



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

**ABORDAGEM QUÍMICA E ESTUDO DA  
ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS RAÍZES DE  
*Chiococca alba* (L.) HITCHC. (RUBIACEAE)**

**Valéria Elisa Gazda**

**Rio de Janeiro**  
**2004**

**ABORDAGEM QUÍMICA E ESTUDO DA  
ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS RAÍZES DE  
*Chiococca alba* (L.) HITCHC. (RUBIACEAE)**

**Valéria Elisa Gazda**

**Faculdade de Farmácia – UFRJ  
Mestrado em Ciências Farmacêuticas**

**Nancy dos Santos Barbi  
Orientadora**

**Prof. Adjunta – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas  
Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio de Janeiro**

**Rio de Janeiro  
2004**

**ABORDAGEM QUÍMICA E ESTUDO DA ATIVIDADE  
BIOLÓGICA DAS RAÍZES DE *Chiococca alba* (L.)  
HITCHC. (RUBIACEAE)**

**Valéria Elisa Gazda**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Aprovada por:**

**Prof. Dra. \_\_\_\_\_ - Nancy dos Santos Barbi, presidente da banca.**

**Prof. Dra. \_\_\_\_\_ - Ana Luísa Palhares de Miranda**

**Prof. Dr. \_\_\_\_\_ - Nuno Alvares Pereira**

**Prof. Dr. \_\_\_\_\_ - Ricardo Machado Kuster**

**Rio de Janeiro  
2004**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Gazda, Valéria Elisa.

Abordagem Química e Estudo da Atividade Biológica das Raízes de *Chiococca alba* (L.) Hitchc. (Rubiaceae) / Valéria Elisa. – Rio de Janeiro: UFRJ/Faculdade de Farmácia, 2004.

xviii, 141 f.: il.

Dissertação (Mestrado) – UFRJ/ Faculdade de Farmácia / Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2004.

Orientadora: Nancy dos Santos Barbi

Referências Bibliográficas: f. 126.

1. *Chiococca alba*. 2. Rubiaceae. 3. Farmacologia. 4. Toxicologia. 5. Perfil Químico - Teses.

I. Barbi, Nancy dos Santos (Orient.).

II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

III. Título.

À minha mãe Vera e minha irmã  
Mariane, com muito amor, pelo  
incentivo de estudar apesar  
da saudade e da distância.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** que me concedeu forças para realizar este trabalho.

À minha mãe **Vera**, minha irmã **Mariane**, meu pai **Alberto** e toda família por seu amor, afeto e incentivos constantes que nunca me abandonaram apesar da distância, muito obrigada por acreditarem em mim.

À minha orientadora **Prof. Dra. Nancy dos Santos Barbi** pela confiança em mim depositada e acima de tudo pelo rigor científico em conduzir a realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Francisco Roma Paumgarten** do Laboratório de Toxicologia Ambiental da Fundação Oswaldo Cruz por ter me acolhido em seu laboratório, pela confiança, incentivo e grande contribuição na realização deste trabalho.

À pesquisadora **M.Sc. Maria Regina Gomes Carneiro** por ter dedicado tanto tempo me orientando na execução dos testes de mutagenicidade que em muito engradeceram este trabalho, pela amizade demonstrada e pela pessoa que é.

Às minhas melhores amigas **Caroline Drechsler** e **Emeli Moura de Araújo** pela amizade, carinho, apoio e companheirismo.

Ao **Prof. Dr. Antônio Jorge Ribeiro da Silva** do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais por ter cedido o laboratório, os reagentes e os equipamentos necessários para a avaliação química.

À **Ana Cecília Xavier** e **Rosângela Ribeiro de Carvalho** do Laboratório de Toxicologia Ambiental por me ajudarem nos experimentos.

Aos técnicos do biotério do Laboratório de Toxicologia Ambiental pelo zelo com que trataram dos animais utilizados nesta dissertação.

Aos meus amigos: **Deise Riba, Bárbara, Laísa, Márcia, Luciana, Elaine e Thiago** do Laboratório de Toxicologia Ambiental pela convivência agradável, cooperação e por terem me auxiliado sempre que precisei.

Aos professores do corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por dividirem seus conhecimentos dando ferramentas valiosas no engradecimento deste trabalho e para a minha formação profissional.

Às **Prof. Dra. Ana Luísa Palhares Miranda e Suzana Guimarães Leitão** por terem sido da comissão de acompanhamento desta dissertação.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster** pelo apoio nas análises por cromatografia líquida de alta eficiência.

À **Maria Cristina H. P. Lima**, da Central Analítica do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, pelas análises por cromatografia com fase gasosa e espectrometria de massas.

À **Flora Medicinal**, em especial ao farmacêutico **Rogério Rosa**, por ter cedido parte da bibliografia e as amostras vegetais usadas neste trabalho.

Ao botânico **Sebastião Neto** pela identificação da espécie.

Ao Laboratório de Controle de Qualidade do Biotério Central (Centro de Criação de Animais da Fundação Oswaldo Cruz) por tão gentilmente ter cedido o equipamento para a análise hematológica.

Ao **Sr. Goularte** pela coleta do material botânico para a confecção da excicata.

À Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro muito obrigada.

Obrigada *Chiococca alba* (L.) Hitchc.

# SUMÁRIO

Resumo.....	xii
Abstract.....	xiv
Lista de Símbolos, Siglas e Abreviaturas.....	xvi
Lista de Figuras.....	xviii
Lista de Tabelas.....	xx
Lista de Cromatogramas.....	xxii
Lista de Espectros.....	xxiii
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>24</b>
1. A família Rubiaceae.....	27
1.1- Sistemática e Quimiosistemática.....	27
1.2- Estudos químicos na família Rubiaceae.....	29
1.3- Estudos farmacológicos na família Rubiaceae.....	30
1.4- Estudos toxicológicos na família Rubiaceae.....	34
2. O Gênero <i>Chiococca</i> .....	38
3. A Espécie <i>Chiococca alba</i> (L.) Hitchc.....	38
3.1- Botânica e Sistemática.....	38
3.1.1- Etimologia.....	38
3.1.2- Sinonímia.....	39
3.1.2.1- Sinonímias científicas.....	39
3.1.2.2- Sinonímias populares no Brasil.....	39
3.1.3 - Descrição macroscópica.....	39
3.1.3.1- Hábito.....	39
3.1.3.2- Caule.....	39
3.1.3.3- Folhas.....	39
3.1.3.4- Inflorescências.....	40
3.1.3.5- Raiz.....	40
3.1.4- Sistemática botânica.....	40
3.1.5- Distribuição.....	40
3.2- Estudos químicos na espécie <i>Chiococca alba</i> (L.) Hitchc.....	40



3.3- Estudos farmacológicos na espécie <i>Chiococca alba</i> .....	45
3.4- Estudos toxicológicos na espécie <i>Chiococca alba</i> .....	48
4. Estudo da toxicidade.....	48
4.1- Toxicidade aguda e subaguda.....	49
4.2- Avaliação da atividade enzimática.....	50
4.3- Mutagenicidade.....	53
5. Estudo farmacológico.....	56
5.1- Analgesia.....	56
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>58</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>59</b>
1. Obtenção do material botânico.....	59
2. Procedimentos gerais para extração das raízes de <i>C. alba</i> .....	59
2.1- Obtenção e fracionamento do extrato etanólico.....	60
2.2- Análise do extrato etanólico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	61
2.3- Pesquisa de alcalóides por cromatografia em camada delgada e por extração em meio básico.....	62
2.3.1- Análise por CCD.....	62
3. Avaliação toxicológica.....	62
3.1- Animais.....	63
3.2- Ensaio de toxicidade aguda do extrato etanólico de <i>C. alba</i> .....	63
3.2.1- Toxicidade aguda do extrato etanólico de <i>C. alba</i> por via oral.....	64
3.2.2- Toxicidade aguda do extrato etanólico de <i>C. alba</i> por vias intraperitoneal e subcutânea.....	64
3.3- Ensaio de toxicidade de doses repetidas (subaguda) do extrato etanólico de <i>C. alba</i> .....	64
3.3.1 – Ensaio de toxicidade de doses repetidas (subaguda) do extrato etanólico de <i>C. alba</i> por via oral.....	65
3.3.1.1 – Determinação das atividades das enzimas hepáticas <i>Cyp</i> 1A1 e <i>Cyp</i> 2B1 do complexo citocromo P-450 em fígados de camundongos tratados com doses repetidas (14 dias) por via oral com o extrato etanólico de <i>C. alba</i> .....	65

3.3.1.1.1– Preparação da fração citossólica hepática (Fração S9).....	66
3.3.1.1.2– Determinação da concentração de proteínas na fração citossólica hepática (Fração S9).....	67
3.3.1.1.3 – Determinação da atividade enzimática de <i>Cyp 1A1</i> e <i>Cyp 2B1</i> .....	68
3.3.2 – Ensaios de toxicidade de doses repetidas (subaguda) do extrato etanólico de <i>C. alba</i> por via intraperitoneal.....	69
3.3.2.1 – Determinação da hemoglobina, hematócrito, contagem de hemáceas e leucócitos totais e exame do esfregaço sanguíneo.....	69
4. Estudo da mutagenicidade.....	70
4.1 – Procedência das linhagens usadas nos testes.....	70
4.2 – Testes de genótipos.....	70
4.3 – Preparo das culturas de <i>Salmonella typhimurium</i> .....	71
4.4 - Testes de mutagenicidade por pré-incubação.....	71
4.5 – Determinação da toxicidade e do intervalo de doses do extrato etanólico de <i>C. alba</i> .....	72
4.6- Sistema de ativação metabólica.....	72
4.7 - Controles positivos utilizados nos experimentos feitos com o extrato etanólico de <i>C. alba</i> .....	72
5. Avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico de <i>C. alba</i> em <i>Artemia salina</i> .....	73
5.1 – Procedimentos para a realização do teste de toxicidade com <i>Artemia salina</i> .....	73
5.2 – Bioensaio.....	73
5.3 - Concentração das amostras.....	74
5.4 – Cálculo da CL <sub>50</sub> .....	74
6. Avaliação farmacológica.....	75
6.1 – Teste de analgesia periférica.....	75
7- Reagentes.....	75
8- Meios de cultura.....	77
9- Soluções.....	77

<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>79</b>
1. Rendimento da extração do extrato etanólico a partir das raízes de <i>C. alba</i> .....	79
2. Avaliação química.....	79
2.1- Fracionamento de Ca3950.....	79
2.2- Cromatografia líquida de alta eficiência do extrato etanólico das raízes de <i>C. alba</i> .....	85
2.3- Pesquisa de alcalóides nas raízes de <i>C. alba</i> .....	97
3. Avaliação toxicológica do extrato etanólico de <i>C. alba</i> .....	97
3.1 – Estudo da toxicidade aguda por via oral, intraperitoneal e subcutânea.....	98
3.1.1 – Toxicidade por via oral.....	100
3.1.2 – Toxicidade por via intraperitoneal.....	103
3.1.3 – Toxicidade por via subcutânea.....	108
3.2 – Estudo da toxicidade de doses repetidas (subaguda) por via oral e intraperitoneal.....	113
3.2.1 – Toxicidade de doses repetidas (subaguda) por via oral.....	114
3.2.1.1 - Avaliação das atividades das enzimas hepáticas do citocromo P-450.....	117
3.2.2 – Toxicidade de doses repetidas por via intraperitoneal.....	121
3.2.2.1 – Avaliação hematológica.....	129
3.3 – Avaliação do potencial mutagênico pelo Teste de Ames.....	135
3.3.1 - Testes de genótipo.....	135
3.3.2 – Estudo da toxicidade e do potencial mutagênico avaliado em ensaios com <i>Salmonella typhimurium</i> .....	135
3.4- Avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico de <i>C. alba</i> em <i>Artemia salina</i> .....	141
4. Avaliação farmacológica.....	143
4.1- Analgesia periférica.....	143
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>147</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>149</b>

## RESUMO

GAZDA, Valéria Elisa. **Abordagem Química e Estudo da Atividade Biológica das Raízes de *Chiococca alba* (L.) Hitchc. (RUBIACEAE)**. Orientadora: Nancy dos Santos Barbi. Rio de Janeiro: UFRJ, 2004. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas.

A *Chiococca alba* (L.) Hitchc. (Rubiaceae) é um arbusto conhecido como “cainca” que tem sido usado na medicina popular do Brasil e outras partes da América do Sul e Central como anti-reumático, emético, purgativo, diurético, febrífugo, tônico, antiinflamatório, antiviral, antiedematogênico, afrodisíaco e antiofídico. Até hoje foram descritos poucos estudos químicos, farmacológicos e toxicológicos para a espécie. O presente estudo teve como objetivo prover dados em relação à segurança do extrato etanólico das raízes de *Chiococca alba*, enfatizando toxicidade aguda, subaguda e mutagênese, além de avaliar sua propalada atividade analgésica. A análise do extrato etanólico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), permitiu sugerir perfis estruturais que poderão auxiliar em estudos fitoquímicos futuros visando o isolamento de metabólitos secundários.

Para a avaliação da toxicidade aguda foram administradas doses únicas do extrato etanólico por via oral, intraperitoneal e subcutânea a camundongos Suiços Albinos machos e fêmeas. Não foi observada efeito tóxico após a administração oral de 2000mg/kg do extrato da planta. Sintomas como hipoatividade, ataxia e letargia foram observados em doses menores ou iguais a 62,5mg/kg de peso corporal por via intraperitoneal. O NOAEL (nível máximo de dose em que não se observam efeitos adversos) para doses repetidas por administração oral foi de 2000mg/kg/dia e menor que 31,3mg/kg/dia para a via intraperitoneal. Estes resultados indicam, preliminarmente, a

segurança do uso da “cainca” por via oral. A genotoxicidade das raízes de *Chiococca alba* foi avaliada no teste *Salmonella/microsoma* sem e com a adição da mistura S9. O extrato testado até o limite de toxicidade (500 a 5000µg/placa), não foi mutagênico para as cepas testadas TA 97a, TA 98, TA 100 e TA 1535.

Os resultados obtidos da análise do extrato etanólico das raízes de *C. alba* por CLAE permitiram sugerir a presença de ácidos fenólicos, antraquinonas, iridóides e/ou seco-iridóides e fenilpropanóides. O fracionamento do extrato forneceu uma mistura de ácidos graxos e um triterpeno ácido, identificado como ácido ursólico. Não foi detectada a presença de alcalóides no extrato estudado.

O efeito analgésico atribuído às raízes de *C. alba* foi comprovado através do teste de inibição do número de contorções induzidas pelo ácido acético em camundongos.

Palavras Chaves: *Chiococca alba*, Rubiaceae, farmacologia, toxicologia e perfil químico.

## ABSTRACT

GAZDA, Valéria Elisa. **Chemical Approach and Biological Activity from Roots of *Chiococca alba* (L.) Hitchc. (RUBIACEAE)**. Orientadora: Nancy dos Santos Barbi. Rio de Janeiro: UFRJ, 2004. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas.

*Chiococca alba* (L.) Hitchc. (Rubiaceae) is a shrub known as “cainca” which has been used in folk medicine in Brazil and other parts of South and Central America as anti-rheumatismal, an emetic, purgative, diuretic, febrifuge, tonic, antiinflammatory, an antiviral, an antioedematogenic, an aphrodisiac and against snakebite. Until day few chemical, pharmacological and toxicological studies of this species have been reported. The present study was undertaken to provide a set of data on the safety of the ethanolic extract of *Chiococca alba* roots, emphasizing acute, subacute toxicity and mutagenicity. The HPLC analysis of the extract made it possible to characterise some structural profiles that may help phytochemical studies, leading to isolation of secondary metabolites.

Single doses of were given orally, intraperitoneally or subcutaneous to male and female Swiss albino mice. No toxicity was observed after oral administration with 2000mg/kg of the extract. Symptoms (e.g. hypoactivity, ataxia and lethargy) were observed at doses  $\geq 62,5$ mg/kg of body weight in intraperitoneal route of administration. The NOAEL (no observable adverse effect level) for repeated doses for oral administration was up to 2000mg/kg/day and low to 31,3mg/kg/day for intraperitoneal route. These results suggested the safety on the use of “cainca” by oral route. Genotoxicity of *Chiococca alba* roots was evaluated in the *Salmonella/microsome* assay without and with S9 mixture. The extract, tested up to the toxicity limit (500-5000 $\mu$ g/plate), was not mutagenic to strains TA 97a, TA 98, TA 100 and TA 1535.

The analysis of ethanolic extract from roots of *C. alba* was performed by HPLC has provided evidence on the existence of phenolic acids, anthraquinones, iridoids and/or seco-iridoids and phenylpropanoids. The fractionation of the ethanolic extract furnished a mixture of fatty acids and an acid triterpene, which was identified as ursolic acid. After investigation no alkaloids were found in the extract.

The ethanolic extract from roots of *C. alba* has shown a good activity (writhing test).

Keywords: *Chiococca alba*, Rubiaceae, pharmacology, toxicology, chemical profile.

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

μl: microlitro(s)

$\lambda_{\text{máx}}$ : comprimento de onda(s) no(s) máximo(s) de absorbância

°C: graus Celsius

2-AA: 2-aminoantraceno

2-AF: 2-aminofluoreno

2-NF: 2-nitrofluoreno

4-NQNO: 4-nitroquinolina-N-óxido

5-HT<sub>2A</sub>: serotonina

Anvisa: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AS: azida sódica

CC: cromatografia em coluna

CCD: cromatografia em camada delgada

CG: cromatografia em fase gasosa

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

col.: colaboradores

Da: daltons

DL<sub>50</sub>: dose letal mediana

DLA: dose letal aproximada

DMSO: sulfoxido de dimetila

DMT: N,N-dimetiltriptamina

DNA: ácido desoxirribonucleico

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

EM: espectrometria de massas

EROD: etóxirresorufina-*O*-desetilase

*et al.*: e colaboradores (*et alii*)

EUA: Estados Unidos da América

eV: elétrons-volt

g: grama(s)

G: força da gravidade

GABA: ácido  $\gamma$ -amino-butírico

h: hora(s)



*his*<sup>-</sup>: auxotrofia para o aminoácido histidina  
*his*<sup>+</sup>: prototrofia para o aminoácido histidina  
kg: quilograma(s)  
l: litro(s)  
LC<sub>50</sub>: concentração letal mediana  
*m/z*: relação massa/carga  
m: metro(s)  
MAO: monoamina oxidase  
mg: miligrama(s)  
min: minuto(s)  
ml: mililitro(s)  
mM: milimolar  
MS: Ministério da Saúde  
n: número de animais ou réplicas  
NADP: adenina nicotidanimida difosfato  
NADPH: adenina nicotinamida difosfato-P  
nm: nanômetro(s)  
NOAEL: *No Observed Adverse Effects Level* ou nível máximo de dose em que não se observam efeitos adversos  
pág: página(s)  
ppm: partes por milhão  
PROD: pentóxirresorufina-*O*-despentilase  
RDC: Resolução da Diretoria Colegiada  
rpm: rotações por minuto  
THH: tetraidroarmina  
*t<sub>r</sub>*: tempo de retenção  
TRIS: [2,4,6-tris(dimetilaminometil)-fenol]  
UV: ultravioleta  
v/v: volume a volume  
EtOH: etanol  
MeOH: metanol

## LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Diversidade química e distribuição dos principais constituintes nas quatro subfamílias: Ixoroideae (IXO), Cinchonoideae (CIN), Rubioideae (RUB) e Antirheoideae (ANT) pertencentes à família Rubiaceae (BOLZANI <i>et al.</i> , 2001).....	29
Figura 2: <i>Psychotria viridis</i> (Ruiz et Pavon).....	37
Figura 3: <i>Chiococca alba</i> (L.) Hitchc. ....	38
Figura 4: Alcalóides quínolínicos isolados das raízes de <i>C. alba</i> .....	42
Figura 5: Hidroxicetonas de <i>C. alba</i> .....	43
Figura 6: Triterpeno isolado das raízes de <i>C. alba</i> .....	43
Figura 7: Iridóides e seco-iridóide isolados das raízes de <i>C. alba</i> .....	44
Figura 8: Nor-seco-pimarano isolado das raízes de <i>C. alba</i> .....	45
Figura 9: Ácido ursólico.....	
Figura 10: Proposta de fragmentação do éster metílico do ácido ursólico sob impacto de elétrons a 70eV.....	85
Figura 11: Antraquinonas de Rubiaceae.....	88
Figura 12: Oscilações dos pesos dos camundongos machos após dose única do extrato etanólico de <i>C. alba</i> por via oral.....	103
Figura 13: Oscilações dos pesos dos camundongos fêmeas após dose única do extrato etanólico de <i>C. alba</i> por via oral.....	103
Figura 14: Oscilações dos pesos dos camundongos machos após dose única do extrato etanólico de <i>C. alba</i> por via intraperitoneal.....	107
Figura 15: Oscilações dos pesos dos camundongos fêmeas após dose única do extrato etanólico de <i>C. alba</i> por via intraperitoneal.....	108
Figura 16: Oscilações dos pesos dos camundongos machos após dose única do extrato etanólico de <i>C. alba</i> por via subcutânea.....	112
Figura 17: Oscilações dos pesos dos camundongos fêmeas após dose única do extrato etanólico de <i>C. alba</i> por via subcutânea.....	112
Figura 18: Atividade EROD (etóxirresorufina- <i>O</i> -desetilase) de camundongos tratados com doses repetidas por via oral do extrato etanólico de <i>C. alba</i> na dose de 2000mg/kg/dia por 14 dias. ....	119

Figura 19: Atividade PROD (pentóxirresorufina- <i>O</i> -despentilase) de camundongos tratados com doses repetidas por via oral do extrato etanólico de <i>C. alba</i> na dose de 2000mg/kg/dia por 14 dias.....	119
Figura 20: Curva de sobrevivência dos camundongos machos que receberam doses repetidas do extrato etanólico de <i>C. alba</i> por via intraperitoneal por 14 dias consecutivos.....	127
Figura 21: Curva de sobrevivência dos camundongos fêmeas que receberam doses repetidas do extrato etanólico de <i>C. alba</i> por via intraperitoneal por 14 dias consecutivos.....	127
Figura 22: Número de contorções induzidas por ácido acético 0,6% em camundongos machos tratados com o extrato etanólico de <i>C. alba</i> por via oral na dose de 500mg/kg.....	144
Figura 23: Número de contorções induzidas por ácido acético 0,6% em camundongos fêmeas tratados com o extrato etanólico de <i>C. alba</i> por via oral na dose de 500mg/kg.....	145

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ácidos graxos identificados na fração Ca3950 do extrato etanólico das raízes de <i>C. alba</i> .....	80
Tabela 2: Sinal eluído de <i>C. alba</i> , seus máximos de absorção e possível correlação com antraquinonas descritas na literatura para Rubiaceae (WIJINSMA & VERPOORTE, 1986).....	90
Tabela 3: Máximos de absorção observados nos espectros de UV das substâncias eluídas em 28,7, 30,2 e 33,1 min. e possível correlação com iridóides isolados de <i>C. alba</i> .....	93
Tabela 4: Máximos de absorção observados nos espectros de UV das substâncias eluídas em 34,6, 39,8 e 42,0 min. e possível correlação com ácidos hidroxicinâmicos (HARBONE, 1986).....	94
Tabela 5: Toxicidade aguda do extrato etanólico de <i>C. alba</i> pelas vias oral, intraperitoneal e subcutânea.....	99
Tabela 6: Toxicidade aguda do extrato etanólico de <i>C. alba</i> por via oral.....	101
Tabela 7: Ganho de peso dos camundongos tratados com dose única do extrato etanólico de <i>C. alba</i> por via oral.....	181
Tabela 8: Toxicidade aguda do extrato etanólico de <i>C. alba</i> por via intraperitoneal.....	105
Tabela 9: Ganho de peso de camundongos tratados com dose única do extrato etanólico de <i>C. alba</i> por via intraperitoneal.....	106
Tabela 10: Toxicidade aguda do extrato etanólico de <i>C. alba</i> por via subcutânea.....	109
Tabela 11: Ganho de peso de camundongos tratados com dose única do extrato etanólico de <i>C. alba</i> por via subcutânea.....	111
Tabela 12: Ganho de peso de camundongos tratados com doses repetidas do extrato etanólico de <i>C. alba</i> por via oral.....	114
Tabela 13: Peso (g) dos órgãos de camundongos tratados com o extrato etanólico de <i>C. alba</i> por via oral em doses repetidas por 14 dias.....	115
Tabela 14: Ganho de peso (g) de camundongos tratados com doses repetidas por via intraperitoneal.....	122

Tabela 15: Peso (g) dos órgãos de camundongos tratados com o extrato etanólico de <i>C. alba</i> por via intraperitoneal em doses repetidas por 14 dias.....	124
Tabela 16: Índices hematimétricos de camundongos tratados com doses repetidas do extrato etanólico de <i>C. alba</i> por via intraperitoneal.....	130
Tabela 17: Leucograma dos camundongos tratados com doses repetidas do extrato etanólico de <i>C. alba</i> por via intraperitoneal.....	133
Tabela 18: Avaliação do potencial mutagênico do extrato etanólico de <i>C. alba</i> , em cepas de <i>S. typhimurium</i> .....	136

## ÍNDICES DE CROMATOGRAMAS

Cromatograma 1: Cromatografia com fase gasosa da fração Ca3950.....	80
Cromatograma 2: Cromatografia líquida de alta eficiência do extrato em etanol das raízes de <i>C. alba</i> .....	86

## ÍNDICES DE ESPECTROS

Espectro 1: Espectro de massas, por impacto de elétrons a 70eV, do ácido hexadecanóico.....	81
Espectro 2: Espectro de massas, por impacto de elétrons a 70eV, do ácido octadecanóico.....	81
Espectro 3: Espectro de massas, por impacto de elétrons a 70eV, do ácido eicosanóico.....	82
Espectro 4: Espectro de massas, por impacto de elétrons a 70eV, do ácido docosanóico.....	82
Espectro 5: Espectro de massas, por impacto de elétrons a 70eV, do ácido tetracosanóico.....	83
Espectro 6: Espectro de massas, por impacto de elétrons a 70eV, do ácido ursólico.....	84
Espectro 7: Espectro no UV da substância eluída em 7,8 min. do extrato etanólico das raízes de <i>C. alba</i> .....	87
Espectro 8: Espectro no UV da substância eluída em 10,8 min. do extrato etanólico das raízes de <i>C. alba</i> .....	87
Espectro 9: Espectro no UV da substância eluída em 27,4 min. do extrato etanólico das raízes de <i>C. alba</i> .....	89
Espectro 10: Espectro no UV da substância eluída em 28,7 min. do extrato etanólico das raízes de <i>C. alba</i> .....	91
Espectro 11: Espectro no UV da substância eluída em 30,2 min. do extrato etanólico das raízes de <i>C. alba</i> .....	91
Espectro 12: Espectro no UV da substância eluída em 33,1 min. do extrato etanólico das raízes de <i>C. alba</i> .....	92
Espectro 13: Espectro no UV da substância eluída em 34,6 min. do extrato etanólico das raízes de <i>C. alba</i> .....	95
Espectro 14: Espectro no UV da substância eluída em 39,8 min. do extrato etanólico das raízes de <i>C. alba</i> .....	95
Espectro 15: Espectro no UV da substância eluída em 42,0 min. do extrato etanólico das raízes de <i>C. alba</i> .....	96

## INTRODUÇÃO

Calcula-se que o número de espécies vegetais presentes no planeta esteja compreendida entre 250.000 a 500.000, sendo que menos de 5% foram exploradas quanto ao aspecto fitoquímico e menor é a percentagem das que foram avaliadas quanto à atividade biológica. A grande maioria das espécies vegetais utilizadas na medicina popular, não tem suas eficácia e toxicidade esclarecidas (FERREIRA, 1998).

Em se falando de plantas utilizadas na medicina popular, não se pode deixar de mencionar a posição do Brasil, pois para o qual estima-se possuir em torno de 120.000 espécies de plantas superiores. Basicamente, a utilização do potencial brasileiro situa-se na forma extrativista (FERREIRA, 1998). O conhecimento sobre a maioria das espécies fica restrito aos dados empíricos e etnofarmacológicos, pois pouco se conhece a respeito das substâncias químicas responsáveis pelas ações farmacológicas. Muitas das espécies medicinais são exóticas, originárias da Europa, com técnicas de cultivo apropriadas daquela região, mas que ainda não foram adaptadas às condições climáticas brasileiras. Segundo a Associação Brasileira da Indústria Fitoterápica (ABIFITO), dos 206 fitoterápicos registrados no país em 2003, 89% eram elaborados com plantas européias (SABINO, 2004). Apesar de serem utilizadas popularmente no Brasil cerca de 300 espécies, somente 10% são nativas.

Quando utilizados de maneira adequada, os fitoterápicos apresentam efeitos terapêuticos às vezes superiores aos dos medicamentos convencionais, podendo apresentar efeitos colaterais mais suaves. Um exemplo é a “valeriana” (*Valeriana officinalis*), que vem sendo usada no tratamento de insônia e que, ao contrário dos medicamentos convencionais, não provoca dependência nem tolerância. No entanto, se ingerida em grandes quantidades e por tempo prolongado, ela pode ser tóxica para o fígado. A utilização inadequada dos fitoterápicos, como automedicação,



pode trazer uma série de danos. É o caso do *Hypericum perforatum* (Hypericaceae), chamado popularmente de “erva-de-são-joão”, planta muito utilizada como antidepressiva por interferir na recaptação de serotonina e outros neurotransmissores. Além de apresentar efeitos adversos, como a fotossensibilidade devido à presença de hipericina, também interfere nas concentrações plasmáticas de um grande número de medicamentos alterando suas biodisponibilidades (OLIVEIRA, AKISUE & AKISUE, 1996). Dados mostram que 4% das causas de internação de pacientes em hospitais na Coréia do Sul são devidas ao uso abusivo de plantas medicinais. O mesmo acontece em outros países asiáticos (DI STASI, 1996). No Brasil não há dados precisos, uma vez que problemas como esse não são de notificação obrigatória aos serviços de saúde. Ao contrário dos medicamentos convencionais, que possuem concentrações conhecidas de princípios ativos, ou seja, das substâncias responsáveis pelos efeitos, nos fitoterápicos os princípios ativos na maioria das vezes são desconhecidos, coexistindo com uma série de outras substâncias presentes nas plantas.

O mercado brasileiro de fitoterápicos apresenta muitos problemas. A começar pelos extratores, pagos pela indústria para tirar da natureza as plantas necessárias à produção dos comprimidos, extratos e chás. Os extratores são normalmente moradores de regiões próximas às matas e, teoricamente, conhecem as espécies pelo menos de forma empírica. A falta de identificação botânica faz com que espécies semelhantes e/ou com a mesma sinonímia popular, apresentando composição química diferente, com constituintes algumas vezes potencialmente tóxicos, sejam coletadas erroneamente por estes “mateiros”. Somam-se ainda problemas relacionados à falta de controle da qualidade, fraudes ou adulterações e fiscalização deficiente. Quanto às espécies nativas, são escassos os conhecimentos agrônômicos, químicos, farmacológicos e principalmente toxicológicos.

O crescimento do mercado de fitoterápicos e seu uso indiscriminado, baseado na crença de ausência de efeitos colaterais, tem gerado certa preocupação entre os cientistas. A maioria das plantas medicinais e chás vendidos no mundo não é licenciada, ou seja, está à disposição dos consumidores de maneira clandestina. A maior parte desses produtos está no mercado sem nenhum critério científico. Além disso, a automedicação é um grande problema porque muitas pessoas utilizam plantas que crescem nos próprios quintais ou as coletam em terrenos baldios ou florestas. Eventualmente, essas plantas são confundidas com outras que possuem características semelhantes, como o mesmo tipo de folhas, flores, frutos, caules ou raízes. As pessoas desconhecem que a quantidade de princípios ativos contida nas plantas pode variar de acordo com a idade da planta, a época da colheita, o tipo de solo, a parte utilizada e as condições de estocagem. Plantas que crescem muito próximas a rodovias, por exemplo, apresentam concentração elevada de metais como chumbo e alumínio, dentre outros, cujos efeitos podem ser indesejáveis.

Um exemplo marcante sobre efeito tóxico de plantas medicinais no Brasil está relacionado ao uso do “confrei” (*Symphytum officinale*) pertencente à família Boraginaceae. No início dos anos 80, foi amplamente divulgado na imprensa que esta planta teria fantásticas propriedades terapêuticas para uma série de doenças, incluindo a leucemia e até mesmo o câncer. A partir daí, muitas pessoas passaram a ingerir suco de “confrei” (folhas com água batidas no liquidificador) regularmente. No entanto, estudos toxicológicos posteriores mostraram que o “confrei” possui substâncias extremamente tóxicas para o fígado, os alcalóides pirrolizidínicos, o que acabou culminando na proibição de sua indicação para uso interno. Já quando usado externamente, o “confrei” apresenta excelentes propriedades cicatrizantes (ROBBERS, SPEEDIE & TYLER, 1997).

Com o ressurgimento do interesse pela Fitoterapia reforça-se a preocupação em coibir a comercialização e utilização de produtos que estão no mercado, sem o prévio conhecimento da ação do seu princípio ativo. Assim, é indispensável um rigoroso controle da qualidade dos dados que revelam a origem de plantas medicinais utilizadas nos medicamentos.

A *Chiococca alba* alvo deste estudo, constitui-se numa matriz de fitoterápicos de ampla aceitação no mercado. Esta planta tem sido utilizada na medicina popular e comercializada por indústrias de fitoterápicos há bastante tempo. Entretanto, a observação, tendo como base uma pesquisa bibliográfica, da escassez de estudos químicos e de atividade farmacológica e/ou toxicológica dessa espécie, coloca em dúvida a segurança e a confiabilidade nas propriedades terapêuticas que a encerra.

## **1. A família Rubiaceae**

Rubiaceae é uma das maiores famílias dentre as Angiospermas e compreende 600 gêneros e mais de 10000 espécies de hábitos essencialmente tropicais. No Brasil, as espécies de Rubiaceae são amplamente distribuídas nos mais variados ecossistemas como a Amazônia, Floresta Atlântica e Cerrado, predominando sob a forma de árvores e semi-arbustos (BOLZANI *et al.*, 2001). Isso confere às espécies grande variedade de formas e estruturas.

### **1.1- Sistemática e Quimiosistemática**

Esta família tem sido dividida em diferentes subfamílias, baseando-se essencialmente em alguns parâmetros morfológicos. Em 1988, Robbrecht, considerando uma série de outras características como a placentação, morfologia e anatomia dos frutos e sementes, reformulou a distribuição das subfamílias e tribos de Rubiaceae. A nova classificação botânica divide a família em quatro subfamílias: Ixoroideae,

Cinchonoideae, Antirrhoideae e Rubioideae. De acordo com este autor, o posicionamento das subfamílias e a determinação das tribos, gêneros e espécies continua problemática devido, principalmente, à falta de informações sobre características morfo-anatômicas. Considerando-se o perfil químico desta família, existem muitas espécies sem qualquer estudo, o que não permite os taxonomistas de realizar as divisões na família e subfamília (BOLZANI *et al.*, 2001).

A avaliação dos dados químicos, aliados aos parâmetros citados por Robbrecht, permite uma boa correlação entre as vias biossintéticas e os aspectos morfológicos das subfamílias Ixoroideae, Cinchonoideae e Rubioideae. Cada uma destas subfamílias apresenta um perfil diferente e típico para iridóides, alcalóides indólicos e antraquinonas, que são considerados marcadores quimiotaxonômicos de Rubiaceae. Na subfamília Ixoroideae, os iridóides são encontrados como marcadores quimiotaxonômicos exclusivos, enquanto em Cinchonoideae os alcalóides indólicos predominam e, em Rubioideae, as antraquinomas estão presentes como a principal classe de metabólitos secundários. Já na subfamília Antirrhoideae não há a ocorrência de nenhum destes marcadores químicos, o que é consistente com a divisão proposta por Robbrecht, considerando somente as informações morfológicas (BOLZANI *et al.*, 2001). Num estudo quimiotaxonômico, foi realizado uma triagem para iridóides glicosídicos em várias espécies e baseado em dados obtidos por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas pode-se concluir que estes metabólitos estão presentes em todas as subfamílias de Rubiaceae (HIROYUKI *et al.*, 1988). Os gêneros *Rubia*, *Galium* e *Morinda* são importantes fontes de antraquinonas pertencentes à família Rubiaceae. As antraquinonas estão presentes freqüentemente na forma de aglicona, mas podem apresentar-se na forma de glicosídeos mais raramente (WIJNSMA & VERPOORTE, 1986).

## 1.2-Estudos químicos na família Rubiaceae

Nos constituintes químicos, a família Rubiaceae apresenta grande diversidade de metabólitos secundários como iridóides, alcalóides indólicos, antraquinonas, flavonóides e outros derivados fenólicos e terpenóides (triterpenos, diterpenos), figura 1.

Os alcalóides indólicos, que junto com as antraquinonas e iridóides são considerados marcadores quimiotaxonômicos da família, pertencem ao grupo de metabólitos secundários mais estudado, na tentativa de comprovar a correlação filogenética entre a química e a taxonomia de Rubiaceae. Os alcalóides indólicos são, quase sempre, produtos de condensação da triptamina (derivado do triptofano) com o seco-iridóide secologanina. Evidências baseadas no esqueleto dos alcalóides indólicos servem como base para tendências químicas e morfológicas da ligação evolucionária entre Rubiaceae, Apocynaceae e Loganiaceae (BOLZANI *et al.*, 2001).

Na família Rubiaceae são encontrados os alcalóides quinolínicos, que são produto do rearranjo dos alcalóides indólicos monoterpênicos e os alcalóides isoquinolínicos, cujo esqueleto é formado pela condensação da tiramina e secologanina, originando os alcalóides do tipo emetina (SIMÕES *et al.*, 1999).

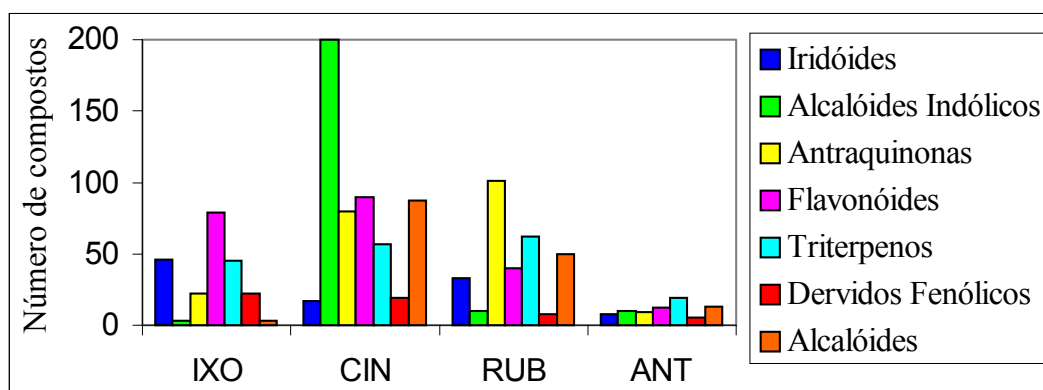


Figura 1: Diversidade química e distribuição dos principais constituintes nas quatro subfamílias: Ixoroideae (IXO), Cinchonoideae (CIN), Rubioideae (RUB) e Antirheoideae (ANT) pertencentes à família Rubiaceae (BOLZANI *et al.*, 2001).

### 1.3-Estudos farmacológicos na família Rubiaceae

Os produtos naturais são uma fonte potencial de novos fármacos. Ao longo da evolução a seleção natural e a competição entre as espécies tem produzido poderosos princípios ativos. A maioria das espécies brasileiras ainda não foi estudada, representando um potencial econômico a ser explorado, a fim de identificar novos componentes, especialmente os agentes bioativos. Produtos naturais em geral, e as plantas medicinais em particular, são importantes fontes de novas substâncias químicas com potenciais aplicabilidades no tratamento de várias enfermidades. Sabendo-se que o Reino Vegetal é rico em plantas com atividades farmacológicas, o estudo de suas propriedades é uma estratégia útil na busca de protótipos para novos fármacos.

Os alcalóides são substâncias muito ativas conhecidas desde a antiguidade. A família Rubiaceae é conhecida produtora deste tipo de metabólito secundário e suas propriedades analgésicas e antiinflamatórias já foram estudadas em algumas espécies. Diversas plantas, pertencentes ao gênero *Psychotria*, são usadas na medicina popular pelas suas ações analgésicas baseadas nas propriedades que os alcalóides presentes possuem. A *Psychotria colorata* (Willd.) contém alcalóides nas folhas e frutos que apresentam atividade analgésica ligada a mecanismos central e periférico no alívio da dor (ELISABETSKY *et al.*, 1995).

