

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALINE ALVARES MACHADO

CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE
DE *SYNADENIUM CARINATUM* BOISS (EUPHORBIACEAE)

CURITIBA
2008

ALINE ALVARES MACHADO

CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE
DE *SYNADENIUM CARINATUM* BOISS (EUPHORBIACEAE)

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Insumos, Medicamentos e Correlatos, Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tomoe Nakashima

CURITIBA
2008

Machado, Aline Alvares
Caracterização fitoquímica e avaliação da citotoxicidade de
Synadenium carinatum Boiss (Euphorbiaceae) / Aline Álvares Machado
- Curitiba, 2008.
xvi, 78f. : il.,

Orientadora: Nakashima, Tomoe
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor
de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Área de Concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.
Inclui bibliografia.

1. *Synadenium carinatum*. 2. Caracterização fitoquímica. 3.
Citotoxicidade. 4. Látex.

CDD 616.99

AGRADECIMENTOS

À Deus, que permitiu que tudo isso fosse verdade.

À minha família, pela formação, pelo amor e compreensão principalmente em relação à distância e aos momentos de ausência.

À Universidade Federal do Paraná em especial ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.

À orientadora e amiga Prof^ª. Dr^ª Tomoe Nakashima, pelos ensinamentos, dedicação e apoio demonstrado em todos os momentos.

Ao Prof. M.Sc. Antonio Waldir Cunha da Silva, do Setor de Ciências Agrárias desta Instituição, pelo auxílio nos ensaios de citotoxicidade e pelo companheirismo.

Ao pesquisador Ernesto Renato Krüger, do Laboratório Marcos Enrietti, pela contribuição nos ensaios de citotoxicidade da parte experimental.

À Silvia Haluch, do Laboratório Teclab Análises Ambientais, pelas análises do teor de minerais e pela solicitude.

À Hilda Aparecida dos Santos, técnica do Laboratório de Fitoquímica, pela ajuda e amizade.

Aos estagiários do Laboratório de Fitoquímica pelo auxílio e amizade nos trabalhos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Ao César Alberto Pacheco Filho, por estar incondicionalmente ao meu lado.

A todos os amigos que embalaram este projeto comigo e com quem pude contar para estar aqui e realizar este trabalho.

Eu sou ainda aquele mesmo menino teimoso de sempre.

Mário Quintana

RESUMO

Synadenium carinatum Boiss é uma planta da família Euphorbiaceae, que como outras do mesmo gênero, é conhecida como cega-olho, leitosinha, janaúba, e outros. Há muitos anos a população brasileira faz uso desta planta com finalidades terapêuticas variadas – câncer, inflamações, diabetes – mesmo não existindo comprovações científicas sobre tais efeitos supostamente benéficos aos seres humanos. Assim, os objetivos deste trabalho foram caracterizar a espécie quimicamente, realizar testes *in vitro* para verificação de possível toxicidade animal e estabelecer a densidade óptica (DO) dos extratos de látex da planta, esta última com o objetivo de estabelecer uma dosagem padrão mais exata, visando contribuir para o conhecimento popular e acadêmico acerca da espécie. Foi realizado o *screening* fitoquímico de *S. carinatum*, utilizando folhas frescas; os extratos apresentaram diversos metabólitos secundários de interesse farmacológico, entre eles: cumarinas, flavonóides, esteróides e/ou triterpenos, taninos, e outros. Os testes de citotoxicidade foram realizados utilizando o látex, metabólito da planta utilizado “terapeuticamente”, em concentrações semelhantes àquelas usadas popularmente, aplicadas em culturas de células de traquéia de feto bovino. Os resultados demonstraram que, em concentrações mais elevadas, o látex apresenta citotoxicidade acentuada, o que inspira cuidados na sua utilização e em futuros testes em modelos animais e humanos.

Palavras-chave: *Synadenium carinatum*. *Screening* fitoquímico. Látex. Citotoxicidade. Densidade óptica do látex.

ABSTRACT

Synadenium carinatum Boiss is a plant of Euphorbiaceae family that, like others of this genus, is known how “cega-olho”, “leitosinha”, “janaúba”, among others. For many years the Brazilian population uses this plant with various therapeutic purposes – cancer, inflammations, diabetes – even with no scientific evidences about this supposed therapeutic effects for humans. Then, the objectives of this study was to chemically characterize the specie, make *in vitro* tests to verify the possibility of animal toxicity and to establish the optical density (OD) of the plant latex extracts to establish a more accurate therapeutic dosing, contributing with the popular and academic knowledge about the specie. The phytochemical screening of *S. carinatum* was made with fresh leaves; the extracts did show many secondary metabolites with pharmacological interesting, like: coumarins, flavonoids, steroids and/or triterpens, tannins, and others. The cytotoxicity tests was made using the latex, the plant's product used “therapeutically”, in concentrations similar to those used popularly, applied in cell cultures of bovine embryo trachea. The results did show that in higher concentrations, the latex show high cytotoxicity, requiring careful with their handling and in future tests on animal and human models.

Key words: *Synadenium carinatum*. Phytochemical screening. Latex. Cytotoxicity. Latex optical density.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

QUADRO 1 - RESULTADOS DOS TESTES FITOQUÍMICOS PARA AS FRAÇÕES F1, F2, F3 E HIDROALCOÓLICA (HA) DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO DE <i>SYNADENIUM CARINATUM</i>	50
QUADRO 2 - RESULTADOS DOS TESTES FITOQUÍMICOS PARA EXTRATO AQUOSO DE <i>SYNADENIUM</i>	51
QUADRO 3 - VARIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS OBSERVADOS AO FINAL DO EXPERIMENTO NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO AQUOSO DE LÁTEX APLICADAS – QUANTIDADE APLICADA: 10 μ L.....	54
QUADRO 4 - VARIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS OBSERVADOS AO FINAL DO EXPERIMENTO NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO AQUOSO DE LÁTEX APLICADAS – QUANTIDADE APLICADA: 20 μ L.....	54
GRÁFICO 1 - AS CURVAS REPRESENTADAS NO GRÁFICO MOSTRAM A VARIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS EXIBIDOS PELO LÁTEX DE <i>SYNADENIUM CARINATUM</i> SEGUNDO O NÚMERO DE POÇOS AFETADOS E A CONCENTRAÇÃO DE LÁTEX UTILIZADA NA PLACA 1, ONDE FORAM UTILIZADOS 10 μ L DE CADA DILUIÇÃO.....	55
GRÁFICO 2 - VARIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DOS “EFEITOS SEVEROS” (1, DESPRENDIMENTO TOTAL DA CAMADA ADERENTE DE CÉLULAS E 2, ALTA INCIDÊNCIA DE MORTE CELULAR) CAUSADOS PELO LÁTEX NA PLACA 1, EM FUNÇÃO DA DILUIÇÃO APLICADA. UMA CURVA LOGARÍTIMICA FOI CONSTRUÍDA COM BASE NOS VALORES APLICADOS NO GRÁFICO, A FIM DE MELHOR VISUALIZAR A VARIÂNCIA DOS DADOS.....	55
GRÁFICO 3 - AS CURVAS REPRESENTADAS NO GRÁFICO MOSTRAM A VARIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS EXIBIDOS PELO LÁTEX DE <i>SYNADENIUM CARINATUM</i> SEGUNDO O NÚMERO DE POÇOS AFETADOS E A CONCENTRAÇÃO DE LÁTEX UTILIZADA NA PLACA 2, ONDE FORAM UTILIZADOS 20 μ L DE CADA DILUIÇÃO.....	56
GRÁFICO 4 - VARIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DOS “EFEITOS SEVEROS” (1, DESPRENDIMENTO TOTAL DA CAMADA ADERENTE DE CÉLULAS E 2, ALTA INCIDÊNCIA DE MORTE CELULAR) CAUSADOS PELO LÁTEX NA PLACA 1, EM FUNÇÃO DA DILUIÇÃO APLICADA. UMA CURVA LOGARÍTIMICA FOI CONSTRUÍDA COM BASE NOS VALORES APLICADOS NO GRÁFICO, A FIM DE MELHOR VISUALIZAR A VARIÂNCIA DOS DADOS.....	56
QUADRO 5 - RESULTADOS DOS TESTES REALIZADOS PARA VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE METAIS (ALUMÍNIO, FERRO, MANGANÊS E ZINCO) ATRAVÉS DE MÉTODOS FOTOMÉTRICOS NAS 3 AMOSTRAS PREPARADAS (RESULTADOS EXPRESSOS EM mg/L).....	58

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 REVISÃO SOBRE BOTÂNICA, ETNOBOTÂNICA, ETNOFARMACOLOGIA E FITOQUÍMICA DA FAMÍLIA EUPHORBIACEAE E DO GÊNERO <i>SYNADENIUM BOISS</i>	14
2.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i>	22
3 OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	26
3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 POPULAÇÃO E AMOSTRA DA PESQUISA.....	28
4.1.1 População e amostra do material vegetal	28
4.1.1.1 Identificação e catalogação da amostra vegetal	28
4.1.1.2 Análise fitoquímica	28
4.1.2 População e amostra de células – análise citotóxica	288
4.1.2.1 Grupo analisado	288
4.1.2.2 Grupo controle	29
4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO 20%.....	29
4.3 OBTENÇÃO DO RESÍDUO SECO	30
4.4 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES	30
4.5 ENSAIOS FITOQUÍMICOS	30
4.5.1 Ensaios com frações obtidas do extrato hidroalcoólico.....	31
4.5.1.1 Pesquisa de alcalóides.....	31
4.5.1.2 Pesquisa de heterosídeos flavônicos.....	32
4.5.1.2.1 Reação de Schinoda	32
4.5.1.2.2 Reação de Taubock ou oxalo-bórica	32
4.5.1.2.3 Reação de Pacheco	33
4.5.1.2.4 Reação com Zinco (Zn) em HCl	33

4.5.1.3 Pesquisa de cumarinas	33
4.5.1.3.1 Reação 1	33
4.5.1.3.2 Reação 2	34
4.5.1.4 Pesquisa de heterosídeo antraquinônico	34
4.5.1.5 Pesquisa de esteróides/triterpenos	35
4.5.1.5.1 Reação de Kiebermann-Bouchard	35
4.5.1.5.2 Reação de Keller Kelliani	36
4.5.1.5.3 Reação de Baljet	37
4.5.1.5.4 Reação de Kedde	37
4.5.1.5.5 Reação de Legal	37
4.6 OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO	38
4.6.1 OBTENÇÃO DO RESÍDUO SECO	38
4.6.2 Ensaio com o extrato aquoso	38
4.6.2.1 Pesquisa de heterosídeos antociânicos	38
4.6.2.2 Pesquisa de heterosídeos saponínicos	38
4.6.2.3 Pesquisa de heterosídeos cianogênicos	39
4.6.2.3.1 Reação do isopurpurato de sódio	39
4.6.2.3.2 Reação de Schoembein	39
4.6.2.4 Pesquisa de taninos	39
4.6.2.4.1 Reação com cloreto férrico a 1%	39
4.6.2.4.2 Reação com solução de gelatina 2,5%	40
4.6.2.4.3 Reação com sulfato férrico amoniacal	40
4.6.2.4.4 Reação com cloridrato de emetina a 1%	40
4.6.2.4.5 Reação com cianeto de potássio	40
4.6.2.4.6 Reação com ácido nitroso	41
4.6.2.4.7 Reação com dicromato de potássio	41
4.6.2.4.8 Ensaio de Staniasny	41
4.6.2.5 Pesquisa de aminogrupos	42
4.6.2.6 Pesquisa de ácidos fixos	42
4.6.2.7 Pesquisa de ácidos voláteis	42
4.7 DETERMINAÇÃO DE TEOR DE MINERAIS	43
4.8 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE COM CULTIVO DE CÉLULAS <i>IN VITRO</i>	44
4.9 LEITURA DA DENSIDADE ÓPTICA DO LÁTEX DE <i>S. CARINATUM</i>	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 TESTES FITOQUÍMICOS	47

5.2 TESTES DE CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i>	51
5.3 LEITURA DA DENSIDADE ÓPTICA DO LÁTEX DE <i>S. CARINATUM</i>	57
5.4 ANÁLISE DO TEOR DE MINERAIS NA AMOSTRA.....	58
6 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61
APÊNDICE	68
Apendice 1 - Figuras	69
ANEXO	72
Anexo 1 - Suprimentos e Equipamentos	73

1. INTRODUÇÃO

Existem no mundo cerca de 250 mil espécies botânicas conhecidas, das quais apenas cerca de 5% foram estudadas quimicamente, e uma porcentagem ainda menor é estudada sob o ponto de vista farmacológico. É importante lembrar que as plantas têm sido muito importantes, notadamente nos últimos anos, para a obtenção de diversos fármacos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), os vegetais são as maiores e melhores fontes de fármacos para a humanidade (BEZERRA *et al.*, 2006).

Sabe-se que a maioria dos fármacos de origem vegetal utilizados atualmente foi pesquisada e posteriormente levada ao mercado baseado em informações da chamada medicina tradicional ou popular, demonstrando assim que as substâncias de origem vegetal têm papel essencial na obtenção de medicamentos e que partindo do conhecimento popular, bons resultados podem ser obtidos (COLOMBO, 2008).

Nesse sentido, a etnobotânica vem contribuindo e muito para o desenvolvimento de novas drogas (ELIZABETSKY, 2003). Segundo Amorozo (1996), etnobotânica é a ciência que se ocupa do estudo do conhecimento e das conceituações desenvolvidas pelas sociedades a respeito dos vegetais, incluindo o uso que se dá a eles. Trata-se, portanto, de uma ciência altamente interdisciplinar, porque envolve não só a botânica como também a fitoquímica, a farmacologia, a medicina, a antropologia e outras (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006).

As diretrizes da WHO (2003) (World Health Organization – Organização Mundial de Saúde) apontam para a necessidade de se identificar práticas seguras na medicina tradicional, fomentando uma base sólida para que se garanta, através dela, um direito universal e constitucional de todo cidadão, que é a saúde; para isso, entendem-se que é necessário aumentar o acesso da população aos serviços de saúde e aos insumos terapêuticos, particularmente os medicamentos (DE LA CRUZ, 2005).

No caso do Brasil, sabe-se que uma parcela grande da população vive em

condições financeiras precárias e que o acesso aos serviços de saúde básica e medicamentos é bastante difícil. O país tem um consumo *per capita* de medicamentos de US\$51,00/ano; 48% dos medicamentos vendidos são comprados por 15% da população, que corresponde aos que possuem renda mensal acima de 10 salários mínimos. A parcela da população que possui renda de menos de quatro salários mínimos (51%) consome apenas 16% dos medicamentos comercializados no país (BRASIL, 2003). Assim fica evidente que o não-acesso ao medicamento é um fator de exclusão social, já que impede o tratamento e pode, dessa forma, agravar o quadro patológico do indivíduo, impedindo-o gradativamente de exercer livremente sua cidadania (DE LA CRUZ, 2005).

Apesar do incentivo à prática da medicina tradicional por parte de órgãos oficiais como a Organização Mundial de Saúde (OMS), as ações até agora têm sido mais no sentido do medicamento fitoterápico que das práticas populares em si, não recebendo então a devida atenção nem dos profissionais da área, nem da comunidade acadêmico-científica (FONTE, 2004).

Dessa maneira, com dificuldade de acesso aos medicamentos alopáticos, grande parte da população faz uso de plantas medicinais, sem conhecer os eventuais riscos que o uso dessas plantas pode representar (FRANÇA *et al.*, 2008).

É iminente a necessidade de mais pesquisas no campo da etnobotânica, especialmente no Brasil, visto que é o país possuidor da maior biodiversidade do planeta, possuindo uma imensa flora com potencial farmacológico ainda carente de pesquisas (ALVES *et al.*, 2007; FONTE, 2004). Os mesmos autores também salientam que apenas 25 dos 191 países que fazem parte da OMS têm desenvolvido políticas referentes à medicina tradicional, sendo que o Brasil não figura neste pequeno grupo.

Ainda no que toca a necessidade desse tipo de prática acadêmica no Brasil, conforme a própria WHO (2003), a pesquisa como forma de fundamentar a medicina popular é essencial para as camadas mais pobres da população, como uma maneira de ajudar a melhorar o seu *status* sanitário, ampliando o acesso aos tratamentos

com um custo reduzido. Assim, torna-se necessário identificar práticas seguras e eficazes através das quais esses tratamentos alternativos se tornem viáveis (WHO, 2008).

Além da questão social, a pesquisa de novos fármacos de origem natural também atende a uma mudança que sutilmente vem ocorrendo no mercado, no qual os consumidores têm preferido as substâncias naturais às sintéticas, seja como tratamento principal, seja como auxiliar à alopatia, por perceberem-nas menos agressivas ao organismo (FRANÇA *et al.*, 2008; TARTUF, MARTÍNEZ, STASHENKO, 2005).

