



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Estudos pré-clínicos da neurotoxicidade da fração rica em casearinas isolada das folhas
da *Casearia sylvestris* Swartz**

ÉVERTON JOSÉ FERREIRA DE ARAÚJO

TERESINA - PIAUÍ

2013

ÉVERTON JOSÉ FERREIRA DE ARAÚJO

**Estudos pré-clínicos da neurotoxicidade da fração rica em casearinas isolada das folhas
da *Casearia sylvestris* Swartz**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira.

Coorientador: Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

TERESINA - PIAUÍ

2013

ÉVERTON JOSÉ FERREIRA DE ARAÚJO**Estudos pré-clínicos da neurotoxicidade da fração rica em casearinas isolada das folhas
da *Casearia sylvestris* Swartz**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

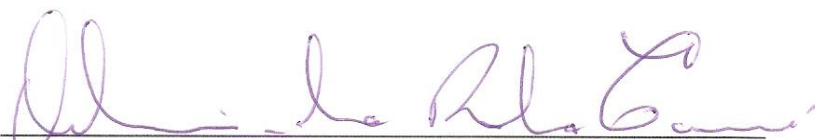
Aprovado em 22 / 03 / 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira (Orientador)
Departamento de Ciências Biológicas – UFPI



Profa. Dra. Chistiane Mendes Feitosa (Examinador Interno)
Departamento de Química – CCN/UFPI



Profa. Dra. Adriana da Rocha Tomé (Examinador Externo)
Faculdade de Veterinária – UECE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITORA

Profa. Dra. Nadir Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Saulo Cunha de Serpa Brandão

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. MSc. Antonio dos Santos Rocha Filho

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. José Guilherme Ferre Pompeu

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes

“Sonhos sem disciplina produzem pessoas frustradas, e disciplina sem sonhos produz pessoas autômatas, que só sabem obedecer a ordens.”

Augusto Cury.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Cora Coralina.

Dedico este trabalho a *Deus*, meu alicerce, minha força e inspiração. Por sempre me amparar e tornar possível mais esta vitória, sobretudo ao iluminar minha mente diante dos desafios da vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, *José Ormano e Margarida Maria*, com imensa gratidão, por sempre me incentivarem a continuar estudando, por não me deixarem desistir nos momentos de desânimo e por permitirem que eu me dedicasse inteiramente ao curso de mestrado.

À minha namorada, *Danielle Yasmin*, por todo o apoio e compreensão incondicionais, por estar sempre disposta a discutir comigo o andamento deste projeto, além de todo o carinho nos bons e maus momentos.

Aos meus avós, *José Pereira, Iraci, Tales e Maria dos Remédios (in memoriam)*, base de tudo para mim e minha família, por semearem os valores morais que norteiam minha vida e minhas decisões.

Aos meus demais **familiares**, aqui representados pelos meus padrinhos de batismo, *Orleans e Acinete*, por sempre confiarem no meu potencial e por toda a torcida.

Aos meus irmãos, *Élisson Tadeu e Thaiane Maria*, professores de ofício, por me compreenderem nos meus vários momentos de estresse e por sempre tentarem me mostrar o quanto importante é o título de mestre.

Ao meu orientador, *Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira*, por ter honrado o compromisso de me orientar, por todas as incontáveis correções e críticas sempre construtivas, pelos debates e ensinamentos no decorrer do curso, além é claro, de toda a paciência dispensada a mim.

Ao *Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas*, meu coorientador e coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPI, por seus esclarecimentos, experiência e empenho frente ao Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental (LAPNEX), cuja estrutura foi fundamental para a realização deste estudo.

Aos professores, *Prof. Dra. Kátia Bonfim, Prof. Dr. Lívio Cesar, Prof. Dr. Evaldo Hipólito, Prof. Dr. Leonardo Ferreira, Prof. MSc. Socorro Cordeiro, Prof. José Vieira e Prof. Alex Aragão* por acreditarem em mim ainda nos tempos de graduação e por todo o estímulo rumo à academia.

A **todos** os meus colegas de pós-graduação por todo companheirismo, horas e experimentos compartilhados, sobretudo à amiga **Antonia Amanda** sempre presente e pronta a me ajudar nas inúmeras vezes que precisei.

Aos meus parceiros de laboratório **Guilherme, Natan e Oskar**. O auxílio de vocês foi muito valioso e com toda certeza este trabalho não é só meu, é nosso.

Aos amigos de sempre **Danilo Barroso, Mayara Ladeira, Lyghia Meireles e Janyerson Dannys**, exemplos de profissionalismo e competência, por todos os desabafos, motivação e assistência.

A todos os **alunos e funcionários da UFPI**, em especial ao “**Paulinho da Farmacologia**”, que me encorajaram a ingressar no mestrado ou me ajudaram no decorrer do curso.

Aos colegas das farmácias em que trabalhei que sempre me motivaram a permanecer estudando, especialmente aos amigos **Cassius, Washington, Ione e Ivonete**.

Aos amigos do laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário da UFPI, **André Fernando, Bethânia Amorim, Dilson Carnier e José Couras** por todo o incentivo na reta final do curso.

E a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram neste estudo, muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo Geral	23
2.2 Objetivos Específicos	23
3. CAPÍTULO I: Aspectos toxicológicos de uma planta medicinal do cerrado brasileiro: <i>Casearia sylvestris</i> Swartz. Revisão de literatura	24
Resumo	25
Abstract	26
3.1 Introdução	27
3.2 Metodologia	29
3.3 Resultados.....	29
3.4 Discussão.....	30
3.5 Conclusão.....	36
Referências	36
4. CAPÍTULO II: Atividade antioxidante <i>in vitro</i> de uma fração rica em casearinas obtida a partir das folhas de <i>Casearia sylvestris</i> Swartz	41
Resumo	42
Abstract	43
4.1 Introdução	44
4.2 Materiais e Métodos	46
4.3 Resultados	49
4.4 Discussão	54
4.5 Conclusão	59
Referências	59
5. CAPÍTULO III: Alterações comportamentais em camundongos induzidas pela fração rica em casearinas extraída das folhas de <i>Casearia sylvestris</i>	

Swartz	64
Resumo	65
Abstract	66
5.1 Introdução	67
5.2 Materiais e Métodos	68
5.3 Resultados	71
5.4 Discussão	75
5.5 Conclusão	78
Referências	78
6. CAPÍTULO IV: Avaliação da atividade antioxidante e das alterações histopatológicas no sistema nervoso central de camundongos tratados com a fração rica em casearinas	82
Resumo	83
Abstract	85
6.1 Introdução	86
6.2 Materiais e Métodos	87
6.3 Resultados	90
6.4 Discussão	95
6.5 Conclusão	98
Referências	99

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°GL	Grau Gay-Lussac
®	Marca registrada
AchE	Acetilcolinesterase
ALE	Atividade Locomotora Espontânea
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AAPH	2,2'-azobis[2-metilpropionamidina]dihidrocloroto
A-549	Células de Carcinoma de Pulmão
BZP	Benzodiazepínicos
CAT	Catalase
CE₅₀	Concentração Eficaz 50%
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DL₅₀	Dose Letal 50%
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	Sequestro do Radical 2,2-difenil-1picril-hidrazil
DTNB	Ácido 2-nitrobenzóico
DZP	Diazepam
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EFS	Extração em Fase Sódila
E.P.M.	Erro Padrão da Média
EREs	Espécies Reativas Derivadas de Enxofre
ERNs	Espécies Reativas Derivadas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas Derivadas de Oxigênio
FC	Fração Rica em Casearinas
FRAP	Poder Antioxidante de Redução do Ferro
GABA	Ácido Gama-aminobutírico
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione Reduzida
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
HeLa	Células de Carcinoma Cervical
HO₂•	Radical Hidroperoxila

HT-29	Células de Carcinoma de Cólon Humano
i.p.	Via intraperitoneal
KB	Células de Carcinoma Epidermoide Oral
L•	Radical Lipídico Alquila
LH	Ácidos graxos
mg kg⁻¹	Miligrama por quilo
mL kg⁻¹	Mililitro por quilo
MDA	Malonaldeído
NEBA	Número de Entradas no Braço Aberto
NO	Óxido Nítrico
NO₂⁻	Íon Nitrito
NPS	Nitroprussiato de Sódio
O₂⁻	Ânion Superóxido
¹O₂	Oxigênio Singlete
•OH	Radical Hidroxila
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORAC	Sequestro de Radicais de Oxigênio
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução Específica
RENISUS	Relação Nominal de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde
SNC	Sistema Nervoso Central
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Toxicológicas
SOD	Superóxido Dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas com o Ácido Tiobarbitúrico
TEAC	Capacidade Antioxidante Total Equivalente ao Trolox
TPBA	Tempo de Permanência no Braço Aberto
TRAP	Capacidade Antioxidante Total
Trolox	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico
µg mL⁻¹	Micrograma por mililitro

LISTA DE TABELAS**Capítulo I**

Tabela 1	Distribuição do total de artigos pesquisados nas bases de dados por palavras-chaves.....	30
----------	--	----

Capítulo III

Tabela 1	Efeitos do tratamento com fração rica em casearinas (FC) administrado via intraperitoneal em camundongos <i>Swiss</i>	71
Tabela 2	Efeitos da fração rica em casearinas (FC) no teste do <i>rota rod</i>	75

Capítulo IV

Tabela 1	Determinação dos níveis de peroxidação lipídica e de nitrito no hipocampo e no corpo estriado de camundongos.....	90
Tabela 2	Determinação dos níveis de glutathiona reduzida e da atividade da catalase no hipocampo e no corpo estriado de camundongos.....	91

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Introdução

Ilustração 1	Imagem fotográfica da <i>Casearia sylvestris</i> Sw	20
--------------	---	----

Capítulo I

Ilustração 1	Casearia sylvetris Swartz. (A) Ramo; (B) Flor; (C) Fruto	29
--------------	--	----

Ilustração 2	Representação da estrutura básica dos diterpenos presentes na <i>C. sylvestris</i> Sw. e seus substituintes	33
--------------	---	----

Capítulo II

Ilustração 1	Estrutura química geral das casearinas	46
--------------	--	----

Ilustração 2	Avaliação dos efeitos da fração rica em casearinas (FC) contra a formação do radical nitrito <i>in vitro</i>	49
--------------	--	----

Ilustração 3	Prováveis mecanismos antioxidantes <i>in vitro</i> da fração rica em casearinas contra a formação do íon nitrito	50
--------------	--	----

Ilustração 4	Avaliação dos efeitos da fração rica em casearinas (FC) contra a formação de radical hidroxila <i>in vitro</i>	51
--------------	--	----

Ilustração 5	Prováveis mecanismos antioxidantes <i>in vitro</i> da fração rica em casearinas contra a formação do radical hidroxila	52
--------------	--	----

Ilustração 6	Avaliação dos efeitos da fração rica em casearinas (FC) contra a formação de TBARS <i>in vitro</i>	53
--------------	--	----

Ilustração 7	Prováveis mecanismos antioxidantes <i>in vitro</i> da fração rica em casearinas contra a formação do radical lipídico durante a peroxidação lipídica	53
--------------	--	----

Capítulo III

Ilustração 1	Efeitos da fração rica em casearinas (FC) em camundongos no teste do campo aberto	72
--------------	---	----

Ilustração 2	Efeitos da fração rica em casearinas (FC) em camundongos no teste do labirinto em cruz elevado	74
--------------	--	----

Capítulo IV

Ilustração 1	Avaliação do tratamento com fração rica em casearinas (FC) no hipocampo de camundongos Swiss adultos (X40) nas doses 2,5 mg kg ⁻¹ (A), 5 mg kg ⁻¹ (B), 10 mg kg ⁻¹ (C), 25 mg kg ⁻¹ (D) e DMSO 4% 10 mL kg ⁻¹ (E).....	92
--------------	---	----

Ilustração 2	Avaliação do tratamento com fração rica em casearinas (FC) no corpo estriado de camundongos Swiss adultos (X40) nas doses 2,5 mg kg ⁻¹ (A), 5 mg kg ⁻¹ (B), 10 mg kg ⁻¹ (C), 25 mg kg ⁻¹ (D) e DMSO 4% 10 mL kg ⁻¹ (E).....	93
Ilustração 3	Cortes de tecido hepático (X40) de camundongos Swiss adultos tratados com a fração rica em casearinas (FC) nas doses 2,5 mg kg ⁻¹ (A), 5 mg kg ⁻¹ (B), 10 mg kg ⁻¹ (C), 25 mg kg ⁻¹ (D) e DMSO 4% 10 mL kg ⁻¹ (E).....	94

Estudos pré-clínicos da neurotoxicidade da fração rica em casearinas isolada das folhas de *Casearia sylvestris* Swartz. ÉVERTON JOSÉ FERREIRA DE ARAÚJO. Orientador: Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Bioquímica e Farmacologia, UFPI, 2013.

RESUMO

A *Casearia sylvestris* Swartz, conhecida em algumas regiões do Brasil como guaçatonga, é um exemplar de planta com caráter medicinal utilizada popularmente para tratar diarreia, ferimentos e envenenamentos ofídicos. Entretanto, poucos estudos relatam suas propriedades toxicológicas, havendo apenas abordagens limitadas em torno da DL₅₀ e da toxicidade aguda de seus derivados e constituintes principais pertencentes ao grupo das casearinas. Dessa forma o presente estudo teve como objetivo realizar uma avaliação pré-clínica da neurotoxicidade da fração rica em casearinas (FC) isolada do extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris* Swartz por meio da determinação do potencial oxidativo da FC em ensaios *in vitro* e *in vivo* e da identificação de alterações comportamentais e danos histológicos induzidos pela fração. Foi observado que fração rica em casearinas é dotada de propriedade antioxidante *in vitro*, uma vez que, reduziu os níveis de nitrito, sobretudo na concentração de 7,2 µg mL⁻¹ (50% de redução, CE₅₀ de 3,7 µg mL⁻¹), bem como, diminuiu a produção de radicais hidroxila (61,6%; 6,4 µg mL⁻¹) e de TBARS (72,4%; 0,16 µg mL⁻¹) provavelmente devido à presença de sítios responsáveis pela interação e sequestro das espécies reativas. Devido à ausência de estudos no que diz respeito às ações da *C. sylvestris* sobre o sistema nervoso central (SNC), também foi realizado um *screening* neurofarmacológico da FC. Os resultados demonstraram que a maior dose (25 mg kg⁻¹) provocou diarreia, redução de peso e morte de um animal (11,11%). No teste comportamental do campo aberto, todas as doses da FC (2,5, 5, 10 e 25mg kg⁻¹ i.p.) diminuíram o número de cruzamentos (p<0,05) em relação ao controle com DMSO 4% e ao diazepam. Houve redução do número de *rearings* apenas na dose de 25 mg kg⁻¹ (p<0,05), não ocorrendo nenhuma modificação significativa no número de *groomings*. No labirinto em cruz elevado, a FC diminuiu o número de entradas nos braços abertos em relação ao diazepam (p<0,05) em todas as doses testadas e o tempo de permanência no braço aberto nas maiores doses (10 e 25 mg kg⁻¹). Na técnica do *rota rod*, a FC provocou um aumento significativo no tempo de permanência na barra giratória em relação ao diazepam e, conseqüentemente, diminuição no número de quedas (p<0,05), achados que sugerem que as casearinas encontradas na FC reduzem a atividade locomotora espontânea e exploratória dos animais com ausência de efeitos sedativos e miorrelaxantes, típicos dos benzodiazepínicos. Esses achados suscitam que as alterações comportamentais podem ser decorrentes de uma influência da FC sobre o sistema dopaminérgico. Na análise *in vivo* não houve comprovação da atividade antioxidante da FC *in vivo* uma vez que a fração não reduziu os níveis de TBARS e de nitrito assim como não aumentou a atividade glutatônica reduzida e da catalase nos homogenatos cerebrais. Foi observado a ocorrência de danos histológicos no hipocampo, corpo estriado e no fígado dos animais submetidos ao tratamento com a fração, sobretudo nas doses 2,5 e 5 mg kg⁻¹. Portanto, a FC apresenta caráter neurotóxico principalmente nas menores doses o que atesta a necessidade de cautela no uso de preparações à base da *C. sylvestris*.