Da *Mitragyna speciosa* Korth., uma árvore oriunda da Tailândia, foi isolado um alcalóide majoritário (66%) denominado mitraginina (SHELLARD, 1983). Este alcalóide possui atividade anti-noceptiva e antitussígena, mediada por mecanismos centrais possivelmente ligados à ativação de receptores opióides (MATSUMOTO *et al.*, 1996). O mesmo alcalóide foi encontrado em outra espécie do gênero *Mitragyna*, a *Mitragyna ciliata* Acibrev. & Pellegt. e mostrou possuir atividade analgésica e antiinflamatória que suporta seu uso etnofarmacológico no tratamento de doenças

infeciosas, bronco-pulmonares e reumatismo pela população da África, local onde a planta é freqüentemente encontrada (DONGMO *et al.*, 2003). Uma avaliação farmacológica do extrato alcaloídico de *Mitragyna inermis* (Willd.) O. Kuntze, usada no tratamento de doenças hepáticas, demonstrou que o mesmo provoca aumento na excreção de bile em ratos. O efeito é atribuído aos alcalóides presentes na planta, principalmente a espiciofilina (constituente majoritário) como responsável pela ação. No mesmo estudo, a fração rica em alcalóides não apresentou efeitos hepatotóxicos. Estes dados indicam que há atividade junto às células hepáticas sem a ocorrência de necrose dos hepatócitos (TOURC *et al.*, 1996).

A *Cephaelis ipecacuanha* (Rich.) conhecida como “ipeca” e “ipecacuanha”, dentre outras denominações populares, é endêmica na floresta tropical (MORS *et al.*, 2000). Esta espécie é produtora de alcalóides como a emetina, muito utilizados como emético, expectorante e também no tratamento da amebíase (TOKARNIA *et al.*, 2000). A emetina e seus análogos ocorrem somente em três famílias vegetais, incluindo Rubiaceae (WOLFGANG *et al.*, 1984).

O “iombe” é uma planta comum nas florestas da República de Camarões, Gabão e Congo. Esta espécie denominada *Pausinystalia yohimbe* (K. Schum.) apresenta principalmente alcalóides indólicos, sendo a ioimbina, componente majoritário, extraída das cascas do caule. O efeito hipotensor por vasodilatação das regiões vasculares periféricas e ação sobre a musculatura lisa que determina um aumento no tônus do intestino são mediadas pela inibição seletiva dos receptores  $\alpha$ -2-adrenérgicos (SIMÕES *et al.*, 1999).

O “café” é uma pequena árvore nativa das zonas montanhosas do sudeste da Etiópia e sul do Sudão. Inicialmente cultivado pelos árabes, o emprego da *Coffea arabica* L. disseminou-se rapidamente pelo mundo até alcançar o Brasil, que

chegou a ser o primeiro produtor mundial. Esta espécie de Rubiaceae tem grande importância pela manufatura de uma bebida estimulante e alimentícia e para a extração de cafeína. A cafeína entra na composição de diversos analgésicos, antipiréticos e antigripais, associada com ácido acetilsalicílico, paracetamol e a codeína no alívio ou abortamento de crises de enxaqueca. Além disso, a cafeína isoladamente tem sido utilizada como sonolítico, tônica e revigorante (SIMÕES *et al.*, 1999).

O uso de espécies de Rubiaceae para o tratamento do reumatismo é muito comum. Um exemplo é a *Paederia foetida* L. (“prasarini”) que é utilizada no tratamento desta doença por possuir propriedades analgésicas e antiinflamatórias contra a artrite. O extrato das folhas de *P. foetida* mostrou diminuir a formação de granulomas, mediante modulação dos mediadores flogísticos da inflamação aguda e crônica. A natureza das substâncias responsáveis por esta atividade ainda são desconhecidas e encorajam novos estudos (SUBRATA, RAVISHANKAR & BHAVSAR, 1994).

A *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Sch. é amplamente distribuída nas florestas tropicais e é conhecida popularmente como “amora-do-mato”, dentre outras denominações (MORS *et al.*, 2000). Esta planta é rica em metabólitos 4-aril-cumarinas (MONACHE *et al.*, 1983) e fenilcumarinas que apresentam comprovada ação relaxante muscular, avaliada em traquéia de “porquinhos-da-índia” sem apresentar efeitos tóxicos quando administrada por via oral em camundongos (ARAÚJO, THOMAS & PAULO, 1988).

Outra espécie freqüentemente encontrada no território brasileiro é a *Borreria verticillata* (L.) Meyer, conhecida como “cordão-de-frade” e que possui propriedades eméticas e antidiarréicas (MORS *et al.*, 2000). A presença de iridóides isolados por Sainty e colaboradores, em 1981 e alcalóides indólicos isolados das partes



aéreas da planta que exibem atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas e negativas (BALDE *et al.*, 1989).

Uma Rubiaceae muito conhecida é o “genipapo”, *Genipa americana*, que além do seu uso alimentício possui muitas atividades biológicas. As raízes possuem ação purgativa e o decocto das folhas e cascas é utilizado como catártico e anti-diarreico. Seu uso também é conhecido junto a tribos indígenas para a pigmentação da pele nos rituais religiosos e bélicos. Este uso provém da propriedade do suco dos frutos escurecer quando exposto à luz ultra-violeta. A genipicina, um iridóide extraído dos frutos de “genipapo” foi isolado por Djerassi, Gray & Kincl em 1960. A atividade destas substâncias foi avaliada contra cepas bacterianas onde foi observado efeito inibitório do crescimento de microorganismos Gram positivos e negativos *in vitro* (TALLENT, 1964).

A *Calycophyllum spruceanum* DC., uma árvore que habita a região Amazônica é usada para o tratamento de numerosas enfermidades, incluindo micoses, infecções de pele e estômago e conhecida popularmente por “mulateiro”. Seu uso foi avaliado frente a formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Os seco-iridóides isolados das cascas desta planta apresentam fraca atividade antitripanossomal, mas contribui com os esforços no combate desta doença que afeta cerca de 18 milhões de pessoas na América Latina (ZULITA *et al.*, 2003).

Outra espécie de Rubiaceae que tem sido testada no tratamento de enfermidades tropicais, como a malária, é a *Gardenia saxatilis* Geddes. O uso dos seus brotos como analgésico é bastante difundido na medicina popular. Recentemente, os triterpenos isolados destes brotos mostraram ter atividade contra o *Plasmodium falciparum*, responsável pela etiologia da malária (SUKSAMRARN *et al.*, 2003).

#### 1.4-Estudos toxicológicos na família Rubiaceae

Apesar de Rubiaceae não ser uma família notadamente tóxica, algumas espécies apresentam toxidez cientificamente reconhecida como, por exemplo, espécies dos gêneros *Palicourea*, *Pachystigma*, *Pavetta* e *Fadogia*. Algumas espécies desses gêneros causam lesões cardíacas graves em bovinos após a ingestão das folhas. Na África, onde ocorrem as espécies tóxicas *Pachystigma pygmaeum*, *Pachystigma thamnus*, *Pavetta barborii*, *Pavetta schumaniana* e *Fagodia monticola*, este tipo de intoxicação é chamado de “*gousiekte*” (doença rápida). Porém, até o momento, não foi determinado o princípio ativo responsável pela toxicidade destas plantas (OLIVEIRA, AKISUE & AKISUE, 1996).

No Brasil, a *Palicourea marcgravii* St. Hil., conhecida como “erva-de-rato”, é uma das plantas tóxicas mais importante do Brasil, devido à sua extensa distribuição, boa palatabilidade, alta toxidez e efeito cumulativo. Ela é responsável por 80% de todas as mortes em bovinos causadas por plantas tóxicas (TOKARNIA *et al.*, 2000).

Na toxicologia do gênero *Palicourea*, os frutos são considerados mais tóxicos que as folhas e flores. Em relação ao princípio tóxico, a presença do ácido monofluoroacético foi caracterizada na fração hidrossolúvel das folhas de *Palicourea marcgravii* por Oliveira em 1963. O ácido monofluoroacético é o princípio ativo responsável pelos sinais e sintomas da intoxicação aguda (DE-MORAES-MOREAU *et al.*, 1995).

O ácido monofluoroacético age interferindo no metabolismo energético celular, mais precisamente no ciclo de Krebs. Quando ingerida, a substância é convertida em fluorocitrato que, por sua vez, inibe a aconitase, enzima responsável pelo desdobramento do citrato resultando na interrupção do ciclo de Krebs. Somam-se, ainda, os efeitos irritantes sobre as mucosas e a diminuição dos íons cálcio no sangue e nos tecidos por

ação dos radicais fluorados (TOKARNIA *et al.*, 2000). Dois alcalóides isolados das folhas de *Palicourea marcgravii* parecem ter influência sobre os efeitos tóxicos: a N-metiltiramina e 2-metiltetraidro- $\beta$ -carbolina (2-Me THBC). Quando administrados por via oral, ambos são inibidores da monoamina-oxidase (MAO), agindo como substratos competitivos pela enzima; assim, a degradação das catecolaminas (adrenalina) fica diminuída. Isto leva a uma forte estimulação adrenérgica dos receptores  $\alpha$  e  $\beta$ , promovendo drástico aumento no ritmo cardíaco, aumento da pressão sanguínea e da demanda energética que se encontra inibida pela ação dos fluoracetatos, além de sua distribuição mais rápida pelos tecidos. A existência destes dois alcalóides pode explicar as diferenças no período de latência observada entre eqüinos, que apresentam mortes entre 10 a 43 horas após a ingestão, enquanto os ruminantes apresentam quadros de “morte súbita”. O trato digestivo dos ruminantes mostra uma melhor absorção dos alimentos, além do fato dos alcalóides encontrarem-se desprotonados e mais apolares no rúmen, resultando em alta reabsorção destas duas substâncias pelo trato gastrointestinal. O pH extremamente ácido do estômago dos cavalos é responsável pela protonação destes alcalóides, que são absorvidos em menor grau (KEMMERLING, 1996).

A dose letal aproximada (DLA) do extrato bruto das folhas de *Palicourea marcgravii* para bovinos, caprinos e coelhos foi calculada entre 650 a 750 mg/kg peso corporal por via oral. Os eqüinos têm resistência bem maior e para eles a dose letal chega a ser cinco vezes superior (TOKARNIA *et al.*, 2000).

Estudos clínicos realizados com intoxicação experimental em animais demonstraram que o sistema nervoso é o principal alvo afetado pela *Palicourea marcgravii*. Os monofluoracetatos são venenos, que não só bloqueiam o ciclo dos ácidos tricarbóxicos mas também a síntese de glutamato, que está

profundamente envolvido no controle da atividade normal do cérebro e sua depleção produz convulsões (GÓRNIAK *et al.*, 1989).

Outra espécie da família *Rubiaceae* envolvida em casos de intoxicação é a *Cephaelis ipecacuanha* Rich. Apesar de ser muito usada pelas propriedades eméticas e anti-helmínticas que possui, é também capaz de produzir irritação cutânea e nas mucosas. O contato da planta com a pele determina lesões irritativas com eritema, bolhas e vesículas; contato com os olhos ou exposição em ambientes contaminados pode ocasionar conjuntivites intensas ou um quadro asmático com dispnéia, sibilos e cianose. A ingestão de doses excessivas de emetina provoca, inicialmente, irritação da mucosa digestiva, náuseas, vômitos, cólicas abdominais, diarreia e, posteriormente, depressão do sistema nervoso central, hipotensão, choque e óbito (TOKARNIA *et al.*, 2000).

Uma *Rubiaceae* que tem despertado interesse por suas propriedades alucinógenas é a *Psychotria viridis* (Ruiz et Pavon), figura 2, planta há muito utilizada em associação com partes de *Banisteriopsis caapi* (Spruce) Morton (*Malpighiaceae*) para o preparo de uma bebida psicoativa potente, utilizada em rituais espirituais e medicinais, conhecida como “ayahuasca”. A mistura é utilizada em várias regiões da floresta Amazônica, mas principalmente por tribos do Peru e Bolívia, onde a beberagem é conhecida como “jono pase”, “daime”, “caapi”, “esperança-da-morte” (que na linguagem inca significa “aya” = morte; “huasca” = esperança) e “vinho-das-almas” (McKENNA *et al.*, 1984; DESMARCHELIER *et al.*, 1996). No Brasil, estas duas plantas fazem parte do ritual realizado pela comunidade do Santo Daime no norte do país (CALLAWAY *et al.*, 1996; GROB *et al.*, 1996).



Figura 2: *Psychotria viridis* (Ruiz et Pavon) - (Disponível em <http://www.google.com.br>. Acesso em: 20 jan. 2004).

O efeito alucinógeno da bebida é devido à presença do alcalóide N,N-dimetiltriptamina (DMT), encontrado nas folhas da *Psychotria viridis* e que tem atividade agonista de receptores 5-HT<sub>2A</sub> (serotonina), aliado à atividade neurotóxica e inibidora da monoamino-oxidase tipo A (MAO-A), causada por alcalóides β-carboxilados, como a harmina, a harmilina e a tetraidroharmina (THH) presentes nas folhas e cascas de *Banisteriopsis caapi* (DEULOFEU, 1967).

Estudos analíticos dos constituintes de *Banisteriopsis caapi* e *Psychotria viridis* permitiram concluir como sendo a harmina o constituinte alcaloídico majoritário (22-62%) seguido pela DMT (CALLAWAY *et al.*, 1999).

A maioria dos pesquisadores acredita que as propriedades únicas da “ayahuasca” vêm da combinação da harmina e da DMT. Foi sugerido que, em virtude da inibição da MAO pelo alcalóide harmina, as enzimas responsáveis pela biotransformação da DMT deixariam de atuar e a biodisponibilidade oral da DMT ficaria aumentada. A DMT não é bem absorvida por via oral e este mecanismo poderia explicar a longa duração dos efeitos alucinógenos da bebida, uma vez que a metabolização via enzimas da MAO encontra-se inibida (FREEDLAND & MANSBACH, 1999).

## 2. O Gênero *Chiococca*

O gênero *Chiococca* inclui 22 espécies distribuídas na América e encontra-se praticamente inexplorado sob o ponto de vista químico, farmacológico e toxicológico. As poucas publicações existentes sobre este gênero concentram-se exclusivamente na espécie *Chiococca alba* (figura 3).

## 3. A Espécie *Chiococca alba* (L.) Hitchc.



Figura 3: *Chiococca alba* (L.) Hitchc. (Disponível em <http://www.google.com.br>. Acesso em: 20 jan. 2004).

**3.1- Botânica e Sistemática** (CORREA, 1931; CRUZ, 1932; COSTA, 1932 & GUSMÃO, 1992).

### 3.1.1- Etimologia

*Chiococca*: nome deriva do latim (*Yiwv* = neve e *xoxos* = baga)

*alba*: branca, alva.

### **3.1.2- Sinonímia**

#### **3.1.2.1- Sinonímias científicas**

*Chiococca brachiata* R. P., *Chiococca anguifuga* Mart., *Chiococca racemosa* H.B.K.,  
*Chiococca paniculata* Willd.

#### **3.1.2.2- Sinonímias populares no Brasil**

“cainca”, “casinga”, “cruzeirinha”, “dambê”, “purga-preta”, “quina-de-raiz-preta”,  
“cipó-cruz”, “caninana”, “raiz-preta”, “fedorenta”, “raiz-de-frade”, “quina-preta”,  
“raiz-de-serpentária”.

### **3.1.3- Descrição macroscópica (GUSMÃO *et al.*, 1992)**

#### **3.1.3.1- Hábito**

Arbusto, tipo trepadeira, que pode atingir de 2 a 3 metros de altura. Apresenta muitos ramos finos, nodosos em cruz.

#### **3.1.3.2- Caule**

O caule de apresenta formato cilíndrico, diâmetro fino com sulcos longitudinais.

#### **3.1.3.3- Folhas**

As folhas, muito numerosas, são opostas, curtamente pecioladas. Limbo coriáceo, inteiro, elíptico com base obtusa e ápice mucronado.

#### **3.1.3.4- Inflorescências**

As flores são tetrâmeras, de cor branco-amarelada levemente púrpuras na face externa do tubo e dispostas em panículas axilares. A corola é hipocrateriforme, prefloração imbricada, glabra com lacínios de bordos revirados e esverdeados. Os estames isômeros são livres. Os filetes levemente concrecidos entre si e a base da

corola, apresenta pêlos na região mediana; anteras lineares e ovário ínfero, com 2 lóculos monospermos.

#### **3.1.3.5- Raiz**

A raiz da “cainca”, parte mais utilizada da planta, apresenta-se em pedaços de dimensões muito irregulares, sua grossura varia de 5 a 70mm e seu comprimento pode atingir de 30 a 40 cm. Estes pedaços, geralmente tortuosos, são recobertos por uma casca parda, quase preta, com numerosas estrias transversais, muito largas e, às vezes, um tanto regularmente esparçadas.

#### **3.1.4- Sistemática botânica**

A tribo Chiococceae compreende 8 gêneros e pertence à subfamília Antirheoideae. A *Chiococca alba* é apresentada com as seguintes variedades: *acuminata*, *acutifolia*, *biformis*, *conjungens*, *diplomorpha*, *genuina*, *grandifolia*, *intercedens*, *intermedia*, *lanceolata*, *microphylla*, *petiolaris*, *rigidula*, *subrhombea*, *tenuifolia* e *valida*.

#### **3.1.5- Distribuição**

A *Chiococca alba* é distribuída nas partes central e sul do Brasil, além de Peru, Guiana Francesa, América Central e Flórida (EUA).

### **3.2- Estudos químicos na espécie *Chiococca alba* (L.) Hitchc.**

A primeira descrição de *C. alba*, em 1777, foi realizada pelo botânico peruano José Pavon e seu colaborador, o naturalista Hipolito Ruiz. A primeira análise química da raiz de “cainca” que se tem registro foi realizada por François Pelletier e Caventou em meados de 1850 e dela retiraram várias substâncias. Dentre elas, substâncias graxas



de cor verde, uma matéria corante amarela, uma substância colorida e viscosa e, finalmente, uma substância a qual denominaram de ácido cainico. Posteriormente, esta substância foi denominada de caincina por Rockleder e Hlasiwetz, que verificaram ser um glicosídeo de cor branca, muito amargo, acre, inodoro, muito pouco solúvel em água e no éter e bastante solúvel no álcool, em diversas concentrações. De acordo com os autores a caincina desdobra-se ou transforma-se em ácido quinóvico, ácido chiococcico, caincegenina e caincetina (CRUZ, 1932). Estas substâncias não tiveram suas estruturas caracterizadas, permanecendo assim dúvidas sobre suas naturezas químicas. Apesar da caincina ter sido descrita por Pio Correa em 1931, como princípio ativo da planta, trabalhos mais recentes não fazem qualquer referência confirmando esta observação nem o isolamento das substâncias acima citadas.

Houve algumas dúvidas sobre a presença de alcalóides nas raízes de *C. alba*, apesar do fato da família Rubiaceae ser conhecida produtora desta classe de metabólitos. Alguns autores chegaram a citar a presença de emetina (CRUZ, 1932), que foi posteriormente descartada, como também a existência de qualquer outro alcalóide baseando-se apenas em ensaios preliminares (COIMBRA, 1958). Com o advento de técnicas mais sensíveis e precisas no estudo da fitoquímica, foram isolados dois alcalóides quinolínicos das raízes de *C. alba* (figura 4) denominados de 4-(4'-metóxfenil)-6,8-dimetóxi-2-quinolina e 4-(4'-metóxfenil)-6,8-dimetóxi-5-hidróxiquinolina (EL-ABBADI *et al.*, 1989).

Estes alcalóides quinolínicos foram, posteriormente, sintetizados a partir do modelo encontrado na natureza (KITAHARA, SHIMIZU & KUBO, 1990).

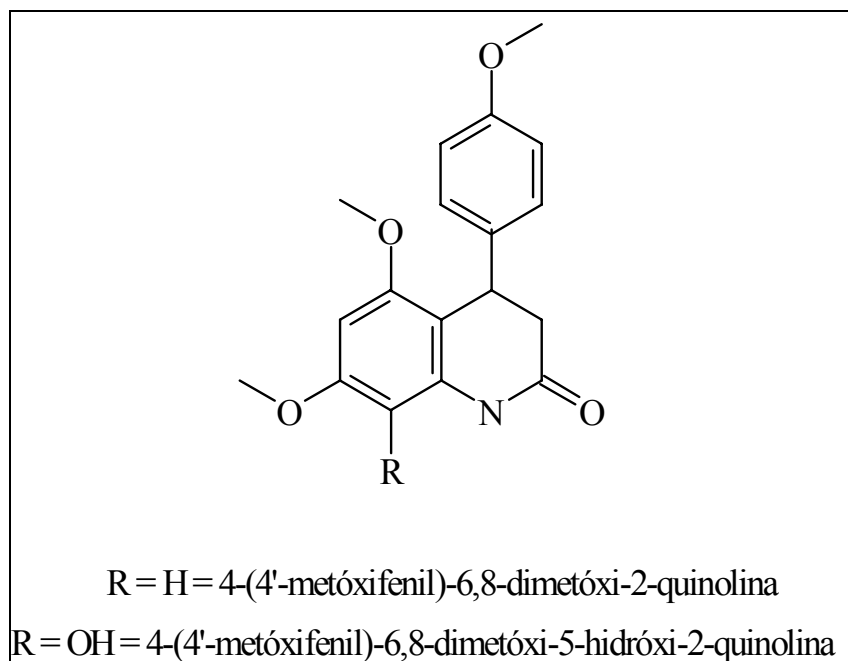


Figura 4: Alcalóides isolados das raízes de *C. alba*.

Resultados positivos foram obtidos nos testes para glicosídeos cardiotônicos, saponinas, flavonóides e taninos nas raízes da planta e negativos para antraquinonas (SCHAPOVAL *et al.*, 1983). Estes estudos compreendem testes preliminares, havendo a necessidade de uma melhor identificação e caracterização destes metabólitos.

O exame das folhas de *C. alba* apontou para a ausência de alcalóides, e para a presença de cumarinas e lignanas (EL-HAFIZ *et al.*, 1991). Estes autores descreveram o isolamento e elucidação estrutural de duas novas hidroxicetonas isoladas das raízes de *C. alba*, a 4-hidroxiptadecan-7-ona e 5-hidroxiotadecan-11-ona (figura 5). Estas hidroxicetonas foram posteriormente sintetizadas a partir de nitroalcanos (BALLINI, BOSICA & RAFAIANI, 1995).

Foram encontradas substâncias já conhecidas, como a 5,7,4'-trimetóxi-4-fenilcumarina, exostimina, matairesinol e D-manitol que, até então, não haviam sido isoladas no gênero *Chiococca* (EL-HAFIZ *et al.*, 1991).

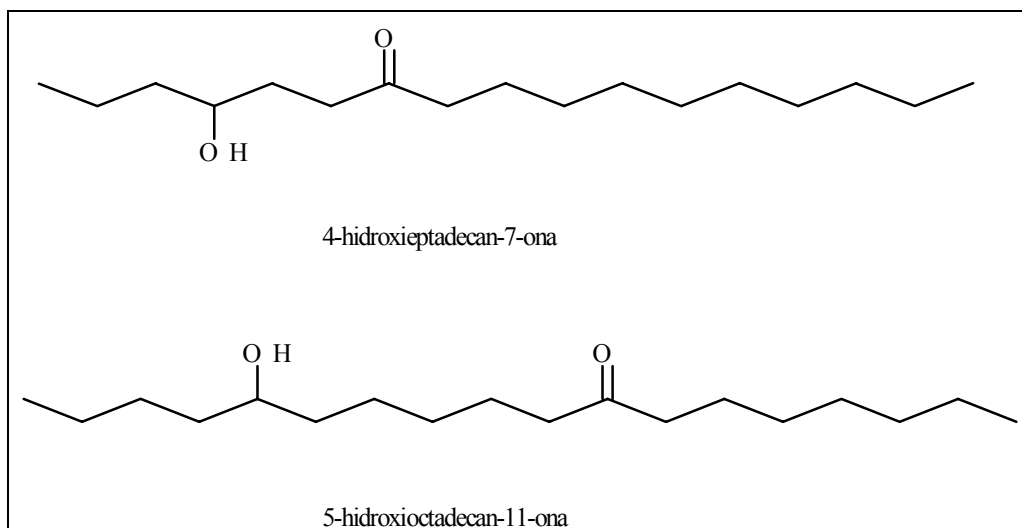


Figura 5: Hidroxicetonas de *C. alba*.

Um novo triterpeno, com esqueleto tipo oleanólico, foi isolado do extrato etanólico das raízes de *C. alba*, denominado como ácido 3 $\beta$ -hidróiolean-12, 15-dien-28-óico.

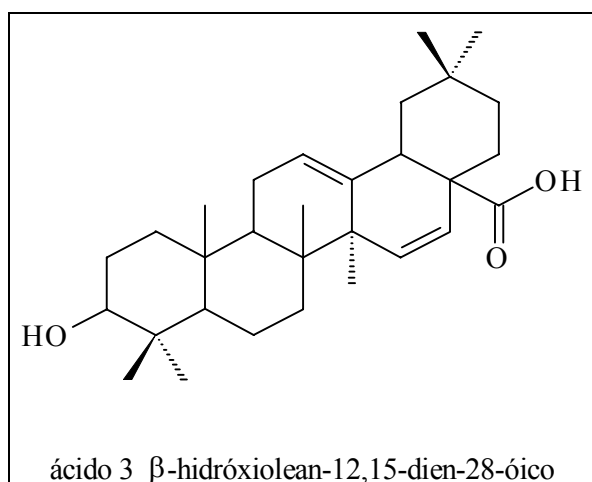


Figura 6: Triterpeno isolado das raízes de *C. alba*.

Borges-Argaéz e colaboradores, em 1996, isolaram um metabólito ao qual denominaram *ent*-17-hidróxi-16 $\alpha$ -kaurano-3-ona do extrato metanólico das raízes de *C. alba*. A elucidação da estrutura desta substância foi baseada em métodos espectroscópicos e de transformação química.

Dando continuidade ao estudo dos constituintes químicos desta planta, uma investigação fitoquímica das raízes permitiu o isolamento de três iridóides chamados de albosídeos (I, II, III) e um seco-iridóide inédito, o albosídeo IV, possuidor de atividade biológica (CARBONEZI *et al.*, 1999), figura 7.

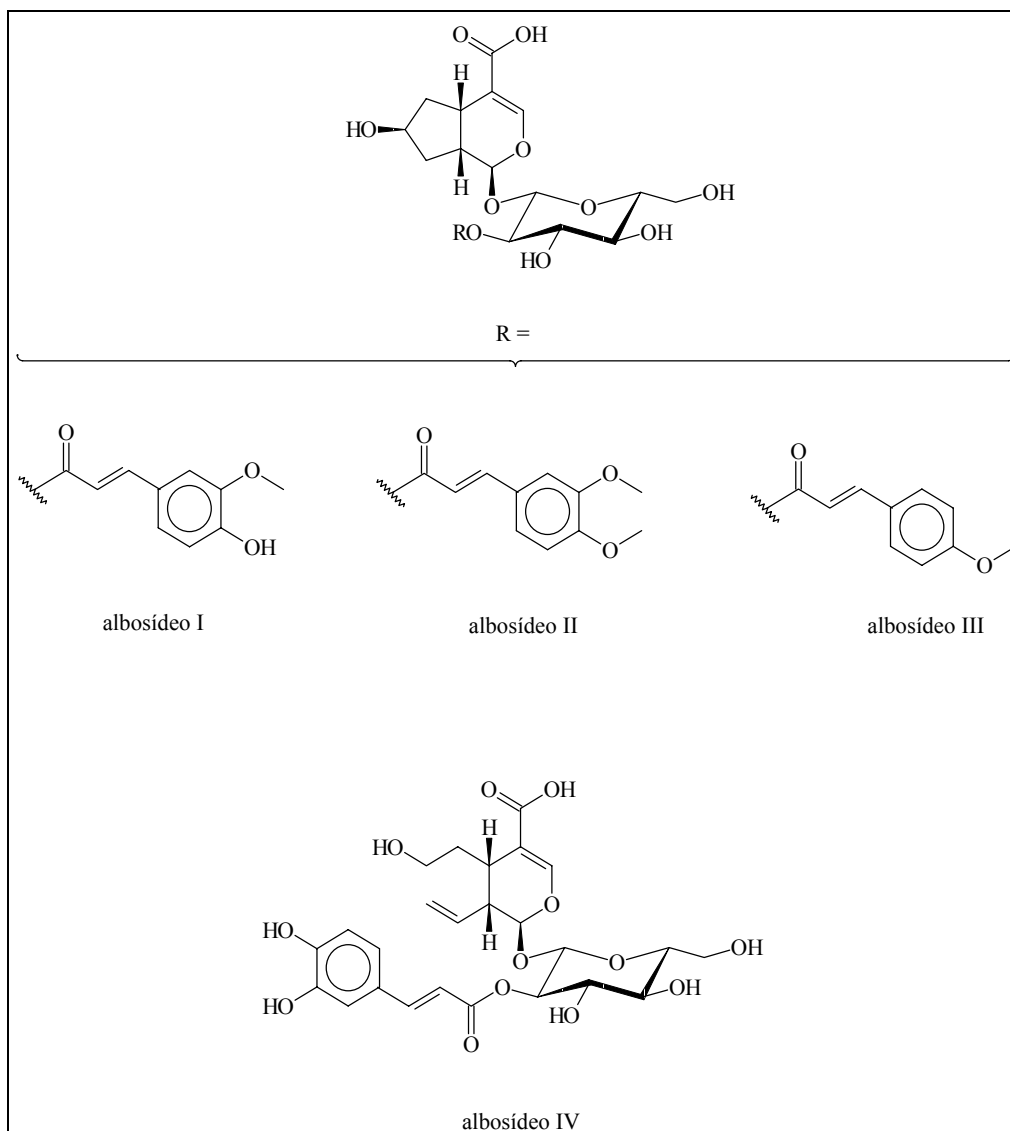


Figura 7: Iridóides e seco-iridóide das raízes de *C. alba*.

Um metabólito, de 19 átomos de carbonos, foi isolado do extrato metanólico das raízes de *C. alba* e foi caracterizado como um novo nor-seco-pimarano denominado merilactona (figura 8). A estrutura e estereoquímica foi estabelecida pela interpretação dos dados espectrais obtidos (BORGES-ARGAÉZ *et al.*, 2001).

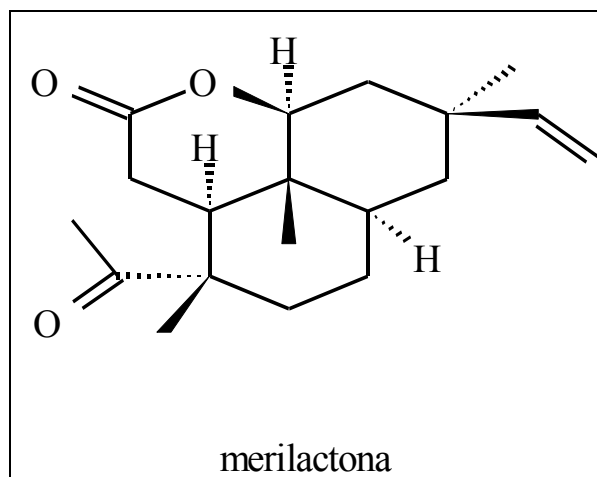


Figura 8: Nor-seco-pimarano isolado das raízes de *C. alba*.

### 3.3- Estudos farmacológicos na espécie *Chiococca alba*

As raízes da “cainca” destinam-se a vários fins terapêuticos, sendo que a maioria deles vêm do uso popular e tradicional que é passado através das gerações. É administrada sob diversas formas como extrato alcóolico, macerado, pó, tintura e xarope. O seu emprego na medicina popular e científica no Brasil e na Europa foi muito difundido no passado. A raiz de “cainca” foi incluída em várias Farmacopéias nos séculos XIX e XX dentre elas a Francesa de 1837 e 1866, a Portuguesa de 1836 e 1876, a Grega de 1837, a Belga de 1854 e 1873, a Espanhola de 1865 e 1884, a Austríaca de 1855, a Mexicana de 1904 e a Brasileira de 1962 (SCHAPOVAL *et al.*, 1983) mostrando sua importância na época.

Esta raiz gozou, antigamente, de grande reputação no combate aos efeitos das picadas de cobras, principalmente da caninana, de onde derivam alguns de seus nomes populares. Foi ainda esta propriedade que lhe rendeu uma de suas sinônimas científicas, *C. anguifuga*, cujo significado é “que afugenta cobras”. Os curandeiros empregavam a raiz por via oral com água ou aguardente, que imediatamente produzia vômitos e

evacuações abundantes. Concomitantemente, aplicavam sobre o local da picada um cataplasma feito com a raiz moída com aguardente (CRUZ, 1932).

Ainda são citadas propriedades emenagogas, hidragogas, anti-asmáticas e anti-reumática, atividade pela qual a planta é comercializada por uma indústria de fitoterápicos até hoje. De acordo com Corrêa (1931), é também benéfica contra hidropsia, que corresponde a uma afecção edematosa cerebral, atribuída à sua atividade diurética e no combate de febres. Seu uso destina-se ainda contra obstruções nas vísceras abdominais, perturbações do sistema linfático, doenças hepáticas e cardíacas. É recomendado o cozimento da raiz no combate a tosses, rouquidão e bronquite, contra angina, laringite e doenças do aparelho urinário (CRUZ, 1932). Nenhuma das atividades supracitadas foi comprovada e ainda aguardam testes científicos para credenciar sua eficácia. Poucos trabalhos científicos avaliaram as ações farmacológicas de *C. alba*.

A ação antiinflamatória de *C. alba* foi avaliada através do teste de edema de pata induzido pela administração de carragenina, em ratos, utilizando extrato etanólico e partições deste com solventes de diferentes polaridades: éter de petróleo, acetato de etila, butanol, éter etílico e água. Os resultados demonstraram que o extrato etanólico total e as frações etérea e aquosa apresentaram atividade antiinflamatória. Esta ação foi atribuída à presença de salicilato de metila que, apesar de não ter sido isolado, foi identificado por cromatografia em camada delgada após comparação com amostra padrão (SCHAPOVAL *et al.*, 1983).

Em estudo realizado por Borges-Argáez e colaboradores em 1997, o extrato metanólico das raízes de *C. alba* foi avaliado quanto à atividade antimicrobiana. Quando testado contra cepas de *Staphylococcus aureus*, o extrato bruto total provocou pouca inibição no crescimento bacteriano. Nas mesmas condições, o metabólito *ent*-kaurano isolado deste extrato provocou uma zona maior de inibição do crescimento

bacteriano, do que a obtida quando foi testado o extrato total. Mesmo assim, o *ent*-kaurano mostrou fraca atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e não foi eficaz contra cepas de *Bacillus subtilis*, *Cândida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Em outro trabalho, o processo de partição de um extrato obtido com clorofórmio/metanol e solubilizado em metanol/água (80%) das raízes de *C. alba* foi monitorado com dois ensaios biológicos. Um dos ensaios era de natureza geral e utilizou cistos de *Artemia salina* Leach enquanto que o outro ensaio, mais específico, usou cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. A fração clorofórmica apresentou atividade seletiva entre os mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* RS321N e RS188N, enquanto a fase hidroalcolica mostrou citotoxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, com a concentração letal mediana (LC<sub>50</sub>) de 91,1µg/ml indicando citotoxicidade e potencial antitumoral (CARBONEZI *et al.*, 1999).

Os extratos aquosos e etanólicos de partes aéreas e raízes de *C. alba* foram avaliados quanto a ações sobre o sistema nervoso central, utilizando o modelo de campo aberto (arena), testes de condicionamento por recompensa (labirinto) e de condicionamento por punição (caixa de Skinner). Os extratos administrados a ratos Wistar por via intraperitoneal causaram sonolência, depressão e apatia dependentes da dose nos ensaios comportamentais realizados em doses próximas a 40 mg/kg peso corporal. Uma vez passada a depressão, os animais tratados com os extratos de *C. alba* se recuperaram sem sequelas aparentes. Na dose de 30 mg/kg por via intraperitoneal, o extrato não apresentou ação anticonvulsivante mas foi capaz de encurtar significativamente o tempo de sono e paralisia induzidos por pentobarbital e zoxazolamina respectivamente em ratos (FELIX *et al.*, 1999).

### **3.4- Estudos toxicológicos na espécie *Chiococca alba***

Hoehne, em 1939, publicou um trabalho que verificou que a “cainca” atua sobre a mucosa intestinal causando irritação e conduzindo até a morte, mas nada mencionou sobre a natureza da substância que assim age. Com o objetivo de verificar esta informação, considerando a necessidade de caracterizar melhor a toxicidade relatada, foram conduzidos testes para a avaliação da toxicidade aguda. A dose letal mediana (DL<sub>50</sub>) para o extrato alcoólico foi de 134,28 mg/kg por via intraperitoneal, utilizando camundongos Swiss Albinos de ambos os sexos (SCHAPOVAL *et al.*, 1983). No mesmo trabalho, o autor atribui a toxicidade à possível presença de glicosídeos cardiotônicos. Até o momento, a presença de glicosídeos cardiotônicos não foi bem caracterizada. Os mesmos autores sugeriram a necessidade de ensaios para uma caracterização mais efetiva da toxicidade da planta, tendo em vista a utilização popular ou mesmo em escala industrial das raízes de “cainca”. Este é o único trabalho, divulgado apenas em congresso, que se tem conhecimento sobre a avaliação da toxicidade aguda das raízes de *C. alba*.

Em 1989, El-Abadi *et al.*, citaram resultados preliminares não divulgados de toxicidade de uma fração rica em alcalóides sobre camarões, encorajando novos estudos toxicológicos com a espécie em questão.

### **4. Estudo da toxicidade**

A avaliação das possíveis propriedades tóxicas, de quaisquer substâncias as quais o homem está exposto é de suma importância. No caso de substâncias de origem natural nota-se que o consumo de fitoterápicos vem sendo impulsionado através da confiabilidade e inocuidade que o termo "natural" exerce sobre as pessoas em geral.



Embora propalados como naturais e, portanto, associados à ausência de efeitos adversos, os fitoterápicos podem apresentar sérios efeitos tóxicos. A toxicidade de uma planta, em muitos casos, é devida à própria natureza do vegetal que, ao longo do caminho evolutivo, incorpora ao seu código genético a capacidade de produzir substâncias para vencer os desafios do ambiente e, assim, cumprir sua função de reproduzir-se e manter-se em seu meio. O uso de plantas medicinais está baseado, na maioria das vezes, em conhecimentos empíricos que são passados através das gerações. No entanto, pouco se conhece sobre as possíveis propriedades toxicológicas existentes nos extratos vegetais, onde as relações causa-efeito são geralmente complexas e de difícil reconhecimento na população usuária dos chás, infusões ou tinturas de plantas.

#### **4.1-Toxicidade aguda e subaguda**

Um dos primeiros testes realizados para a avaliação do potencial tóxico de quaisquer substâncias é o teste de toxicidade aguda. A dose letal mediana ( $DL_{50}$ ) e outros efeitos tóxicos podem ser determinados após administração aguda por uma ou mais vias (rota de exposição) em uma ou mais espécies (ratos e camundongos são as mais frequentemente usadas). Os estudos são realizados em animais adultos de ambos os sexos e verifica-se o número de animais que morrem durante o período de observação de 14 dias. A avaliação dos resultados permite conhecer a espécie ou sexo mais sensível. Além de dados de mortalidade e peso corporal, podem ser avaliados outros parâmetros como sinais de intoxicação, letargia, mudanças comportamentais, morbidade e alteração no consumo de alimento. Os testes de toxicidade aguda fornecem: 1) uma estimativa quantitativa de toxicidade aguda em comparação com outras substâncias; 2) a identificação dos órgãos-alvo ou outras manifestações clínicas

agudas; 3) o estabelecimento do caráter reversível das respostas tóxicas; e 4) um guia de doses para outros estudos (KLAASSEN & EATON, 1994).

Os testes de toxicidade subaguda fornecem informações sobre a toxicidade das substâncias químicas após administrações repetidas, além de estabelecer doses para estudos subcrônicos posteriores. Um protocolo típico para estes testes é a administração de três diferentes doses e a avaliação das alterações macroscópicas é realizada após 14 dias de exposição ao xenobiótico (KLAASSEN & EATON, 1994).

#### **4.2- Avaliação da atividade enzimática**

Os homens e os animais estão continuamente expostos em seu meio ambiente a um vasto número de substâncias estranhas ou xenobióticos de origem sintética ou natural. A exposição contínua ou intermitente a estes compostos podem levar a um acúmulo dos mesmos no organismo, a não ser que um mecanismo efetivo de eliminação esteja presente. Os organismos animais desenvolveram processos bioquímicos, denominados de um modo geral de processos de biotransformação, capazes de converter compostos lipofílicos em metabólitos hidrossolúveis através de reações enzimáticas. Assim, a molécula original é modificada no sentido de reduzir sua capacidade de partição nas membranas biológicas, o que restringe sua distribuição pelos tecidos e sua reabsorção renal e intestinal.

Um grande número de enzimas presentes no organismo é capaz de biotransformar xenobióticos. Um dos sistemas enzimáticos que catalisam a biotransformação dos xenobióticos está localizado no fígado e é chamado de complexo citocromo P-450. Estas enzimas são responsáveis pelas reações de biotransformação e estão localizadas ligadas à membrana do retículo endoplasmático, que é composta basicamente por proteínas e lipídeos. A presença destas enzimas junto à matriz lipofílica

dos hepatócitos é essencial, uma vez que os substratos de caráter hidrófobo têm maior afinidade pelos lipídeos.