A espécie *Synadenium carinatum*, popularmente conhecida no Brasil como janaúba ou leitosinha, vem sendo usada pela medicina popular há muitos anos. Seu uso era tradicional entre os indígenas, que a utilizavam na “garrafada”, obtida através de diluição do látex da planta em água pura e fresca, como remédio “curatudo”. Tal uso foi muito difundido para a cura de variados tipos de câncer, mas há relatos de populares utilizando a planta para outras enfermidades, tais como diabetes e a úlcera. Porém, são poucos os estudos a respeito das supostas ações farmacológicas da planta, não havendo, portanto, evidências científicas que as comprovem.

Grupo (1998) citou a escassez da literatura sobre o gênero *Synadenium*, relacionada à taxonomia ou quimiotaxonomia. Assim, faz-se necessária a investigação sobre o tema, em especial no Brasil, onde “extratos brutos” da planta têm sido usados frequentemente pela população como “cura” para vários males, mesmo não possuindo informações suficientes a respeito dessa ação.

Há diversos estudos publicados sobre outros gêneros da mesma família; esses estudos mostram a presença de compostos químicos biologicamente ativos variados, tais como terpenóides, flavonóides, alcalóides, glicosídeos cianogenéticos e taninos. Entre esses, chamam a atenção alguns diterpenos (tiglianos, ingenanos e dafnanos), os quais produzem, além de efeitos urticantes, alguns tipos de câncer, ao mesmo tempo em que inibem outros, ação que, a princípio, acredita-se ser

determinada pela sua concentração (BITTNER *et al.*, 2001).

Estudos recentes realizados com a espécie demonstraram um grande potencial imunomodulador de um componente isolado a partir de seu látex, uma lecitina (AFONSO-CARDOSO, 2007; ROGÉRIO, 2007). Contudo, sabe-se que a população faz uso do látex na sua forma “integral” (sem qualquer processo de purificação, da maneira como é extraído da planta); dessa maneira, pode-se dizer que há mais substâncias além desta lecitina já isolada, as quais podem atuar de maneira conjunta, produzindo os efeitos benéficos sobre a saúde humana observados naqueles que dele fazem uso. Esta afirmação se baseia no princípio da ação sinérgica dos compostos químicos, neste caso, metabólitos secundários do vegetal, o que significa que diferentes compostos químicos que têm uma mesma atividade atuam de forma conjunta, potencializando os efeitos uns dos outros (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001). Assim, embora o isolamento e identificação dos compostos químicos vegetais sejam de extrema utilidade, é preciso lembrar que muitas vezes – no caso de remédios fitoterápicos – não é necessariamente aquela substância isolada a mais útil para o tratamento da doença: exemplo disto é o caso relatado por Id (2001), em que o grupo de pesquisa isolou e identificou duas espécies químicas a partir do vegetal *Croton urucurara*, sendo que nenhuma das duas isoladamente teve o mesmo desempenho do extrato na forma “integral”, ou seja, como é utilizado pela população, nos modelos biológicos testados.

As plantas do gênero *Synadenium* Boiss (GRUPO, 1998) têm sido historicamente utilizadas pelas populações dos vários países onde ocorrem – principalmente em países tropicais como o Brasil – como remédio para um grande e diversificado número de doenças. No entanto, há pouca literatura disponível sobre a composição química destas plantas e sua suposta ação farmacológica. Id (1998) demonstrou que a espécie *Synadenium grantii* não possui a ação antiulcerativa indicada pela medicina popular. Outros autores, porém (PREMARATNA *et al.*, 1981; ROGERO *et al.*, 2003), demonstraram ação benéfica de lecitinas encontradas no

látex da mesma espécie sobre o sistema imunológico. Poucos desses estudos, no entanto, avançaram ou se desdobraram em novas pesquisas, o que acabou por prejudicar substancialmente o conhecimento acerca do gênero.

Alheia a isso, a população continua fazendo uso indiscriminado de plantas do gênero *Synadenium* (AFONSO-CARDOSO *et al.*, 2007), podendo se tornar até mesmo um sério problema de saúde pública, devido ao desconhecimento da composição química da planta, o que pode implicar em intoxicações e alergias, além do próprio problema da automedicação.

Além disso, o presente estudo busca não só reconhecer ou descartar o uso de *Synadenium carinatum* como planta medicinal, através da elucidação de sua composição química, como também estabelecer níveis de segurança preliminares para seu uso, uma vez que já foram descritas outras espécies deste gênero com ação tóxica bastante potente (GRUPO, 1998).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 REVISÃO SOBRE BOTÂNICA, ETNOBOTÂNICA, ETNOFARMACOLOGIA E FITOQUÍMICA DA FAMÍLIA EUPHORBIACEAE E DO GÊNERO *Synadenium* BOISS

Estudar a medicina tradicional se constitui em assunto de primeira importância, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil, por ter relevante papel no resgate do patrimônio cultural tradicional, por viabilizar o acesso aos tratamentos terapêuticos através das “fórmulas caseiras” (ou seja, com baixo custo), e por organizar os conhecimentos tradicionais de forma a aproveitá-los na produção de novas tecnologias (AMOROZO, 1996; ALVES *et al.*, 2007).

É nesse sentido que também a etnobotânica vem contribuindo e muito para o desenvolvimento de novas drogas. Segundo Id (1996), etnobotânica é a ciência que se ocupa do estudo do conhecimento e dos conceitos desenvolvidos pelas sociedades sobre os vegetais, incluindo o uso que se dá a eles, sendo assim uma ciência altamente interdisciplinar, porque envolve não só a botânica, como também a fitoquímica, a farmacologia, a medicina, a antropologia e outras (Id, 2007; FONTE, 2004).

A etnofarmacologia trata dos conhecimentos populares em relação aos sistemas tradicionais de medicina (ELISABETSKY, 2003). Ela é, assim como a etnobotânica, uma divisão de uma grande área de conhecimento denominada Etnobiologia, esta definida primeiramente por Berlin (1992) como o estudo das complexas relações psicossociais e culturais entre o ser humano e os animais e as plantas.

A abordagem etnofarmacológica consiste na combinação de conhecimentos populares com estudos químicos e farmacológicos para a pesquisa de novos fármacos (ELISABETSKY, 2003). As informações fornecidas pelas pessoas que fazem uso desta ou daquela planta são muito valiosas, no sentido de que dão um ponto de partida para as pesquisas, como por exemplo, modo de preparo e uso, sendo que estas podem ou não comprovar os efeitos que são atribuídos à planta

(ALBUQUERQUE, HANAZAKI, 2006).

Tanto a etnobotânica quanto a etnofarmacologia tem sido instrumentos importantes na identificação de substâncias úteis aos seres humanos (Id, 2006).

ELIZABETSKY (2003) ainda ressalta que o fato de ser usado pela população não exclui a possibilidade de o extrato da planta apresentar toxicidade, e nesse mesmo trabalho afirma que a importância do conhecimento popular na obtenção de substâncias farmacologicamente ativas está na sua eficiência em relação a outros métodos, pois os remédios da medicina popular ou tradicional levam em conta os sintomas apresentados, proporcionando um “alívio rápido” ao paciente; ainda que ignorando a etiologia do processo da doença, este parece ser um método bastante útil, pois sua relação custo *versus* benefício em comparação com as pesquisas não orientadas pela etnobotânica e etnofarmacologia apresentou resultados a cerca de vinte e cinco vezes mais satisfatórios – 1:10.000 princípios ativos aplicáveis na indústria farmacêutica, no caso das pesquisas com base etnofarmacológica, e 1:25.000, no caso das pesquisas “aleatórias” (Id, 2006).

Muitos fármacos amplamente utilizados hoje foram pesquisados e posteriormente levados ao mercado baseados em informações da chamada medicina tradicional ou popular (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Por esse motivo pode-se dizer que aproximadamente 50% dos fármacos mais amplamente utilizados hoje para o tratamento do câncer são derivados de produtos vegetais, percentagem que é pouco maior – 60% – em relação ao desenvolvimento de medicamentos antivirais desenvolvidos também com base em produtos naturais (ELIZABETSKY, 2003).

Todas as plantas produzem compostos químicos derivados de seu metabolismo primário – a fotossíntese – aos quais damos o nome de *metabólitos secundários* (MONTANARI; BOLZANI, 2001). Nem todos esses metabólitos secundários têm função totalmente esclarecida no metabolismo da planta (JULKUNEN-TIITO, 1985), embora acredite-se que a maioria deles tenha surgido como auxiliar no mecanismo de defesa contra o herbivorismo (Id, 2001). Em geral,

são esses os compostos de interesse farmacêutico presentes nos vegetais.

A família Euphorbiaceae, que pertence a um clado superior, as Malpighiales, possui cerca de 300 gêneros e mais de 7000 espécies identificadas (BITTNER *et al.*, 2001). Segundo os caracteres descritos em APG II, os membros da família Euphorbiaceae podem apresentar diferentes aspectos: arbustivo, arbóreo, passando por plantas rasteiras e lianas, podendo ser monóicos ou dióicos; comumente são laticíferas; suas folhas são, em geral, dispostas helicoidalmente em torno do galho, sendo menos comum a distribuição oposta das mesmas; flores em geral pequenas, dotadas de estames e frutos deiscentes ou não, entre outras características (APG II, 2003).

Os caracteres que marcam e identificam este e outros grupos botânicos podem diferir segundo o sistema de classificação adotado. Neste trabalho, adotou-se o APG II por ser este o sistema de classificação mais atualizado. Não obstante, sabe-se que outros sistemas têm sido utilizados para identificar e caracterizar os vegetais nos trabalhos desta área, sendo que esses outros sistemas tendem a ser gradativamente sobrepujados por outros mais aprimorados e editados mais recentemente, como é o caso do APG – Angiosperm Phylogeny Group -, cuja última edição data do ano de 2003 (id, 2003).

É por apresentar essa diversidade de características morfológicas que o grupo botânico Euphorbiaceae é considerado o mais controverso, e por isso também se sugere que o grupo seja de origem polifilética (BITTNER *et al.*, 2001), ou seja, as espécies apresentam estruturas morfológicas aparentemente relacionadas, mas têm origens ancestrais diferentes.

Embora a classificação adotada para este trabalho siga o APG II, é necessário cautela, uma vez que as relações filogenéticas do grupo ainda permanecem em estudo (id, 2003).

As Euphorbiaceae têm tido um papel muito significativo nas pesquisas fitoquímicas, em especial na determinação de novos compostos farmacologicamente ativos (BITTNER *et al.*, 2001); na família são comuns triterpenos, do tipo curcubitacina e lectinas. Na medicina tradicional, o uso da família Euphorbiaceae é

muito comum ao longo do desenvolvimento da própria humanidade. Um exemplo é a espécie *Euphorbia fischeriana*, que vêm sendo utilizada há mais de 2000 anos na China para o tratamento do câncer (DEI-JI *et al.*, 1991). Em pesquisa recente, Wang *et al.* (2006) obtiveram dos extratos das raízes desta espécie nove diterpenos, dos quais sete ainda não eram conhecidos, elucidando suas estruturas principalmente por meios espectrofotométricos; destes compostos, dois apresentaram considerável citotoxicidade *in vitro*, a prostratina, um composto já conhecido e o 17-acetoxiolkinolida B, composto descrito pela primeira vez por estes autores.

Wyde *et al.* (1993) demonstraram efeitos antivirais seletivos de polímeros polifenólicos obtidos a partir de cascas do caule de plantas do grupo das Euphorbiaceae contra diversos tipos de vírus de acentuada relevância em casos clínicos principalmente para países em desenvolvimento com o Brasil, tais como parainfluenza tipo 1; vírus influenza tipos A e B; e vírus respiratório sincicial. Estes são casos relevantes porque, nos países em desenvolvimento, complicações decorrentes de infecções causadas por vírus destes tipos freqüentemente podem levar a morte, principalmente em pacientes cujo estado físico já se encontre debilitado em decorrência de subnutrição e outros fatores.

Outro gênero bastante conhecido e explorado deste grupo é o *Croton*, cujos óleos costumam apresentar diversos ésteres forbólicos, que são compostos reconhecidamente precursores de processos tumorais (ABDEL; RIZK, 1987; HEGNAUER, 1989). Além disso, foi descrito em algumas espécies do gênero *Croton*, conhecidas no Peru e em outros países da América Latina, como “Sangre de Drago” (*C. lechleri*, *C. palanostigma* e *C. draconoides*) a taspina, que apresentou relevante atividade citotóxica *in vitro* e *in vivo*, além de acentuada ação antiinflamatória e cicatrizante (ITOKAWA *et al.*, 1991; VAISBERG *et al.*, 1989).

Manihot é outro gênero bem estudado fitoquimicamente, possivelmente por ser uma espécie comum nos trópicos e por ser o gênero de uma das mais populares fontes de carboidratos da América Latina – o aipim ou mandioca. Trease e Evans

(1989) citam que *Manihot esculentus* (variedade amarga) contém heterosídeos cianogenéticos. Recentemente, EBUEHI (2005) realizou o estudo dos extratos aquoso e etanólico dessa mesma espécie, encontrando nos extratos de raízes cruas alcalóides, flavonóides, taninos, açúcares reduzidos e antocianosídeos; nos extratos de folhas, foi detectada a presença dos grupos alcalóides, flavonóides, taninos, antraquinonas, flobatininas, açúcares reduzidos e antocianosídeos, além de outros compostos de valor nutritivo.

Aproximadamente 90% das espécies da família *Euphorbiaceae* estudadas até o momento tinham principalmente como compostos biologicamente ativos os terpenóides (BITTNER *et al.*, 2001). Os alcalóides também são considerados como possíveis determinantes na ação farmacológica, porque uma das ações mais apontadas pela população é a antitumoral, ação esta que deriva, na maioria dos casos, da potencial ação citotóxica que exibem alguns alcalóides; alguns dos fármacos mais utilizados no tratamento de câncer são alcalóides de origem vegetal, como os alcalóides da vinca (vincristina e vimblastina), o taxol e as podofilotaxonas (ALMEIDA *et al.*, 2005; CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

O estudo dos minerais presentes na planta também é importante para que se possa compreender mais sobre seus aspectos metabólicos e nutricionais (ZANGARO *et al.*, 2002), que podem influenciar na quantidade e no tipo de metabólitos secundários encontrados. Além disso, alguns metais são importantes constituintes de moléculas orgânicas, tais como as metaloproteínas, constituídas em enzimas associadas freqüentemente a íons como o manganês (Mn) e o zinco (Zn) e que, por exemplo, catalisam a produção de peróxido de hidrogênio.

Na família *Euphorbiaceae*, são bastante estudadas sob o aspecto de absorção de minerais aquelas espécies de vegetação “pioneira”, como algumas do gênero *Croton* (VANDRESEN *et al.*, 2007; MEYER *et al.*, 2004), além das cultivadas para alimentação, como as do gênero *Manihot*. Pode-se observar, pelos resultados desses trabalhos, que por se tratarem de plantas de vegetação pioneira, apresentam

grande retenção de macronutrientes como nitrogênio (N), potássio (K) e cálcio (Ca^{++}), mas apresentam um *deficit* acentuado na absorção de fósforo (P), mais pronunciadamente nos estágios iniciais do desenvolvimento, fato que levaria a ocorrência espontânea de fungos radiculares do tipo micorrizas arbusculares, os quais auxiliam na absorção desse nutriente (VANDRESEN *et al.*, 2007; ZANGARO *et al.*, 2002).

Croton floribundus Spreng. segundo publicação de Macari *et al.* (2002), apresenta uma média de ferro de aproximadamente 113 ppm (partes por milhão), determinada a partir de coletas sucessivas do vegetal em um determinado intervalo de tempo. A concentração deste e de outros minerais analisados (níquel e zinco, por exemplo) variou em todas as coletas de forma mais ou menos significativa. Todos estes são parte constituinte do solo, sendo consumidos pelas plantas como micronutrientes, ou seja, nutrientes minerais que lhes servem como um “suplemento alimentar” (DELAPORTE *et al.*, 2005).

É de suma importância à avaliação nutricional e, em especial, a presença de metais em plantas de interesse medicinal, sendo que estes últimos micronutrientes vegetais, podem influenciar em importantes processos orgânicos, como a oxi-redução (DELAPORTE *et al.*, 2005). Além disso, segundo o mesmo autor, o estudo da composição mineral de um vegetal contribui para que haja um controle de qualidade com parâmetros mais seguros para a padronização de espécies cultivadas com fins terapêuticos.

Salienta-se a importância do conteúdo mineral de plantas, principalmente daqueles considerados como “micronutrientes”; muitos são considerados potencialmente tóxicos e podem levar a quadros patológicos, quando consumidos por longos períodos de tempo ou a intoxicações agudas, quando aplicados em concentrações muito altas (D’MELLO; DUFFUS; DUFFUS, 1991).

