. O resíduo insolúvel foi então recolhido em ácido sobre o papel de filtro isento de cinzas e lavado com água quente até a obtenção de um filtrado neutro. A seguir o papel de filtro contendo o resíduo foi transferido para o cadiño original, secado em chapa aquecedora, sofrendo posterior incineração a 500 °C até peso constante.

4. Ensaios Biológicos

4.1 Animais

Foram utilizados 58 ratos machos da linhagem *Wistar* (*Rattus norvergicus*), adultos não-isogênicos, provenientes de colônias mantidas pelo Biotério central da UFG. Os grupos foram formados aleatoriamente com a diferença de peso entre os animais não ultrapassando 20%.

Os animais foram mantidos no biotério do Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas da Universidade Federal de Goiás (NEPET), com um sistema de barreiras de modo a garantir as condições sanitárias adequadas para estudo toxicológico, na temperatura ambiente de 26 °C; umidade relativa do ar entre 50 – 70%; com o ciclo claro-escuro de 12 horas. Os animais foram tratados com ração Nuvilab e água tratada, fornecidas *ad libitum*. O manuseio dos animais foi feito utilizando-se vestimenta composta de luvas, avental e máscara.

4.2 Fármacos/Reagentes

- Extrato etanólico de *Aspidosperma subincanum* (EEAS), obtido de acordo com o item 2.
- Solução salina, recém-preparada (0,9 g de NaCl em 99,1 mL de água destilada).
- Dimetilsulfóxido (DMSO) PA, marca Sinth.

4.3 Toxicidade Aguda

Para a avaliação da toxicidade aguda de EEAS foi utilizada a metodologia descrita nas diretrizes da Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD, 1996), (Figura 44 e 45) e as diretrizes da Portaria 116/96 do Ministério da Saúde (BRASIL, 1996).

Todo o procedimento atendeu às exigências da RDC 48 de 16 de março de 2004 da ANVISA/MS (BRASIL, 2004).

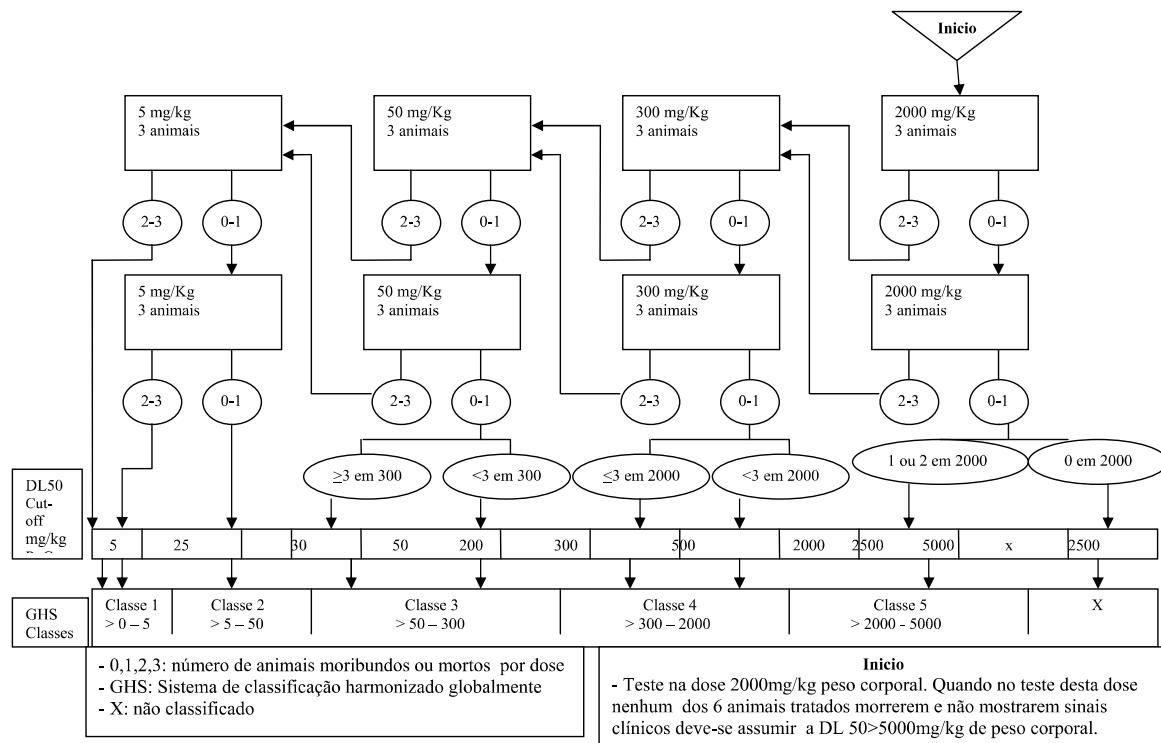


FIGURA 44 – Procedimento para o teste de classificação de toxicidade iniciando com dose de 2000 mg/kg (OECD Guia 423)

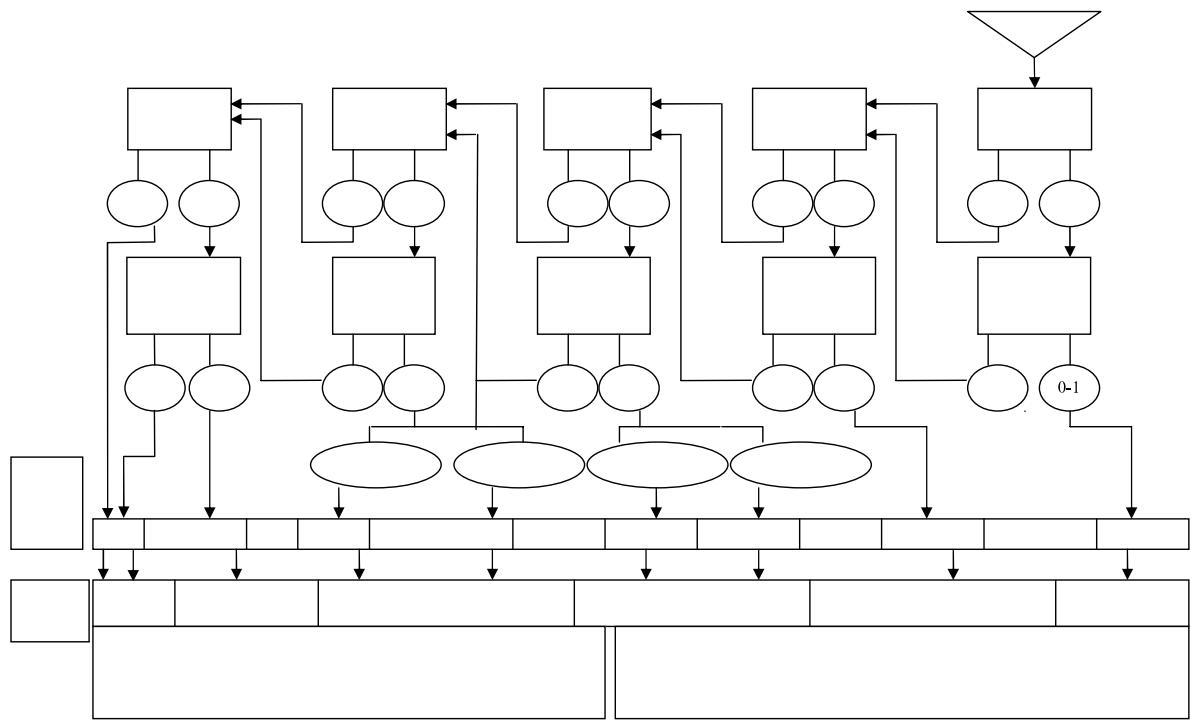


FIGURA 45 – Procedimento para o teste de classificação de toxicidade iniciando com dose de 5000 mg/kg (OECD Guia 423)

O teste de toxicidade aguda pelo método de classes (com a dose de 2000 mg/kg) inicia-se com a administração da dose de 2000 mg/kg a três animais. Caso houvesse a morte de 0-1 animal há duas opções: a amostra não seria considerada tóxica ou entraria na classe 5, cuja DL_{50} varia até 5000 mg/kg sendo maior que 2000 mg/kg. A morte de 2 ou 3 animais implicaria na administração de uma dose de 300 mg/kg.

Dose 300 mg/kg: A morte de 0-1 animal indica classe 4 ($300 \text{ mg/kg} < DL_{50} \leq 2000 \text{ mg/kg}$). Se houver morte de 2 a 3 animais, administra-se a dose de 50 mg/kg.

Dose 50 mg/kg: A morte de 0-1 animal indica a classe 3 ($50 \text{ mg/kg} \leq DL_{50} \leq 300 \text{ mg/kg}$). Se houver a morte de 2 a 3 animais, administra-se a dose de 5 mg/kg .

Dose 5 mg/kg: A morte de 0-1 animal indica a classe 2 ($5 \text{ mg/kg} \leq DL_{50} < 50 \text{ mg/kg}$). Se houver a morte do 2 ou 3 animais, indica a classe 1 ($DL_{50} \leq 5 \text{ mg/kg}$) o que a caracteriza como altamente tóxica.

A verificação da classificação da toxicidade para dose de 5000 mg/kg é feita seguindo o protocolo descrito na Figura 2. A morte de 0-1 animal, caracteriza a amostra como classe 5 ($2000 \text{ mg/kg} \leq DL_{50} \leq 5000 \text{ mg/kg}$). A morte de 2 a 3 animais exige administração de uma dose de 2000 mg/kg.

Dose 2000 mg/kg: A morte de 0-1 animal indica classe 5 (DL_{50} por volta de 2500 mg/kg). Se houver morte de 2 a 3 animais, administra-se a dose de 300 mg/kg.

Dose 300 mg/kg: A morte de 0-1 animal indica classe 4 ($500 \text{ mg/kg} \leq DL_{50} \leq 2000 \text{ mg/kg}$). Se houver a morte de 2 a 3 animais, é administrada a dose de 50 mg/kg.

Dose 50 mg/kg: A morte de 0-1 animal indica a classe 3 ($50 \text{ mg/kg} \leq DL_{50} \leq 300 \text{ mg/kg}$). Se houver morte de 2 ou 3 animais, administra-se a dose de 5 mg/kg.

Dose 5 mg/kg: Essa é a menor dose e caso haja a morte de 0-1 animal, indica a classe 2 ($5 \text{ mg/kg} \leq DL_{50} \leq 50 \text{ mg/kg}$).

A presença de mais de uma morte nesta dosagem acusa uma alta toxicidade da substância classificada como classe 1; portando uma $DL_{50} \leq 5 \text{ mg/kg}$.

4.3.1 Teste de Toxicidade Aguda

Tendo em vista a metodologia supracitada e considerando a Portaria 116/96 do Ministério da Saúde (BRASIL, 1996) que concede uma liberdade de escolha na utilização das doses a serem administradas, os animais foram divididos em seis grupos de exposição ($n= 3$) e foram determinadas seis doses suficientemente espaçadas, a fim

de serem observadas as diferenças de graduação dos efeitos tóxicos. O espaçamento das doses correspondeu a 50%, o que na prática correspondeu a uma chance muito remota de que uma determinada dose matasse um animal e sua dose subsequente falhasse em fazê-lo.

O extrato etanólico bruto EEAS foi solubilizado em uma mistura de solução salina e DMSO e administrado via intraperitoneal (i.p.), conforme Tabela 2, em grupos de 3 ratos (n=3). Para solubilizar o extrato utilizou-se solução salina a 0,9% e dimetilsulfóxido (DMSO) numa concentração de no máximo 5% da solução.

Após a administração de EEAS, os animais foram observados continuamente por 3 horas e em seguida, observados a cada hora durante 24 horas para verificação de qualquer alteração no comportamento geral ou de atividades fisiológicas.

Os animais foram avaliados pelo método de *screening* hipocrático o qual verifica os efeitos produzidos por uma substância/extrato desconhecida sobre: estado de consciência, disposição, atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular, atividade do sistema nervoso central e autônomo do animal.

Seguindo o protocolo da OEDC (1996) e Portaria 116/96 do Ministério da Saúde (BRASIL,1996), quatro grupos de animais (n=3), foram tratados com as doses de: 500 mg/kg, 1000mg/kg, 2000 mg/kg, 3000 mg/kg e 5000 mg/kg de solução de EEAS, via intraperitoneal e 5000 mg/kg *per os* (TABELA 2).

TABELA 2 – Protocolo de diluição e administração de EEAS em ratos para determinação da toxicidade aguda

Dose mg/kg	Peso médio (g) dos ratos.	EEAS (mg)	Salina (mL)	DMSO (mL)	Administrado (mL)*
500 i.p	144	22	1,9	0,1	0,4
1000 i.p	144	44	1,9	0,1	0,4
2000 i.p	145	90	1,9	0,1	0,4
3000 i.p	145	135	1,9	0,1	0,4
5000 i.p	136	180	3,8	0,2	0,4
5000 p.o.	147,3	236,5	7,6	0,4	0,4

EEAS: Extrato etanólico de *Aspidosperma subincanum*.

* Os valores representam o cálculo do volume de EEAS diluído a ser administrado em função da média do peso corporal dos camundongos.

4.4 Toxicidade Subaguda

Para a avaliação da toxicidade subaguda de EEAS foi utilizada a metodologia descrita no Guia 407 das diretrizes da Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD, 1999) e as diretrizes da Portaria 116/96 do Ministério da Saúde (BRASIL, 1996).

Todo o procedimento experimental aqui utilizado atendeu às exigências da RDC 48 de 16 de março de 2004 da ANVISA/MS (BRASIL, 2004).

Este estudo foi realizado com o fim de obter informações sobre as propriedades tóxicas de *Aspidosperma subincanum* Mart., acerca dos riscos potenciais para a saúde, resultantes da administração de doses repetidas e diárias do EEAS por um período de 30 dias.

Todos os animais foram acomodados em gaiolas semi-metabólicas, permanecendo por um período de 7 dias para a aclimatação às condições do laboratório e familiarização com as gaiolas.

Os ensaios de toxicidade foram realizados em concordância com as normas de bioética aplicada a animais de experimentação preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), visando reduzir sofrimento e número de animais.

4.4.1 Tratamento dos animais

Previamente ao início do tratamento dos animais com o EEAS e/ou veículo, todos foram pesados para determinação da dose, e por todo o período da realização do ensaio, semanalmente, para possíveis reajustes nas doses (TABELA 4).

Os animais foram tratados via gavagem, com EEAS atentando-se para que o volume máximo administrado não ultrapassasse 1 mL/100g (10 mL/kg) de massa corpórea dos animais.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos de exposição ($n=8$), para cada nível de dose, sendo 1 grupo controle, 1 grupo satélite o qual foi tratado com a dose mais alta e os demais grupos para as doses de 125 mg/kg, 250 mg/kg e 500 mg/kg de EEAS, ressuspenso em solução salina e DMSO. O nível de dose foi estabelecido em três doses suficientemente espaçadas para mostrar diferenças na graduação dos efeitos tóxicos.

Um grupo controle (n=8), foi tratado com solução salina, recém preparada, conforme item 4.2 e DMSO em volume idêntico ao do extrato aplicado aos demais animais.

Findo o período de tratamento, no trigésimo primeiro dia, com exceção daqueles do grupo satélite, os animais foram submetidos a um jejum de 12 horas e anestesiados com uma solução de xilazina e cetamina de no máximo 0,10 mL/100g de massa corpórea, na proporção de 8,75 mL de cetamina e 1,25 mL de xilazina, submetidos à punção cardíaca para a coleta de sangue e posterior realização de exames hematológicos e bioquímicos. Para os exames bioquímicos da urina, neste dia também foi coletada a urina. Em seguida os animais foram mortos por deslocamento cervical, sendo feita a seguir a avaliação macroscópica das vísceras e coleta de material para exame histopatológico.

O grupo satélite foi cuidadosamente observado, por um período adicional de 30 dias sem a administração do EEAS, a fim de se analisar o caráter reversível e a persistência ou aparecimento de diferentes efeitos tóxicos, após a última administração do período de tratamento. Todos os animais deste grupo ao final do período de observação, no trigésimo primeiro dia, foram anestesiados, tiveram o sangue coletado para exames hematológicos e bioquímicos e posteriormente foram mortos por deslocamento cervical, sendo feita a seguir a análise macroscópica externa das vísceras e posterior análise histopatológica.

4.4.2 Observações realizadas

Durante o experimento foram realizadas observações sistemáticas sobre o comportamento dos animais e *screening* hipocrático, a saber: atividade geral, frêmito vocal, irritabilidade, resposta ao toque, resposta ao aperto da cauda, contorção, posição trem posterior, reflexo endireitamento, tônus do corpo, força para agarrar, ataxia, reflexo auricular, reflexo corneal, tremores, convulsões, straub, hipnose, anestesia, lacrimação, ptosis, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração, cianose, hiperemia, morte. Também foi observada a ocorrência de alterações da pele, pêlos, mucosas e olhos, diariamente, após a administração do EEAS.

Foram mensurados ainda: evolução ponderal, consumo de água e registro de letalidade.

4.4.3 Exames Laboratoriais

4.4.3.1 Exames hematológicos e bioquímicos

Para a execução destes exames foram coletados de cada animal, amostras de sangue até a exaustão, por punção cardíaca, aproximadamente 5 mL de sangue usando para tal uma seringa de 10 mL. Parte do sangue foi transferida para um tubo contendo 2 gotas de anticoagulante universal, o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), a fim de serem realizados os exames hematológicos; outra parte foi transferida para um tubo seco, para as análises bioquímicas. Para a contagem diferencial de leucócitos e verificação das plaquetas foi feito um esfregaço sangüíneo, antes da adição de EDTA. Os exames hematológicos realizados foram: contagem total de hemácias, contagem total e diferencial de leucócitos, contagem total de plaquetas, concentração de hemoglobina e hematócrito, sendo calculados os seguintes índices hematológicos: VCM (Volume Corpuscular Médio), HCM (Hemoglobina Corpuscular Média), MCHC (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média).

Os exames bioquímicos realizados foram: proteínas totais, albumina, bilirrubina, glicose, L-alanina-aminotransferase - ALT (TGP), L-aspartato-aminotransferase - AST (TGO), uréia, creatinina, colesterol, triglicérides e fosfatase alcalina - ALP, sódio, potássio, cálcio, creatina fosfoquinase (CPK), alfa-amilase.

Os exames de bioquímicos de urina realizados foram: pH, urubilinogênio, bilirrubina, glicose, cetonas, proteínas, sangue oculto, além de creatinina, ácido úrico e uréia.

Os exames foram realizados em Laboratório de Análises Clínicas terceirizado, de acordo com a metodologia e equipamentos citados na Tabela 8.

TABELA 8 – Metodologia e equipamentos utilizados na realização dos exames laboratoriais.