Muitos estudos evidenciaram a presença de múltiplas formas de enzimas do citocromo P-450, que diferem entre si pela estrutura da cadeia polipeptídica e pela especificidade das reações por elas catalisadas. A classificação do sistema citocromo P-450 baseia-se nas seqüências de ácidos aminados codificadas por genes usando tecnologia de DNA-recombinante. A nomenclatura apresenta as seguintes regras: o símbolo “CYP” (“*Cyp*” para camundongo) denota citocromo P-450, um algarismo arábico denominando a família e uma letra indicando a subfamília. De uma maneira geral, as enzimas com identidade menor que 40% são designadas como pertencentes a diferentes famílias gênicas; graus de homologia entre 40 a 55% são classificadas em subfamílias; e para graus de homologia na seqüência de aminoácidos superiores a 55%, as enzimas são classificadas como pertencentes à mesma subfamília (NELSON *et al.*, 1993). As isoenzimas hepáticas microsossomais do complexo citocromo P-450 envolvidas na metabolização de xenobióticos pertencem a três famílias gênicas principais chamadas de CYP1, CYP2 e CYP3 (PARKINSON, 1998).

Na maioria das vezes, os processos de biotransformação levam à inativação das substâncias ou uma desintoxicação, mas pode ocorrer que os metabólitos produzidos sejam mais tóxicos que os compostos de origem ou que ainda apresentem atividade farmacológica (pró-fármacos). A bioativação pode levar à formação de intermediários mais ativos capazes de causar danos induzindo a morte celular, câncer quimicamente induzido, teratogênese e outros efeitos tóxicos.

No processo de indução enzimática certas substâncias químicas podem interagir com receptores celulares disparando a transcrição de sítios genômicos específicos e tradução dos genes que codificam as enzimas de complexo citocromo P-450. Assim,

proporcionam um aumento no número de enzimas disponíveis para catalisar as reações do complexo citocromo P-450. A indução enzimática pode ser um evento reversível; com a retirada do agente, os níveis enzimáticos ou das enzimas voltam ao seu nível basal (PARKINSON, 1998).

Na inibição enzimática os mecanismos são diferentes, que podem ser: competição pelos sítios ativos ou cofatores; inibição do transporte dos componentes dos sistemas multienzimáticos, diminuição da biossíntese ou destruição das enzimas ou seus cofatores. Mudanças alostéricas na conformação das enzimas ou perda do sítio funcional (necrose hepática) também podem levar a uma diminuição da atividade de enzimas de biotransformação de xenobióticos (PARKINSON, 1998).

A composição das enzimas do complexo citocromo P-450 nos homogenatos de fígados, denominada de fração S9, pode ser alterada em função da espécie, idade, estado de saúde, estresse e exposição dos animais a agentes químicos, dentre outros fatores. Quando o fígado é removido e homogeneizado, o retículo endoplasmático é rompido e as isoenzimas presentes podem ser isoladas por ultra-centrifugação (para remover o núcleo, mitocôndrias e lisossomos, bem como as células intactas e grandes fragmentos de membrana). O sobrenadante obtido é chamado de fração S9 e é rica em enzimas solúveis que podem ser avaliadas quanto à sua capacidade catalítica frente a substratos específicos (PARKINSON, 1998). A quantificação das enzimas do complexo citocromo P-450 é um método útil para a determinação da ocorrência de fenômenos como a indução ou inibição enzimática advindos da ação de xenobióticos, sejam eles sintéticos ou de origem natural.

A etoxirresorufina foi originalmente sintetizada para servir como substrato fluorogênico para o citocromo P-450. O objetivo era que seu metabólito *O*-desetilado, a resorufina, permitisse a medida da atividade enzimática em espectro de ondas longas em

fluorímetro sem a interferência da turbidez da amostra hepática e nem da fluorescência azul do NADPH (BURKE & MAYER, 1974). A etóxirresorufina-*O*-desetilase (EROD) mostrou-se altamente sensível e seletiva para a quantificação da indução por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos das isoenzimas do citocromo P-450 em ratos, mais especificamente sobre a subfamília *Cyp1A1* (BURKE & MAYER, 1975). Com a subsequente síntese e testes de uma série de alcoxirresorufinas homólogas, levou-se a descoberta que a pentóxirresorufina-*O*-despentilase (PROD) era uma medida segura da indução de outra subfamília do P-450, a *Cyp2B1* por fenobarbital (BURKE *et al.*, 1985).

### 4.3- Mutagenicidade

O teste de Ames é bastante difundido e utilizado para avaliar o potencial mutagênico de agentes químicos genotóxicos aos quais o homem está exposto. Este teste detecta se a substância testada e/ou seus metabólitos interagem ou não com o DNA bacteriano, revertendo o efeito de um tipo de mutação, previamente inserida em vários genes que controlam a síntese de histidina (*operon* histidina) de cepas bacterianas de *Salmonella typhimurium*. As mutações inseridas nestas bactérias as impossibilita de crescer por serem incapazes de sintetizar o aminoácido essencial histidina (auxotróficas para histidina ou *his*<sup>-</sup>). Assim, estas cepas mutantes só podem crescer se este aminoácido for adicionado ao meio de cultura. Após a mutação compensatória induzida pelos agentes químicos testados, as cepas recuperam a capacidade de sintetizar o aminoácido (prototróficas para histidina ou *his*<sup>+</sup>) a partir do nitrogênio inorgânico. Diferentes doses da substância-teste são utilizadas neste ensaio, combinadas diretamente com a bactéria e com ou sem a mistura S9, em placa de Petri. Cerca de 10<sup>8</sup> células bacterianas são testadas em uma única placa, tornando possível a detecção de mutações, que são eventos raros (1/10<sup>6</sup>). A reversão ou estado selvagem (prototrófico) é medido

pela formação de colônias de bactérias revertentes que são contadas nas placas após 48 - 72 horas de incubação em estufa a 37°C (GOMES-CARNEIRO, 1997).

Este fenômeno traduz que as substância(s)-teste entrou(aram) em contato com as bactérias e interagiu(ram) com o seu DNA, provocando mutações reversas no *operon* histidina. A recuperação da habilidade de sintetizar histidina e, portanto, de crescer no meio de cultura indica que a(s) substância(s) responsável(is) por este fenômeno provocou(aram) mutações nas bactérias e é(são) considerada(s) mutagênica(s) genotóxica(s).

Além das mutações no *operon* histidina, as linhagens de *S. typhimurium* possuem outras alterações genéticas que as tornam mais susceptíveis à mutagênese, tais como: as mutações *rfa* (que elimina a parte polissacarídica da parede bacteriana, tornando as bactérias que a possuem mais permeáveis e completamente não patogênicas) e *uvrB* (deleção do gene responsável pelo reparo do DNA por excisão; assim o aduto formado pela ligação da substância química com o DNA não é retirado por este mecanismo de reparo, aumentando a mutagênese (AMES *et al.*, 1973). O plasmídeo pKM101, introduzido nas cepas utilizadas no teste, carrega o gene que confere resistência à ampicilina. O pKM101 aumenta a susceptibilidade das bactérias à mutagênese espontânea e a induzida por uma variedade de agentes e pela luz ultravioleta, uma vez que aumenta a eficiência do sistema de reparo, normalmente presente nas células bacterianas (MARON & AMES, 1983).

As substâncias que provocam alterações no genoma de organismos procariotos, como propõe o Teste de Ames, podem ocasioná-las também no genoma humano, porque a estrutura primária do DNA é a mesma (PILOT & DRAGAN, 1998). Apesar destas semelhanças, as bactérias não apresentam a maioria das enzimas envolvidas nos processos de biotransformação que ocorrem nos mamíferos. Portanto, para que estes

ensaios em procariotos sejam preditivos, isto é, possam detectar substâncias potencialmente mutagênicas para o homem, é importante que um sistema extrínseco de ativação metabólica (fração S9) seja adicionado ao meio de incubação (GOMES-CARNEIRO, 1997).

O Teste de Ames é muito usado na avaliação de risco mutagênico em extratos vegetais, principalmente de plantas utilizadas na medicina popular, para certificar a ausência de dano genotóxico provocado por substâncias naturais ao homem. Em tratando da família Rubiaceae alguns estudos deste caráter foram realizados em espécies como a *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC., conhecida popularmente como “unha-de-gato”, usada no tratamento de uma vasta gama de afecções como abscessos, artrite, úlceras gástricas dentre outros. Os resultados obtidos com as raízes demonstraram ausência de efeitos genotóxicos sobre cepas de *Salmonella typhimurium* (KEPLINGER *et al.*, 1999). Outros testes realizados em outras espécies e famílias vegetais como, por exemplo, nas folhas de *Luehea divaricata* (Tiliaceae) e *Baccharis anomala* (Compositae), ambas usadas como diurético, revelaram resultados positivos para dano genotóxico quando avaliadas pelo Teste de Ames. Este fato poderia ser explicado pela presença de taninos e flavonas presentes nas folhas destas duas espécies que apresentariam padrões de hidroxilação que causariam dano à estrutura do DNA (ALICE *et al.*, 1991).

No caso da “cainca” a avaliação mutagênica genotóxica pode garantir a segurança do seu consumo ou pode indicar a presença de substâncias dotadas desta capacidade e colaborar na identificação da classe de metabólitos secundários responsáveis pelo efeito.

## **5. Estudo farmacológico**

O contingente de informações sobre as propriedades farmacológicas das plantas usadas na medicina popular, de um modo geral, é ainda bastante escasso em vista do grande potencial de novas substâncias ativas que o Reino Vegetal pode prover. No caso da “cainca” a avaliação da atividade analgésica vai de encontro a um seus postulados usos etnofarmacológicos.

### **5.1-Analgesia**

A dor é um sintoma comum a muitos quadros clínicos e uma freqüente razão de procura do auxílio médico. Difícil e variada tem sido a definição de dor. Por isso, a Associação Internacional para o Estudo da Dor propôs sua conceituação “como uma experiência sensorial e emocional desagradável, relacionada com lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termos deste tipo de dano” (WANNMACHER & FERREIRA, 1992).

A nocicepção se refere à atividade do sistema nervoso aferente induzida por estímulos nocivos, que compreendem estímulos exógenos (mecânicos, químicos, físicos ou biológicos) e endógenos (inflamação, aumento do peristaltismo, isquemia tecidual). Sua percepção em nível periférico se dá em estruturas específicas, situadas nas terminações nervosas livres e denominadas nociceptores. Em tecidos normais, estes não respondem a estímulos leves. Porém, na presença da inflamação, podem ser sensibilizados (hiperalgesia) por prostaglandinas e dopamina, tendo como mediadores AMP cíclico e cálcio, cuja concentração aumenta nos terminais nervosos. Isso os torna mais receptivos à ativação da bradicinina e histamina, substâncias endógenas indutoras de dor. Em seqüência, os estímulos são conduzidos através das vias nervosas periféricas



sensitivas até o sistema nervoso central onde, em níveis talâmico e cortical, se faz a integração da sensação dolorosa (WANNMACHER & FERREIRA, 1992).

A dor, tanto fisiológica quanto fisiopatológica, possui três características espaço-temporais: 1) a área sensível onde o estímulo nocivo é aplicado (sítio receptivo) freqüentemente se amplia à medida que a intensidade da dor aumenta. Este fenômeno, denominado radiação, ocorre mesmo quando o estímulo nocivo é pontual; 2) a dor freqüentemente persiste após o término do estímulo lesivo; 3) estímulos nocivos repetitivos e de intensidade fixa evocam lenta somação temporal, que produz progressivo aumento da sensação de dor. Além de processos centrais, diversos mecanismos periféricos também contribuem para a geração destes fenômenos. Como parte da resposta inflamatória à lesão tecidual tem-se, inicialmente, a hiperalgesia primária, que se expande gradualmente para as áreas vizinhas ao tecido inflamado, caracterizando a hiperalgesia secundária. Este quadro de hipersensibilidade e extensão do campo receptivo é acompanhado por expansão da área medular que recebe informações nociceptivas da periferia. Deste modo, as hiperalgesias primária e secundária são mediadas por alterações que ocorrem tanto na periferia quanto na medula espinhal, sem excluir outros possíveis mecanismos centrais (PRADO, 2001).

O cérebro modula a dor mediante vias eferentes inibitórias, de modo que a sensação dolorosa é a resultante desses dois processos antagônicos. Toda a atividade nervosa está vinculada à presença de neurotransmissores e neuromoduladores, tanto nas vias aferentes (substância P, GABA, colecistocinina, somatostatina, encefalinas) quanto nas eferentes (acetilcolina, dopamina e encefalinas). Para dores leves e moderadas de natureza tegumentar e localização diversificada, associadas ou não a processo inflamatório periférico, são preferencialmente indicados os analgésicos não-opioides e, para as intensas, os opioides (WANNMACHER & FERREIRA, 1992).

## OBJETIVOS

Esta dissertação foi desenvolvida tendo como base o uso popular das raízes de *C. alba* (“cainca”) já há bastante tempo, sem que houvesse dados químicos, farmacológicos e toxicológicos suficientes que pudessem assegurar a eficácia do seu uso e ausência de risco para os consumidores.

Neste contexto, o presente trabalho foi delineado com os objetivos específicos a seguir:

- 1) Verificar a presença de alcalóides nas raízes de *C. alba* e determinar o perfil químico do extrato etanólico das raízes de *C. alba* por CLAE/UV e CG/EM.
- 2) Avaliar a toxicidade aguda e subaguda do extrato etanólico das raízes de *C. alba*, além da atividade enzimática do complexo citocromo P-450; do potencial mutagênico (Teste de Ames) e da citotoxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach.
- 3) Avaliar a propriedade analgésica do extrato etanólico das raízes de *C. alba* considerando seu uso popular como anti-reumático.

# MATERIAIS E MÉTODOS

## 1- Obtenção do material botânico

As raízes de *Chiococca alba* foram doadas pela indústria de fitoterápicos Flora Medicinal-Natura. Estas amostras foram coletadas no município de Nova Friburgo, no Estado do Rio de Janeiro, no período de março a outubro de 2001. A identificação botânica foi realizada pelo Dr. Sebastião Neto (Jardim Botânico do Rio de Janeiro). A excicata encontra-se depositada no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro sob o número de registro: RB395399.

## 2 – Procedimentos gerais para extração e estudo químico das raízes de *C. alba*

Os solventes empregados na extração do material botânico e no fracionamento do extrato foram em grau para análise e para análise por cromatografia líquida de alta eficiência, em grau espectroscópico.

Para cromatografia em camada delgada foram utilizadas cromatofolhas de gel de sílica 60 F<sub>254</sub> sobre placas de alumínio Merck (Darmstadt, Alemanha). Os reagentes utilizados para revelação das placas foram:

- 1) Sulfato cérico a 2% em ácido sulfúrico 2N.
- 2) Anisaldeído sulfúrico – 0,5ml de anisaldeído em 10ml de ácido acético glacial. Adicionar 85ml de metanol e 5ml de ácido sulfúrico concentrado, aquecer a 100<sup>0</sup>C/5 min.
- 3) Solução de Dragendorff – solução a: 16g de iodeto de potássio dissolvido em 40ml de água; solução b: 1,7g de nitrato de bismuto e 20g de ácido tartárico dissolvido em 80ml de água. Misturar 1:1 (v/v) das soluções a e b. Guardar sob refrigeração (0°C).

Para o reagente em spray: adicionar 5ml da solução estoque a 10g de ácido tartárico em 50ml de água.

## **2.1 – Obtenção e fracionamento do extrato etanólico**

As raízes de *C. alba* (2kg), secas e trituradas em moinho, foram inicialmente extraídas com seis litros de etanol por maceração estática durante 72 horas e posteriormente em aparelho de Soxhlet com dois litros do mesmo solvente. O solvente foi concentrado sob pressão reduzida a 50<sup>0</sup>C e os extratos etanólicos obtidos foram reunidos fornecendo 172,8g de material. Parte deste material (150g) foi separado para realização dos testes biológicos e o restante para estudo fitoquímico. Desse modo, 20g do extrato etanólico obtido foram particionados sucessivamente com solventes de polaridades diferentes fornecendo frações em: hexano (2,1g), diclorometano (1,2g), acetato de etila (5,7g), 1-butanol (3,1g) e água (8g).

O resíduo em hexano (2,1g) foi submetido à cromatografia em coluna (80 x 1,5 cm) empacotada com gel de sílica (Merck). As substâncias foram eluídas da coluna com gradiente crescente de hexano/acetato de etila/metanol. Foram coletadas 104 frações, monitoradas por cromatografia em camada delgada e reunidas de acordo com a similaridade de coloração e valores de R<sub>f</sub> (1-5, 6-11, 12-22, 23-33, 34-38, 39-50, 51-60, 61-70, 71-80, 81-90, 91-104). As placas foram reveladas com sulfato cérico e/ou anisaldeído sulfúrico e aquecidas a 100<sup>0</sup>C até visualização das cores após observação sob luz ultravioleta (250 e 360nm). As frações 39-50 (2,4mg), eluídas da coluna com hexano/acetato de etila 30%, foram reunidas e codificadas como Ca3950, após observação de uma mancha rosada desenvolvida com os reagentes reveladores (sulfato cérico e anisaldeído). Esta amostra foi submetida à metilação com diazometano e analisada por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas. As

demais frações serão analisadas futuramente. A metilação da amostra Ca3950 foi realizada com diazometano: cerca de 1mg foi solubilizado em solução etérea de diazometano (4ml), permanecendo em contato e sob refrigeração, por uma hora. Transcorrido esse tempo, o excesso do reagente foi evaporado em corrente de nitrogênio. Para cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM) foi utilizado cromatógrafo modelo GCMS-QP5000 (Shimadzu) equipado com coluna DB-1 (30m, 25mm DI, com filme de 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura, J&W Scientific, Rancho Cordova, CA), nas seguintes condições: 50 a 270<sup>0</sup>C a uma velocidade de 5<sup>0</sup>C/min.; modo *split* (1:30); injetor: 270<sup>0</sup>C; interface: 230<sup>0</sup>C. Os espectros de massas foram obtidos por impacto de elétrons a 70eV. As substâncias foram identificadas por comparação com os perfis de fragmentação em relação aos encontrados na literatura (McLAFERTY & STANFFER, 1989; NIST62).

## **2.2- Análise do extrato etanólico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Cerca de 1mg do extrato etanólico de *C. alba* foi solubilizado em metanol/água 30:70 v/v (sistema idêntico ao utilizado como fase móvel) e analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e detecção por rede de diodos. A cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada em cromatógrafo da marca Shimadzu, com detectores na região do UV-visível (SPD-10A) e de rede de diodos (SPD-M10A) com coluna de gel de sílica funcionalizada para fase reversa com octadecilsilano, em escala analítica [LiChrosorb, Merck (Darmsdatl, Alemanha)], 250mm x 4,6mm de diâmetro interno, partícula de 5  $\mu\text{m}$ . A fase móvel consistiu de um gradiente linear de eluição de metanol em água e fluxo de 1ml/min. O gradiente

iniciou com metanol 30% por 10 minutos; metanol 30 a 40% de 10 a 20 minutos e por fim metanol 40 a 100% de 20 a 60 minutos.

## **2.3– Pesquisa de alcalóides por cromatografia em camada delgada e por extração em meio básico**

### **2.3.1- Análise por CCD**

Alíquotas do extrato etanólico e das frações obtidas das partições em hexano, diclorometano, acetato de etila e 1-butanol foram utilizadas para pesquisa de alcalóides por cromatografia em camada delgada tendo como fase móvel os seguintes sistemas de solventes:

- a) tolueno/acetato de etila/dietilamina (7: 2: 1) e
- b) 1-butanol/ácido acético/água (4: 1: 1)

As placas foram reveladas com reagente de Dragendorff e aquecidas a 120<sup>0</sup>C durante dois minutos.

- c) Extração em meio básico (El Abbadi *et al.*, 1989)

Cerca de 100g de raízes secas e moídas de *C. alba* foram extraídas exaustivamente com solução de hidróxido de amônia 1M. A solução básica obtida foi extraída com clorofórmio e posteriormente submetida à precipitação com éter dietílico. A pesquisa de alcalóides foi realizada através de análise por cromatografia em camada delgada e revelação com o reagente de Dragendorff.

## **3- Avaliação toxicológica**

A avaliação toxicológica das raízes de *C. alba* foram realizados em cooperação com o Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgarten no Laboratório de Toxicologia

Ambiental - Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz  
- Manguinhos, Rio de Janeiro.

A avaliação da toxicidade do extrato etanólico de *Chiococca alba* constou da investigação da toxicidade aguda por três vias: oral, intraperitoneal e subcutânea; experimentos de toxicidade de doses repetidas (14 dias) ou subaguda por duas vias: oral e intraperitoneal. Em todos os testes foram utilizados camundongos Swiss Albinos de ambos os sexos. A avaliação do potencial mutagênico foi obtida através do Teste de Ames em procariotos. Avaliação de citotoxicidade foi realizada em microcrustáceo *Artemia salina* Leach.

### **3.1- Animais**

Para a avaliação da toxicidade aguda do extrato etanólico das raízes de *C. alba*, por via oral, intraperitoneal e subcutânea, na avaliação da toxicidade doses repetidas (subaguda) do extrato etanólico das raízes de *C. alba* por via oral e intraperitoneal foram usados camundongos Swiss Albinos machos (36±3g) e duas fêmeas (29±2g) fornecidos pelo Biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz (CECAL-FIOCRUZ). Os animais tinham 6 semanas de vida e foram acondicionados em gaiolas plásticas, mantidos em salas com temperatura (23±1)°C e umidade (aproximadamente 72%) controladas e fotoperíodo de 12 horas de luz (7 às 19 horas).

### **3.2- Ensaio de toxicidade aguda do extrato etanólico de *C. alba***

Os animais foram pesados em balança BG 2000 (*Gehaka*) e um volume de 10 ml/kg de peso corporal do extrato foi administrado a cada camundongo. O grupo controle (dois machos e duas fêmeas) foi tratado com o veículo (água destilada). Água e ração foram fornecidos *ad libitum* a todos os grupos, exceto por um breve período de

duas horas antes e depois do tratamento com dose única do extrato de *C. alba* pelas diferentes vias de administração. Os sinais de toxicidade, as mortes e suas latências foram observados por 14 dias, bem como a pesagem diária dos animais e controle de ganho ou perda de peso foi realizada. As gaiolas foram inspecionadas quanto à ocorrência de mortes várias vezes ao dia durante as primeiras 48 horas pós-tratamento e depois diariamente, até completar 14 dias. No décimo quinto dia, os animais sobreviventes foram sacrificados por deslocamento cervical e as vísceras foram examinadas macroscopicamente quanto a alterações de cor ou forma dos órgãos da cavidade abdominal e caixa torácica. Metodologia utilizada de acordo com Kennedy *et al.*, 1986.

### **3.2.1 - Toxicidade aguda do extrato de *C. alba* por via oral**

Na avaliação da toxicidade aguda por via oral, grupos de dois machos e duas fêmeas foram tratados com o extrato etanólico dissolvido em água destilada nas doses de 2000, 1000, 500 e 250 mg/kg, em administração única por entubação gástrica.

### **3.2.2- Toxicidade aguda do extrato de *C. alba* por vias intraperitoneal e subcutânea**

Na avaliação da toxicidade aguda por vias intraperitoneal e subcutânea, grupos de dois machos e duas fêmeas foram tratados com o extrato etanólico dissolvido em água destilada nas doses de 500, 250, 125 e 62,5 mg/kg em administração única por injeção intraperitoneal ou subcutânea.

### **3.3- Ensaio de toxicidade de doses repetidas (subaguda) do extrato de *C. alba***

. Os animais foram pesados e um volume de 10 ml/kg do extrato foi administrado a cada camundongo por 14 dias. O grupo controle (dez machos e dez



fêmeas) foi tratado com o veículo (água destilada). Água e ração foram fornecidos *ad libitum* a todos os grupos, exceto por um breve período de duas horas antes e depois do tratamento com o extrato etanólico de *C. alba* por via oral ou intraperitonal. Os sinais de toxicidade, as mortes e seus períodos de latência foram observados, bem como a pesagem diária dos animais e controle de ganho ou perda de peso realizada. No décimo quinto dia, os animais sobreviventes foram sacrificados por deslocamento cervical e as vísceras foram avaliadas quanto a alterações macroscópicas e fígado, baço, rins e coração foram removidos e pesados em balança modelo *Acculab*.

### **3.3.1 – Ensaios de toxicidade de doses repetidas (subaguda) do extrato etanólico de *C. alba* por via oral**

Na avaliação da toxicidade de doses repetidas por via oral, grupos de dez machos e dez fêmeas foram tratados com o extrato etanólico de *C. alba* dissolvido em água destilada nas doses de 2000, 1000, 500 e 250 mg/kg/dia, por 14 dias consecutivos por via oral (entubação gástrica). O estômago foi retirado e examinado quanto à presença de ulcerações estomacais ou hiperemia. As atividades enzimáticas de duas subfamílias hepáticas pertencentes ao complexo citocromo P-450 foi determinada nos fígados dos camundongos, sobreviventes ao tratamento repetido com a dose de 2000 mg/kg/dia do extrato etanólico de *C. alba*.

#### **3.3.1.1 – Determinação das atividades das isoenzimas hepáticas *Cyp 1A1* e *Cyp 2B1* do complexo citocromo P-450 em fígados de camundongos tratados com doses repetidas (14 dias) por via oral com o extrato etanólico de *C. alba***

Os fígados de cinco camundongos (machos e fêmeas) dos grupos controle e tratados com a dose de 2000 mg/kg/dia do extrato etanólico de *C. alba*, foram preservados em nitrogênio líquido a -196°C desde o fim do experimento de toxicidade

de doses repetidas por via oral. Estes órgãos foram usados na avaliação da atividade EROD (etoxirresorufina-*O*-desetilase) que marca a atividade da subfamília de enzimas *Cyp* 1A1 e PROD (pentoxirresorufina-*O*-despentilase) que marca a atividade da subfamília de enzimas *Cyp* 2B1 do complexo citocromo P-450.

#### **3.3.1.1.1– Preparação da fração citossólica hepática (Fração S9)**

Para o preparo da fração citossólica hepática (fração S9), os fígados foram colocados em placa de Petri e descongelados. Os fígados foram homogeneizados à temperatura de 4°C - em homogeneizadores de vidro com pistilo de teflon - em solução tampão contendo TRIS 50 mM, sacarose 250 mM, EDTA 100 mM e glicerol 20%, num volume correspondente a quatro vezes o peso de cada fígado, a uma velocidade angular de 1200 rpm. A homogeneização foi feita através de movimentos ascendentes e descendentes do homogeneizador. A partir do momento em que foi constatada visualmente a homogeneização do tecido, foram realizados mais 10 ciclos de movimentos ascendentes e descendentes para todas as amostras. O homogeneizado foi, então, levado à centrífuga (*Eppendorf*<sup>®</sup> 5804R) refrigerada (4 °C) a 9000 G durante 30 minutos.

Após a centrifugação, as amostras foram filtradas com gaze e transferidas para cinco tubos criogênicos devidamente identificados. As amostras foram armazenadas em *freezer* a -80°C até o momento da quantificação das proteínas e determinação da atividade enzimática.

### **3.3.1.1.2 – Determinação da concentração de proteínas na fração citossólica hepática (Fração S9)**

A dosagem de proteínas totais das frações S9 dos camundongos controles e tratados com a dose de 2000 mg/kg do extrato etanólico de *C. alba*, foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Bradford *et al.* (1976). Foi utilizado o corante Azul de Coomassie G-250 e leitura de densidade ótica (DO) a 595 nm em espectrofotômetro de microplaca Molecular Devices - *Spectra Max Plus 384*.

As curvas de calibração foram realizadas com albumina sérica bovina – BSA - 1,4 mg/ml diluída em solução de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (50 mM) e NaCl (150 mM), pH 7,2 para que fossem obtidas as seguintes concentrações: 0; 0,35; 0,7; 1,05 e 1,4 mg/ml.

Para determinação da concentração de proteínas na fração S9, diluiu-se a amostra na proporção de 1:20 e colocou-se 5  $\mu\text{l}$  de amostra diluída na microplaca. Em seguida, adicionou-se 250  $\mu\text{l}$  do reagente de Bradford em cada poço da microplaca. A formação do complexo proteína-corante é rápida e estável no período de 5 a 60 minutos. Assim, adotou-se um intervalo constante de aproximadamente 30 minutos entre a adição do corante e a leitura da absorbância.

Cada valor de DO obtido é convertido em concentração de proteína, empregando-se a curva-padrão. Feitas as correções para cada fator de diluição, as concentrações de proteína na fração S9 são calculadas como a média obtida (média final) a partir das médias de cada triplicata e expressas como mg de proteína/ml de fração S9.

As determinações foram realizadas com a aceitação de um coeficiente de variação máximo de 10%.

### 3.3.1.1.3 – Determinação da atividade enzimática *Cyp 1A1* e *Cyp 2B1*

Para a determinação da atividade enzimática da subfamília *Cyp 1A1* foi usado o marcador fluorescente chamado éster da fenoxazona - etoxirresorufina (EROD) e para a subfamília *Cyp 2B1* o marcador usado foi o éster da fenoxazona - pentoxirresorufina (PROD). A velocidade de desalquilação enzimática dos respectivos ésteres da fenoxazona foi verificada através do registro fluorimétrico do acúmulo da resorufina, substância fluorescente, produto final da reação. A reação ocorreu como descrito a abaixo:

Inicialmente, adicionou-se à cubeta 1900  $\mu\text{l}$  da solução tampão de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  100 mM para análise da fração S9 dos fígados dos camundongos tratados com a planta. Em seguida, incubou-se à temperatura de 30°C durante 5 minutos e adicionou-se 40  $\mu\text{l}$  da fração S9 e 10  $\mu\text{l}$  do substrato específico (etoxirresorufina 1mM ou pentoxirresorufina 1mM, ambos diluídos em DMSO). Após mais 1 minuto de incubação, a reação foi iniciada com a adição de 50  $\mu\text{l}$  do sistema regenerador de NADPH (doador de elétrons para a reação), constituído de 35  $\mu\text{l}$  de glicose-6-fosfato desidrogenase, 35  $\mu\text{l}$  de cloreto de magnésio, 140  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -NADP e 140  $\mu\text{l}$  de glicose-6-fosfato (BURKE & MAYER, 1982).

No início da atividade enzimática, realizou-se uma curva-padrão com diferentes quantidades (picomoles) de resorufina (solução 1  $\mu\text{M}$  em tampão). Estas atividades foram realizadas em espectrofluorímetro *Shimadzu* – RF – 5000 (excitação: 550 nm, emissão: 582 nm, abertura de fenda: 5nm).

Por meio dos valores de inclinação da reta obtidos a partir de registros gráficos e sua correspondência com a intensidade de fluorescência (RTU) e através da quantificação de resorufina da curva-padrão, pode-se calcular a velocidade da reação enzimática (pmoles/min/mg de proteína). Todas as determinações foram realizadas em

triplicata para cada alíquota de S9 com aceitação de um coeficiente de variação máximo de 10%.

### **3.3.2 – Ensaios de toxicidade de doses repetidas (subaguda) do extrato etanólico de *C. alba* por via intraperitoneal**

Na avaliação da toxicidade de doses repetidas por via intraperitoneal, grupos de dez machos e dez fêmeas foram tratados com o extrato etanólico de *C. alba* dissolvido em água destilada nas doses de 125, 62,5, 31,3 e 15,6 mg/kg/dia por 14 dias consecutivos por via intraperitoneal. Ao final do período de tratamento os animais sobreviventes foram anestesiados com éter P.A. e uma amostra de sangue foi retirada para a determinação da concentração de hemoglobina, hematócrito, contagem de hemáceas e leucócitos totais, além de confecção de esfregaço em lâmina, para a avaliação morfológica eritrocitária e contagem percentual diferencial de leucócitos.

#### **3.3.2.1 – Determinação da hemoglobina, hematócrito, contagem de hemáceas e leucócitos totais e exame do esfregaço sangüíneo**

Os índices de concentração de hemoglobina e contagem total de hemáceas e leucócitos foram realizados em aparelho de automação para hematologia em dispositivo DA 530 (*Celm*). O hematócrito foi determinado em tubos capilares de micro hematócrito em microcentrífuga (*Quimis*), com centrifugação a 9000G por 5 minutos. O esfregaço sangüíneo foi corado com o corante para hemograma May-Grunwald-Giemsa modificado e examinado ao microscópio óptico (*Olympus BX45*) no aumento de 100 vezes. Os eritrócitos foram avaliados quanto à cor, ao tamanho, à forma e à estrutura. A contagem diferencial de leucócitos constou de percentuais de bastões, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos presentes. Considerando-se que

eritroblastos, macrófagos, granulócitos imaturos, células linfóides imaturas, megacariócitos e células anormais não encontram-se normalmente no sangue, suas presenças foram registradas separadamente quando presentes nos esfregaços dos camundongos avaliados.

#### **4– Estudo da mutagenicidade**

O potencial mutagênico do extrato etanólico de *Chiococca alba* foi avaliado pelo teste de Ames, utilizando as cepas TA 100, TA 98, TA 1535 e TA 97a de *Salmonella typhimurium*, na ausência e na presença de um sistema de ativação metabólica, pelo método de pré-incubação de acordo com Gomes-Carneiro (1997) e Gomes-Carneiro *et al.*, (1998).

##### **4.1 – Procedência das linhagens usadas nos testes**

Neste estudo foram utilizadas as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA 97a, TA 98, TA 100 e TA 1535 fornecidas pelo Dr. Bruce Ames do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade da Califórnia, Berkeley, pertencentes ao Laboratório de Toxicologia Ambiental (ENSP-FIOCRUZ) e processadas segundo protocolo estabelecido por Gomes-Carneiro (1997) e Gomes-Carneiro *et al.*, (1998).

##### **4.2 – Testes de genótipos**

As linhagens bacterianas usadas nos experimentos de mutagenicidade realizados com o extrato etanólico de *C. alba* foram previamente avaliadas com relação às suas características fenotípicas, a fim de garantir a viabilidade e qualidade das cepas usadas. A presença das mutações no *operon* histidina e de outras alterações genéticas como as

mutações rfa, uvrB e a presença do plasmídeo foram verificadas de acordo com Maron & Ames (1983).

#### **4.3 – Preparo das culturas de *Salmonella typhimurium***

Para a preparação das culturas bacterianas utilizadas nos ensaios de mutagenicidade, cada cepa mantida em nitrogênio líquido foi descongelada em banho de gelo. A cultura descongelada (200µl) foi então transferida para um erlenmeyer contendo 20 ml de meio *Oxoid Nutrient Broth n° 2* líquido. A cultura foi colocada para crescer em banho-maria a 37°C, com agitação (90 movimentos/minuto) e protegida da luz, durante 14-15 horas, tempo de crescimento necessário para a obtenção de uma concentração bacteriana de  $1-2 \times 10^9$  células/ml (MARON & AMES 1983).

#### **4.4 - Testes de mutagenicidade por pré-incubação**

A tubos de ensaio previamente preparados com 2 ml de ágar de superfície adicionou-se solução de histidina 0,5mM /biotina 0,5mM. Os tubos foram mantidos a 45°C em banho seco e foram então adicionados: 100µl da cultura bacteriana ( $1-2 \times 10^9$  células/ml), 100µl de diferentes concentrações do extrato etanólico de *C. alba* e 500µl de tampão sódio-fosfato 0,2M. Para o controle negativo, ao invés do extrato, foi adicionado 100µl de solução de álcool 70%, diluente utilizado para a planta. Os tubos foram pré-incubados por 20 minutos em banho-maria a 37°C com agitação (90 movimentos por minuto), posteriormente homogeneizados em agitador de tubos tipo *Vortex* e vertidos em placas de meio E. Nos experimentos realizados na presença da mistura S9, 500µl da mesma foi adicionada nos tubos de ensaio substituindo o tampão (MARON & AMES, 1983).

#### **4.5 – Determinação da toxicidade e do intervalo de doses do extrato etanólico de *C. alba***

A determinação da toxicidade e potencial mutagênico do extrato às linhagens de *Salmonella typhimurium* foi determinada usando o procedimento de pré-incubação de 20 minutos, no qual verificou-se a presença do limite superior de toxicidade para cada cepa testada na presença e na ausência da mistura S9. A presença de concentrações tóxicas do extrato para as bactérias utilizadas foi caracterizada pela formação de debris celulares no fundo das placas. Este fenômeno ocorre quando há morte bacteriana em grande escala, tornando a histidina residual mais disponível, o que permite que bactérias auxotróficas sobreviventes sofram um maior número de divisões celulares e tornem-se visíveis como pequenas colônias.

#### **4.6- Sistema de ativação metabólica**

O sistema de ativação metabólica (mistura S9) foi preparado da seguinte maneira: 7 ml de água destilada, 10,5 ml de tampão sódio-fosfato 0,2M (pH 7,4), 840µl de β-NADP 0,1M, 105µl de glicose-6-fosfato 1M, 420µl de solução de MgCl<sub>2</sub> 0,4 M com KCl 1,65 M e mistura S9 liofilizada reconstituída com 2,1ml de água destilada. A mistura S9 utilizada é composta por uma fração microsomal hepática obtida a partir de fígado de ratos *Sprague-Dawley* machos, induzidos por Aroclor-1254. A fração liofilizada foi mantida a -20°C até o momento do seu uso (AMES *et al.*, 1973).

#### **4.7 – Controles positivos utilizados nos experimentos feitos com o extrato etanólico de *C. alba***

Os controles positivos utilizados neste trabalho, bem como suas respectivas doses, foram determinados através de protocolo descrito por Gomes-Carneiro, (1997).



A) Em experimentos realizados na ausência da mistura S9

TA 100 e TA 1535: azida sódica (1µg/placa) - *Aldrich Chemical*

TA 98: 2-nitrofluoreno (1µg/placa) – *Aldrich Chemical*

TA 97a: 4-nitroquinolina-N-óxido (1µg/placa) – *Sigma Chemical*

B) Em experimentos realizados na presença da mistura S9

TA 100 e TA 1535: 2-aminoantraceno (1µg/placa) – *Merck*

TA 98: 2-aminoantraceno (0,5µg/placa) - *Merck*

TA 97a: 2-aminofluoreno (10µg/placa) – *Merck*

## **5– Avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico de *C. alba* em *Artemia salina***

O bioensaio com o microcrustáceo *Artemia salina* foi utilizado para avaliar a citotoxicidade do extrato etanólico de *C. alba* e determinar a concentração letal mediana (CL<sub>50</sub>), ou seja, concentração na qual a metade dos organismos expostos é morta.

### **5.1 – Procedimentos para a realização do teste de toxicidade com *Artemia salina***

Os cistos de *Artemia salina* foram fornecidos pelo Laboratório de Poluição das Águas – COPPE/UFRJ, livres de contaminantes, na fase de náuplios II - III com alta taxa de eclosão e sensibilidade ao dodecil sulfato de sódio compreendida entre 30,9 e 31,1 mg/l (CL<sub>50</sub> de 24 horas).

### **5.2 – Bioensaio**

As soluções-teste foram preparadas em balões volumétricos, diluindo com água do mar sintética (preparada de acordo com o procedimento descrito por Meyer e colaboradores em 1982) e transferindo-se 10ml para os becheres. Para cada

concentração foram montadas três réplicas. Em cada réplica foram colocados dez organismos com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* de ponta redonda. O grupo controle foi composto por três réplicas contendo apenas água do mar sintética.

O teste foi mantido em incubadora biológica (FANEM) a  $(25\pm 1)^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, em ausência de luz. Após o período de 24 horas de incubação do teste, os organismos afetados e não afetados pela amostra foram contados em lupa *Olympus SZK* e os valores registrados em formulário.

### **5.3 - Concentração das amostras**

O extrato etanólico de *C. alba* foi dissolvido em água marinha artificial na concentração de  $1000\mu\text{g/ml}$  ( $1000\text{ppm}$ ). A partir desta solução-mãe, as demais concentrações de 500, 100, 50 e  $10\mu\text{g/ml}$  foram obtidas, diluindo-se com água do mar artificial. Paralelamente, foi realizada uma curva com o solvente usado na extração das raízes de *C. alba*, utilizando-se as concentrações de 0,1, 15,0 e 10,0% de etanol P.A. nas mesmas condições em que foi realizado o experimento com o extrato bruto da planta.

### **5.4 – Cálculo da $CL_{50}$**

Para a obtenção da  $CL_{50}$  os resultados obtidos nos testes de avaliação de toxicidade foram submetidos a testes estatísticos, de acordo com o método de ajuste Spearman-Kärber, que fornece também o intervalo de 95% de confiança (HAMILTON, RUSSO & THUESTON, 1977).

## **6– Avaliação farmacológica**

A atividade analgésica periférica do extrato etanólico de *C. alba* foi determinada através do método da inibição do número de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,6% por via intraperitoneal (COLLIER *et al.*, 1968).