Palavras-chave: Antioxidante. *Casearia*. Comportamento animal. Toxicidade.

Preclinical studies of neurotoxicity of rich fraction in casearins isolated from leaves of *Casearia sylvestris* Swartz. ÉVERTON JOSÉ FERREIRA DE ARAÚJO. Advisor: Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira. Master's Dissertation. Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences. Center for Health Sciences. Department of Biochemistry and Pharmacology, UFPI, 2013.

ABSTRACT

Casearia sylvestris species, known in some regions of Brazil as “guaçatonga”, is a plant with medicinal character popularly used to treat diarrhea and snakebite poisonings. However, a few studies have reported its toxicological properties, with only limited approaches around the LD₅₀ and acute toxicity of derivatives and major constituents belonging to casearin group. Thus the present study aimed to perform a preclinical evaluation of neurotoxicity of the fraction rich in casearins (FC) isolated from the ethanolic extract of *C. sylvestris* leaves, determining the *in vitro* and *in vivo* oxidative potential of the FC and identifying behavioral changes and histological damage induced by the fraction. It was observed that FC has *in vitro* antioxidant properties, since it reduced levels of nitrite, especially at a concentration of 7.2 mg mL⁻¹ (EC₅₀ value of 3.7 mg mL⁻¹) as well as decreased production of hydroxyl radicals (61,6%; 6.4 mg mL⁻¹) and TBARS (72.4%, 0.16 mg mL⁻¹) probably due to the presence of sites responsible for the interaction and sequestration with reactive species. Due to the absence of studies concerning actions of *C. sylvestris* on the central nervous system (CNS), it was also performed a neuropharmacological screening about the FC. Outcomes showed that the highest dose (25 mg kg⁻¹) caused diarrhea, weight loss and death of one animal (11.11%). In the open field behavior test, all doses of FC (2.5, 5, 10 and 25mg kg⁻¹ ip) reduced the number of crossings (p<0.05) compared to the controls (DMSO 4% and diazepam). There was a reduction in the number of rearings only at a dose of 25 mg kg⁻¹ (p<0.05) and no significant changes in the number of groomings were realized. In the elevated plus maze, FC decreased number of entries into the open arms in comparison with diazepam (p<0.05) at all doses tested and the residence time in the open arm in higher doses (10 and 25 mg kg⁻¹). In the rota rod technique, CF increased the residence time in the swivel bar in relation to diazepam. So, decreasing in the number of falls was also noticed (p <0.05), findings which suggest that FC reduce spontaneous locomotor and exploratory activities of the animals with no sedation and muscle relaxants, typical of benzodiazepines. These findings indicate that these behavioral alterations could be due to an influence of FC on the dopaminergic system. There was no evidence of *in vivo* antioxidant activity with FC whereas the fraction did not reduce TBARS and nitrite levels in brain homogenates and did not change the catalase and reduced glutathione actions. It was observed histological damages in the hippocampus, striatum and liver of treated animals, particularly in the doses of 2.5 and 5 mg kg⁻¹. Therefore, FC probably has neurotoxic action, indicating wariness to use it in preparations obtained from *C. sylvestris* for medicinal purposes.

Key-words: Antioxidant. Animal behavior. *Casearia*. Toxicity.

1 INTRODUÇÃO

A utilização na medicina de produtos ativos isolados de plantas consiste em uma forma de obtenção significativa de novos medicamentos. Das 1.031 novas moléculas químicas aprovadas entre os anos de 1981 e 2002 pelo FDA (*Food and Drug Administration*), 23% foram derivadas de produtos naturais e 20% dessas foram moléculas inspiradas nas naturais. Essa porcentagem é mais significativa quando se trata de terapia contra o câncer e doenças infecciosas, das quais 60% e 75% desses fármacos tem origem em produtos naturais, respectivamente. Produtos derivados de plantas medicinais são amplamente utilizados em todo o mundo, sobretudo em países ocidentais. Conforme levantamento realizado em 2002, 19% da população adulta dos Estados Unidos afirmou que utiliza essa opção de terapia. O mesmo foi relatado por 71% dos canadenses em outra pesquisa realizada em 2005 (NEWMAN et al., 2003; JORDAN et al., 2010). No Brasil, aproximadamente 91,9% da população faz uso de alguma planta medicinal, sendo que 41,6% realiza o cultivo das espécies na própria residência (ETHUR et al., 2011).

As plantas medicinais e seus derivados podem ser tão eficientes quanto os medicamentos sintéticos. Entretanto, a transformação da planta em medicamento requer estudos que visam garantir a integridade da entidade química, a manutenção das suas propriedades farmacológicas e sua segurança, critério muitas vezes negligenciado pela medicina popular em virtude da falsa ideia de que esses produtos possam ser inócuos (TOLEDO et al., 2003).

A toxicidade dos produtos naturais ainda é quase sempre colocada em segundo plano apesar do vasto consumo para fins terapêuticos. São poucas as informações sobre efeitos colaterais, reações adversas ou limites de doses, o que representa um risco cada vez maior para a saúde humana. De maneira indireta, este tipo de cultura desperta o interesse de pesquisadores de áreas multidisciplinares, como botânica, farmacologia, fitoquímica e toxicologia, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a vasta flora do planeta e contribuem para a definição dos potenciais terapêuticos e tóxicos das plantas medicinais (MACIEL et al., 2002; VEIGA JÚNIOR et al., 2005). Relatos na literatura comprovam a toxicidade de plantas utilizadas rotineiramente na medicina tradicional, conforme descrito por Almeida e colaboradores (2000) ao constatarem em modelos animais as propriedades teratogênicas e abortivas no primeiro trimestre de gravidez de *Peumus boldus* Molina em ratas prenhas (800 mg/kg, v.o.), planta muito consumida na forma de chás pela população no Brasil.

Aliado a isso, em virtude do aumento do número de doenças neurodegenerativas, as análises das propriedades neurotóxicas de plantas medicinais vem ganhando destaque no meio científico. O potencial neurotóxico de algum constituinte ativo das plantas pode ser determinado a partir de modificações qualitativas ou quantitativas das células do sistema nervoso e de componentes endógenos após a exposição como, por exemplo, a redução de sistemas enzimáticos de defesa antioxidantes ou a promoção da síntese de radicais livres, indução de apoptose neuronal (SLIKKER JR; BOWYER, 2005).

A avaliação neurotóxica pode ser realizada tanto em testes *in vitro*, com o emprego de culturas de células neuronais de diferentes regiões do cérebro, como por experimentos *in vivo*, dos quais se destacam os testes sensoriais, de função motora, neurocomportamentais e cognitivos, visto que as modificações de comportamento animal podem estar relacionadas com lesões neurológicas ou alterações patológicas e bioquímicas. Essas informações, mediante avaliação por meio da curva dose-resposta podem ser utilizadas para relacionar o uso das substâncias testadas com o risco associado à saúde do homem (STEINBERG, 1987; ABDULLA; CAMPBELL, 1993; LI et al., 2012).

A *Casearia sylvestris* Swartz (Ilustração 1), conhecida em algumas regiões do Brasil como guaçatonga, é uma planta com caráter medicinal de uso popular para várias finalidades. Há relatos que os índios tupis a utilizavam para tratar ferimentos e picadas de cobras. Fundamentado nesse histórico, hoje esta planta é matéria-prima para vários estudos e fonte de inspiração na busca de novos fármacos e de terapias alternativas para outras patologias como neoplasias malignas (ESTEVES et al., 2005; FERREIRA et al., 2010, 2011).

Em 2009, o Ministério da Saúde publicou a Relação Nominal de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), uma lista de 71 plantas medicinais que apresentam potencial medicinal relevante para o SUS. A finalidade da lista foi orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração de novos fitoterápicos disponíveis para a população. Nessa lista está incluída a *C. sylvestris*, fato que estimula ainda mais o estudo de suas propriedades biológicas como forma de assegurar suas aplicações terapêuticas.

Tendo em vista que a maioria dos compostos vegetais com atividade farmacológica são relativamente pouco estudados quanto ao seu potencial toxicológico e que a *C. sylvestris* e seus derivados são cada vez mais utilizados pela população, a avaliação toxicológica pré-clínica dessa espécie pode ser viável especialmente para validar seu uso racional, nortear o desenvolvimento de novos medicamentos à base de seus constituintes químicos principais, as casearinas, bem como subsidiar estudos clínicos com medicamentos obtidos a partir dessa planta. Além da existência do pequeno número de estudos toxicológicos com a guaçatonga, a

possibilidade de uma mesma planta possuir atividades terapêuticas e tóxicas simultaneamente endossa a pesquisa do caráter nocivo da espécie (MAISTRO et al., 2004; VEIGA JÚNIOR et al., 2005; SANTOS et al., 2007; FERREIRA et al., 2007).

Ilustração 1. Imagens fotográficas da *Casearia sylvestris* Sw.



Fonte: (A) Giehl (2008); (B) Silva (2009); (C) Filho (2010); (D) Rosa (2011).

REFERÊNCIAS

- ABDULA, E.M.; CAMPBELL, I.C. In Vitro Tests of Neurotoxicity. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 29, p. 69-75, 1993.
- ALMEIDA, E.R., MELO, A.M., XAVIER, H. Toxicological evaluation of the hydro-alcohol extract of the dry leaves of *Peumus boldus* and boldine in rats. **Phytotherapy Research** v. 14, p. 99-102, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Relação Nominal de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS - RENISUS**. Brasília, 2009. Disponível em: <portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>. Acesso em: 16 de junho de 2012.
- ESTEVES, I.; SOUZA, R.I.; RODRIGUES, M.; CARDOSO, L.G.V.; SANTOS, L.S.; SERTIE, J.A.A.; PERAZZO, F.F.; LIMA, L.M.; SCHEEDORF, J.M.; BASTOS, J.K.; CARVALHO, J.C. 2005. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 191-196, 2005.
- ETHUR, L.Z.; JOBIM, J.C.; RITTER, J.G.; OLIVEIRA, G.; TRINDADE, B.S. Comércio formal e perfil de consumidores de plantas medicinais e fitoterápicos no município de Itaquiraçu. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu**, v. 13, n. 2, p. 121-128, 2011.
- FERREIRA, P.M.P.; CARVALHO, A.F.F.U.; SOUSA, D.F.; MAGALHÃES, J.F.; MARTINS, A. R.; MARTINS, M. A. C.; QUEIROZ, M. G. R. Water extract of *Moringa oleifera* seeds: a toxicological approach. **Revista Eletrônica Pesquisa Médica**, v. 1, p. 45-57, 2007.
- FERREIRA P.M.P.; SANTOS, A.G.; TININIS, A.G.; COSTA, P.M.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; PESSOA, C. Casearin X exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, p. 497-504, 2010.
- FERREIRA, P.M.P.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; BARROS, F.W.A.; MARTINS, A.M.A.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; SANTOS, A.G.; PESSOA, C. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, p. 1373-1384, 2011.
- FILHO, P.J. **Flora Digital do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina: Casearia sylvestris Sw**. Araricá: UFRGS, 2009. Disponível em: <http://www6.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=1825>. Acesso em: 12 de dezembro de 2012.
- GIEHL, E.L.H. **Flora Digital do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina: Casearia sylvestris Sw**. Araricá: UFRGS, 2009. Disponível em: <http://www6.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=1825>. Acesso em: 12 de dezembro de 2012.
- JORDAN, S.A.; CUNNINGHAM, D.G.; MARLES, R.J. Assessment of herbal medicinal products: Challenges, and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 243, p. 198-216, 2010.

LI, A.A.; LEVINE, T.E.; BURNS, C.J.; ANGER, W.K. Integration of epidemiology and animal neurotoxicity data for risk assessment. **Neurotoxicology**, v. 33, p. 823-832, 2012.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JÚNIOR, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHAVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MAISTRO E.L.; CARVALHO, J.C.; MANTOVANI, M.S. Evaluation of the genotoxic potential of the *Casearia sylvestris* extract on HTC and V79 cells by the comet assay. **Toxicology in Vitro**, v. 18, n. 3, p. 337-42, 2004.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as a source of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1002-1037, 2003.

ROSA, F. **Flora Digital do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina: *Casearia sylvestris* Sw.** Araricá: UFRGS, 2009. Disponível em: <http://www6.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=1825>. Acesso em: 12 de dezembro de 2012.

SANTOS, A.G.; PEREZ, C.C.; TININIS, A.G.; BOLZANI, V.S.; CAVALHEIRO, A.J. Clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Swartz. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1100-1103, 2007.

SILVA, J.G. **Flora Digital do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina: *Casearia sylvestris* Sw.** Araricá: UFRGS, 2009. Disponível em: <http://www6.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=1825>. Acesso em: 07 de agosto de 2012.

SLIKKER JR., W.; BOWYER, J.F. Biomarkers of adult and developmental neurotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 206, n. 2, p. 255-260, 2005.

STEINBERG, M. The Use of Traditional Toxicologic Data in Assessing Neurobehavioral Dysfunction. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 9, p. 403-409, 1987.

TOLEDO, A.C.O.; HIRATA, L.L.; BUFFON, M.C.M.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta Bragança Paulista**, v. 21, p. 7-13, 2003.

VEIGA JÚNIOR, V.F.; MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, n. 28, p. 519-528, 2005.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a neurotoxicidade da fração rica em casearinas (FC) isolada do extrato etanólico das folhas de *Casearia sylvestris* Swartz.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar as alterações comportamentais por meio dos métodos *rota rod*, campo aberto e labirinto em cruz elevado.
- Determinar o potencial oxidativo da FC mediante ensaios *in vitro*.
- Averiguar os danos oxidativos provocados no SNC de camundongos pela fração rica em casearinas por meio da determinação dos níveis de peroxidação lipídica, íons nitrito, atividade da glutathione reduzida e da catalase.
- Caracterizar o grau de lesão cerebral por meio de análises histopatológicas no tecido cerebral (hipocampo e corpo estriado) e no tecido hepático de camundongos adultos tratados com a FC por via intraperitoneal.

CAPÍTULO I

3 Aspectos toxicológicos da planta medicinal *Casearia sylvestris* Swartz: revisão de literatura.

**Aspectos toxicológicos da planta medicinal *Casearia sylvestris* Swartz:
revisão de literatura.**

ARAUJO, E.J.F.¹; ARAUJO, D.Y.M.L.¹; FREITAS, R.M.¹; FERREIRA, P.M.P.^{1,2}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Núcleo de Tecnologia Farmacêutica, Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental, Universidade Federal do Piauí (NTF/LAPNEX/UFPI), 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

²Departamento de Ciências Biológicas, *Campus* Senador Helvídio Nunes de Barros, Universidade Federal do Piauí (CSHNB-UFPI), 64.607-670, Picos, Piauí, Brasil.

RESUMO

No Ocidente, o consumo de plantas medicinais vem aumentando substancialmente, onde aproximadamente 40% da população utiliza regularmente plantas medicinais e preparações fitoterápicas sob o rótulo de serem produtos inócuos ou seguros, embora, na maioria das vezes não haja comprovação científica das suas propriedades farmacológicas e toxicológicas. Este estudo teve como objetivo realizar um levantamento bibliográfico das propriedades toxicológicas da *Casearia sylvestris* Swartz e coletar dados que fundamentem o uso racional desta planta medicinal. Foram utilizados 40 artigos extraídos das bases de dados: LILACS (04), PubMed (08), Scielo (13) e Science Direct (15) entre os meses de agosto e novembro de 2012 utilizando os seguintes termos livres sem uso de descritores controlados: *Casearia*, Plantas medicinais e Toxicidade de acordo com os critérios de inclusão. Alguns estudos validam indicações terapêuticas clássicas da *C. sylvestris* como antidiarréico e no tratamento de ferimentos ofídicos fundamentando seu uso empírico. Porém, poucos trabalhos relatam suas propriedades toxicológicas havendo apenas uma abordagem limitada em torno da Dose Letal 50% e da toxicidade aguda de seus constituintes. Portanto, até o presente momento as pesquisas são insuficientes para garantir a segurança de preparações populares à base de *C. sylvestris* havendo a necessidade de avaliar melhor o perfil deletério dessa espécie principalmente no que diz respeito ao potencial tóxico dos seus constituintes assim como da sua capacidade lesiva sobre órgãos-alvos e sistemas orgânicos específicos.