Em relação ao gênero *Synadenium* Boiss, dos estudos fitoquímicos que se desenvolveram até o momento, a grande maioria foi realizada até o final da década

de 80. Segundo KINGHORN (1980), este gênero compreende 15 plantas nativas do Oeste da África que foram trazidas para as Américas e para a Europa com a finalidade de serem usadas como plantas ornamentais. Na África e na Ásia, porém, são bastante utilizadas como cercas-vivas em propriedades rurais, pois o contato do gado com o látex da planta causa lesões dérmicas, podendo inclusive levar o animal a cegueira caso entre em contato com os olhos deste (BAGAVATHI *et al.*, 1988)

A espécie *Synadenium carinatum*, popularmente conhecida no Brasil como janaúba ou leitossinha, vem sendo usada pela medicina popular há muitos anos. Nativa da África, seu uso é tradicional entre os indígenas, que utilizam a “garrafada”, obtida através de diluição do látex da planta em água pura e fresca, como remédio “cura-tudo”. Os estudos relacionados a essa espécie, porém, ainda são poucos.

Há diversos estudos publicados sobre outros gêneros da mesma família que mostram a presença de compostos químicos biologicamente ativos variados bem como compostos altamente tóxicos; toxicidade esta que parece estar estreitamente relacionada com sua concentração (BITTNER *et al.*, 2001).

Synadenium grantii, apresenta diversos compostos químicos com possível ação farmacológica, entre eles diterpenos, alcalóides, flavonóides entre outros. Porém, há indícios de que nenhum dos extratos obtidos possui a ação antiulcerativa apontada pela medicina popular; também foi evidenciada a presença de glicosídeos cianogênicos ou cianogenéticos, que são potencialmente tóxicos a um grande número de organismos vivos, demonstrando o risco da administração de extratos desta planta (FRANCISCO e PINOTTI, 2000; GRUPO, 1998).

Se por um lado foi demonstrado que *S. grantii* possui uma variedade de compostos tóxicos, também ficou claro que há outros tantos interessantes farmacologicamente, principalmente devido à ação antioxidante de alguns desses grupos de compostos, em especial os fenólicos, tal como é o caso dos flavonóides (TARFUT; MARTÍNEZ; STASHENKO, 2005).

Synadenium grantii demonstrou ação molusquicida nas frações ricas em ésteres diterpênicos, com especial atenção à ocorrência de classes incomuns

desses ésteres – tiglianos, ingenanos e dafnanos (EL SAYED, 1992).

Em 2005, Souza *et al.* isolaram e purificaram uma proteína presente no látex de *S. carinatum* por cromatografia de afinidade. Essa proteína, uma lecitina, é apontada por este mesmo trabalho como um potente agente de aglutinação de eritrócitos humanos, e, segundo os mesmo autores, é encontrada em diversas outras espécies da família Euphorbiaceae.

Outros trabalhos anteriores a esse já haviam isolado e purificado parcialmente lecitinas do látex de *S. grantii* (PREMARATNA *et al.*, 1981), demonstrando algumas de suas possíveis ações sobre as células do sistema imunológico.

Em sua pesquisa, Rogero *et al.* (2007) demonstraram a importância da ação das lecitinas de *S. carinatum* sobre os quadros de inflamação crônica, ressaltando ainda seu potencial como imunomodulador e como fonte de possíveis novas terapias. Este trabalho foi um dos pioneiros na aplicação de um único componente totalmente isolado de *S. carinatum* em modelos biológicos, comprovando a ação deste sobre o sistema imunológico. Esse trabalho foi muito importante porque demonstrou que esta espécie vegetal pode realmente apresentar uma ação antiinflamatória eficaz.

Outro importante aspecto ressaltado pela pesquisa foi à resistência apresentada por essa lecitina aos ácidos gástricos, demonstrando que sua administração via oral pode alcançar bons resultados (ROGERO *et al.*, 2007).

As lecitinas podem, ao mesmo tempo, estar ligadas a um efeito imunomodulador, com a estimulação de citocinas, como também com um efeito fortemente citotóxico; a obtenção desses efeitos com a mesma molécula está diretamente ligada à concentração em que é aplicada (MÖCKEL *et al.*, 1997).

Trabalhos com outras espécies do gênero *Synadenium* também demonstraram a presença de glicoproteínas biologicamente ativas (MENON *et al.*, 2002), o que pode nos levar a crer que a distribuição de certo tipo de padrão de proteínas de látex seja característico deste grupo vegetal. Além disso, muitos

trabalhos recentes apontam para a necessidade de maiores estudos sobre a família, e em especial, o gênero *Synadenium*, assim como afirmam, por exemplo, Souza-Fagundes *et al.* (2002), Bittner *et al.* (2001) e Oliveira *et al.* (2005).

2.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

Interessante notar que a realização de testes para determinação da citotoxicidade *in vitro* tem se tornado uma etapa cada vez mais freqüente em trabalhos para a determinação de toxicidade de produtos obtidos a partir de materiais naturais, em especial os de origem vegetal. Ensaio *in vitro* com as substâncias de origem vegetal podem fornecer importantes dados sobre seu modo de ação, e assim guiar as próximas etapas de estudo (DAVID *et al.*, 2007). Dessa forma chegou-se ao desenvolvimento de importantes drogas na atualidade, tais como o etoposido e o paclitaxel, utilizados para o tratamento de vários tipos de câncer, e que são substâncias sintetizadas a partir da podofilotoxina, a toxina encontrada nas plantas do gênero *Taxus*. Id (2007) descreve ainda em estudo inédito a ação citotóxica *in vitro* dos extratos clorofórmicos das partes aéreas de *Eriope blanchetii* (Benth.) Harley, uma planta que ocorre exclusivamente no território brasileiro, demonstrando uma atividade das lignanas presentes nos extratos testados nesses ensaios.

Além disso, a tendência é que o número de protocolos para testes *in vitro* e o número de estudos realizados utilizando este tipo de metodologia aumente com o passar do tempo, devido a questões éticas relacionadas com o trabalho utilizando animais (CRUZ *et al.*, 2004).

Rogero *et al.* (2003) também chamou a atenção para a necessidade de desenvolvimento e padronização de ensaios *in vitro*, principalmente para a detecção de toxicidade de biomateriais com aplicação clínica. Além disso, resoluções da *International Standard Organization*, constantes da ISO 10993 (INTERNATIONAL STANDARD, 1992), indicam que os ensaios de citotoxicidade *in vitro* devem ser os

primeiros a serem realizados na pesquisa de dispositivos clínicos, apontando a partir disso para a continuidade ou não dos testes; só então, a partir da resposta obtida nos testes *in vitro*, seria decidida a conveniência e importância dos testes *in vivo*.

Os testes de citotoxicidade *in vitro* consistem em expor direta ou indiretamente uma cultura de células de mamíferos a uma determinada substância, observando-se posteriormente as alterações causadas, como por exemplo, lise celular, inibição da formação de colônias celulares, descolamento do tecido, entre outros (ROGERO *et al.*, 2003). Essas modificações são observadas normalmente através de mecanismos de coloração, que são aplicados à cultura de células após um determinado período de exposição ao material em teste. Id (2003) também afirma que com a coloração é possível analisar a viabilidade celular, que é um dos testes mais freqüentes para a análise da citotoxicidade *in vitro*. Um teste muito utilizado é o da coloração com azul de Tripán, que avalia a integridade da membrana celular e que cora de azul o citoplasma das células lisadas, permitindo diferenciá-las das células vivas que não adquirem a coloração (CARVALHO *et al.*, 2004; VALADARES; CASTRO; CUNHA, 2008). Dessa forma são estabelecidos os parâmetros de viabilidade celular daquela substância sobre a cultura de células analisadas. As células são então contadas e são determinados os parâmetros estatísticos necessários para que se estabeleçam as diretrizes quantitativas da citotoxicidade do material sobre a cultura (SILVA *et al.*, 2004).

O procedimento normal dos ensaios preliminares de toxicidade aguda consiste em testar uma série de dosagens diferentes do produto em estudo, utilizando intervalos regulares os quais são estabelecidos a partir da toxicidade presumida do produto, levando em conta informações prévias – no caso do trabalho com plantas medicinais, obtidas fundamentalmente a partir da população que faz uso da planta; essas informações iniciais levam ao estabelecimento de níveis de segurança que guiam as etapas posteriores, sendo assim de fundamental importância para o estudo toxicológico (LOOMIS, 1990).

Esse tipo de teste oferece outras vantagens, além das relacionadas com as

questões éticas da pesquisa, como em relação ao custo, rapidez na obtenção de resultados e fácil reprodutibilidade (SILVA, 2004). O fato de poder ser reproduzido com facilidade também pode conferir mais credibilidade ao estudo. Além disso, também é possível limitar adequadamente o número de variáveis, o que facilita a realização do teste e contribui também para o aumento da confiabilidade estatística.

Os testes *in vitro* são ainda uns ótimos complementos, por apresentarem a citada possibilidade do controle das variáveis e também pela fácil manutenção das culturas, quando comparadas aos animais em laboratório (SIMONI *et al.*, 2002).

Os testes de citotoxicidade permitem uma análise comparativa fácil em relação às reações das células *in vitro* ao extrato ou composto em teste e os benefícios/mafeícios trazidos por eles; isso permite que se estabeleça a viabilidade e/ou a necessidade de testes com animais, e também permite que se estabeleçam níveis de segurança para a realização desses testes, caso sejam considerados convenientes (SEGNER, 1994).

As células de traquéia de feto bovino se caracterizam pelo crescimento em uma única camada de células, ou seja, não formando estratos, e se aderem às paredes do poço de cultivo; apresentam ainda formato ligeiramente alongado, com núcleo mais ou menos central. Elas foram escolhidas para este estudo por serem de fácil cultivo e por apresentarem resposta clara e rápida a estímulos exógenos (COLES, 1984; KRÜGER *et al.*, 1998; MARCONDES; GONÇALVES, 2008).

A possível presença de flavonóides em outras espécies de plantas do gênero *Synadenium* (GRUPO, 1998) também justifica a realização de testes de citotoxicidade *in vitro*, uma vez que dessa forma pode ser mais fácil avaliar a ocorrência de seus efeitos mais comuns já descritos. Os flavonóides têm demonstrado diversas atividades farmacológicas, entre elas analgésica e antiinflamatória (SIMONI *et al.*, 2002), além de atuarem como potenciais antioxidantes (HAVSTEEN, 2002).

Quando ocorre ruptura do equilíbrio entre substâncias antioxidantes e radicais livres, estes últimos formados normalmente como subprodutos das reações

celulares são gerados a situação de estresse oxidativo, a qual promove danos celulares e/ou teciduais, afetando membranas e mesmo ácidos nucléicos, de forma a interferir diretamente no ciclo de vida celular (CHOW, 2002). O uso de produtos que possuam espécies químicas antioxidantes tem por objetivo retardar ou inibir esse processo, prolongando assim a vida da célula (FRAGA FILHO, 2003).

É importante lembrar que os extratos de *Synadenium carinatum* usados pela população são bastante diluídos. Isso diminui a concentração dos compostos e, conseqüentemente, pode reduzir a sua citotoxicidade, conforme descrito por outros autores (MÖCKEL *et al.*, 1997).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Caracterizar os principais grupos de compostos químicos das folhas e avaliar o grau de citotoxicidade do látex de *Synadenium carinatum* Boiss, sobre cultivo de células de traquéia de feto bovino.

3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- a) Selecionar, dentro da família Euphorbiaceae o gênero *Synadenium* Boiss;
- b) Escolher, dentre o gênero *Synadenium*, a espécie *Synadenium carinatum*;
- c) Coletar amostras da planta para sua identificação e catalogação em herbário;
- d) Coletar amostras de folhas e látex de *Synadenium carinatum* para obtenção dos extratos;
- e) Obter extrato hidroalcoólico bruto a partir das folhas;
- f) Obter frações a partir do extrato por partição líquido/líquido com solventes de diferentes polaridades;
- g) Caracterizar os principais grupos químicos presentes nas frações, através de metodologias específicas;
- h) Obter extrato aquoso das folhas do vegetal;
- i) Caracterizar os principais grupos químicos presentes no extrato aquoso;
- j) Determinar as concentrações dos metais: manganês, alumínio, zinco e ferro nas folhas do vegetal;
- l) Fazer o cultivo de células traquéia de feto bovino, seguindo o protocolo estabelecido por KRÜGER *et al.* (1998);
- m) Analisar a citotoxicidade do extrato aquoso do látex aplicado nas culturas de células em diferentes concentrações;

n) Evidenciar a importância do conhecimento acadêmico em associação com o conhecimento popular em relação às plantas medicinais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO E AMOSTRA DA PESQUISA

4.1.1 População e amostra do material vegetal

4.1.1.1 Identificação e catalogação da amostra vegetal

Uma amostra da espécie vegetal em estudo foi coletada na cidade de Bauru, São Paulo. Uma exsicata da espécie foi enviada ao Instituto de Botânica da Universidade de São Paulo (USP), aos cuidados da Prof^a Dr^a. Inês Cordeiro, para identificação e catalogação.

4.1.1.2 Análise fitoquímica

A espécie vegetal analisada, *Synadenium carinatum*, teve amostras coletadas de um exemplar na cidade de Bauru, no Estado de São Paulo, entre os meses de junho e julho do ano de 2007.

Das folhas frescas destas amostras vegetais, foram preparados extratos brutos hidroalcoólico e aquoso, a partir dos quais foram realizadas as determinações dos principais grupamentos químicos presentes.

4.1.2 População e amostra de células – análise citotóxica

4.1.2.1 Grupo analisado

O grupo de células analisado foi constituído de células de traquéia de feto bovino padronizadas pelo Setor de Cultivo Celular do Laboratório Marcos Enrietti, Curitiba, Estado do Paraná, através de protocolo estabelecido pelo próprio Laboratório (KRÜGER *et al.*, 1998).

A estes grupos de células foram acrescentadas diferentes diluições do extrato (látex) vegetal a fim de analisar a citotoxicidade dos mesmos. Os cultivos que receberam o extrato (látex) são chamados de “grupo analisado”, ou “grupo teste” e são comparados a um grupo não exposto ao extrato, chamado “grupo controle”.

4.1.2.2 Grupo controle

O grupo controle foi constituído pelo mesmo padrão de células de traquéia de feto bovino, obtido no Laboratório Marcos Enrietti.

Estes grupos de cultivo celular não receberam os extratos, de forma a comparar-se a sua viabilidade em relação ao “grupo teste” após a coloração com o corante azul de Tripán.

4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO 20%

O extrato hidroalcoólico foi preparado segundo a metodologia de Moreira (1979) modificada por Nakashima (1993). O extrato bruto foi obtido por maceração a frio. Folhas do vegetal foram fragmentadas com o auxílio de uma tesoura e deixadas imersas no líquido extrator em diferentes concentrações em frasco âmbar devidamente fechado, durante um período de aproximadamente 10 dias para cada concentração do líquido extrator. O líquido extrator usado foi o etanol (EtOH) em diferentes concentrações, sendo elas P.A., 70% e 50%. Após o período de maceração, os extratos foram reunidos formando o extrato bruto, que foi filtrado em funil de vidro com papel de filtro, do qual foi separada uma alíquota e transferida a um balão apropriado para ser concentrado em rotavapor até que seu volume fosse reduzido a aproximadamente um terço do original. O processo visa à concentração do extrato para diminuir a interferência deste no processo posterior de

particionamento.

4.3 OBTENÇÃO DO RESÍDUO SECO

A determinação do teor de resíduo seco foi obtido através de secagem, em cápsula de porcelana previamente tarada, de uma alíquota de 10 mL do extrato hidroalcoólico bruto. A cápsula foi levada à secagem em estufa e posteriormente a um dessecador, foi pesado até um peso constante e calculado o teor de resíduo seco.

4.4 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES

As frações foram obtidas a partir do extrato bruto hidroalcoólico concentrado pelo processo de partição líquido-líquido, que consiste da adição de solventes orgânicos de polaridades crescentes: n-hexano, clorofórmio e acetato de etila. A extração foi realizado em funil de separação, com 20 mL do líquido extrator, até completar 200 mL. Após a extração com diferentes solventes o extrato bruto foi levado à evaporação em banho-maria para retirada do excesso do líquido extrator e que foi reconstituído com etanol a 70%, obtenção o a fração hidroalcoólica.

Todas as frações foram acondicionadas em frascos rotulados e devidamente fechados em geladeira até o momento do seu uso na triagem fitoquímica e foram denominadas F1 (fração n-hexânica), F2 (fração clorofórmica), F3 (fração acetato de etila) e HA (fração hidroalcoólica).

4.5 ENSAIOS FITOQUÍMICOS

Foram realizados ensaios fitoquímicos para verificação da presença dos principais grupamentos químicos nas frações obtidas a partir dos extratos das folhas de *S. carinatum*.

4.5.1 Ensaio com frações obtidas do extrato hidroalcoólico

4.5.1.1 Pesquisa de alcalóides

Levou-se à secura em banho-maria 50 mL de cada uma das frações (hexano, clorofórmio, acetato de etila, hidroalcoólica), em cápsula de porcelana. O resíduo seco foi dissolvido em 1 mL de etanol (EtOH) absoluto e acrescido de 20 mL de ácido clorídrico (HCl) 1%.