### **6.1 – Teste de analgesia periférica**

Foram utilizados, neste experimento, três grupos de cinco camundongos Swiss Albinos machos (35±2g) e cinco camundongos Swiss Albinos fêmeas (30±1g) fornecidos pelo Biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz (CECAL-FIOCRUZ) com 6 semanas de vida. Cada grupo foi tratado do seguinte modo: um grupo recebeu água destilada, constituindo o grupo controle; outro grupo recebeu solução de dipirona sódica 50mg/ml e o último grupo recebeu 500 mg/kg do extrato etanólico de *C. alba*. O volume administrado das respectivas soluções aos grupos de animais foi de 10ml/kg/peso corpóreo, por via oral, 30 minutos antes de ser efetuado o estímulo doloroso com a injeção intraperitoneal de 0,1ml/10g de camundongo de solução de ácido acético glacial a 0,6%. Os animais foram colocados em caixas plásticas individualizadas e o número de contorções ou estiramentos abdominais foram contados em intervalos de 5 minutos, pelo período de 30 minutos, a partir da injeção intraperitoneal com ácido acético 0,6%.

## **7 – Reagentes**

Ácido cítrico monoidratado PA ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ): *Merck*

Ácido acético P.A: *Merck*

Ácido Clorídrico (HCl): *Merck*

Albumina Sérica Bovina (BSA) *Sigma Chemical Co*

Álcool etílico P.A. (etanol absoluto): *Merck*

Ampicilina triidratada: *Sigma Chemical Co*

Cloreto de magnésio P.A. ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ): *Merck*

Cloreto de potássio P.A. (KCl): *Merck*

Cloreto de sódio P.A. (NaCl): *Merck*

Clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ): *Merck*

Cristal violeta: *Merck*

D-(+)-Biotina: *Merck*

D-(+)-Glicose anidra P.A. (NaOH): *Vetec*

D-glicose-6-fosfato *Sigma*

Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA): *Merck*

Etóxirresorufina *Boehringer Mannheim GmbH*

Fosfato de potássio dibásico P.A. ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ): *Merck*

Fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

Fosfato de sódio dibásico P.A. ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ): *Reagen*

Fosfato de sódio e amônio tetraidratado P. *Merck*

Fosfato de sódio monobásico monoidratado P.A. ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ): *Isofar*

Glicerol: *Merck*

Glicose-6-fosfato desidrogenase 250U *Sigma*

Hidróxido de sódio P.A. (NaOH): *Merck*

L-Histidina. HCl. monoidratada: *Sigma Chemical*

Pentóxirresorufina *Boehringer Mannheim GmbH*

Reagente de Bradford *Merck*

Resorufina *Aldrich*

Sacarose ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ ) *Qeel*

Sulfato de magnésio P.A. (MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O): *General Division*

Sulfóxido de dimetila (DMSO): *Merck*

Tampão sódio-fosfato 0,2 M: *Merck*

Tetraciclina base livre: *Sigma Chemical CO*

Tris [2,4,6-tris(dimetilaminometil)-fenol]: *Merck*

β-D-glicose-6-fosfato monossódica: *Aldrich Chem*

β-nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato (β-NADP): *Sigma Chemical*

## **8– Meios de cultura**

Os meios de cultura foram preparados e utilizados de acordo com o procedimento descrito por Gomes-Carneiro, (1997).

Ágar de superfície

Meio E

Meio *oxoid nutrient broth*

Meio *Oxoid Nutrient Broth n. 2 Oxoid*

Mistura S9 *MOLTOX (Molecular Toxicology, Incorporated, Annapolis, USA)*

## **9-Soluções**

Solução de água marinha sintética

Solução de ampicilina (8 mg/ml)

Solução de Cloreto de Magnésio

Solução de glicose – 6 – fosfato

Solução de glicose a 20% (P/V)

Solução de glicose-6-fosfato 500mM

Solução de Glicose-6-Fosfato-Desidrogenase 250U

Solução de histidina 0,5 mM/biotina 0,5 mM

Solução de  $K_2HPO_4$  (fosfato de potássio dibásico) 100mM pH 7,8

Solução de  $KH_2PO_4$  (fosfato de potássio monobásico) 1 M

Solução de  $KH_2PO_4$  50 mM/ NaCl 150mM pH 7,2

Solução de mutagênicos (controle positivos)

Solução de NADP 0,1 M

Solução de sais ( $MgCl_2$  0,4M + KCl 1,65 M)

Solução de sais Voguel-Bonner (10x)

Solução de salina NaCl 0,9% (P/V)

Solução de tetraciclina (2 mg/ml)

Solução de  $\beta$ -NADP 25mM

Solução tampão

Substratos – EROD e PROD

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

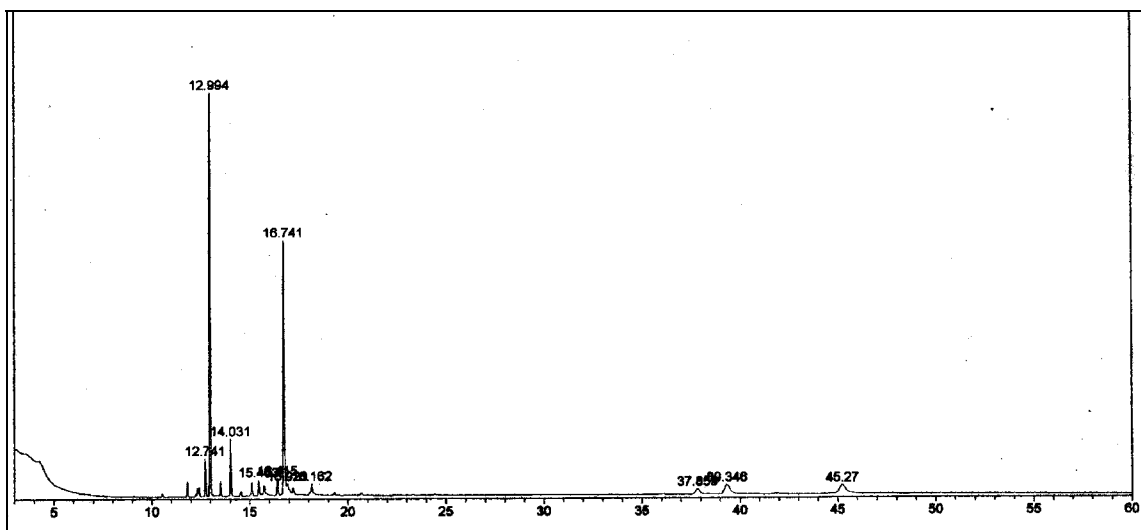
### 1- Rendimento da extração do extrato etanólico a partir das raízes de *Chiococca alba*

Após a extração unindo os processos por maceração estática e por aparelho de Soxhlet, o rendimento do material botânico foi de 86,4g por quilo de raízes moídas.

### 2- Avaliação Química

#### 2.1- Fracionamento de Ca3950

A fração Ca3950, que apresentou cristais em forma de agulhas impregnadas com material de aspecto oleoso, quando analisada por CCD e revelação por anisaldeído sulfúrico, originou uma mancha de coloração lilás indicativa da presença de esteróides e/ou triterpenos. A pouca quantidade de material fez com que se escolhesse a CG/EM como técnica para possível identificação da(s) substância(s). Previamente, esta fração foi submetida à metilação para que possíveis ácidos graxos presentes pudessem ser convertidos em derivados de maior volatilidade. A análise por CG/EM revelou uma mistura rica em ácidos graxos acompanhados por um triterpeno com tempo de retenção de 45,2 minutos, conforme pode ser observado no cromatograma 1.



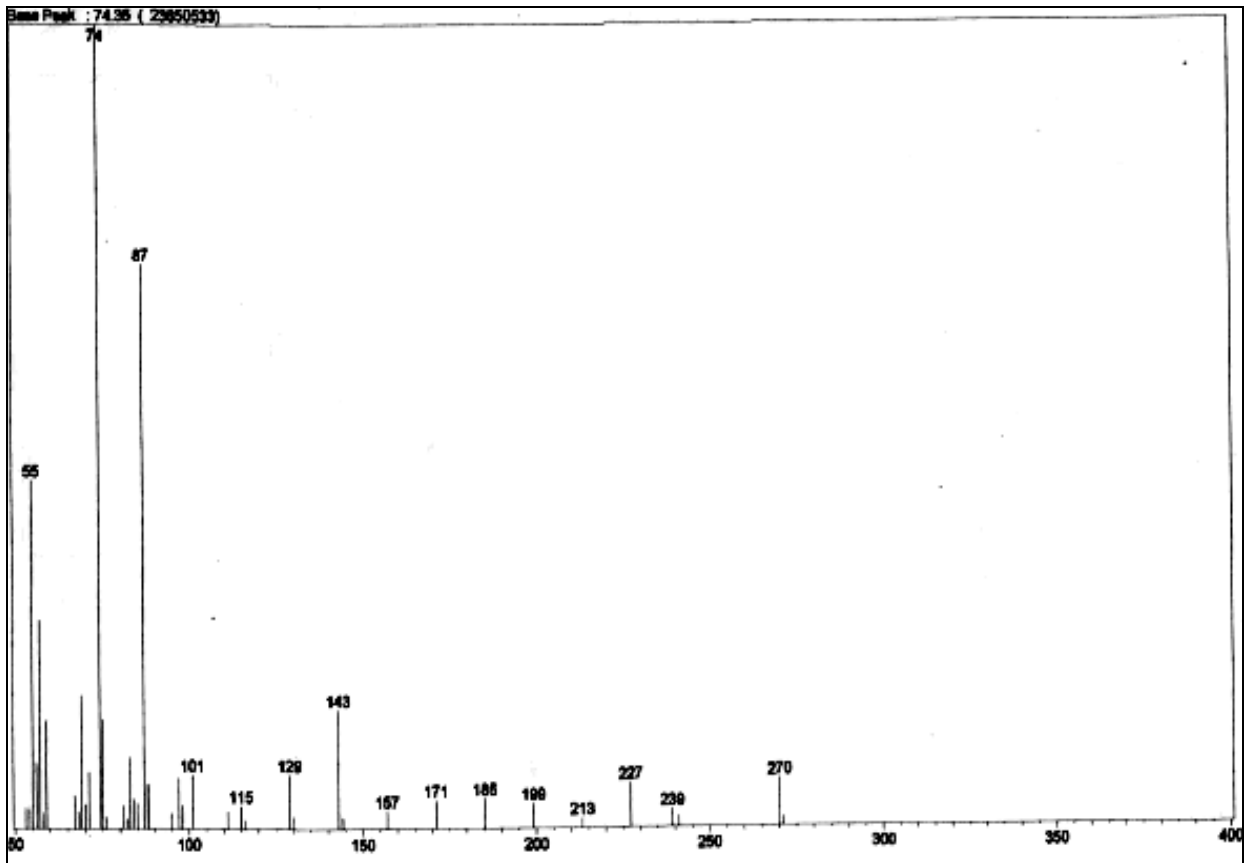
Cromatograma 1: Cromatografia com fase gasosa da fração Ca3950.

Os espectros de massas 1, 2, 3, 4 e 5 mostram um perfil de fragmentação que sugere a presença de ácidos graxos na fração Ca3950 e que encontram-se listados com seus respectivos tempos de retenção na tabela 1. Dentre os ácidos graxos, evidenciados através de seus ésteres metílicos, foi verificada a presença do éster metílico do ácido hexadecanóico como componente majoritário da mistura eluído em 12,9 min. A caracterização dos componentes foi realizada por comparação com modelos de fragmentação de substâncias descritas na literatura (McLAFERTY & STANFFER, 1989; NIST62).

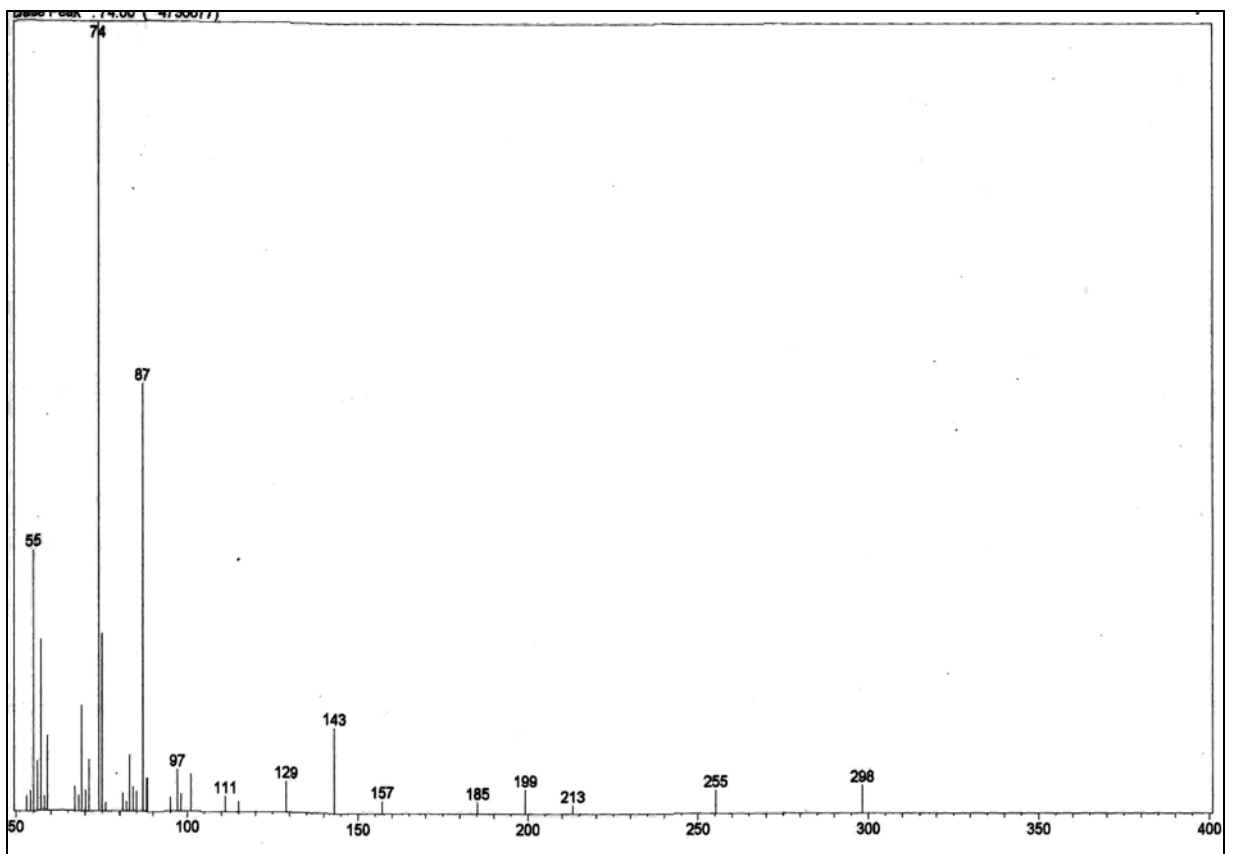
Tabela 1: Ácidos graxos identificados na fração Ca3950 do extrato etanólico das raízes de *C. alba*.

Componentes	tempo de retenção (min.)	M <sup>+</sup> • m/z
Ác. Hexadecanóico	12,9	270
Ác. Octadecanóico	14,0	298
Ác. Eicosanóico	15,1	326
Ác. Docosanóico	16,4	354
Ác. Tetracosanóico	18,1	382

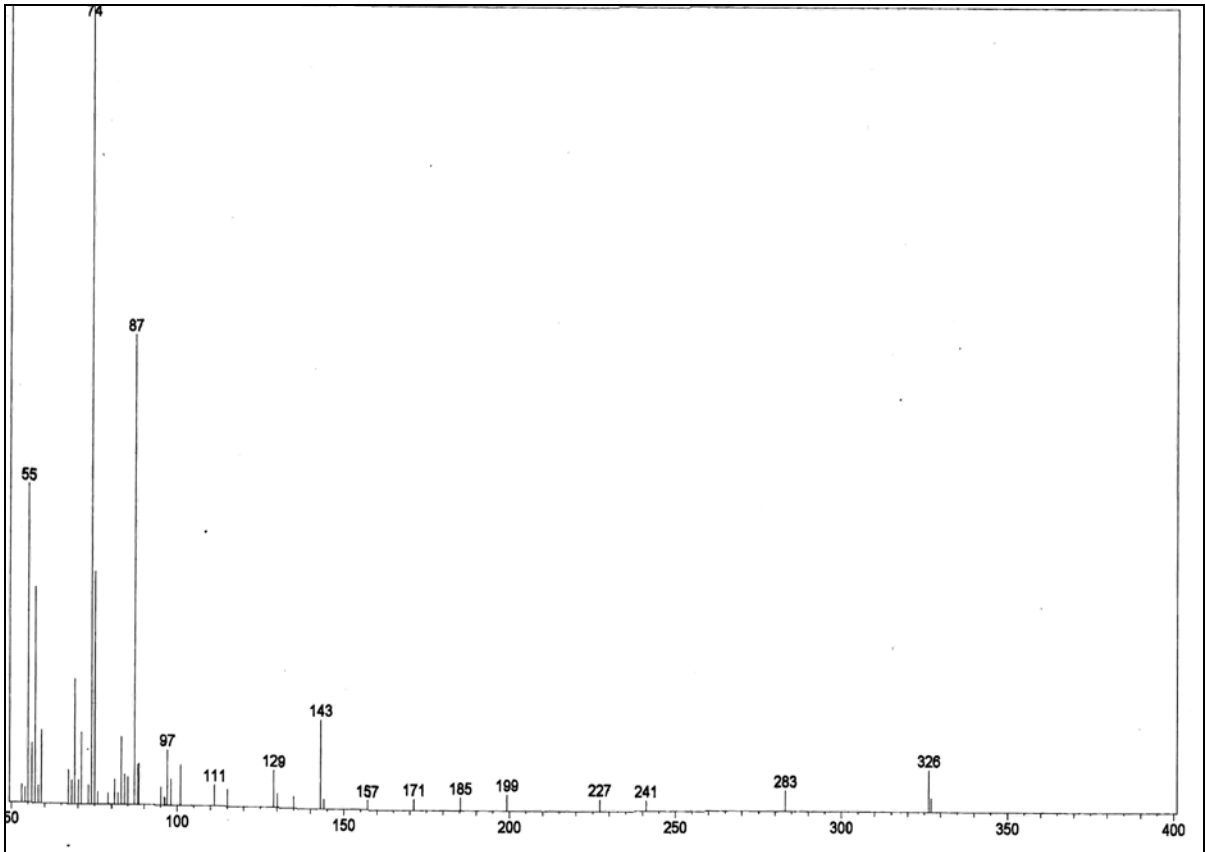




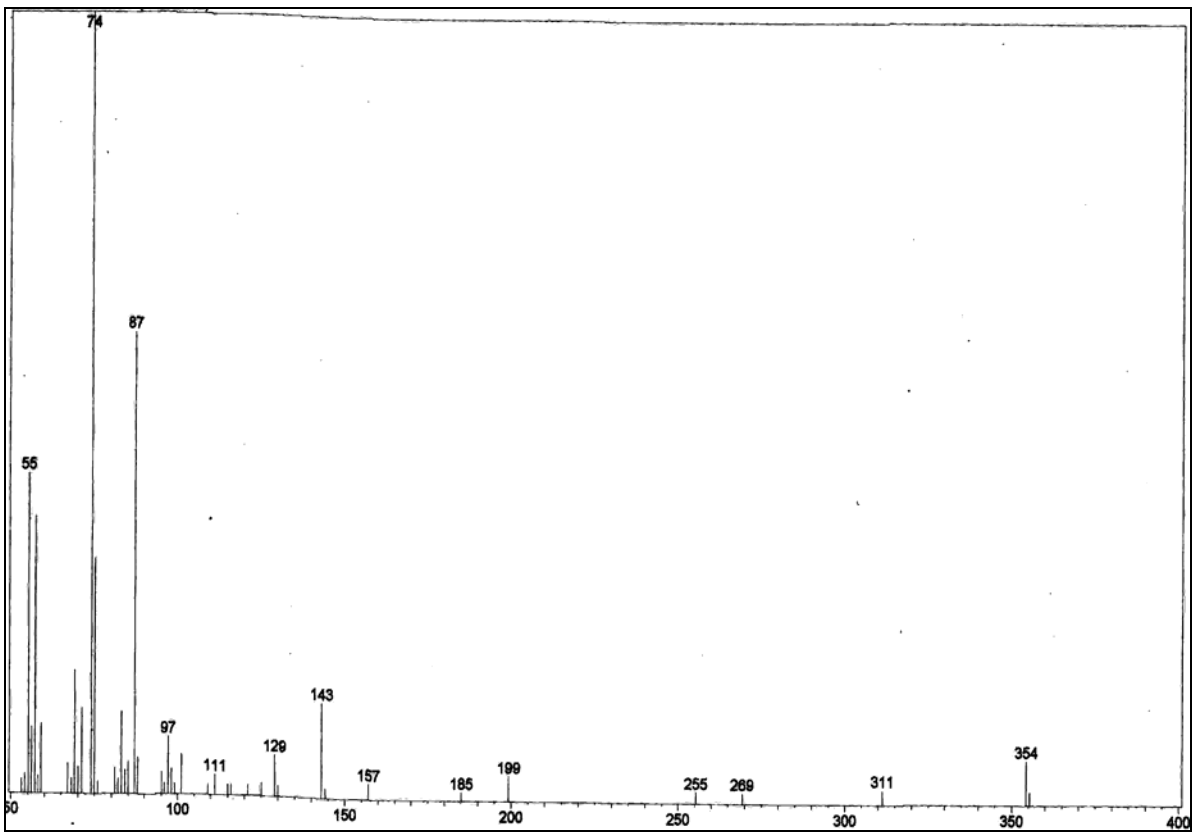
Espectro 1: Espectro de massas, por impacto de elétrons a 70 eV, ácido hexadecanóico.



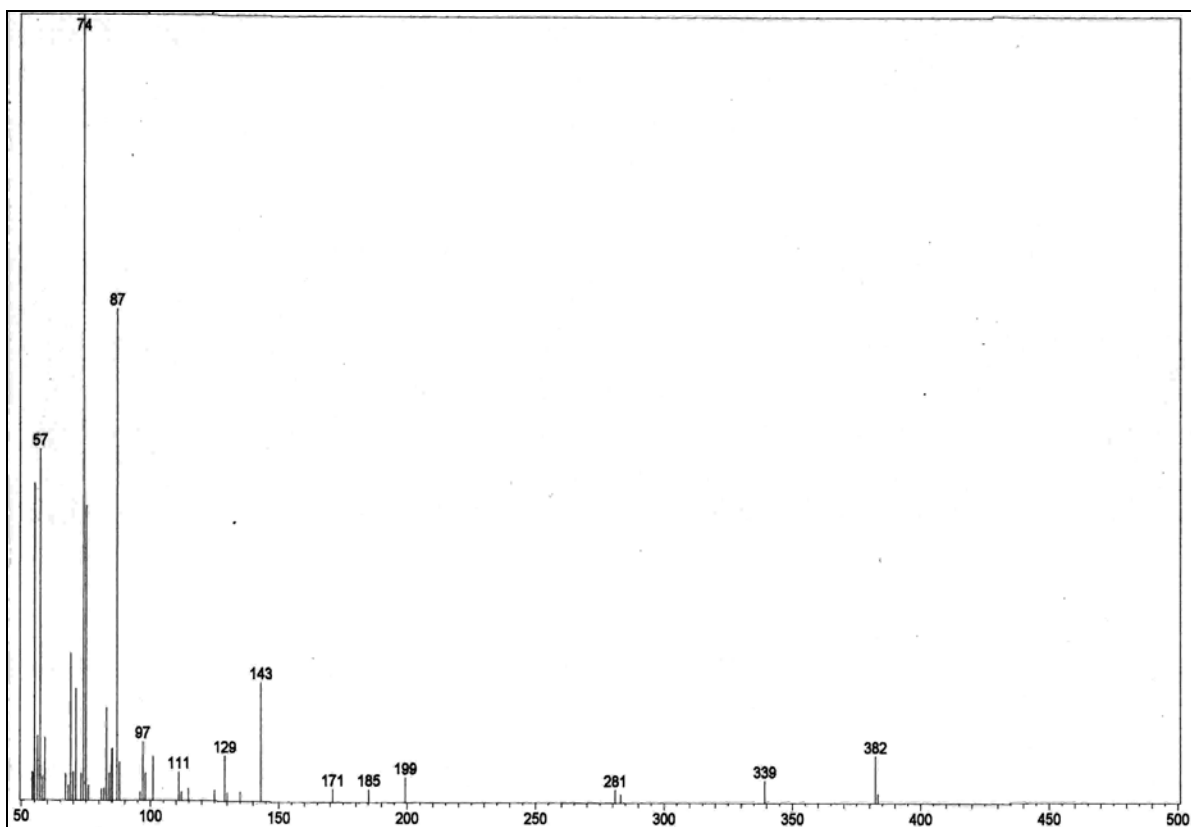
Espectro 2: Espectro de massas, por impacto de elétrons a 70 eV, ácido octadecanóico.



Espectro 3: Espectro de massas, por impacto de elétrons a 70 eV, ácido eicosanóico.



Espectro 4: Espectro de massas, por impacto de elétrons a 70 eV, ácido docosanoico.



Espectro 5: Espectro de massas, por impacto de elétrons a 70 eV, ácido tetracosanóico.

A substância que eluiu em 45,2 min. foi identificada através de seu espectro de massas (espectro 6) como sendo provavelmente o ácido ursólico (figura 9). Estruturas da série dos triterpenos pentacíclicos não saturados, como o oleanano ou o ursano, podem ser rapidamente identificados através da observação de um pico com  $m/z$  203 (OGUNKOYA, 1981).

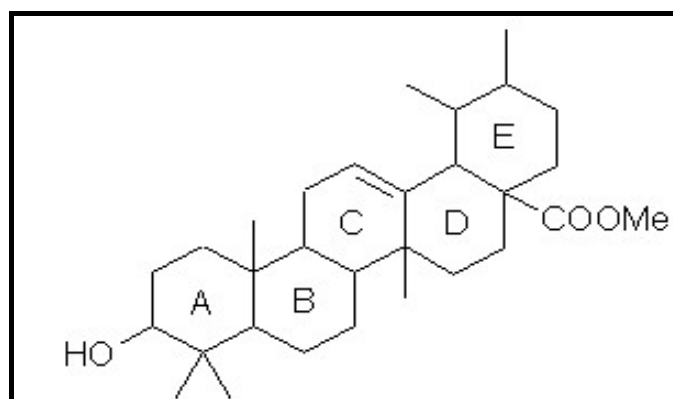
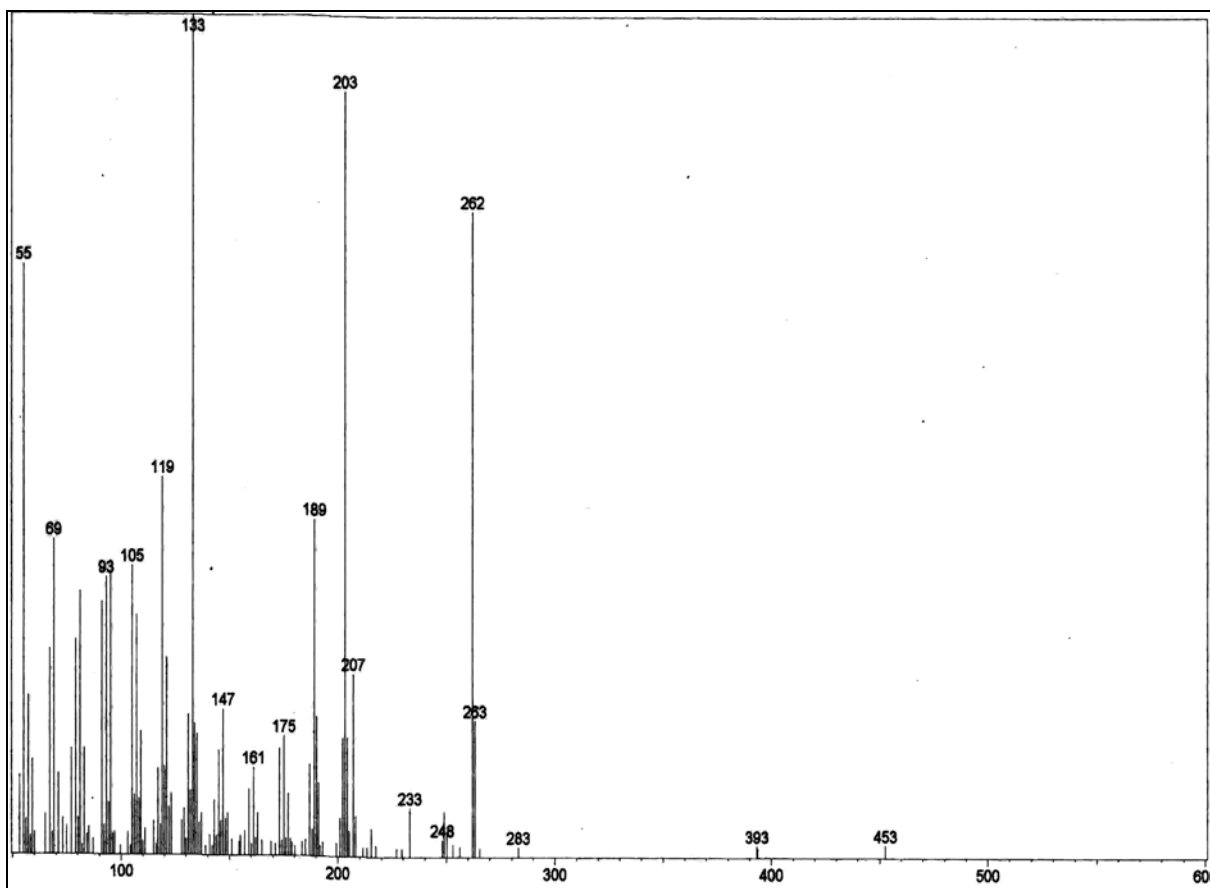


Figura 9: Ácido ursólico



Espectro 6: Espectro de massas, por impacto de elétrons a 70 eV, ácido ursólico.

Djerassi e col. (1963) descreveram que a presença de picos intensos com  $m/z$  133 e 262 são características na fragmentação de triterpenos com esqueletos semelhantes aos anteriormente citados. De acordo com os autores, os fragmentos formados são resultantes da quebra do anel C, que ocorre através de uma reação do tipo retro-Diels-Alder. Assim, o fragmento com  $m/z$  262 é originado a partir do ion molecular com  $m/z$  470, que corresponde ao peso molecular do éster do ácido ursólico. O pico com  $m/z$  203 resulta da perda de 59 unidades de massa ( $-\text{COOCH}_3$ ) a partir do ion com  $m/z$  262. A figura 10, mostra uma proposta de fragmentação estabelecida para o ácido ursólico, com base nos argumentos mencionados (WALLER, 1972).

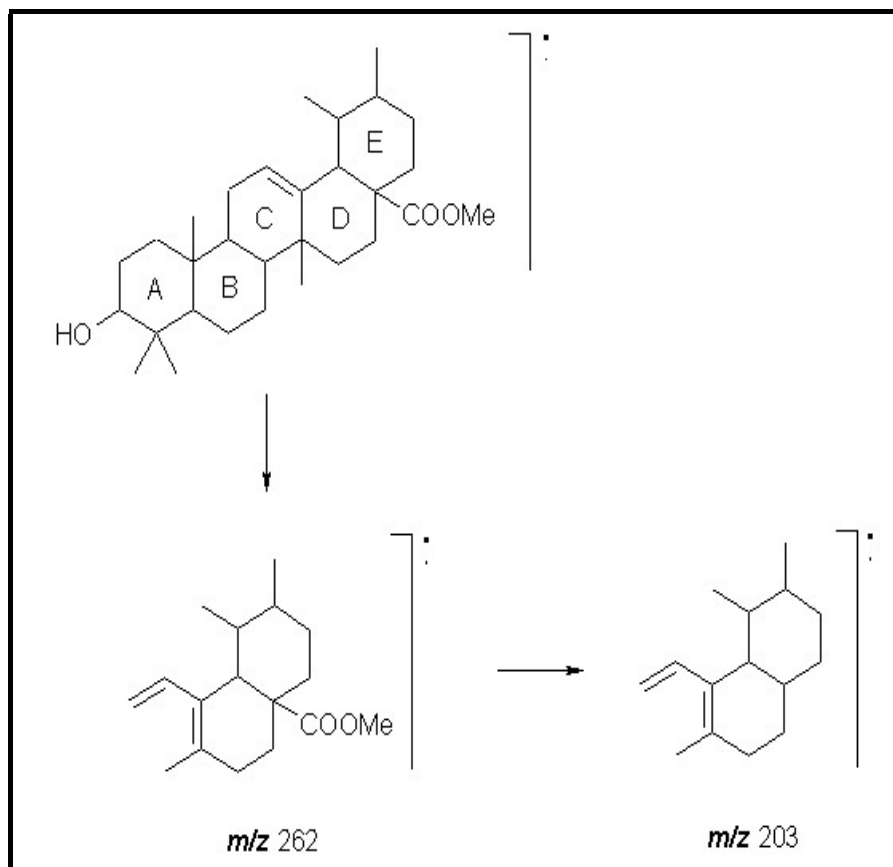


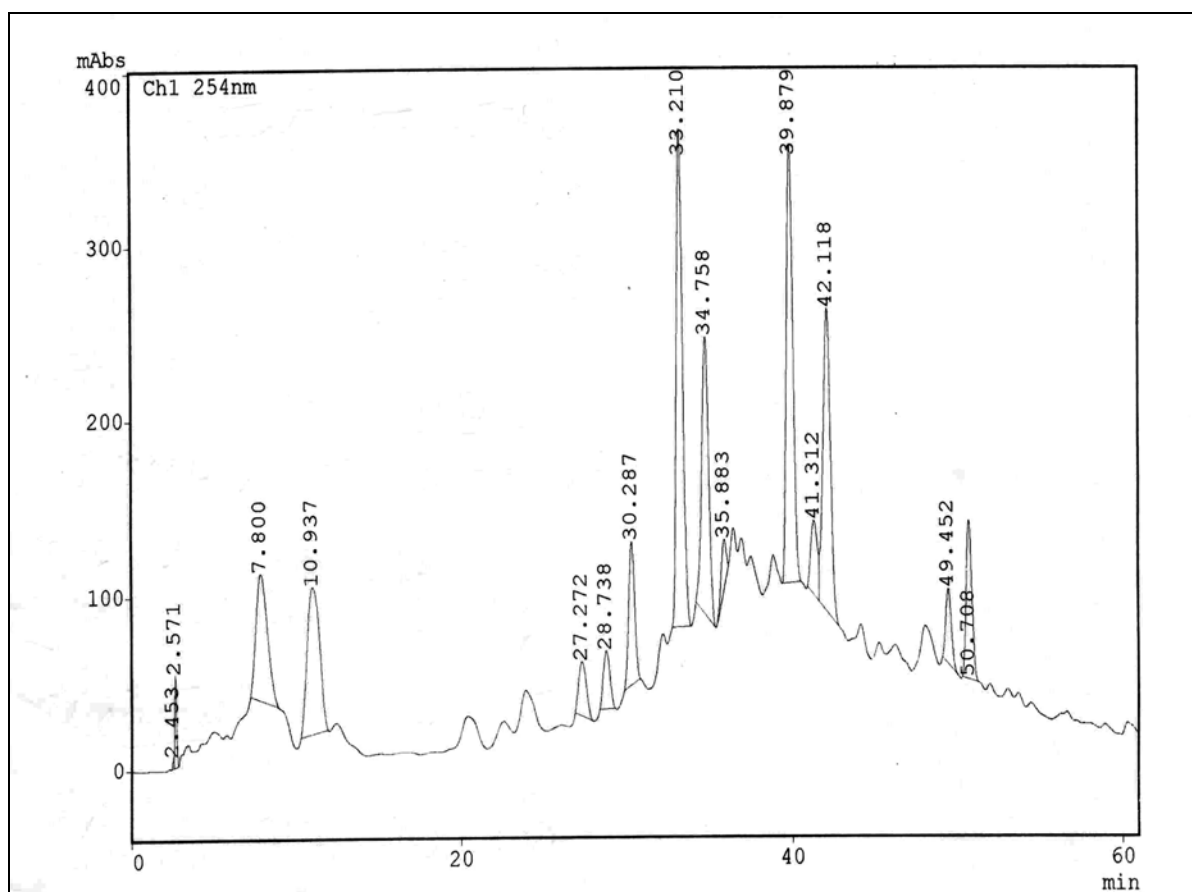
Figura 10: Proposta de fragmentação do éster metílico do ácido ursólico sob impacto de elétrons a 70eV.

### 2.3- Cromatografia líquida de alta eficiência do extrato etanólico das raízes de *C. alba*.

Proseguiu-se o estudo fitoquímico optando-se por uma investigação sistemática do extrato etanólico. Com base na pesquisa bibliográfica realizada para a família verificou-se predominância de antraquinonas, iridóides e alcalóides indólicos como marcadores sistemáticos em Rubiaceae. Sabendo-se que a tribo Antirrhoideae, da qual *Chiococca alba* faz parte, não é produtora de alcalóides indólicos, a busca passou a ser focada nas duas outras classes que apresentam cromóforos bem característicos.

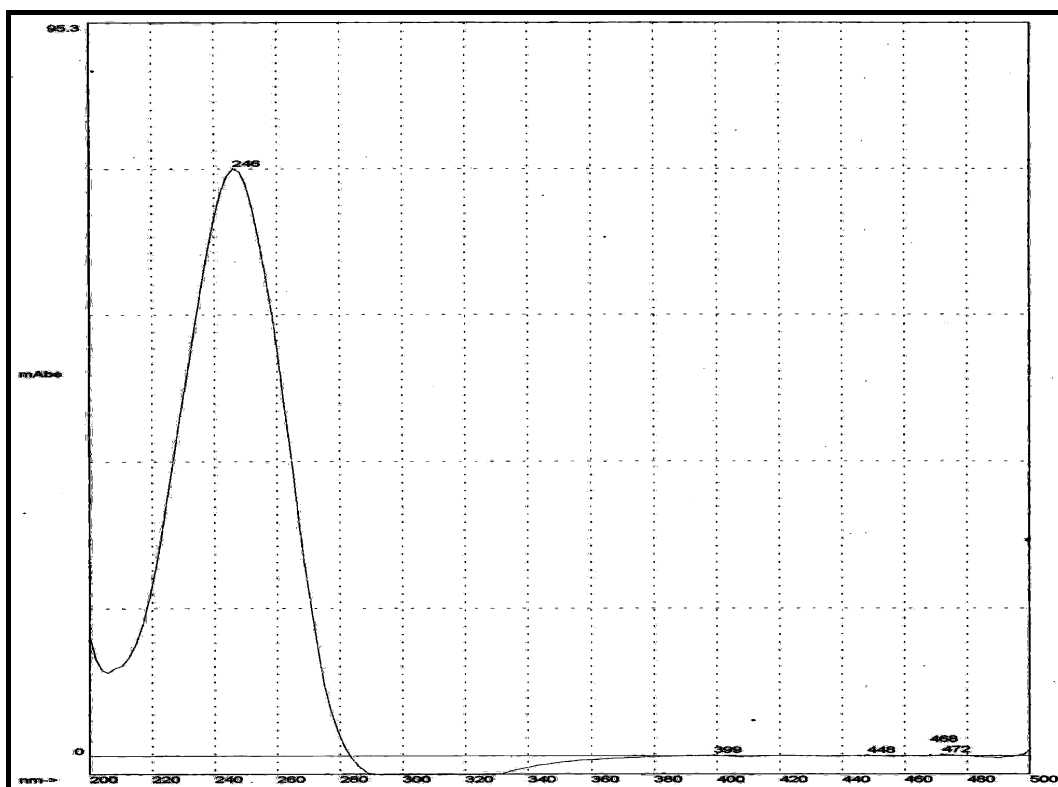
Desse modo, o extrato etanólico foi submetido à análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector no UV com rede de diodos. A análise por

CLAE (cromatograma 2) utilizando esse tipo de detecção oferece informações úteis sobre possíveis classes de metabólitos, podendo até mesmo indicar formas estruturais básicas como um norteio para trabalhos futuros mais detalhados.