Exame	Metodologia	Marca kit	Equipamento	Marca Equipamento
Glicose	Enzimática	Katal	Autolab	Boehringer mannheim
Uréia	UV-cinético	Laborclin	Autolab	Boehringer mannheim
Creatinina	Cinética	Labtest	Autolab	Boehringer mannheim
TGP	UV-cinético	Laborclin	Autolab	Boehringer mannheim
TGP	UV-cinético	Laborclin	Autolab	Boehringer mannheim
Gama – GT	UV-cinético	Laborclin	Autolab	Boehringer mannheim
Fosfatase Alcalina	UV-cinético	Bioclin	Autolab	Boehringer mannheim
Proteínas totais	Biureto	Bioclin	Autolab	Boehringer mannheim
Albumina	Verde de Bromocresol	Katal	Autolab	Boehringer mannheim
Colesterol	Enzimático	Bioclin	Autolab	Boehringer mannheim
Triglicérides	Enzimático	Bioclin	Autolab	Boehringer mannheim
Hemograma	Automatizada	ABX	ABX Micros 60	ABX Diagnostics
EAS	Tira reagente 10 áreas e sedimentoscopia			Biobrás

4.4.4 Exames Histopatológicos

4.4.4.1 Processamento do material para microscopia de luz:

Após a morte dos animais, foram coletados fragmentos de pulmões, fígado, baço, cérebro, intestino, estômago, rins e coração. As amostras foram fixadas por imersão durante duas a três horas em paraformaldeído. Após a fixação, o material foi colocado para desidratação em banhos de concentrações crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 90% e três vezes 100%) durante uma hora para cada banho. Em seguida foi submetido a uma mistura de álcool-xilol (1:1) por uma hora, diafanizado em três banhos

de xanol de 40 minutos cada e posteriormente incluído em três banhos de parafina de uma hora cada. As amostras foram então emblocadas individualmente em parafina usando-se barras de Leuckhart. Os blocos foram cortados com espessura de cinco micrômetros em micrótomo Spencer ‘820’ e os cortes colocados em estufa, por 24 horas, para que aderissem às lâminas. Para coloração HE (hematoxilina/Eosina) as lâminas foram colocadas em uma seqüência de banhos, de um minuto cada, em: xanol puro (três vezes), álcool/xanol (1:1), álcool etílico 100%, 90%, 80% e 70%, Hematoxilina, água corrente, Eosina, álcool 70%, 80%, 90%, álcool/xanol (1:1), xanol puro (três vezes) e montadas em meio Bálsmo do Canadá e lamínula. Posteriormente as lâminas foram analisadas e fotomicrografadas.

Neste estudo de toxicidade de doses repetidas, os tecidos de todos os animais são guardados em blocos de parafina e em lâminas, por pelo menos 5 anos a partir do término dos experimentos.

5. Análises Estatísticas

Os resultados numéricos foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) e foram organizados e resumidos na forma de tabelas e gráficos. Para as variáveis consideradas dentro da distribuição normal, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) para verificar diferenças significativas entre os grupos. As análises foram feitas com auxílio do programa GraphPad Prism 4.0. Nos casos em que foram detectadas diferenças significativas entre os grupos, foi utilizado o teste de contraste de Tukey. Para todos os grupos foram considerados estatisticamente significativos quando $P < 0,05$.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS E DISCUSSÃO



CAPÍTULO 3: RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora no Brasil existam normas e legislação para garantir a segurança e qualidade dos fitoterápicos, a planta medicinal comercializada por raizeiros, em feiras, ervanários, e outros locais pouco apropriados, não estão sujeitas a esse controle. Além disso, para muitas das plantas utilizadas popularmente, não há registros facilmente disponíveis, de suas características macroscópicas, de marcadores químicos. Dessa forma, informações que possam fornecer subsídios para a correta identificação e garantia dos três princípios fundamentais para um medicamento – qualidade, eficácia e segurança – são necessárias, principalmente para aquelas espécies que têm uso mais evidente no Brasil e/ou América Latina, que em outros países nos quais o controle da utilização de material botânico como medicinal é mais rígido.

1. Perfil Farmacognóstico

1.1 Análise macroscópica da casca

A avaliação macroscópica das cascas significa, em linhas gerais, observar os aspectos macroscópicos internos e externos que possam ser utilizados como pontos marcantes para a identificação e determinação da pureza da droga vegetal.

As cascas secas de *Aspidosperma subincanum* Mart. apresentaram-se em pedaços de tamanhos variados, enroladas no sentido transversal, às vezes canaletadas. A superfície externa apresentou súber de cor parda com lenticelas que se destacaram, com fissuras no sentido longitudinal e transversal. Quando o súber foi removido, a superfície externa apresentou coloração amarela esverdeada constituindo uma casca mondada. A superfície interna apresentou cor clara com tons amarelados, a fratura apresentou-se externamente granulosa e internamente fibrosa. A secção transversal apresentou coloração clara com tons amarelados na região mais interna.

Os aspectos observados foram compatíveis com aqueles esperados para *Aspidosperma subincanum* Mart. de acordo com Gomes (1997).

1.2 Análise microscópica da casca

A análise microscópica de cascas, da mesma forma que a análise macroscópica, serve como parâmetro nos processos de identificação de espécies e pode ser fundamental na identificação de adulterantes. Assim, em uma casca completa, em secção transversal, é possível observar regiões distintas e características, onde são considerados o número de camadas, formatos das células, tipos de células e inclusões citoplasmáticas, que em alguns casos são específicas de determinadas espécies.

As secções transversais e longitudinais das cascas de *Aspidosperma subincanum* Mart. em corante de Etzold mostraram as seguintes características: o súber em várias camadas de células achataadas, que se apresentaram coradas em marrom (FIGURA 46A, Su), e uma região cortical próxima a ele (logo abaixo do feloderma) apresentando uma camada constituída quase completamente por células pétreas (FIGURA 46A, Cpe). A região cortical possui fibras gelatinosas de parede não lignificada (FIGURA 46B, Fg e FIGURA 48A, Fg). O parênquima cortical apresentou agrupamentos de células pétreas/esclereides (FIGURA 46B, Esc), células parenquimáticas ricas em cristais prismáticos e grãos de amido isolados ou agrupados e ainda a presença de canais secretores (FIGURA 46C, Ga e Cs). A região floemática possui raios unisseriados, grãos de amido isolados ou agrupados nas células parenquimáticas e fibras lignificadas alongadas envoltas por bainhas cristalíferas (FIGURA 46D, Fl e Rp e FIGURA 48B, Fl).

Os cortes transversais e longitudinais radiais em corante de Steinmetz apresentaram: o súber, as esclereides do parênquima cortical e algumas fibras maiores foram coradas em dourado (FIGURA 47A e B). A região floemática apresentou fibras lignificadas e gotas de material lipídico (FIGURA 47B, Gl, Fl). O reagente evidenciou a presença de canais secretores contendo material lipídico (FIGURA 47C, Cs e Gl).

Na microscopia do pó da casca do *Aspidosperma subincanum* Mart. (FIGURA 49), foi observada a presença de fragmentos de fibras lignificadas envolvidas por bainha cristalífera, de cristais prismáticos (FIGURA 49A, Fl e FIGURA 49E, Cpr), de fragmentos de fibras gelatinosas, poucas células pétreas e grãos de amido pequenos, esféricos e isolados (FIGURA 49B, Fg; 49C, Cpe; 49D, Ga).

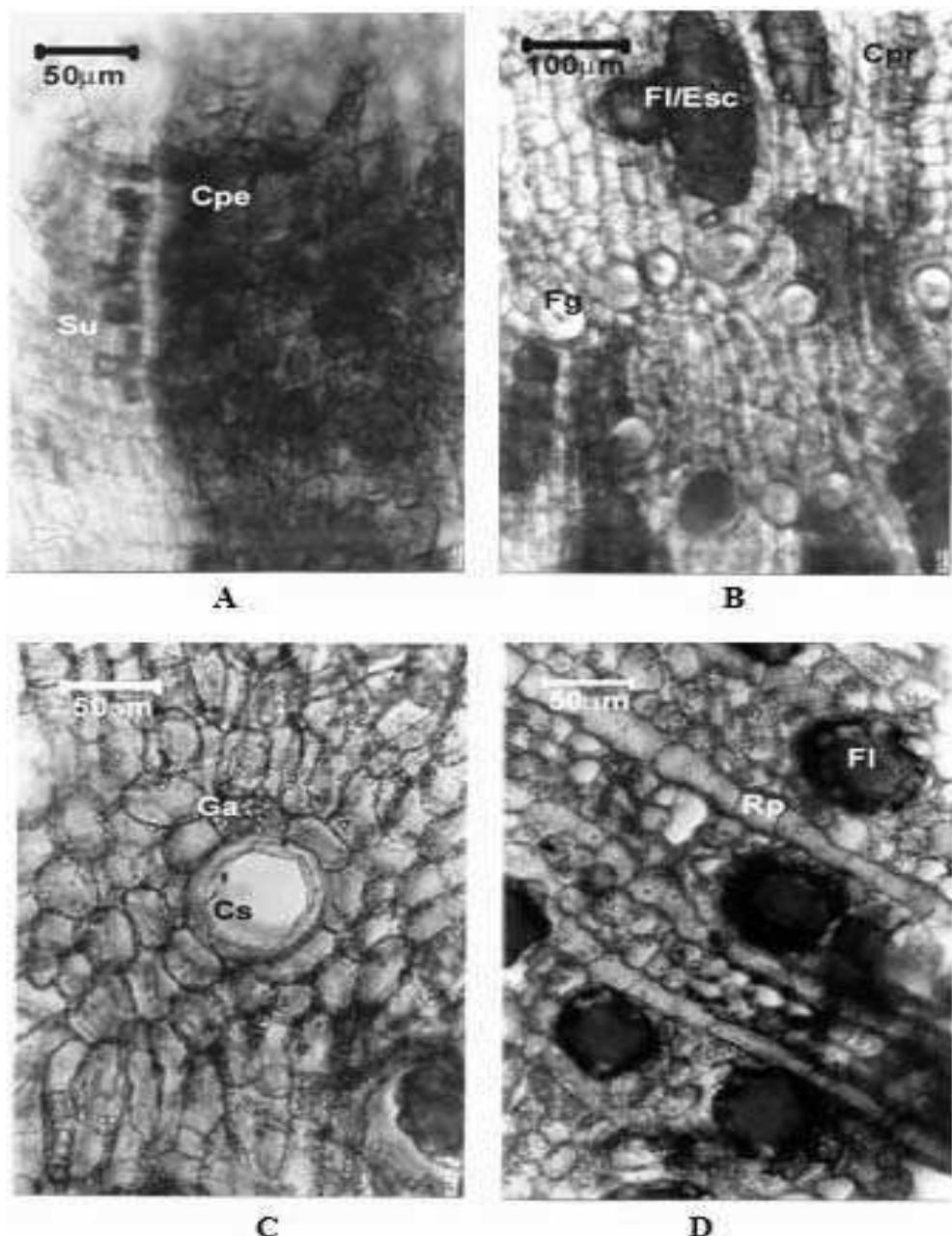


FIGURA 46 – Secção transversal da casca de *Aspidosperma subincanum* submetidas ao reagente de Etzold. A – Região de súber e parênquima cortical. B e C – região de parênquima cortical. D – Região floemática. Su – súber, Cpe – células pétreas, Cpr – cristais prismáticos, Fg – fibras gelatinosas, Fl – fibras lignificadas, Esc. – esclereídes, Cs – canal secretor, Rp – raios parenquimáticos , Ga – grãos de amido.

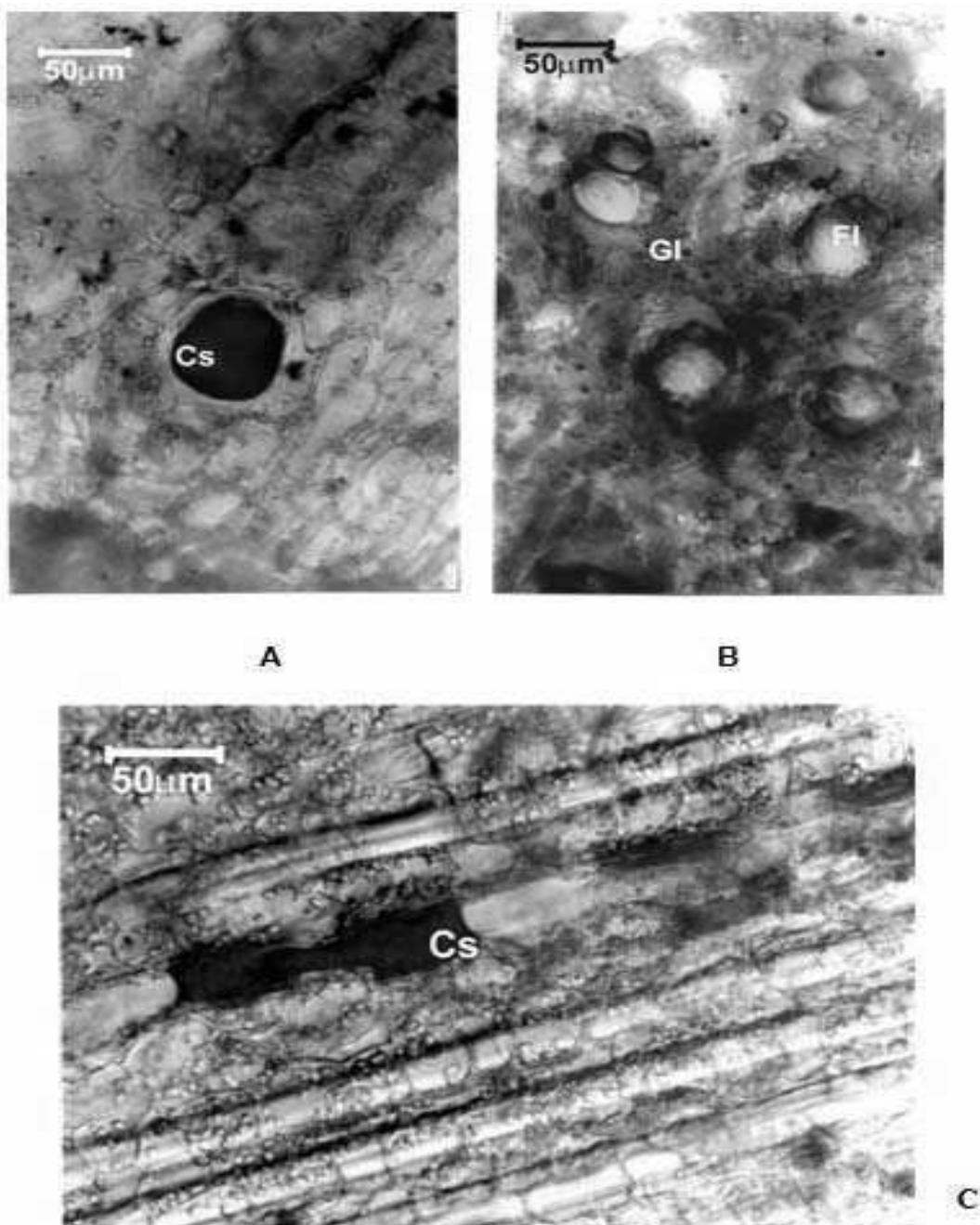


FIGURA 47 – Secções transversal e longitudinal radial da casca de *Aspidosperma subincanum* submetidas ao reagente de Steinmetz. A – Secção transversal da região cortical mostrando a presença de canal secretor (Cs) com material lipídico. B - Secção transversal da região floemática. C – Secção longitudinal radial da região cortical. Cs – canal secretor, Gl – gota de material lipídico, Fl – fibra lignificada.

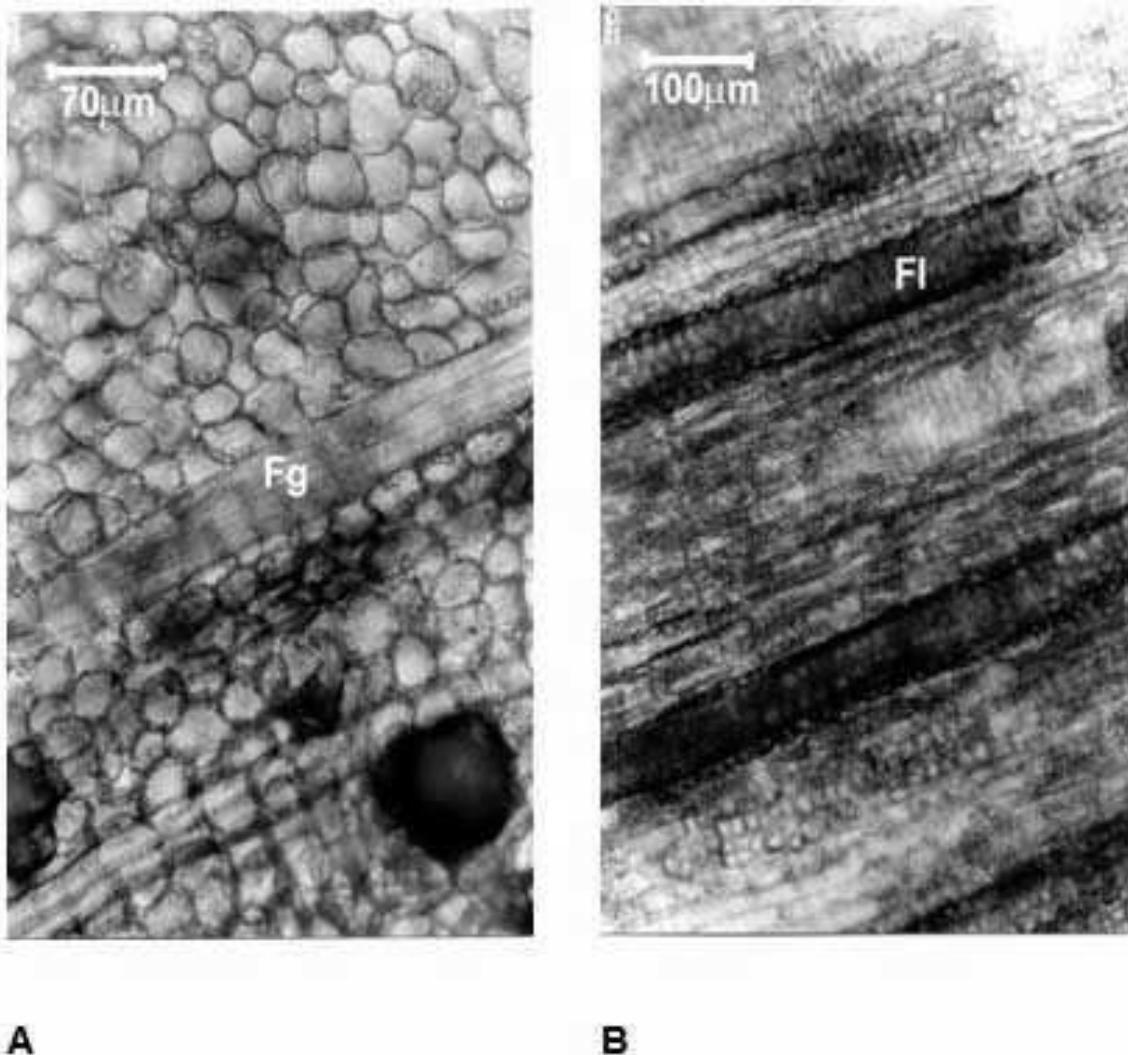


FIGURA 48 – Secções longitudinais radiais da casca de *Aspidosperma subincanum* submetidas ao reagente de Etzold. A – Região de parênquima cortical. B – Região floemática Fg – fibra gelatinosa, Fl – fibra lignificada.