Palavras-chave: *Casearia sylvestris*; Plantas medicinais; Toxicidade.

**ABSTRACT: Toxicological aspects of the medicinal plant *Casearia sylvestris* Swartz:
Literature review.**

In the West, the consumption of medicinal plants is strongly increasing, where nearly 40% of the population use medicinal plants regularly and phytotherapeutic conctions, thinking that it is innocuos and safe, although, in the most of time there is no cientific proof of its pharmacological and toxicological properties. The goal of this study is to carry out a bibliographical survey of the toxicological properties of the *Casearia sylvestris* Swartz and colect data that underlie the racional use of this medicinal plant. Were used 40 extracted papers from the database: LILACS (04), PubMed (08), Scielo (13) e Science Direct (15) between, August and November of 2012 using the following free terms without using controled discribers: *Casearia*, medicinal plants, toxicity according to the inclusion criterions. Some studies validate classical therapeutic indications of the *C. sylvestris* as anti-diarrheal and in the treatment ophidical wounds justifying its empirical use, nevertheless, few works report its toxicological properties, showing Just a limited approach about the Letal Dose 50% and the acute toxicity of its constituents. Therefore, until the present moment the researchs are insufficient to ensure the safety of popular preparations based in *C. sylvestris*, there is the need of a better evaluation of the deleterious profile of that species, mainly about the toxic potential of its constituents as well as its injurious capacity over target-organs and specific organic systems.

Keywords: *Casearia sylvestris*, Medicinal plants, Toxicity.

3.1 INTRODUÇÃO

Atualmente ocorre uma busca impetuosa por novas substâncias com propriedades terapêuticas a partir de plantas com o emprego de variados estudos químicos, farmacológicos e toxicológicos. A fitoterapia se encontra muito presente na medicina popular e constitui a base dos estudos da Etnofarmacologia, ciência voltada para sistemas tradicionais de tratamento que surgem das relações entre povos e plantas e que fundamenta a busca por princípios ativos, empregados muitas vezes pelo homem sem embasamento científico. Existe ainda um interesse renovado em pesquisas com produtos naturais devido à vasta biodiversidade da flora do planeta e à ausência de descobertas de novos fármacos alternativos para tratamento de doenças infecciosas, imunossupressão, doenças metabólicas e câncer (ELISABETSKY, 2001; MACIEL et al., 2002; BUTLER, 2004).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), entre 65 a 80% da população mundial depende do uso de plantas medicinais como única forma de terapia para as mais diversas doenças, principalmente devido aos custos da alopatia moderna atual. No Ocidente, o consumo de plantas medicinais vem aumentando substancialmente, onde aproximadamente 40% da população faz uso regularmente de preparações fitoterápicas. O uso popular ocorre principalmente nas formas de infusões, decoctos, pós, tinturas e alcoolaturas obtidos na maioria das vezes do modo artesanal. Somado a isso, a crescente aceitação da fitoterapia por parte dos profissionais da saúde tem estimulado o uso pela população. Porém, muitas preparações à base de plantas medicinais são comercializadas sob o rótulo de serem produtos naturais, as quais muitas vezes não possuem qualidade comprovada e acabam sendo repassadas aos usuários com uma falsa conotação de que são inócuas ou seguras. Além disso, existe no mundo um apelo ao consumo de produtos naturais, embora, na maioria das vezes, suas indicações terapêuticas possuam fundamentação apenas em hábitos e costumes e as propriedades farmacológicas a eles atribuídas ainda não tenham comprovação se quer em testes pré-clínicos (VEIGA JÚNIOR, et al., 2005; FRANÇA et al., 2008; SEEFF, 2007; SILVEIRA et al., 2008; OLIVER, 2010).

Os compostos naturais possuem vasta variabilidade qualitativa e quantitativa nos seus constituintes químicos o que se reflete em diferentes mecanismos de ações toxicológicas e farmacológicas, bem como repercute sobre a eficácia e segurança dos produtos naturais. A avaliação de substâncias isoladas, frações ou extratos obtidos da droga vegetal pode ocorrer por meio da elucidação da sua atividade biológica, da investigação dos mecanismos atribuídos

aos constituintes e partes da planta, determinação da sua concentração ativa e do seu potencial tóxico (FEHER; SCHMIDT, 2003; TOLEDO et al., 2003).

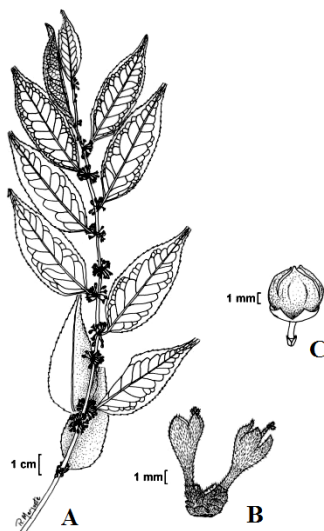
Muitos trabalhos utilizam os termos “fitoterápicos” e “plantas medicinais” como sinônimos, entretanto, as plantas medicinais possuem nas suas estruturas substâncias com ação terapêutica que por ventura podem vir a ser precursores de fármacos semi-sintéticos ou matérias-primas de medicamentos, enquanto fitoterápicos são produtos farmacêuticos obtidos a partir do preparo da planta para uso em uma formulação. Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 14 de 2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, fitoterápico é uma classe de medicamento que emprega exclusivamente matéria-prima vegetal ativa caracterizada pela reprodutibilidade e constância da sua qualidade e que possui eficácia e segurança comprovada por parâmetros estabelecidos pela RE 90 de 2004, resolução específica que apresenta um guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica com fitoterápicos (BRASIL, 2004, 2010).

Logo, existem regulamentações sobre os ensaios toxicológicos de fitoterápicos para fins de registro do medicamento, que incluem a determinação da toxicidade pré-clínica empregando estudos de toxicidade aguda com dose única ou fracionada, obtenção da relação dose-resposta e da dose letal 50% (DL₅₀), estudo de toxicidade de longa duração com doses repetidas, verificação de alterações comportamentais, bioquímicas e fisiológicas e exames anatomopatológicos e de genotoxicidade quando se tratar de um medicamento de uso contínuo, o que motiva e norteia a realização de ensaios toxicológicos pré-clínicos com derivados de plantas medicinais (GOMES et al., 2001; BRASIL, 2004).

No Brasil, uma das plantas com propriedades medicinais utilizada para fins diversos é a *Casearia sylvestris* Swartz (Ilustração 1). Trata-se de uma espécie que possui dimensões que variam desde formas arbustivas a arbóreas próximas dos 20 metros de altura, popularmente conhecida como guaçatonga, café-bravo, café-do-diabo, cafeeiro-do-mato, chá-de-bugre, erva-de-tiú, erva-de-lagarto, dentre outros sinônimos que surgem em função da região geográfica onde ocorre. Vale ressaltar que estudos recentes de filogenia enquadraram na família Salicaceae espécies que tradicionalmente pertenciam à família Flacourtiaceae como é o caso da *C. sylvestris* (CARVALHO, 2007; THADEO et al., 2009).

O presente estudo teve como objetivo realizar um levantamento bibliográfico das propriedades toxicológicas da *Casearia sylvestris* Swartz visando coletar dados que fundamentem o uso racional dessa planta medicinal, bem como incentivar a avaliação toxicológica pré-clínica de produtos derivados e constituintes da guaçatonga.

Ilustração 1. *Casearia sylvestris* Swartz. A. Ramo; B. Flor; C. Fruto.



Fonte: Marquete (2001).

3.2 METODOLOGIA

A metodologia utilizada no presente estudo foi uma revisão bibliográfica de textos científicos que relacionassem as propriedades toxicológicas da *Casearia sylvestris* ou de outras espécies do seu gênero. Foram selecionados artigos originais e gratuitos publicados nas bases de dados: LILACS, PubMed, Scielo e Science Direct, nos idiomas inglês, português e espanhol, coletados entre os meses de agosto e novembro de 2012. Devido às diferenças no processo de indexação nas bases de dados e à escassez de trabalhos científicos relacionados diretamente ao tema da pesquisa foi realizada a busca de artigos com os seguintes termos livres sem uso de descritores controlados: *Casearia*, Plantas medicinais e Toxicidade. Além disso, não foi estabelecido intervalo de tempo limite para as publicações o que garantiu a obtenção de um número maior de referências dentro dos critérios estabelecidos. Os critérios de exclusão definidos para a seleção dos artigos foram: artigos publicados em outros idiomas, repetidos nas bases de dados, não totalmente disponíveis ou cujo resumo não retratasse a temática referente à revisão.

3.3 RESULTADOS

Foram encontrados um total de 1437 artigos por meio da busca com as palavras-chave selecionadas conforme descrito na tabela 1 dos quais foram selecionados para a revisão 40 artigos que atenderam aos critérios de inclusão do estudo. Foram utilizados 04 artigos da base

LILACS, 08 do PubMed, 13 do Scielo e 15 do Science Direct. Para o estudo foram lidos apenas os artigos selecionados para a elaboração do manuscrito bem como legislações sanitárias da ANVISA, estatísticas de órgãos de toxicovigilância, livros e descrições técnicas da EMBRAPA relacionadas com a pesquisa. Após a leitura crítica dos textos selecionados foi realizada a discussão das informações mais relevantes extraídas.

Tabela 1. Distribuição do total de artigos pesquisados nas bases de dados por palavras-chaves.

Palavras-chaves	Bases de dados				TOTAL
	LILACS	PubMed	Scielo	Science Direct	
<i>Casearia</i>	37	98	52	846	1033
<i>Casearia</i> e Plantas medicinais	10	33	02	84	129
<i>Casearia</i> e Toxicidade	02	12	00	157	171
<i>Casearia</i> , Plantas medicinais e Toxicidade	00	07	00	97	104
TOTAL	49	150	54	1184	1437

3.4 DISCUSSÃO

Os fitoterápicos compartilham com as plantas medicinais o fato de serem alvos da automedicação. Entretanto, o perfil tóxico da maioria desses medicamentos ainda é parcialmente desconhecido, demonstrando a importância da Farmacovigilância direcionada para a utilização de fitoterápicos e de plantas medicinais tradicionais, possibilitando a notificação e a prevenção de efeitos indesejáveis e riscos inerentes ao uso. A toxicidade é agravada se vierem a ser utilizados por idosos, grávidas, crianças, na presença de doenças crônicas ou concomitantemente com outros medicamentos, o que aumenta a probabilidade de interações medicamentosas (LAPA et al., 2001; TUROLLA; NASCIMENTO, 2006)

Os efeitos adversos dos produtos naturais podem variar desde sintomas gastrointestinais e processos alérgicos até ao risco de óbito. Além disso, os produtos naturais são agentes xenobióticos, passivos de metabolismo ativador cujos efeitos podem não se manifestar de forma imediata, o que intensifica as ações tóxicas mediante uso crônico, como por exemplo, comprometimento hepático e renal, alterações hematológicas, problemas cardiovasculares, efeitos carcinogênicos e complicações neurológicas (TÔRRES et al., 2005; BERRIN et al., 2006; SILVEIRA et al., 2008).

No Brasil, a toxicidade de plantas medicinais é quase sempre colocada em segundo plano (FERREIRA et al., 2007). O uso imprudente muitas vezes até para finalidades diferentes daquelas tradicionalmente empregadas, sua identificação errônea, a presença de adulterantes e contaminantes, as associações e sinergismos possíveis, assim como a obtenção ou preparo indevidos podem causar sérios problemas de saúde pública. Outro agravante é que a comercialização dessas plantas ocorre nos mais variados locais os quais são ineficazmente inspecionados pelos órgãos de vigilância sanitária. Portanto, é importante evitar a automedicação ou o uso indiscriminado, uma vez que o emprego de plantas medicinais ou mesmo de medicamentos fitoterápicos não significa ausência total de efeitos colaterais e de reações adversas ou tóxicas. É necessário conhecer as características farmacológicas e toxicológicas, posologia e aspectos clínicos dessas substâncias, evitar a propagação de informações equivocadas e aprimorar os métodos de produção, controle de qualidade e de fiscalização para que ocorra realmente segurança na utilização de produtos naturais (VEIGA JÚNIOR, et al., 2005; SEEFF, 2007; JORDAN et al., 2010).

As propriedades toxicológicas das plantas são muitas vezes esquecidas favorecendo o uso de modo abusivo. Podem ser citados como exemplo, os casos do *Panax ginseng* C.A. Meyer e da *Piper methysticum* G. Forst. A primeira é uma espécie utilizada na medicina tradicional chinesa que se propagou pelo mundo. Sua ingestão crônica e abusiva causa hipertensão, nervosismo, insônia e diarreia. Já a outra é utilizada como antidepressivo e ansiolítico, entretanto possui constituintes hepatotóxicos. Além disso, mesmo para aquelas espécies com documentação científica que comprove seus efeitos terapêuticos, a toxicidade costuma ser desconhecida ou pouco explorada (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006; FRANÇA et al., 2008; OUEDRAOGO et al., 2012).

De acordo com levantamento realizado pelo Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas (SINITOX), foram notificados 1307 casos de intoxicações humanas com plantas no Brasil, com maior ocorrência entre indivíduos do sexo masculino e moradores de região urbana. Quando se trata de plantas com caráter medicinal, algumas circunstâncias merecem destaque como é o caso da automedicação, erro de administração, uso indevido e/ou abusivo (BRASIL, 2009). É possível que esses registros provavelmente encontrem-se subestimados em virtude da notificação reduzida dos casos ou devido ao desconhecimento por parte da população da existência dos Centros de Informações Toxicológicas.

A *Casearia sylvestris* é uma espécie com ampla distribuição geográfica por regiões tropicais e temperadas, ocorrendo nas Antilhas, México, Paraguai, Uruguai, Argentina e Brasil, onde pode ser encontrada desde o estado do Amazonas até o Rio Grande do Sul,

destacando-se como parte dos biomas da Mata Atlântica e Cerrado. Existem registros de que a *C. sylvestris* é utilizada popularmente para fins medicinais com indicações diversas, como anti-diarréico, para tratar ferimentos e no combate a envenenamentos ofídicos. A própria etimologia da palavra guaçatonga é oriunda do tupi-guarani, o que reforça a hipótese do uso empírico da planta em comunidades indígenas. Ocorrem na literatura inúmeros trabalhos que corroboram as propriedades medicinais da planta, contudo poucos levantamentos relatam suas informações toxicológicas (TORRES; YAMAMOTO, 1986; SILVA et al., 1988; ALMEIDA et al., 1998; FERREIRA et al., 2010, 2011).

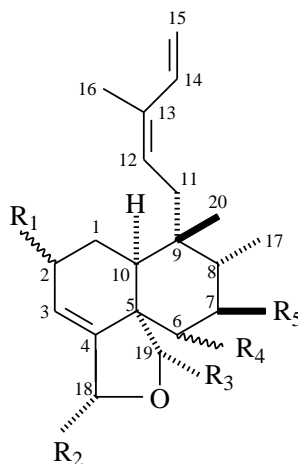
Nesse sentido, Cavalcante e colaboradores (2007) demonstraram que o extrato aquoso das folhas da *C. sylvestris* neutraliza proteases em venenos de cobras dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*, inibindo suas propriedades hemorrágicas e miotóxicas, evitando o bloqueio neuromuscular e danos à integridade da membrana celular. Esteves e colaboradores (2005) comprovaram que o óleo essencial da guaçatonga possui propriedades antiulcerosas e anti-inflamatórias ao reduzir a secreção gástrica em ratos submetidos ao estresse, assim como por induzir uma menor formação de edemas produzidos pela carragenina em patas de ratos ao diminuir a permeabilidade vascular e a liberação de mediadores inflamatórios. Esses resultados juntamente com a abordagem realizada por Mattos e colaboradores (2007) com o extrato hidroalcoólico da planta demonstram a presença de atividade antinociceptiva.