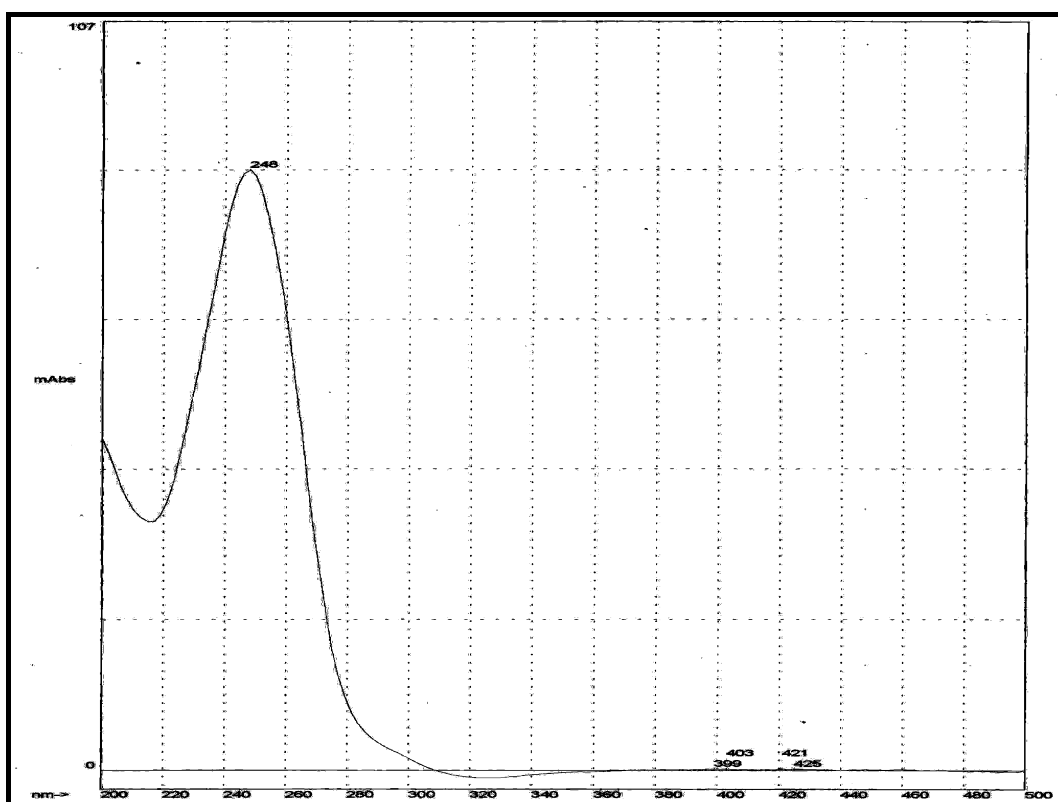


Cromatograma 2: Cromatografia líquida de alta eficiência do extrato em etanol das raízes de *C. alba*.

Os sinais com máximos de absorção no espectro do UV em 246nm (para o sinal em 7,8 min.) e 248nm (para o sinal em 10,8 min.) apresentam banda única na região do UV, dificultando uma possível identificação, tais comprimentos de onda levam a especular sobre a probabilidade da presença de ácidos fenólicos (HARBORNE, 1984). O fato de terem eluído da coluna logo no início da corrida confirma o caráter bastante polar dessas substâncias (espectros 7 e 8).

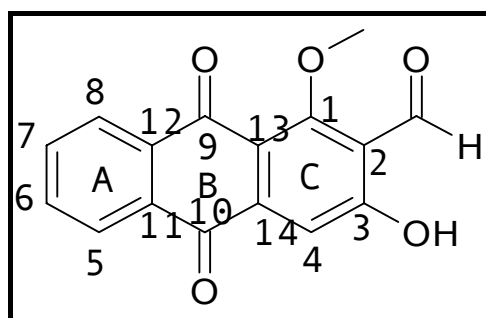


Espectro 7: Espectro no UV da substância eluída em 7,8 min. do extrato etanólico das raízes de *C. alba*.

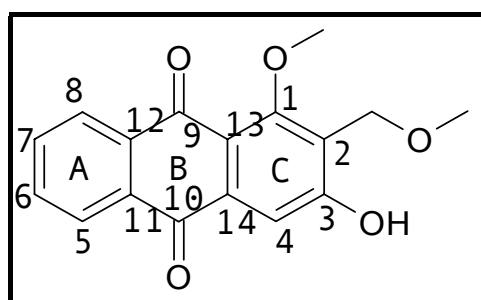


Espectro 8: Espectro no UV da substância eluída em 10,8 min. do extrato etanólico das raízes de *C. alba*.

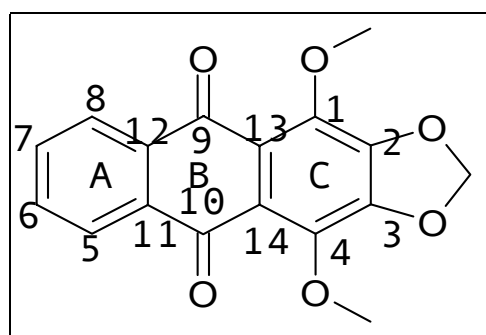
O sinal em 27,4 min. apresenta um espectro no UV que mostra os máximos de absorção em 240, 275, 308 (ombro) e 372nm (espectro 9), em possível concordância com aqueles obtidos na literatura para algumas antraquinonas isoladas de Rubiaceae (WIJNSMA & VERPOORTE, 1986). As antraquinonas encontradas em Rubiaceae constituem um grupo homogêneo de substâncias, todas derivadas de uma estrutura tricíclica básica (figura 11) formadas através da via chiquimato-mevalonato.



Damnacanthal



Damnacanthol éter *m*-metílico

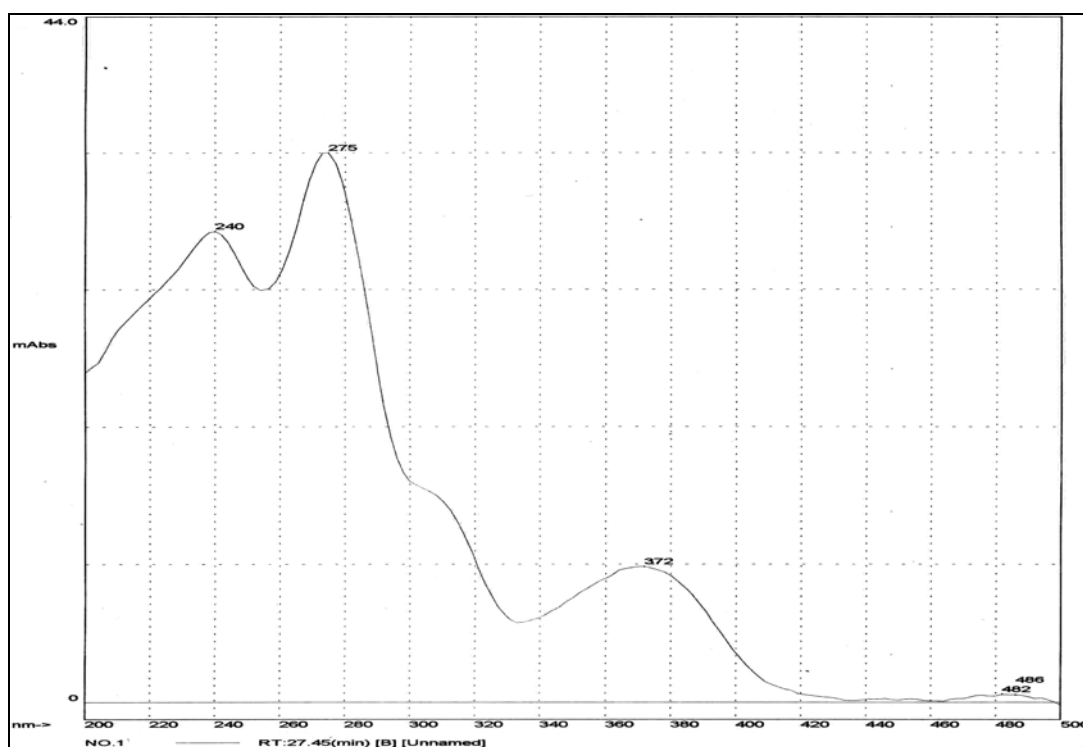


1,4-dimetoxi-,3-metilenodioxiantraquinona

Figura 11: Antraquinonas de Rubiaceae.



Elas diferem somente na natureza dos substituintes e no padrão de substituição nos anéis A e C. Um grupamento metila, oxidado ou não, está sempre presente na posição C-2 ou na posição C-6, que são biogeneticamente equivalentes. Os substituintes encontrados com maior frequência, em adição ao grupo metila (oxidado ou não) na posição C-2, são os grupos hidroxila e metoxila. Estes substituintes estão geralmente presentes no anel C nas posições C-1, C-2, C-3 e C-4 e no anel A nas posições C-5 e C-6. Em antraquinonas de Rubiaceae a presença de substituintes nas posições C-5 e/ou C-6 e/ou C-7 é muito mais freqüente do que na posição C-8 do anel A (WIJNSMA & VERPOORTE, 1986). A tabela a seguir mostra a semelhança entre os comprimentos de onda da substância eluída em 27,4 min. e antraquinonas isoladas de espécies de Rubiaceae. No caso da substância em questão ser uma antraquinona, pode-se esperar que haja um substituinte no anel C, possivelmente uma metoxila, sem entretanto poder se precisar o número e as posições nas quais se encontram.



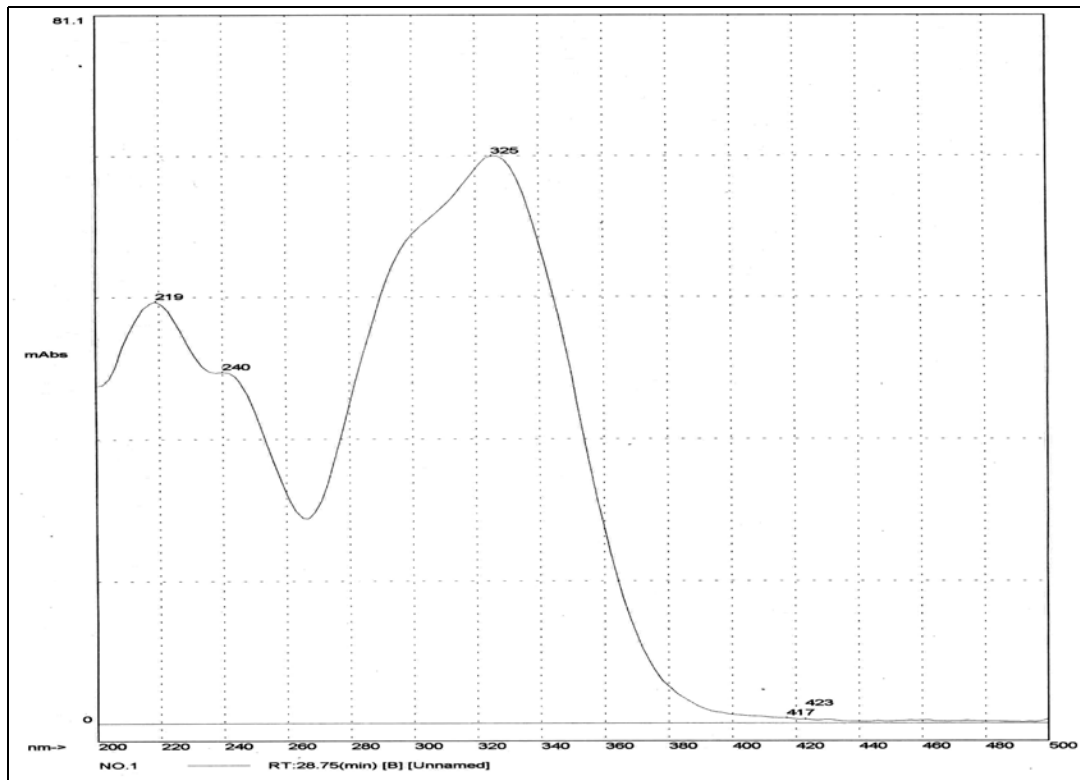
Espectro 9: Espectro no UV da substância eluída em 27,4 min. do extrato etanólico das raízes de *C. alba*.

Tabela 2: Sinal eluído de *C. alba*, seus máximos de absorção e possível correlação com antraquinonas descritas na literatura para Rubiaceae (WIJNSMA & VERPOORTE, 1986).

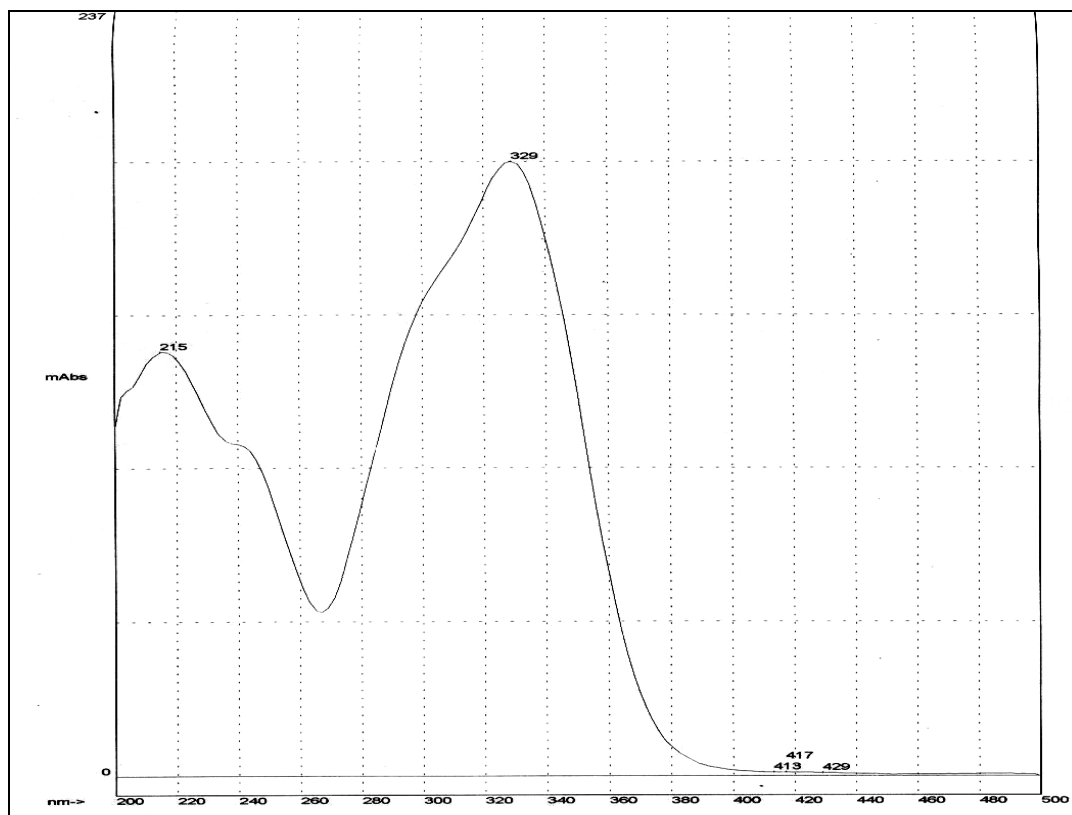
<b>Substância</b>	<b>Máximos de absorção (<math>\lambda_{\text{max}}</math> nm)</b>
Tempo de retenção 27,4 min.	240, 275, 308 (ombro), 372
Damnacanthol éter $\omega$ -metílico	242, 274, 308, 380 (em MeOH)
Damnacanthal	247, 282, 375 (em EtOH)
1,4-dimetoxi-,3-metilenodioxiantraquinona	220 (ombro), 241, 276, 375 (em MeOH)

As antraquinonas são marcadores químicos de Rubiaceae, mais especificamente da subfamília Rubioideae (BOLZANI *et al.*, 2001) e até o momento ainda não foram encontradas em *C. alba*. Assim, abre-se a possibilidade para a ocorrência de antraquinonas na espécie encorajando estudos futuros.

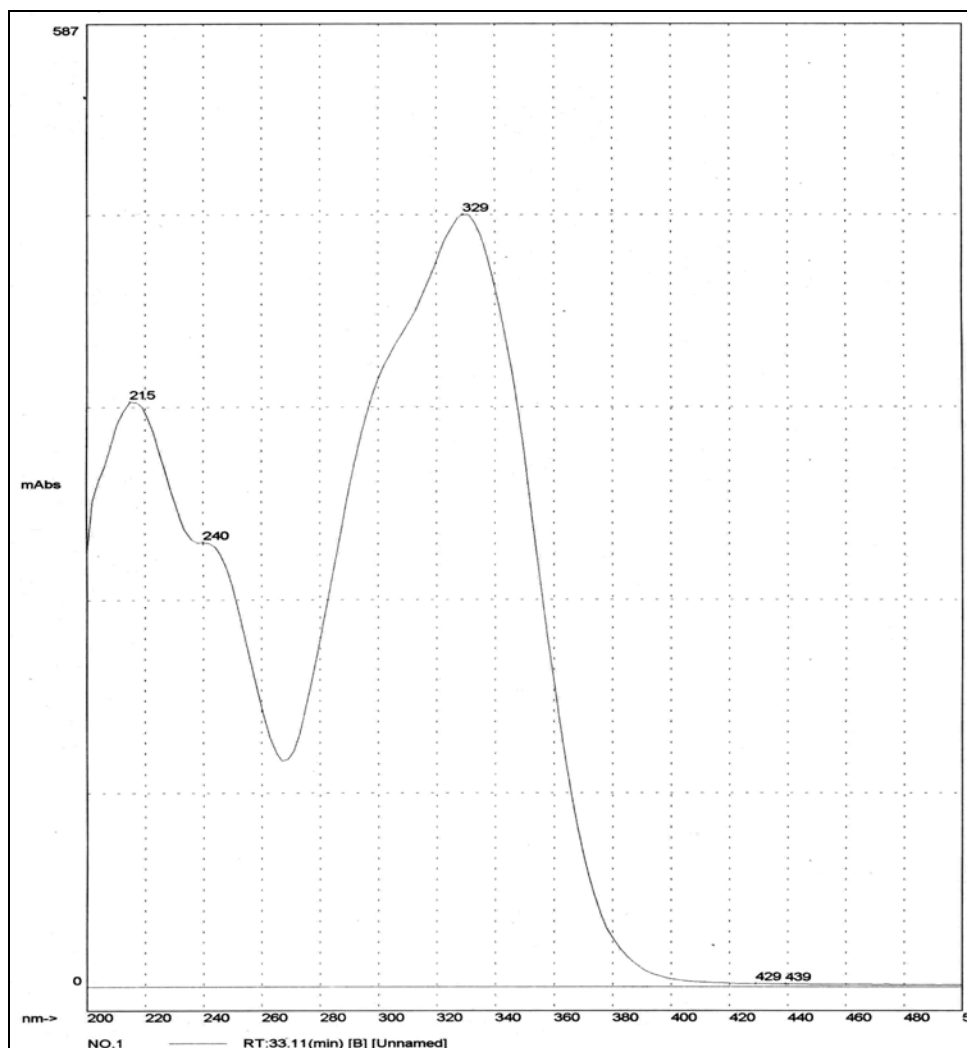
Ao se comparar o formato dos espectros no UV (espectros 10, 11 e 12) e os máximos de absorção dos sinais eluídos em 28,7, 30,2 e 33,1 min. (cromatograma 2), tem-se a impressão de que formam um grupo de substâncias congêneres com substituintes tais que, apesar de não causarem interferência considerável nos deslocamentos dos comprimentos de onda, conferem características para que haja diferença nos tempos de retenção.



Espectro 10: Espectro no UV da substância eluída em 28,7 min. do extrato etanólico das raízes de *C. alba*.



Espectro 11: Espectro no UV da substância eluída em 30,2 min. do extrato etanólico das raízes de *C. alba*.



Espectro 12: Espectro no UV da substância eluída em 33,1 min. do extrato etanólico das raízes de *C. alba*.

A sugestão inicial é de que se trata de um conjunto de iridóides e/ou seco-iridóides. Os espectros no UV sugerem a presença de um grupo acila aromático correspondente a um sistema do tipo cinamoila, com absorção característica em torno de 326 nm. Trabalho realizado por Carbonezi e col. (1999) mostra a presença de três iridóides e um seco-iridóide (todos glicosilados e contendo um grupamento acila aromático) denominados de albosídeos (I a IV), nas raízes de *C. alba*, com máximos de absorção bem próximos aos verificados para as substâncias eluídas nos tempos de retenção acima citados (tabela 3).

Iridóides são comuns em Rubiaceae, sendo considerados importantes marcadores quimiotaxonômicos na família. Inouye e col. (1988) investigaram a presença de iridóides em trinta e cinco espécies de rubiáceas, através de análise por CG e/ou CG/EM, objetivando um estudo quimiotaxonômico baseado em uma classificação fundamentada nas similaridades estruturais desses metabólitos. Os resultados sugerem que estas plantas possam ser divididas em três grupos, onde a subfamília Antirheoideae mostrou conter seco-iridóides e loganina biossintetizados a partir do asperulosídeo, um iridóide glicosilado encontrado em várias espécies da subfamília Rubioideae.

Tabela 3: Máximos de absorção observados nos espectros no UV das substâncias eluídas em 28,7, 30,2 e 33,1 min. e possível correlação com iridóides isolados de *C. alba*.

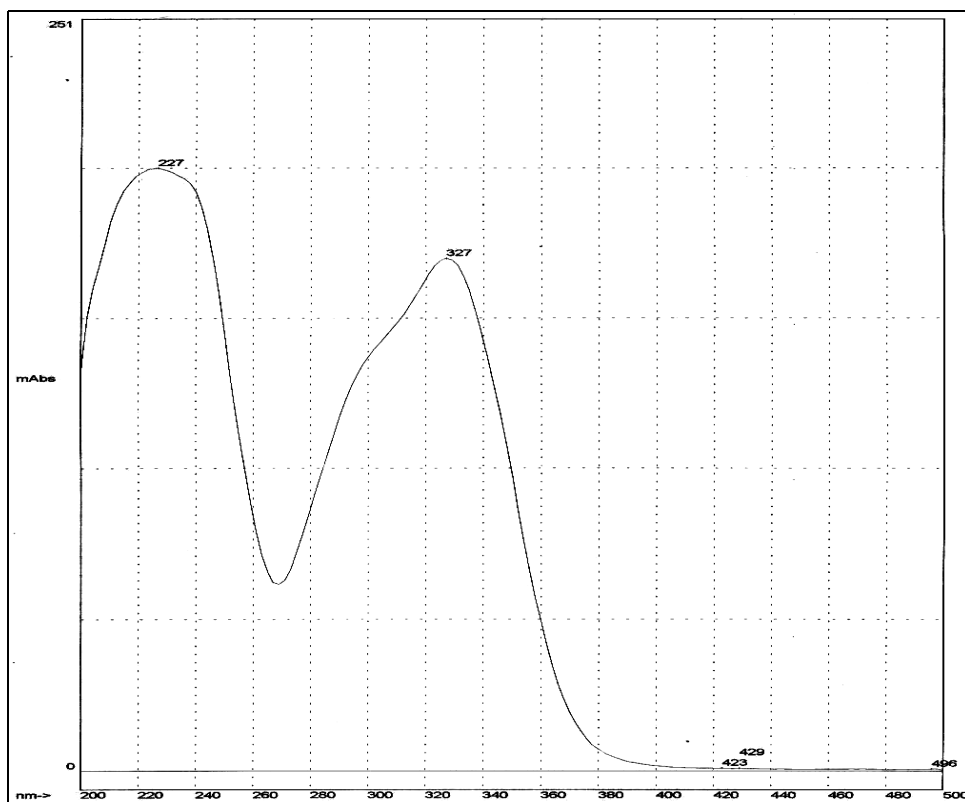
<b>Substâncias</b>	<b>Máximos de absorção (<math>\lambda_{\max}</math> nm)</b>
Tempo de retenção 28,7 min.	219, 240, 325
Tempo de retenção 30,2 min.	215, 240, 329
Tempo de retenção 33,1 min.	215, 240, 329
Albosídeo I	208, 235, 325
Albosídeo II	208, 238, 330
Albosídeo III	208, 235, 338
Albosídeo IV (seco-iridóide)	210, 238, 325

Essas observações estimulam estudos futuros abrindo possibilidades de se isolar iridóides e/ou seco-iridóides, já conhecidos ou não, das raízes de *C. alba* em escala preparativa.

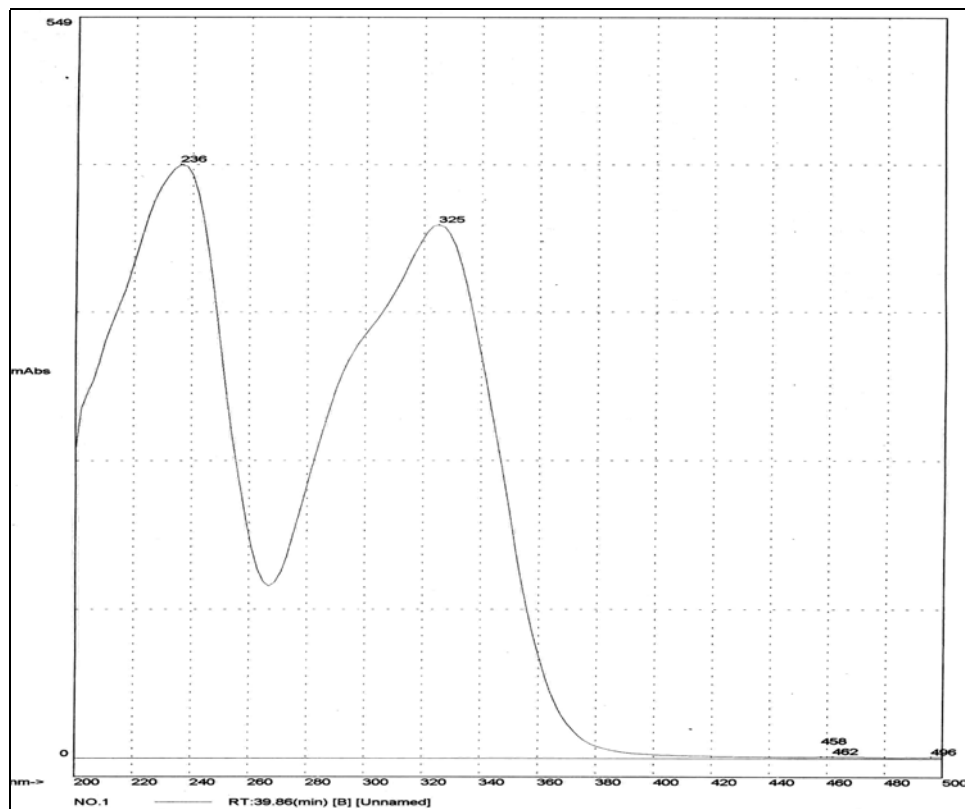
A interpretação meramente visual dos espectros no UV dos sinais eluídos com tempo de retenção de 34,6, e 39,8 min. permite que se considere tratar de substâncias com estruturas semelhantes. As absorções em 327 e 325 nm, respectivamente, levam a especular sobre a presença de um sistema cinamoila (espectros 13 e 14). De acordo com a tabela 4, (HARBORNE, 1984), tais comprimentos de onda indicam a probabilidade da presença de fenilpropanóides derivados do ácido hidroxicinâmico no extrato etanólico da “cainca”. Apesar da diferença com relação ao máximo de absorção para a substância eluída em 42,0 min. (espectro 15) quando comparada com as duas anteriormente citadas, de um modo geral o formato dos espectros é parecido e os comprimentos de onda situam-se na faixa daqueles encontrados para derivados fenilpropanoídicos, conforme pode ser visto na tabela a seguir.

Tabela 4: Máximos de absorção observados nos espectros de UV das substâncias eluídas em 34,6, 39,8 e 42,0 min. e possível correlação com ácidos hidroxicinâmicos (HARBORNE, 1984).

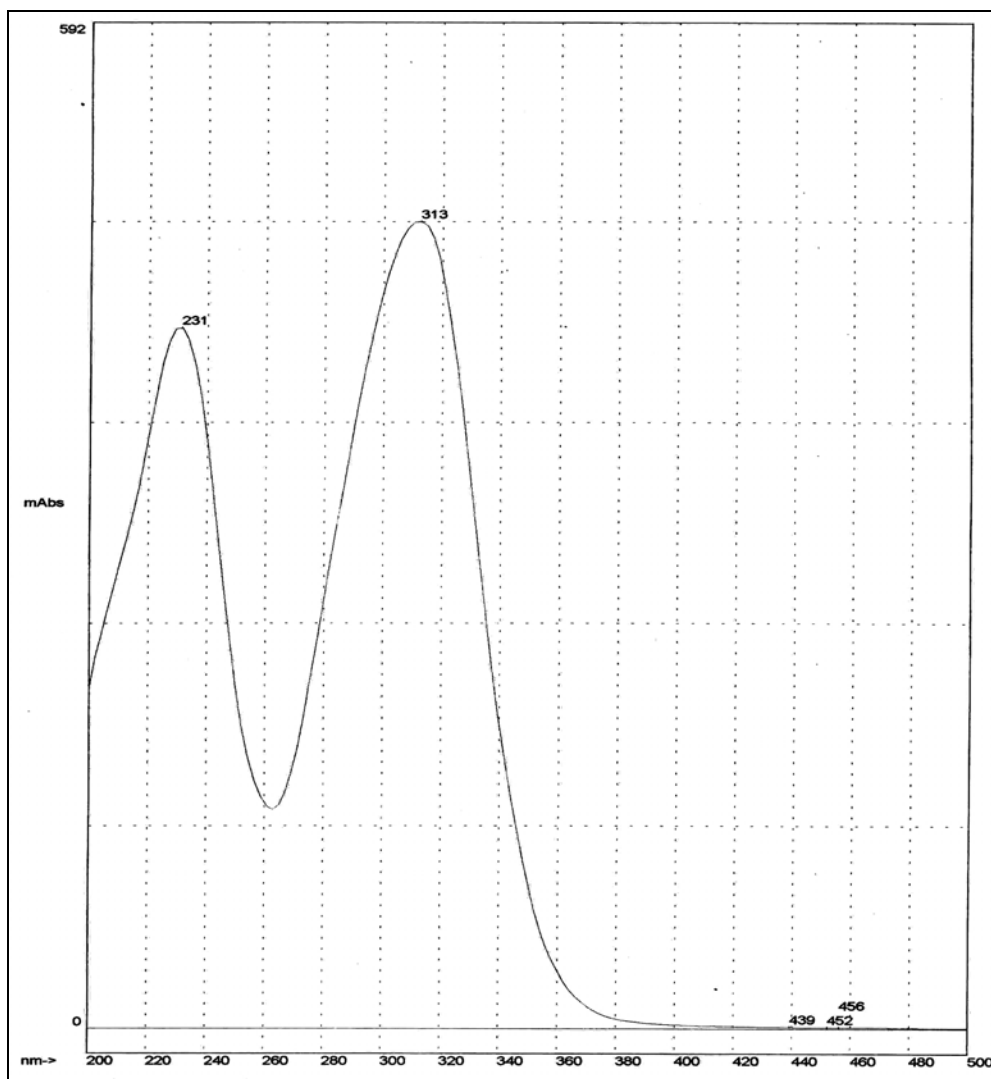
<b>Substâncias</b>	<b>Máximos de absorção (<math>\lambda_{\text{max}}</math> nm)</b>
Tempo de retenção 34,6 min.	227, 327
Tempo de retenção 39,8 min.	236, 325
Tempo de retenção 42,0 min.	231, 313
ác. p-cumárico	227, 310
ác. caféico	243, 326
ác. ferúlico	235, 324
ác. sinápico	239, 325
ác. o-cumárico	227, 275, 325



Espectro 13: Espectro no UV da substância eluída em 34,6 min. do extrato etanólico das raízes de *C. alba*.



Espectro 14: Espectro no UV da substância eluída no tempo de 39,8 min. do extrato etanólico das raízes de *C. alba*.



Espectro 15: Espectro no UV da substância eluída em 42,0 min. do extrato etanólico das raízes de *C. alba*.

Apesar do cromatograma não apresentar uma linha-base satisfatória, a simetria observada para os sinais mostrou-se satisfatória, fazendo com que a interpretação dos espectros relativos aos picos pudesse ser feita de uma forma próxima à realidade. Nem todos os espectros puderam ser interpretados em face das diversidades estruturais possíveis.



## **2.2 – Pesquisa de alcalóides nas raízes de *C. alba***

A avaliação do extrato etanólico e das frações obtidas em hexano, diclorometano, acetato de etila e 1-butanol por cromatografia em camada delgada com relação ao conteúdo de alcalóides, apontou resultado negativo para presença desses metabólitos nas raízes da “cainca”. Resultado semelhante foi encontrado na análise do resíduo obtido pela extração em meio básico conforme descrito na parte experimental. Apesar de El Abbadi e col. 1989 terem isolado dois alcalóides isoquinolínicos desta parte da planta, não foi possível detectar a presença destes metabólitos, mesmo quando seguimos a metodologia adotada pelos pesquisadores. Considerando que os autores não mencionaram a quantidade de planta trabalhada, é impossível avaliar a percentagem dos alcalóides no extrato por eles trabalhado. Assim, podemos deduzir que possivelmente os alcalóides estejam ausentes ou em concentrações bastante reduzidas nas raízes da planta coletada para a elaboração deste trabalho.

## **3- Avaliação toxicológica do extrato etanólico de *C. alba***

A investigação das propriedades toxicológicas das substâncias às quais o homem está exposto é de vital importância para a segurança de seu uso. O estudo toxicológico de *C. alba* se sustenta no fato desta planta ser usada na medicina popular e estar disponível sob forma de fitoterápico em escala industrial sob o nome comercial de Rheumoflora®, sendo fabricado pela Flora Medicinal atualmente sobre o comando da Natura do Brasil. O Rheumoflora® é um medicamento fitoterápico registrado em 1924 e sua formulação foi desenvolvida pelo Dr. J. Monteiro da Silva associando as raízes da “cainca” (*Chiococca alba*) e de uma samambaia (*Polypodium lepidopteris* Langsd. & Fisch.) Kunze (Bulário do Rheumoflora®).

Atualmente, a RDC 17 (ANVISA/MS, 2000) exige que sejam realizados testes de toxicidade que garantam a segurança no uso de medicamentos à base de plantas. Os

testes toxicológicos devem assegurar a ausência de risco tóxico para o usuário, através da indicação da presença de grupos ou substâncias químicas tóxicas presentes no fitoterápico possibilitando uma dose segura e adequada para os fins terapêuticos.

Os testes farmacológicos atestam a coerência com relação às indicações terapêuticas propostas. Se as condições anteriores não forem todas atendidas, a referida resolução indica a avaliação da relação risco/benefício, podendo ser exigidas comprovação de segurança de uso e/ou eficácia terapêutica, e/ou ainda a adoção de restrições à forma farmacêutica, frequência de uso e indicações, de modo a possibilitar a utilização adequada do medicamento e não causar danos à saúde dos usuários.

O uso popular e mesmo o tradicional, não são suficientes para validar as plantas medicinais como eficazes e seguras. Seu uso deve ser fundamentado em evidências experimentais comprobatórias de que o risco a que se expõem aqueles que a utilizam é suplantado pelos benefícios que possam advir (SIMÕES *et al.*, 1999). Pouco se conhece sobre os constituintes químicos de *C. alba* e os estudos toxicológicos podem colaborar no fornecimento de dados, que indiquem a possível existência de propriedades tóxicas no extrato bruto das raízes.

### **3.1 – Estudo da toxicidade aguda por via oral, intraperitoneal e subcutânea**

A toxicidade aguda por via oral, intraperitoneal e subcutânea do extrato etanólico de *C. alba* foi investigada em camundongos Swiss Albinos machos e fêmeas e está ilustrada de forma compilada na tabela 5.

Tabela 5: Toxicidade aguda do extrato etanólico de *C. alba* para as vias oral, intraperitoneal e subcutânea.

Dose (mg/kg)	Sexo	Oral		Intraperitoneal		Subcutânea	
		M/T	Sintomas	M/T	Sintomas	M/T	Sintomas
<b>62,5</b>	M	---	---	0/2	Sonolência, tremores, taquipnéia e piloereção	0/2	Sem alterações
	F	---	---	0/2	Sonolência, tremores e taquipnéia	0/2	Sem alterações
<b>125</b>	M	---	---	2/2	Piloereção, prostração sonolência e tremores	0/2	Sem alterações
	F	---	---	0/2	Prostração e piloereção	0/2	Sem alterações
<b>250</b>	M	0/2	Hipoatividade	2/2	Sonolência, prostração e taquipnéia	1/2	Prostração
	F	0/2	Hipoatividade	0/2	Sonolência, prostração e taquipnéia	1/2	Prostração
<b>500</b>	M	0/2	Hipoatividade	1/2	Sonolência, prostração e taquipnéia	2/2	Letargia e prostração
	F	0/2	Hipoatividade	2/2	Sonolência, prostração e taquipnéia	2/2	Letargia e prostração
<b>1000</b>	M	0/2	Hipoatividade	---	---	---	---
	F	0/2	Hipoatividade	---	---	---	---
<b>2000</b>	M	0/2	Hipoatividade	---	---	---	---
	F	0/2	Hipoatividade	---	---	---	---

Quadro clínico apresentado pelos camundongos – machos (M) e fêmeas (F) – tratados com dose única do extrato etanólico de *C. alba* diluído em água destilada pelas vias oral, intraperitoneal e subcutânea. M= mortos e T= animais tratados.

A metodologia empregada na realização destes experimentos utilizou um número reduzido de animais (dois machos e duas fêmeas em cada intervalo de dose testado) para a determinação da dose letal aproximada (DLA) por via oral, intraperitoneal e subcutânea. Durante os últimos anos, por razões éticas e econômicas, os toxicologistas têm se empenhado em reduzir o número de animais necessários para a avaliação da segurança dos agentes químicos e em usar métodos *in vitro* sempre que possível. A determinação da dose letal mediana (DL<sub>50</sub>) vêm sendo questionada pelo

elevado número de animais sacrificados para prover um valor estatisticamente válido. O método de determinação da  $DL_{50}$  depende de muitas variáveis como a espécie animal usada, do sexo, da idade, da dieta, da temperatura e umidade do ambiente, dos ritmos circadianos e dos procedimentos laboratoriais dentre outros fatores, de modo que a reprodutibilidade dos resultados obtidos só pode ser mantida sob rígidas condições experimentais. Assim, a substituição da  $DL_{50}$  por outras metodologias como a dose letal aproximada (DLA) que emprega um número menor de animais poderia fornecer informações úteis na classificação dos agentes químicos de acordo com suas propriedades tóxicas e na seleção de doses para estudos de doses repetidas ou crônicas posteriores (PAUMGARTTEN *et al.*, 1989).

### **3.1.1 – Estudo da toxicidade aguda por via oral**

A avaliação da toxicidade aguda por via oral mostrou que as raízes desta planta não provocaram mortes nos camundongos machos e fêmeas tratados até a dose máxima testada de 2000 mg/kg (tabela 6). Os dados relativos às variações de peso corporal são apresentadas na tabela 7. Os camundongos machos e fêmeas que foram tratados com a dose de 2000 mg/kg por via oral apresentaram queda nos registros de peso no segundo dia após o tratamento (figura 12 e 13), em decorrência à parada na alimentação por um período de algumas horas. Nos demais grupos de doses (250, 500 e 1000 mg/kg) não foram observadas diminuições nos valores de peso corporal registrados após o tratamento com a planta.

Nas fêmeas que receberam a dose de 2000 mg/kg, não ocorreu a queda de peso nos primeiros dias apresentada pelos machos. Elas permaneceram com ganho de peso estável até o final do período de observação. O mesmo se verificou no ganho diário de peso das fêmeas que receberam as doses de 1000, 500 e 250 mg/kg por via oral

(figura 13). A necropsia dos animais sacrificados por deslocamento cervical realizada no 15º após o tratamento, não revelou nenhum achado macroscópico digno de registro em todos os animais tratados com o extrato.

Tabela 6: Toxicidade aguda do extrato etanólico de *C. alba* por via oral.

<b>Dose (mg/kg)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Mortos / Tratados</b>	<b>Quadro Clínico</b>
<b>2000</b>	<b>M</b>	0 / 2	Hipoatividade.
	<b>F</b>	0 / 2	Hipoatividade.
<b>1000</b>	<b>M</b>	0 / 2	Hipoatividade.
	<b>F</b>	0 / 2	Hipoatividade.
<b>500</b>	<b>M</b>	0 / 2	Hipoatividade.
	<b>F</b>	0 / 2	Hipoatividade.
<b>250</b>	<b>M</b>	0 / 2	Hipoatividade.
	<b>F</b>	0 / 2	Hipoatividade.
<b>0 (Veículo)</b>	<b>M</b>	0 / 2	Sem alterações.
	<b>F</b>	0 / 2	Sem alterações.

Quadro clínico apresentado pelos camundongos – machos (M) e fêmeas (F) – tratados por entubação gástrica com dose única do extrato etanólico de *C. alba* diluído em água destilada (veículo). Os animais foram observados por 14 dias após o tratamento.

Um quadro de hipoatividade estabeleceu-se após a dose única com o extrato por entubação gástrica em todos os animais tratados. Este efeito teve início em poucos minutos e foi observado em todos os intervalos de dose testados (2000, 1000, 500 e 250 mg/kg/peso corporal) e incluiu sinais de sonolência e catatonia. Os animais que receberam a menor dose (250 mg/kg) recuperaram-se do estado hipoativo em menor tempo do que os que receberam as doses superiores. Portanto, o efeito de hipoatividade pareceu ser dependente da dose administrada considerando-se as diferenças nos períodos de latência observados para a recuperação do mesmo tanto nos camundongos machos quanto nas fêmeas.

Algumas espécies de Rubiaceae apresentam propriedades ligadas a mecanismos centrais que levam à ocorrência de mudanças comportamentais. No gênero *Psychotria*, a espécie *Psychotria viridis* possui o alcalóide N,N-dimetiltriptamina, isolado das folhas desta planta, que apresenta atividade agonista serotoninérgica. Este metabólito age no sistema nervoso central levando ao aparecimento de estados hipnóticos e alucinógenos em humanos que ingerem esta planta (CALLAWAY *et al.*, 1999).