Cada fração tratada, com o volume total de 1 mL, foi colocada em 5 diferentes tubos de ensaio. Foram adicionados os reagentes a seguir, observando-se a ocorrência ou não da reação positiva (presença confirmada de alcalóides) indicada:

- a) reativo de Mayer: adicionaram-se duas gotas. Reação positiva: precipitado ou leve turvação brancos;
- b) reativo de Dragendorff: foram adicionadas duas gotas. Reação positiva: precipitado vermelho-tijolo;
- c) reativo de Bouchardat: adicionaram-se duas gotas. Reação positiva: precipitado alaranjado;
- d) reativo de Bertrand: foram adicionadas duas gotas. Reação positiva: precipitado ou leve turvação brancos.

Quando ocorreu a reação positiva, foi feita a reação de confirmação. Para tanto, transferiu-se o restante do extrato clorídrico da fração positiva para um funil de separação e alcalinizou-se com hidróxido de amônio (NH₄OH) até se obter um pH de 9 a 10. Foi efetuada uma extração com aproximadamente 50 mL (2x25) de uma mistura de éter:clorofórmio na proporção 3:1, a mistura foi levado em seguida à secura em banho-maria. Ao resíduo, adicionou-se 0,5 mL de EtOH e 5 mL de HCl 1%, aquecendo ligeiramente. Após resfriamento, foi transferido 1 mL em cada um dos cinco tubos de ensaios e adicionou-se três gotas dos reativos utilizados anteriormente (Mayer, Dragendorff, Bouchardat, Bertrand). Quando ocorreu a

formação de precipitado, foram adicionados gota a gota no máximo 2 mL de solução alcoólica de ácido tartárico 5%.

4.5.1.2. Pesquisa de heterosídeos flavônicos

4.5.1.2.1 Reação de Schinoda

Transferiu-se para cápsulas de porcelana 20 mL das frações F1, F2 e F3 e foi levado à secura em banho-maria. O resíduo seco foi ressuscendido em 10 mL de EtOH. Não há necessidade de concentrar a fração hidroalcoólica para esta reação.

Foram preparados tubos de ensaio com 200 mg de limalha de magnésio e adicionou-se 5 mL de cada uma das frações nos tubos. Os tubos foram colocados em béquer com gelo e adicionou-se lentamente 0,5 mL de HCl fumegante.

A confirmação da presença de heterosídeos flavônicos ocorreu quando houve a mudança de coloração da fração: amarelo a vermelho, para flavonas; vermelho a vermelho-sangue para flavonol e diidroflavonol; vermelho a violeta para flavononas; vermelho rosado, para derivados antocianoínicos.

4.5.1.2.2. Reação de Taubock ou oxalo-bórica

Levou-se a secura em banho-maria 10 mL de cada uma das frações. Ao resíduo seco, adicionaram-se 5 gotas de acetona e 30 mg de uma mistura de ácido bórico e ácido oxálico, na proporção de 1:1. Agitou-se e levou-se à secura. Ao resíduo, adicionaram-se 5 mL de éter etílico, transferindo então para tubos de ensaio. Foi observado sob ultravioleta (UV).

Considerou-se a reação com resultado positivo quando observada fluorescência amarelo-esverdeada.

4.5.1.2.3 Reação de Pacheco

Em cápsulas de porcelana, 10 mL de cada fração foram levados à secura em banho-maria. Adicionou-se ao resíduo seco alguns cristais de acetato de sódio (AcONa) e 0,1 mL de anidrido acético, aquecendo em fogareiro. Em seguida, adicionou-se 0,1 mL de HCl concentrado.

A reação foi considerada positiva quando houve aparecimento de coloração roxa.

4.5.1.2.4 Reação de Zinco (Zn) em HCl

Preparou-se um tubo de ensaio para cada fração com uma pastilha de zinco (Zn). Colocou-se 10 mL das frações F1, F2 e F3 em cápsulas de porcelana e levou-se à secura em banho-maria. Não há necessidade de concentrar a fração hidroalcoólica. Ao resíduo seco das frações levadas ao banho-maria, adicionou-se 10 mL de EtOH.

Levaram-se 5 mL de cada fração aos tubos de ensaio previamente preparados, em um béquer com gelo. Na capela, adicionou-se lentamente 0,5 mL de HCl fumegante.

A mudança da coloração da fração para roxo confirmava a reação como positiva.

4.5.1.3 Pesquisa de cumarinas

4.5.1.3.1 Reação 1

Em cápsulas de porcelana, foram concentrados 30 mL das frações F1, F2 e F3 em banho-maria, até que seu volume se reduzisse a 5 mL.

O mesmo volume da fração HA (30 mL) teve seu pH reduzido para 1 com a adição de HCl 2N. Após esse procedimento, a fração HA foi levada ao banho-maria para que fosse concentrada até o volume de 5 mL. Após esfriar a fração

concentrada foi levada para um funil de separação, foi extraído com 20 mL de éter etílico (2 vezes de 10 mL) obtendo-se a fração etérea, que foi levada para concentrar em banho-maria até que seu volume fosse reduzido a 5 mL.

Com as frações concentradas (F1, F2, F3 e etérea) 3 mL foram transferidos para tubos de ensaio. Adicionaram-se 2 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 1N recém-preparado e os tubos foram levados para uma câmara de luz ultravioleta (UV) em 366 nm, por um período de 15 minutos.

A confirmação da reação positiva para cumarinas ocorria se houvesse fluorescência azul ou verde-amarelada.

4.5.1.3.2 Reação 2

Os 2 mL restantes das frações preparadas para a reação anterior foram depositados em tiras de papel de filtro previamente preparadas e identificadas, formando três pontos de aproximadamente 1cm cada. Sobre duas das manchas, aplicou-se uma gota da solução de NaOH 1N recém-preparada (manchas 1 e 2). A mancha 1 foi coberta com uma moeda ou papel-alumínio e exposta ao UV a 366 nm por 15 minutos.

A presença de cumarinas era confirmada quando ocorria fluorescência azul ou verde-amarelada na mancha 2 expostas a luz UV.

4.5.1.4 Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos

4.5.1.4.1 Reação de Bornträeger

Transferiu-se 30 mL de cada uma das frações para balões de fundo redondo, com capacidade para 100 mL ou 250 mL. Adicionaram-se 5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 10%. Acoplou-se ao condensador e foi levado para refluxo por 30 minutos, filtrando em seguida, ainda quente, com papel de filtro.

As frações hexânica, clorofórmica e acetato foram levadas para funis de

separação onde se adicionou 30 mL de água destilada, formando então uma fração orgânica de cada fração original.

A fração hidroalcoólica foi extraída com 20 mL de éter etílico, em funil de separação, formando assim a fração etérea da fração original.

As frações foram concentradas em banho-maria até que se atingisse um volume de aproximadamente 5 mL. As frações concentradas foram transferidas para tubos de ensaio e adicionou-se 5 mL da solução de hidróxido de amônia (NH₄OH), agitando lentamente.

A mudança da coloração da fração para vermelho indicaria que o resultado da reação foi positivo.

4.5.1.5 Pesquisa de esteróides e/ou triterpenos

4.5.1.5.1 Reação de Libermann Bouchard

Em cápsulas de porcelana, evaporou-se 30 mL de cada uma das frações em banho-maria até a secura. Os resíduos foram dissolvidos em 5 mL de clorofórmio e filtrados.

Com o auxílio de uma pipeta, transferiram-se, de cada uma das frações, as seguintes alíquotas a três tubos de ensaio diferentes: 0,1 mL; 0,5 mL; 1,0 mL. Em seguida, os volumes foram completados com clorofórmio até 2 mL.

Em seguida adicionou-se 1 mL de anidrido acético e 0,5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado lentamente, observando-se então o desenvolvimento de coloração.

A mudança da coloração do extrato para rósea ou azul pode indicar a presença de esteróides ou triterpenos com função carbonila (C=O) no carbono 3 e dupla ligação entre os carbonos 5 e 6 da estrutura.

Se ocorresse coloração verde, haveria indícios de função hidroxila (OH) no carbono 3 e dupla ligação entre os carbonos 5 e 6.

Coloração amarela indicaria possível metilação (CH_3) no carbono 14.

4.5.1.5.2 Reação de Keller Kelliani

Preparou-se 4 tubos de ensaio, adicionando 2 mL de H_2SO_4 .

Levou-se à secura 2 mL de cada uma das frações no banho-maria, em cápsulas de porcelana. Os resíduos foram dissolvidos com 2 mL de ácido acético glacial e 0,2 mL de solução aquosa de cloreto férrico 1%. Cautelosamente as misturas foram transferidas para os tubos de ensaio previamente preparados, onde foi observada a ocorrência de coloração.

O desenvolvimento de coloração azul na zona de contato entre os dois líquidos ou na fase acética podia indicar presença de desoxi-açúcares do tipo esteróides.

Desenvolvimento de coloração verde na zona de contato ou na fase acética podia indicar a presença de desoxi-açúcares do tipo triterpenóides.

4.5.1.5.3 Reação de Baljet

Preparo prévio de duas soluções:

a) Solução A: ácido pícrico em etanol, a 5%;

b) Solução B: hidróxido de sódio 10%.

Colocou-se 2 mL de cada uma das frações em tubos de ensaio e adicionou-se, em cada tubo, 1 mL de cada uma das soluções A e B.

A reação positiva foi indicada com coloração laranja.

4.5.1.5.4 Reação de Tollens

Levou-se à secura, em cápsulas de porcelana, 2 mL de cada uma das frações em banho-maria. Ao resíduo, adicionou-se 1 mL de piridina, 0,5 mL de solução aquosa de nitrato 10%, 0,5 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio 5% e

adicionou-se hidróxido de amônia até a completa dissolução do precipitado. Levou-se a solução a uma chama até atingir fervura.

A reação positiva foi indicada com a formação de espelho de prata.

4.5.1.5.5 Reação de Kedde

Preparou-se previamente os seguintes reativos:

a) reativo A: ácido 3,5-dinitrobenzóico a 2%, em EtOH;

b) reativo B: hidróxido de potássio a 6%, em água destilada.

Levou-se cada uma das frações à secura em cápsulas de porcelana, no banho-maria. O resíduo foi dissolvido em metanol e transferido para tubos de ensaio. Adicionou-se 0,5 mL do reativo A e 0,5 mL do reativo B.

Na ocorrência da coloração violeta ou azul a reação foi considerada positiva.

4.5.1.5.6 Reação de Legal

Levou-se a secura 2 mL de cada uma das frações, em cápsulas de porcelana, no banho-maria. Os resíduos foram dissolvidos em piridina.

Transferiu-se então para tubos de ensaio. Nos tubos, adicionaram-se duas gotas do reativo nitroprusiato de sódio e uma pastilha de NaOH.

A reação foi considerada positiva quando houve desenvolvimento de coloração rosa.

4.6 OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO 20%

O extrato aquoso 20% foi preparado segundo a metodologia de Moreira (1979) modificada por Nakashima (1993). Folhas frescas do vegetal foram

fragmentadas e colocadas em recipiente de vidro com água destilada. Este recipiente foi levado ao banho-maria (BM), a uma temperatura aproximada de 60°C por um período de 3 horas. Após este período, o líquido foi filtrado com papel de filtro em funil de vidro, resultando assim no extrato aquoso 20%, no qual foi realizado a triagem fitoquímica.

4.6.1 Ensaio com o extrato aquoso

4.6.1.1 Pesquisa de heterosídeos antociânicos

Em três tubos de ensaio, devidamente numerados de 1 a 3, colocaram-se 5 mL do extrato aquoso. Acidificou-se o tubo número 1 (pH 4); alcalinizou-se o tubo número 2 (pH 10); e neutralizou-se o tubo número 3 (pH 7).

A reação foi considerada positiva quando houve as seguintes mudanças de coloração:

- a) meio ácido (tubo 1): tons avermelhados;
- b) meio básico (tubo 2): tons azulados;
- c) meio neutro (tubo 3): tons violáceos.

Aparecimento da coloração verde é possível em qualquer um dos tubos, indicando também uma reação positiva.

4.6.1.2 Pesquisa de heterosídeos saponínicos

Ensaio da espuma: os três tubos de ensaio do teste anterior (4.6.1.1), foram agitados energicamente, durante 5 minutos. A altura do anel de espuma formado logo após a agitação foi mesurada.

A persistência de anel de espuma de tamanho igual ou maior que 1 cm após o repouso (30 min) indicava a presença de heterosídeos saponínicos.

4.6.1.3 Pesquisa de heterosídeos cianogênicos

4.6.1.3.1 Reação do isopurpurato de sódio

Transferiu-se para um tubo de ensaio ou tubo de Roux, 5 mL do extrato aquoso de modo a não umedecer as paredes do tubo. Foram adicionados ao extrato 1 mL de H_2SO_4 1N. Suspendeu-se dentro do tubo uma tira de papel picro-sódico como auxílio de uma rolha de cortiça, de modo que o papel não tocasse no líquido. O tubo foi levado ao banho-maria a 60°C , por 30 minutos.

A reação foi considerada positiva quando o papel picro-sódico adquiriu uma coloração avermelhada.

4.6.1.3.2 Reação de Schoembein

Em cápsula de porcelana, foram depositados 5 mL do extrato aquoso. Adicionaram-se 4 gotas de solução de NaOH 10% ou KOH (hidróxido de potássio) 10%, 3 cristais de sulfato ferroso e uma gota de cloreto de ferro III (FeCl_3) 1%. A mistura foi aquecida até a ebulição e adicionou-se 1 gota de HCl concentrado.

O desenvolvimento de coloração azul característica – azul da Prússia – indicava presença de heterosídeos cianogênicos.

4.6.1.4 Pesquisa de taninos

4.6.1.4.1 Reação com cloreto férrico

Adicionaram-se 3 a 5 gotas de solução aquosa de cloreto férrico 1% em 1 mL do extrato aquoso.

Desenvolvimento de coloração azul indicava possível ocorrência de taninos; coloração verde, possivelmente flavonóides; e coloração marrom podia dar indícios da presença de poli fenóis.

4.6.1.4.2 Reação da solução de gelatina

Em três tubos de ensaio, identificados de 1 a 3, adicionou-se 0,5 mL; 1,0 mL; 2,0 mL do extrato aquoso em cada tubo, respectivamente. Adicionou-se em cada tubo 2,0 mL de solução de gelatina 2,5%.

A formação de precipitado indicava reação positiva.

4.6.1.4.3 Reação de sulfato de ferro amoniacal

Adicionou-se 2 gotas de sulfato de ferro amoniacal a 5 mL do extrato aquoso, em tubo de ensaio.

A ocorrência de coloração azul indicava reação positiva para taninos.

4.6.1.4.4 Reação de cloridrato de emetina

Em tubo de ensaio, depositou-se 1 mL do extrato aquoso. Adicionou-se 4 mL de água destilada e 2 gotas de solução aquosa de cloridrato de emetina 1%.

O desenvolvimento de precipitado indicaria a presença de taninos.

4.6.1.4.5 Reação de cianeto de potássio

Preparou-se previamente uma solução de ácido acético diluído em 1 mL de solução aquosa de cianeto de potássio 10%. Adicionou-se uma gota desta solução a 5 mL do extrato, em tubo de ensaio.

Desenvolvimento de coloração rosada indicaria a presença de taninos.

4.6.1.4.6 Reação de ácido nitroso

Transferiu-se para uma cápsula de porcelana 5 mL do extrato aquoso. Foram adicionados alguns cristais de nitrito de potássio e 5 gotas de ácido sulfúrico

0,5%.

Havendo aparecimento de coloração rosada, que passa a púrpura e ao índigo, consideramos a reação positiva para a presença de taninos.

4.6.1.4.7 Reação do dicromato de potássio

Em tubo de ensaio, depositaram-se 5 mL do extrato aquoso e foram adicionadas 3 gotas de dicromato de potássio 1%.

Desenvolvimento de precipitado ao término da reação era considerado positivo, indicando a presença de taninos.

4.6.1.4.8 Ensaio de Staniasny

Transferiu-se para um balão de junta 24/40 de 250 mL de capacidade, 30 mL do extrato aquoso, 6 mL de formaldeído 40% e 4 mL de HCl 37%. Acoplou-se a um condensador de bolas e levou-se a refluxo durante uma hora. Após esfriar, foi filtrado com papel de filtro. Foram utilizados o filtrado e os resíduos do papel de filtro.

Reação com os resíduos: lavou-se o papel de filtro com etanol 50% e gotejou-se sobre o resíduo lavado algumas gotas de solução aquosa de KOH 5%.

Coloração verde indicava reação positiva para taninos não-hidrolisáveis.

Reação com o filtrado: sem agitar, adicionou-se acetato de sódio e algumas gotas de solução aquosa de cloreto férrico 1%.

Coloração azulada ao término da reação indicava a presença de taninos hidrolisáveis.

4.6.1.5 Pesquisa de aminogrupos

Reação com ninhidrina: em cápsula de porcelana, depositou-se 10 mL do extrato aquoso e levou-se para concentrar em banho-maria, a uma temperatura

aproximada de 60°C, até atingir 5 mL.

Em papel de filtro ou em placa cromatográfica (CCD), foram depositadas 5 gotas do extrato concentrado, formando uma mancha. Após deixar secar, nebulizou-se com ninhidrina sobre a mancha. A placa foi levada a estufa para aquecimento, durante aproximadamente 15 minutos.