O extrato alcoólico da *C. sylvestris* demonstrou ser ativo contra bactérias Gram negativas e leveduras, o que certamente assegura seu potencial antisséptico para o tratamento de ferimentos, conforme relatos da medicina popular e indígena. Outros estudos com plantas do cerrado brasileiro demonstram ainda que espécies do gênero *Casearia* possuem significativa ação antiprotozoária contra a forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi* e larvicida frente ao *Aedes aegypti* (MESQUITA et al., 2005; RODRIGUES et al., 2006; SILVA et al., 2008).

Avaliações fitoquímicas constataam que a maioria das propriedades farmacológicas descritas acima são atribuídas a diterpenos clerodânicos presentes em diferentes órgãos da planta, como por exemplo, as casearinas, casearvestrinas e caseargrevinas (Ilustração 1). Dentre estes componentes bioativos, as casearinas, ocorrem de forma majoritária especialmente nas folhas da *C. sylvestris*, havendo relatos na literatura da existência de 23 variantes deste diterpeno. Atualmente, muitos estudos visam atribuir ou comprovar a relação desses metabólitos secundários com alguma propriedade farmacológica da planta ou mesmo elucidar novos terpenóides ativos, com raras abordagens sobre os seus aspectos toxicológicos

(OBERLIES et al., 2002; SANTOS et al., 2007; CARVALHO et al., 2009; WANG et al., 2009).

Ilustração 2. Representação da estrutura básica dos diterpenos presentes na *C. sylvestris* Sw. e seus substituintes.



DITERPENOS	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Casearina A	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina B	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina C	OH (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	n-C ₉ H ₁₉ CO ₂
Casearina D	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina E	OH (α)	OCH ₂ CH ₃	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₉ H ₁₉ CO ₂
Casearina F	OH (α)	OCH ₂ CH ₃	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina G	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	H	n-C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina H	OH (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	H	n-C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina I	OH (α)	CH ₃ CO ₂	n-C ₃ H ₇ CO ₂	H	n-C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina J	OCH ₃ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina K	CH ₃ CO ₂ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina L	OCH ₃ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	OH
Casearina M	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	OH
Casearina N	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina O	OCH ₃ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina P	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	CH ₃ CO ₂
Casearina Q	OH (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina R	= O	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina S	OCH ₃ (α)	= O	CH ₃ CO ₂	H	n-C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina T	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (β)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina U	OCH ₃ (α)	OCH ₃	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina V	OH(α)	OCH ₃	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina X	n-C ₃ H ₇ CO ₂	n-C ₃ H ₇ CO ₂	(α) CH ₃ CO ₂	OH (α)	H
Casearvestrina A	(CH ₃) ₂ CHCO ₂ (β)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	H
Casearvestrina B	CH ₃ CH ₂ CH(CH ₃)CO ₂ (β)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	H
Casearvestrina C	n-C ₅ H ₁₁ CO ₂ (β)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	H
Caseargrevina F	n-C ₃ H ₇ CO ₂ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	H

Fonte: Ferreira et al. (2011).

Estudo toxicológico preliminar da *C. sylvestris* realizado por Silva e colaboradores (1988), revelou por meio da administração intraperitoneal do extrato aquoso aquecido das

folhas da guaçatonga em camundongos, um valor da dose letal 50% (DL₅₀) de aproximadamente 1,79 g kg⁻¹ de peso animal, valor esse muito próximo daquele descoberto posteriormente por Basile e colaboradores (1990), para o extrato etanólico (DL₅₀ = 1,84 g kg⁻¹) o que sugere uma baixa toxicidade dos derivados da planta. Esses valores de dose letal dos extratos estudados podem ser considerados ligeiramente tóxicos se avaliados mediante a escala de toxicidade estabelecida por Hodge & Sterner (1944), vigente até os dias atuais.

No trabalho realizado por Silva e colaboradores (2006), a dose de 20 mg kg⁻¹ de peso corporal do extrato aquoso de *C. sylvestris* administrado via oral em ratos foi escolhida devido ao valor ser semelhante àqueles consumidos diariamente por humanos. Essa dose não causou morte de animais e nem modificações comportamentais ou qualquer outra resposta biológica quando submetidos a um tratamento subcrônico, provavelmente devido ao fato desta dose ser bem inferior ao valor da DL₅₀ conforme estabelecido anteriormente. Porém, segundo os pesquisadores, o extrato pode exercer efeitos modulatórios sobre o Sistema Nervoso Central (SNC), evidência que reforça a importância em avaliar seus aspectos toxicológicos sobre os sistemas orgânicos.

O extrato aquoso de *C. sylvestris* promoveu alterações neuroquímicas no SNC nos sistemas purinérgico e colinérgico por meio da inibição das enzimas NTPDase, 5'-nucleotidase, Na⁺/K⁺-ATPase e acetilcolinesterase (AChE) em preparações de membrana cortical de ratos submetidos a tratamento subcrônico por via oral. No caso das três primeiras enzimas, constituintes do extrato pertencentes aos grupos dos taninos e flavonóides podem atuar como quelantes de íons metálicos divalentes, como por exemplo, o cálcio e o magnésio, os quais agem como cofatores enzimáticos, bloqueando a ação catalítica dessas proteínas enquanto que para a AChE, os constituintes ativos podem agir como inibidores competitivos reversíveis da enzima (SILVA et al., 2006).

Em outra análise Maistro e colaboradores (2004) demonstraram que o extrato etanólico de *C. sylvestris* não possui potencial genotóxico, porém também não previne danos ocasionados por drogas reconhecidamente tóxicas ao material genético, como por exemplo, a ciclofosfamida. Alguns trabalhos relatam as propriedades citotóxicas das plantas pertencentes à família Salicaceae. Oberlies e colaboradores (2002) demonstraram a atividade do extrato metanólico de *C. sylvestris* contra células de carcinoma epidermoide oral (KB) e Mosaddik e colaboradores (2004) mostraram os efeitos citotóxicos de *C. costulata*, *C. grewiiifolia*, *C. grayi* e *C. multinervosa* em linfoblastos P388 de ratos. Entretanto, Silva e colaboradores (2008b), ao estudarem o óleo essencial da guaçatonga observaram que apesar do potencial anticâncer frente a linhagens tumorais, a substância apresentou atividade hemolítica contra

eritrócitos humanos na concentração $156,02 \pm 0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ indicando que o uso de produtos derivados da planta para fins medicinais, sobretudo de altas concentrações do óleo essencial, deve ser realizado com cautela.

Em um estudo mais recente, pesquisadores comprovaram a ação dos terpenos isolados das folhas da planta contra diferentes tipos histológicos de câncer (melanoma, leucemias, glioblastoma e cólon), destacando uma possível seletividade na citotoxicidade dos constituintes da planta contra a linhagens tumorais (FERREIRA et al., 2010; SANTOS et al., 2010). Neste caso e contrariando os resultados de Silva e colaboradores (2008b), as casearinas não apresentaram ação hemolítica nem mesmo na maior concentração testada ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$), sugerindo que outro constituinte presente apenas no óleo essencial da planta seja o responsável por essa característica. O fato dessas substâncias presentes na *C. sylvestris* apresentarem atividade contra células neoplásicas desperta o interesse em caracterizar seu potencial lesivo em células normais, como é o caso dos neurônios, visto que já há registro da atuação da planta no SNC. Entretanto, ainda não existem informações dessa outra vertente. (SANTOS et al., 2010).

Outra pesquisa realizada com produtores rurais do Cariri Cearense observou que caprinos que ingeriram os frutos da *Casearia commersoniana* (20 g kg^{-1}) sofreram de ataxia, diminuição da atividade locomotora, relaxamento muscular, taquicardia e taquipnéia seguidos de bradicardia e bradipnéia evoluindo para a morte 14 horas após o início dos sinais clínicos. Apesar de se tratar de uma pesquisa de caráter veterinário, esse estudo levanta a possibilidade de outras espécies do gênero *Casearia* também possuírem potencial tóxico (BEZERRA et al., 2012).

De acordo com os preceitos da Toxicologia toda substância pode ser considerada um agente tóxico, dependendo das condições de exposição, dose administrada ou absorvida, frequência, tempo e via de administração. Os testes toxicocinéticos fornecem o perfil da substância desde a sua absorção até a sua excreção, o que serve de base para comparações das propriedades do agente tóxico entre diferentes espécies animais e os seres humanos. A severidade da toxicidade das plantas medicinais pode ser agravada pela incerteza dos padrões cinéticos da droga e conseqüentemente dos seus efeitos toxicológicos. Porém esse outro tipo de análise juntamente com a elucidação dos prováveis mecanismos de ação tóxica, também ainda não foram realizadas detalhadamente com a *C. Sylvestris*, havendo apenas uma abordagem limitada em torno da DL_{50} e da toxicidade aguda de seus derivados. (DENG, 2002; DAVINO; BARROS, 2003).

3.5 CONCLUSÃO

Até o presente momento as pesquisas são insuficientes para garantir a segurança de preparações populares à base de *C. sylvestris* e não há atualmente medicamento fitoterápico com registro vigente na ANVISA obtido a partir dessa planta, apesar das várias propriedades farmacológicas descritas na literatura. Logo, há a necessidade de uma melhor avaliação do perfil deletério dessa espécie principalmente no que diz respeito ao potencial tóxico dos seus constituintes principais – as casearinas – bem como da sua capacidade lesiva sobre órgãos-alvo e sistemas orgânicos.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998.
- BASILE, A.C.; SERTIÉ, J.A.A.; PANNIZZA, S.; OSHIRO, T.T.; AZZOLINI, C.A. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 30, p. 185-97, 1990.
- BERRIN, Y.; ALI, O.; UMUT, S.; MELTEM, E.; MURAT, B.; BARUT, Y. Multi-organ toxicity following ingestion of mixed herbal preparations: An unusual but dangerous adverse effect of phytotherapy. **European Journal of Internal Medicine**, v. 17, p. 130-132, 2006.
- BEZERRA, C.W.C.; MEDEIROS, R.M.T.; RIVERO, B.R.C.; DANTAS, A.F.M.; AMARAL, F. R.C. Plantas tóxicas para ruminantes e equídeos da microrregião do Cariri Cearense. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 42, n. 6, p. 1070-1076, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Específica nº 90 de 16 de março de 2004. **Dispõe sobre o Guia para os estudos de toxicidade de medicamentos fitoterápicos**. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004.
- BRASIL. Fundação Oswaldo Cruz / Centro de Informação Científica e Tecnológica / Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. **Estatística Anual de Casos de Intoxicação e Envenenamento**. Rio de Janeiro, Brasil, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº 14 de 31 de março de 2010. **Estabelece os requisitos mínimos para o registro de medicamentos fitoterápicos**. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 5 abr. 2010.
- BUTLER, M.S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 2141-2153, 2004.
- CAVALCANTE, W.L.G.; CAMPOSA, T.O.; PAI-SILVA, M. D.; PEREIRA, O. S.; OLIVEIRA, C. Z.; SOARES, A.M.; GALLACCI, M. Neutralization of snake venom

phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 490-497, 2007.

CARVALHO, P.E.R. **Cafezeiro-do-Mato: *Casearia sylvestris***. Colombo: EMBRAPA-CNPQ, 2007. (Circular Técnica nº 138)

CARVALHO, E.S.; SANTOS, A.G.; CAVALHEIRO, A.J.; Identificação de diterpenos clerodânicos em diferentes órgãos de *Casearia sylvestris* Sw. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 277-284, 2009.

DAVINO, S.C.; BARROS, S.B.M. Avaliação da Toxicidade. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2 ed. São Paulo: Ed. Atheneu, p. 57-67, 2003.

DENG, J.F. Clinical and laboratory investigations in herbal poisonings. **Toxicology**. v. 27, n. 181-182, p. 571-576, 2002.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre: Ed. da Universidade UFRGS, p. 91-103, 2001.

ESTEVES, I.; SOUZA, R.I.; RODRIGUES, M.; CARDOSO, L.G.V.; SANTOS, L.S.; SERTIE, J.A.A.; PERAZZO, F.F.; LIMA, L.M.; SCHEEDORF, J.M.; BASTOS, J.K.; CARVALHO, J.C. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 191-196, 2005.

FEHER, M.; SCHMIDT, J.M. Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. **Journal of Chemical Information and Computer Science**, v. 43, p. 218-227, 2003.

FERREIRA, P.M.P.; CARVALHO, A.F.F.U.; SOUSA, D.F.; MAGALHÃES, J.F.; MARTINS, A.R.; MARTINS, M.A.C.; QUEIROZ, M.G.R. Water extract of *Moringa oleifera* seeds: a toxicological approach. **Revista Eletrônica Pesquisa Médica**, v. 1, p. 45-57, 2007.

FERREIRA P.M.P.; SANTOS, A.G.; TININIS, A.G.; COSTA, P.M.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; PESSOA, C. Casearin X exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, p. 497-504, 2010.

FERREIRA, P.M.P.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; BARROS, F.W.A.; MARTINS, A.M.A.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; SANTOS, A.G.; PESSOA, C. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, p. 1373-1384, 2011.

FRANÇA, I.S.X.; SOUZA, J.A.; BAPTISTA, R.S.; BRITTO, V.R.S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, n. 2, p. 201-208, 2008.

GOMES, E.C.; ELPO, E.R.S.; GABRIEL, M.M.; LOPES, M. Plantas medicinais com características tóxicas usadas pela população do município de Morretes, PR. **Revista Visão Acadêmica**, v. 2, n. 2, p. 77-80, 2001.

HODGE, C.E.; STERNER, J.H. Tabulation of toxicity classes. **American Industrial Hygiene Association Journal**, v. 10, p. 94-97, 1949.

JORDAN, S.A.; CUNNINGHAM, D.G.; MARLES, R.J. Assessment of herbal medicinal products: Challenges, and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 243, p. 198-216, 2010.

LAPA, A. J; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; GODINHO, R.O.; DE LIMA, T.C.M. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre: Ed. da Universidade UFRGS, p. 183-197, 2001.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JÚNIOR, V.F.; GRYNBERG, N. F.; ECHAVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MAISTRO E.L.; CARVALHO, J.C.; MANTOVANI, M.S. Evaluation of the genotoxic potential of the *Casearia sylvestris* extract on HTC and V79 cells by the comet assay. **Toxicology in Vitro**, v. 18, n. 3, p. 337-42, 2004.

MARQUETE, R. Reserva ecológica do IBGE (Brasília-DF): Flacourtiaceae. **Rodriguésia**. v. 52, n.80, p.5-16, 2001.

MATTOS, E.S.; FREDERICO, M.J.S.; COLLE, T.D.; PIERI, D.V.; PETERS, R.R.; PIOVEZAN, A.P. Evaluation of antinociceptive activity of *Casearia sylvestris* and possible mechanism of action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 1-6, 2007.

MESQUITA, M.L.; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; FOURNET, A.; DE PAULA, J.E.; GRELLIER, P.; ESPINDOLA, L.S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 783-787, 2005.

MOSADDIK, M.A.; BANBURY, L.; FORSTER, P.; BOOTH, R.; MARKHAM, J.; LEACH, D.; WATERMAN, P.G. Screening of some Australian Flacourtiaceae species for in vitro antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity. **Phytomedicine**, v. 11, p. 461-466, 2004.

OBERLIES, N.H.; BURGESS, J.P.; NAVARRO, H.A.; PINOS, R.E.; FAIRCHILD, C.R.; PETERSON, R.W.; SOEJARTO, D.D.; FARNSWORTH, N.R.; KINGHORN, A.D.; WANI, M.C.; WALL, M.E. Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 2, p. 95-99, 2002.

OLIVER, J. El consumo de hierbas medicinales como causa de hepatotoxicidad. **Salud i Ciência** v. 17, n. 8, p. 775-777, 2010.

OUEDRAOGO, M.; BAUDOUX, T.; STEVIGNY, C.; NORTIER, J.; COLET, J-M.; EFFERTH, T.; QU, F.; ZHOU, J.; CHAN, K.; SHAW, D.; PELKONEN, O.; DUEZ, P.

Review of current and “omics” methods for assessing the toxicity (genotoxicity, teratogenicity and nephrotoxicity) of herbal medicines and mushrooms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, p. 492-512, 2012.

RODRIGUES, A.M.S.; DE PAULA, J.E.; DEGALLIER, N.; MOLEZ, J.F.; ESPÍNDOLA, L.S. Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, p. 314-317, 2006.