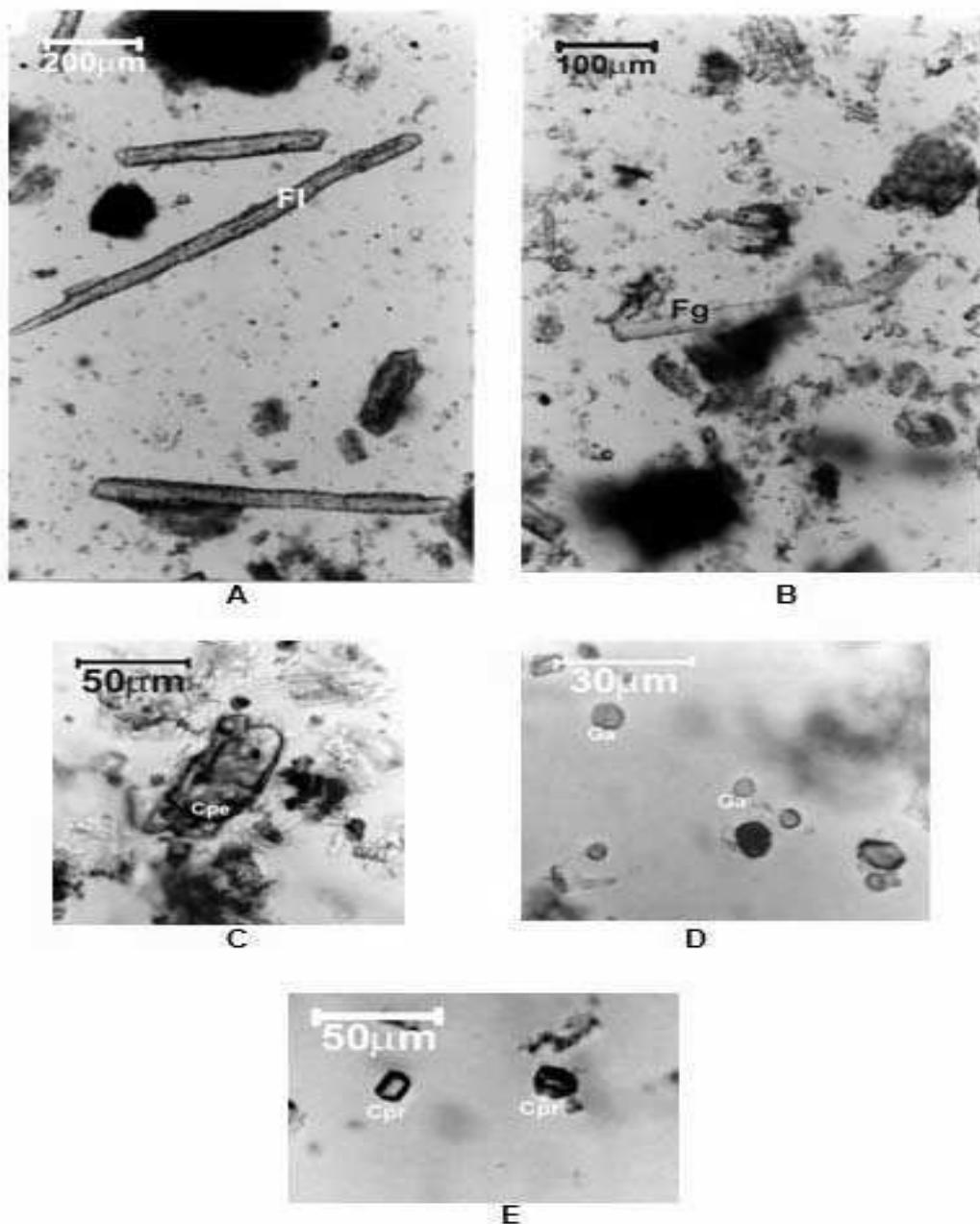


FIGURA 49 – Microscopia do pó da casca de *Aspidosperma subincanum* submetido ao reagente de Steinmetz. Fl – fibra lignificada envolvida por bainha cristalífera, Fg – fibra gelatinosa, Cpe – célula pétrea, Ga – grãos de amido, Cpr – cristal prismático.

1.3 Prospecção fitoquímica

Os processos de prospecção fitoquímica são de extrema importância pois permitem identificar qual ou quais classes de metabólitos secundários e/ou princípios ativos estão presentes em dada amostra vegetal e, a partir daí, orientar a extração e/ou fracionamento dos extratos para o isolamento dos compostos de maior interesse. Muitas substâncias, quando tratadas por determinados reativos, apresentam reações de coloração e/ou de precipitação características, que permitem a identificação das amostras que as contêm.

Além disso, algumas espécies possuem substâncias que são características; assim, sua presença ou não na amostra, permite averiguar a identidade daquele material vegetal.

Através dos testes de prospecção fitoquímica os seguintes resultados foram obtidos (TABELA 3):

TABELA 3 – Prospecção fitoquímica a partir do pó da casca de *Aspidosperma subincanum* Mart.

Classes	Reações	Resultados*
Heterosídeos antracênicos	Borntraeger	-
Esteróides e Triterpenóides	Liebermann-Burchard	+
	Keller-Kiliani	-
	Kedde	-
Compostos fenólicos	FeCl ₃	-
	AlCl ₃	-
	Shinoda Oxalo-bórica	-
Flavonóides		-
	Índice de espuma	+
Saponinas	Gelatina	+
Taninos	Dragendorff	+
Alcalóides	Sais metálicos	+
Cumarinas	NaOH	+
Resinas	Turvação do Ext. alcoólico pela adição de água.	+

* : (-) ausência ; (+) presença

1.4 Testes de pureza

1.4.1 Determinação do teor de umidade

O excesso de umidade em amostras vegetais favorece a ação enzimática e pode levar ao desenvolvimento de fungos e bactérias, e, consequentemente, à deterioração da amostra e degradação das substâncias químicas presentes (SIMÕES *et al.*, 2003).

Os métodos empregados atualmente descritos pela Farmacopéia Brasileira IV Edição, Parte I (1988) são: gravimétrico (perda por dessecção), azeotrópico (destilação com tolueno) e volumétrico (Karl Fischer), sendo que o primeiro é mais simples e rápido e é preconizado por outras Farmacopéias, como a Alemã e a Britânica, e pela OMS. Sua limitação reside em não ser adequado para amostras vegetais contendo substâncias voláteis (SIMÕES *et al.*, 2003).

O objetivo deste teste é de estabelecer se as condições de conservação e armazenamento do material vegetal foram adequadas. A água residual de matéria prima vegetal está diretamente relacionada com o armazenamento correto. Um teor elevado de umidade constitui-se em ambiente favorável à proliferação de microorganismos e para a degradação de seus constituintes micromoleculares. A Farmacopéia Brasileira IV Edição, 2000 especifica que a faixa adequada de teor de umidade para conservação de vários órgãos vegetais ocorre de 8 a 14%.

Nas condições de análise, a amostra do pó de *Aspidosperma subincanum* Mart. apresentou teor de umidade de 8,9%, estando assim dentro da conformidade.

1.4.2 Determinação do teor de cinzas totais

A determinação de cinzas totais visa determinar a quantidade de material inorgânico não volátil presente na amostra, através de um processo de incineração determinado. Essa análise permite a verificação de adulteração da amostra, através da observação da quantidade de material inorgânico na mesma, após a calcinação. As cinzas totais incluem aquelas derivadas de tecido vegetal (cinzas fisiológicas) e derivadas de materiais estranhos, especialmente areia e terra aderente à superfície da droga (cinzas não fisiológicas) (FARM. BRAS. IV, 2000).

O resultado obtido para a amostra de cascas *Aspidosperma subincanum* Mart. foi de 9,35% de cinzas totais. Considerando que, na revisão bibliográfica realizada não foi encontrado os valores de cinzas totais para *Aspidosperma subincanum* Mart., esse dado pode fornecer subsídio no controle de qualidade dessa matéria prima vegetal.

1.4.3 Determinação do teor de cinzas insolúveis

As cinzas insolúveis em ácido compreendem o resíduo obtido no aquecimento, à ebulação, de cinzas totais ou sulfatadas com ácido clorídrico diluído, após filtragem, lavagem e incineração. O método destina-se à determinação de sílica e seus derivados no material vegetal (FARM. BRAS. IV, 2000).

O resultados obtidos para a amostra de cascas de *Aspidosperma subincanum* Mart. foi de 0,48%.

2. Avaliação da toxicidade de EEAS

2.1 Toxicidade aguda

O protocolo utilizado é um procedimento em etapas no qual são utilizados 3 animais de um mesmo sexo em cada uma. Dependendo da mortalidade ou da condição de quase-morte dos animais, 2 a 4 etapas podem ser necessárias para permitir uma correta avaliação da toxicidade aguda da amostra testada. Esse protocolo utiliza uma pequena quantidade de animais, tem sido extensivamente validado, desde sua adoção em 1996.

Nas condições do experimento, nenhuma das doses de EEAS administradas por via intraperitoneal (500 mg/kg, 1000 mg/kg e 2000 mg/kg), promoveu o óbito de qualquer dos indivíduos. Os animais também não apresentaram diferenças significativas de comportamento quando avaliados pelo método de *screening* hipocrático, mantendo consciência, estados de sedação/alerta, tônus muscular e coordenação motora semelhantes àqueles anteriores ao tratamento.

Considerando que EEAS não apresentou toxicidade nas doses avaliadas, e em conformidade com o protocolo da OECD (1996), uma segunda avaliação de toxicidade foi realizada, com uma dose 50% superior àquela anteriormente utilizada (3000 mg/kg), pela mesma via de administração (i.p.). Adicionalmente, uma dose 2,5 vezes superior à maior utilizada no teste anterior (5000 mg/kg) foi administrada a outro grupo de animais, via oral. Durante todo o experimento não foi constatado óbito.

De acordo com o Guia 423 (OECD, 1996), em um ensaio de toxicidade no qual não ocorra óbito de mais que um animal ao ser administrada a dose de 2000 mg/kg, o valor da DL₅₀ (dose suficiente para matar 50% dos animais) pode ser estimado como sendo maior que 2000 mg/kg de massa corpórea.

Nesse mesmo protocolo é considerada praticamente atóxica a amostra que apresente um valor de DL₅₀ acima de 2000 mg/kg ou entre 2000 e 5000 mg/kg.. O mesmo documento não aconselha a realização do teste de toxicidade aguda utilizando a dose de 5000 mg/kg, como uma forma de proteção à vida do animal e por dificuldades técnicas de solubilização e administração, a não ser que tal teste seja necessário em um estudo para garantir a qualidade da saúde humana (OECD, 1999). Portanto, considerando os parâmetros da OECD, o EEAS mostrou-se praticamente atóxico neste teste.

Litchfield e Wilcoxon (1949) propuseram que a DL₅₀ seja determinada quando a dose letal aproximada (DLA) for inferior a 2000 mg/kg. No teste realizado foi observado que nem mesmo a dose de 5000 mg/kg provocou algum dano. Dessa forma, não foi possível a determinação de DL₅₀ para o EEAS.

Acredita-se que a resposta dos animais frente à administração por gavagem possa não ser a mesma daquela observada quando utilizada a via intraperitoneal, devido às diferenças existentes entre os perfis de absorção estomacal e intestinal (pH, superfície de absorção, motilidade intestinal, irrigação sanguínea). Por esse motivo, o teste de toxicidade aguda foi realizado utilizando as duas vias de administração.

Nas condições dos experimentos não houve diferenças de comportamento dos animais testados, quando esses foram avaliados através da aplicação de *screening* hipocrático. E, considerando as condições experimentais, o EEAS é praticamente atóxico em exposição aguda a altas doses.

2.2 Toxicidade subaguda

Os sinais de intoxicação sistêmica são avaliados a partir da redução na massa corporal dos animais experimentais, na redução no consumo de água e ração, alterações comportamentais, apatia, e outros que podem sinalizar, por exemplo, injúria hepática (RAUBERT *et al.*, 2006; JAHN; GUNZEL, 1997).

Os resultados mostraram que a administração oral de EEAS (125, 250 e 500 mg/kg) por gavagem, por 30 dias, de forma geral, não produziu efeitos tóxicos em ratos Wistar adultos machos, uma vez que durante o tratamento, nenhum sinal clínico visível de toxicidade foi detectado.

Durante o período do experimento o peso corporal e água, foram anotados semanalmente e os animais foram observados para detecção de qualquer alteração comportamental.

Na análise de evolução ponderal (TABELA 4 e FUGURA 54), pôde ser observado que o EEAS administrado por via oral não alterou de forma significativa o ganho de massa corporal, no entanto existiu uma tendência de redução de peso ao longo do experimento, provavelmente pelo produto administrado, já que no grupo controle foi administrado apenas veículo. Além disso, não houve alterações significativas no consumo de água e ração.

TABELA 4 - Efeito EEAS 125, 250 e 500 mg/kg administrado por via oral sobre peso dos ratos Wistar adultos tratados por 30 dias consecutivos. (p.o.; n = 8)

	<i>Controle</i>	<i>G2</i>	<i>G3</i>	<i>G4</i>	<i>Satélite</i>
Aclimatação	293,8±2,2	271±2,5	281±1,9	252±3,1	228±11,7
Semana 1	305,0±14,6	*280±4,8	294±3,4	*261±2,6	*240±6,0
Semana 2	321,1±7,1	*280±12,1	305±3,1	*260±2,8	*248±10,2
Semana 3	298,3±8,9	283±68,3	296±16,4	258±4,9	*238±16,5
Semana 4	322,3±8,2	*285±6,9	307±4,3	*267±4,0	*265±10,4
Último dia	315,4±7,6	*289±6,2	302±3,0	*271±4,7	-

Grupo 1 (Controle)= Sem tratamento; Grupo 2 = 125 mg/kg; Grupo 3 = 250 mg/kg; Grupo 4 = 500 mg/kg; Grupo 5 (Satélite)= 500 mg/kg, mantidos por um período adicional de 30 dias, sem tratamento, após a finalização do período de tratamento subagudo com o EEAS. * Estatisticamente diferentes do grupo controle (ANOVA seguido de Teste Tukey, p<0,05

EVOLUÇÃO PONDERAL

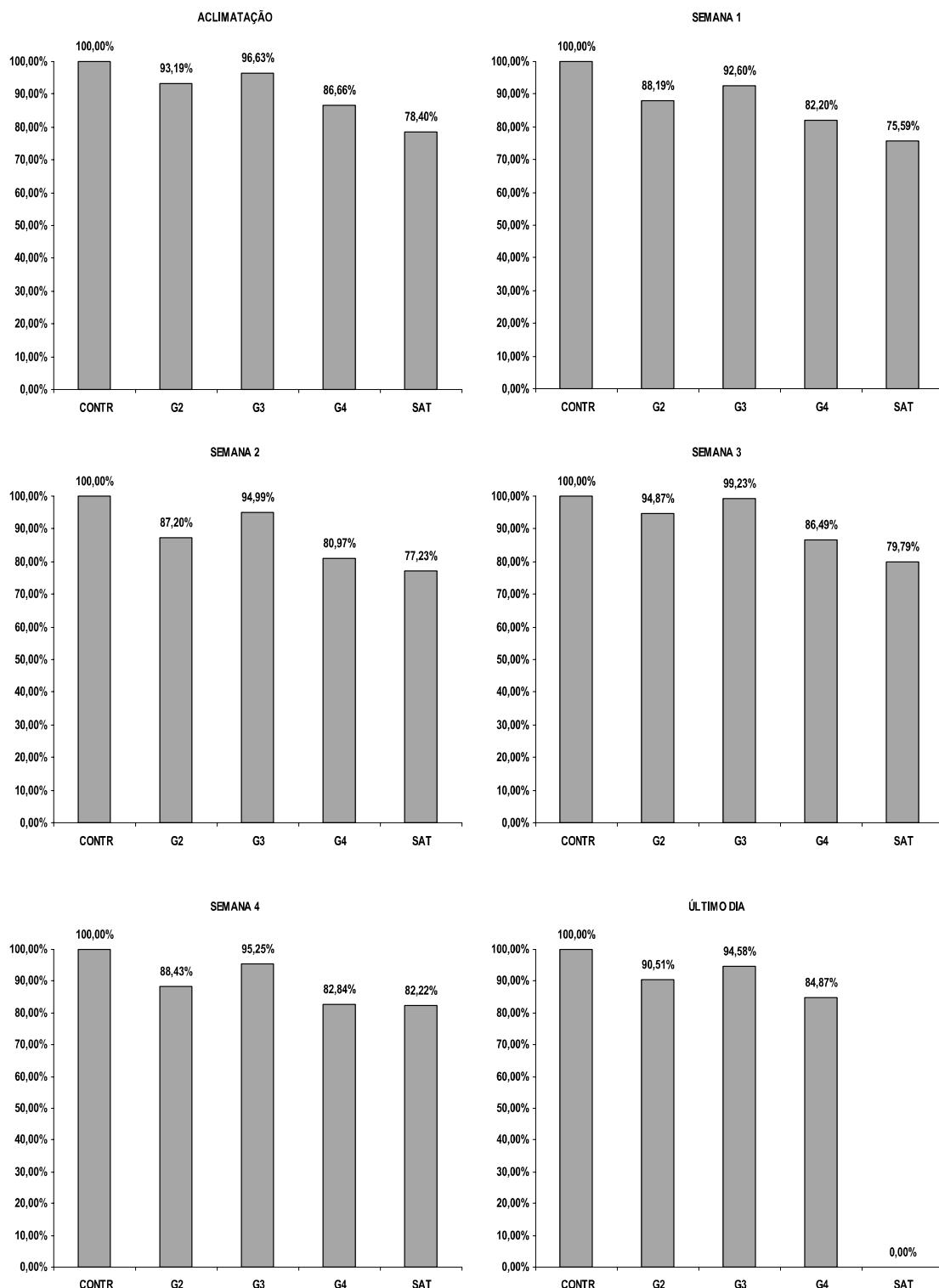


FIGURA 54 - Efeito EEAS 125, 250 e 500 mg/kg administrado por via oral sobre peso dos ratos Wistar adultos tratados por 30 dias consecutivos. (p.o.; n = 8). Grupo 1 (Controle)= Sem tratamento; Grupo 2 = 125 mg/kg; Grupo 3 = 250 mg/kg; Grupo 4 = 500 mg/kg; Grupo 5 (Satélite)= 500 mg/kg, mantidos por um período adicional de 30 dias, sem tratamento, após a finalização do período de tratamento subagudo com o EEAS. * Estatisticamente diferentes do grupo controle (ANOVA seguido de Teste Tukey, p<0,05)

2.2.1 Análise laboratorial

Outros sinais de toxicidade podem ser expressos por alterações bioquímicas do sangue e urina, como mostram os resultados abaixo.

2.2.1.1 Análise dos parâmetros bioquímicos e celulares da urina

A avaliação da nefrotoxicidade induzida quimicamente deve incluir a análise de urina, a serologia bioquímica e a histopatologia, para fornecer um perfil razoável dos efeitos funcionais e morfológicos de um composto sobre o rim (KLAASSEN; WATIKINS, 2001). A análise da urina fornece uma avaliação relativamente fácil e não invasiva da integridade da função renal, fornecendo alguns elementos sobre a natureza da agressão renal.

A urina dos ratos de todos os grupos apresentou-se com aparência considerada dentro da normalidade: cor amarela citrino, sem variação de valores de pH e densidade entre os grupos. A presença de nitritos, glicose, corpos cetônicos, urobilinoglobulina, bilirrubina e cristais permaneceu dentro dos valores normais em todos os grupos. Não foi encontrada hemoglobina nas amostras dos grupos tratados. Contudo, no grupo controle esteve presente em 5 animais.

A TABELA 5 e a FIGURA 50 apresentam a variação nos parâmetros bioquímicos da urina.

TABELA 5 – Efeito de EEAS (125, 250 e 500 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros bioquímicos da urina ($X \pm DP$) em ratos Wistar adultos tratados por 30 dias consecutivos. (p.o.; n = 8)

Grupo	N	Densidade (mg/L)	pH	Proteína (g/dL)	Cels epiteliais (%)	Piócitos (%)	Hemáceas (%)
Grupo 1	8	1010,7±3,45	7,4±0,376	147,14±157	5143±2853,56	6714±4347	13857±8802
Grupo 2	5	1016±8,215	7,1±0,65	340±219	23600±8385	4600±2073,6	25400±8876,9
Grupo 3	4	1010±7,07	7,5±0,288	382,5±235	19750±18661	9750±974,5	13250±11814,5
Grupo 4	7	1006,42±3,7	7,5±0,288	428,57±188,98*	2728,6±15217*	16000±15000*	20000±17204,65

Grupo 1 (Controle)= Sem tratamento; Grupo 2 = 125 mg/kg; Grupo 3 = 250 mg/kg; Grupo 4 = 500 mg/kg.

*Estatisticamente diferentes do grupo controle (ANOVA seguido de Teste Tukey, p<0,05)

As análises do número de células presentes nas amostras de urina mostraram diferenças significativas entre o Controle e o grupo 4 nos parâmetros piócitos, células epiteliais e proteínas,

sendo que os valores maiores foram para o grupo 4 (recebendo EEAS 500 mg/kg) (FIGURA 50 e TABELA 5).