Tabela 7: Ganho de peso (g) de camundongos tratados com dose única do extrato etanólico de *C. alba* por via oral.

Dose (mg/kg)	Sexo	N	Dias após o tratamento							
			0	2	5	6	8	10	12	14
<b>0 (veículo)</b>	M	2	37,2±4,2	37,9±3,1	38,5±4,2	39,8±4,6	40,1±7,8	41,1±6,6	42,6±5,5	43,6±5,1
	F	2	33,2±2,3	34,5±1,2	35,6±1,6	36,7±1,7	36,3±1,5	36,6±2,0	37,9±1,6	37,9±1,6
<b>250</b>	M	2	38,8±5,4	39,6±4,3	41,1±4,0	40,6±2,8	42,0 ±4,1	44,4±3,5	44,3±3,6	45±3,8
	F	2	30,9±0,3	32,1±0,2	32,9±1,7	32,6±1,6	33,0 ±1,8	34,8±0,2	34,2±0,6	35±0,1
<b>500</b>	M	2	37,4±1,5	37,0±0,6	38,7±1,7	38,4±1,2	38,9±1,2	40,4±3,1	39,7±2,8	40,4±1,9
	F	2	28,8±0,9	29,3±0,1	30,6±1,6	30,4±1,5	30,8±1,6	33,4±1,4	33,0±1,4	32,8±1,2
<b>1000</b>	M	2	38,6±4,5	39,7±2,4	40,6±2,1	42,7±1,9	42,5±1,7	45,3±0,9	45,3±0,7	45,5±1,0
	F	2	28,3±0,6	28,7±0,5	29,7±1,2	30,3±1,7	30,4±0,3	32,8±1,3	33,6±0,7	33,0±1,0
<b>2000</b>	M	2	33,5±2,1	28,1±1,5	34,0±1,6	34,8±1,6	36,6±2,8	38,0±2,6	38,8±4,0	40,0±4,0
	F	2	26,9±0,8	25,3±0,5	27,6±0,1	27,6±0,6	28,5±0,7	29,5±0,3	29,9±0,1	29,0±1,3

Alterações de peso corporal de camundongos machos (M) e fêmeas (F) tratados por entubação gástrica com dose única do extrato etanólico de *C. alba* diluído em água destilada. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão e foram analisados com o Teste *t* de Student. \* Valores diferentes ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo veículo (controle). N = número de animais.

Como não foram evidenciadas na literatura a presença de substâncias isoladas das raízes de *C. alba* que pudessem produzir mudanças comportamentais iguais às observadas, permanece obscura a identidade do(s) constituinte(s) responsável(is) pelo efeito hipotativo verificado. Este resultado sugere que as raízes de *C. alba* podem possuir substâncias que agiram sobre o sistema nervoso central e, encoraja a realização

de experimentos comportamentais como o campo aberto para a investigação do efeito de hipoatividade observado nos animais tratados por via oral.

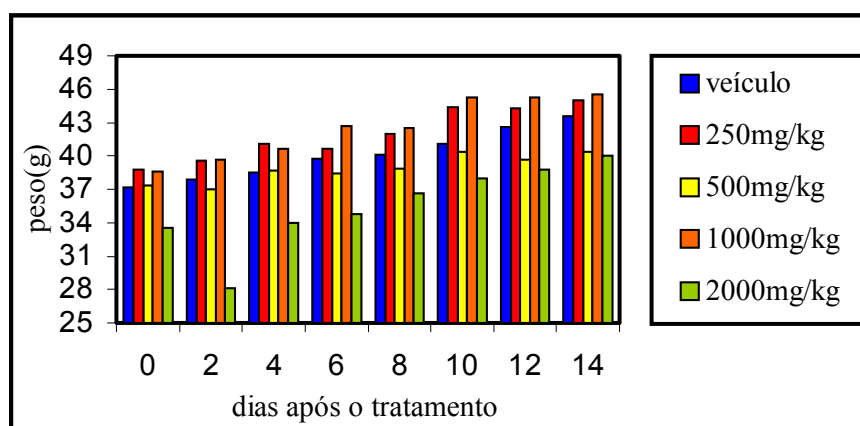


Figura 12: Oscilações de ganho de peso dos camundongos machos após dose única do extrato etanólico de *C. alba* por via oral.

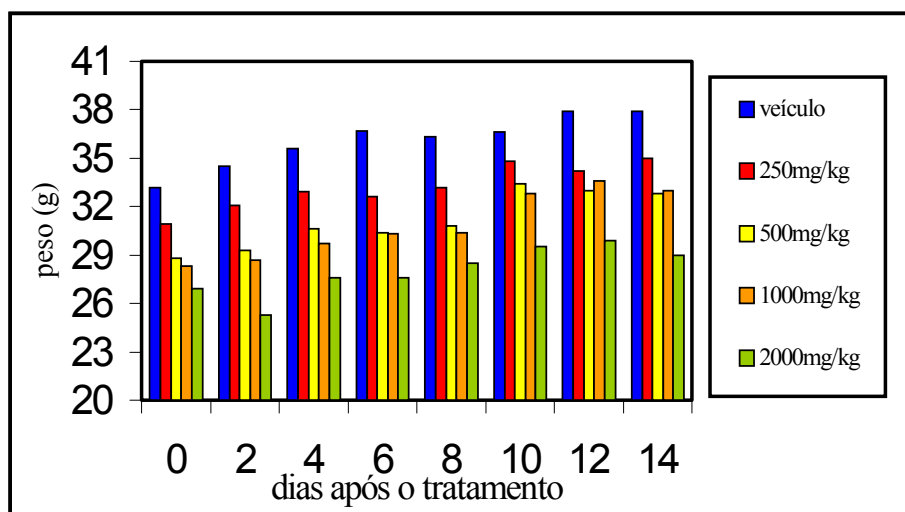


Figura 13: Oscilações de ganho de peso dos camundongos fêmeas após dose única do extrato etanólico de *C. alba* por via oral.

### 3.1.2 – Estudo da toxicidade por via intraperitoneal

No experimento de toxicidade aguda por via intraperitoneal foram tratados 2 animais de cada sexo em quatro intervalos de doses ( 500, 250, 125 e 62,5 mg/kg). Os resultados estão ilustrados na tabela 8 e mostram que as fêmeas e os machos tratados

com a dose de 500 mg/kg morreram em decorrência do tratamento. Nos camundongos que receberam a dose de 250 mg/kg, apenas uma fêmea sobreviveu ao tratamento com o extrato. As mortes observadas nos animais destes dois grupos de doses ocorreram dentro do intervalo de 1 a 2 horas após a administração. Os sintomas observados iniciaram-se poucos minutos após o tratamento e incluíram sonolência, prostração, tremores e taquipnéia e perduraram até o momento da morte. Apesar do quadro supra citado, os animais permaneceram respondendo a estímulos sonoros. A fêmea que sobreviveu à dose de 250 mg/kg recuperou-se dos sintomas que precederam a morte dos outros animais e não apresentou queda no peso nos dias após o tratamento por dose única com o extrato etanólico de *C. alba* (tabela 9). Na dose de 125 mg/kg, um macho tratado morreu apresentando um quadro clínico semelhante ao anteriormente, mas a sintomatologia incluía piloereção e tremores além de um período de latência de 7 horas para a ocorrência da morte.

Para os demais animais tratados com o extrato das raízes de *C. alba* não foram observados mortes nos grupos de dose de 125 (fêmeas) e 62,5 mg/kg até o final do período de observação de 14 dias. As duas fêmeas tratadas com a dose de 125 mg/kg apresentaram sintomas como prostração e piloereção, que se iniciaram poucos minutos após o tratamento e duraram por algumas horas. Na dose de 62,5 mg/kg, a sintomatologia dos animais de ambos os sexos compreendeu piloereção, minutos após a administração, e prostração transitórias que desapareceram com o tempo. As figuras 14 e 15 mostram o registro nos ganhos de peso dos animais sobreviventes à administração aguda do extrato por via intraperitoneal por 14 dias após o tratamento com a planta.



Tabela 8: Toxicidade aguda do extrato etanólico da *C. alba* por via intraperitoneal.

<b>Dose (mg/kg)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Mortos/Tratados</b>	<b>Latência para morte (N)</b>	<b>Quadro Clínico</b>
<b>500</b>	<b>M</b>	2 / 2	>1h , <2h	Sonolência, prostração, tremores, taquipnéia, mas respondendo a estímulos sonoros.
	<b>F</b>	2 / 2	>1h , <2h	Sonolência, prostração, tremores, taquipnéia, mas respondendo a estímulos sonoros.
<b>250</b>	<b>M</b>	2 / 2	>1h , <2h	Sonolência, prostração, tremores, permanecendo no canto da caixa com taquipnéia, mas respondendo a estímulos sonoros.
	<b>F</b>	1 / 2	>1h , <2h	Sonolência, prostração, tremores, permanecendo no canto da caixa com taquipnéia, mas respondendo a estímulos sonoros.
<b>125</b>	<b>M</b>	1 / 2	<24h	Sonolência, prostração piloereção e tremores.
	<b>F</b>	0 / 2	-	Prostração, piloereção.
<b>62,5</b>	<b>M</b>	0 / 2	-	Sonolência e em seguida tremores, alteração da frequência respiratória e piloereção
	<b>F</b>	0 / 2	-	Sonolência e em seguida tremores e alteração da frequência respiratória.
<b>0 (Veículo)</b>	<b>M</b>	0 / 2	-	Sem alterações.
	<b>F</b>	0 / 2	-	Sem alterações.

Mortalidade, latência para a morte e quadro clínico apresentado por camundongos – machos (M) e fêmeas (F) – tratados por via intraperitoneal com dose única do extrato etanólico de *C. alba* diluído em água destilada (veículo). Os animais sobreviventes foram observados por 14 dias após o tratamento. (N) = número de animais mortos com o período de latência assinalada.

Nenhuma alteração macroscópica nas vísceras pode ser evidenciada na necropsia realizada, tanto dos animais que morreram durante o período de observação quanto daqueles sacrificados após o fim do mesmo.

Tabela 9: Ganho de peso (g) dos camundongos após dose única do extrato etanólico de *C. alba* por via intraperitoneal.

Dose (mg/kg)	Sexo	N	Dias após o tratamento							
			0	2	4	6	8	10	12	14
250	F	1	32,1	29,6	32,8	34,7	35,5	36,2	36,7	37,3
125	M	1	33,5	30,8	34,2	34,7	34,9	35,2	36,5	37,8
	F	2	31,3±3,6	31,5±0,9	32,0±2,4	32,3±3,6	33,1±3,0	33,8±4,1	34,5±3,9	35,0±4,3
62,5	M	2	34,0±2,0	35,6±2,6	37,3±2,4	37,2±2,8	37,7±2,6	39,8±4,2	40,5±3,7	40,7±3,3
	F	2	28,8±3,0	27,6±1,5	30,1±1,5	30,8±1,4	31,7±1,6	32,8±0,8	31,9±0,9	32,8±1,5
0 (Veículo)	M	2	27,4±1,9	29,5±3,6	31,6±5,1	32,4±5,0	33,7±6,3	33,9±7,5	34,4±5,5	35,8±4,3
	F	2	28,9±0,8	31,4±1,6	31,7±1,1	32,0±0,6	32,6±0,2	33,2±1,0	34,0±0,7	35,6±1,3

Alterações de ganho de peso de camundongos machos (M) e fêmeas (F) tratados por via intraperitoneal com dose única do extrato etanólico de *C. alba* diluído em água destilada. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão e referem-se apenas aos animais que sobreviveram até o período final de observação (14 dias). Os dados foram analisados com o Teste *t* de Student. \* Valores diferentes ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo veículo (controle). N = número de animais sobreviventes. Todos os animais tratados com a dose de 500 mg/kg e um macho tratado com a dose de 250 mg/kg peso corporal morreram.

Nos testes onde avaliou-se a toxicidade do extrato etanólico da “cainca” através da via intraperitoneal utilizou-se concentrações menores do que as empregadas por via oral. O extrato etanólico de *C. alba* apresentou efeitos tóxicos mesmo em doses mais baixas quando administrado por via parenteral. A Dose Letal Aproximada (DLA) obtida segundo procedimento descrito por Kennedy e colaboradores, em 1986, foi de 250 mg/kg para as fêmeas. Entretanto, os machos pareceram ser mais sensíveis aos efeitos dos componentes da planta apresentando uma DLA de 125 mg/kg. Efeitos centrais puderam ser observados como sonolência e tremores, além de alterações na frequência respiratória em todas as doses testadas por via intraperitoneal. O período de latência para a ocorrência das mortes foi de apenas duas horas para as doses de 500 e 250 mg/kg, demonstrando a alta letalidade do extrato.

Em 1983, Schapoval e colaboradores realizaram experimentos de toxicidade aguda com doses crescentes do extrato alcóolico das raízes de *C. alba* utilizando camundongos Swiss. Os animais deste experimento foram observados por 4 horas e a Dose Letal Mediana ( $DL_{50}$ ) encontrada foi de 134,28 mg/kg por via intraperitoneal para ambos os sexos. A toxicidade das raízes *C. alba* foi atribuída pelos pesquisadores à possíveis glicosídeos cardiotônicos identificados através de testes fitoquímicos preliminares. A presença de glicosídeos cardiotônicos ou quaisquer outras substâncias responsáveis pela toxicidade observada, tanto pelo experimento realizado por Schapoval e colaboradores quanto na encontrada neste trabalho, ainda não foram esclarecidas.

A DLA de 125 mg/kg para os animais do sexo masculino encontrada no presente estudo, se aproxima da  $DL_{50}$  encontrada por Schapoval e colaboradores em 1983, apesar das duas metodologias diferirem no número de animais utilizados, os valores encontrados foram semelhantes e corroboram com indícios que o uso da dose letal aproximada é um método adequado e recomendado pela sua eficiência, praticidade e redução do número de animais sacrificados.

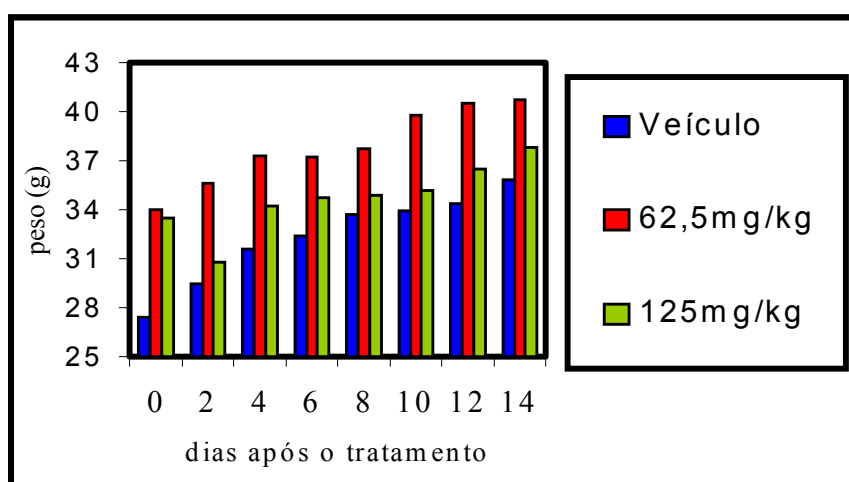


Figura 14: Oscilações de ganho de peso dos camundongos machos após dose única do extrato etanólico de *C. alba* por via intraperitoneal.

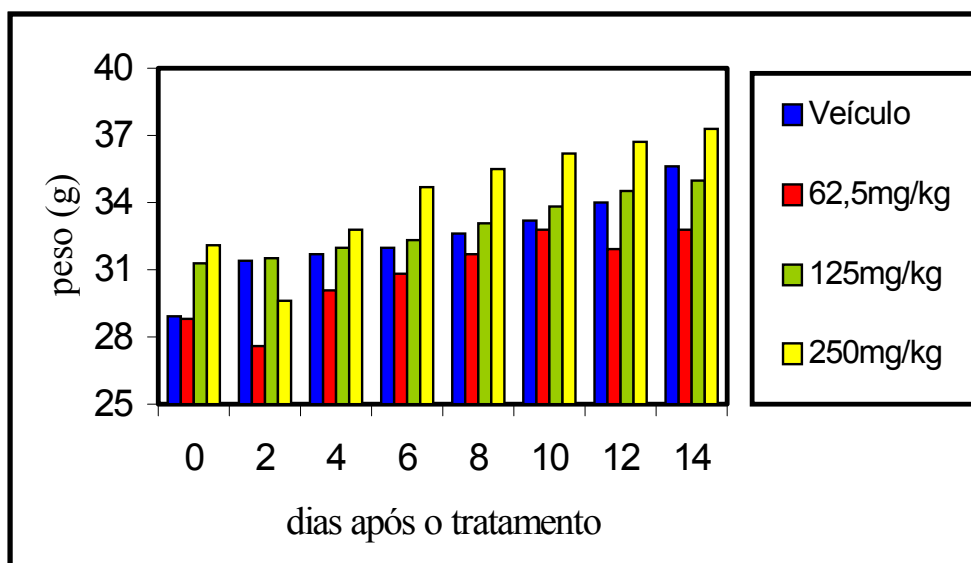


Figura 15: Oscilações de ganho de peso dos camundongos fêmeas após dose única do extrato de *C. alba* por via intraperitoneal.

### 3.1.3 – Estudo da toxicidade por via subcutânea

A toxicidade aguda por via subcutânea está ilustrada na tabela 10, onde dois machos e duas fêmeas tratadas com a dose de 500 mg/kg peso corporal morreram com um período de latência de 2 dias, apresentando um quadro de letargia nas primeiras horas e posteriormente uma prostração persistente até a morte. No grupo tratado com a dose de 250 mg/kg, metade dos animais morreram apresentando prostração como sintoma principal com um período de latência de 2 dias para as fêmeas e 3 dias para os machos.

Tabela 10: Toxicidade aguda do extrato etanólico de *C. alba* por via subcutânea.

Dose (mg/kg)	Sexo	Mortos/Tratados	Latência para a morte (N)	Quadro Clínico
500	M	2 / 2	>24h, <48h (2)	Letargia.
	F	2 / 2	>24h, <48h (2)	Prostração.
250	M	1 / 2	>48h, <72h	Prostração.
	F	1 / 2	>24h, <48h	Prostração.
125	M	0 / 2	-	Sem alterações.
	F	0 / 2	-	Sem alterações.
62,5	M	0 / 2	-	Sem alterações.
	F	0 / 2	-	Sem alterações.
0 (Veículo)	M	0 / 2	-	Sem alterações.
	F	0 / 2	-	Sem alterações.

Mortalidade, latência para a morte e quadro clínico apresentado por camundongos – machos (M) e fêmeas (F) – tratados por via subcutânea com dose única do extrato etanólico de *C. alba* diluído em água destilada (veículo). Os animais sobreviventes foram observados por 14 dias após o tratamento. (N) – número de animais mortos com o período de latência assinalada.

Nos animais que receberam as doses de 125 e 62,5 mg/kg, não foram observadas mortes até o final do período de observação (14 dias) e nenhuma alteração no quadro clínico digna de registro pode ser verificada. Quanto ao ganho de peso diário (tabela 11), houve perda de peso após a administração, com posterior recuperação de todos os grupos de dose tratados com o extrato em relação ao grupo controle. Tanto os machos quanto as fêmeas apresentaram quedas nos pesos no dia seguinte a administração do extrato etanólico de *C. alba*, ilustradas nas figuras 16 e 17, respectivamente. O emagrecimento observado em todos os camundongos tratados com a planta deveu-se aos períodos de prostração e letargia que os animais apresentaram em decorrência do tratamento. No quarto dia após a administração subcutânea do extrato os animais voltaram a se alimentar com posterior recuperação do peso perdido indicando um possível efeito do extrato etanólico de *C. alba*.

Os sintomas de prostração, letargia e emagrecimento observado após o tratamento com a "cainca" foi também verificado após administração subcutânea de outra espécie vegetal pertencente a mesma família. O tratamento agudo com o extrato bruto das folhas de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae) em ratos Wistar, provocou diminuição na locomoção espontânea, aumento nos períodos de imobilidade e inanição em experimento comportamental realizado em campo aberto. O decréscimo na atividade geral apresentada após a administração desta espécie de Rubiaceae sugeriu um efeito neuroléptico ligado aos receptores de dopamina no sistema nervoso central pela via mesoestriatal mais relacionada à função motora (GÓRNIAK, PALERMO & SOUZA-SPINOSA, 1990). Talvez o efeito depressivo observado após o tratamento com a "cainca" possa estar relacionado a mecanismos centrais, necessitando de maiores investigações tanto no sentido de esclarecer a(s) substância(s) dotada(s) desta capacidade quanto ao modo de ação utilizado para que este efeito possa ser observado.

A DLA para a via subcutânea foi de 250 mg/kg para ambos os sexos, e não observou-se mortes abaixo da dose de 125 mg/kg, para as quais a sintomatologia mostrou-se mais branda que quando o extrato foi administrado na dose por via intraperitoneal. Nas doses de 125 e 62,5 mg/kg por via subcutânea, diferentemente da via intraperitoneal, os animais tratados não apresentaram nenhum sintoma após a administração do extrato. Nos animais que morreram em decorrência do tratamento com o extrato etanólico das raízes de *C. alba* nas doses de 500 e 250 mg/kg as causas das mortes não foram esclarecidas.

Tabela 11: Ganho de peso (g) de camundongos tratados com dose única do extrato etanólico de *C. alba* por via subcutânea.

Dose (mg/Kg)	Sexo	N	Dias após o tratamento							
			0	2	4	6	8	10	12	14
250	M	1	36,6	30,5	36,2	38,1	38,9	39,3	40,1	41,3
	F	1	30,7	28	31,2	31,5	30,4	32,4	33,2	33,8
125	M	2	36,0±1,1	34,3±1,9	35,7±0,9	36,2±1,8	36,6±2,5	36,7±0,8	36,9±1,3	37,5±1,6
	F	2	25,6±0,2	22,5±0,2	28,3±0,1	29,5±0,5	30±0,1	30,4±0,8	30,7±1,6	32,1±1,1
62,5	M	2	40,9±3,9	37,0±2,8	44,2±3,2	43,2±3,4	44,3±2,7	44,3±3,6	44,6±2,5	45,3±3,1
	F	2	26,3±1,7	23,2±1,2	29,4±1,3	29,4±1,5	31,8±1,5	30,6±1,2	31,5±1,6	33,9±1,9
0 (Veículo)	M	2	30,7±0,2	31,3±0,2	31,8±0,8	32±0,1	32,2±0,8	32,4±0,6	33,2±1,7	33,8±2,6
	F	2	30,3±1,0	31,8±1,1	32,2±1,3	32,4±0,1	32,7±0,6	33,1±0,3	33,9±0,7	34,2±0,4

Alterações de peso corporal (g) de camundongos machos (M) e fêmeas (F) tratados por via subcutânea com dose única do extrato etanólico de *C. alba* diluído em água destilada. Os dados são apresentados com média ± desvio padrão e referem-se aos animais que sobreviveram até o final do período de observação (14 dias). Os dados foram analisados com o Teste *t* de Student. \* Valores diferentes ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo veículo (controle). Não houveram sobreviventes na dose de 500 mg/kg peso corporal.

Todos os animais que morreram durante o experimento de toxicidade aguda por via subcutânea foram necropsiados assim que constatados os óbitos, mas nenhum sinal ou alteração macroscópica foi observada, o que poderia sugerir ou indicar o(s) órgão(s) ou tecido(s) afetado(s) pela(s) substância(s) presentes no extrato responsável(is) pela toxicidade observada. Nos camundongos sacrificados ao final do período de observação de 14 dias após o tratamento, os dados de necropsia não apontaram para nenhuma lesão ou sinal de toxicidade visíveis nas vísceras.

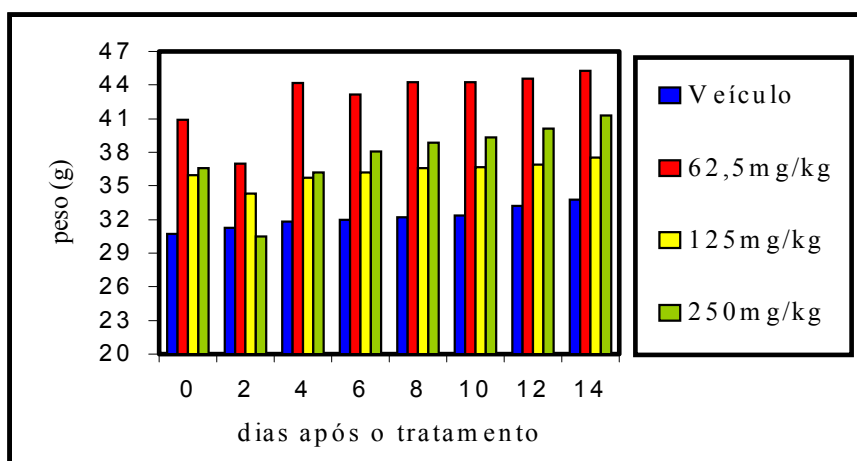


Figura 16: Oscilações de ganho de peso dos camundongos machos após dose única do extrato etanólico de *C. alba* por via subcutânea.

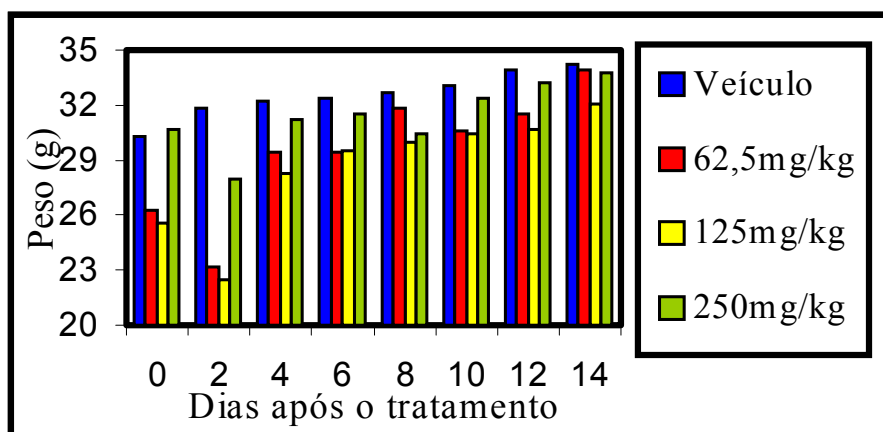


Figura 17: Oscilações de ganho de peso dos camundongos fêmeas após dose única do extrato etanólico de *C. alba* por via subcutânea.

Quando analisa-se os resultados obtidos com a administração do extrato de *C. alba* por via enteral (oral) e por vias parenterais (intraperitoneal e subcutânea), verifica-se grandes diferenças entre elas. Por via oral o extrato da “cainca” não provocou mortes até o limite de 2000 mg/kg e o único sinal que pode ser notado nos animais foi um quadro de hipoatividade de rápida instalação e evolução de algumas horas. Mas, quando o extrato foi administrado por via intraperitoneal observou-se mortalidade em doses maiores ou iguais a 125 mg/kg nos machos e 250 mg/kg nas



fêmeas e por via subcutânea em doses maiores ou iguais a 250 mg/kg para ambos os sexos em períodos de tempo considerados breves. Aliado a alta mortalidade encontramos um amplo quadro de sintomas que estenderam-se até as menores doses administradas por via intraperitoneal.

Ficam claras as diferenças entre as vias de administração e que os princípios tóxicos responsáveis pela mortalidade podem estar sendo degradados pelo pH do estômago ou pouco absorvidos pelo trato gastrointestinal, dentre outros fatores, quando administrado por via oral. No estômago as substâncias químicas entram em contato com muitas enzimas digestivas (pepsina, renina e lipase gástrica) em adição ao ácido clorídrico. Assim, a absorção ou as características químicas de algumas substâncias presentes no extrato podem ter sido alteradas pela interação com o conteúdo gástrico. Por via oral, ao contrário das vias intraperitoneal e subcutânea, o princípio tóxico pode estar sendo inativado por enzimas que compõe o sistema responsável pela biotransformação dessa(s) substância(s).

### **3.2 – Estudo da toxicidade de doses repetidas (subaguda) pelas vias oral e intraperitoneal**

A finalidade dos testes de doses repetidas (subagudo) é descobrir ações qualitativa ou quantitativamente diferentes produzidas pelo maior tempo de exposição, permitindo medir o período de latência para a instalação dos efeitos tóxicos e o acúmulo das substâncias no organismo (SIMÕES *et al.*, 1999). No estudo de toxicidade de doses repetidas foram usados um número maior de animais (dez machos e dez fêmeas para cada dose testada) a fim de comprovar os resultados observados no experimento de dose única além de verificar o comportamento dos camundongo frente repetidas exposições ao extrato etanólico de *C. alba*.

### 3.2.1 – Estudo da toxicidade de doses repetidas (subaguda) por via oral

Quando o extrato etanólico de *C. alba* foi testado em doses repetidas por via oral em camundongos Swiss Albinos por 14 dias, ficou demonstrado que o mesmo não provocou nenhuma morte nos animais tratados até a dose máxima de 2000 mg/kg/dia. O único sintoma que pode ser apreciado, tanto nos camundongos machos quanto nas fêmeas, em todos os intervalos de dose avaliados (2000, 1000, 500 e 250 mg/kg/dia) foi um quadro de hipoatividade. Este efeito iniciava-se poucos minutos após a administração por entubação gástrica e permanecia por algumas horas. Os animais ficavam sonolentos e estáticos dentro das caixas onde eram mantidos. Apesar dos sinais de hipoatividade, manifestada após cada administração até a quinta dose, os animais não apresentaram perdas de peso durante o tratamento com a planta (tabela 12).

Tabela 12: Ganho de peso (g) de camundongos tratados com doses repetidas do extrato etanólico de *C. alba* por via oral.

Dose (mg/kg)	Sexo	N	Dias após o tratamento							
			0	2	5	6	8	10	12	14
0 (veículo)	M	2	25,7±1,7	28,0±2,1	29,1±1,8	31,0± 2,0	31,0±2,5	33,2± 2,6	33,9±2,4	34,6±2,5
	F	2	29,1±2,0	31,8±2,2	31,4±2,6	31,8±2,6	31,0±2,9	32,3±2,8	32,9±3,1	33,3±3,3
500	M	2	26,4±3,2	28,7±3,1	28,1±3,1	30,0±4,1	30,4±3,5	31,7±3,8	32,6±4,0	33,4±3,9
	F	2	30,5±3,4	32,0±3,4	31,2±2,9	31,4±2,8	31,4±2,9	31,4±2,8	32,2±2,7	32,6±2,8
1000	M	2	27,7±2,6	29,8±2,6	29,5±2,4	30,3±2,2	31,0 ±2,2	32,7±2,3	32,5± 4,0	34,8±2,3
	F	2	29,7±1,9	30,8±1,4	30,6±1,0	30,1±1,5	30,5 ±1,1	31,4±1,0	31,6±1,1	32,0±1,4
2000	M	2	28,4±3,9	30,2±3,8	30,9±4,4	32,1±3,4	29,9±4,2	31,4±4,9	33,2±4,1	34,6±4,5
	F	2	29,0±1,7	30,3±1,7	30,4±1,3	29,6±1,4	29,0±1,4	29,4±1,8	30,0±1,6	30,6±1,8

Alterações de peso corporal de camundongos machos (M) e fêmeas (F) tratados por entubação gástrica com doses repetidas do extrato etanólico de *C. alba* diluído em água destilada. Os resultados são apresentados com média ± desvio padrão e foram analisados com o Teste *t* de Student. \* Valores diferentes ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo veículo (controle). N = número de animais.

Na necropsia dos animais sacrificados ao final do período de tratamento de 14 dias com o extrato, não se verificou nenhum sinal macroscópico de toxicidade nos órgãos dos camundongos e não houve diferença significativa no peso do fígado, baço, rins e coração dos camundongos dos grupos que receberam as doses testadas (2000, 1000 e 500 mg/kg/dia) em relação ao grupo veículo que recebeu apenas o diluente do extrato (água destilada) por via oral, ilustrada na tabela 13. Não foram encontradas perfurações ou sinais de hiperemia estomacal em todos os animais tratados.

Tabela 13: Peso (g) dos órgãos de camundongos tratados com o extrato etanólico de *C. alba* por via oral em doses repetidas por 14 dias.

Dose (mg/kg)	Sexo	N	Peso dos órgãos (g)				
			Fígado	Baço	Coração	Rim	
						direito	esquerdo
<b>0</b> (veículo)	<b>M</b>	10	1,91 ± 0,31	0,17 ± 0,03	0,16 ± 0,03	0,22 ± 0,03	0,23 ± 0,02
	<b>F</b>	10	1,79 ± 0,19	0,17 ± 0,02	0,16 ± 0,03	0,19 ± 0,04	0,19 ± 0,04
<b>500</b>	<b>M</b>	10	1,93 ± 0,38	0,17 ± 0,06	0,15 ± 0,03	0,21 ± 0,02	0,21 ± 0,03
	<b>F</b>	10	1,76 ± 0,28	0,19 ± 0,04	0,18 ± 0,04	0,19 ± 0,02	0,19 ± 0,02
<b>1000</b>	<b>M</b>	10	2,18 ± 0,25	0,20 ± 0,07	0,18 ± 0,04	0,23 ± 0,04	0,23 ± 0,05
	<b>F</b>	10	1,83 ± 0,17	0,17 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,18 ± 0,02
<b>2000</b>	<b>M</b>	10	2,15 ± 0,35	0,16 ± 0,04	0,17 ± 0,03	0,22 ± 0,04	0,22 ± 0,04
	<b>F</b>	10	1,73 ± 0,21	0,17 ± 0,03	0,14 ± 0,02	0,18 ± 0,05	0,18 ± 0,02

Peso (g) dos órgãos de camundongos machos (M) e fêmeas (F) tratados por entubação gástrica com doses repetidas do extrato etanólico de *C. alba* por 14 dias. O grupo veículo recebeu água destilada. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão do peso dos órgãos dos animais necropsiados ao final do tratamento e foram analisados com o Teste *t* de Student. \* Valores diferentes ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo veículo (controle).

Os experimentos de doses repetidas fornecem uma estimativa sobre os efeitos tóxicos produzidos após sucessivas doses da(s) substância(s)-teste e pode(m) revelar indícios sobre efeitos cumulativos. No caso do extrato etanólico de *C. alba*, o uso na forma de tintura no medicamento fitoterápico é comum por períodos prolongados, até o

desaparecimento dos sintomas e melhora do quadro que levou o indivíduo a administrá-la. A administração por via oral de doses constantes do extrato etanólico da planta por 14 dias consecutivos não provocou mortes nos camundongos tratados até a maior dose testada (2000 mg/kg/dia). Estes resultados poderiam, preliminarmente, subscrever a segurança no uso das raízes de *C. alba*.

Semelhante ao que ocorreu no experimento de dose única por esta via, os animais apresentaram hipoatividade como único sintoma aparente. Houve diferenças nos períodos de latências para a recuperação dos animais do estado hipoativo no qual se encontravam, sendo mais breve o tempo quanto menor a dose administrada (500 mg/kg/dia). Curiosamente, após o quinto dia de tratamento, os animais apresentaram uma maior tolerância ao extrato de *C. alba*, não sendo mais observados os efeitos de hipoatividade até a última dose administrada. Conceitua-se tolerância como a habilidade que o organismo desenvolve de responder com menos intensidade a um agente químico do que numa ocasião anterior para a mesma dose. O organismo se torna refratário ao efeito do agente em virtude de prévias exposições a ele. O fenômeno da tolerância deve-se a três mecanismos principais: a falha na translocação do agente químico nos receptores (esta hipótese apresenta poucos estudos experimentais); mecanismos de biotransformação (aumento da eliminação/excreção do agente); e por último, o mecanismo que envolveria mudanças numéricas e conformacionais de receptores a serem ativados pelo agente químico (LOOMIS & HAYES, 1996). Estes resultados permitem estudos futuros no sentido de verificar que mecanismo estaria envolvido na hipoatividade do extrato etanólico das raízes de *C. alba* para uma possível utilização desta planta como calmante ou ansiolítica.

Não há evidências de efeitos cumulativos, uma vez que não foram observadas alterações macroscópicas nos órgãos dos animais sacrificados ao final do período de

tratamento por 14 dias. A pesagem das vísceras, fígado, rins, baço e coração dos animais que receberam as doses do extrato não apresentaram diferenças significativas. Também foram descartados efeitos irritantes sobre a mucosa estomacal, pois não foram encontradas perfurações, úlceras ou hiperemia nos estômagos de todos os animais tratados. Os resultados indicam que as administrações repetidas com o extrato etanólico de *C. alba*, por via oral, não provocaram mortalidade sobre camundongos Swiss Albinos e, apesar dos animais apresentarem sinais de hipoatividade, estes não produziram efeitos sobre a ingestão de alimento, visto que não houve emagrecimento nos camundongos.

Uma vez comprovada a relação entre as doses testadas e os efeitos tóxicos produzidos pelo extrato etanólico de *C. alba* por via oral pode-se estabelecer que o NOAEL (nível máximo de dose em que não se observam efeitos adversos) foi maior que 2000 mg/kg/dia. Este é um parâmetro importante na avaliação da margem de segurança da planta pela população. O extrato etanólico de *C. alba* na maior dose administrada aos camundongos (2000 mg/kg) corresponde à 20 gramas de raízes por quilo de peso corporal. A exposição humana, em níveis comparáveis a este, corresponderia à ingestão de 1,4 quilos de raízes de *C. alba* para um indivíduo adulto de 70 quilos de peso. Assim, é improvável a ocorrência de ingestão desta dose pelo uso de chás e tinturas à base de raízes de *C. alba*.

### **3.2.1.1 – Avaliação da atividade das isoenzimas hepáticas do complexo citocromo P-450**

Os metabólitos secundários encontradas no reino vegetal são considerados xenobióticos (produtos estranhos ao organismo humano) e biotransformados em grande parte por enzimas que compõe o sistema P-450. Assim, a análise das atividades

enzimáticas de duas subfamílias de isoenzimas hepáticas ligadas ao complexo citocromo P-450, responsáveis pela biotransformação de xenobióticos, foi realizada para averiguar a existência de indução ou inibição destas isoenzimas pelas substâncias do extrato administrado aos camundongos.

As atividades de etoxirresorufina-*O*-desetilase (EROD) e pentoxirresorufina-*O*-despentilase (PROD) foram medidas nos fígados de camundongos de ambos os sexos tratados com doses repetidas de 2000 mg/kg/dia por 14 dias. A atividade de EROD é marcadora da subfamília *Cyp1A1*, responsável pela biotransformação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e bifenilas dentre outras substâncias. Esta atividade não apresentou diferença significativa em relação à atividade enzimática verificada nos camundongos do grupo controle que receberam o diluente do extrato (água destilada). A atividade de PROD, marcadora da subfamília *Cyp2B1* e responsável pela biotransformação do fenobarbital por exemplo, mostrou-se acima dos valores obtidos nos grupos controle, mas não teve significância estatística verificada pelo teste “*t*” de Student.

O resultado indica que estes dois grupos de isoenzimas não foram induzidas ou inibidas pelas substâncias presentes no extrato que foi administrado repetidamente ao camundongos por via oral. Os resultados da atividade enzimática EROD e PROD são mostradas nas figuras 18 e 19.

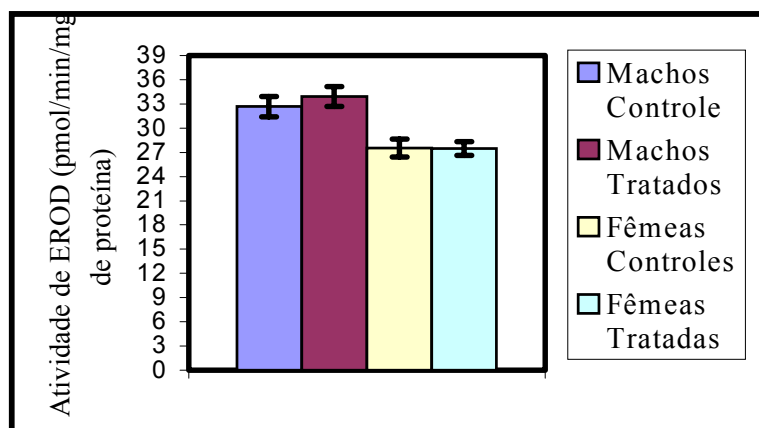


Figura 18: Atividade EROD (etoxirresorufina-*O*-desetilase) de camundongos tratados com doses repetidas por via oral com o extrato etanólico de *C. alba* na dose de 2000 mg/kg/dia por 14 dias. Os grupos controle receberam água destilada pelo mesmo período de tempo. \* Valores diferentes ( $p < 0,01$ ) do grupo controle.