SANTOS, A.G.; PEREZ, C.C.; TININIS, A.G.; BOLZANI, V.S.; CAVALHEIRO, A.J. Clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Swartz. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1100-1103, 2007.

SANTOS, A.G.; FERREIRA, P.M.P.; VIEIRA JÚNIOR, G.M.; PEREZ, C.C.; TININIS, A.G.; SILVA, G.H.; BOLZANI, V.S.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PESSOA, C.; CAVALHEIRO, A.J. Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumour human cells. **Chemistry and Biodiversity**, v. 7, p. 205-215, 2010.

SEEFF, L.B. Herbal Hepatotoxicity. **Clinics In Liver Disease**, v. 11, p. 577-596, 2007.

SILVEIRA, P.F.; BANDEIRA, M.A.M.; ARRAIS, P.S.D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008.

SILVA, F.A.; BAISCH, A.L.M.; OLIVEIRA, B.; BATTASTINI, A.M.; TORRES, F.; RACOSKI, G.; SILVA, E.S.; ALAM, M.F.; APOLINÁRIO, J.C.G.; LAPA, A.J. Estudos Farmacológicos Preliminares dos Extratos da *Casearia sylvestris* Swartz. **Suplemento Acta Amazonica**, v. 18, p. 219-229, 1988.

SILVA, A.C.; BALZ, D.; DE SOUZA, J.B.D.; MORSC, V.M.; CORRÊA, M.C.; ZANETTI, G.D.; MANFRON, M.P.; SCHETINGER, M.R.C. Inhibition of NTPDase, 5-nucleotidase, Na⁺/K⁺-ATPase and acetylcholinesterase activities by subchronic treatment with *Casearia sylvestris*. **Phytomedicine**, v. 13, p. 509-514, 2006.

SILVA, S.L.; CHAAR, J.S.; DAMICO, D.C.S.; FIGUEIREDO, P.M.S.; YANO T. Antimicrobial activity of ethanol extract from leaves of *Casearia sylvestris*. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, p. 347-351, 2008.

SILVA, S.L.; CHAAR, J.S.; FIGUEIREDO, P.M.S.; YANO, T. Citotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazonica**, v. 38, p. 107-118, 2008b.

THADEO, M.; MEIRA, R.M.S.A.; AZEVEDO, A.A.; ARAÚJO, J.M. Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras da folha de *Casearia decandra* Jacq. (Salicaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 32, n. 2, p. 329-338, 2009.

TOLEDO, A.C.O.; HIRATA, L.L.; BUFFON, M.C.M.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta Bragança Paulista**, v. 21, p. 7-13, 2003.

TORRES, R.B.; YAMAMOTO, K. Taxonomia das espécies de *Casearia* Jacq. (Flacourtiaceae) do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 9, p. 239-258, 1986.

TÔRRES, A.R.; OLIVEIRA, R.A.G; DINIZ, M.F.F.M.; ARAÚJO, E.C. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 373-380, 2005.

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

VEIGA JÚNIOR, V.F.; MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

WANG, W.; ZHAO, J.; WANG, Y-H.; SMILLIE, T. A.; LI, X-C.; KHAN, I.A. Diterpenoids from *Casearia sylvestris*. **Planta Medica**, v. 75, p. 1436-1441, 2009.

CAPÍTULO II

4 Atividade antioxidante *in vitro* de uma fração rica em casearinas obtida a partir das folhas de *Casearia sylvestris* Swartz.

Atividade antioxidante *in vitro* de uma fração rica em casearinas obtida a partir das folhas de *Casearia sylvestris* Swartz.

ARAÚJO, E.J.F.¹; CITÓ, A.M.G.L.¹; SILVA, O.A.¹; FREITAS, R.M.¹; CAVALHEIRO, A.J.²; BOLZANI, V.S.²; SILVA, D.H.S.²; PESSOA, C.^{3,4}; FERREIRA, P.M.P.^{1,4}.

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí (NTF/UFPI), 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

²Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NubbE), Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 14.800-900, Araraquara, São Paulo, Brasil.

³Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará (UFC), 60.430-270, Fortaleza, Ceará, Brasil.

⁴Departamento de Ciências Biológicas, *Campus* Senador Helvídio Nunes de Barros, Universidade Federal do Piauí (CSHNB-UFPI), 64.607-670, Picos, Piauí, Brasil.

RESUMO

A busca por antioxidantes naturais vem aumentando consideravelmente devido ao fato do estresse oxidativo participar diretamente na gênese e evolução de patologias como o câncer e distúrbios neurológicos. A planta *Casearia sylvestris* Swartz, espécie pertencente à família Salicaceae, popularmente conhecida como guaçatonga, possui vasta aplicação na medicina tradicional brasileira, por exemplo, no tratamento de ferimentos e envenenamentos ofídicos. Investigações fitoquímicas revelam a presença de diterpenos clerodânicos conhecidos como casearinas, sobretudo nas folhas, aos quais são atribuídos a maior parte das propriedades bioativas. Este estudo tem como objetivo avaliar a atividade antioxidante *in vitro* da fração rica em casearinas (FC) obtida das folhas da *C. sylvestris* por meio de reações químicas que caracterizam o potencial da FC em reduzir a formação dos radicais hidroxila, íons nitrito e a peroxidação lipídica baseado nas reações de Griess, de Fenton e nos níveis de TBARS, respectivamente. A FC apresentou atividade antioxidante *in vitro* ao diminuir os níveis de nitrito, sobretudo na concentração de 7,2 µg mL⁻¹ (50% de redução, CE₅₀ de 3,7 µg mL⁻¹). A FC também reduziu a produção de radicais hidroxila (61,6%; 6,4 µg mL⁻¹) e de TBARS (72,4%; 0,16 µg mL⁻¹). Os resultados sugerem que a FC possui ação antioxidante *in vitro* perante os radicais nitrito e hidroxila e contra a peroxidação lipídica, provavelmente devido à presença de sítios responsáveis pela interação e sequestro das espécies reativas.

Palavras-chave: Atividade antioxidante; *Casearia sylvestris*; Folhas.

ABSTRACT: *In vitro* antioxidant activity of a fraction rich in casearins obtained from leaves of *Casearia sylvestris* Swartz.

The search for natural antioxidants has increased considerably due to the fact that oxidative stress directly participate in the genesis and progression of diseases such as cancer and neurological disorders. The plant *Casearia sylvestris* Swartz, species belonging to the Salicaceae family, popularly known as guaçatonga, has wide uses in Brazilian folk medicine, for example, in the treatment of wounds and snake poisons. Phytochemical investigations revealed the presence of clerodane diterpenes known as casearins, particularly in leaves, to which is attributed the most of its bioactive properties. This study evaluated the *in vitro* antioxidant activity of the fraction rich in casearins (FC) obtained from the leaves of *C. sylvestris* using chemical reactions that evaluate the potential of the FC in reducing the formation of the nitrite and hydroxyl free radicals and lipid peroxidation based on Griess, Fenton and TBARS level reactions, respectively. The FC presented *in vitro* antioxidant activity since it reduce nitrite levels, especially at the concentration of $7.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ (50% reduction, EC_{50} of $3.7 \mu\text{g mL}^{-1}$). The FC also reduced the production of hydroxyl radicals (61,6%; $6.4 \mu\text{g mL}^{-1}$) and TBARS production (72.4%; $0.16 \mu\text{g mL}^{-1}$). The results suggest that FC possesses *in vitro* antioxidant activity against nitrite and hydroxyl radicals and against lipid peroxidation probably due to the presence of sites responsible for interaction and sequestration of reactive species.

Keywords: Antioxidant activity; *Casearia sylvestris*; leaves.

4.1 INTRODUÇÃO

A oxidação quimicamente é definida como a transferência de elétrons entre átomos. É um fenômeno naturalmente presente nos processos metabólicos das células humanas que pode ser exacerbado por substâncias pró-oxidantes ou originar radicais livres reativos causadores de danos oxidativos. Os radicais livres são produzidos majoritariamente nas organelas citoplasmáticas e estão envolvidos em reações bioquímicas, na produção de energia, sinalização intracelular e fagocitose. Porém em excesso causam efeitos deletérios em várias moléculas como DNA, proteínas, lipídios e membranas celulares o que leva a distúrbios degenerativos coletivamente conhecidos como estresse oxidativo (ALVES et al., 2010).

Radical livre é qualquer átomo, molécula ou íon dotado de meia-vida curta, instabilidade química e elétrons desemparelhados. Os elétrons livres que caracterizam o radical estão geralmente nos átomos de oxigênio, enxofre e nitrogênio, culminando no surgimento das chamadas espécies reativas. Dentre estas, destacam-se as espécies reativas derivadas de oxigênio (EROs), as derivadas de nitrogênio (ERNs) resultantes da decomposição do óxido nítrico (NO) e as derivadas de enxofre (EREs) formadas a partir de reações de tióis com EROs. Por sua vez, as EROs incluem o ânion superóxido (O_2^-), oxigênio singlete (1O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\bullet OH$) e o radical hidroperoxila ($HO_2\bullet$). Essas espécies surgem durante o exercício físico intenso, em processos isquêmicos e inflamatórios e na metabolização de xenobióticos podendo interagir com um grande número de moléculas orgânicas (GUARATINI et al., 2007; ABDALLA; FAINE, 2008; CAROCHO; FERREIRA, 2012).

Atualmente a busca por moléculas antioxidantes, principalmente derivadas de frutas e vegetais, vem aumentando consideravelmente devido ao fato do estresse oxidativo participar diretamente na gênese e evolução de várias patologias como, por exemplo, o câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, enfermidades neurológicas e no processo de envelhecimento precoce. Além disso, o aumento da expectativa de vida da população torna crucial o desenvolvimento de novas estratégias e terapias de combate às doenças crônicas (ALAM et al., 2012).

Os antioxidantes, portanto, são substâncias que inibem o processo de oxidação favorecendo à manutenção do equilíbrio entre a formação e a remoção de elementos prejudiciais ao organismo e protegendo contra os danos oxidativos. Tipicamente as defesas antioxidantes tem origem enzimática, com destaque para a glutatona peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), ou não enzimática no qual se enquadram

produtos de origem exógena adquiridos por meio da dieta como as vitaminas (tocoferóis e ascorbato), carotenoides, compostos fenólicos, quelantes e produtos sintéticos. Enquanto as enzimas impedem a produção de radicais livres, os antioxidantes não enzimáticos bloqueiam e previnem o estresse oxidativo ao sequestrar espécies reativas. O organismo conta ainda com sistemas específicos de reparo do DNA constituído por proteases e fosfolipases modulados de acordo com fatores ambientais e genéticos (GUARATINI et al., 2007; RAHMAN, 2007; ABDALLA; FAINE, 2008; HALLIWELL, 2011).

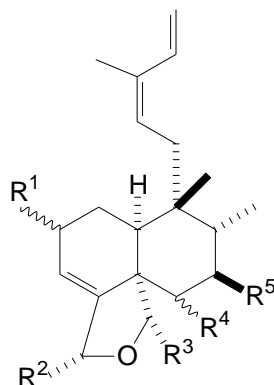
Há trabalhos na literatura que citam a ocorrência em plantas medicinais de metabólitos secundários dotados de propriedades antioxidantes. Essas substâncias pertencem aos mais variados grupos químicos, dentre os quais podem ser citados, os compostos nitrogenados, como os alcaloides e os glicosídeos cianogênicos e os compostos não nitrogenados, como é o caso dos taninos, flavonoides, terpenos e antocianinas. Esses constituintes bioativos são alvos de novos estudos para a elucidação de potenciais fármacos antioxidantes (DALLAQUA; DAMASCENO, 2011; KRISHNAIAH et al., 2011; RÊGO JÚNIOR et al., 2011).

Existem várias metodologias que avaliam a capacidade antioxidante *in vitro*, contudo, cada uma delas avalia aspectos diferentes o que torna difícil caracterizar as propriedades antioxidantes pautado em apenas um teste ou mesmo a escolha de um ensaio ideal. As principais metodologias são as seguintes: sequestro de radicais de oxigênio (ORAC), capacidade antioxidante total (TRAP), cooxidação do β -caroteno/ácido linoleico, capacidade antioxidante total equivalente ao Trolox (TEAC), poder antioxidante de redução do ferro (FRAP), sequestro do radical 2,2-difenil-1picril-hidrazil (DPPH), sequestro do ânion superóxido, sequestro do radical hidroxila, sequestro do peróxido de hidrogênio, ensaio de redução do radical óxido nítrico, determinação de fenóis totais e método de degradação da 2-desoxirribose para caracterizar a inibição da peroxidação lipídica. Todas essas técnicas são comumente usadas na tentativa de detectar o potencial antioxidante de compostos sintéticos e/ou naturais (CHANDA; DAVE, 2009; ALVES et al., 2010; BADARINATH et al., 2010; ALAM et al., 2012)

A *Casearia sylvestris* Swartz, espécie pertencente à família Salicaceae encontrada na América do Sul, é dotada de propriedades anti-inflamatórias e antitumorais com vasta aplicação na medicina popular. Popularmente conhecida como guaçatona, a planta é indicada no tratamento de ferimentos, úlceras gástricas e envenenamentos ofídicos. Investigações fitoquímicas revelam a presença de diterpenos clerodânicos conhecidos como casearinas (Ilustração 1), sobretudo nas folhas da planta, aos quais são atribuídas as propriedades farmacológicas da *C. sylvestris* (FERREIRA et al., 2011; SANTOS et al., 2007).

Baseado no que foi exposto esse estudo visa caracterizar a atividade antioxidante *in vitro* da fração rica em casearinas obtida das folhas da *C. sylvestris*, por meio de reações químicas que avaliam o potencial dos diterpenóides em reduzir a formação do íon metabólito nitrito (NO_2^-), do radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) e da produção de peroxidação lipídica.

Ilustração 1. Estrutura química geral das casearinas.



4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção da fração rica em casearinas (FC)

As exsicatas dos exemplares coletados foram depositadas no herbário Maria Eneida P. Kaufmann do Instituto Botânico do Estado de São Paulo com os seguintes registros: AGS04, AGS05, AGS06, AGS13 e AGS19. As folhas de *Casearia sylvestris* Swartz (20 kg) foram coletadas no Parque Estadual Carlos Botelho (São Miguel Arcanjo, São Paulo) por colaboradores do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais - NuBBE, do Instituto de Química da UNESP (Araraquara, São Paulo) e foram secas à temperatura ambiente e em estufa a 40 °C durante 7 dias, moídas e extraídas com aproximadamente 200 L de etanol em extrator de aço inox com sistemas de circulação de solvente e de aquecimento, à 40 °C por cerca de 24 h. O extrato líquido concentrado após secagem em capela e em dessecador com sílica gel sob vácuo, forneceu o extrato seco necessário. Parte deste extrato (473,6 g) sofreu fracionamento em fase sólida empregando carvão ativo/sílica gel 60-200 μm (1:1, m/m), como fase estacionária, e os eluentes hexano/acetato de etila (95:5, v/v), acetato de etila e metanol, fornecendo 3 frações respectivamente.

Análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C revelaram que a fração rica em casearinas (FC) empregada nesse estudo

corresponde à segunda fração (EFS2). A FC é caracterizada por possuir um percentual de casearinas totais de 56,5 % (mg g^{-1}), sendo a caseargrevida F e a casearina X os constituintes majoritários com teor de 9,9 e 14,2 %, respectivamente. Antes da adição aos meios reacionais a FC foi devidamente diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) a 4% em água purificada.

Reagentes utilizados

Os reagentes utilizados foram dimetilsulfóxido (DMSO), 2-desoxirribose, 2,2'-azobis[2-metilpropionamida]dihidroclorato (AAPH), reagente de Griess, peróxido de hidrogênio, tampão fosfato, nitroprussiato de sódio (NPS), ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido tricloroacético, bem como ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico (Trolox) adquiridos da Sigma Aldrich (EUA).