Alterações no número de piócitos presentes, mais especificamente seu aumento, sinalizam a ocorrência de um processo infeccioso ou inflamatório no trato urinário. O aumento de células epiteliais sugere maior descamação do epitélio do trato urinário, provavelmente devido a algum efeito irritante provocado por substâncias presentes no extrato.

O aumento de proteínas pode ser indicativo de um aumento na permeabilidade do glomérulo, uma vez que as proteínas não passam no filtro renal, no entanto a que se considerar o consumo de ração com elevado teor de proteínas.

A excreção de proteínas de alto peso molecular, tais como albumina, é sugestiva de lesão glomerular, enquanto a excreção de proteínas de baixo peso molecular, sugere uma lesão do túbulo proximal.

Pela a serologia sanguínea a confirmação da presença de creatinina poderá auxiliar na avaliação sobre os potenciais efeitos do EEAS sobre a filtração glomerular, pois a ela é normalmente filtrada pelo glomérulo. Assim um aumento das concentrações séricas sugerem uma diminuição na filtração glomerular, todavia a creatinina é relativamente insensível aos índices de filtração glomerular, sendo necessária uma diminuição de 50 – 70% da mesma para que se note um aumento da creatinina no soro. O aumento deste metabólito no sangue não reflete necessariamente uma lesão renal induzida por um composto químico, mas podem ser secundários a desidratação, hipovalemia ou catabolismo de proteínas.

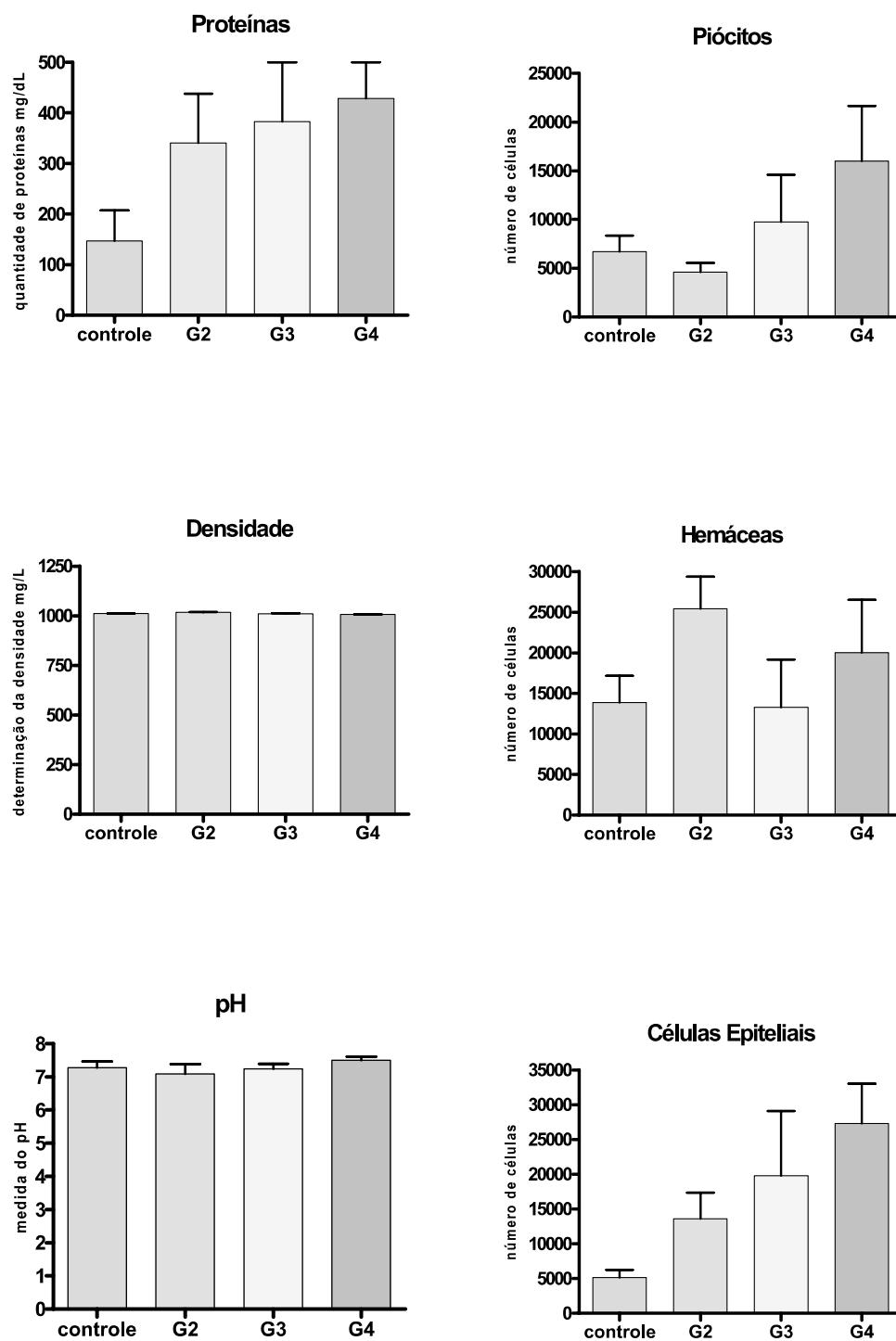


FIGURA 50 - Efeito de EEAS (125, 250 e 500 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros bioquímicos da urina ($X \pm DP$) em ratos Wistar adultos tratados por 30 dias consecutivos. Estatisticamente diferentes do grupo controle (ANOVA seguido de Teste Tukey, $p < 0,05$). (p.o.; n=8)

2.2.1.2 Análise dos parâmetros hematológicos

O fígado é um órgão muito suscetível a agressões químicas que podem resultar em processos inflamatórios ou necrosantes. O grau da lesão hepática provocada por injúria química ou biológica pode variar, podendo levar a alterações leves das enzimas hepáticas sem desenvolvimento de sintomas clínicos, até casos mais graves de insuficiência hepática aguda ou crônica.

Em fase inicial, a lesão hepática pode ser detectada a partir do aumento dos níveis de enzimas hepáticas no sangue. Esse aumento pode ser devido à necrose celular ou pelo aumento da permeabilidade da membrana celular. Algumas das enzimas que podem ser utilizadas como indicadoras de injúria hepática são alanina-aminotransferase (ALT), também denominada transaminase glutâmico-pirúvica (TGP); aspartato-aminotransferase (AST), também denominada transaminase glutâmico-oxaloacética (TGO); *gama*-glutamiltransferase (GGT), também denominada *gama*-glutamilpeptidase (GGP); fosfatase alcalina (ALP).

A transaminase glutâmico-oxaloacético (TGO) é encontrada também no miocárdio, músculo esquelético, rim e cérebro, mas de forma geral, em virtude de sua ampla distribuição, a TGO não tem sido rotineiramente utilizada como parâmetro laboratorial em ratos. Seus valores normais não diferem significativamente com a idade ou sexo dos animais, mas seus níveis elevam-se na ocorrência de oclusão arterial aguda, proporcionalmente ao grau de isquemia. Em casos de dano muscular severo, a persistência de altos níveis de TGO indica dano tecidual irreversível (ELY *et al.*, 2000). Em congestão hepática por problemas cardíacos, seus níveis apresentam-se elevados devido ao fígado congestionado (SCHEFFER; GONZÁLEZ, 2007).

A transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) é encontrada em tecidos com metabolismo ativo de aminoácidos tais como fígado, rins, músculos esqueléticos e cardíacos. Nutrição inadequada e falha renal podem levar à diminuição da atividade dessa enzima. Seu aumento sérico está relacionado com a extensão e não com a gravidade da lesão. A persistência de valores elevados por mais de 2 semanas, pode ser indicativo de uma patologia crônica como neoplasia ou hepatite (SCHEFFER; GONZÁLEZ, 2007). Assim, seguindo o protocolo da OECD, o grupo satélite, ao final de 60 dias, foi submetido a exames clínicos laboratoriais e observações histopatológicas.

A fosfatase alcalina (ALP) está presente em vários tecidos, principalmente ósseo, no sistema hepatobiliar e na mucosa gastrointestinal. Ela é indicadora da ocorrência de colestase (fluxo biliar prejudicado), que pode levar a um incremento dos níveis séricos em até 10 vezes (SCHEFFER; GONZÁLEZ, 2007).

A gama-glutamiltransferase (GGT) apresenta grande atividade nos rins e no fígado, mas no plasma, somente aquela de origem hepática é encontrada, pois a renal é eliminada na urina. O aumento da sua concentração sérica também está envolvido com a ocorrência de colestase.

As análises das enzimas aminotransferases séricas (TGP e TGO) e da fosfatase alcalina (ALP), mostraram um aumento estatisticamente significativo entre o grupo Controle e o grupo Satélite, apenas para os níveis plasmáticos de TGO.

A diminuição da filtração glomerular, de forma geral, leva ao aumento das concentrações plasmáticas de creatinina e uréia. Em ratos, níveis plasmáticos alterados para uréia não são bons indicadores de lesão renal, mas alterações na creatinina podem ser um indicador confiável para avaliar a presença da lesão, pois seu nível sérico não é influenciado pela dieta, idade ou sexo.

Nos resultados obtidos, os parâmetros bioquímicos mostraram diferenças estatísticas para os valores de creatinina entre os grupos Controle e Grupo 4 o que pode ser indicativo de diminuição na filtração glomerular. Um aumento estatisticamente significativo ocorreu também para o parâmetro proteínas totais, fato que pode indicar uma lesão do túbulo proximal.

Foi observada também hipoalbuminemia, não estatisticamente significativa, mas pela significância clínica dessa alteração, considerando que o valor de albumina dos animais de todos os grupos inclusive o grupo Controle, foi menor que o limite inferior de referência desse parâmetro (3,4 g/dL) (BIRCHARD; SHERDING, 1998). Tal condição clínica ocorre por redução da ingestão de alimentos, podendo, contudo decorrer de lesão hepática grave, considerando que a síntese da albumina é exclusivamente hepática. (KANEKO *et al.*, 1997).

O tratamento por trinta dias consecutivos com EEAS, de forma geral, não induziu modificações no perfil hematológico dos ratos (TABELA 6 e FIGURA 51), exceto para os valores de volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) os quais apresentaram aumento significativo para o grupo satélite ($p \leq 0,05$).

As análises dos índices hematimétricos são importantes indicadores na determinação do tipo morfológico das anemias. Os índices CHCM, VCM e HCM foram estatisticamente diferente para o Grupo Satélite em relação ao Grupo Controle fornecendo indícios de anemia microcítica durante o período de tratamento, tendendo a valores normais com a suspensão do tratamento.

A contagem diferencial de neutrófilos, linfócitos e monócitos apresentou-se semelhante entre os grupos ocorrendo apenas pequenas variações não significativas (TABELA 6 e FIGURA 51).

Embora, estatisticamente, a contagem diferencial dos monócitos não tenha apresentado variações entre os grupos, foi observada monocitose em todos, exceto para o grupo Satélite o que pode ser caracterizado como uma monocitose inespecífica, pois na contagem total de leucócitos não houve modificações e segundo Klaassen e Watkins (2001), nem a monocitose nem a monocitopenia parecem ser especificamente induzidas por agressões químicas.

TABELA 6 - Efeito EEAS (125, 250 e 500 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros hematológicos em ratos Wistar adultos tratados por 30 dias consecutivos. (p.o.; n = 8/grupo)

Parâmetros	Controle	EEAS 125mg/kg	EEAS 250mg/kg	EEAS 500 mg/kg	Satélite
HEM ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	7,08±0,4	6,85±0,4	7,09±0,3	6,9±0,4	6,66±0,5
HT (%)	38,59±2,3	37,92±2,2	38,20±1,8	37,01±1,9	39,4±3,3
HB (g/dL)	12,81±0,8	12,74±0,7	12,77±0,5	12,39±0,5	13,7±1,2
VCM (ft)	53,89±1,9	54,38±2,4	53,83±0,9	52,29±2,8	*58,0 ±2,5
HCM (pg)	18,09±0,3	18,60±0,4	18,00±0,1	17,97±0,4	*20,5±0,6
CHCM (g/dL)	33,21±0,3	33,60±0,4	33,44±0,4	33,49±0,8	*34,7±0,5
RDW (%)	13,34±0,3	13,32±0,3	13,18±0,4	13,53±0,6	13,6±1,1
Leucócitos (%)	6425±2125,3	8320±1183,9	7283,33±1387	7300±1755,8	7066,67±2703,5
Neutrófilos (%)	19,63±4,3	16,00±4,1	19,33±4,3	15,71±3,1	19,3333±6,1
Eosinófilo	0,63±0,1	0,20±0,4	1,50±1,0	0,43±0,5	0,833±1,1
Linfócitos (%)	71,25±4,2	73,40±3,7	69,83±4,9	75,00±3,4	73,5±6,6
Monócitos (%)	8,5±1,1	10,40±1,8	9,33±1,1	8,86±2,0	6,667±1,2*
Plaquetas (%)	609,88±84,3	595,00±29,1	659,00±57,4	653,71±35,1	550,167±184,2

Os valores representam a média ± e.p.m (n=8) *Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido de Teste Tukey, p<0,05)

TABELA 7 - Efeito EEAS (125, 250 e 500 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros bioquímicos do sangue em ratos Wistar adultos tratados por 30 dias consecutivos. (p.o.; n = 8/grupo)

<i>Parâmetros</i>	<i>Controle</i>	<i>EEAS 125mg/kg</i>	<i>EEAS 250mg/kg</i>	<i>EEAS 500 mg/kg</i>	<i>Satélite</i>
TGO (U/L)	160±46,2	156,6±14,9	163,3±17,7	138,0±9,3	*345,2±60,9
TGP (U/L)	103,7±26,6	82,2±3,3	77,6±8,0	105±20,2	92,2±26,4
ALP (U/L)	165,6±32,1	35± 7,0	89±61,5	43,6±15,6	133,2±71,7
CREATININA (mg/dL)	0,6375±0	0,6000±0	0,5167±0	**0,4571±0	0,6167±0,1
URÉIA (mg/dL)	51,9±3,2	51,9±4,5	56,2±3,6	61,7±3,2	55,3±8,6
COLESTEROL	60 ± 1,7	66,2 ± 3,3	62,3±6,0	59,8±2,4	62,3±3,0
Triglicerídeos (mg/dL)	47±5,4	64±1,5	50,2±4,2	39,3±3,7	67,7±7,9
GLICEMIA (mg/dL)	162,9±9,5	144±8,9	144,3±7,4	173,7±17,2	218,3 ±28,1
PROTEINA TOTAL (g/dL)	6,3±0,2	6,4±0,2	6,4±0,1	5,8±0,1	*5,3 ±0,2
ALBUMINA mg/dL	3±0	3,06±0	2,9±0,1	3,0±0	2,82±0,1
GGT (U/L)	7,6±1,7	5±1,7	5,2±1,4	7,8±3,6	4,5 ±1,8

Os valores representam a média ± e.p.m (n=8) *Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido de Teste Tukey, *p<0,05; **p<0,01)

Parâmetros hematológicos

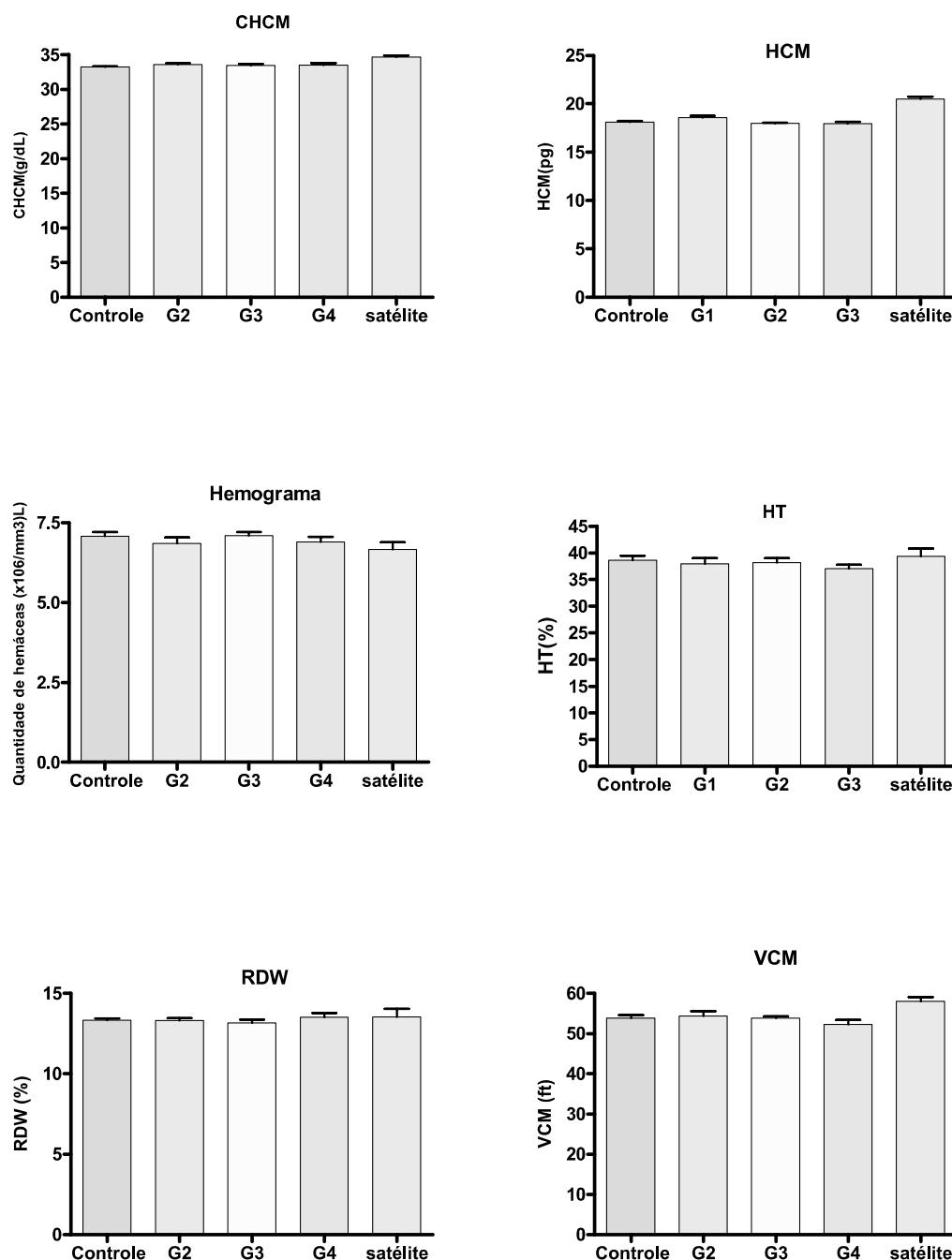


FIGURA 51a - Efeito EEAS 125, 250 e 500 mg/kg administrado por via oral sobre os parâmetros hematológicos em ratos Wistar adultos tratados por 30 dias consecutivos. Estatisticamente diferentes do grupo controle (ANOVA seguido de Teste Tukey, $p<0,05$) (p.o.; n=8)