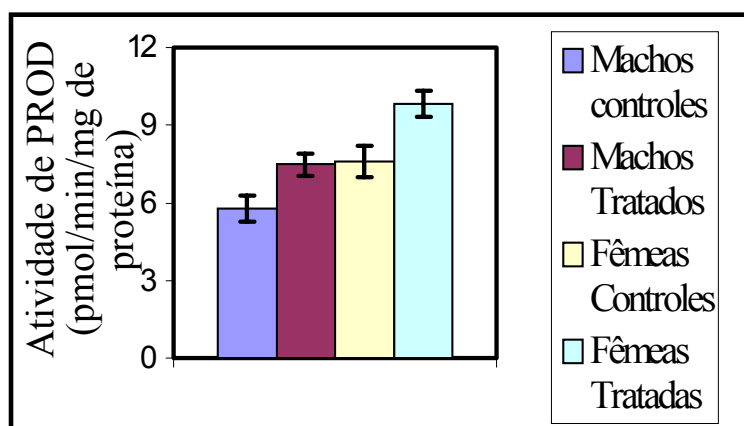


Figura 19: Atividade PROD (pentoxirresorufina-*O*-despencilase) de camundongos tratados com doses repetidas por via oral do extrato etanólico de *C. alba* na dose de 2000 mg/kg/dia por 14 dias. Os grupos controle receberam água destilada pelo mesmo período de tempo. \* Valores diferentes ( $p < 0,01$ ) do grupo controle.

Os processos de biotransformação hepáticos podem influenciar na toxicidade das substâncias químicas que dependem deste sistema de metabolização para a sua conversão em metabólitos, que podem ser mais ou menos tóxicos do que a substância de origem. Por esta razão, é importante avaliar se houve indução ou inibição das atividades das isoenzimas microsossomais hepáticas. A indução enzimática, basicamente, representa um mecanismo de adaptação a doses repetidas do xenobiótico, porque resulta num aumento na metabolização das substâncias. A indução enzimática pode proteger o animal (quando a detoxificação está envolvida) ou prejudicar o mesmo (quando o mecanismo de ativação estiver ocorrendo). Se o produto de metabolização das enzimas microsossomais levar a formação de um metabólito com maior toxicidade (ativação metabólica) que a substância de origem, a inibição das enzimas de biotransformação iria proteger o animal da toxicidade resultante (LOOMIS & HAYES, 1996).

No caso das raízes de *C. alba*, não houve modificação nas atividades enzimáticas analisadas indicando que o extrato não induziu ou inibiu este sistema de metabolização de xenobióticos. O objetivo principal deste estudo foi garantir que estas rotas de metabolização não seriam afetadas pela(s) substância(s) do extrato levando em consideração o uso concomitante de terapias alopáticas. O uso de politerapia é uma prática comum entre as pessoas que sofrem de doenças crônicas como o reumatismo, atividade pela qual o extrato de “cainca” é comercializado pela indústria de fitoterápicos. A associação de um medicamento fitoterápico que possui a capacidade de induzir ou inibir o sistema de biotransformação hepático poderia interferir na biodisponibilidade de drogas que necessitassem desta via enzimática para exercer seus efeitos terapêuticos ou para serem inativadas impedindo possíveis efeitos indesejados.



### **3.2.2 – Estudo da toxicidade de doses repetidas (subaguda) por via intraperitoneal**

No experimento realizado, administrando-se o extrato etanólico de *C. alba* por via intraperitoneal pelo período de 14 dias, foi observado que na maior dose testada (125 mg/kg/dia), apenas um macho, dos dez tratados, sobreviveu até o final do tratamento, com considerável perda de peso (tabela 14). Este único sobrevivente apresentou sintomas variados, que incluíram hipoatividade, sonolência, tremores e piloereção, que se iniciavam poucos minutos após a administração. Estes sintomas persistiram por algumas horas e recorreram até o quarto dia após cada tratamento com o extrato e tiveram o mesmo período de latência para o desaparecimento destes sintomas. Após a primeira dose de 125 mg/kg/dia foram observados cinco óbitos nos camundongos machos, sendo que os sinais e sintomas que precederam as mortes incluíam hipoatividade, tremores, sonolência e cianose, demonstrada pela coloração azulada nas patas e caudas dos animais. O período de latência para as mortes foi de cerca de 6 horas após a primeira administração do extrato da planta. Não foram encontrados sinais indicativos da *causa mortis* nas necropsias realizadas após serem constatados os óbitos.

Tabela 14: Ganho de peso (g) de camundongos tratados com doses repetidas do extrato etanólico de *C. alba* por via intraperitoneal.

Dose (mg/kg)	Sexo	N	Dias após o tratamento							
			0	2	4	6	8	10	12	14
0	M	10	47,6±3,4	46,9±3,1	46,6±3,5	47,3±3,3	47,6±3,3	48,5±3,1	48,5±2,9	48,8±2,7
	F	10	43,1±3,8	43,8±3,2	43,7±3,3	42,0±3,3	43,0±4,2	43,2±4,8	43,1±4,5	44,0±4,8
15,6	M	10	50,8±7,9	48,5±6,9	47,8±6,8	47,6±6,7	46,2±6,9	46,9±7,3	46,4±7,1	47,2±6,9
	F	10	46,2±3,6	44,5± 3,3	43,7± 3,1	43,3± 3,7	43,4± 3,9	43,1±4,3	42,7±4,1	41,7±4,0
31,3	M	6	49,8±3,4	48,4±2,8	46,5±1,6	45,9±2,2	45,2±1,4	44,7±1,3	45,9±1,3	46,3±1,1
	F	10	44,7±4,1	42,3±3,6	41,6±3,3	40,4±3,6	39,6±3,9	39,2±3,5	38,9±3,1	38,6±3,5
62,5	M	6	46,6±2,21	42,8±3,5	43,9±3,1	42,6± 3,9	44,3±3,4	42,6±2,7	43,6±1,7	43,8±1,4
	F	10	48,3±8,26	45,5±6,6	44,2±6,6	43,10±6,0	42,2± 6,0	41,1±5,8	40,9±5,4	40,0±5,6
125	M	1	47,3	43,4	39,5	39,1	39,7	36,1	34,6	37,5
	F	3	40,4±3,2	37,7±2,5	34,7±2,6	34,2 ± 2,8	33,8±3,0	33,0±2,6	33,1±2,9	32,9±3,2

Alterações de peso corporal (g) de camundongos machos (M) e fêmeas (F) tratados por via intraperitoneal com doses repetidas do extrato etanólico de *C. alba* diluída em água destilada (veículo). Os dados são apresentados com média ± desvio padrão e referem-se aos animais que sobreviveram até o final do período de tratamento de 14 dias (N). Os dados foram analisados com o Teste *t* de Student. \* Valores diferentes ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo veículo (controle). O grupo veículo recebeu apenas água destilada por via intraperitoneal por 14 dias consecutivos.

Após a segunda administração, quatro machos que receberam a dose de 125 mg/kg/dia morreram cerca de 2 horas após a injeção intraperitoneal. Os animais que já apresentavam sonolência, hipoatividade e nenhuma resistência à imobilização após a segunda administração, intensificaram estes sintomas que culminaram com as mortes. Novamente, não foram encontrados sinais na necropsia que sugerissem ou indicassem a causa das mortes.

Nas fêmeas do grupo (125 mg/kg/dia), duas mortes foram observadas 6 horas após a primeira administração do extrato. Outras três fêmeas sobreviveram ao segundo dia, sucumbindo 3 horas após a administração. No terceiro dia de tratamento, foram perdidas mais duas fêmeas cerca de 3 horas após a injeção abdominal com o extrato de

*C. alba*. Os sintomas apresentados por todas estas fêmeas, após cada administração, eram hipoatividade, tremores e sonolência, que iniciaram-se poucos minutos após a injeção intraperitoneal com o extrato. Apenas três fêmeas sobreviveram até o último dia de tratamento, apresentando os mesmos sinais (hipoatividade, tremores, prostração e piloereção que duraram de 3 a 4 horas) que acometeram as demais fêmeas após cada dose até a quinta administração. A tabela 14, mostra que os camundongos sobreviventes tratados com a dose de 125 mg/kg/dia apresentaram perdas diárias de peso.

As necropsias dos animais machos e fêmeas sobreviventes mostram que os pesos das vísceras retiradas não foram diferentes dos pesos das vísceras dos camundongos controle que receberam apenas o diluente do extrato (água destilada) por via intraperitoneal (tabela 15). No macho e nas três fêmeas sobreviventes ao tratamento com a dose de 125 mg/kg/dia foram verificadas aderências mesenteriais acentuadas no peritônio, além de um espessamento da parede abdominal acompanhada de enrijecimento, dificultando a visualização e retirada das vísceras.

No grupo que recebeu a dose de 62,5 mg/kg/dia foram tratados dez machos, dos quais um morreu imediatamente após a primeira administração e outros três no final do tratamento, sendo dois após a décima terceira dose e outro após a última dose. A necropsia destes animais foi prejudicada pelo elevado grau de autólise em que se encontravam os cadáveres, pois as mortes ocorreram à noite e foram constatadas apenas na manhã seguinte. Mesmo assim, nada foi revelado de anormal nas vísceras e tecidos. Todos os animais que receberam a dose de 62,5 mg/kg/dia apresentaram hipoatividade, tremores e piloereção poucos minutos depois da administração da primeira e segunda dose. Nos dias seguintes, eles não apresentaram estes sintomas, tolerando melhor o tratamento. A tabela 14 mostra que as médias dos pesos dos camundongos apresentaram decréscimos nos primeiros dias do tratamento, se estabilizando nos seguintes, mas

acabando o período com baixas, quando comparados ao grupo controle que recebeu apenas água destilada (diluyente do extrato) por via intraperitoneal.

Na necropsia realizada após o sacrifício por deslocamento cervical, ao término do período de tratamento com a dose de 62,5 mg/kg/dia por via intraperitoneal, foram observadas as presenças das seguintes alterações macroscópicas: presença de aderência nas veias mesentéricas, com uma camada branca no mesentério em dois machos do grupo e outros dois apresentavam a vesícula seminal enrijecida no lado esquerdo. Quanto ao peso de fígado, rins e baço, não houve diferenças significativas em relação ao grupo controle (tabela 15).

Tabela 15: Peso (g) dos órgãos de camundongos tratados com o extrato etanólico de *C. alba* por via intraperitoneal em doses repetidas por 14 dias.

Dose (mg/kg)	Sexo	N	Peso dos órgãos (g)			
			Fígado	Baço	Rim	
					direito	esquerdo
<b>0 (veículo)</b>	<b>M</b>	10	2,30 ± 0,22	0,19 ± 0,06	0,30 ± 0,03	0,30 ± 0,04
	<b>F</b>	10	1,77 ± 0,17	0,18 ± 0,04	0,19 ± 0,03	0,19 ± 0,02
<b>15,6</b>	<b>M</b>	10	2,48 ± 0,14	0,24 ± 0,08	0,30 ± 0,04	0,29 ± 0,03
	<b>F</b>	10	1,74 ± 0,24	0,21 ± 0,05	0,20 ± 0,03	0,21 ± 0,03
<b>31,2</b>	<b>M</b>	6	2,28 ± 0,25	0,20 ± 0,07	0,23 ± 0,04	0,23 ± 0,05
	<b>F</b>	10	1,74 ± 0,24	0,21 ± 0,05	0,20 ± 0,03	0,21 ± 0,03
<b>62,5</b>	<b>M</b>	6	2,51 ± 0,22	0,29 ± 0,11	0,27 ± 0,02	0,27 ± 0,02
	<b>F</b>	10	1,90 ± 0,31	0,20 ± 0,09	0,20 ± 0,02	0,20 ± 0,02
<b>125</b>	<b>M</b>	1	2,18	0,15	0,28	0,28
	<b>F</b>	3	2,07 ± 0,10	0,27 ± 0,12	0,30 ± 0,08	0,30 ± 0,10

Peso (g) dos órgãos de camundongos machos (M) e fêmeas (F) tratados via intraperitoneal com doses repetidas do extrato de *C. alba* por 14 dias. O grupo veículo recebeu água destilada. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão do peso dos órgãos dos animais necropsiados sobreviventes ao final do tratamento e foram analisados pelo Teste *t* de Student. \* Valores diferentes ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo veículo (controle).

Entre as dez fêmeas do grupo que recebeu a dose de 62,5 mg/kg/dia, não houve mortes. Os animais apresentaram hipoatividade e tremores após as primeiras duas administrações, recuperando-se destes sintomas horas depois do tratamento e não manifestando mais estes sinais nas doze doses subseqüentes. Quanto ao ganho de peso, pode-se observar quedas diárias nas médias de pesos registradas (tabela 14). Na necropsia realizada no décimo quinto dia, a pesagem das vísceras não apresentaram diferença quando comparadas ao grupo controle (tabela 15). Foram encontradas alterações em quatro animais dos dez sobreviventes ao tratamento. A gordura que se localiza próxima ao útero encontrava-se enrijecida e as veias mesentéricas apresentavam uma espessa camada de coloração branca, que o tornava enrijecido e aderente aos órgãos.

Nos camundongos machos tratados com a dose de 31,3 mg/kg/dia foram registradas quatro mortes, que aconteceram uma no nono dia, duas no décimo segundo dia e uma no décimo terceiro dia de tratamento. Os achados de necropsia dos animais que morreram em decorrência dos efeitos da planta foram negativos, não sugerindo os possíveis órgãos-alvo ou esclarecendo a causa das mortes. O único sintoma apresentado por estes quatro camundongos foi a perda de peso diária, presente também nos demais integrantes do grupo que sobreviveram ao período de 14 dias (tabela 14). A pesagem de fígado, rins e baço realizada no final do período de tratamento nos animais sobreviventes não revelou nenhuma alteração que pudesse ser visualizada nem mensurada (tabela 15). Os pesos das vísceras não se mostraram diferentes dos controles que receberam apenas água destilada. Nas fêmeas que receberam esta dose não foram verificadas mortes e também houveram perdas de peso diário como sinal de toxicidade após a administração repetida do extrato por via intraperitoneal. Após o sacrifício, as necropsias dos animais revelaram aderências nas veias mesentéricas e tecidos

gordurosos enrijecidos próximo ao aparelho reprodutor feminino de seis fêmeas do grupo. Os dados referentes ao peso de fígado, rins e baço não mostraram-se diferentes ao controle (grupo que recebeu o veículo) como mostra a tabela 15.

Na última dose testada, de 15,6 mg/kg/dia, não ocorreram mortes nos grupos de dez camundongos de ambos os sexos tratados. Só foram observados perdas de peso corporal nos dois grupos, tanto comparando-se com os pesos no início do tratamento, quanto comparando-se com o grupo controle, ilustrada na tabela 14. Após sacrificados, as vísceras dos machos e fêmeas foram retiradas e os valores obtidos com as pesagens não foram estatisticamente diferentes dos valores obtidos com os controles. Nos machos foram encontrados pontos de coloração esverdeada no fígado, vesícula seminal eritematosa, aderência com enrijecimento do tecido adiposo abdominal e cisto no mesentério. Estas alterações supracitadas foram encontradas em cada camundongo.

Nos camundongos que corresponderam ao grupo veículo não foram verificadas mortes durante as injeções intraperitoniais com água destilada (dilúente do extrato administrado aos demais grupos) e nenhuma alteração foi encontrada nos órgãos destes animais. As figuras 20 e 21 mostram as curvas de sobrevivência nos camundongos machos e fêmeas respectivamente, tratados com doses repetidas de 15,6, 31,3, 62,5 e 125 mg/kg/dia do extrato etanólico de *C. alba* por 14 dias.

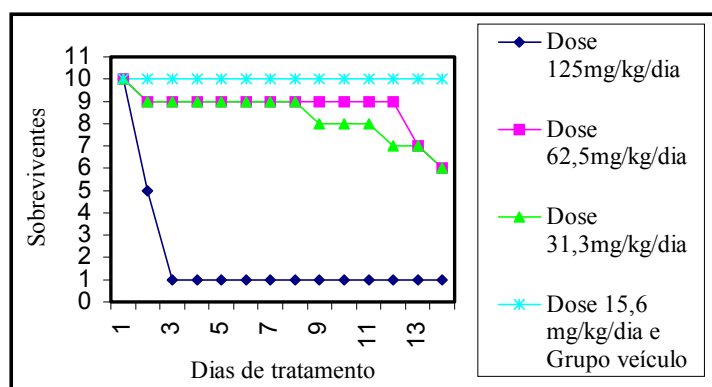


Figura 20: Curva de sobrevivência dos camundongos machos tratados com doses repetidas do extrato etanólico de *C. alba* por via intraperitoneal por 14 dias consecutivos. O grupo veículo recebeu água destilada.

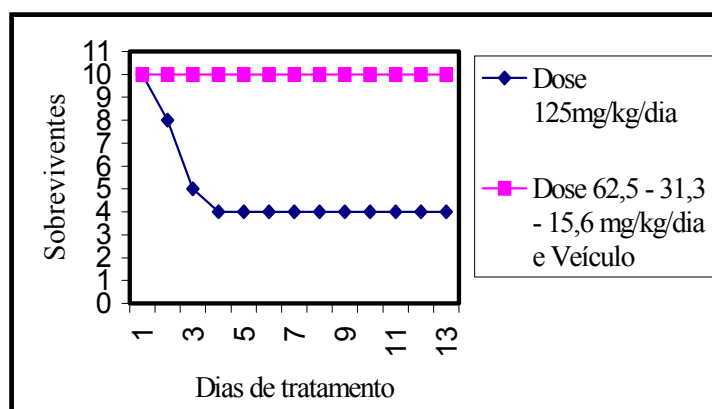


Figura 21: Curva de sobrevivência dos camundongos fêmeas tratados com doses repetidas do extrato etanólico de *C. alba* por via intraperitoneal por 14 dias consecutivos. O grupo veículo recebeu água destilada.

O extrato etanólico de *C. alba*, quando administrado por via intraperitoneal, mostrou possuir efeitos tóxicos. Na maior dose testada (125 mg/kg/dia), apenas um camundongo macho sobreviveu ao tratamento por 14 dias e, nas doses de 62,5 e 31,3 mg/kg/dia, somente 6 machos de cada dose sobreviveram até o final do experimento. Das doses testadas, apenas a concentração de 15,6 mg/kg/dia não

provocou mortes nos camundongos machos e somente a dose de 125 mg/kg/dia foi fatal para as fêmeas. Como pode-se notar, os machos foram mais susceptíveis aos efeitos tóxicos do extrato da planta do que as fêmeas. Os efeitos sobre os camundongos tratados com a dose de 125 mg/kg/dia foram marcantes pois dos vinte animais de ambos os sexos tratados, as dezesseis mortes observadas ocorreram antes de ser administrada a quarta dose, o que indica alta letalidade do extrato etanólico da “cainca” por via intraperitoneal. A sintomatologia apresentada por todos os animais tratados com o extrato por via intraperitoneal variou de acordo com a dose administrada. As respostas foram mais pronunciadas na maior dose testada e decresceram nas menores doses e com o passar dos dias de tratamento. Pode ser verificado que os animais desenvolveram tolerância ao extrato. Os animais passaram a reagir melhor aos efeitos da planta e não voltaram a apresentar os sinais que se verificavam no início do tratamento. Ocorreram também perdas de peso decorridas aos períodos de inanição dos animais, que são sinais típicos de toxicidade.

Os achados de necropsia revelaram a presença de pronunciadas aderências no mesentério, aliado ao enrijecimento apreciável do tecido adiposo presente na cavidade abdominal dos animais (machos e fêmeas) sobreviventes às administrações repetidas do extrato etanólico de *C. alba*. Uma hipótese que poderia explicar esta observação seria que os camundongos teriam desenvolvido um quadro de peritonite química. Este quadro inflamatório poderia ter se instalado em resposta a presença de possíveis substâncias irritantes presentes no extrato. Esta irritação estaria atingindo tanto as paredes do peritônio como as membranas viscerais e parietais que revestem a cavidade abdominal. Diferentes graus de severidade nas aderências e nos enrijecimentos puderam ser verificados no abdômen dos camundongos machos e fêmeas submetidos às administrações repetidas com o extrato. As aderências mais marcantes foram



encontradas nos animais sobreviventes à maior dose (125 mg/kg/dia) e, em menores graus, nas doses abaixo desta, exceto na dose mais baixa (15,6 mg/kg/dia) e nos grupos controle (que receberam apenas água destilada), onde não foram observadas a formação de aderências mesentéricas ou quaisquer outros sinais que poderiam indicar a presença de irritação local.

É pouco provável que este quadro de peritonite química tenha sido o responsável pelas mortes ocorridas nos grupos de camundongos machos e fêmeas, que receberam a dose de 125 mg/kg/dia do extrato etanólico de *C. alba*. Estes animais morreram num intervalo de dois dias após o início do tratamento e este processo inflamatório no peritônio desenvolve-se, normalmente, em vários dias. Como não foram encontradas aderências nas necropsias realizadas após serem constatados os óbitos destes animais, suas mortes foram atribuídas a outros mecanismos tóxicos.

### **3.2.2.1 – Avaliação hematológica**

A tabela 16 mostra os resultados da avaliação hematológica realizada nos camundongos machos e fêmeas sobreviventes após a administração repetida do extrato etanólico de *C. alba* por via intraperitoneal. A contagem de hemáceas e de leucócitos, a concentração de hemoglobina e a determinação de hematócrito dos camundongos (de ambos sexos) do grupo veículo que receberam água destilada serviram como referência para os demais grupos tratados com o extrato.

Tabela 16: Índices hematimétricos de camundongos tratados com doses repetidas do extrato etanólico de *C. alba* por via intraperitoneal.

Dose (mg/kg/dia)	Sexo	N	Hemáceas (milhões/mm <sup>3</sup> )	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	Leucócitos (mil/mm <sup>3</sup> )
125	M	1	6,3	11,3	38	4,1
	F	3	9,18±2,1	13,0±2,1*	39±3*	2,3±0,2*
62,5	M	6	7,61±0,6*	13,4±1,0**	42±2*	5,1±2,5
	F	10	8,86±1,7*	14,4±1,6*	40±3*	4,3±2,1
31,3	M	6	8,07±1,0*	14,0±1,9**	43±4*	4,2±0,7
	F	10	7,58±1,2*	14,5±0,9*	44±3*	3,5±1,4
15,6	M	10	10,10±2,5	17,1±4,9	41±4*	5,3±2,1
	F	10	11,10±1,4*	20,2±2,6*	47±2	4,4±1,6*
0 (Veículo)	M	10	9,90±1,2	17,7±2,2	47±3	3,8±1,1
	F	10	9,49±0,8	17,0±1,7	47±2	3,0±1,1

Avaliação dos índices hematimétricos de camundongos machos (M) e fêmeas (F) tratados com doses repetidas (14 dias) por via intraperitoneal com o extrato etanólico de *C. alba* diluído em água destilada (veículo). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão e referem-se aos animais sobreviventes até o fim do tratamento e foram analisados pelo Teste *t* de Student. \* Valores diferentes ( $p<0.05$ ) em relação ao grupo veículo (controle). \*\* Valores diferentes ( $p<0.01$ ) em relação ao grupo veículo (controle). N= número de animais.

Quanto à contagem total de hemáceas (tabela 16), o grupo de camundongos machos tratados com a dose de 15,6 mg/kg/dia não apresentou diminuições nos valores registrados em relação ao grupo controle. Nos demais grupos, as doses de 31,3, 62,5, e 125 mg/kg/dia apresentaram quedas na contagem de hemáceas quando comparados aos valores médios do grupo veículo que recebeu apenas o diluente do extrato (água destilada) por via intraperitoneal. Nas fêmeas foram observados decréscimos na contagem total de hemáceas nos grupos tratados com as doses de 62,5 e 31,3 mg/kg/dia, e nas doses de 125 e 15,6 mg/kg/dia não houveram diminuições nos valores do número de hemáceas.

Quando foi avaliada a concentração de hemoglobina dos animais sobreviventes, pode ser observado decréscimos nos valores em todos grupos de dose, exceto nos camundongos machos que receberam a menor dose testada (15,6 mg/kg/dia).

Nos grupos tratados com as doses de 15,6, 31,3, 62,5 e 125 mg/kg/dia do extrato etanólico de *C. alba*, houve diminuições nos valores de hematócrito encontrados para os animais de sexo masculino. Nas fêmeas, o grupo que recebeu a dose de 15,6 mg/kg/dia por 14 dias apresentou valores semelhantes ao grupo veículo do mesmo sexo e foram observados decréscimos no hematócrito nas demais grupos que receberam as doses de 125, 62,5 e 31,3 mg/kg/dia.

Na contagem de leucócitos totais nos machos do grupo controle foi obtida a média de  $(3,8 \pm 1,1)$  mil leucócitos por  $\text{mm}^3$  e contagens um pouco mais altas nos grupos dos camundongos machos tratados com a planta como mostra a tabela 16. Nas fêmeas, a média obtida no grupo veículo foi de  $3,0 \pm 1,1$  e, nos grupos tratados com o extrato etanólico de *C. alba* os valores encontrados não diferiram do controle.

A análise dos índices hematimétricos (contagem de eritrócitos e determinação de hemoglobina e hematócrito) mostrou a existência de anemia severa em todos os animais tratados com as dose de 125, 62,5 mg/kg/dia e anemia moderada no grupo que recebeu a dose de 31,3 mg/kg/dia. Considera-se a presença de anemia se a concentração de hemoglobina ou o hematócrito estiver abaixo do intervalo de referência encontrado nos animais do grupo veículo e também em relação aos valores fornecidos pelo Laboratório de Controle de Qualidade do Biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz (CECAL-FIOCRUZ). As causas da anemia se encontram divididas em duas categorias fisiopatológicas principais: a produção deficiente, a perda sangüínea ou destruição acelerada (hemólise) de eritrócitos, além da capacidade da medula óssea compensar estas perdas. A anemia também pode ser classificada com base na morfologia dos

eritrócitos, considerando-se o tamanho, a cor e a forma dos mesmos (ELGHETANY & DAVEY, 1998).

A anemia apresentada pelos animais tratados com a planta, por via intraperitoneal, não deveu-se à perda sangüínea pois não foram evidenciados sangramentos durante o tratamento, bem como na necropsia. A anemia apresentada pelos animais dos grupos que receberam as doses de 125, 62,5 e 31,3 mg/kg/dia provavelmente seria causada por problemas de produção dos eritrócitos em virtude de deficiência de ferro ou folatos, elementos necessários à hematopoiese. Isto é corroborado pelo fato dos animais terem apresentado emagrecimento e períodos de inanição decorrentes das administrações repetidas com a planta. A anemia por deficiência na produção de eritrócitos é acompanhada por alterações morfológicas típicas, como a hipocromia (pouca coloração) e microcitose (hemáceas com diâmetro reduzido). Estes achados foram observados nos esfregaços sangüíneos dos camundongos tratados com as doses de 125 e 62,5 mg/kg/dia, quando analisados ao microscópio óptico. Na anemia ferropriva, o esfregaço freqüentemente mostra eritrócitos com microcitose, anisocitose (populações de hemáceas com tamanhos diferentes) e graus variados de hipocromia. Os valores de hematócrito e hemoglobina são relativamente mais baixos que a contagem eritrocitária (ELGHETANY & DAVEY, 1998).

A tabela 17 mostra os resultados da análise diferencial de leucócitos dos camundongos sobreviventes às administrações repetidas com as doses testadas do extrato da raiz da planta. Na dose de 125 mg/kg/dia houve um predomínio de neutrófilos no esfregaço sangüíneo do único macho. Nas fêmeas foi encontrado equilíbrio nas médias percentuais de neutrófilos e linfócitos. Na dose de 62,5 mg/kg/dia, as fêmeas deste grupo tiveram 62% de linfócitos e 32% de neutrófilos em média nos

esfregaços; já nos machos sobreviventes tratados com esta dose encontra-se 52% de linfócitos e 42% de neutrófilos nos esfregaços. Nos demais grupos de doses testadas, de 31,3 e 15,6 mg/kg/dia, houve um predomínio de linfócitos no exame diferencial de leucócitos nos machos e fêmeas, não diferindo do encontrado no grupo veículo de ambos sexos, onde foram encontrados 73% e 84% de linfócitos e 23% e 13% de neutrófilos nos machos e fêmeas, respectivamente.

Tabela 17: Leucograma dos camundongos tratados com doses repetidas do extrato etanólico de *C. alba* por via intraperitoneal.

Doses (mg/kg/dia)	125		62,5		31,3		15,6		Veículo	
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
<b>Sexo</b>										
<b>N</b>	1	3	6	10	6	10	10	10	10	10
Eosinófilos (%)	2	2 ± 1	4±4	4±2**	3±1*	4±2**	2±2	2±1*	1±1	1±1
Neutrófilos (%)	32	32±7	43±16*	32±16**	28±14	21±9**	25±13	14±7	23±9	13±4
Linfócitos (%)	65	47±31	52±12*	62±16**	66±17	74±9**	71±11	83±6	73±9	84±5
Monócitos (%)	1	1±1	2±1	2±2	4±3	2±1	3±2	1±2	2±1	3±1

Contagem diferencial de leucócitos dos camundongos (M=machos e F=fêmeas) sobreviventes ao tratamento de doses repetidas com o extrato etanólico de *C. alba* por 14 dias por via intraperitoneal. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão. \* Valores diferentes ( $p<0.05$ ) em relação ao grupo veículo (controle). \*\* Valores diferentes ( $p<0.01$ ) em relação ao grupo veículo (controle). N= número de animais.

O estudo quantitativo de leucócitos incluiu a medida da concentração de leucócitos (totais) e as concentrações relativas de vários tipos de células brancas do sangue. Os resultados da análise da contagem total de leucócitos no sangue periférico dos animais sobreviventes ao tratamento não revelou a presença de leucocitose (aumento no número de leucócitos totais) ou leucopenia (diminuição do número de leucócitos totais). Assim, o extrato etanólico de *C. alba* aparentemente não afetou a produção ou migração dos leucócitos dos tecidos. O exame diferencial dos esfregaços dos camundongos, de cada grupo de dose, revelou um achado que destoava da normalidade. Os camundongos Swiss Albinos apresentam predominância de células mononucleadas, compostas principalmente por linfócitos, constituindo 70% dos

leucócitos encontrados no exame diferencial dos esfregaços sangüíneos ao microscópio óptico. Esta informação é baseada num controle histórico fornecido pelo Laboratório de Controle de Qualidade do CECAL-FIOCRUZ, entidade que forneceu os animais utilizados neste experimento. Aliado a isto, os valores encontrados para os grupos controles (machos e fêmeas) que receberam o diluente do extrato (água destilada) apresentaram predominância de linfócitos, como esperado. Assim, foi evidenciado um crescimento do percentual de neutrófilos encontrados nos esfregaços dos animais machos e fêmeas tratados com as doses de 125 e 62,5 mg/kg/dia por via intraperitoneal. Os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas nos processos infecciosos e inflamatórios. O dano tecidual faz com que aumente o influxo de neutrófilos a partir da medula óssea, aumentando assim a proporção de células no “*pool*” marginal (tecidos) e circulante (sangue). Em infecções agudas a medula promove um aumento no influxo de neutrófilos dos estoques medulares para o sangue periférico (DAVEY & HUTCHINON, 1998). Assim, o aumento observado no percentual de neutrófilos no sangue periférico dos animais tratados com as doses de 125 e 62,5 mg/kg/dia pode ser atribuído ao processo inflamatório encontrado no abdomen dos mesmos, indicados pelos dados de necropsia.

Tendo como base os resultados obtidos no experimento de toxicidade doses repetidas (subaguda) o NOAEL (nível máximo de dose em que não se observam efeitos adversos) para a via intraperitoneal foi menor que 31,3 mg/kg/dia, dado a anemia observada nos animais que receberam esta dose do extrato.

### **3.3 – Avaliação do potencial mutagênico pelo Teste de Ames**

A avaliação do potencial mutagênico do extrato etanólico das raízes de *C. alba* foi realizado pelo Teste de Ames com as seguintes cepas de *Salmonella typhimurium*: TA 97a, Ta 98, Ta 100 e Ta 1535.

#### **3.3.1 - Testes de genótipo**

Os testes de genótipos realizados nas linhagens de *Salmonella typhimurium* TA 97a, TA 98, TA 100 e TA 1535 utilizadas apresentaram resultados condizentes com aqueles encontrados na literatura. Elas apresentaram as características fenotípicas que estas cepas deveriam ter quanto à dependência à histidina e biotina, presença de mutação *rfa* e *uvrB* e presença ou ausência do plasmídeo pKM101 como determinado por Maron e Ames (1984).

#### **3.3.2 – Estudo da toxicidade e do potencial mutagênico avaliado em ensaios com *Salmonella typhimurium***

A tabela 18 mostra a toxicidade e a mutagenicidade do extrato etanólico de *C. alba* frente a seguintes cepas TA 97a, TA 98, TA 100 e TA 1535 na presença e ausência de mistura S9.

Tabela 18: Avaliação do potencial mutagênico do extrato etanólico da *C. alba* em cepas de *S.typhimurium*.

Dose ( $\mu\text{g/placa}$ )	Número de revertentes (média $\pm$ D.P.)							
	TA100		TA98		TA97a		TA1535	
	- S 9	+ S 9	- S 9	+ S 9	- S 9	+ S 9	- S 9	+ S 9
5000	-	157 $\pm$ 12	14 $\pm$ 3*	43 $\pm$ 3	-	-	-	8 $\pm$ 6 *
4000	-	149 $\pm$ 10 *	28 $\pm$ 8*	42 $\pm$ 3	-	-	-	13 $\pm$ 3 *
3000	-	130 $\pm$ 1 *	25 $\pm$ 4	47 $\pm$ 7	-	-	-	16 $\pm$ 2 *
2500	-	-	28 $\pm$ 7	-	-	139 $\pm$ 14	10 $\pm$ 8 *	-
2000	135 $\pm$ 26 *	139 $\pm$ 13 *	23 $\pm$ 1	48 $\pm$ 10	73 $\pm$ 8 *	131 $\pm$ 14	12 $\pm$ 1 *	17 $\pm$ 6
1500	107 $\pm$ 38 *	134 $\pm$ 9	29 $\pm$ 6	44 $\pm$ 9	-	147 $\pm$ 23	12 $\pm$ 3	18 $\pm$ 2
1000	100 $\pm$ 20 *	145 $\pm$ 10	29 $\pm$ 9	54 $\pm$ 9	75 $\pm$ 9 *	149 $\pm$ 22	16 $\pm$ 4	15 $\pm$ 4
500	91 $\pm$ 6 *	163 $\pm$ 16	31 $\pm$ 7	36 $\pm$ 4	83 $\pm$ 17 *	178 $\pm$ 27	14 $\pm$ 4	20 $\pm$ 2
250	127 $\pm$ 24	169 $\pm$ 13	34 $\pm$ 8	49 $\pm$ 5	103 $\pm$ 8	191 $\pm$ 19	19 $\pm$ 4	20 $\pm$ 6
100	134 $\pm$ 18	153 $\pm$ 24	-	38 $\pm$ 6	94 $\pm$ 11	190 $\pm$ 25	26 $\pm$ 5	18 $\pm$ 6
25	126 $\pm$ 6	-	-	-	115 $\pm$ 16	193 $\pm$ 10	21 $\pm$ 2	12 $\pm$ 3
10	114 $\pm$ 11	-	-	-	113 $\pm$ 11	190 $\pm$ 16	-	-
5	-	-	-	-	110 $\pm$ 16	-	-	-
1	-	-	-	-	128 $\pm$ 7	-	-	-
0	133 $\pm$ 27	147 $\pm$ 12	37 $\pm$ 4	43 $\pm$ 11	121 $\pm$ 12	164 $\pm$ 11	23 $\pm$ 2	20 $\pm$ 6
CP	990 $\pm$ 32	777 $\pm$ 93	310 $\pm$ 22	236 $\pm$ 14	414 $\pm$ 53	785 $\pm$ 34	256 $\pm$ 27	89 $\pm$ 10

Média  $\pm$  D.P.: média  $\pm$  desvio-padrão de 3 réplicas; Dose 0 - controle negativo: 100 $\mu\text{l}$  etanol a 70%; CP - Controle positivo: TA 100/-S9 e 1535/-S9, A.S. (1 $\mu\text{g/placa}$ ); TA 100 /+S9 e TA1535/+S9, 2-AA (1 $\mu\text{g/placa}$ ); TA98/-S9, 2-NF (1 $\mu\text{g/placa}$ ); TA 98/+S9, 2-AA (0,5 $\mu\text{g/placa}$ ); TA97a/-S9, 4-NQNO (1 $\mu\text{g/placa}$ ); TA97a/+S9, 2-AF (10 $\mu\text{g/placa}$ ); \*: toxicidade;

O intervalo de doses testado para a cepa TA 100 foi de 2000 a 10  $\mu\text{g/placa}$  na ausência da mistura S9. Nas doses de 2000, 1500, 1000 e 500  $\mu\text{g/placa}$  observa-se a formação de um tapete de fundo e uma discreta redução no número de revertentes nas três últimas doses, quando comparadas com o controle negativo (133  $\pm$  27). Isto indica que houve destruição bacteriana com a formação de “*debris*” celulares observáveis macroscopicamente no fundo das placas. Nas demais doses não foram detectados efeitos tóxicos e, portanto, foi estabelecida a dose de 500  $\mu\text{g/placa}$  como limite superior de toxicidade para esta cepa sem a adição do fator extrínseco de metabolização (fração S9). Na presença da mistura S9, foram testadas as doses de 5000 a 50  $\mu\text{g/placa}$  (exceto a dose de 2500  $\mu\text{g/placa}$ ) e verificou-se toxicidade nas doses de 4000, 3000 e



2000 µg/placa. Como na dose de 1500 µg/placa, bem como nas demais doses testadas, não houve formação de tapete nem diminuição no número de revertentes quando comparados à média do controle negativo ( $147 \pm 12$ ), fixou-se como limite de toxicidade, a dose de 2000 µg/placa.

Na avaliação do extrato frente à cepa TA 98, podemos observar que o intervalo de doses testadas foi de 5000 a 250 µg/placa e de 5000 a 50 µg/placa nos ensaios executados na ausência e na presença da mistura S9, respectivamente. As doses de 5000 e 4000 µg/placa foram tóxicas para a cepa TA 98 na ausência da mistura S9 e não foi observada toxicidade na presença da mesma. A dose de 4000 µg/placa foi o limite superior de toxicidade para a linhagem TA 98 sem a mistura S9.

Quanto à cepa TA 97a, as doses variaram de 2000 a 1 µg/placa ( exceto a dose de 1500 µg/placa) e o limite de toxicidade foi fixado em 500 µg/placa na ausência da mistura S9. Quando a mistura foi adicionada ao teste, o intervalo de dose escolhido foi de 5000 µg/placa até 25 µg/placa, exceto a dose de 2500 µg/placa, e o intervalo de dose onde apareceram efeitos tóxicos foram de 3000 a 5000 µg/placa, sendo esta dose de 3000 µg/placa, o limite superior de toxicidade para a TA 97a na ausência da mistura S9. Nos dois experimentos, as doses abaixo do limite de toxicidade acima citado não apresentaram diminuição na média de revertentes contados em relação ao controle negativo  $121 \pm 12$  e  $156 \pm 16$  sem e com a fração S9 respectivamente.

Pode ser observado, nos experimentos realizados com a cepa TA 1535, que o intervalo de doses testadas na ausência da mistura S9 foi de 2500 a 25 µg/placa, sendo o limite de toxicidade a dose de 2000 µg/placa. Na presença da mistura S9, as doses testadas foram mais altas partindo de 5000 a 25 µg/placa (excluindo a dose de 2500 µg/placa). O intervalo de 5000 a 3000 µg/placa foi tóxico para esta cepa,

apresentando tapete bacteriano de fundo na presença do fator extrínseco de metabolização. Considera-se a dose de 3000 µg/placa o limite de toxicidade.

Nos experimentos realizados, nas doses testadas, nas quatro linhagens de *Salmonella typhimurium* (TA 97a, TA 98, TA 100 e TA 1535) em ambas situações (com ou sem mistura S9), os resultados mostraram que não houve aumento do número de revertentes obtidos nas placas tratadas. Este resultado é comparado ao respectivo controle negativo (dose 0) – diluente da amostra – etanol 70% e controles positivos utilizados para cada cepa na ausência e na presença da fração S9. Estes resultados indicaram que o extrato etanólico de *C. alba* não é mutagênico pelo Teste de Ames.

Neste trabalho optamos pelo conjunto de 4 cepas representado pelas linhagens de *Salmonella typhimurium* TA 100, TA 98, TA 97a e TA 1535, de acordo como o sugerido por Maron & Ames (1983). Na bateria de cepas testadas, todas possuem mutações em diferentes pontos no *operon* histidina além das mutações *rfa*, *uvrB* que aumentam a sensibilidade das mesmas aos mutágenos. O plasmídeo pkM101 está ausente somente na linhagem TA 1535.

A TA 97a apresenta a mutação *hisGD6610* em um “*hot spot*” presente no gene *hisD*, que é constituído por uma sequência de seis citosinas. Esta mutação é revertida por mutagênicos *frameshift* que causam a deleção de um par de bases, dando origem a uma pseudo histidinol desidrogenase, contendo um resíduo extra de prolina que, embora apresente 60% da atividade da enzima produzida pela cepa selvagem, ainda permite um crescimento bacteriano normal em meio mínimo (MARON & AMES, 1983).