Avaliação do potencial antioxidante da fração rica em casearinas (FC) na remoção do metabólito nitrito (NO_2^-)

O radical nitrito (NO_2^-) surge a partir da interação do óxido nítrico com o oxigênio e sua formação é quantificada pela reação de Griess (BASU; HAZRA, 2006). O óxido nítrico foi inicialmente gerado a partir da decomposição espontânea do nitroprussiato de sódio (NPS) em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4). O meio reacional (1 mL) contendo NPS em tampão fosfato e a fração rica em casearinas (FC) em diferentes concentrações (0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foi incubado a 37 °C durante 1 h. Uma alíquota de 0,5 mL foi retirada e misturada com 0,5 mL do reagente de Griess. A absorbância do cromóforo foi medida em 540 nm. A porcentagem de inibição do nitrito produzido foi medida por meio da comparação dos valores de absorbância dos controles (nitroprussiato de sódio 10 mM e veículo) e os resultados foram expressos em porcentagem de nitrito formado pelo NPS isolado.

Avaliação do potencial antioxidante da fração rica em casearinas (FC) na remoção de radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$)

A formação do radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), mediante a reação de Fenton, foi quantificada usando a degradação oxidativa da 2-desoxirribose a malonaldeído (MDA), que por sua vez reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA). (LOPES et al., 1999). As reações foram iniciadas pela adição de sulfato ferroso (FeSO_4) em uma concentração final de 6 mM em soluções

contendo 5 mM de 2-desoxirribose, 100 mM de H₂O₂ e 20 mM de tampão fosfato (pH 7,2). Para medir a atividade antioxidante de remoção do radical hidroxila, diferentes concentrações (0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 µg mL⁻¹) da fração rica em casearinas (FC) foram adicionadas ao sistema antes da adição de FeSO₄. As reações foram realizadas durante 15 min à temperatura ambiente e foram cessadas pela adição de ácido fosfórico 4% (v/v) seguido de TBA 1% (p/v, em NaOH 50 mM). As soluções foram aquecidas durante 15 min a 95 °C, e depois resfriadas à temperatura ambiente. A absorbância foi medida a 532 nm e os resultados foram expressos em função da degradação da 2-desoxirribose.

Avaliação do potencial antioxidante da fração rica em casearinas (FC) na remoção de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Este teste foi utilizado para quantificar nível de peroxidação lipídica (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990). Este método foi adaptado para medir a capacidade antioxidante da fração rica (FC) usando gema de ovo homogeneizado como substrato rico em lipídios (GUIMARÃES et al., 2010). A gema de ovo foi brevemente homogeneizada (1% p/v) em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4). Em seguida 1 mL de homogenato foi sonificado e então ao homogeneizado foi adicionado 0,1 mL de FC nas concentrações 0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 µg mL⁻¹. A peroxidação lipídica foi induzida pela adição de 0,1 mL da solução de 2,2'-azobis[2-metilpropionamidina]dihidrocloreto (AAPH) 0,12 M. Ao grupo controle foi adicionado apenas o veículo (DMSO 4% dissolvido em água destilada). As reações foram realizadas durante 30 min a 37 °C e após o resfriamento, as amostras (0,5 mL) foram centrifugadas com 0,5 mL de ácido tricloroacético (15%) a 1200 rpm por 10 min. Uma alíquota de 0,5 mL de sobrenadante foi misturado com 0,5 mL ácido tiobarbitúrico 0,67% (TBA) e aquecida a 95 °C durante 30 min. Após o resfriamento, a absorbância das amostras foi medida a 532 nm e os resultados foram expressos em porcentagem de TBARS formadas apenas pelo AAPH isolado.

Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados com o *software GraphPad Prism*® versão 5.0 e apresentados como a média ± erro padrão da média (E.P.M.). Os resultados foram avaliados por meio da Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste *t*-Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente

significativas quando $p < 0,001$. A porcentagem de redução dos radicais livres (R%) foi determinada em função das medidas das absorbâncias por meio da seguinte equação (REANMONGKOL et al., 1994):

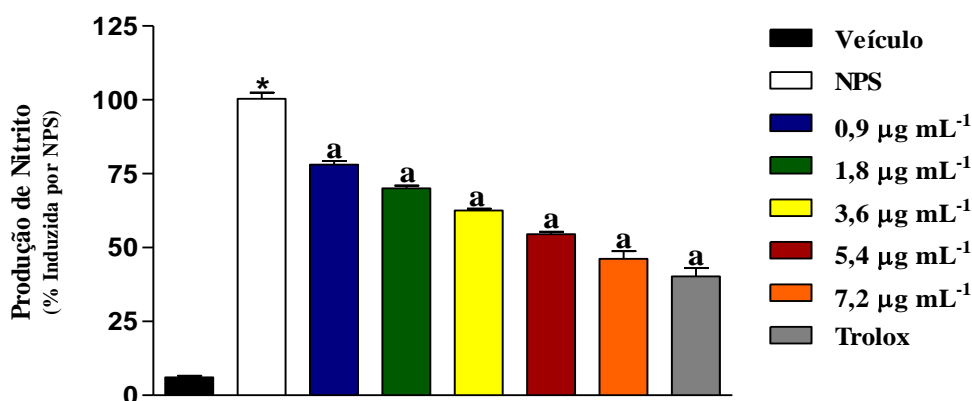
$$R\% = 100 \times (A_c - A_T) / A_c$$

onde, A_c é a absorbância do controle, obtida do meio reacional sem a amostra e A_T é o valor da substância testada, ou seja, a FC. A concentração capaz de reduzir em 50% as espécies reativas (CE_{50}) foi calculada a partir dos gráficos de R% e com o auxílio do *GraphPad Prism*®.

4.3 RESULTADOS

A atividade da FC como sequestradora do radical nitrito foi realizada mediante o método de Griess. Os resultados revelaram que houve uma redução gradual e significativa na produção de nitrito com o aumento da concentração da FC em relação ao meio de produção deste radical (NPS) em 26,2, 30,4, 38,2, 43,7 e 50% respectivamente ($p < 0,001$). O Trolox, droga antioxidante de referência, reduziu a produção de nitrito em 59,8% (Ilustração 2). A concentração da FC capaz de reduzir em 50% (CE_{50}) a produção de nitrito foi de aproximadamente $3,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ variando de $2,8$ a $4,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ com 95% de intervalo de confiança.

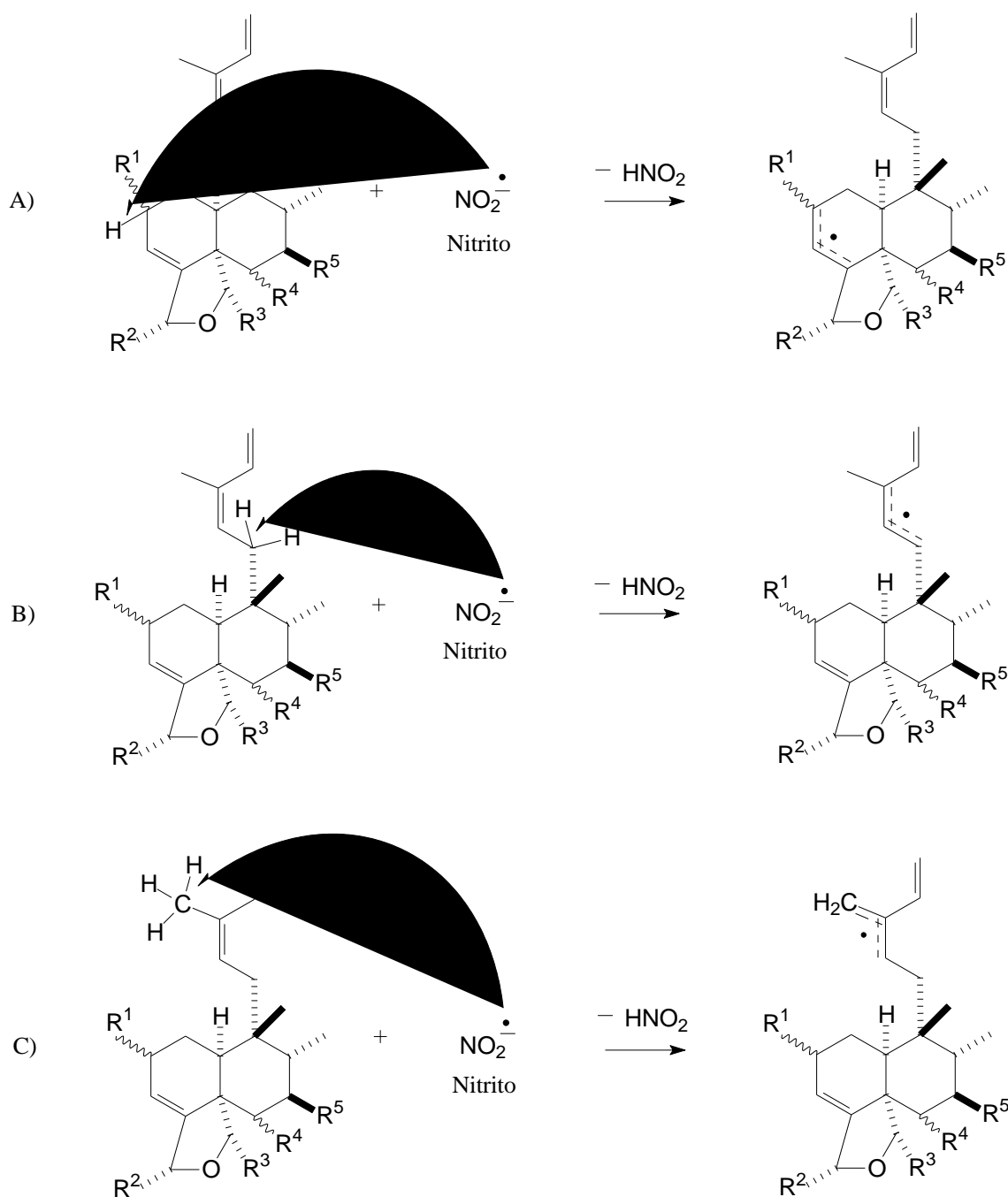
Ilustração 2. Avaliação dos efeitos da fração rica em casearinas (FC) contra a formação de nitrito *in vitro*.

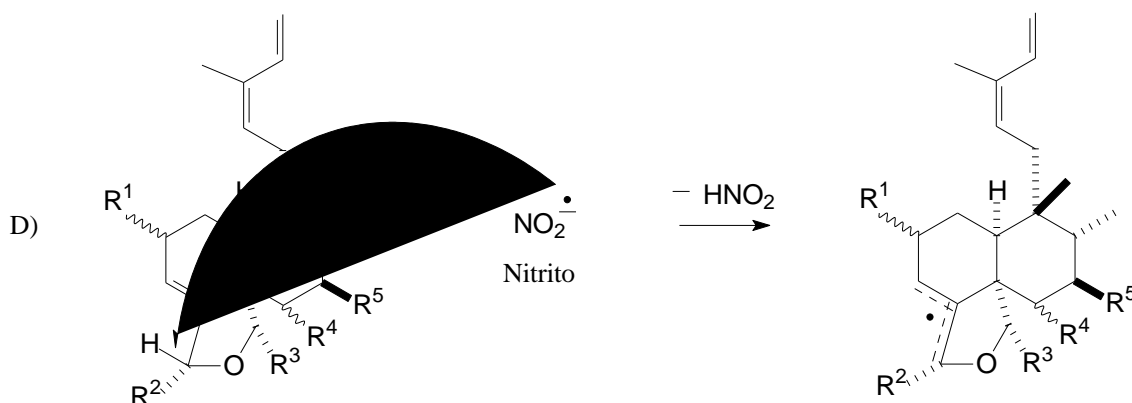


Efeitos da fração rica em casearinas (FC) na remoção do metabólito nitrito. O Trolox $140 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi usado como padrão antioxidante. Os valores correspondem à média \pm E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*, $n = 5$, experimentos em duplicata. ^a $p < 0,001$ em relação ao NPS (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste); * $p < 0,001$ comparado ao veículo (DMSO 4%) (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

A partir dos nossos resultados foi possível elaborar a proposta de quatro mecanismos de ação antioxidante da FC, baseado na estrutura química fundamental das casearinas, contra a produção de nitrito e outras espécies reativas geradas a partir da decomposição do óxido nítrico (Ilustração 3).

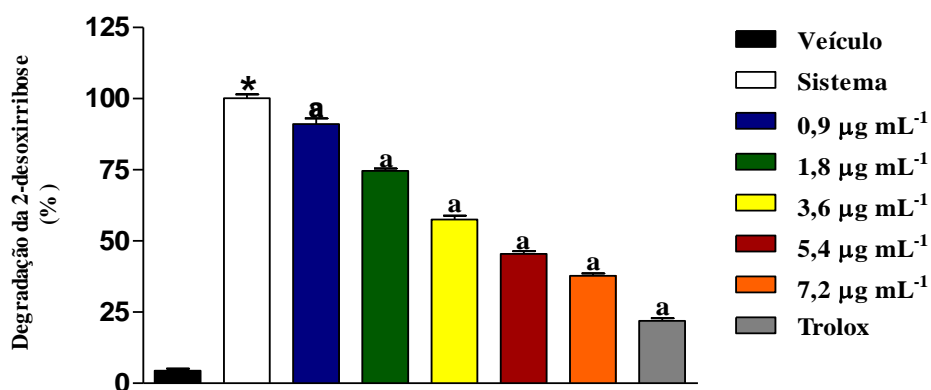
Ilustração 3. Prováveis mecanismos de ação antioxidante *in vitro* da fração rica em casearinas contra a formação do radical nitrito.





Em relação à formação do radical hidroxila, todas as concentrações testadas da FC (0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) reduziram significativamente a concentração do radical livre em relação ao meio responsável pela sua produção, com diminuição de 10,5, 23,9, 42,7, 54,5 e 61,6% respectivamente, enquanto o Trolox promoveu a redução do radical em 78,1% em relação ao sistema ($p < 0,001$; Ilustração 4).

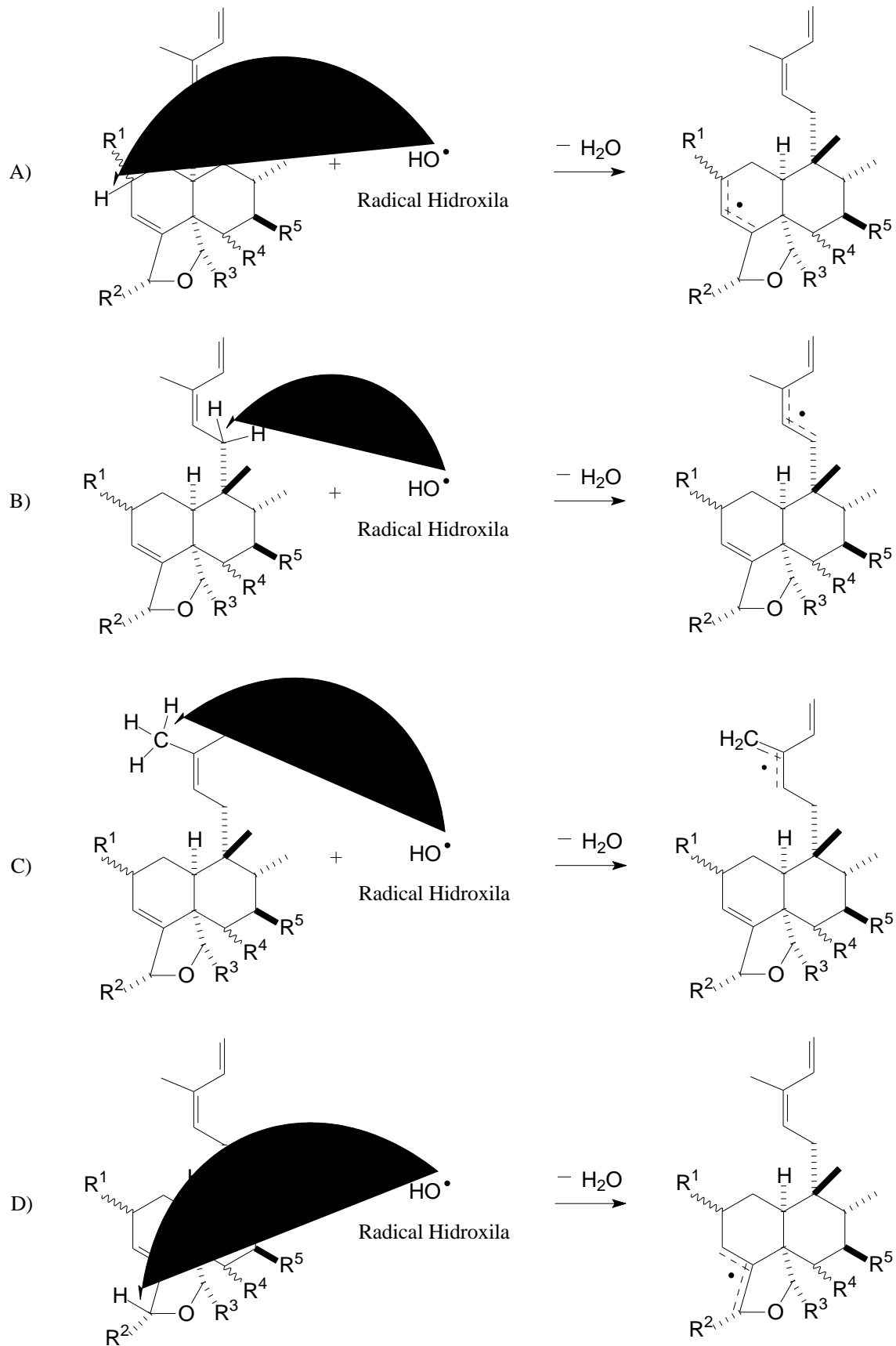
Ilustração 4. Avaliação dos efeitos da fração rica em casearinas (FC) contra a formação de radical hidroxila *in vitro*.