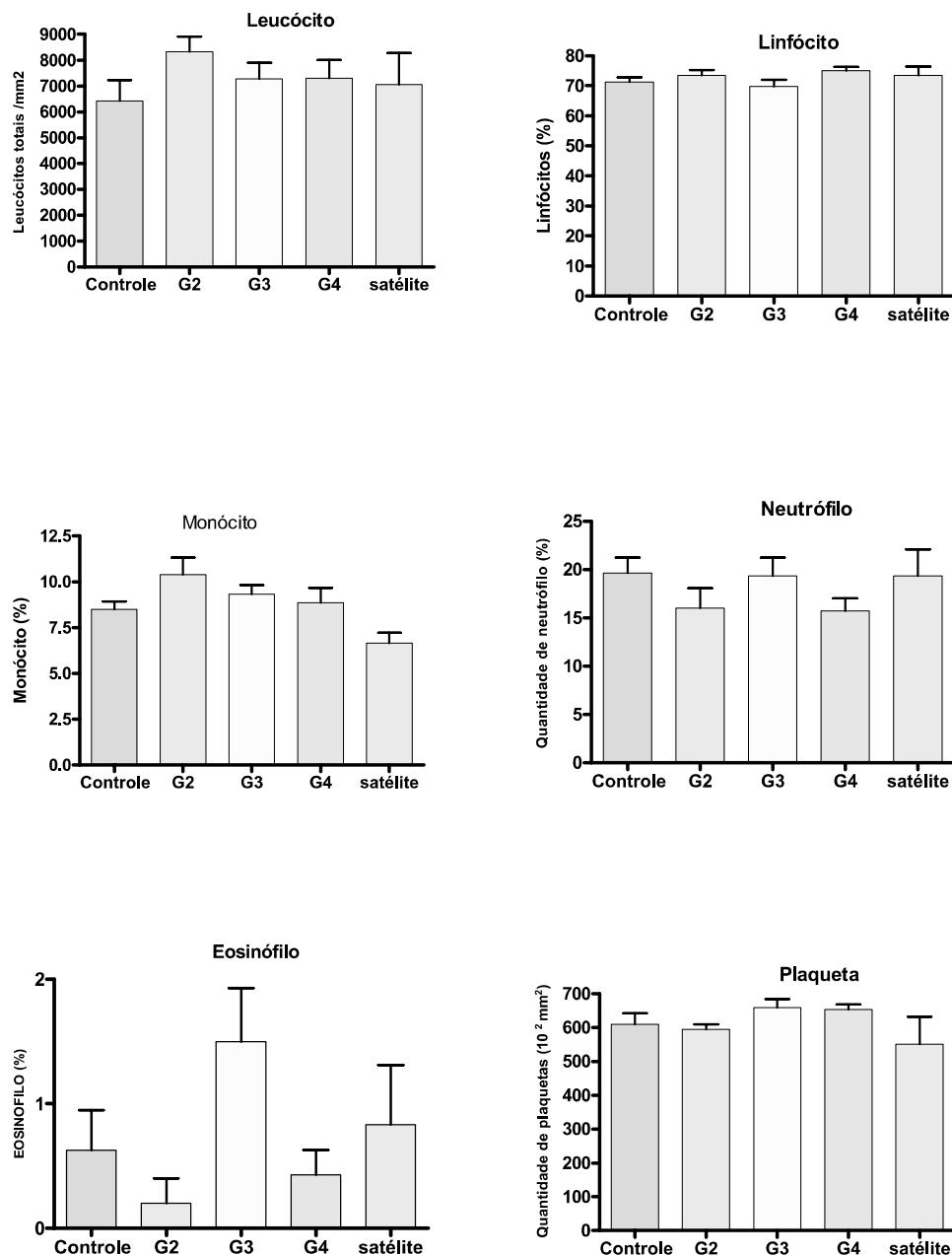


FIGURA 51b - Efeito EEAS 125, 250 e 500 mg/kg administrado por via oral sobre os parâmetros hematológicos em ratos Wistar adultos tratados por 30 dias consecutivos. Estatisticamente diferentes do grupo controle (ANOVA seguido de Teste Tukey, $p<0,05$) (p.o.; n=8)

2.2.1.3 Análise histopatológica

Nos exames histopatológicos, os animais do grupo Controle (grupo 1) demonstraram integridade tecidual dos órgãos observados (fígado, rins, baço, estômago, intestino, coração, cérebro e pulmão) (FIGURA 52, A, E, J). Em contraste, os grupos submetidos ao tratamento com EEAS, apresentaram alterações patológicas, principalmente nos fígados, rins e pulmões.

No fígado, os animais que ingeriram a menor dose (125 mg/kg) (grupo 2) demonstraram um aumento no número de leucócitos polimorfonucleares (PMN) no interior dos sinusóides (FIGURA 52, B), enquanto que a observação dos grupos de 250 (grupo 3) e 500 mg/kg (grupo 4) revelou a presença de vasos congestionados, necrose multifocal (caracterizada por núcleos picnóticos e cariorréxicos dos hepatócitos) (FIGURA 52, C), hiperplasia ductal (proliferação dos ductos biliares) e, em 25% dos animais, esteatose microvesicular (FIGURA 52, D) e desorganização dos cordões epiteliais hepáticos com aumento do espaço sinusoidal.

A necrose ocorrida nos hepatócitos, associada com o aumento da permeabilidade da membrana plasmática pode ser confirmada bioquimicamente pelo doseamento no plasma de enzimas derivadas do citosol hepático, onde foi detectado um aumento considerável das mesmas, já discutido anteriormente. O aumento dos níveis séricos da ALP reforça ainda as alterações dos ductos biliares, juntamente com a presença de células inflamatórias (KLAASSEN; WATKINS, 2001).

A análise realizada nos rins permitiu a observação de degeneração tubular hialina e presença de cilindros protéicos intratubulares nos túbulos contorcidos proximais (FIGURA 52, G) e degeneração hidrópico-vacuolar das células epiteliais dos túbulos contorcidos distais (degeneração grave com picnose nuclear e desaparecimento do citoplasma) (FIGURA 52, F), ambos localizados no córtex renal, quase sempre associadas à congestão vascular acentuada e hemorragia intersticial. A medula renal também apresentou intensa congestão. Além disso, principalmente os animais dos grupos 3 e 4, apresentaram necrose tecidual (FIGURA 52, H), demonstrando efeito tóxico dose-dependente.

Somando-se estes dados à presença de piócitos e células epiteliais na urina e também aos resultados aumentados na serologia bioquímica para os valores de creatinina, indicativo de diminuição na filtração glomerular, associando-se ainda ao aumento estatisticamente significativo que ocorreu também para o parâmetro proteínas totais, indicativo de uma lesão do túbulo proximal, caracteriza assim um quadro de nefrotoxicidade.

As principais lesões microscópicas observadas nos pulmões foram infiltrado intersticial e acúmulo intravascular de PMNs (FIGURA 52, L), principalmente neutrófilos, e fibrose periarterial e peribronquiolar moderada (FIGURA 52, N). Alguns animais também apresentaram vasos hiperêmicos e cilindros de hemoglobina (FIGURA 52, M). Esses dados sugerem um processo inflamatório.

Em contrapartida, comparado com o grupo Controle, o Grupo satélite (FIGURA 53) demonstrou organização tecidual, sugerindo que as degenerações causadas pela toxicidade subaguda são reversíveis após o período de trinta dias, demonstrando que o tempo de exposição é decisivo para a manifestação da toxicidade, bem como o tempo de suspensão do tratamento é importante para a reversão da mesma.

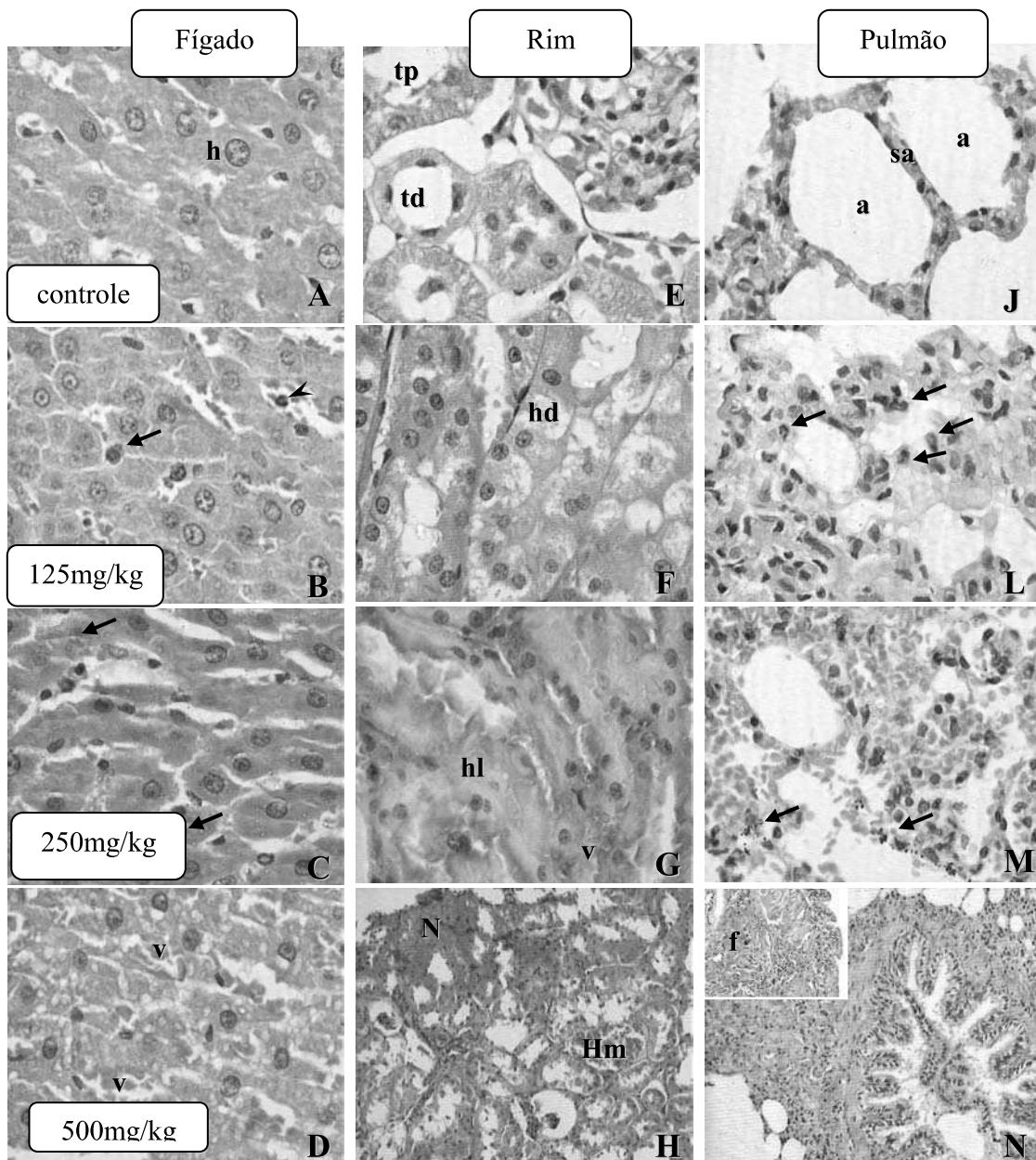


FIGURA 52 – Análise Histopatológica – Órgãos afetados durante o Teste de Toxicidade Subaguda

No grupo Controle, as FIGURAS (A), (E) e (J) estão demonstrando o fígado (h: hepatócito), o rim (tp: túbulo contorcido proximal; td: túbulo contorcido distal) e o pulmão (a: alvéolo; sa: septo alveolar), respectivamente, apresentando integridade tecidual.

Os animais do grupo 2 (125 mg/kg) apresentaram em (B), no fígado, e em (L), no pulmão, leucócitos polimorfonucleares (PMN) intravascular (seta) e intersticial (ponta-de-seta), enquanto que no rim é possível observar a degeneração hidrópica das células epiteliais (hd).

No grupo 3 (250 mg/kg) o fígado (C) apresentou necrose focal, com características típicas tal como núcleos cariorréxicos (setas), o rim (G) demonstrou degeneração hialina (hl) e congestão (v) e no pulmão (M) teve o início de uma hemorragia e, consequentemente, a presença de hemossiderina (setas).

Em (D) é demonstrado que além da necrose, também é possível observar a esteatose e a congestão dos sinusóides (v) após a administração de 500 mg/kg. No rim a necrose (N) e a hemorragia (Hm) também podem ser vista nos animais deste grupo. Em contraste, no pulmão já é possível observar a fibrose tecidual (f), envolvendo os bronquíolos.

As fotomicrografias estão apresentadas com aumento de 40x, com exceção de (H) e (N), com aumento de 10x.

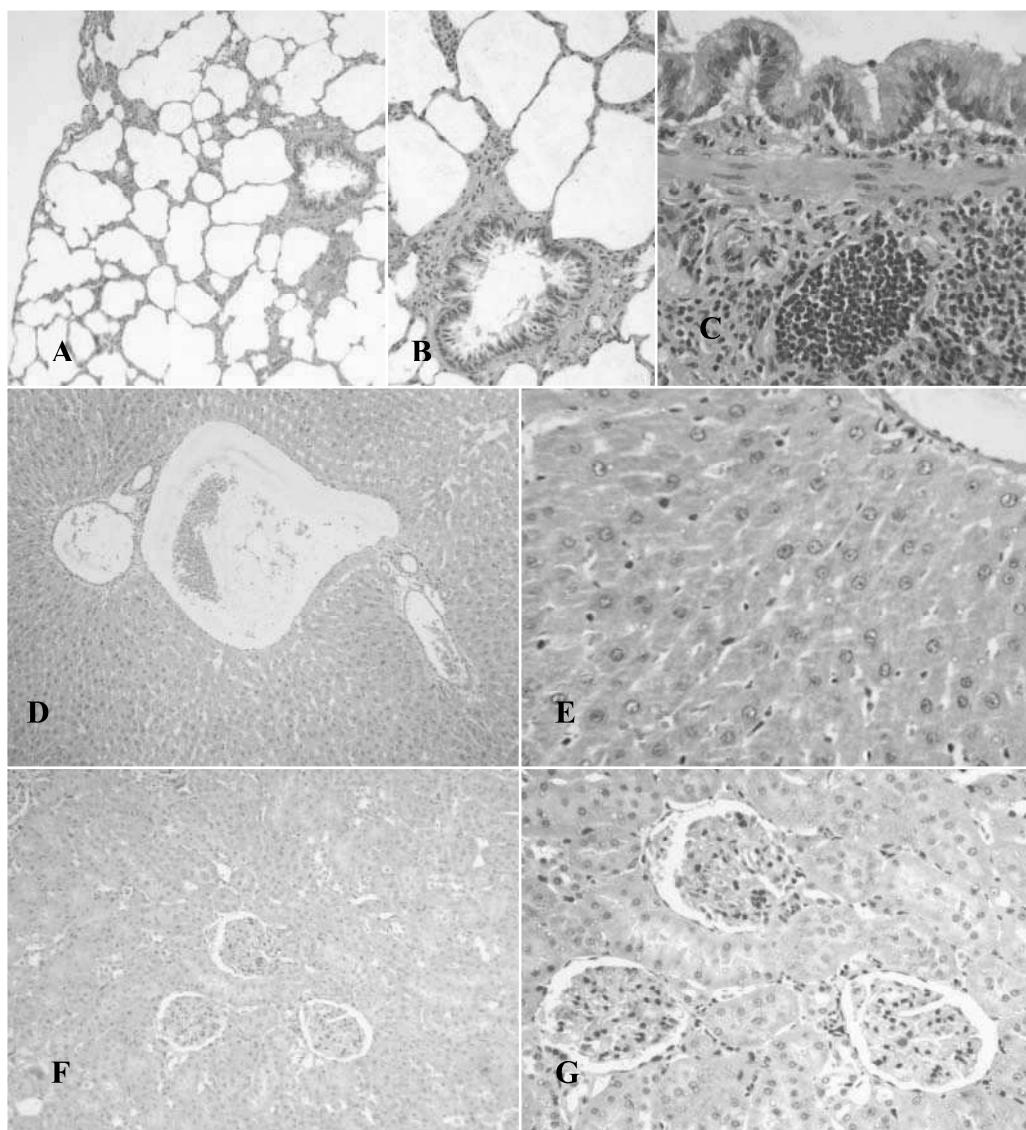


FIGURA 53 - Aspectos histopatológicos dos animais do grupo satélite: reversibilidade da integridade tecidual.

As fotomicrografias (A) e (B) apresentam aspectos morfológicos normais dos sacos alveolares (SA) e bronquíolo (Br). Na (C) é possível observar um detalhe de um brônquio com o epitélio respiratório ciliado (chave) e a submucosa com o tecido linfóide (seta branca) associado íntegros. Em (D) o fígado demonstra preservação do espaço porta (EP) e em (E) dos hepatócitos.

Em (F) e (G) os rins, especialmente o córtex renal, região mais afetada por agentes tóxicos, apresenta-se com os glomérulos (Gl) e túbulos contorcidos (TC) intactos.

Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: A, D e F = 100x; B = 200x; C, E e G = 400x.

CAPÍTULO 4: CONCLUSÕES



CAPÍTULO 4: CONCLUSÕES

A caracterização farmacognóstica do guatambu, além de ser uma contribuição para a informação sobre plantas medicinais brasileiras, *per si*, é subsídio interessante para estudos multidisciplinares posteriores, tais como descrições farmacobotânicas, fracionamento de extratos e isolamento de substâncias responsáveis pela atividade biológica desta espécie vegetal.

A caracterização macro e microscópica das cascas de *Aspidosperma subincanum* Mart., juntamente com a prospecção fitoquímica, teor de umidade e cinzas são dados importantes na diagnose do material vegetal. Conseqüentemente, estes parâmetros poderão ser empregados no controle de qualidade do guatambu utilizado como matéria prima na preparação de fitoterápicos.

Da mesma forma, a avaliação da toxicidade da *Aspidosperma subincanum* Mart., principalmente a toxicidade subaguda e crônica, tem relevância para a saúde pública, considerando que o guatambu é utilizado por indivíduos portadores de diabetes, um quadro crônico que, conseqüentemente, faz com que a ingestão da planta medicinal seja em regime de uso constante e diário.

A administração do EEAS via oral em uma dose 10 vezes superior à maior dose utilizada nas avaliações de toxicidade aguda não interferiu no consumo de água ou ração e nem levou animais a óbito. Assim, de acordo com o protocolo utilizado, a determinação de uma DLA superior a 5000 mg/kg confere um caráter de toxicidade muito baixa ao EEAS, numa administração aguda de dose fixa.

Quanto aos ensaios de toxicidade subaguda, os resultados dos exames bioquímicos, mostraram que EEAS provocou poucas alterações nos níveis séricos dos grupos tratados, em comparação com o grupo controle. É interessante notar que os níveis de fosfatase alcalina (ALP) foram reduzidos nas três doses avaliadas, quando comparados com os grupos Controle e Satélite.

Na avaliação histopatológica, EEAS provocou alterações celulares nos rins, pulmões e fígado em todas as doses avaliadas, caracterizando que tais órgãos foram especialmente prejudicados pela administração de EEAS.

Quanto ao grupo Satélite, os níveis bioquímicos séricos, de forma geral, mostraram-se estatisticamente semelhantes àqueles apresentados pelos animais do grupo Controle. Entretanto,

os valores de TGO, apresentaram-se bastante elevados, o que pode sinalizar a ocorrência de dano hepático persistente. Entretanto, no exame histopatológico, não foi detectada a presença de tecido fibroso e de modo geral, os tecidos se apresentaram íntegros. Dessa forma, se o EEAS provocou alguma injúria hepática, esta parece ser reversível.

Essas alterações morfológicas, hepatonefrotóxicas, (reflexos de alterações bioquímicas) são indícios de que no EEAS existem substâncias potencialmente tóxicas ao fígado e aos rins. Entretanto tais sinais de toxicidade mostraram ser reversíveis.

O protocolo de avaliação de toxicidade potencial aqui utilizado é um ensaio amplo e os mecanismos envolvidos nas alterações observadas devem ser estudados utilizando também outros modelos mais específicos.

É interessante notar que apesar de o guatambu ser utilizado pela população para “baixar o colesterol e o açúcar do sangue”, não houve qualquer alteração significativa nesses dois parâmetros. Além disso, o grupo Satélite apresentou glicemia elevada, em comparação com o grupo Controle. Esse resultado, porém, não significa que o EEAS seja destituído de tais efeitos; indica que a avaliação da alegada atividade hipoglicemiante do guatambu deve ser realizada utilizando protocolos específicos e sensíveis, considerando que os indivíduos envolvidos nos experimentos eram normoglicêmicos.