A reação foi considerada positiva se houvesse coloração azul ou violeta.

4.6.1.6 Pesquisa de ácidos fixos

Transferiu-se para um balão de 100 mL, 20 mL do extrato aquoso e 2 mL de NaOH 1N. Foi acoplado a um condensador de bolas e levado a refluxo por 30 minutos. Deixou-se esfriar e acidificou-se a solução com H₂SO₄, extraíndo com éter etílico em seguida, o qual foi adicionando-o em três vezes, de 10 mL cada.

Adicionou carvão ativado à fração éterea, filtrou-se e levou a secar em banho-maria a 50°C. O resíduo foi aquecido durante 10 minutos, em estufa, a temperatura de 100°C. Após esfriar, adicionou-se 5 mL de solução aquosa de hidróxido de amônia 1N. Foi filtrado e depositou-se 3 gotas deste extrato em um papel, formando uma mancha de aproximadamente 1cm. Gotejou-se sobre a mancha o reativo de Nessler.

O desenvolvimento de coloração indicaria a presença de ácidos fixos.

4.6.1.7 Pesquisa de ácidos voláteis

Em um tubo de ensaio, depositaram-se 5 mL do extrato aquoso sem umedecer as paredes. Suspendeu-se uma tira de papel de tornassol ou de pH (0-14) com auxílio de uma rolha de cortiça, de modo que o papel não tocasse o líquido. O tubo foi levado ao banho-maria, a uma temperatura de 60°C por 30 minutos.

Caso haja a presença de ácidos voláteis, o papel irá adquirir coloração avermelhada.

4.7 DETERMINAÇÃO DE TEOR DE MINERAIS

A determinação do teor de minerais seguiu o preparo de amostra de cinzas totais em triplicata para este trabalho conforme a Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 1988), modificado para este estudo.

Folhas de *S. carinatum* foram secas à sombra e à temperatura ambiente. A quantidade de 1 g destas folhas foi pesada em balança analítica, sendo posteriormente triturada e pulverizada em graal de porcelana. Em cadinho de porcelana previamente tarado, o pó obtido foi colocado e levado à mufla, com temperatura entre 625-650°C, por aproximadamente 5 horas, até que todo o carvão fosse eliminado e se obtivesse um pó branco. Após o resfriamento da amostra em dessecador, esta foi pesada em balança analítica e posteriormente dissolvida em 20 mL de água deionizada em erlenmeyer de 100 mL. A amostra dissolvida foi levada a aquecimento em chapa elétrica até a fervura.

Quando a mistura entrou em ebulição, foram adicionados 5 mL de água régia (ácido nítrico e ácido clorídrico, na proporção de 1:3, preparado segundo Assumpção e Morita, 1968) em pequenas porções, sem deixar que secasse, observando-se a eliminação de fumos amarelos.

Em seguida, a mistura foi filtrada em papel faixa azul (Merck) e recolhida em balão volumétrico de 100 mL, completando o volume para 100 mL com água deionizada.

As amostras permaneceram acondicionadas a -20°C até que fossem enviadas ao laboratório Teclab Análises Ambientais (São José dos Pinhais, PR), o qual realizou as análises com técnicas fotométricas.

4.8 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE COM CULTIVO DE CÉLULAS *IN VITRO*

O modelo de ensaio *in vitro* deste trabalho foi desenvolvido a partir de Moreira, Weiss e Krüger (2000), com adaptações às condições desse experimento.

As culturas de células de traquéia de feto bovino foram obtidas do Laboratório Marcos Enrietti, através do cultivo de células de fetos bovinos abortados.

As culturas de células utilizadas neste estudo foram previamente estabilizadas por 48 horas após a semeadura, em meio de cultura constituída de um meio básico F10-199 Invitrogen (EDDINGTON; BRIDGES, 1985), adicionado de 10% de FBS (soro bovino fetal), penicilina (100UI/ mL), estreptomicina (100 µg/ mL) e anfotericina B (2,5 µg/ mL) (MOREIRA; WEISS; KRÜGER, 2000).

As culturas de células foram feitas e mantidas em placas de cultivo com 96 poços (NAPCO, modelo 6100), conforme mostra a FIGURA 1, e em incubadora de CO₂ para cultivo de células (TRP) a 28°C e a uma saturação máxima de 5% de CO₂.

Este estudo se utilizou de 3 placas de cultivo com 96 poços cada; no entanto, apenas 64 desses poços de cada placa foram analisados, uma vez que apenas neste número foi aplicado o produto a ser analisado. Em duas delas foi aplicado o produto; a terceira serviu como controle.

O método de aplicação do produto e a análise de seus resultados foram criados pelos autores do trabalho e por seus colaboradores, e está em processo de padronização.

Foram extraídos por gotejamento 100 µL de látex do pecíolo da planta com o auxílio de uma micropipeta. Este volume foi dissolvido em 900µL de água destilada. Esta primeira solução foi chamada de “diluição 1”, correspondendo ao volume 10⁻¹. A diluição seguinte – 10⁻² – foi feita diluindo-se 100 µl desta primeira solução em 900 µL de água destilada, seguindo dessa forma um padrão de diluições crescentes de base 10. Ao final, obtiveram-se 8 diferentes diluições, as quais foram nomeadas de 10⁻¹ até 10⁻⁸.

As 8 diluições foram aplicadas nos poços de cultura das placas A e B, sendo feitas 8 repetições para cada diferente diluição. Na placa A, foi aplicado um volume de 10 µL de cada uma das soluções-teste. Na placa B, foi aplicado um volume de 20

μL de cada solução-teste nos poços de cultivo. O controle foi feito utilizando uma placa C, que continha apenas meio de cultura e foi mantida sob as mesmas condições que as placas testadas.

A observação foi feita durante um período de 72 horas, em microscópio invertido (marca Olympus, modelo IM, número de série: 101953) a cada período de 24 horas.

Os efeitos do látex foram observados por dois dias; no terceiro dia, as placas foram lavadas com solução PBS (solução fosfato-tamponada), coloridas com Azul de Tripán e novamente observadas ao microscópio. As células que sofreram lise ou tiveram a permeabilidade de membrana alterada e permaneceram aderidas ao tapete de células, apresentaram coloração azul ao serem observadas através do microscópio invertido (CARVALHO *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2004).

4.9 LEITURA DA DENSIDADE ÓPTICA DO LÁTEX DE *SYNADENIUM CARINATUM*

A leitura da densidade óptica do látex de *S. carinatum* foi realizada nos laboratórios da Tecpar em Curitiba, PR.

O objetivo das tomadas dessas leituras foi o de estabelecer um parâmetro mais preciso para as dosagens de látex utilizadas nos experimentos de citotoxicidade, bem como, em futuros estudos, poder direcionar a quantificação de compostos químicos ali presentes.

Os métodos descritos foram modificados a fim de adaptar as metodologias padrões às particularidades da amostra em estudo.

O aparelho utilizado para fazer as leituras foi um espectrofotômetro da marca Hewlett-Packard, modelo μ -Quant ($\lambda = 650\text{nm}$) – leitor ELISA.

Partiu-se da mesma concentração utilizada pela população com extrato aquoso, utilizando-se água destilada.

Foram então feitas diluições de base 2 sempre utilizando água destilada, sendo que a primeira diluição partiu da razão 1:200, havendo 7 sucessivas diluições

de mesma base, chegando à 8.^a diluição (1 :25600).

Essas diluições foram então colocadas em placas de cultivo (figura 1), adequadas para a leitura neste tipo de aparelho, e levadas ao espectrofotômetro onde foram tomadas as leituras.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TESTES FITOQUÍMICOS

Fundamentalmente, o processo de *screening* ou triagem fitoquímica se baseia no princípio de que toda e qualquer substância presente na planta, independente da sua concentração, pode ser um princípio ativo (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Pelo fato de haver poucos estudos desse tipo com o gênero *Synadenium*, e das crescentes evidências de sua bioatividade (VALADARES; CASTRO; CUNHA, 2008; JÄGER; HUTCHINGS; VAN STADEN, 1996; AFONSO-CARDOSO *et al.*, 2007), foi realizado o *screening* fitoquímico com o objetivo de rastrear todos os possíveis grupos de compostos com algum tipo de bioatividade, quer seja tóxica ou terapêutica, nos extratos analisados.

O *screening* fitoquímico de *Synadenium carinatum* evidenciou a presença de diversos grupos de metabólitos secundários de interesse farmacológico, o que pode demonstrar necessidade de estudos mais aprofundados sobre o vegetal.

A presença de alcalóides foi observada de maneira significativa na fração clorofórmica (F2) na reação de Meyer, com formação de precipitado branco. As outras frações apresentaram resultado negativo. Estes resultados vêm corroborar com estudos já realizados antes com o gênero (GRUPO, 1998).

A pesquisa dos heterosídeos flavônicos mostrou-se fortemente positiva para a fração acetato de etila (F3) nas reações de Schinoda, com zinco, e reação de oxalo-bórica. Também, a fração F2 apresentou resultado positivo, somente na reação oxalo-bórica.

Durante os ensaios para a verificação da presença dos heterosídeos flavônicos, a fração F3 desenvolveu forte coloração vermelho-sangue na reação de Schinoda. Na reação de zinco em cloro, forte coloração roxa foi observada. Na

reação oxalo-bórica, F3 exibiu forte fluorescência amarelo-esverdeada. A fração clorofórmica (F2) também apresentou fluorescência amarelo-esverdeada nesta reação, porém não tão intenso quanto F3. Nenhuma das frações apresentou resultado positivo para a reação de Pacheco.

As outras frações tiveram resposta negativa à presença de heterosídeos flavônicos em todos os testes. Isso já era esperado também, já que os heterosídeos flavônicos tendem a se associar com moléculas de solventes orgânicos de polaridade mediana ou maior, como o acetato de etila, solvente utilizado na fração 3, ou, menos freqüentemente, o clorofórmio, utilizado na fração 2 (HAVSTEEN, 2002).

Os flavonóides são substâncias que merecem especial atenção, já que possuem um alto potencial antioxidante e, por isso, podem ter uma larga aplicação na indústria farmacêutica. No entanto, a administração deve ser sempre cautelosa, pois, mesmo sendo uma das drogas naturais com menor índice de intoxicações agudas, há flavonóides que são potencialmente tóxicos e que podem causar intoxicação em longo prazo, se depositando em órgãos vitais como o fígado (Id, 2002). Esse grupo é considerado como o mais disseminado em plantas, sendo que até o momento estima-se que 2 mil flavonóides já tenham sido identificados em estado livre ou na forma de glicosídeos. Entre as bioatividades associadas aos flavonóides estão: antimicrobiana, agentes alelopáticos, inibidores de enzimas, além de, como já mencionado, larga ação antioxidante (SASAKI, 2008).

Além disso, estudos anatômicos do gênero demonstraram a presença de idioblastos secretores de compostos fenólicos (GRUPO, 1998), que podem assim estar relacionados com uma riqueza em compostos desse tipo, como os flavonóides, e são também mais uma evidência que corrobora com os resultados aqui encontrados.

A pesquisa de cumarinas também apresentou resultado satisfatório, do ponto de vista da forte evidência da presença desses metabólitos. As frações clorofórmica (F2) e acetato de etila (F3) apresentaram fluorescência azul moderada

e amarela intensa, respectivamente, mas somente quando a reação foi realizada em tubos de ensaio. Para a reação realizada em papel de filtro, os resultados foram negativos para todas as frações.

Na pesquisa de heterosídeos antraquinônicos foi observado resultado positivo somente para a fração hidroalcoólica (HA), com desenvolvimento de fraca coloração vermelha. Esse resultado demonstra a possível presença de heterosídeos antraquinônicos o que deve ser confirmado em estudos posteriores.

As reações para pesquisa de esteróides e triterpenos também apresentaram resultados interessantes nas frações hexânica e clorofórmica. Isso ocorre porque essa classe de metabólitos secundários tem maior afinidade, principalmente em solventes como o n-hexano e o clorofórmio/diclorometano, estes dois últimos utilizados no presente trabalho para a formação das frações F1 e F2, respectivamente.

Durante a pesquisa de esteróides e/ou triterpenos, na realização da reação de Libermann-Bouchard, houve desenvolvimento de coloração verde para as frações F1 (hexânica) e F2 (clorofórmica). As mesmas frações apresentaram resultados fortemente positivos na reação de Keller-Kelliani, com desenvolvimento de coloração verde escura, confirmando a presença de heterosídeos terpênicos.

A reação de Tollens para triterpenos e esteróides apresentou resultados positivos para as frações F1 e F2. Em ambas ocorreu a formação do espelho de prata. Nota-se que a reação com a fração F2 não necessitou de aquecimento, pois a formação do espelho de prata foi espontânea e imediata.

A reação de Baljet para triterpenos e esteróides teve resultados negativos para todas as frações, assim como as reações de Kedde e de Legal.

Os resultados da pesquisa com as frações do extrato hidroalcoólico estão representados no quadro 1:

QUADRO 1 - RESULTADOS DOS TESTES FITOQUÍMICOS PARA AS FRAÇÕES F1, F2, F3 E HIDROALCOÓLICA (HA) DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO DE *SYNADENIUM CARINATUM*

Fração \ Metabólito	F1 (hexânica)	F2 (clorofórmica)	F3 (acetato de etila)	HA
Alcalóides	-	++	-	-
Heterosídeos Flavônicos	-	+	+++	-
Cumarinas	-	+	++	-
Heterosídeos Antraquinônicos	-	-	-	+
Esteróides e/ou Triterpenos	+++	+++	-	-

FONTE: O autor (2008).

LEGENDA - presença da classe de metabólitos secundários indicada por:

+: reação fracamente positiva

++: reação positiva

+++ : reação fortemente positiva

Ausência indicada por:

-: ausente

As reações com o extrato aquoso também demonstraram que vários compostos de interesse podem estar presentes.

Foi possível observar claramente a presença de taninos, tanto hidrolisáveis quanto condensados, na reação de formol com ácido clorídrico. A reação com dicromato de potássio, assim como as reações com sulfato de ferro amoniacal e cloreto férrico tiveram resultados fortemente positivos para a presença de taninos. As reações com cianeto de potássio, ácido nitroso, cloridrato de emetina e gelatina tiveram resultados negativos para a presença de taninos.

A pesquisa de ácidos fixos teve resultado fortemente positiva quando realizada a reação com o extrato aquoso de *Synadenium carinatum*, com desenvolvimento de forte coloração característica. A presença de ácidos voláteis, no entanto, não foi confirmada nos ensaios realizados.

Os testes confirmaram a presença de aminogrupos, com desenvolvimento de coloração violeta intensa característica durante a reação com a ninhidrina.

Heterosídeos cianogênicos não foram encontrados no extrato aquoso analisado em nenhuma das reações.

As reações realizadas para a constatação da presença de heterosídeos antociânicos confirmaram a presença destes no extrato aquoso através da formação

de coloração verde característica.

A presença de heterosídeos saponínicos não foi confirmada pela reação realizada neste estudo.

Os resultados obtidos nos ensaios com o extrato aquoso estão representados no quadro 2:

QUADRO 2 - RESULTADOS DOS TESTES FITOQUÍMICOS PARA EXTRATO AQUOSO DE *SYNADENIUM CARINATUM*

Grupos de Compostos	Resultado
Heterosídeos Antociânicos	+++
Heterosídeos Saponínicos	---
Heterosídeos Cianogênicos	---
Taninos Hidrolisáveis	+++
Taninos Não-hidrolisáveis	+++
Aminogrupos	+++
Ácidos Fixos	+++
Ácidos Voláteis	---

FONTE: O autor (2008).

LEGENDA - presença da classe de metabólitos secundários indicada por:

+: reação fracamente positiva

++: reação positiva

+++ : reação fortemente positiva

Ausência indicada por:

-: ausente

5.2 TESTES DE CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

O extrato aquoso de látex de *S. carinatum* mostrou-se citotóxico desde o primeiro dia de aplicação, observando-se uma alta ocorrência de mortes celulares desde o primeiro dia de teste. Este fato contribuiu para a interrupção do experimento 48 horas antes do programado.

As culturas de células apresentaram, 72 horas após a aplicação do látex, alta desorganização tecidual, principalmente nas duas concentrações mais altas (10^{-1} e 10^{-2} – concentrações 1 e 2, respectivamente) e em ambas as quantidades testadas (10 e 20 μ L); aparentemente as células não conseguiram aderir-se às paredes do poço de cultura e não formaram a estrutura comumente chamada de “tapete de

células” (formação de monocamada aderente característica deste tecido), estrutura esta observada com clareza nas placas de controle. A mortalidade celular observada durante essas 72 horas foi significativa, fato dado pelo grande número de células com características de estado de morte celular (FIGURA 2).

Também, foram observadas no meio de cultura cristais do tipo drusas, que possivelmente são provenientes do látex aplicado nas culturas (FIGURA 3), muito embora uns dos poucos relatos que se tem de cristais do látex da planta descrevam apenas os do tipo ráfides (GRUPO, 1998). Não se descarta, porém, a hipótese de ter ocorrido alguma reação entre componentes do látex e do meio de cultura, resultando na formação desse tipo de cristal. Este fato será estudado em futuros trabalhos.