A TA 98 é capaz de detectar substâncias que causam mutações do tipo *frameshift* (mutação que ocasiona um deslocamento no quadro de leitura dos códons) revertendo uma mutação pré-existente *hisD3052* no gene *hisD* que, por sua vez, codifica a síntese da enzima histidinol desidrogenase que participa da biossíntese da histidina. A

TA 100 apresenta a mutação *hisG46* no gene *hisG* que codifica a primeira enzima da biossíntese da histidina. Essa mutação é revertida por substituição de um par de bases da trinca que codifica a prolina, restituindo a trinca original que codifica a leucina. A TA 1535 contém mutações *hisG46* no *his G* do *operon* histidina e pode ser usada na detecção de mutágenos que causam substituição de pares de bases (GOMES-CARNEIRO, 1997).

As cepas possuidoras do plasmídeo pKM101 são as mais sensíveis à detecção de mutagênicos do que as linhagens parenterais não plasmidiais. A TA 100 é capaz de detectar, como positivas, substâncias que não são detectadas pela TA 1535. É recomendado que a TA 1535, que não contém o plasmídeo pKM101, seja usada em adição à TA 100 por causa da sua baixa taxa de reversão espontânea e também por ser mais conveniente e sensível para a detecção de mutágenos que preferencialmente não revertem as mutações da TA 100 (AMES *et. al.*, 1975). As cepas TA 100, TA 98, TA 97a e TA 1535 são capazes de detectar substâncias que interagem apenas com pares de bases CG, e cujas atividades mutagênicas independem da existência de um sistema de reparo do DNA por excisão íntegro.

Para a realização dos ensaios foi utilizado o procedimento de pré-incubação como metodologia mais conveniente, onde puderam ser visualizados os limites superiores de toxicidade para as cepas utilizadas. Assim, foi evidenciado que as substâncias contidas no extrato etanólico de *C. alba* entraram em contato com as bactérias e sobre elas atuaram, observação conferida pelos efeitos tóxicos de formação de tapete de lise bacteriana observada nas maiores doses testadas. Nos ensaios realizados, pode ser observado que houve um aumento no limite de toxicidade para todas as cepas testadas na presença da mistura S9. É provável que tenha ocorrido uma desintoxicação do extrato de *C. alba* pela fração S9, possibilitando que os constituintes

do extrato não afetassem as bactérias em doses que seriam tóxicas sem a presença da mistura S9.

Dentre as vantagens do uso da pré-incubação, pode-se citar que o fator de diluição da amostra e da mistura S9, dentro do tubo de ensaio, é muitas vezes menor, permitindo que a bactéria entre em contato direto com os componentes da solução. Além disso, observa-se redução na probabilidade de ocorrerem ligações inespecíficas do mutagênico ativo com o ágar (PRIVAL *et al.*, 1979). Na presença da mistura S9, a fase *lag* do crescimento bacteriano, que dura até 5 horas na incorporação em placa, pode ser diminuída para 1-2 horas, devido aos efeitos nutritivos das proteínas existentes na fração S9, permitindo que as bactérias, crescendo logaritmicamente, possam ser expostas a espécies mutagênicas instáveis ou de vida curta.

É ainda muito difícil o estabelecimento de critérios para se considerar uma substância mutagênica ou não pelo teste de Ames. É necessário que exista uma relação dose-resposta reprodutível para que um agente químico seja classificado como mutagênico (GATHEHOUSE *et al.*, 1994). Outro critério aceito para que uma substância possa ser considerada mutagênica no ensaio de pré-incubação é que ela deve induzir um aumento significativo no número de revertentes com relação aos valores observados nos controles negativos, na presença e na ausência da mistura S9. Um aumento maior ou igual ao dobro do número de revertentes espontâneos combinados com uma dose-efeito indica uma resposta positiva (WHO, 1985). A mutagenicidade de uma substância também pode ser determinada comparando-se a média do número de colônias dos grupos tratados com a média do número de colônias do grupo controle (CARIELLO & PIERGORCH, 1996).

Assim, uma substância é considerada mutagênica quando:

- a) a média do número de revertentes em um ou mais grupos tratados for duas vezes maior do que a do grupo controle;
- b) se houver uma relação dose-resposta para pelo menos dois níveis de doses.

O critério empregado neste trabalho para indicar um resultado positivo incluiu a obtenção de um efeito mutagênico dependente da dose nas placas tratadas e um aumento de pelo menos duas vezes na média do número de revertentes por placa, em comparação com a média de revertentes dos controles negativos (reversão espontânea) em dose igual ou inferior à maior dose não-tóxica testada (GOMES-CARNEIRO, 1997).

Os resultados apresentados na tabela 14, analisados segundo o critério acima citado, sugerem que o extrato etanólico de *Chiococca alba* não é mutagênico. A negatividade dos resultados obtidos neste estudo pode ser corroborada considerando os seguintes aspectos: a repetitividade dos resultados obtidos; a eficácia da mistura S9 utilizada em ativar metabolicamente os pró-mutagênicos utilizados como controles positivos em cada uma das linhagens; e pela taxa de reversão observada nos controles positivos, ou seja, com substâncias sabidamente mutagênicas, que foi muito maior do que a taxa observada nas placas tratadas somente com o diluente do extrato, no caso etanol 70%.

### **3.4- Avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico de *C. alba* em *Artemia salina*.**

A *Artemia salina* L. (Artemiidae) é um componente invertebrado do ecossistema marinho e um participante importante na cadeia alimentar aquática. Esta espécie vem sendo cada vez mais usada como bioensaio para a determinação da toxicidade, através da determinação da concentração letal mediana (LC<sub>50</sub>) e indicativo de atividade

biológica (LEWAN; ANDERSSON & MORALES-GOMEZ, 1992). Na avaliação de extratos vegetais, resultados de  $LC_{50}$  inferiores a  $1000\mu\text{g/ml}$  são considerados bioativos (MEYER *et al.*, 1982).

Na avaliação da toxicidade do extrato etanólico de *C. alba* frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, de acordo com a razão entre o número de organismos expostos e o número de organismos afetados/mortos, aplicando o método estatístico de ajuste de Spearman-Kärber para o cálculo de  $LC_{50}$ , encontrou-se o valor de  $10\mu\text{g/ml}$  como concentração letal mediana para o extrato etanólico de *C. alba*. Este resultado indica que as substâncias químicas presentes no extrato afetaram os náuplios de *Artemia*, cuja larva é muito sensível a vários tipos de substâncias químicas. A curva controle de etanol realizada paralelamente ao experimento visou garantir que os resultados obtidos não sofreram interferências relacionadas com possíveis resquícios do solvente usado na extração e manufatura do extrato das raízes de *C. alba*. Não foi observado nenhum organismo afetado até a concentração máxima de 10% de etanol.

Em 1989, El-Abbadi *et al.*, citaram resultados preliminares não divulgados de toxicidade de uma fração rica em alcalóides sobre camarões, encorajando novos estudos toxicológicos com a espécie em questão. Em outro trabalho realizado por Carbonezi e colaboradores, em 1999, o extrato em clorofórmio/metanol das raízes de *C. alba* foi particionado com solventes de diferentes polaridades e cada fração obtida foi biomonitorada quanto a atividade citotóxica. A fase hidroalcóolica mostrou possuir atividade biológica frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, e a concentração letal mediana ( $LC_{50}$ ) encontrada pelos autores foi de  $91,1\ \mu\text{g/ml}$ . Apesar do resultado apresentado por Carbonezi ter sido obtido com uma fração mais purificada do extrato bruto, o valor encontrado no presente estudo para o extrato etanólico total das raízes desta planta foi de  $10\ \mu\text{g/ml}$ . Este valor indica que o extrato possui uma promissora

atividade biológica (antitumoral) que aguarda novos estudos no sentido de isolar e purificar as substâncias dotadas desta atividade demonstrada frente ao microcrustáceo *Artemia salina*.

#### **4– Avaliação farmacológica**

As raízes de *C. alba* apresentam uma gama variada de ações etnofarmacológicas e é comercializada por seu postulado efeito anti-reumático especialmente contra artralguas ou artrite em enfermidades reumáticas, é utilizada como antiinflamatório e analgésico para mialgias e dores no corpo e como auxiliar no tratamento de cialgia lombar e outras dores causadas por compressão de raízes nervosas (Bulário do Rheumoflora®). A atividade analgésica de *C. alba* foi avaliada baseando-se no uso popular e comercial das raízes no combate de várias formas de dor.

##### **4.1- Analgesia periférica**

A atividade analgésica do extrato etanólico de *C. alba* foi avaliada pelo método de inibição do número de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,6%. As figuras 22 e 23 ilustram os resultados obtidos em camundongos machos e fêmeas respectivamente. Nelas pode ser visto que o extrato etanólico de *C. alba* na dose de 500 mg/kg por via oral diminuiu o número de contorções, quando comparada ao grupo veículo e ao grupo que recebeu dipirona sódica 50 mg/kg por via oral. O número de estiramentos abdominais, registrados em intervalos de 5 minutos ao longo 30 minutos, apresentados pelos animais machos e fêmeas tratados previamente com o extrato da planta, foram menores em relação aos grupos supracitados.

A dipirona sódica foi usada como controle por ser uma substância conhecidamente analgésica. A dipirona tem maior efeito inibitório sobre as

ciclooxigenases cerebrais do que nas existentes em outros tecidos. Experimentalmente, trabalhos demonstraram que a dipirona inibe a hiperalgesia induzida nos receptores diferencialmente dos inibidores da ciclooxigenase. Sugerem que seu efeito analgésico é periférico, decorrendo de bloqueio direto da hiperalgesia em vez da inibição da síntese de prostaglandinas nos tecidos inflamados (LORENZETTI & FERREIRA, 1985). Também foi demonstrado que a dipirona é capaz de desativar a sensibilização já instalada e persistente (MARQUEZ & FERREIRA, 1987).

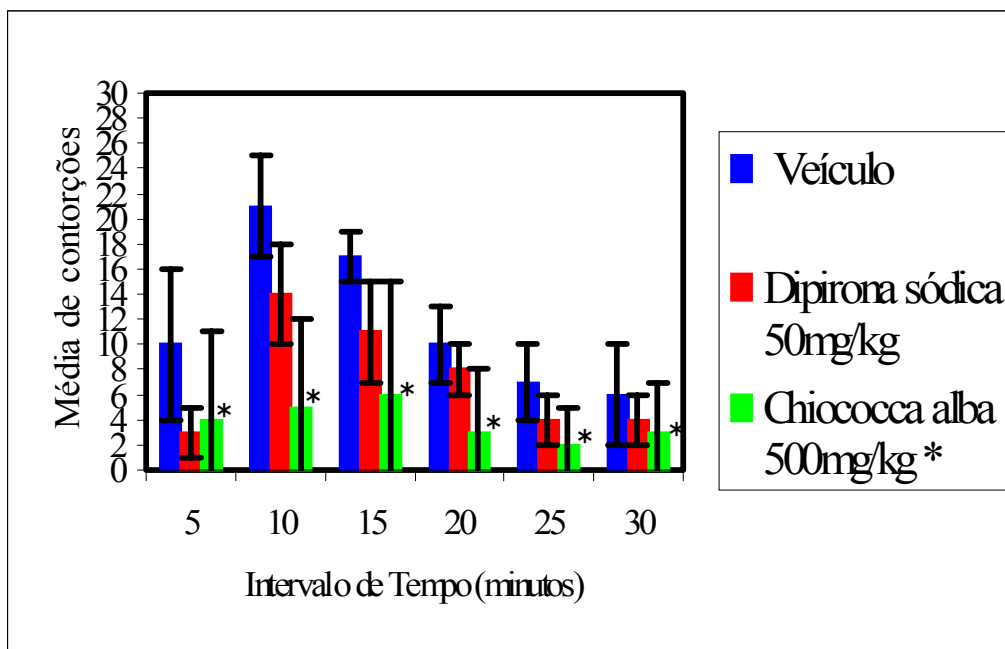


Figura 22: Número de contorções induzidas por ácido acético 0,6% em camundongos machos tratados com o extrato etanólico de *C. alba* por via oral na dose de 500 mg/kg. O grupo veículo recebeu água destilada. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão e foram analisados com o Teste *t* de Student. \* Valores diferentes ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo veículo (controle). \*\* Valores diferentes ( $p < 0.01$ ) em relação ao grupo veículo (controle). N = 5 animais.



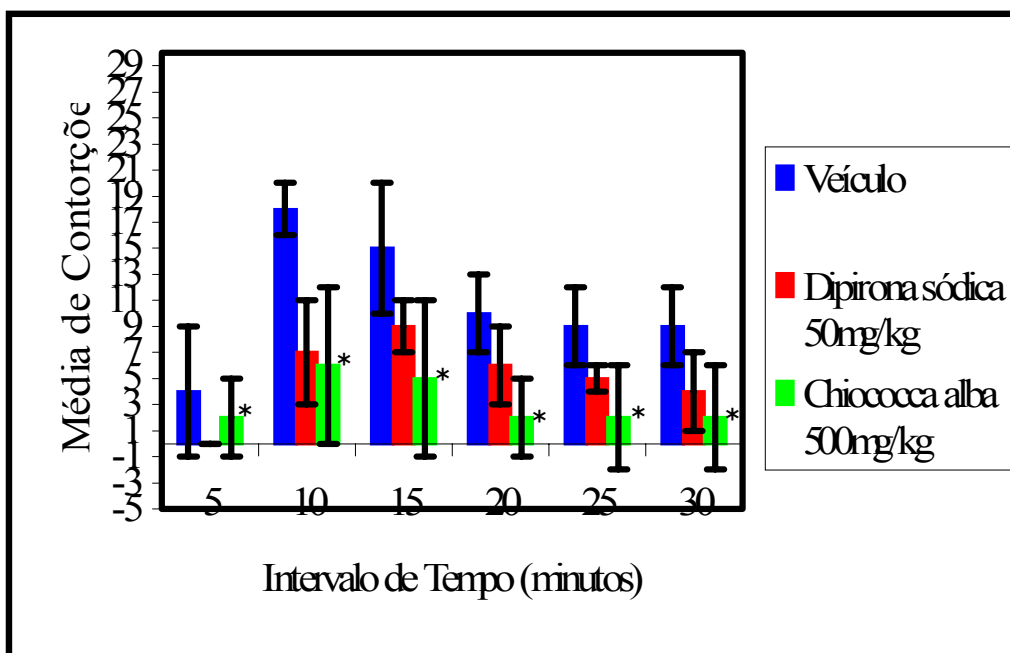


Figura 23: Número de contorções induzidas por ácido acético 0,6% em camundongos fêmeas tratados com o extrato etanólico de *C. alba* por via oral na dose de 500 mg/kg. O grupo veículo recebeu água destilada. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão e foram analisados com o Teste *t* de Student. \* Valores diferentes ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo veículo (controle). \*\* Valores diferentes ( $p < 0.01$ ) em relação ao grupo veículo (controle). N = 5 animais.

Os resultados obtidos neste experimento mostraram que a dose de 500 mg/kg do extrato etanólico de *C. alba* provocou diminuições no número de contorções nos camundongos machos e fêmeas. Além da atividade analgésica observada, os animais tratados apresentaram sinais de hipoatividade que iniciou-se cerca de cinco minutos após a administração oral e perdurou durante algumas horas, inclusive durante o período de observação (30 minutos) onde foram registradas o número de contorções existentes. Os efeitos comportamentais são mediados por mecanismos que envolvem o sistema nervoso central, local onde também se encontram os receptores que modulam a intensidade da dor (receptores opióides). Talvez o efeito analgésico possa estar vinculado com a hipoatividade observada nos animais. Se a analgesia observada neste

modelo de inibição do número de contorções for mediada por mecanismos centrais, outros modelos, como a placa quente, possam contribuir no esclarecimento da origem da atividade analgésica que o extrato mostrou possuir.

O extrato aquoso das raízes desta espécie produziram um percentual de 84% de inibição no número de contorções em camundongos tratados com a dose de 1000mg/kg peso corporal por via oral em estudo realizado por Ruppelt e colaboradores em 1991. Este estudo procurou correlacionar as atividades analgésicas e antiinflamatórias das raízes de “cainca” com a sua postulada ação etnofarmacológica contra veneno de cobras (anti-ofídica).

## CONCLUSÕES

O estudo químico, farmacológico e toxicológico da *C. alba* realizado neste trabalho abriu novas possibilidades para um melhor conhecimento sobre esta espécie, que se encontra pouco explorada se levarmos em conta o seu consagrado consumo como medicamento fitoterápico desde os anos de 30.

- A análise química realizada com o extrato das raízes de *C. alba* revelou a presença de ácidos graxos de cadeia linear e um triterpeno (ácido ursólico). O perfil químico realizado em CLAE e detecção por UV indicou a presença de ácidos fenólicos, antraquinonas, iridóides e/ou seco-iridóides e fenilpropanóides. Estes resultados abrem a possibilidade de estudos futuros que possam confirmar e/ou identificar estas substâncias.
- Neste trabalho não foi constatada a presença de alcalóides no extrato etanólico das raízes de *C. alba*.
- Quanto as propriedades farmacológicas, as raízes de *C. alba* demonstraram boa atividade analgésica por via oral no modelo de inibição do número de contorções abdominais induzidas por ácido acético a 0,6% na dose de 500 mg/kg.
- No estudo toxicológico foi evidenciado que a administração do extrato etanólico das raízes da “cainca” por via oral não provocou mortes em camundongos quando administrada em dose única ou doses repetidas (14 dias). O único efeito observado, tanto em tratamento agudo quanto subagudo, foi hipoatividade em todos os níveis de doses testados.

- Para as vias parenterais, o estudo toxicológico apontou um quadro de letalidade e efeitos tóxicos mais pronunciados, seja em tratamento único ou repetido, possivelmente relacionadas ao metabolismo das diferentes vias de administração.
- O extrato etanólico das raízes de *C. alba* não foi mutagênico pelo Teste de Ames nas quatro cepas bacterianas usadas, na presença e na ausência de fator extrínseco de metabolização (mistura S9).
- O extrato etanólico das raízes de *C. alba* apresentou atividade citotóxica frente ao microcrustáceo *Artemia salina* sugerindo potenciais atividades antitumorais.

Acredita-se que estes resultados possam vir a contribuir para o estudo da espécie *C. alba* e aumentar o interesse no gênero que permanece pouco explorado. Além, de prover alguns dados que venham a garantir a segurança do uso das raízes de *C. alba* tanto *in natura*, quanto dos produtos dela originados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). RESOLUÇÃO - RDC Nº 17, de 24 de fevereiro de 2000. DOU de 24/04/2000. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 20 fev. 2004.

ALICE, C. B.; VARGAS, V. M. F.; SILVA, G. A. A. B.; SIQUEIRA, N. C. S.; SCHAPOVAL, E. E. S.; GLEYE, J.; HENRIQUES, J. A. P. & HENRIQUES, A. T. Screening of plants used in Brazilian folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, **35**: 165-171, 1991.

AMES, B. N.; McCANN, J. & YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Samonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research*, **31**: 347-364, 1975.

AMES, B.N.; LEE, F. D. & DURSTON, W. E. An improved bacterial test system for detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, **70** (3): 782-786, 1973.

ARAÚJO, C. C.; THOMAS, G. & PAULO, M. Q. Effects of 5,7,2',5'-tetracetoxy-4-phenylcoumarin in guinea pig tracheal preparations. *Planta Medica*, **20**: 494 – 497, 1988.

BALDÉ, A. M.; GERGELY, A.; PIETERS, L. A.; CLAEYS, M.; BERGHE, V. & VLIETINCK, A. J. Antimicrobial alkaloids from *Borreria verticillata*. *Planta Medica*, **55**: 652, 1989.

BALLINI, R.; BOSICA, G. & RAFAIANI, G. Funcionalized Nitroalkanes in Organic Synthesis. The First Concise Preparation of 4-Hydroxyheptadecan-7-one and 14-Hydroxyoctadecan-8-one, Two New Hydroxy ketones Isolated from *Chiococca alba*. *Helvetica Chimica Acta*, **78**: 879-882, 1995.

BHATTACHARYYA, J. & CUNHA, E. V. L. A triterpenoid from the root-bark of *Chiococca alba*. *Phytochemistry*, **31** (7): 2546 – 2547, 1992.

BOLZANI, V. S.; YONG, M. C. M.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A. J.; ARAÚJO, A. R.; SILVA, D. H. S. & LOPES, M. N. Secondary Metabolites from Brazilian Rubiaceae Plant Species: Chemotaxonomical and biological significance. *Recent Research Development in Phytochemistry*, **5**: 19-31, 2001.

BORGES-ARGÁEZ, R.; BAIZABAL-MEDINA, L.; MAY-PAT, F. & PEÑA-RODRIGUEZ, L. M. Merilactone, an unusual C<sub>19</sub> metabolite from the root extract of *Chiococca alba*. *Journal of Natural Products*, **64**: 228-231, 2001.

BORGES-ARGÁEZ, R.; BAIZABÁL-MEDINA, L.; MAY-PAT, F. & PEÑA-RODRIGUES, L. M. A new *ent*-kaurano from the root extract os *Chiococca alba*. *Canadian Journal of Chemistry*, **75** (6): 801-804, 1997.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248-254, 1976.

BRAGA, R. Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará. 2<sup>o</sup> edição, 1960.

BREW, E. T. C. & THOMSON, R. H. Naturally occurring quinones and anthraquinones in *Hymenodictyon excelsum* and *Damnacanthus major*. *Journal of Chemical Society*, **34**: 2001-2016, 1971.

BURKE, M. D. & MAYER, R. T. Differential effects of phenobarbitone and 3-methylcholanthrene induction on the hepatic microsomal metabolism and cytochrome P-450-binding of phenoxazone and homologous series of its *n*-alkyl ethers (alkoxyresorufins). *Chemistry Biology Interactions*, **45**: 243-258, 1983.

BURKE, M. D. & MAYER, R. T. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal *O*-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metabolism Disposition*. **2**: 583-588, 1974.

BURKE, M. D. & MAYER, R. T. Inherent specificities of purified cytochromes P 450 and P 488 toward biphenyl hydroxylation and ethoxyresorufin deethylation. *Drug Metabolism Disposition*, **3**: 245-253, 1975.

BURKE, M. D.; THOMPSON, S.; ELCOMBE, C. R.; HALPERT, J.; HAAPARANTA, T. & MAYER, R. T. Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxiphenazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P 450. *Biochemical Pharmacology*, **34**: 3337-3345, 1985.

CALLAWAY, J. C.; McKENNA, D. J.; GROBS, C. S.; BRITO, G. S.; RAYMON, L. P.; POLAND, R. E.; ANDRADE, E. O. & MASH, D. C. Pharmacokinetics of Hoasca alkaloids in healthy humans. *Journal of Ethnopharmacology*, **65**: 243-256, 1999.

CALLAWAY, J. C.; RAYMON, L. P.; HEARN, L. P.; MCKENNA, D. J.; GROB, C. S.; BRITO, C. S. & MASH, G. S. Quantification of N,N-dimethyltryptamine and harmana alkaloids in human plasma after oral dosing with ayahuasca. *Journal of Analytical Toxicology*, **20**: 492-497, 1996.

CARBONEZI, C. A.; MARTINS, D.; YOUNG, M. C. M.; LOPES, M. N.; FURLAN, M. & BOLZANI, V. S. Iridoid and seco-iridoid glucosides from *Chiococca alba* (Rubiaceae). *Phytochemistry*, **51**: 781-785, 1999.

CARIELLO, N. F. & PIERGORCH, W. W. The two-fold rule revisited. *Mutation Research*, **185**: 243-269, 1987.

COIMBRA, R. Notas de Fitoterapia – Catálogo dos dados principais sobre plantas utilizadas em Medicina e Farmácia. 2ª Edição. Rio de Janeiro, Editora L. C. S. A. p. 84, 1958.



COLLIER, H. O. J.; DINNEEN, L. C.; JOHNSON, C. A. & SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Brazilian Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, **32**: 295-310, 1968.

CORRÊA, M. P. Dicionário de Plantas Utéis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Vol. II, pp. 271-272. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro, 1931.

COSTA, O. A. Plantas Medicinais Brasileiras. Estudo Farmacognóstico da Cainca. *Revista Brasileira de Medicina e Pharmacia*, **8**(2):124 –129, 1932.

CRUZ, J. “Cainca”. Estudo Botânico Farmacognóstico e Químico. *Boletim do Museu Nacional*, **7**: 97-116, 1932.

D’AGOSTINO, M.; DE FEO, V.; DE SIMONE, F. & PIZZA, C. A 4-arylcoumarin from *Coutarea hexandra*. *Phytochemistry*, **28** (6): 1773 – 1774, 1989.

DAVEY, F. D. & HUTCHINON, R. E. Doenças Leucocitárias. In: *Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais* (J. B. Henry, ed.), 19° ed., São Paulo, p. 664-700, 1998.

DE-MORAES-MOREAU, R. L.; HARAGUCHI, M.; MORITA, H. & PALERMO-NETO, J. Chemical and biological demonstration of the presence of monofluoroacetate in leaves of *Palicourea marcgravii* St. Hil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **28**(6): 685-692, 1995.

DESMARCHELIER, C.; GURNI, A.; CICCIA, G. & GIULIETTI, A. M. Ritual and medicinal plants of the Esse'ejas of amazonian rainforest (Madre de Dios, Perú). *Journal of Ethnopharmacology*, **52**: 45-51, 1996.

DEULOFEU, V. Chemical compounds isolated from *Banisteriopsis* and relative species. *Ethnopharmacologic Search*, **18**: 393-402, 1967.

DI STASI, L. C. Plantas medicinais: Arte e Ciência. São Paulo, Editora UNESP, 1996.

DJERASSI, C.; BUDZIKIEWICZ, H. & WILSON, J.M. Mass-spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic triterpenes. *Journal of American Chemistry Society*, **85**:3688-3699, 1963.

DJERASSI, C.; GRAY, J. D. & KINCL, F. Isolation and Characterization of Genipin. *Journal of Organic Chemistry*, **25**: 2174 –2177, 1960.

DONGMO, A. B.; KAMANYI, A.; DZIKOUK, G.; CHUNGAG-ANYE, B. N.; TAN, P. V.; NGUELEFACK, T.; NOLE, T.; BOPELET. M. & WAGNER.H. Anti-inflammatory and analgesic properties of the stem bark extract of *Mitragyna ciliata* (Rubiaceae) Aubrév. & Pellegr. *Journal of Ethnopharmacology*, **84**: 17- 21, 2003.

EL-ABBADI, N.; WENIGER, B.; QUIRON, J. C. & ANTON, N. New alkaloids of *Chiococca alba*. *Phytochemistry* ,**31** (7): 603-604, 1989.

ELGHETANY, M. T. & DAVEY, F. Doenças Eritrocitárias. In: Diagnósticos Clínicos por Métodos Laboratoriais (J. B. Henry, ed.) 19º ed. São Paulo, p. 617-663, 1998.

EL-HAFIZ, A.; WENIGER, B.; QUIRON, J. C. & ANTON, N. Ketoalcohols, lignans and coumarins from *Chiococca alba*. *Phytochemistry*, **30**(6): 2029-2031, 1991.

ELISABETSKY, E.; AMADOR, T. A.; ALBUQUERQUE, R. R.; NUNES, D. S. & CARVALHO, A.C. T. Analgesic activity of *Psychotria colorata* (Willd. Ex R. & S.) Muell. Arg. Alkaloids. *Journal of Ethnopharmacology*, **48**: 77-83, 1995.

FÉLIX, S. C.; QUARESMA, K. M. L.; FERREIRA, T. R. & UBATUBA, F. B. Evidência farmacológica da ocorrência de tranquilizante hidrossolúvel nas partes vegetais de *Chiococca alba*. *Revista Brasileira de Farmácia*, 80 (1/2):29-34, 1999.

FERREIRA, S. (Coord.). *Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil*. Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências, 1998.

FREEDLAND, C. S. & MANSBACH, R. S. Behavioural profile of constituents in ayahuasca, an Amazonian psychoactive plant mixture. *Drug and Alcohol Dependence*, **54**: 183-194, 1999.

GATHEHOUSE, D.; HAWORTH, S.; CEBULA, T.; GOCKE, E.; KIER, L.; MATSUSHIMA, T.; MELCION, C.; NOHMI, T.; OHTA, T.; VEENITT, S. & ZEIGER, E. Recommendations for performance of bacterial mutation assays. *Mutation Research*, **312**: 217-233, 1994.

GOMES-CARNEIRO, M. R. Avaliação do potencial mutagênico de monoterpenos presentes em óleos essenciais. Tese submetida ao Instituto Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de mestre em Ciências, 1997.

GOMES-CARNEIRO, M. R., FELZENSWALD, I. & PAUMGARTTEN, F. J. R. Mutagenicity testing of ( $\pm$ )-camphor, 1,8-cineole, citral, citronella, (-)-menthol and terpineol with the *Salmonella*/microsome assay. *Mutation Research*, **416**: 129-136, 1998.

GÓRNIK, S. L.; PALERMO-NETO, J. & SOUZA-SPINOSA, H. Effects of a *Palicourea marcgravii* leaf extract on some dopamine-related behaviors of rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **28**: 329-335, 1990.

GÓRNIK, S. L.; PALERMO-NETO, J. & SOUZA-SPINOSA, H. Effects of *Palicourea marcgravii* on laboratory rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, **25**: 221-226, 1989.

GROB, C. S.; MCKENNA, D. J.; BRITO, J. C.; NEVES, E. S.; OBERLANDER, G.; SAIDE, O. L.; LABIGALINI, E.; TALCA, C.; MIRANDA, C. T.; STRASSMAN, R. J. & BOONE, K. B. Human psychopharmacology of ayahuasca a plant hallucinogen used in ritual context in Brazil. *Mental Disease*, **184**: 86-94, 1996.

GUSMÃO, E. D.; SOUZA, J. P. & SILVA, I. M. S. Estudo Anátomo-Morfológico de Dicotiledôneas das dunas de Salvador-Bahia. *Borreria cymosa* Cham. ET P. e *Chiococca brachiata* R. ET P. ( Rubiaceae ). *Acta Botânica Brasileira* , **6** (1):79-98, 1992.

HAMILTON, M.A., RUSSO, R.C. & THURSTON, R.V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science and Technology*, **11** (7): 714-719, 1977.

HARBONE, J. B. Phytochemical Methods, 2<sup>nd</sup> ed. In.: CHAPMAN & HALL, New York, 37-57,1984.

HIROYUKI, T.; TAKEDA, Y.; HIROSHI, N.; KANOMI, A.; OKUDA, T & PUFF, C. Chemotaxonomic Studies of Rubiaceae Plants Containing iridoid Glycosides. *Phytochemistry*, **27** (8): 2591-2598, 1988.

HODGSON, E. & LEVI, P. E. A Textbook of Modern Toxicology. 2<sup>o</sup> ed. 1997.

HOEHNE, F. C. Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais. São Paulo, 1939.

KEMMERLING, W. Toxicity of *Palicourea marcgravii*: combined effects of fluoroacetate, N-methyltyramine and 2-methyltetrahydro- $\beta$ -carboline. *Zeitschrift für Naturforsch*, **51** (1-2): 59-64, 1996.

KENNEDY, G. L.; FERENZ, R. L. J. & BURGESS, B. A. Estimation of acute toxicity in rats by determination of the approximate lethal dose rather than the LD<sub>50</sub>. *Journal of Applied Toxicology* **6**: 145-148, 1986.

KEPLINGER, K.; LAUS, G.; WURM, M.; DIERICH, M. P. & TEPPNER, H. *Uncaria tormentosa* (Willd.) D.C. – Ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botany results. *Journal of Ethnopharmacology*, **64**: 23-34, 1999.

KITAHARA, Y.; SHIMIZU, M. & KUBO, A. Synthesis of New Quinoline Alkaloids of *Chiococca alba*. *Heterocycles*, **31**(11): 2085-2090, 1990.

KLAASSEN, C. D. & EATON, D. L. Principles of Toxicology. In: *Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons* (M. O. Amdur, J. Doull & C. D. Klaassen, eds.), 4 ed., New York/ St. Louis/San Francisco, McGraw-Hill Inc., p. 12-49, 1994.

LEWAN, L.; ANDERSSON, M. & MORALES-GOMEZ, P. The use of *Artemia salina* in toxicity testing. *Alternative to Laboratory Animals*, **20**: 297-301, 1992.

LOOMIS, T. A. & HAYES, A. W. *Essentials of Toxicology*. 4<sup>o</sup>ed. Academic Press. Londres/Inglaterra, 1996.

LORENZETTI, B. B. & FERREIRA, S. H. Mode of analgesic action of dipyron: direct antagonism of inflammatory hyperalgesia. *European Journal of Pharmacology*, **114**: 375-81, 1985.

MARON. M. D. & AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, **113**: 173-215, 1983.

MARON. M. D. & AMES. B. N. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemical: Discussion. *Proceedings of National Academy of Sciences*, **73** (3): 950-954, 1976.

MARQUEZ, J. O. & FERREIRA, S. H. Regional dipyrone nociceptor blockade: a pilot study. *Brazilian Journal of Medical and Biology Research*, **20**: 441-44, 1987.

MATSUMOTO, K.; MIZOWAKI, M.; SUCHITRA, T.; TAKAJAMA, H.; SAKAI, S.; AIMI, N. & WATANABE, H. Antinociceptive action of mitragynine in mice: Evidence for the involvement of supraspinal opioid receptors. *Life Science*, **59**: 1149 -1155, 1996.

McKENNA, D. J.; TOWERS, G. H. N. & ABBOTT, F. Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants: tryptamine and  $\beta$ -carboline constituents of ayahuasca. *Journal of Ethnopharmacology*, **10**: 195-223, 1984.

McLafferty, F.W. & Stanffer, D.B. *Registry of Mass Spectral Data*, vol. I, II, III, Wiley-Interscience Pub., N.Y, 1989.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E. & Mc-LAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, **45**: 31-34, 1992.

MONACHE, G. D.; BOTTA, B.; NETO, A. S. & DE LIMA, R. A. 4-Arylcoumarins from *Coutarea hexandra*. *Phytochemistry*, **22**(7): 1657-1658, 1983.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T. & PEREIRA, N. A. *Medicinal Plants of Brazil* ( Robert A. DeFillipps, ed.), p. 294 – 300, 2000.

NELSON, D. R.; KAMATAKI, T.; WAXMAN, F.; GUENGERICH, F. P.; ESTABROOK, R. W.; FEYEREISEN, R.; GONZALEZ, F. J.; COON, M. J.; GUNSALUS, I. C.; GOTOH, O.; OKUDA, K. & NEBERT, D. W. The P-450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA and Cell Biology*, **12** (1): 1-51, 1993.

NIST62 (*Library National Institute of Standards and Technology-62*).

OGUNKOYA, L. Application of mass spectrometry in structural problems in triterpenes. *Phytochemistry*, **20**:121-126, 1981.

OLIVEIRA, F., AKISUE, G. & AKISUE, M. K., *Farmacognosia*. Editora Atheneu, RJ, 1996.

OLIVEIRA, M. M. Chromatographic isolation of monofluoroacetic acid from *Palicourea marcgravii*. *Experientia*, **19**: 586, 1963.

PARKINSON, A. Biotransformation of xenobiotics. In: *Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons* (M. O. Amdur, J. Doull & C. D. Klaassen, eds.), 5 ed., New York/ St. Louis/San Francisco, McGraw-Hill Inc., p. 113-186, 1998.



PAUMGARTTEN, F. J.R.; PRESGRAVE, O. A. F.; MENEZES, M. A. C.; FINGOLA, F. F.; FREITAS, J. C. B. R.; CARVALHO, R. R. & CUNHA, F. Q. Comparison of Five Methods for the determination of Lethal Dose in Acute Toxicity Studies. *Brazilian Journal of Medical Biology Research*, **22**:987-991, 1989.

PILOT, H. C. & DRAGAN, Y. P. Chemical carcinogens. In: *Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons* (M. O. Amdur, J. Doull & C. D. Klaassen, eds.), 5 ed., New York/ St. Louis/San Francisco, McGraw-Hill Inc., p. 201-267, 1998.

PRADO, W. A. Medicamentos Analgésicos de Ação Central. In: GRAEFF, F. G. & GUIMARÃES, F. S. (org). *Fundamentos de Psicofarmacologia*. São Paulo, Editora Atheneu, p. 175-195, 2001.

PRIVAL, M. J.; KING, V. D. & SHELDON, A. T. The mutagenicity of dialkyl nitrosamines in the *Salmonella* plate assay. *Environmental Mutagenesis*, **1**: 95-104, 1979.

RIVIER, L. & LINDGREN, L. Ayahuasca, the South American hallucinogenic drink: an ethnobotanical and chemical investigation. *Economic Botany*, **26**:101-129, 1972.

ROBBERS, E. R.; SPEEDIE, M. K. & TYLER, V. E. *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*. Baltimore, Editorial, 1997.

ROBBRECHT, E. Tropical Woody Rubiaceae. National Botanica Garden of Belgium, Meise, 1988.

RUPPELT, B. M.; PEREIRA, E. F. R.; GONÇALVES, L. C. & PEREIRA, N. A. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom – I. Analgesic and anti-inflammatory activities. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **86** (2): 203-205, 1991.

SABINO, M. O mercado de Fitoterápicos no Brasil. *Revista Veja*. Editora Abril- Edição 1850. Ano 37 – número **20**: 82-86, Abril/ 2004.

SAINTY, D.; BAILLEUL, F.; DELAVEAU, P. & JACQUEMIN, H. Iridoides du' *Borreria verticulata*. *Planta Medica*, **42**: 260 –264, 1981.

SCHAPOVAL, E. E. S.; SCHENKEL, E. P.; CHAVES, C. M. C.; MENTI, L. A.; ZANATA, A & IRGANG, A. Ensaio Químico e Farmacológico com a *Chiococca alba* (L.) Hitchc. (Nota prévia). *Anais do 2º Simpósio de Produtos Naturais*, 3-5:289-294. João Pessoa, 1983.

SHELLARD, J. E. Mitragyna: a note on the alkaloids of African species. *Journal of Ethnopharmacology* **8**: 345-347, 1983.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. & PETROVICK, P. R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Ed. da Universidade, 1999.

SIPES, I. G. & GANDOLFI, A. J. Biotransformation of xenobiotics. In: *Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons* (M. O. Amdur, J. Doull & C. D.

Klaassen, eds.), 4 ed., New York/ St. Louis/San Francisco, McGraw-Hill Inc., p. 89-105, 1994.

SUBATRA, D.; RAVISHANKAR, B. & BHAVSAR, G. C. Investigation of the anti-inflammatory effects of *Paederia foetida*. *Journal of Ethnopharmacology*, **43**: 31-38, 1994.

SUKSAMRARN, A.; TANACHATCHAIRATANA, T. & KANOKMEDHAKUL, S. Antiplasmodial triterpenes from twigs of *Gardenia saxatilis*. *Journal of Ethnopharmacology*, **88**: 275-277, 2003.

TALLENT, W. H. Two new antibiotic cyclopentanoid monoterpenes of plant origin. *Tetrahedron*, **20**: 1781 – 1787, 1964.

TOKARNIA, C. H. ; DÖBEREINER, J. ; PEIXOTO, P. V. Plantas Tóxicas de Interesse Pecuário. In: *Plantas Tóxicas do Brasil*. Rio de Janeiro, Editora Helianthus, p. 19-29, 2000.

TOURC, H.; BALANSARD, G.; PAULI, A. M. & SCOTTO, A. M. Pharmacological investigation of alkaloids from leaves of *Mitragyna inermis* (Rubiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **54**: 59-62, 1996.

WALLER, G.R. *Biochemical Applications of Mass Spectrometry*, pág. 872, Wiley, New York., 1972.

WANNMACHER, L. & FERREIRA, M. B. Farmacologia Clínica da Dor. In: FUCHS, F. D. & WANNMACHER, L. *Farmacologia Clínica - Fundamentos da Terapêutica Racional*. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, p132-148, 1992.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guide to short-term tests for detecting mutagenic and carcinogenic chemical. Edited by IPCS, International Programm on Chemical Safety. *Enviromental Health Criteria*, **51**: 208, Geneva, 1985.

WIJNSMA, R. & VERPOORTE, R. Anthraquinones in the Rubiaceae. *Programm Chemistry Organization of Natural Products*, **49**: 79-149, 1986.

WOLFGANG, W.; KRAMER, W. J. & SHAMMA, M. The emetine alkaloids. *Journal of Natural Products*, **47** (3): 397- 408, 1974.

YOSHIYASU, K.; SHIMIZU, M. & KUBO, A. Synthesis of New Quinoline Alkaloids of *Chiococca alba*. *Heterocycles*, **11**: 2085-2090, 1990.

ZULITA, L. M. C.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, D. H. S.; FURLAN, M.; YOUNG, M. C. M.; ALBUQUERQUE, S.; CASTRO-GAMBOA, I. & BOLZANI, V. S. Secoiridoids from *Calycophyllum spruceanum* (Rubiaceae). *Phytochemistry*, **64**: 549-553, 2003.