Efeitos da fração rica em casearinas (FC) na remoção de radical hidroxila. O Trolox 140 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi usado como padrão antioxidante. Os valores representam a média \pm E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*, $n = 5$, experimentos em duplicata. ^a $p < 0,001$ em relação ao sistema reacional (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste); * $p < 0,001$ versus o veículo (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

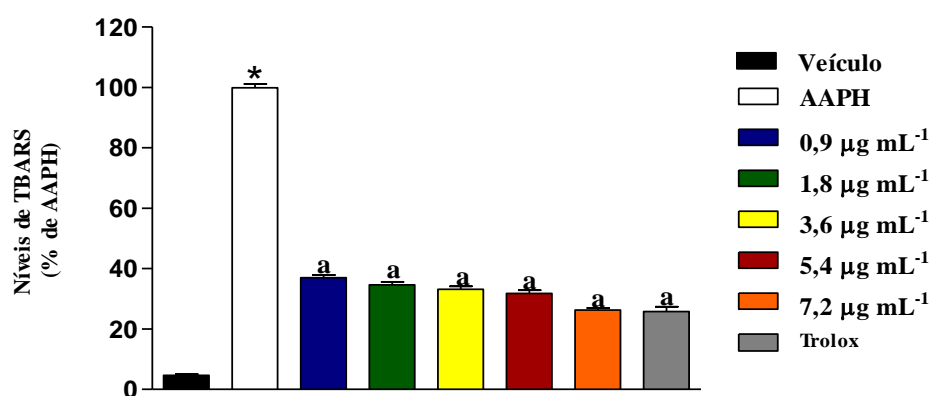
Após os testes antioxidantes *in vitro* foi determinada a CE₅₀ de 6,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra a formação do radical hidroxila com uma margem de variação de 5,7 a 7,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com um intervalo de confiança de 95%. Desta maneira foram possíveis mecanismos de ação antioxidante contra o radical hidroxila conforme representado na ilustração 5.

Ilustração 5. Prováveis mecanismos de ação antioxidante *in vitro* da fração rica em casearinas contra a formação do radical hidroxila.



A peroxidação lipídica foi avaliada por meio do método de quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os resultados mostram que nas concentrações testadas ocorreu redução significativa nas porcentagens de TBARS em relação ao AAPH na devida ordem: 65,1, 66,7, 67,6, 69,4 e 72,4% ($p < 0,001$). O Trolox, por sua vez, provocou a redução de 74,1% na produção de TBARS. (Ilustração 6)

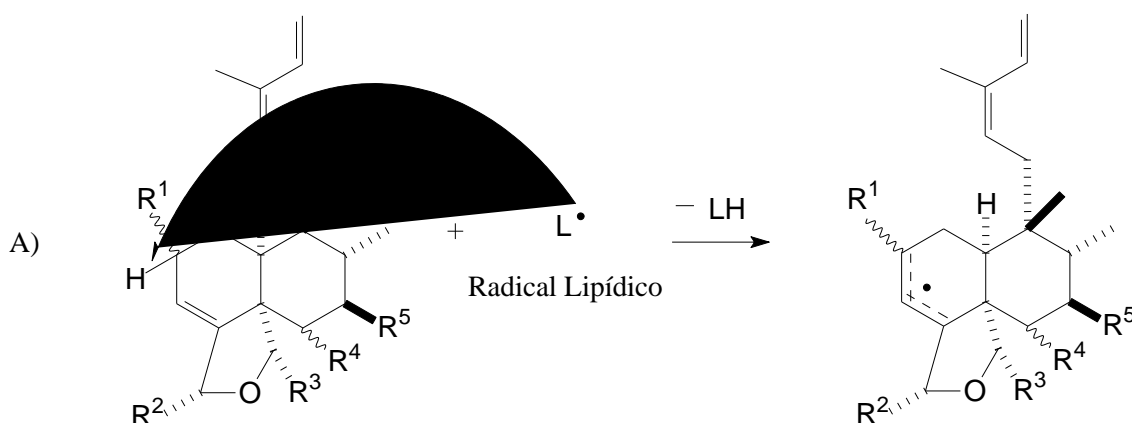
Ilustração 6. Avaliação dos efeitos da fração rica em casearinas (FC) contra a formação de TBARS *in vitro*.

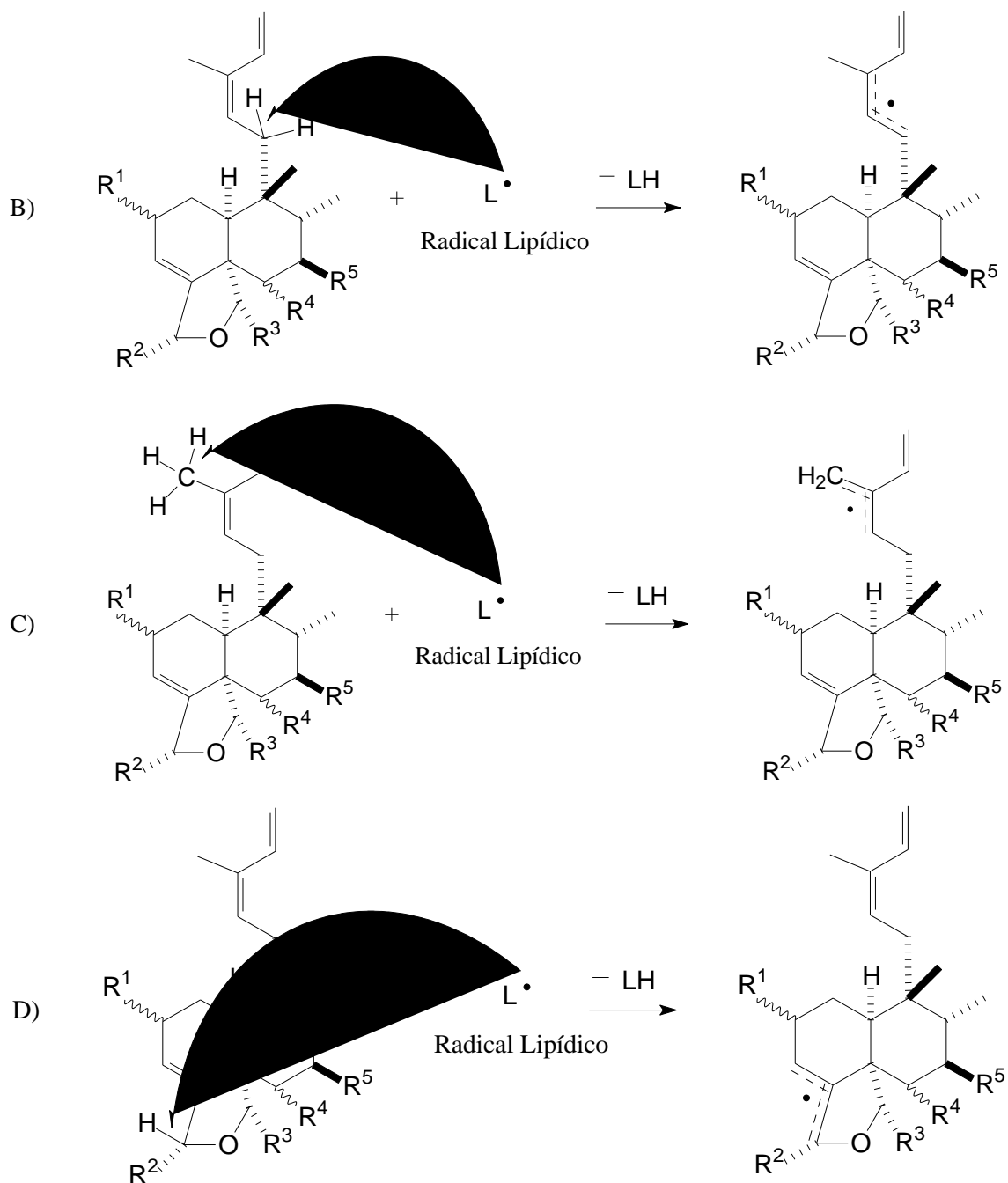


Efeitos da fração rica em casearinas (FC) contra a produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico. O Trolox $140 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi usado como padrão antioxidante. Os valores representam a média \pm E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*, $n = 5$, experimentos em duplicata. ^a $p < 0,001$ em relação ao AAPH (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste); ^{*} $p < 0,001$ comparado ao DMSO 4% (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

A CE_{50} da FC contra a formação de TBARS foi de $0,16 \mu\text{g mL}^{-1}$ com margem de variação de $0,07$ a $0,39 \mu\text{g mL}^{-1}$ e 95% de intervalo de confiança. A ilustração 7 representa esquematicamente os prováveis mecanismos de atuação da FC contra a formação do radical $L\cdot$ (radical lipídico) durante a peroxidação lipídica.

Ilustração 7. Prováveis mecanismos de ação antioxidante *in vitro* da fração rica em casearinas contra a formação do radical lipídico durante a peroxidação lipídica.





4.4 DISCUSSÃO

Os estudos com substâncias antioxidantes presentes em frutas, vegetais e em plantas medicinais ganhou destaque no meio científico em virtude da relação existente entre os radicais livres e a etiologia de várias patologias, principalmente as de caráter crônico como o câncer e doenças neurodegenerativas (Alzheimer e Parkinson, por exemplo) (LOPACZYNSKI; ZEISEL, 2001; RAHMAN, 2007). A *C. sylvestris*, popularmente conhecida como guaçatonga, é uma planta medicinal com inúmeras propriedades

farmacológicas com destaque para seu potencial citotóxico contra diferentes linhagens de células cancerígenas (FERREIRA et al., 2010; SANTOS et al., 2010). Por conseguinte, é válido pesquisar a atividade dos constituintes majoritários da fração rica extraída das folhas da planta, as casearinas, frente a espécies reativas causadoras de estresse oxidativo.

As casearinas são metabólitos secundários diterpenóides derivados do isopreno com estrutura clerodânica tricíclica oxigenada (Ilustração 1) extraídos principalmente das folhas de *Casearia sylvestris* Swartz. Estas entidades químicas diferem entre si quanto à posição do grupamento dieno na cadeia lateral e na quantidade e localização de substituintes oxigenados. Os terpenóides são substâncias alelopáticas que atuam na proteção das plantas contra patógenos e herbívoros. Podem estar presentes em produtos derivados de plantas e possuir propriedades antioxidantes principalmente contra a peroxidação de lipídios devido sua lipofilicidade. (GRASSMAN et al., 2002; SANTOS et al., 2007; CARVALHO et al., 2009; WANG et al., 2009).

A atividade antioxidante *in vitro* é baseada fundamentalmente em ensaios químicos que avaliam a capacidade de determinada substância isolada de produtos naturais ou de fontes sintéticas em reduzir a concentração de radicais livres em um meio reacional específico. Em todas as metodologias utilizadas foi possível definir o valor das porcentagens de inibição e da concentração de FC capaz de reduzir as quantidades iniciais dos radicais em 50%, denominada de concentração eficaz (CE₅₀). O incremento na atividade antioxidante da amostra é determinado em função da CE₅₀, já que, quanto menor o valor da concentração de inibição melhor será a atividade antioxidante da substância. Para fins de comparação foi utilizado como antioxidante padrão o Trolox, análogo sintético hidrossolúvel do tocoferol tradicionalmente utilizado como referência na avaliação do potencial antioxidante de compostos isolados de alimentos e de extratos vegetais (VAN DEN BERG et al., 1999; GIORDANI et al., 2008; AHMADI et al., 2010; BADARINATH, 2010; FABRI et al., 2011).

Este estudo foi realizado visando caracterizar e expandir as informações sobre o poder antioxidante das casearinas isoladas das folhas da guaçatonga por meio de ensaios antioxidantes ainda não realizados com a *C. sylvestris* (FERREIRA et al., 2011). O método proposto para determinar a ação sequestradora do íon nitrito, conforme descrito anteriormente, foi baseado na decomposição do NPS em óxido nítrico em pH fisiológico, o qual em condições aeróbicas produz os nitritos que foram quantificados espectrofotometricamente pela reação com sulfanilamida e com o cloridrato de N-(1-naftil)etilenodiamina (Reagente de Griess). É importante realizar a avaliação da FC contra ERNs, uma vez que esses radicais podem causar danos em componentes biológicos como no

aminoácido aromático tirosina e nas bases do DNA, particularmente na guanina, por nitração ou hidroxilação (BARREIROS et al., 2006; RAMOS et al., 2006; ALAM et al., 2012; CAROCHO; FERREIRA, 2012).

De acordo com a Ilustração 2 a FC foi capaz de reduzir significativamente os níveis de ERNs especialmente na concentração de $7,2 \mu\text{g mL}^{-1}$, com a qual houve 50% de redução, enquanto a CE_{50} foi de $3,7 \mu\text{g mL}^{-1}$. Estes resultados são superiores àqueles demonstrados por Serafini e colaboradores (2011) com o extrato aquoso das folhas de *Morinda citrifolia* L., espécie com ampla divulgação na medicina tradicional brasileira, regionalmente conhecida como noni. Para estes pesquisadores, o extrato das folhas da planta na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ reduziu em apenas 11% a produção de óxido nítrico no mesmo sistema reacional utilizado neste estudo. Previamente Napolitano e colaboradores (2005) relataram que o extrato hexânico do caule e da casca da raiz da *C. sylvestris* possuem capacidade imunomodulatória contra a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos *in vitro* (94,4 e 97,1%, respectivamente), porém na concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, o que demonstra proporcionalmente, que a FC extraída das folhas possui a atividade superior.

O radical hidroxila é uma ERO muito deletéria para os organismos vivos, extremamente reativa e dificilmente sequestrada *in vivo*, que interage de forma muito rápida e inespecífica com os mais variados alvos celulares podendo atacar o DNA, proteínas, organelas citoplasmáticas, como as mitocôndrias e lipídios de membrana, causando sua hidroxilação e colapso celular. Na avaliação da atividade antioxidante da FC contra o radical hidroxila foi utilizada uma metodologia baseada na reação de Fenton, na qual a produção do radical ocorre a partir da reação entre o peróxido de hidrogênio e um metal de transição, como o ferro ou o cobre. Neste ensaio o radical formado reage com a 2-desoxirribose cuja degradação pode ser determinada por espectrofotometria. Substâncias antioxidantes, como é o caso das casearinas, podem competir com a 2-desoxirribose pelo radical livre causando uma redução na sua degradação, conforme apresentado na Ilustração 4 (HALLIWELL, 1991; ANDERSON; PHILLIPS, 1999; ALVES et al., 2010).