Importante salientar neste momento que cristais do tipo drusas ainda não foram descritos neste gênero (GRUPO, 1998; MACHADO *et al.*, 2007), e que podem ser um parâmetro importante na classificação botânica, carecendo para tanto de estudos anatômicos mais aprofundados.

Após este período, as culturas passaram por um processo de tripla lavagem com PBS e coloração com o corante Azul de Tripán. Após esse processo foi possível observar que em ambas as quantidades e nas duas diluições mais concentradas (10^{-1} e 10^{-2}) não havia nenhuma célula viva. Esse fato provavelmente se deve à morte das células e/ou à perda da sua capacidade de se aderir às paredes do poço de cultura, descaracterizando o tecido e confirmando as observações anteriores à coloração. Isto pode ser devido à atividade do extrato testado sobre os canais de transporte de Ca^{2+} e Mg^{2+} das células, íons estes que contribuem para aumentar a capacidade aderente das células de um tecido. Outra possibilidade é a sua influência sobre proteínas ligantes dessas células, entre as quais se podem destacar a vitronectina e a fibronectina (XUTGLÀ; SANCHÉZ; OTERO, 1997).

Na placa 1, o “desprendimento total da camada de células” foi observado nas diluições 1 e 2. Na placa 2, o mesmo efeito foi observado até a terceira diluição (10^{-3}), demonstrando assim que a toxicidade do produto é mais elevada nesta

quantidade – 20 μL –, maior que aquela aplicada na Placa 1 – 10 μL .

Um nível moderado de organização celular pode ser observado a partir da diluição 3, na placa 1. Foi possível ver células vivas e aderidas às paredes do poço mesmo após a lavagem, ainda que um grande número de mortes celulares pudesse ser observado; as células sobreviventes apresentavam formato arredondado ao invés do característico alongado, formando pequenos grupos isolados. Nestas células sobreviventes foi observada uma intensa vacuolização, o que pode levar a crer que este seja um pré-estágio da morte das células provocada pelo produto (FIGURA 4). Na placa 2 este mesmo efeito só foi observado a partir da diluição 4.

Em ambas as placas de cultivo, o nível de organização observado na diluição 8 (QUADROS 3 e 4) foi bastante semelhante ao encontrado na placa controle, sendo, portanto, menos tóxico do que as concentrações mais altas.

A mensuração da citotoxicidade se deu tendo como referência o efeito apresentado em cada uma das concentrações de látex testadas. Foi determinado o “efeito principal” observado na maioria dos poços testados com determinada concentração e assim foram quantificados os poços de cultivo em que aquele efeito ocorreu.

Foram estabelecidos números, de 1 a 4, para designar e classificar os diferentes efeitos tóxicos observados nos meios de cultivo, sendo 1 o efeito mais grave e 4 o efeito mais sutil. Isso permitiu que se estabelecesse uma correlação primária entre concentração de látex e citotoxicidade, que podemos observar nos quadros 3 e 4, onde as legendas trazem a especificação de cada um dos referidos efeitos – 1, 2, 3 e 4. Os resultados contidos nestes quadros expressam o número de poços em que o efeito foi observado.

QUADRO 3 - VARIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS OBSERVADOS AO FINAL DO EXPERIMENTO NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO AQUOSO DE LÁTEX APLICADAS – QUANTIDADE APLICADA: 10 µL

Efeito \ Concentração	1	2	3	4
10 ⁻¹	8	---	---	---
10 ⁻²	7	1	---	---
10 ⁻³	1	7	---	---
10 ⁻⁴	---	2	4	2
10 ⁻⁵	---	2	5	1
10 ⁻⁶	---	---	3	5
10 ⁻⁷	---	---	1	7
10 ⁻⁸	---	---	---	8

FONTE: O autor (2008).

QUADRO 4 - VARIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS OBSERVADOS AO FINAL DO EXPERIMENTO NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO AQUOSO DE LÁTEX APLICADAS – QUANTIDADE APLICADA: 20µL

Efeito \ Concentração	1	2	3	4
10 ⁻¹	8	---	---	---
10 ⁻²	8	---	---	---
10 ⁻³	8	---	---	---
10 ⁻⁴	---	5	2	1
10 ⁻⁵	---	---	5	3
10 ⁻⁶	---	---	2	6
10 ⁻⁷	---	---	1	7
10 ⁻⁸	---	---	---	8

FONTE: O autor (2008).

LEGENDA:

- 1: desprendimento total da camada aderente de células: nenhuma célula viva ou morta pôde ser vista após a lavagem e coração da placa de cultivo.
- 2: alta incidência de morte celular, não-formação da característica monocamada aderente de células - ausência de tecido organizado; células deformadas agrupadas pontualmente - “grumos”.
- 3: presença de leve organização de tecido – formação ainda desorganizada de uma monocamada aderente de células; incidência de morte celular razoável.
- 4: formação de monocamada aderente de células; baixa incidência de morte celular (comparável ao controle).

Em função desses resultados obtidos, foram elaborados gráficos apresentados abaixo, em que a quantidade de látex aplicada está relacionada com a morte das células. Nesses gráficos pode-se observar a predominância do que foi chamado de “efeitos severos” (predominância dos efeitos 1 e 2 descritos anteriormente) nas duas quantidades testadas.

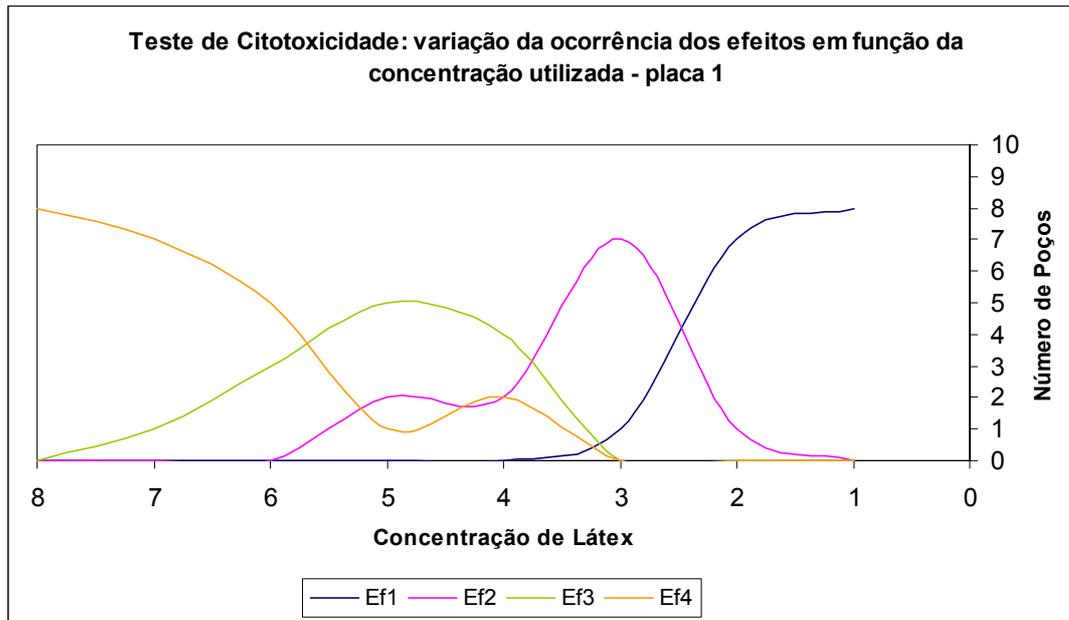


GRÁFICO 1 - As curvas representadas no gráfico mostram a variação dos efeitos tóxicos exibidos pelo látex de *Synadenium carinatum* segundo o número de poços afetados e a concentração de látex utilizada na placa 1, onde foram utilizados 10 μ L de cada diluição.

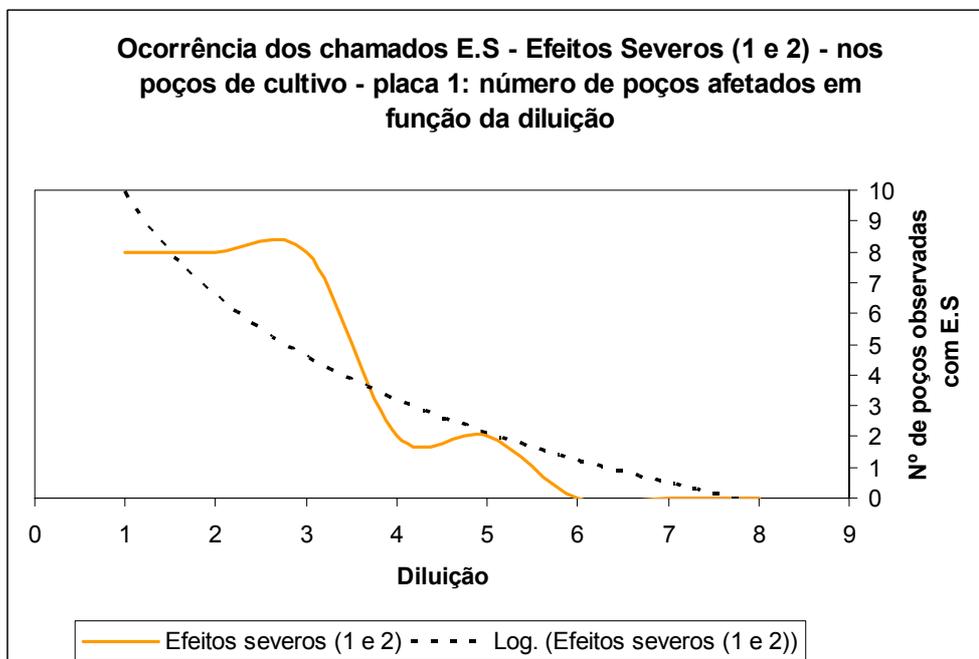


GRÁFICO 2 - Variação da ocorrência dos “efeitos severos” (1, desprendimento total da camada aderente de células e 2, alta incidência de morte celular) causados pelo látex na Placa 1, em função da diluição aplicada. Uma curva logarítmica foi construída com base nos valores aplicados no gráfico, a fim de melhor visualizar a variância dos dados.

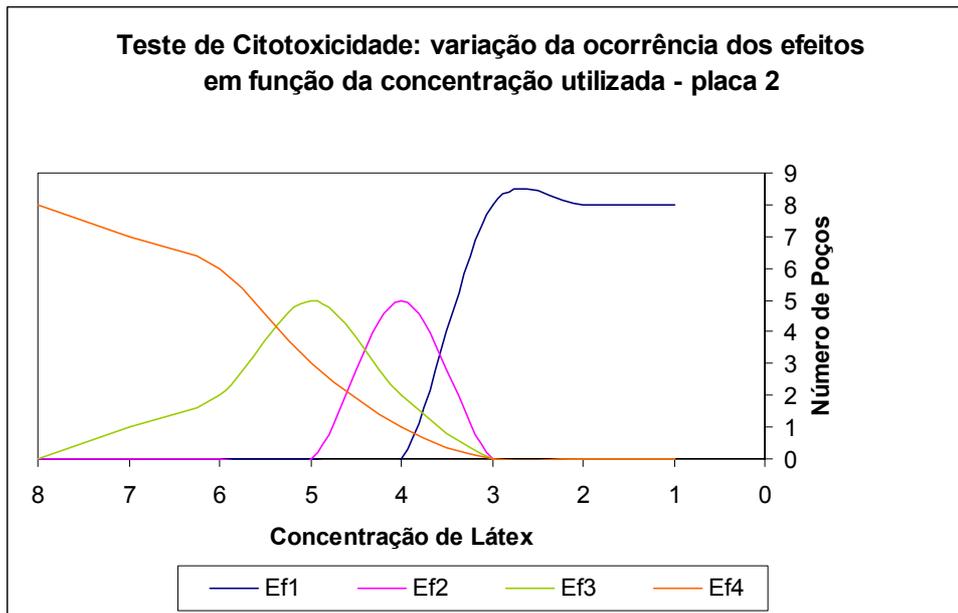


GRÁFICO 3 - As curvas representadas no gráfico mostram a variação dos efeitos tóxicos exibidos pelo látex de *Synadenium carinatum* segundo o número de poços afetados e a concentração de látex utilizada na placa 2, onde foram utilizados 20 μ L de cada diluição.

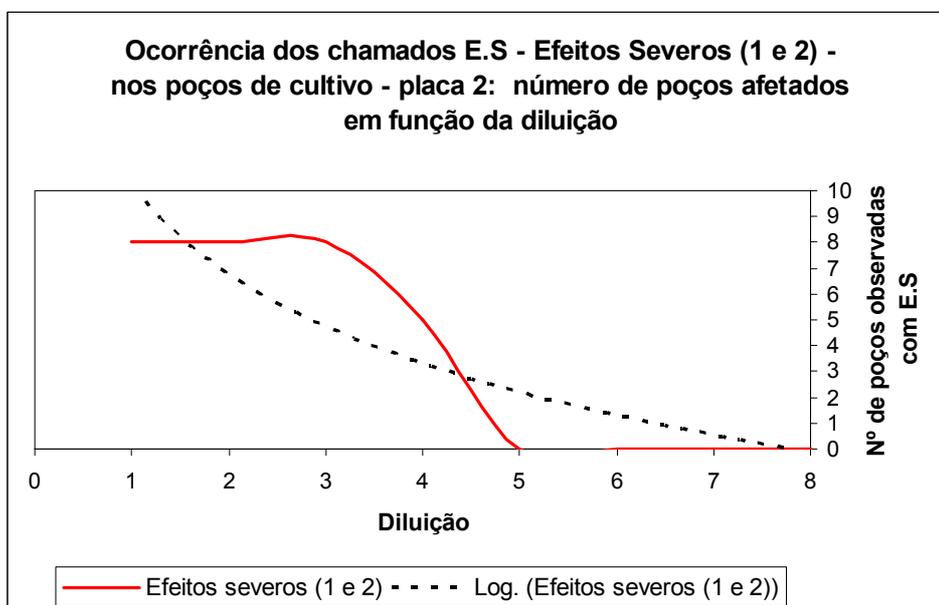


GRÁFICO 4 - Variação da ocorrência dos “efeitos severos” (1, desprendimento total da camada aderente de células e 2, alta incidência de morte celular) causados pelo látex na placa 1, em função da diluição aplicada. Uma curva logarítmica foi construída com base nos valores aplicados no gráfico, a fim de melhor visualizar a variância dos dados.

A DTCC₅₀ (Dose Tóxica em Cultivo de Células letal a 50% dos indivíduos) foi calculada pelo método de Reed-Muench (1938), onde foi estipulada a dose ou diluição em que ocorre a morte celular de 50% das células do cultivo. Segundo esse método, a DTCC₅₀ para a menor quantidade – 10 µL – é de 10^{-2,5} e para a maior quantidade testada – 20µL – é de 10^{-3,5}, o que significa que doses menores do que estas são as indicadas para uma possível aplicação terapêutica.

5.3 LEITURA DA DENSIDADE ÓPTICA DO LÁTEX DE *SYNADENIUM CARINATUM*

A medição da densidade óptica do látex de *S. carinatum* foi feita numa tentativa de estabelecer um parâmetro mais preciso das quantidades tóxicas do látex às culturas de células.

Primeiramente, tentou-se medir a densidade óptica do extrato aquoso na mesma concentração em que é utilizado pela população. No entanto, esta concentração era excessivamente alta para que se fizesse a leitura em qualquer comprimento de onda possível naquele aparelho. Foi necessário fazer diluições bem maiores, a fim de que pudesse realizar as leituras.

Com o intuito de seguir os mesmos passos realizados no ensaio de toxicidade e também para podermos posteriormente fazer uma analogia entre os dados, foram feitas 8 diluições gradualmente crescentes de base 2. As diluições feitas foram da ordem de 1:200; 1:400; 1:800; 1:1600; 1:3200; 1:6400; 1:12800; 1:25600. Cada uma dessas diluições foi numerada, respectivamente, de 1 até 8.

As leituras obtidas foram as seguintes: 1.845 Å (na concentração 1); 1.512 Å (2); 1.080 Å (3); 0.624 Å (4); 0.319 Å (5); 0.167 Å (6); 0.082 Å (7); 0.038 Å (8).

O estabelecimento de correlações entre as densidades ópticas e os efeitos citotóxicos do látex será feito em estudos futuros, com o objetivo de determinar de maneira mais precisa as dosagens a ser utilizadas em testes biológicos e, possivelmente, fornecendo um direcionamento mais exato também na pesquisa

fitoquímica, uma vez que a concentração dos compostos químicos está diretamente ligada a concentração de produto utilizado.