Concluindo, nas condições experimentais, o extrato etanólico das cascas de *Aspidosperma subincanum* Mart., guatambu, apresenta hepatocixidade e nefrotoxicidade discretas, tanto na utilização via oral, quanto via intraperitoneal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Final Report on the Safety Assessment of *Calendula officinalis* Extract and *Calendula officinalis*. **International Journal of Toxicology**, v. 20, n. 2, supl. 2, p. 13-20, 2001.

ALBERTI, G.; ZIMMET, P.; SHAW, J. I. BLOOMGARDEN, Z.; KAUFMAN, F.; SILINK, M.. Type 2 diabetes in the young: the evolving epidemic: the international diabetes federation consensus workshop. **Diabetes Care**. v.27, p.1798-1811. 2004.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus: Positon Statements. **Diabetes Care**, v. 28, n.1, p.37-42, 2005.

ATTUCH, I. M. **Conhecimentos tradicionais do Cerrado: sobre a memória de Dona Flor, raizeira e parteira**. Tese (Doutorado em Antropologia Social), Instituto de Ciências Sociais, Universidade de Brasília, Brasília – DF, 2006.

BARBOSA, L. F.; VIEIRA, I. J. C.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; UCHOA, D. Estudo Fitoquímico de *Aspidosperma illustre* (Apocynaceae). In: 26^a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 26, 2003 Poços de Caldas. **Anais da Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2003.

BARON-RUPPERT, G.; LUEPKE, N. P. Evidence for toxic effects of lakyphenols from *Ginkgo biloba* in the hen's egg test (HET). **Phytomedicine**, v. 8, n. 2, p. 133-138, 2001.

BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders: Clínica de Pequenos animais**. 1.ed. São Paulo: Editora Roca Ltda. 1998,1591p.

BOURDY, A. G. P.; OPORTO, B. A.; GIMENEZ, B. E.; DEHARO, A. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part VI. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Isoceño-Guaran Indians, **Journal of Ethnopharmacology**, v.93, p. 269–277, 2004.

BRANDAO, M.; GRANDI, T.; ROCHA, E.; SAWYER, D.; KRETTLI, A., Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, p.175–182, 1992.

BRASIL. Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm. Acesso em: 18 out. 2006

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 mar. 2004. Sessão 1.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância sanitária. Portaria 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 04 mai. 2006. Sessão 1.

BRASIL. RDC nº 88, de 16 de março de 2004. Determina a publicação da “**Lista de referências bibliográficas para a avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos**”. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/search.php>>. Acesso: 10 out. 2006. 2004a.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 89, de 16 de março de 2004. Determina a publicação da “**Lista De Registro Simplificado de Fitoterápicos**”. **Diário Oficial da União; Poder Executivo**, Brasília, DF, 16 de mar. 2004. Sessão 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 116 de 8 de agosto de 1996. Publica proposta de norma para estudo da toxicidade e da eficácia de produtos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 12 de ago. 1996.

CAMPOS, A. R.; LIMA JR, R.C.P.; UCHOA, D. E. A.; SILVEIRA, E. R.; SANTOS, F. A.; RAO, V.S.N. Pro-erectile effects of an alkaloidal rich fraction from *Aspidosperma ulei* root bark in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.104, p. 240-244, 2006.

CARVALHO, A. C. B; DINIZ, M. F. F. M.; MUKHERJEE, R. Estudos da atividade antidiabética de algumas plantas de uso popular contra o diabetes no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.86, n°1, p.11-16, 2005.

CARVALHO, V. M.; MARQUES, R. M.; LAPENTA, A. S.; MACHADO, M. F. P. S. Functional classification of esterases from leaves of *Aspidosperma polyneuron* M. Arg. (Apocynaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n.2, p.195-198, 2003.

CASTELON, L. **A esperança é verde**. BOLETIM FITONEWS n. 23 – ago./2001.

CORNÉLIO, M. L.; LAGO, J. H. G.; MORENO, P. R. H. Composição química do óleo essencial de *Aspidosperma cylindrocarpon*. In: XXIII RESEN. São Paulo. **Livro de resumos – XXIII RESEM**, São Paulo 2001.

CORNÉLIO, M. L.; LAGO, J. H. G.; MORENO, P. R. H. Volatile Oil Composition of *Aspidosperma cylindrocarpon* Muell. Arg. Leaves. **Journal of Essential Oil Research**, v.17, n.3, p. 310-311, 2005

CORNÉLIO, M. L.; LAGO, J. H. G.; MORENO, P. R. H.; HENRIQUES, A. T.; LIMBERGER, R. P. Essential oil from *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. Leaves. **Journal of Essential oil research**, may/jun, 2004. Disponível em: <http://www.findarticles.com/p/articles/mi_qa4091/is_200405/ai_n9452004>. Acessado em: 11/11/2006.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3.ed. Lisboa: Fundação Calouste Guibenian. 1982, v.3. 1032p.

COSTA, M. A. D. **Efeito do Extrato de *Bauhinia variegata* sobre a Atividade Transcricional Mediada pelo Receptor dos Proliferadores Peroxisomais-gama (PPARgama)**. 52.f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília. Brasília – DF. 2005.

CUPP, M. J. **Toxicology and Clinical Pharmacology of Herbal Products.** Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 2000. 344p.

DIMECH, G. S.; GONÇALVES, E. S.; ARAÚJO, A. V.; ARRUDA, V. M.; BARATELLA, E. L.; WANDERLEY, A. G. Avaliação do extrato hidroalcoólico de *Mentha crispa* sobre a performance reprodutiva em ratos Wistar. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, p.152-157, 2006.

EISENBARTH, G. S. Type 1 diabetes:molecular, cellular and clinical immunology. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.552, p.306-10, 2004.

ELY, J.F.; ELY, P.B.; WEBSTER, R.S.; PAVELECINI, M.; LUCAS, M. Enzymatic alterations due to skeletal muscle ischemia in rats. **Acta Cirurgica Brasileira.**, v.15, n.3, 2000.

ELDIN, S.; DUNFORD, A. **Fitoterapia na Atenção Primária à Saúde.** Ed. Manole, São Paulo, 2001. 163p.

ETZOLD, H. Eine Kontrastreiche, Simultane Mehrfachfärbung für Pflazenanatomische Präparate. **Mikroskopos**, v. 72, p. 213-218, 1993.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.Ed. Parte II, 3º Fascículo. Ed. Atheneu Ltda, São Paulo, 2000.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.Ed. Parte I, Ed. Atheneu Ltda, São Paulo 1988.

FERREIRA, I. C. P.; LONARDONI, M. V. C.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L; FILHO, L. G.; PINTO, L. H. B.; OLIVEIRA, A. J. B. Anti-leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, n.3, p.325-327, 2004.

GASKELL, A. J.; JOULE, J. A. Subincanine, a C22-carbazole alkaloid. **Tetrahedron Letters**, v.1, p. 77-82, 1970.

GOMES, S. M. **Aspidosperma Mart. et Zucc. (Apocynaceae) no Distrito Federal, Brasil, e caracteres para o aprimoramento da taxonomia de gênero.** Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade de Brasília-UnB, Brasília – DF. 1997.

GRENAND, P.; MORETTI, C.; JACQUEMIN, H. Pharmacopées traditionnelles en Guyane. **Collection mémoires**, v. 108, p. 569, 1987.

GUARIM, N. G.; MORAIS, R.G. Recursos Medicinais de Espécies do Cerrado de Mato Grosso: Um Estudo Bibliográfico. **Acta Botanica Brasilica**, v.17, n.4, p.561-584, 2003.

IKEGAME, A. L. M.; PEREIRA, N. A. Hypoglycemic activity of *Picrasma crenata* (Vell.) Engl. Simaroubaceae. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.84, n.2, p.51-53, 2003.

JÁCOME, R. L. R. P.; SOUZA, R. A.; OLIVEIRA, A. B. Comparação cromatográfica entre o extrato de *Aspidosperma parvifolium* e o fitoterápico "Pau-Pereira". **Revista**

Brasileira de Farmacognosia, v.13, p.39-41, 2003.

JACOME, R. L. R. P.; OLIVEIRA, A. B.; RASLAN, D. S.; WAGNER, H. Chemical constituents and chromatographic profile of the stem bark of *Aspidosperma parvifolium* A. DC. ("pau-pereira"). **Química Nova**. v.27, n.6, p.897-900, 2004.

JAHN, A. I.; GÜNZEL, P. K. H. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment? **Reproductive Toxicology** v.11, n.23, p.171-178, 1997.

ISHIYAMA, H.; MATSUMOTO, M.; SEKIGUCHI, M.; SHIGEMORI, H.; OHSAKI, A.; KOBAYASHI, J. Two new indole alkaloids from *Aspidosperma subincanum* and *Geissospermum vellosii*. **Heterocycles**. v.66, p.651-658, 2005.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSOS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5^aed. Academic Press. San Diego, 1997

KANJANAPOTHI, D.; SMITASIRI, Y.; PANTHONG, A.; TAESOTIKUL, T.; RATHANAPANONE. V. Postcoital antifertility effect of *Mentha arvensis*. **Contraception**, v.24, p.559-567, 1981.

KLAASSEN, CURTIS. D.; WATKINS, J. B. **TOXICOLOGIA A Ciência Básica dos Tóxicos de Casarett & Doull**. 5^a ed. Ed. Copyright, Portugal, 2001, 864 p.

KOBAYASHI, J.; SERIGUCHI, M.; SHIMAMOTO, S.; SHIGEMORI, H.; ISHIYAMA, H.; OHSAKI, A. Subincanadines A-C, Novel Quaternary Indole Alkaloids from *Aspidosperma subincanum*. **Journal of Organic Chemistry**, v.67, n.18, p.6449-6455, 2002.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual Básico de Métodos em Morfologia Vegetal**. Seropédica – RJ: Editora da Universidade Rural do Rio de Janeiro. 1997. 198 p.

LAAKSONEN, D. E.; NISKANEN, L.; LAKKA, H. M. Epidemiology and treatment of the metabolic syndrome. **Annals of Medicine**. v.36, n.5, p.332-346, 2004.

LEFEBVRE, P.; PIERSON, A. The global challenge of diabetes. **World Hospitals and Health Services**. v.40, n.42, p.37-40, 2004.

LINO, R. C.; GARROTE, C. F. D. Isolamento dos alcalóides indólicos presentes na casca do caule de *Aspidosperma subincanum* Mart., para obtenção de padrões com finalidade de desenvolvimento de metodologia para doseamento com marcadores de matéria-prima vegetal. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v.2, n.2, p. 107-109, 2005.

LITCHFIELD, J. T.; WILCOXON, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.95, p.99-113, 1949.

LUCIO, E. M. R. A.; ROSALEN, P. L.; SHARAPIN, N.; SOUZA, B. A. R. M. Avaliação toxicológica aguda e screening hipocrático da epiisoilosina, alcalóide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Staph. **Revista Brasileira de Farmacognosia**,

v.9, n. 10, 2000.

MARIZ, S. R.; CERQUEIRA, G. S.; ARAÚJO, W. C.; DUARTE, J. C.; MELO, A. F. M.; SANTOS, H. B.; OLIVEIRA, K.; DINIZ, M. F. F.; MEDEIROS, I. A. Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypiifolia* L. em ratos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.3, p. 372-378, 2006.

MARQUES, M. F. S.; KATO, L.; FILHO, H. F. L.; REIS, F. A. M. Índole Alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. **Phytochemistry**, v.41, n.3, p. 963-967, 1996.

MATHUR, R. Fructolysis effect of 50% ethanolic extract of *Mentha arvensis* linn. (leaves) in seminal vesicles of rat. **Acta European Fertility**, v.22, p.219-220. 1991.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza, Edições UFC, 1988.

MIRANDA, F. G. G.; ALVES, I. A. N.; VILAR, J. C.; BATISTA, J. S.; ANTONIOLLI, A. R. Toxicidade aguda e atividade antiedematogênica e antinociceptiva do extrato aquoso da entrecasca de *Tabebuia avellanedae* Lor. Ex Griseb. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, S.1, p.91-94, 2002.

MITAINE-OFFER, A. C.; SAUVAIN, M.; VALENTIN, A.; CALLAPA, J.; MALLIÉ, M.; ZÈCHES-HANROT, M. Antiplasmodial activity of *Aspidosperma* indole alkaloids of *Aspidosperma* indole alkaloids. **Phytomedicine**, v.9, p.142–145, 2002.

MORAIS, I. C.; SILVA, L. D. G.; FERREIRA, H. D.; PAULA, J. R.; TRESVENZOL, L. M. F. Levantamento sobre plantas medicinais comercializadas em Goiânia: abordagem popular (raizeiros) e abordagem científica (levantamento bibliográfico). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.2, n.1, p.13-16, 2006.

NAMMI, S.; BOINI, M. K.; LODAGALA, S. D.; BEHARA, R. B. S. The juice of fresh leaves of *Catharanthus roseus* Linn. reduces blood glucose in normal and alloxan diabetic rabbits. **BMC Complementares and Alternative Medicine**. v.3, p.1 sept. 2003. <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1472-6882-3-4.pdf> acessado em 15/10/2006

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.2, p.121-142, 2005.

NEWTON, C.A.: RASKIN, P. Diabetic Ketoacidosis in type 1 and type 2 diabetes mellitus: clinical and biochemical differences. **Archives of Internal Medicine**, v.164, n.17, p.1925-31, 2004.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT, OECD. **Guidelines for testing of Chemicals**, Paris, 1996.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT, OECD. **Guideline For The Testing Of Chemicals**, November, 1999. 8p.

OLIVEIRA, A. B.; SOUZA FILHO, J. D.; CHIARI, E.; BRAGA, F. C; LOMBARDI, J. A.; SILVA, M. A. Isolamento de alcalóides de *Aspidosperma tomentosum*

biomonitorado por testes *in vitro* contra *Trypanosoma cruzi*. **Anais da III Semana de Pós-graduação da UFMG**. 2001.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. **Farmacognosia**. 1.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. 411 p.

OLIVEIRA, V. B.; VIEIRA, I. J. C.; FILHO, B. R.; MATHIAS, L.; UCHOA, D. Alcalóides indólicos de *Aspidosperma spruceanum* Benth ex. Mull Arg (Apocynaceae). In: 29ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2006 Águas de Lindóia. **Anais da Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. São Paulo, 2006.

OMS/UNICEF. **Cuidados Primários de saúde**. Relatório da conferência Internacional sobre Cuidados Primários da Saúde, Alma-Ata, URSS, 6 a 12 de setembro de 1978. Brasília: Ministério da saúde, 1991. 64p.

PADILLA, M. C L.; ALFONSO, L. I. C.; MOLINA, L. J.; FREIXAS, L. C.; GÓMEZ, C. L. Toxicología Aguda Oral Del *Eucalyptus saligna* SM. por el método de las clases. **Revista Cubana de Plantas Medicinais**, v.3, n.2, p.87-90, 1999.

PARI, L.; LATHA, M. Protective role of *Scoparia dulcis* plant extract on brain antioxidant status and lipidperoxidation in STZ diabetic male Wistar rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, n.4, p.577-586, 2004.

PEPPING, J. P. Kawa: *Piper methysticum* Alternative Therapies. **American Journal of Health-System Pharmacy**. v. 56, n.10, p. 957-958, 1999.

POERTER, J. R.; BARRETT, T. G. Acquired non-type 1 diabetes in child-hood: subtypes, diagnosis, and management. **Archives of Disease in Childhood**, v.89, p.1138-44, 2004.

RAUBER, C.; MELLO, F. B.; MELLO, J. R. B. Pre-clinic toxicological evaluation of a phytotherapeutic containing *Aristolochia cymbifera*, *Plantago major*, *Luehea grandiflora*, *Myrocarpus frondosus*, *Piptadenia colubrina* (Cassaú Composto®) in Wistar rats. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.34, n.1, p.15-21, 2006.

REWERS, M.; NORRIS, J.; DABELEA, D. Epidemiology of type 1 diabetes mellitus. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.552, p.219-46, 2004.

ROCHAL, F. D.; TEIXEIRA, V. L.; PEREIRA, R. C.; KAPLAN, M. A. Diabetes mellitus e estresse oxidativo: produtos naturais como alvo de novos modelos terapêuticos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.87, n. , p.49-54, 2006.

SCHEFFER, J. F. S.; GONZÁLEZ, F. H. D. Enzimologia clínica em medicina veterinária. www6.ufrgs.br/bioquimica/pesquisa/bioqclin/rev._jfss.pdf. acesso em 06/01/2007.

SCHULTES, R. E. De plantis toxicariie e mundo novo tropicale commentationes. XIX. Biodynamic apocynaceous plants of the northwest Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v.1, n.2, p.165–192, 1979.

SHARAPIN, N.; ROCHA, L. M.; CARVALHO, E. S.; SANTOS, E. V. M.; LUCIO, E. M. R. A.; ALMEIDA, J. M. L. **Fundamentos de Tecnologia de Produtos Fitoterápicos.** CYTED / CAB, Bogotá, 2000. 248 p.

SILVA, K. L.; FILHO, V. C. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico, **Química Nova**, v.25, n.3, p. 449-454, 2002. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000300018&lng=pt&nrm=iso&tlang=pt, Acessado em 08/10/2006.

SILVA, V. R. C.; LOBO, A. M. G.; CUNHA, P. G.; OLIVEIRA, C. I. F. B. Efeito Do Extrato Aquoso De *Aspidosperma Carapanauba* Nas Lesões Gástricas Induzidas Por Indometacina Em Ratos Da Espécie Wistar. In: **XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, Aguas de Lindóia - São Paulo, ago., 2006.

SILVA, E. J. R.; AGUIAR, F. J. S.; GONÇALVES, E. S.; SOUSA, I. M. V.; DIMECH, G. S.; FRAGA, M. C. C. A.; COELHO, M. C. O. C.; WANDERLEY, A. G. Avaliação do tratamento subcrônico como extrato hidroalcoólico da *Calendula officinalis* L. sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratas Wistar. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.2, p. 88-93, 2005.

SIMÕES, C. M. O.; SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5^a ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003, 1102 p.

SINITOX Casos de Intoxicação e envenenamento humano. **Informe Epidemiológico do SUS**, jul./ago., 1991.

SOUZA, A. C. M.; SOUZA, L. K. H.; SILVA, M. R. S.; OLIVEIRA, C. M. A.; KATO, L.; SILVA, C. C.; TANAKA, J. C. A.; OLIVEIRA, A. J. B. Propriedades antifúngicas dos alcalóides de *Aspidosperma*. In: **29^a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA**, 2006 Águas de Lindóia. **Anais da Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. São Paulo, 2006.

SPERLING, H.; LORENZ, A.; KREGE, S.; ARNDT, R.; MICHEL, M. C. An extract from the bark of *Aspidosperma quebracho blanco* binds to human penile. **The Journal of urology**, v.168, n.1, p.160–163, 2002.

SCHWENK, L. M.; SILVA, C. J.; A Etnobotânica Da Moraria Mimosa No Pantanal De Mato Grosso. In: **III SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SÓCIO-ECONÔMICOS DO PANTANAL. OS DESAFIOS DO NOVO MILÊNIO**, Novembro, 2000 Corumbá – MS, 2000. **Anais do III Simpósio Sobre Recursos Naturais E Sócio-Econômicos do Pantanal. Os Desafios do Novo Milênio**. Corumbá – MS, Novembro, 2000.

TANAKA, J. C. A.; SILVA, C. C.; FERREIRA, F. C. P.; MACHADO, G. M. C.; OLIVEIRA, A. J. B. Antileishmanial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum* **Phytomedicine**, nov., 2006.

TANAKA, J. C. A.; SILVA, C. C.; OLIVEIRA, A. J. B.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Antibacterial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 9, n.39, p.387-391, 2006.

TRESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R.; RIBEIRO, A. F.; FERREIRA, H. D. **Levantamento das plantas medicinais do Estado de Goiás.** In: IV encontro de pesquisadores da UFG. 1997, Goiânia. Resumos, 1997.