5.4 ANÁLISE DO TEOR DE MINERAIS NA AMOSTRA

Os minerais analisados nas amostras preparadas a partir do vegetal foram alumínio, ferro, manganês e zinco. O ensaio foi feito em triplicata. Os testes foram realizados utilizando métodos fotométricos e os resultados, em mg/L, seguem dispostos no quadro 5, onde aparecem distribuídos para cada uma das amostras, que foram numeradas para fins de elaboração dos laudos:

QUADRO 5 - RESULTADOS DOS TESTES REALIZADOS PARA VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE METAIS (ALUMÍNIO, FERRO, MANGANÊS E ZINCO) ATRAVÉS DE MÉTODOS FOTOMÉTRICOS NAS 3 AMOSTRAS PREPARADAS (RESULTADOS EXPRESSOS EM mg/L)

Amostra Mineral	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Alumínio	0,91	1,59	1,71
Ferro Solúvel	0,069	0,19	0,080
Manganês	0,141	0,120	0,187
Zinco	0,06	0,08	<0,05

FONTE: O autor (2008).

Os valores encontrados para alumínio e ferro foram oscilantes nas amostras analisadas.

Entretanto, em duas das três amostras foram encontrados valores relativamente altos de alumínio, o que pode indicar que *Synadenium carinatum* apresenta uma resistência adaptativa a esse mineral, retendo-o nos tecidos das partes aéreas sem prejuízos aparentes a seu metabolismo.

As quantidades de alumínio, embora não tenham guardado uma proporcionalidade nas amostras analisadas, não é necessariamente um risco à administração do produto, uma vez que os seres humanos apresentam uma barreira absorviva em relação a este metal quando administrado via oral, pouco ou nada sentindo seus efeitos (ANVISA, 2008). Todavia, sabe-se que os íons alumínio podem afetar a proliferação, a atividade metabólica e a diferenciação de

osteoblastos, bem como seu acúmulo nos tecidos humanos ao longo do tempo parece estar relacionado com doenças degenerativas, como o Mal de Alzheimer e a granulomatose pulmonar de Wegener (MORAIS *et al.*, 2007; MERCK, 2008).

Os valores encontrados para manganês foram significativos. Há descrições na literatura de que este metal pode atuar em importantes processos, sendo componente e dando origem a um grupo específico de enzimas superóxido dismutase (SOD), espécie química responsável pela conversão de O_2^- em peróxido de hidrogênio. Dessa forma, o residual de manganês presente no vegetal pode influenciar os processos de oxi-redução, fornecendo este íon na formação de enzimas catalisadoras da reação (DRÖGE, 2002). Além da importância que o manganês exibe, enquanto mineral-traço essencial para os seres humanos, no processo antioxidante há evidências de que este desempenhe importantes papéis relacionados com processos como o metabolismo normal da glicose e participe da formação da estrutura óssea (HENDLER, 1994).

Zinco também se constitui num importante mineral-traço essencial para o ser humano, podendo, a exemplo do manganês, dar origem a antioxidantes enzimáticos específicos, neste caso, as Zn-SOD (enzima superóxido dismutase associada ao íon zinco) (HENDLER, 1994; DRÖGE, 2002). As quantidades encontradas nas amostras analisadas, apesar de serem relativamente pequenas, podem atuar nos processos já citados, além de haver a possibilidade de o vegetal ser considerado como uma reserva natural.

6 CONCLUSÃO

Nas análises qualitativas realizadas, os extratos de folhas frescas de *Synadenium carinatum* formaram detectados os seguintes grupos de compostos químicos: alcalóides, heterosídeos flavônicos, cumarinas, heterosídeos antraquinônicos, esteróides e/ou triterpenos, heterosídeos antociânicos, taninos hidrolisáveis, taninos não-hidrolisáveis, aminogrupos e ácidos fixos.

O látex de *Synadenium carinatum* diluído em água demonstrou ser citotóxico nas culturas de células de traquéia de feto bovino, provocando, nas concentrações mais altas, intensa morte celular e afetando de maneira significativa a sua capacidade de adesão, ou seja, a formação de um tecido organizado.

Com base nos resultados obtidos nos testes de citotoxicidade e nas diluições utilizadas, foram estabelecidas as DTCC₅₀ (Dose Tóxica em Cultivo de Células letal para 50% dos indivíduos) para ambas as quantidades em teste: para a quantidade de 10 µL, a DTCC₅₀ é de 10^{-2,5} e para a quantidade de 20 µL, a DTCC₅₀ é de 10^{-3,5}. Estes resultados poderão guiar estudos futuros com o vegetal.

As leituras das densidades ópticas do extrato aquoso do látex de *Synadenium carinatum* obtidas nas diferentes concentrações foram: 1.845 Å (concentração 1); 1.512 Å (concentração 2); 1.080 Å (concentração 3); 0.624 Å (concentração 4); 0.319 Å (concentração 5); 0.167 Å (concentração 6); 0.082 Å (concentração 7); 0.038 Å (concentração 8), poderão ser utilizados para estabelecer correlações entre os efeitos tóxicos do látex e sua concentração em estudos futuros.

A análise de minerais apresentou resultados com altos índices de manganês em todas as amostras e quantidades razoáveis de alumínio e zinco.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho sugere-se a continuidade da pesquisa acadêmica correlacionada com o conhecimento popular para não haver o uso indiscriminado da planta.

REFERÊNCIAS

- ABDEL, F; RIZK, M. The chemical constituents and economic plants of the Euphorbiaceae. **J Linn Soc**, London, v. 94, p. 293-326, 1987.
- AFONSO-CARDOSO, S. R. *et al.* Protective effect of lectin from *Synadenium carinatum* on *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. **Korean Journal of Parasitology**, Seul, v. 45, n. 4, p. 255-266, dez. 2007.
- ALBUQUERQUE, U. P; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Rev. Bras. Farmacogn.**, João Pessoa, v. 16 (supl.), p. 678-689, dez. 2006.
- ALMEIDA, V.L. *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não-específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, jan./fev. 2005.
- ALVES, R.R.N. *et al.* Utilização e comércio de plantas medicinais em Campina Grande, PB, Brasil. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 4, n. 26, dez. 2007.
- AMOROZO, M. C. M. A. A abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais. *In*: DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo: UNESP, 1996. p. 57-63.
- ANDRADE, C.A.*et al.* Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoidae, **Rev. Bras. Farmacogn.**, João Pessoa, v. 17, n. 2, abr/jun 2007.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 20/11/2008.
- ANVISA. **Resposta sobre toxicidade humana do alumínio da ANVISA**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/faqdinamica/asp/usuario.asp?usersecoes=28&userassunto=41>>. Acesso em: 4/11/2008.
- APG II. ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Bot. J. Linn. Society**, London, v. 141, p. 399-436, 2003. Disponível em: <<http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1046/j.1095-8339.2003.t01-1-00158.x/full>>; acessado em 21 de julho de 2007>. Acesso em: 22/6/2007.
- ARBOS, K. A. **Estudo do potencial antioxidante de vegetais da família Cruciferae de diferentes cultivos**. 2004. 86 f. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Área de Medicamentos, Insumos e Correlatos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2004.
- ASSUMPÇÃO, R.M.V.; MORITA, T. **Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização, preparo, purificação**. São Paulo: Edgard Blücher, 1968. 627p.
- BAGAVATHI, R. *et al.* Tiglane-type diterpene esters from *Synadenium grantii*. **Planta Med.**, Stuttgart, v. 54, n. 6, p. 506-510, 1988.
- BERLIN, B. On the making of a comparative ethnobiology. *In*: **Ethnobiological Classification: principles of categorization of plants and animals in traditional societies**. Princeton: Princeton University, 1992.

BEZERRA, J. L. *et al.* Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacogn.**, João Pessoa, n. 16, supl., p. 631-637, dez. 2006.

BITTNER, M. *et al.* Estudio químico de especies de la familia Euphorbiaceae em Chile. **Bol. Soc. Chil. Quim.**, Concepción, v. 46, n. 4, p. 1-15, dez. 2001.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira IV**: Parte I. Brasília: Ministério da Saúde, 1988. p. V.4.2.3-V.4.2.4.

BRASIL. Ministério da Saúde. Relatório Final. **Fórum de Competitividade da Cadeia Produtiva Farmacêutica** – Acesso aos Medicamentos, Compras Governamentais e Inclusão Social. Brasília: Ministério da Saúde, p. 5-29, 2003.

CARVALHO, J. E. M. *et al.* Study of bronchoalveolar lavage in leptospirosis patients with pulmonary involvement. **J. Bras. Pneumol.**, São Paulo, v. 30, n. 2, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132004000200010&lng=en&nrm=iso>. Acesso em:23/7/2007.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para a otimização da atividade. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 21, n. 1, jan./fev. 1998.

CHOW, C. K. Antioxidant nutrients and environmental health: introduction. **Toxicology**, v.180, n.1, p.1-3, 2002.

COLES E. H. **Patologia clínica veterinária**. 3. ed. Manole: São Paulo, 1984. p.390-426.

COLOMBO. **Utilizando adequadamente as plantas medicinais**. Colombo: Herbarium, 2008. 63p.

CRUZ, A. S. *et al.* Testes *in vitro* como alternativa aos testes *in vivo* de Draize. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 63, n. 1, p. 1-9, jan./jun. 2004.

D'MELLO, J.P.F.; DUFFUS, C.M.; DUFUS, J.H. **Toxic substances in crop plants**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1991. 339p.

DAVID, J. P. *et al.* . Lignanas e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blanchetii*. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 24, n. 6, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422001000600004&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em:23/7/2007.

DE LA CRUZ, M. G. (Org.). O acesso aos fitoterápicos e plantas medicinais e a inclusão social – diagnóstico situacional da cadeia produtiva farmacêutica no Estado do Mato Grosso. **Fitoplama**, Secretaria de Estado da Saúde, Governo do Mato Grosso, Brasil, 2005.

DEI-JI, P *et al.* Kanmiphorin-C and D citotoxic diterpenes from *Euphorbia kansui*. **Phytochemistry**, New York, v. 30, n. 3, p. 1018-1020, 1991.

DELAPORTE, R.H.*et al.* Estudo mineral das espécies vegetais *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze e *Bouchea fluminensis* (Vell) Mold., **Rev. Bras. Farmacogn.**, João Pessoa, v. 15, n. 2, abr/jun 2005.

- DOKKEDAL *et al.* Xeractinol – A New Flavanonol C-glucoside from *Paepalanthus argenteus* var. *argenteus* (Bongard) Hensold (Eriocaulaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 18, n. 2, p. 437-439, 2007.
- DORTA, D. J. **Efeitos citoprotetor e/ou citotóxico dos flavonóides**: estudo estrutura-atividade envolvendo mecanismos mitocondriais, com ênfase na apoptose. Ribeirão Preto, 2007. Tese (Doutorado em Toxicologia) – Programa de Pós-graduação em Toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- DRÖGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiol. Rev.**, n. 82, p. 47 – 95, 2008.
- EBUEHI, O. A. T. *et al.* Phytochemical, nutritive and anti-nutritive composition of cassava (*Manihot esculenta* L.) tubers and leaves. **Nigerian Food Journal**, Abuja, v. 23, p. 40-46, 2005.
- EDDINGTON, N.; BRIDGES, C. G. Experimental reactivation of equid herpesvirus 1 (EHV-1) following the administration of corticosteroids. **Equine Veterinary Journal**, v.17, p.369-371, 1985.
- EL SAEYD, M. M. Isolation of diterpene esters from *Synadenium grantii* as molluscicidal agent. **Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences**, Cairo, v. 33, p. 819-821, 1992.
- ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia. **Cienc. Cult.**, Campinas, v. 55, n. 3, p. 35-36, jul./set. 2003.
- FERNANDES JUNIOR, A. *et al.* Antimicrobial activity of *Apis mellifera* propolis from three regions of Brazil. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 24-29, 2006.
- FONTE, N. N. **A complexidade das plantas medicinais**: algumas questões de sua produção e comercialização. Curitiba, 2004. 183 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.
- FRAGA FILHO, C. Radicais Livres: vilões ainda em estudo. **Ciênc. Hoje**, v.27, p. 60-62, 2003.
- FRANÇA, I.S.X. *et al.* Medicina Popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Rev. Bras. Enferm.**, Brasília, n. 61, v. 2, p. 201-208, 2008.
- FRANCISCO, I. A.; PINOTTI, M. H. P. Cyanogenic glycosides in plants. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, Curitiba, v. 43, n. 5, p. 24-27, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132000000500007&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 23/7/2007.
- GONZÁLES BELLIDO, J.; LECHUGA CHÁCON, A. M.; SERRANO FLORES, C. A. Estudio fitoquímico comparativo de *Oenothera rosea* y *Oenothera multicaulis* (Yawar chonq'a), **SITUA**, Lima, v. 9, n. 17, p. 67-72, set. 2000/fev. 2001.
- GRUPO, L. R. P. **Contribuição ao estudo anatômico, fitoquímico e farmacológico de *Synadenium carinatum* Hook f. (Euphorbiaceae)**. Curitiba, 1998. 78 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Programa de Pós-Graduação em Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 26, p. 67-202, 2002.

HEGNAUER, B. **Chemotaxonomie der Pflazen**. Stuttgart: Birkhäuser Verlag Basel, 1989.

INTERNATIONAL Standard. **Biological Evaluation of Medical Devices**. Part 5: Tests for Cytotoxicity: *in vitro* methods. ISO 10993, 1992.

ITOKAWA, H. *et al.*, A citotoxic substance from Sangre de Dagro. **Chem. Pharm. Bull.**, Boston, v. 39, p. 1041, 1991.

JÄGER, A.; HUTCHINGS, A.; VAN STADEN, J. Screening of Zulu medicinal plants for prostaglandin-synthesis inhibitors. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 52, p. 95-100, 1996.

JÜGER, E. *et al.* Characterization of recombinant and plant-derived mistletoe lectin and their B-chains, **Eur. J. Biochem.**, v. 265, p. 788-797, 1999

JULKUNEN-TIITTO, r. Phenolic constituents in the leaves of Northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. **J. Agric. Food Chem.** v. 33, p. 213-217, 1985

KINGHORN, D. A. Major skin-irritant principle from *Synadenium grantii*. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 69, n. 12, p. 1446-1447, 1980.

KRÜGER, E. R. *et al.* Protocolo para cultivo *in vitro* de células de traquéia de feto bovino. **Arch. Vet. Scienc.**, v. 3, n. 1, p. 25-30, 1998.

LOOMIS, T. A. **Fundamentos de Toxicologia**. Zaragoza: Acribia, 1990. 274p.

MACARI, P.A.T *et al.* Comparação entre os metais presentes em *Croton floribundus* Spreng. e *Baccharis dracunculifolia* DC., **Rev. Bras. Farmacogn.**, João Pessoa, v. 12, supl., p. 76-77, 2002.

MACHADO *et al.* Efeitos citotóxicos do látex de *Synadenium carinatum* (EUPHORBIACEAE) sobre cultura de células de traquéia de feto bovino. **XV Congresso da Sociedade Brasileira de Toxicologia – SBTTox**, Búzios, RJ, 2007 (painel).

MACHADO, A.A. ; NAKASHIMA, T. Review about *Synadenium* Boiss genus (EUPHORBIACEAE). **Congresso Internacional de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – CIFARP**, Ribeirão Preto, SP, 2007. Painel.

MARCONDES, J. S.; GONÇALVES, R. C. Metodologia de colheita de células do trato respiratório em ovinos sadios através de técnica de lavagem traqueobrônquica por via nasotraqueal. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 2, p. 418-426, abr./jun. 2008.

MARTINS, E. R. *et al.* **Plantas Mediciniais**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1995.

MENON, M. *et al.* Isolation and characterization of proteolytic enzymes from the latex of *Synadenium grantii* Hook, 'f' . **Plant Science**, San Francisco, v. 163, n. 1, p. 131-139, 2002.

MERCK – Manual Merck Sharp & Dhome Portugal. Disponível em: <<http://www.msd.pt>>. Acesso em: 18/11/2008.

MÖCKEL, B. *et al.* Effects of mistletoe lectin I on human blood cell lines and peripheral blood cells: cytotoxicity, apoptosis and induction of cytokines. **Symposium der Paul-Martini-Sitfung**, Mainz, Alemanha, 1997. Resumo.

- MONTANARI, C.A; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.
- MORAIS, L.S *et al.* Liberação de íons metálicos em implantes ortodônticos de Ti-6Al-4V. **Rev. Matéria**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 2, p. 290-297, 2007.
- MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise fitoquímica. **Trib. Farm.**, Curitiba, v. 47, n. 1, p. 1-19, 1979.
- MOREIRA, N.; WEISS, R. R.; KRÜGER, E. R. Freqüência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus eqüino tipo 1. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.1, n. 1-2, p. 9-14, 2000.
- NAKASHIMA, T. **Étude phytochimique, évaluation des activités antifongiques at antivirales de trois Verbenaceae : *Lippia alba* N. E. Brown, *Lippia multiflora* Mold. et *Citharexylum myrianthum* Cham.** These. Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse, France, 199p, 1993.
- OLIVEIRA, R. B. *et al.* Toxicidade aguda de látex e extrato etanólico de folhas de *Synadenium umbellatum* em camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 2, n. 2, suplemento, 2005. Disponível em: <http://www.farmacia.ufg.br/revista/_pdf/vol2_2_supl/resumos/ref_v2_2_supl-2005_p137-139%20Oliveira2.pdf>. Acesso em: 12/05/2005.
- OLIVEIRA, Rodrigo Borges de *et al.* Avaliação dos efeitos depressores centrais do extrato etanólico das folhas de *Synadenium umbellatum* Pax. e de suas frações em camundongos albinos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v. 44, n. 3, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322008000300019&lng=&nrm=iso>. Acesso em: 5/2/2008.
- PREMARATNA, A. *et al.* Isolation, purification and properties of a lectin from the latex of *Synadenium grantii* Hook f. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysicis**, New Delhi, v. 18, n. 2, p. 32-35, 1981.
- REED, L.J; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American Journal of Hygiene**, n. 27, p. 493-497, 1938.
- ROGÉRIO, A. P. Anti-asthmatic potential of a D-galactose binding lectin from *Synadenium carinatum* latex. **Glycobiology Advance Access**. Disponível em: <<http://glycob.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/cwm053v1>>. Acesso em: 29/05/2007.
- ROGERO, S. O. *et al.* Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Mat. Res.**, São Carlos, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.
- SANTORO, A.L. **Relações estrutura-retenção de flavonóides por cromatografia a líquido em membranas imobilizadas artificialmente.** São Carlos, 2007. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Físico-Química) – Programa de Pós-Graduação em Ciências, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- SANTOS, M. D. DOS; BLATT, C. T. T. Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. **Rev. Bras. Bot.**, São Paulo, v. 21, n. 2, 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-84041998000200004&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 29/02/2008.

SASAKI, C. M. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopáticas e antimicrobianas das partes aéreas de *Pterocaulon lorentzii* Malme (ASTERACEAE)**. Curitiba, 2008. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

SEGNER, H. *et al.* Cytotoxicity of metals toward rainbow trout R1 cell line. **International Symposium Toxicity Assessment and on-line monitoring**, Nova York, v. 9, n. 4, 1994. p. 273-279.

SILVA, T. M. A. *et al.* Citotoxicidade do promotor de tumor e sua ação mitogênica sobre os linfócitos humanos. **RBCA**, São Paulo, v. 36, n. 4, p. 237-239, 2004.

SIMONI, I.C. *et al.* Avaliação da citotoxicidade de biflavonóides isolados de *Ouratea spectabilis* (OCHINACEAE) em células de córnea de coelho SIRC. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 69, n. 4, p. 95-97, out/dez, 2002.

SOUZA, M. A. *et al.* Isolation and partial characterization of a D-galactose-binding lectin from the latex of *Synadenium carinatum*. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, Curitiba, v. 48, n. 5, p. 705-716, 2005.

SOUZA-FAGUNDES, E. M. *et al.* Screening and fractionation of plant extracts with antiproliferative activity on human peripheral blood mononuclear cells. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 8, p. 1207-1212, dez. 2002.

TARTUF, G.; MARTÍNEZ, J.R.; STASHENKO, E.E. Evaluación de la actividad antioxidante de aceites esenciales em emulsiones degradadas por radiación ultravioleta, **Revista Colombiana de Química**, Bogotá, v. 34, n. 1, 2005.

TREASE, G.E.; EVANS, W.C. **Farmacognosia**. 13 ed. México: Interamericana, 1989. 612p.

VAISBERG, A. *et al.* Taspine is the cicatrizant principle in Sangre de Drago extracted from *Cronton lechleri*. **Planta Med**, Stuttgart, v. 55, p. 140, 1989.

VALADARES, M. C.; CASTRO, N. C.; CUNHA, L. C. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células de medula óssea de camundongos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v. 43, n. 4, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322007000400017&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 18/09/2008.

VANDRESEN, J. *et al.* Inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e adubação na formação e pós-transplante de mudas de cinco espécies arbóreas nativas do Sul do Brasil. **Acta bot. Bras.**, v. 21 (4), p. 753-765, 2007.

VILLAS BOAS, M. G. K.; GADELHA, C. A. G. Oportunidades na indústria de medicamentos e a lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para a discussão de uma política nacional, **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 6, p. 1463-1471, jun, 2007.

WANG, Y. B. *et al.* Diterpenoids from the roots of *Euphorbia fischeriana*. **J. Nat. Prod.**, London, v. 69, p. 967-970, 2006.

WEBSTER, G.L. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. **Ann. Missouri Bot. Gard.**, Missouri, v. 81, p. 33-144, 1994.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <<http://www.who.int/nha/en/>>. Acesso em: 28/11/2008.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on good agricultural and collection practices**. Geneva, 2003. 79p.

WYDE, P.R *et al.* *In vitro* evaluation of the antiviral activity of SP-303, an euphorbiaceae shrub extract, against a panel of respiratory viruses. **Drug Development Research**, Berlim, v. 28 n. 4 p. 467-472, 1993.

XUTGLÀ, M.C.C; SANCHÉZ, J.E.; OTERO, M.J. Moléculas de adhesión en las interacciones entre los leucocitos, el endotelio y la matriz extracelular (I). Estructura, distribución y función biológica, **Medicina Clínica**, Barcelona, v. 108, n. 12, p. 472-477, 1997.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da industria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

ZANGARO, W. *et al.* Micorriza arbuscular em espécies arbóreas nativas da bacia do Rio Tibagi, Paraná. **CERNE**, Lavras, v. 8, n. 1, p. 77-87, 2002.

APÊNDICE

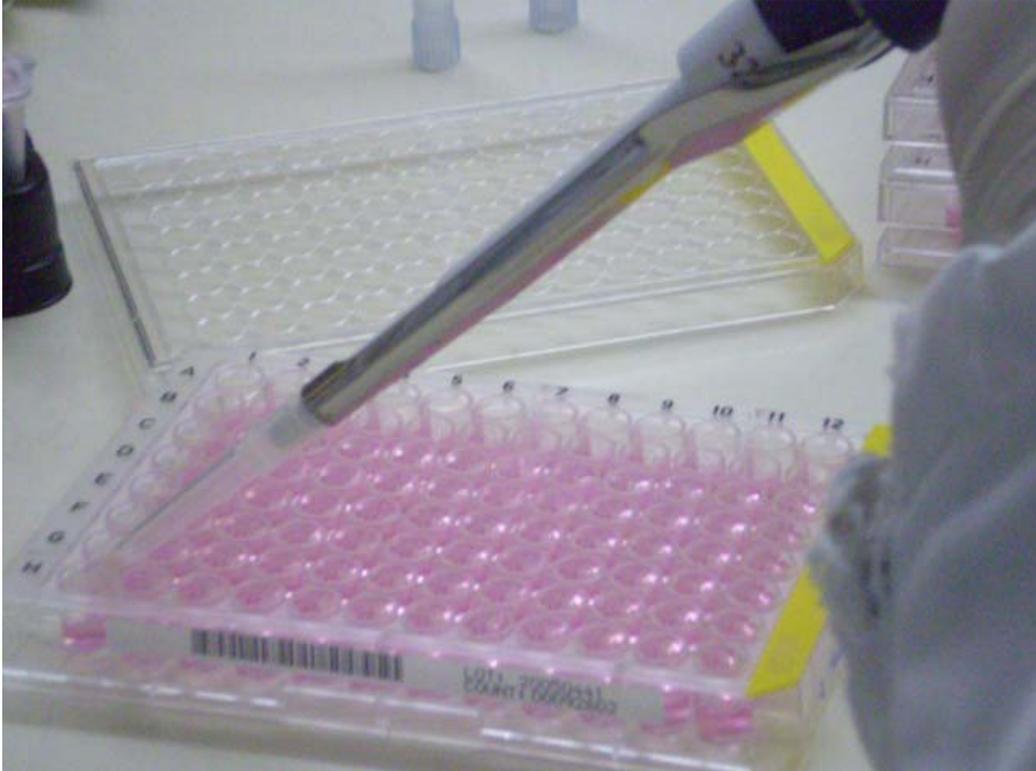
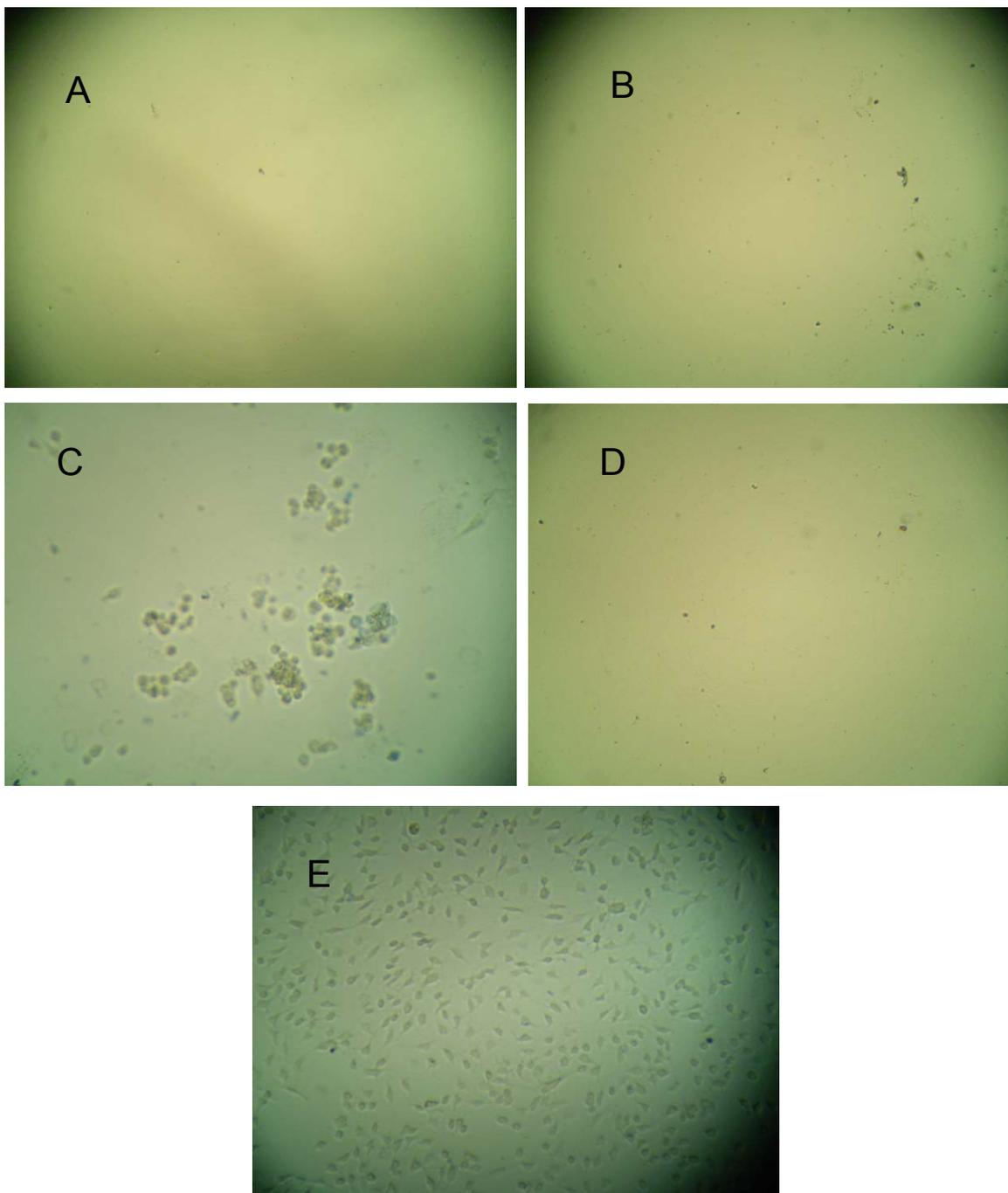
APÊNDICE 1 - FIGURAS

Figura1: placa de cultivo utilizada no experimento de citotoxicidade; na foto, pode-se ver o momento da inoculação do produto testado neste estudo.



Legendas: A: placa 1, poço d1; B: placa 2, poço c1; C: placa 1, poço e2; D: placa 2, poço d2; E: placa controle.

Figura 2: imagens dos efeitos das concentrações 1 e 2 em ambas as placas (10 e 20 μ L), comparando-os ao controle.

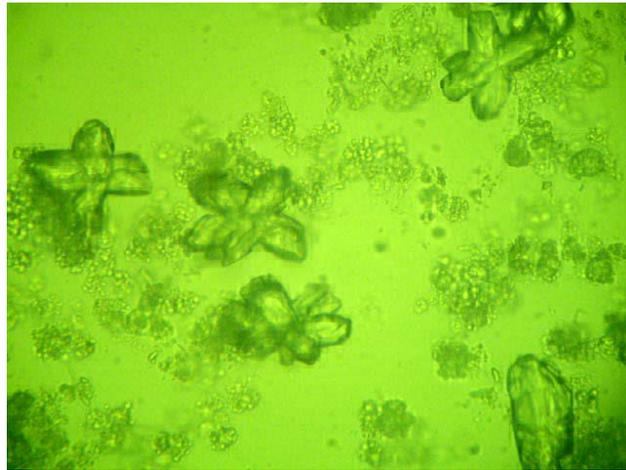
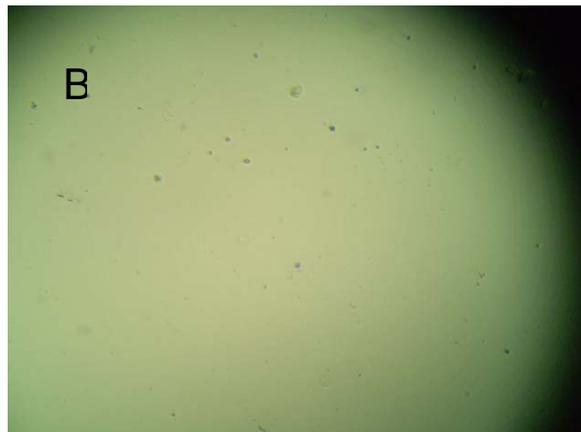
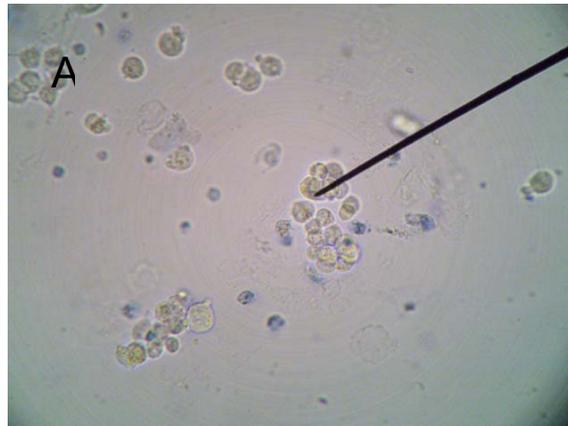


Figura 3: cristais observados nas culturas, antes da lavagem para aplicação do corante.



Legenda: A: placa 1, poço h3; B: placa 2, poço c3.

Figura 4: imagens dos efeitos da diluição 3 nas placas 1 e 2: possível estágio de pré-morte celular, na placa 1 e efeito de desprendimento total observado ainda na placa 2.

ANEXO

ANEXO 1 - SUPRIMENTOS E EQUIPAMENTOS

Fitoquímica

Solventes e reagentes

Acetato de sódio;

Acetato de etila;

Acetona;

Ácido acético concentrado;

Ácido acético 10%;

Ácido clorídrico concentrado;

Ácido clorídrico 1%;

Ácido sulfúrico concentrado;

Ácido sulfúrico 10%;

Água deionizada;

Álcool etílico comum;

Álcool etílico 100%;

Anidrido acético;

Cloreto férrico 1%;

Cloreto de sódio 0,9%;

Clorofórmio;

Éter de petróleo;

Éter etílico;

Formaldeído;

Hidróxido de amônio;

Hidróxido de sódio;

Magnésio metálico;

Metanol;

Butanol;

Hexano;

Ninhidrina;

Sulfato de ferro amoniacal 1%.

Insumos e equipamentos

Algodão hidrofílico comum;

Balança comum;

Balança analítica de precisão;

Banho-maria;

Béquer;

Câmara de luz ultravioleta;

Cubetas para espectrofotômetro;

Destilador de água;

Espectromfotômetro;

Estufa de secagem;

Frasco de vidro âmbar 1l;

Funil de vidro;

Luvas descartáveis;

Medidor de pH;

Provetas.

Cultivo Celular

Reagentes e meios de cultura

Água deionizada;

Álcool etílico 100%;

FBS – soro fetal bovino;

PBS – solução fosfatada tamponada.

Equipamentos

Capela de fluxo laminar;

Estufa de cultivo celular;

Luvas descartáveis;

Máscaras descartáveis;

Microscópio invertido;

Placas para cultivo celular com 96 poços;

Câmera Fotográfica.

Ensaio Farmacológico

Drogas e Reagentes

Reagente: azul de Tripan;

A droga a ser testada será produzida exclusivamente para este trabalho, a partir da espécie vegetal estudada.

Equipamentos

Espectrofotômetro;

Estufa de cultivo celular;

Microscópio invertido;

Óculos de proteção;

Pipetas automáticas multicanal (5-200 μ l; 50-1000 μ l);

Pipetas comuns (vários volumes);

Tubos de ensaio;

Suporte para tubos de ensaio.