TRESVENZOL, L. M.; PAULA, J. R.; RICARDO, A. F.; FERREIRA, H. D.; ZATTA, D. T. Estudo sobre o comércio informal de plantas medicinais em Goiânia e cidades vizinhas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, n.1, p. 23-28, 2006.

TRUCCO, M. Regeneration of the pancreatic beta cell. **Journal of Clinical Investigation**, v.115, p.5-12, 2005.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.2, p.289-306, 2006.

UKPDS- Prospective Diabetes Study Goup. Intensive blood-glucose control with sulfonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes: UKPDS 33. **Lancet**, v.352, p.837-853, 1998.

UMEZAWA, K.; HIROKI, A.; KAWAKAMI, M.; NAKA, H.; TAKEI, I.; OGATA, T.; KOJIMA, I.; KOYANO, T.; KOWITHAYAKORN, T.; PANG, H.-S.; KAM, T. S. Induction of insulin production in rat pancreatic acinar carcinoma cells by conophylline, **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.57, p.341-350, 2003.

VEIGA, J. V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Medicinal plants: safe cure?. **Química Nova**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.

VIANA, G. S. B; MEDEIROS, A. C.; LACERDA, L. A. M.; LEAL, K. A. M.; VALEI, T. G.; MATOS, J. A. Hypoglycemic and anti-lipemic effects of the aqueous extract from *Cissus sicyoides*. **BMC Pharmacology**, v.4, n.1, p.9, 2004.

VILAR, L. **Endocrinologia clínica**. 3 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 988p.

VINER, R. M.; SEGAL, T. Y.; KRYNSKA, L. E.; HINDMARSH, P. Prevalence of the insulin resistance syndrome in obesity. **Archives of Disease in Childhood**, v.90, p.10-14, 2004.

WASICKY, R.; UNTI, O.; BARBIERI, E. Quinine and alkaloids in Brazil. **BMC Complementary and Alternative Medicine** v.4, p.16, 2004. doi: 10.1186/1472-6882-4-16.

WENIGER, B.; ROBLEDO, S.; ARANGO, G. J.; DEHARO, E.; ARAGÓN, R.; MUÑOZ, V.; CALLAPA, J.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.78, p.193-200, 2001.

WINER, N.; SOWERS, J. R. Epidemiology of diabetes. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v.44, n.4, p.397-405, 2004.

WOOLTORTON, E. Herbal kava: reports of liver toxicity. **Canadian Medical Association Journal**, v.166, n.6, p.777, mar., 2002.

Atividade biológica e alcalóides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): uma revisão

OLIVEIRA, V.B.*; FREITAS, M.S.M.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I.J.C.

*Laboratório de Ciências Químicas, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Avenida Alberto Lamego 2000, Parque Califórnia, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil, 28013-602 *vilmamar@uenf.br*

RESUMO: Embora sejam conhecidas principalmente como fonte de madeira nobre para aplicação na construção de móveis, as espécies do gênero *Aspidosperma* apresentam muitos estudos na área da fitoquímica e poucos estudos na área da farmacologia. As espécies do gênero *Aspidosperma* são largamente aplicadas por populares como potenciais agentes antimaláricos, no tratamento da leishmaniose, de inflamações do útero e ovário, como anticonceptiva, em diabetes e em problemas estomacais, contra câncer, febre e reumatismo. Do ponto de vista químico, a grande maioria das espécies constituintes do gênero já foi submetida a algum estudo de isolamento e identificação dos alcalóides indólicos presentes nas mais diversas partes das plantas. Já do ponto de vista farmacológico poucos testes foram realizados até então para justificar a grande aplicação das mesmas por populares e a importância dos alcalóides indólicos presentes nas representantes do gênero. Visando contribuir para um maior conhecimento sobre a importância da presença dos alcalóides indólicos no gênero *Aspidosperma* e sua relação com as atividades farmacológicas atribuídas ou testadas, é que apresentamos uma revisão das principais publicações envolvendo estudos químicos e biológicos do gênero *Aspidosperma*.

Palavras-chave: *Aspidosperma*, alcalóides indólicos, atividade biológica, etnofarmacologia

ABSTRACT: Biological activity and indole alkaloids of the genus *Aspidosperma* (Apocynaceae): a review. Although mainly known as source of noble wood for furniture construction, species of the genus *Aspidosperma* have been extensively studied in Phytochemistry but scarcely investigated in Pharmacology. *Aspidosperma* species have been commonly used in folk medicine as potential antimalarial agents; in the treatment of leishmaniasis, and uterus and ovary inflammations; as contraceptive; in diabetes and stomach disorders; and against cancer, fever and rheumatism. From a chemical point of view, the great majority of *Aspidosperma* species have already been subjected to isolation and identification of indole alkaloids present in their several parts. From a pharmacological point of view, few tests have been carried out so far to justify the great applicability of these species in folk medicine besides the importance of the indole alkaloids present in the genus representatives. Aimed at improving the knowledge on the importance of indole alkaloids in the genus *Aspidosperma* and their relationship with attributed or tested pharmacological activities, we present a review of the main reports involving chemical and biological studies on the genus *Aspidosperma*.

Key words: *Aspidosperma*, indole alkaloids, biological activity, ethnopharmacology

INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Aspidosperma*, família Apocynaceae, são encontradas apenas nas Américas (Lorenzi, 1998), principalmente na Argentina, Brasil, Bolívia, México, Paraguai e Peru (Woodson, 1951). No Brasil foram catalogadas cerca de 52 espécies desse gênero, praticamente distribuídas em todos os

ecossistemas (Corrêa, 1931), tais como, caatinga, cerrado e florestas (Amorim et al., 2005). Várias espécies de *Aspidosperma* são conhecidas popularmente como perobas, guatambus, carapanaúba, pau-pereiro, amargoso e quina (Corrêa, 1931).

Apresentam grande importância tanto do ponto de vista econômico como científico, pois além de serem fornecedoras de madeira nobre, com larga aplicação na carpintaria (Lorenzi, 1998; Joly, 1991), a maioria das espécies deste gênero são objetos de extensas investigações na busca de novas substâncias com atividades biológicas (Di Stasi & Hiruma-Lima, 2002).

Segundo Barroso (1991), o gênero *Aspidosperma* está submetido ao reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, subclasse Asteridae, ordem Gentianales, família Apocynaceae, subfamília: Plumerioidea e a Tribo Plumerieae.

Em 1951, o gênero *Aspidosperma* sofreu uma revisão sistemática, haja vista que espécies distintas vinham sendo classificadas com o mesmo nome. Esta revisão agrupou 52 espécies em nove séries, Macrocarpa, Ramiflora, Pyricolla, Polyneura, Rígida, Nitida, Stegomeria, Quebrachines e Nobile, levando em consideração suas características morfológicas (Woodson, 1951). Entretanto, ainda existia controvérsias quanto ao número exato de espécies que constituíam este gênero (Allorge & Poupat, 1991).

Então, em 1987 Bolzani propôs uma nova classificação das espécies deste gênero, compreendendo 48 espécies em 8 séries, Rígida, Nitida, Quebrachines, Polyneura, Pyricolla, Nobile, Macrocarpa e Tomentosa, levando em consideração os aspectos quimiotaxonómicos (Pereira et al., 2007).

O gênero *Aspidosperma* comprehende tipicamente espécies arbóreas tropicais de grande porte (2 a 60 m de altura) (Woodson, 1951; Corrêa, 1931), com flores e sementes abundantes, copas amplas, folhas alternas espiraladas não agrupadas no ápice dos ramos, que podem apresentar látex abundante, sendo que, as mesmas não apresentam látex no tronco circular como a maioria das Apocynaceae (Vicentini & Oliveira, 1999).

Cerca de 20% das espécies de plantas conhecidas acumulam alcalóides, com maior frequência nas Dicotiledôneas (Luca & Laflamme, 2001). Essas substâncias podem ser encontradas em diferentes partes do vegetal (Sottomayor et al., 2004), e em representantes de diversas famílias (Lorence & Nessler, 2004). Essa classe de substâncias do metabolismo secundário é famosa pela acentuada ação sobre o sistema nervoso central, sendo muitos deles utilizados como venenos ou alucinógenos (Luca & Pierre, 2000).

Neste contexto de plantas bioprodutoras de alcalóides, insere-se o gênero *Aspidosperma*, família Apocynaceae, o qual tem sido alvo de inúmeros trabalhos sobre a química de vários alcalóides indólicos.

Gilbert (1966) estudou 33 espécies de

Aspidosperma de ocorrência no Brasil, resultando no isolamento de mais de 100 alcalóides indólicos, o que levou a conclusão da predominância desta classe de alcalóides neste gênero. Especificamente foi observada a ocorrência de alcalóides indólicos com uma grande variedade estrutural, dos quais, muitos deles contendo esqueleto b-carbonílico simples, sistemas tricíclicos de anéis pirido-indólicos (Allen & Holmstedt, 1980).

Pereira et al. (2007) realizaram um vasto levantamento das estruturas dos alcalóides indólicos identificados em espécies do gênero *Aspidosperma*, nesta revisão foi possível observar a diversidade estrutural de cerca de 247 alcalóides indólicos isolados até 2006 neste gênero.

Com intensificação dos estudos fitoquímicos sobre os alcalóides de *Aspidosperma*, pode-se obter uma correlação entre a classificação taxonômica de 52 espécies proposta por Woodson (1951) e a química de 33 espécies proposta por Gilbert (1966).

O grande número de alcalóides indólicos encontrados nas espécies de *Aspidosperma*, confirmam a grande importância dessa classe de substâncias, no que tange a classificação, e divisão de espécies do gênero em sete grupos: Polineura, Pyricolla, Tomentosa, Macrocarpa, Macroloba, Nobiles e Nitida, de acordo com as semelhanças químicas das estruturas alcaloidicas (Woodson, 1951; Gilbert, 1966), fato este, que coloca os alcalóides indólicos como marcadores quimiotaxonómicos das espécies do gênero *Aspidosperma* (Nunes, 1980).

É atribuído aos alcalóides indólicos de espécies do gênero *Aspidosperma*, uma larga aplicação terapêutica (Bourdy et al., 2004). Este fato tem despertado nos pesquisadores, a necessidade de uma investigação mais apurada de uma correlação entre as atividades terapêuticas, com a grande ocorrência de alcalóides indólicos presentes no gênero *Aspidosperma*.

Dentre as várias atividades biológicas dos alcalóides indólicos, podemos destacar a ergometrina obtida de *Secale cornutum* (Esporão de centeio) que apresenta propriedade de contração intensa dos músculos uterinos e é contra indicada para pacientes com disfunção cardíaca, hepática e renal, hipertensão e problemas vasculares, mas é muito útil na prevenção e tratamento de hemorragia pós-parto e pós-aborto devido à atonia uterina após a expulsão da placenta (Schripsema et al., 2004).

De *Pausinystalia yohimbe* pode ser obtido o alcalóide ioimbina, um inibidor seletivo dos receptores alfa-2-adrenérgico. É, portanto um agente simpatolítico. Em doses fracas, é um hipotensor e, em doses maiores, é um hipotensor e vasodilatador das regiões vasculares periféricas. Sua ação sobre a musculatura lisa, determina um aumento do tônus e dos movimentos dos intestinos. Uma metanálise dos

efeitos da ioimbina sobre disfunção erétil em humanos foi publicada recentemente (Schripsema et al., 2004).

De *Rauvolfia serpentina* pode ser obtido o alcalóide reserpina, que em associação com um diurético é efetivo na prevenção da retenção sódica e edema. Entre seus principais efeitos adversos podem ser citados hipotensão, depressão do sistema nervoso central, sonolência e hipotermia. Como a depressão é um efeito adverso relacionado com a dose, a menor dose possível deve ser administrada, não podendo ser utilizado por pacientes com histórico de episódios depressivos ou úlcera péptica (Schripsema et al., 2004).

A maioria dos alcalóides indólicos atuam como agonistas parciais nos receptores adrenérgicos, serotoninérgicos, colinérgicos, dopaminérgicos e noradrenérgicos. As diferentes atividades dos vários compostos se devem, aparentemente, às diferenças de atividade frente aos vários receptores e pela maneira que cada um interage com os diferentes receptores. Já que cada classe de receptor possui diversos sub-tipos, com diferente sensibilidade aos vários compostos, a gama de atividades dos alcalóides indólicos em diferentes órgãos é enorme (Roberts & Wink, 1998; Biel et al., 1959).

Apesar de vários relatos na literatura sobre a química dos alcalóides indólicos de *Aspidosperma*, pouco se vê trabalhos relatando suas atividades biológicas. Sendo assim, o objetivo dessa revisão foi realizar um levantamento bibliográfico, enfatizando a importância biológica dos alcalóides de *Aspidosperma* relatados na literatura.

É importante salientar que das 52 espécies descritas na literatura somente 10 apresentam relatos sobre atividade biológica com extratos brutos e/ou substâncias puras, descritos na literatura, segundo esta revisão.

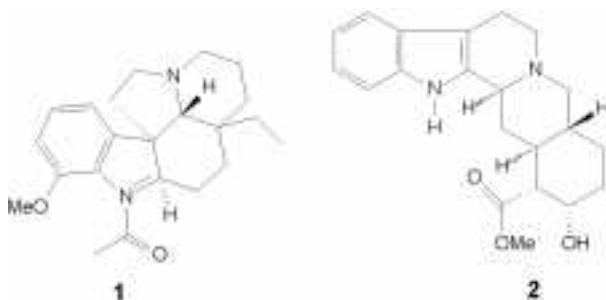
Etnofarmacologia, atividade biológica e alcalóides indólicos de espécies de *Aspidosperma*

Del Vitto et al. (1997) realizaram a catalogação de 273 espécies de uso popular como medicamento na Argentina, das quais a *Aspidosperma quebracho blanco* relatada como antiditóxico, antiasmático, cicatrizante e febrífugo. Seguindo a mesma linha Scarpa (2000) realizou uma busca das espécies vegetais utilizadas contra transtornos digestivos na região do Chaco na Argentina e das espécies mais utilizadas foi relatada a aplicação da infusão em água das cascas e dos talos de *A. quebracho blanco* para curar diarréias.

Desta espécie já foram isolados e identificados cerca de 34 alcalóides (Marques, 1988), dentre os quais a aspidospermina (**1**), um alcalóide indólico com atividade sobre uma linhagem de *Plasmodium falciparum* resistente a cloroquina

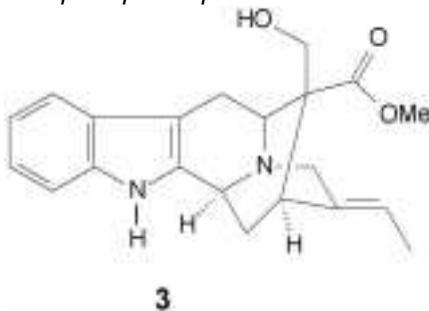
(Mitaine-Offer et al., 2002), e a ioimbina (2), que atua como bloqueador dos receptores α_2 -adrenérgicos, como serotoninérgicos, provocando excitação central, elevação da pressão sanguínea, aumento da frequência cardíaca, e aumento da atividade motora e antidiurética (Deutsch et al., 1994). O extrato de *A. quebracho blanco* é usado como droga prescrita para o tratamento da disfunção erétil e este efeito tem sido atribuída ao seu conteúdo de ioimbina (2), que é mais um inibidor seletivo dos receptores α_2 -adrenérgicos, um agente simpatolítico cujos efeitos mais pronunciados são a vasodilatação dos vasos sanguíneos periféricos, mas diferentemente ao uso da substância pura o extrato não é seletivo ao se ligar aos receptores α_1 ou α_2 (Sperling et al., 2002).

Aspidosperma quebracho blanco



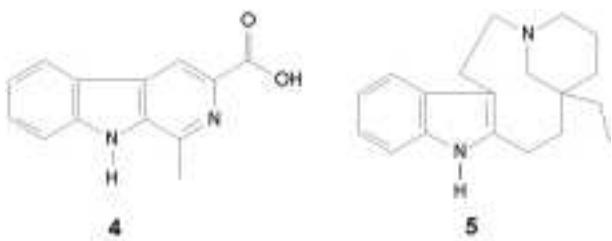
Os extratos etanólicos de folhas, raízes e caules de *A. polineuron* (peroba rosa) foram avaliados quanto à atividade antifúngica contra *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus niger*, *Penicilium chrysogenum*, *Candida albicans*, *Trichoderma harzianum*, *Rhizoctonia sp*, para que houvesse justificativas biológicas que embasasse seu estudo fitoquímico. Dessa forma foram testados os extratos etanólicos das folhas, raízes e caules dessa espécie, mas apenas o extrato etanólico do caule foi capaz de inhibir o crescimento de *C. herbarum* (Ferreira et al., 2003). Estudos semelhantes foram conduzidos por Granato et al. (2005) que testaram o extrato etanólico de rejeitos de indústria madeireira de *A. polineuron*, resultando em atividade positiva contra *Pseudomonas mirabilis*, neste caso foram obtidos dados de espectroscopia de ultravioleta os quais demonstraram grande similaridade com valores descritos na literatura para o alcalóide polineuridina (3), o principal alcalóide

Aspidosperma polineuron



indólico isolado das cascas e das folhas de *A. polineuron* (Marques, 1988), espécie reconhecida também por apresentar alcalóides quaternários nas raízes (Alves, 1991).

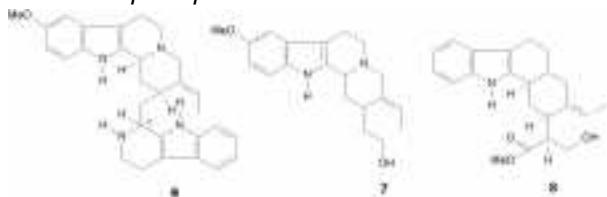
As cascas do caule de *A. nitidum* (carapanaúba) são utilizadas por mais de 8.000 nativos em várias partes do Brasil para curar malária (Brandão et al., 1992). Os índios Makunas e Taiwanos relatam que o látex desta árvore é eficaz na cura de lesões provocadas pela hanseníase (Tratado de Cooperação Amazonica-TCA, 1995). No estado do Amapá, a espécie *A. nitidum* é utilizada no tratamento de bronquites e diabetes, e em Manaus é utilizada como antiinflamatória, cicatrizante e contraceptivo (TCA, 1995). Pereira et al. (2006) tomado por base que *A. nitidum* era utilizada no tratamento de inflamações, avaliaram a atividade antinociceptiva do extrato etanólico do cerne, através dos testes de nociceção induzida por formalina, da latência para o reflexo de retirada da cauda ("tail-flick"), de performance motora ("rota-rod"), e edema induzido pela injeção intraplantar da carragenina. O efeito antinociceptivo foi detectado em 2^a fase, indicando que não houve a participação do sistema opioidérgico, houve ainda uma redução do edema de pata em relação ao controle do teste (Pereira et al., 2006). Recentemente foi relatado o isolamento e a identificação de um novo alcalóide indólico de *A. nitidum* com um sistema 1,2,9-trazabiciclo[7.2.1], denominada braznitidumina (nome este em homenagem ao Professor Raimundo Braz-Filho) (4), o que poderia justificar a atividades biológicas relatadas (Pereira et al., 2006). De *A. nitidum* já são conhecidos pelo menos treze estruturas de alcalóides indólicos, merecendo destaque a aspidospermina (1), quebrachamina (5), e ioimbina (2), muito comuns em outros representantes do gênero, e na sua maioria presentes nas cascas, folhas e galhos (Marques et al., 1996).



Do total de 114 extratos de 88 espécies de plantas diferentes ocorrentes na Mata Atlântica no estado de São Paulo, somente os extratos de folhas e cascas do caule de *A. ramiflorum* (guatambu) mostraram atividade antibacteriana contra *E. coli* (Agripino et al., 2004). Com o objetivo de se descobrir drogas menos tóxicas para o tratamento da leishmaniose, extratos de plantas brasileiras bioprodutoras de alcalóides vêm sendo avaliados

(Oliveira et al., 2002). Assim a atividade antileishmaniose do extrato alcaloidal das cascas do caule e substâncias puras de *A. ramiflorum* contra *Leishmania brasiliensis* e *L. amazonensis* foram avaliados e constatou-se uma maior efetividade contra *L. amazonensis* do que contra a *L. brasiliensis*, tanto para o extrato ($DL_{50} < 47 \mu\text{g mL}^{-1}$) quanto para as substâncias puras, ramiflorina A ($DL_{50} = 16,3 \pm 1,6 \mu\text{g mL}^{-1}$) e ramiflorina B ($DL_{50} = 4,9 \pm 0,9 \mu\text{g mL}^{-1}$) (6) (Tanaka et al., 2007; Ferreira et al., 2004). O mesmo grupo de trabalho avaliou a atividade antibacteriana, e neste foram constatados resultados de inibição de crescimento de *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* do extrato básico e das substâncias ramiflorinas A e B (6) (Oliveira, 1999; Tanaka et al., 2006), e antifúngica do extrato bruto metanolico e ramiflorinas A e B (6) contra *Cryptococcus neoformans* (Souza et al., 2006). Data de 1988 o primeiro trabalho de isolamento e identificação de alcalóides de *A. ramiflorum*, onde foram descritos os alcalóides β-ioimbina (OH-17 em β) (2), 10-metoxigeissoschizol (7) presentes nas cascas do caule e sementes com estruturas já relatadas em outras espécies, e ramiflorinas A e B (6), presentes nas cascas do caule (Marques, 1988; Marques et al., 1996). Somente dez anos depois um novo alcalóide foi isolado, a isositsiriquina (8) (Oliveira, 1999).

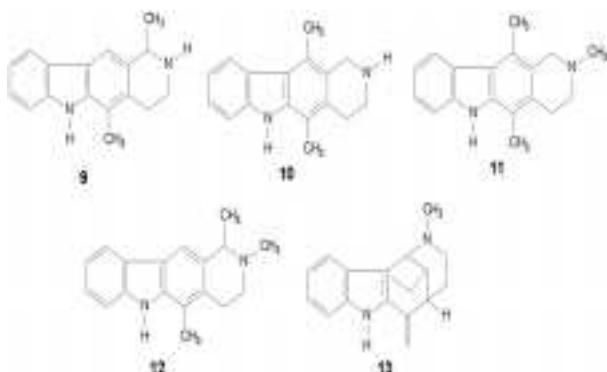
Aspidosperma ramiflorum



Campos et al. (2006) observaram o efeito pró-erétil de uma fração rica em alcalóides de cascas da raiz de *A. ulei* (piquiá) comparado ao padrão ioimbina (2) como controle positivo mediado por mecanismos dopaminérgicos, noradrenérgicos e nitrérgicos, resultados estes que, segundo os autores, juntamente com estudos posteriores serão suficientes para embasar o uso popular de extratos de *A. ulei* como remédio para disfunção erétil. *A. ulei* possui pelo menos cinco alcalóides indólicos isolados e identificados: 1,2-dihidro-olivacina (9), 1,2-dihidro-elipticina (10), *N*-metil-tetrahidro-elipticina (11), (D)-guatambuina (12) e uleina (13) (Marques, 1988).

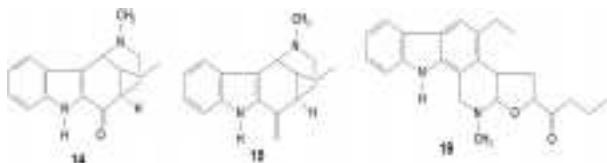
A. subicanum (guatambu) foi submetida a análises de dados de coleta, análises macroscópicas e microscópicas das cascas, análise microscópica do pó da casca, prospecção fitoquímica e testes de pureza a fim de se obter dados padronizados a respeito das partes da planta que são aplicados por populares como medicamentos para tratamento do diabetes e da hipercolesterolemia. Dessa forma pode ser

Aspidosperma ulei



assegurado um certo grau de confiança às populações consumidoras (Morais et al., 2005; Balzon et al., 2004). Outro aspecto importante é a toxicidade aguda presente em algumas espécies de plantas consumidas como medicinais, dessa forma, o extrato metanólico das cascas do caule de *A. subicanum* foi submetida a estudos de toxicidade aguda de dose única e dose letal aproximada. Não havendo resposta significativa de letalidade para nenhum dos métodos aplicados em doses variando de 500 mg Kg⁻¹ a 5000 mg Kg⁻¹, caracterizando a espécie praticamente como atóxica (Goloni et al., 2005). De *A. subicanum* foram isolados e identificados a partir das cascas, dez alcalóides indólicos, dentre os quais, *N*-metiltetrahidro-elipticina (11), uleina (13), 3-*epi*-dasycarpidona (14), 3-*epi*-uleina (15), e subincamina (16) (Marques, 1988).

Aspidosperma subicanum



A. excelsum (sapopema) é uma espécie com grandes aplicações na medicina popular. No Peru é utilizada por Índios Shipibo-Conibo, para o tratamento da hepatite e malária, e por outros nativos como afrodisíaco, vasodilatador, antiséptico, antimicrobiano, cicatrizante, aumento da pressão sanguínea e bronquite. No Brasil, é utilizada como carminativa, estomáquica, contra bronquite, inflamação, febre, diabetes, câncer e malária (Mejia & Rengifo, 2000; Perez, 2002). Apesar das várias indicações terapêuticas e de sua grande aplicação como poderoso agente antimalárico (Perez, 2002) poucas pesquisas biológicas têm sido conduzidas com esta espécie. Os dados que provavelmente sustentam estas indicações etnofarmacológicas, em especial a atividade antimalária, que é comum nas espécies do gênero, é a presença do conteúdo alcaloidal, da qual são conhecidos cerca de 18 alcalóides indólicos,

dos quais, α ioimbina (2), *N*-acetilaspidospermidina (16), excelsinina (17) e aspexcina (18), (Marques, 1988). A atividade antimicrobiana foi confirmada por Verpoorte et al. (1983) demonstrando a atividade inibitória no crescimento de *Bacillus subtilis* de pelo menos seis alcalóides desta espécie, tais como a 11-metoxitubotaivina (19), ochrolifuanina A (20), e tetrahidrosecamina (21), todos presentes nas raízes da planta (Marques, 1988).

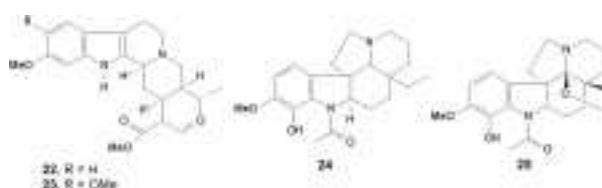
Aspidosperma excelsum



A. marcgravianum (carapanaúba) é também uma espécie com indicações populares no tratamento da malária, além do diabetes e câncer, da qual são utilizadas madeira e cascas (Quiqnard, 2003).

De *A. marcgravianum* já são conhecidos cerca de 50 alcalóides indólicos, dentre estes a reserpina (22), reserpilina (23), aspidoscarpina (24), e aspidolimidina (25) (Marques, 1988), os quais podem justificar sua atividade letal frente às larvas de *Artemia franciscana* na concentração de 500 mg mL⁻¹ (Quiqnard, 2003), e atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *A. niger*, entre outros (Verpoorte et al., 1982).

Aspidosperma marcgravianum

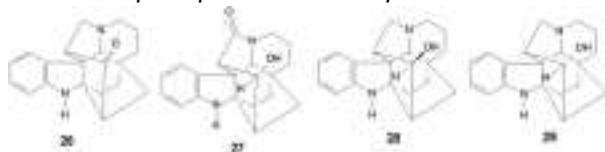


Mesquita et al. (2007) testaram os extratos hexânico e etanólico das folhas, madeira, casca do caule, raízes e cascas das raízes de *A. macrocarpon* frente à atividade antimalária *in vitro* contra uma linhagem de *P. falciparum*, resistente a cloroquina e citotóxica contra células pulmonares embrionárias de humanos (MRC-5) e células retiradas dos músculos de ratos (L-6). O melhor resultado foi obtido com o extrato etanólico das cascas das raízes para a atividade contra *P. falciparum*, e não foram observados efeitos citotóxicos para nenhum dos extratos nas células ensaiadas.

Das cascas de *A. macrocarpon* foram isolados e identificados quatro alcalóides indólicos, kopsanova (26), *epi*-kopsanal-10-lactama (27),

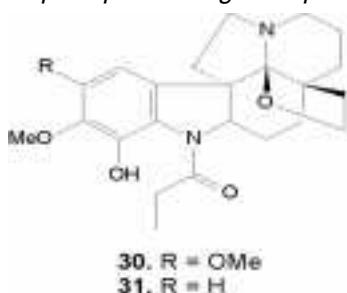
kopsanol (28), e *epi*-kopsanol (29), (Ferreira-Filho et al., 1966), o que poderia justificar os resultados obtidos por Mesquita et al. (2007).

Aspidosperma macrocarpon



A. megalocarpon foi avaliada quanto a sua atividade antimalárica por Weninger et al. (2001) realizando testes *in vitro* dos extratos obtidos em diclorometano e metanol contra *P. falciparum* obtendo-se bons resultados. Mitaine-Offer et al. (2002) testaram três dos quatro alcalóides isolados desta espécie, aspidolimidina (25), aspidoalbina (30) e fendlerina (31) (madeira) (Mitaine et al., 1998) demonstrando uma baixa atividade antimalária ao testar os alcalóides purificados.

Aspidosperma megalocarpon



CONCLUSÃO

Foi evidenciado por esta revisão a existência de um grande número de trabalhos de isolamento e identificação de alcalóides indólicos nas espécies do gênero *Aspidosperma* e de poucos trabalhos que descrevam testes biológicos realizados com os alcalóides e/ou extratos destas espécies. Apesar disto é notável que estudos biológicos com *Aspidospermas* sejam facilmente justificados pela grande aplicação na medicina popular de algumas representantes do gênero como potenciais agentes antimaláricos, antimicrobianos, anticancerígenos, antiinflamatória, no tratamento do diabetes, como afrodisíaco, vasodilatador, anti-séptico, cicatrizante, estomáquica e outras indicações.

Concluímos então que a grande aplicação de espécies do gênero *Aspidosperma* por populares merece maior empenho dos pesquisadores no sentido de investigar as atividades biológicas a elas atribuídas e que maior importância deve ser dada ao grande número de alcalóides até então identificados neste gênero.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AGRIPINO, D.G. et al. Screening of Brazilian plants for antimicrobial and DNA-damaging activities. I. Atlantic rain forest-Ecological station Juréia-Itatins. **Biota Neotropica**, v.4, n.2, 2004.
- ALLEN, J.R.F.; HOLMSTEDT, B.R. The simple α -carboline alkaloids. **Phytochemistry**, v.19, n.8, p.1573-82, 1980.
- ALLORGE, L.; POUPAT, C. Position systématique et révision du genre *Aspidosperma* (Apocynaceae) pour les trios Guyanes. Le point sur leur chimique. **Letters Botaniques**, v.138, n.415, p.267-301, 1991.
- ALVES, C.F. **Alcalóides quaternários da Aspidosperma Polyneuron**. 1991. p. Dissertação (Mestrado-Area de Concentração em Química Orgânica) - Departamento de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- AMORIM, I.L.; SAMPAIO, E.V.S.B.; ARAÚJO, E.L. Flora e estrutura da vegetação arbustiva-arbórea de uma área de caatinga do Seridó, RN, Brasil. **Acta Botanica Brasiliensis**, v.19, n.3, p.615-23, 2005.
- BALZON, D.R.; SILVA, J.C.G.L.; SANTOS, A.J. Aspectos mercadológicos de produtos florestais não madeireiros - Análise retrospectiva. **Floresta**, v.34, n.3, p.363-71, 2004.
- BARROSO, G.B. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1991. v.3, 326p.
- BIEL, J.H.; DRUKKER, A.E.; MITCHELL, T.F. Central stimulants chemistry and structure-activity relationship of alkyl hydrazines. **Journal American Chemical Society**, v.81, n.11, p.2805-13, 1959.
- BOURDY, G. et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part VI. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Isoceño-Guaraní Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v.93, p.269-77, 2004.
- BRANDÃO, M. et al. Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v.36, p.175-82, 1992.
- CAMPOS, A.R. et al. Pro-erectile effects of an alkaloidal rich fraction from *Aspidosperma ulei* root bark in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.104, p.240-4, 2006.
- CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura. v.2.1931. 771p.
- DEL VITTO, L.A.; PETENATTI, E.M.; PETENATTI, M.E. Recursos herbolarios de San Luis (República Argentina). Primeira parte: Plantas Nativas. Multequina. **Latin American Journal of Natural Resources**, v.6, p.49-66, 1997.
- DEUTSCH, H.F. et al. Isolation and biological activity of aspidospermine and quebrachamine from an *Aspidosperma* tree source. **Journal Pharmacology and Biomedical Analysis**, v.12, p.1283-7, 1994.
- DI STASI, L.C. Asteridae medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. In: DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2.ed. São Paulo: Editora UNESP, 2002. p.372-93.
- FERREIRA, D.T. et al. Avaliação da atividade antifúngica dos extratos etanólicos de raiz, caule e folhas de *Aspidosperma polyneuron*. In: ENCONTRO DE QUÍMICA DA REGIÃO SUL, 11., 2003. Pelotas. **Resumos...Pelotas**, 2003.
- FERREIRA, I.C.P. et al. Anti-leishmanial activity of

- alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, n.3, p.325-7, 2004.
- FERREIRA FILHO, J.M. et al. Four heptacyclic alkaloids from *Aspidosperma* species. **Journal Chemical Society C-Orgânic**, v.14, p.1260-6, 1966.
- GILBERT, B. Um estudo fitoquímico do gênero *Aspidosperma*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.38, supl., p.315-9, 1966.
- GOLONI, R. et al. Estudo da toxicidade aguda do *Aspidosperma subincanum* MARTIUS. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.2, n.2, p.89-91, 2005.
- GRANATO, D. et al. Chemical and biological evaluation of rejects from the word industry. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, p.237-41, 2005.
- JOLY, A.B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 10.ed. São Paulo: Editora Nacional, 1991. v.4, 777p.
- LORENCE, A.; NESSLER, E. Molecules of interest. Camptothecin over four decades of surprising findings. **Phytochemistry**, v.65, p.2735-49, 2004.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2.ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 1998. 352p.
- LUCA, V.; LAFLAMME, P. The expanding universe of alkaloid biosynthesis. **Physiology and Metabolism**, v.4, p.225-33, 2001.
- LUCA, V.; PIERRE, B.S. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. **Trends in Plant Science**, v.5, p.168-73, 2000.
- MARQUES, M.F.S. **Contribuição ao estudo químico do gênero Aspidosperma**: *Aspidosperma ramiflorum* Muell. Arg. 1988. p. Dissertação (Mestrado-Área de Concentração em Química Orgânica) - Departamento de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- MARQUES, M.F.S. et al. Indole alkaloid from *Aspidosperma ramiflorum*. **Phytochemistry**, v.41, n.3, p.963-7, 1996.
- MEJIA, K.; RENGIFO, E. **Plantas medicinales de uso popular en la Amazônia Peruana**. 2.ed. Lima: Tarea Asociación Gráfica Educativa, 2000. 286p.
- MESQUITA, M.L. et al. *In vitro* antiplasmoidal activity of Brazilian cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p.165-70, 2007.
- MITAINE, A.C. et al. Indole alkaloid from the trunk bark of *Aspidosperma megalocarpon*. **Planta Medica**, v.64, p.487, 1998.
- MITAINE-OFFER, A.C. et al. Antiplasmoidal activity of *Aspidosperma* indole alkaloids. **Phytomedicine**, v.9, p.142-5, 2002.
- MORAIS, I.C. et al. Levantamento sobre plantas medicinais comercializadas em Goiânia: abordagem popular (raizeiros) e abordagem científica (levantamento bibliográfico). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.2, n.1, p.13-6, 2005.
- NUNES, D.S. **Contribuição ao estudo químico do gênero Aspidosperma**: *Aspidosperma pruinosum* Markgraf. 1980. 177p. Dissertação (Mestrado - Área de Concentração em Química Orgânica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- OLIVEIRA, A.J.B. **Estudo de seis espécies do gênero Aspidosperma utilizando GC, GC/MS e HPLC**: análise qualitativa e quantitativa. Teste bioautobiográfico; Cultura de tecidos e células vegetais e Rota de preparação dos compostos diméricos ramiflorina A e ramiflorina B. 1999. p. Dissertação (Mestrado-Área de Concentração em Química Orgânica) - Departamento de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- OLIVEIRA, A.J.B. et al. Callus culture of *Aspidosperma ramiflorum* Muell. Arg.: growth and alkaloid production. **Acta Scientiarum**, v.23, p.609-12, 2002.
- PEREIRA, M.M. et al. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). **Química Nova**, v.30, n.4, p.970-83. 2007.
- PEREIRA, M.M. et al. Constituientes químicos e estudo biológico de *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.8, n.3, p.1-8, 2006a.
- PEREIRA, M.M. et al. NMR structural analysis of Braznitidumine: A new Indole Alkaloid with 1,2,9-Triazabicyclo[7.2.1]System, Isolated from *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae). **Journal of The Brazilian Chemical Society**, v.17, n.7, p.1274-80, 2006b.
- PEREZ, D. Etnobotânica medicinal y biocidas para malaria en la región Ucayali. **Folia Amazónica**, v.13, p.87-108, 2002.
- QUIQNARD, E.L.J. Screening of plants found in Amazonas state for lethality towards brine-shrimp. **Acta Amazonica**, v.33, p.93-104, 2003.
- ROBERTS, M.F.; WINK, M. **Alkaloids**: biochemistry, ecology and medicinal applications. New York: Plenum Press, 1998. 486p.
- SCHRIPSEMA, J.; DAGNINO, D.; GOSMANN, G. Alcalóides indólicos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. p.819-46.
- SOUZA, A.C.M. et al. Propriedades antifúngicas dos alcalóides de *Aspidosperma ramiflorum*. In: REUNIÓN ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA. 29., 2006. Águas de Lindóia. **Resumo**...São Paulo, 2006.
- SOTOMAYOR, M. et al. Peroxidases and the biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Phytochemistry Reviews**, v.3, p.159-71, 2004.
- SPERLING, H. et al. An extract from the bark of *Aspidosperma quebracho blanco* binds to human penile α -adrenoceptors. **The Journal of Urology**, v.168, p.160-3, 2002.
- TANAKA, J.C.A. et al. Antibacterial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.39, p.387-91, 2006.
- TANAKA, J.C.A. et al. Antileishmanial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. **Phytomedicine**, v.16, n.6, p.377-80, 2007.
- TRATADO DE COOPERACIÓN AMAZONICA (TCA).
- Plantas medicinales Amazónicas**: realidad y perspectivas. Ediciones TCA. Lima: Ediciones TCA, 1995. p.
- VERPOORTE, R.; PUIGROK, C.L.M.; BERARHEIM, S.A. Medicinal plants of Surinam. II- Antimicrobial active alkaloids from *Aspidosperma marcrovianum*. **Planta Medica**, v.46, p.149-52, 1982.
- VERPOORTE, R. et al. Medicinal plants of Surinam. **Planta Medica**, v.48, p.283-9, 1983.
- VICENTINI, A.; OLIVEIRA, A.A. Apocynaceae e Asclepiadaceae. In: _____ **Flora da reserva Ducke**:

guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central. Manaus: INPA – DFID, 1999. v.2, p.568-81.

WENINGER, B. et al. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.78, p.193-200,

2001.

WOODSON, R.J. Studies in the Apocynaceae. VIII An Interim revision of the genus *Aspidosperma* Mart. & Zucc. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.38, p.119-204, 1951.