Dessa forma, é observado que o perfil de redução dos radicais livres da ilustração 4 é semelhante ao da ilustração 2, ou seja, mais uma vez houve maior diminuição na produção dos radicais com a maior concentração da FC, porém neste caso com uma porcentagem superior (61,6%) e com um valor de CE_{50} de $6,4 \mu\text{g mL}^{-1}$. Esse é um dado significativo se comparado aos resultados obtidos por Awah e colaboradores (2010) ao estudarem as propriedades de *Stachytarpheta angustifolia* V., planta medicinal africana caracterizada por melhorar a condição de pacientes HIV positivos ao reduzir o estresse oxidativo decorrente da

infecção. Segundo os pesquisadores, o extrato etanólico das folhas dessa planta inibe consideravelmente a degradação da 2-desoxirribose pelo radical hidroxila, produzido em um ensaio ferro-dependente semelhante ao deste estudo, com uma CE_{50} de $99,4 \pm 1,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ o que demonstra comparativamente a significativa atividade protetora da FC contra o radical hidroxila.

A peroxidação lipídica consiste no ataque a componentes lipídicos celulares por espécies reativas derivadas de nitrogênio e oxigênio devido a uma superprodução de radicais livres ou redução das defesas antioxidantes. Esse é um processo que pode estar relacionado com a patogênese de várias doenças como o câncer, diabetes, aterosclerose e sobretudo distúrbios neurológicos em que ocorrem complexas reações em cadeia que levam à oxidação de ácidos graxos (LH) e à formação de radical lipídico ($L\bullet$). O radical lipídico é instável e tende a se degradar muito rapidamente em diferentes produtos secundários em sua maioria aldeídos eletrofílicos, como é o caso do malonaldeído (MDA), que representa o principal marcador de injúria oxidativa nos lipídios insaturados de membrana celular (GROTTO et al., 2009; REED, 2011).

Para a determinação do potencial protetor contra o fenômeno da peroxidação lipídica foi empregado um método largamente utilizado para caracterizar a atividade antioxidante de amostras vegetais fundamentado na determinação de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). O AAPH, azocomposto hidrossolúvel que produz radicais peroxila por decomposição térmica, foi adicionado a um meio reacional rico em lipídios para iniciar a peroxidação lipídica resultando em substâncias capazes de reagir com o TBA, como por exemplo, o próprio MDA. Por fim, o nível de condensação das TBARS por ataque nucleofílico pode ser quantificado por espectrofotometria (LIMA; ABDALLA, 2001; OSAWA et al., 2005; LEE et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2007; GROTTO et al., 2009; KRISHNAIAH, 2011).

Os resultados obtidos demonstram que houve uma redução nos níveis de TBARS superior a 65% em todas as concentrações de FC estudadas (Ilustração 6) com o valor da CE_{50} de aproximadamente $0,16 \mu\text{g mL}^{-1}$. No trabalho de Guimarães e colaboradores (2010) pode ser verificado que a atividade da FC em reduzir os níveis de peroxidação lipídica é superior à do carvacrol, monoterpene fenólico com propriedades redox e anti-inflamatórias presente em espécies da família Labiatae. Os autores relatam que o carvacrol é capaz de reduzir a quantidade de substâncias reativas derivadas do AAPH com concentrações de 1 ng mL^{-1} , porém só manifesta efeito preventivo contra a peroxidação lipídica a partir de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Além disso, após analisar a pesquisa realizada por Mosaddick e colaboradores (2004) pode

ser constatada a elevada capacidade da *C. sylvestris* em reduzir a peroxidação lipídica, se comparada a outras espécies do seu gênero. De acordo com os pesquisadores, o extrato metanólico do galho da *C. grayi* possui a melhor atividade antioxidante dentre as espécies do gênero *Casearia* estudadas, obtendo CE_{50} de $6,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ no ensaio de TBARS, potencial antioxidante abaixo daquele determinado para a *C. sylvestris* nesta pesquisa.

Há ainda diferentes possibilidades de mecanismos de ação antioxidante baseados na estrutura química geral das casearinas (Ilustrações 3, 5 e 7). A atividade da FC contra os radicais livres provavelmente é decorrente da presença de sítios responsáveis pela interação e sequestro das espécies reativas. Ocorre, em quatro posições distintas, a presença de hidrogênios alílicos adjacente a duplas ligações, respectivamente nos carbonos das posições 2, 11, 16 e 18 da molécula que possivelmente interagem com os radicais. Dessa forma, o hidrogênio atômico é preferencialmente abstraído das casearinas ocorrendo a eliminação de substâncias mais inertes como a água, o ácido nitroso (HNO_2) e ácido graxo (LH) com formação de radicais de carbono estabilizados, procedentes da estrutura das casearinas, interrupção do dano oxidativo e preservação das biomoléculas eventualmente expostas ao estresse oxidativo (BARREIROS et al., 2006; RAMALHO; JORGE, 2006).

Menezes e colaboradores (2004) determinaram e compararam a atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico das folhas da guaçatonga, reconhecidamente rico em casearinas, com outras dez plantas medicinais do cerrado brasileiro. Foi avaliada a habilidade das plantas em sequestrar o radical livre DPPH e verificado que a *C. sylvestris* apresentou ação antioxidante inferior às demais espécies testadas com o valor de CE_{50} de $471,80 \mu\text{g mL}^{-1}$. No presente estudo, a FC isolada do extrato etanólico das folhas da guaçatonga demonstrou ter boa atividade *scavenger* para o íon nitrito, radical hidroxila e de TBARS *in vitro* conforme demonstrado nas ilustrações 2, 4 e 6.

É importante salientar que existe a necessidade da comprovação da atividade antioxidante por meio de testes *in vivo* visto que, a presença de atividade antioxidante *in vitro* não garante a manutenção do potencial redox da FC em sistemas orgânicos. Isso porque o poder antioxidante de uma substância não depende somente da sua reatividade química, mas também da sua interação com as moléculas orgânicas e da influência que o meio biológico exerce sobre ela. Além disso, a solubilidade, a concentração e a complexidade dos constituintes das plantas medicinais são fatores que podem ser alterados quando estes componentes são isolados ou sofrer variação dentro do organismo, modificando sua atividade antioxidante (HALLIWELL, 1995; ALVES, 2010).

4.5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados foi possível verificar o potencial antioxidante da fração rica em casearinas comparativamente com outros constituintes de produtos naturais assim como a atividade redox da própria *C. sylvestris* frente a outras plantas medicinais do seu gênero e a outras espécies com propriedades antioxidantes citadas na literatura. Entretanto, o fato da FC ser capaz de reduzir o dano oxidativo *in vitro* não garante que essa fração possua as mesmas propriedades antioxidantes *in vivo*. Logo, pode ser deduzido que a guaçatonga é realmente dotada de ação antioxidante *in vitro* contra o íon nitrito, o radical hidroxila e TBARS, porém exige a constatação dessa característica em sistemas orgânicos.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, D.S.P.; FAINE, L.A. Radicais livres e antioxidantes. In: OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A.O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 2008.
- AHMADI, F.; SADEGHI, S.; MODARRESI, M.; ABIRI, R.; MIKAELI, A. Chemical composition, in vitro anti-microbial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and methanolic extract of *Hymenocrater longiflorus* Benth., of Iran. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1137-1144, 2010.
- ALAM, M. N.; BRISTI, N.J.; RAFIQUZZAMAN. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 2012.
- ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ANDERSON, D.; PHILLIPS, B.J. Comparative *in vitro* and *in vivo* effects of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 1015-1025, 1999.
- AWAH, F.M.; UZOEGWU, P.N.; OYUGI, J.O.; RUTHERFORD, J.; IFEONU, P.; YAO, X-J.; FOWKE, K.R.; EZE, M.O. Free radical scavenging activity and immunomodulatory effect of *Stachytarpheta angustifolia* leaf extract. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1409-1416, 2010.
- BADARINATH, A.V.; RAO, K.M.; CHETTY, C.M.S.; RAMKANTH, S.; RAJAN, T.V.S.; GNANAPRAKASH, K. A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. **International Journal of PharmTech Research**, v. 2, n. 2, p. 1276-1285, 2010.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.; DAVID, J. Estresse oxidativo: relação entre geração das espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

BASU, S.; HAZRA, B. Evaluation of nitric oxide scavenging activity, *in vitro* and *ex vivo*, of selected medicinal plants traditionally used in inflammatory diseases. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 896-900, 2006.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, 2012.

CARVALHO, E.S.; SANTOS, A.G.; CAVALHEIRO, A.J.; Identificação de diterpenos clerodânicos em diferentes órgãos de *Casearia sylvestris* Sw. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 277-284, 2009.

CHANDA, S.; DAVE, R. *In vitro* models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 13, p. 981-996, 2009.

DALLAQUA, B.; DAMASCENO, D.C.; Comprovação do efeito antioxidante de plantas medicinais utilizadas no tratamento do *Diabetes mellitus* em animais: artigo de atualização. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu**, v. 13, n. 3, p. 367-373, 2011.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 407-421, 1990.

FABRI, R.L.; NOGUEIRA, M.S.; DUTRA, L.B., BOUZADA, M.L.M.; SCIO, E. Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu**, v. 13, n. 2, p. 183-189, 2011.

FERREIRA P.M.P.; SANTOS, A.G.; TININIS, A.G.; COSTA, P.M.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; PESSOA, C. Casearin X exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, p. 497-504, 2010.

FERREIRA, P.M.P.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; BARROS, F.W.A.; MARTINS, A.M.A.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; SANTOS, A.G.; PESSOA, C. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, p. 1373-1384, 2011.

GIORDANI, R.B.; PAGLIOSA, L.B.; HENRIQUES, A.T.; ZUANAZZI, J.A.S.; DUTILH, J.H.A. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2041-2046, 2008.

GRASSMANN, J.; HIPPELI, S.; ELSTNER, E.F.; Plant's defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 471-478, 2002.

GROTTO, D.; MARIA, L.S.; VALENTINI, J.; PANIZ, C.; SCHIMITT, G.; GARCIA, S.C.; POMBLUM, V. J.; ROCHA, J.B.T.; FARINA, M. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. **Química Nova**, v. 32, p. 169-174, 2009.

GUARATINI, T.; MEDEIROS, M.H.G.; COLEPICOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova**, v. 30, p. 206-213, 2007.

GUIMARÃES, A.G.; OLIVEIRA, G.F.; MELO, M.S.; CAVALCANTI, S.C.; ANTONIOLLI, A.R.; BONJARDIM, L.R.; SILVA, F.A.; SANTOS, J.P.A.; ROCHA, R.F.; MOREIRA, J.C.F.; ARAÚJO, A.A.; GELAINN, D.P.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 107, p. 949-957, 2010.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. **The American Journal of Medicine**, v. 91, supp. 3C, p. 14-22, 1991.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. **Biochemical Pharmacology**, v. 49, p.1341-1348, 1995.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants – *quo vadis?* **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 3, p. 125-130, 2011.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, p. 217-233, 2011.

LEE, W.S.; KIM, J-R.; HAN, J-M.; JANG, K. C.; SOK, D-E.; JEONG, T-S. Antioxidant activities of abietane diterpenoids isolated from *Torreya nucifera* leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 5369-5374, 2006.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LOPACZYNSKI, W.; ZEISEL, S.H. Antioxidants, programmed cell death, and cancer. **Nutrition Research**, v. 21, p. 295-307, 2001.

LOPES, G.K.B.; SCHULMAN, H.M.; LIMA, M.H. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1472, p. 142-52, 1999.

MENEZES, P.R.; SCHWARZ, E.A.; SANTOS, C.A.M. In vitro antioxidant activity of species collected in Paraná. **Fitoterapia**, v. 75, p. 398-400, 2004.

MOSADDICK, M.A.; BANBURY, L.; FORSTER, P.; BOOTH, R.; MARKHAM, J.; LEACH, D.; WATERMAN, P.G. Screening of some Australian Flacourtiaceae species for in vitro antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity. **Phytomedicine**, v. 11, p. 461-466, 2004.

NAPOLITANO, D.R.; MINEO, J.R.; SOUZA, M.A.; PAULA, J.E.; ESPINDOLA, L.S.; ESPINDOLA, F.S. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 35-41, 2005.

OSAWA, C.C.; FELÍCIO, P.E.; GONÇALVES, L.A.G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 655-663, 2005.

RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clinical Interventions in Aging**, v. 2, n. 2, p. 219-236, 2007.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RAMOS, L.A.; CAVALHEIRO, C.C.S.; CAVALHEIRO, E.T.G. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1114-1120, 2006.

REANMONGKOL, W.; MATSUMOTO, K.; WATANABE, H.; SUBHADHIRASAKUL, S.; SAKAI, S.I. Antinociceptive and antipyretic effects of alkaloids extracted from the stem bark of *Hunteria zeylanica*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 17, p. 1345-1350, 1994.

REED, T. T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, p. 1302-1319, 2011.

RÊGO JR., N.O.; FERNANDEZ, L.G.; CASTRO, R.D.; SILVA, L.C.; GUALBERTO, S.A.; PEREIRA, M.L.A.; SILVA, M.V. Compostos bioativos e atividade antioxidante de extratos brutos de espécies vegetais da caatinga. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, p. 50-57, 2011.

SANTOS, A.G.; PEREZ, C.C.; TININIS, A.G.; BOLZANI, V.S.; CAVALHEIRO, A.J. Clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Swartz. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1100-1103, 2007.

SANTOS, A.G.; FERREIRA, P.M.P.; VIEIRA JÚNIOR, G.M.; PEREZ, C.C.; TININIS, A.G.; SILVA, G.H.; BOLZANI, V.S.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PESSOA, C.; CAVALHEIRO, A.J. Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumour human cells. **Chemistry and Biodiversity**, v. 7, p. 205-215, 2010.

SERAFINI, M.R.; SANTOS, R.C.; GUIMARÃES, A.G.; SANTOS, J.P.A.; SANTOS, A.D.C.; ALVES, I.A.; GELAIN, D.P.; NOGUEIRA, P.C.L.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; BONJARDIM, L.R.; ARAÚJO, A.A.S. *Morinda citrifolia* Linn Leaf Extract Possesses Antioxidant Activities and Reduces Nociceptive Behavior and Leukocyte Migration. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 10, p. 1159-1166, 2011.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VAN DEN BERG, R.; HAENEN, G.R.M.N.; VAN DEN BERG, H.; BAST, A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. **Food Chemistry**, v. 66, p. 511-517, 1999.

WANG, W.; ZHAO, J.; WANG, Y-H.; SMILLIE, T. A.; LI, X-C.; KHAN, I.A. Diterpenoids from *Casearia sylvestris*. **Planta Medica**, v. 75, p. 1436-1441, 2009.

CAPÍTULO III

5 Alterações comportamentais em camundongos induzidas pela fração rica em casearinas extraída das folhas de *Casearia sylvestris* Swartz.

Alterações comportamentais em camundongos induzidas pela fração rica em casearinas extraída das folhas de *Casearia sylvestris* Swartz.

ARAÚJO, E.J.F.¹; ALMEIDA, A.A.C.¹; FREITAS, R.M.¹; CAVALHEIRO, A.J.²; BOLZANI, V.S.²; SILVA, D.H.S.²; PESSOA, C.³; FERREIRA, P.M.P.^{1,4};

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí (NTF/UFPI), 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

²Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NubbE), Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 14.800-900, Araraquara, São Paulo, Brasil.

³Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará (UFC), 60.430-270, Fortaleza, Ceará, Brasil.

⁴Departamento de Ciências Biológicas, Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, Universidade Federal do Piauí (CSHNB-UFPI), 64.607-670, Picos, Piauí, Brasil.

RESUMO

A *Casearia sylvestris* Swartz, é uma planta medicinal popularmente utilizada no tratamento de envenenamentos ofídicos, ferimentos, inflamações e úlceras gástricas. Existem poucos estudos no que diz respeito às suas ações sobre o sistema nervoso central (SNC) e nenhuma avaliação neurofarmacológica da planta que correlacione seus efeitos sobre a cognição animal. Esse estudo visou examinar os possíveis efeitos que a fração rica em casearinas (FC) exerce sobre o comportamento de camundongos adultos mediante os testes de campo aberto, labirinto em cruz elevado e *rota rod*. Os resultados demonstram que a FC na maior dose testada (25 mg kg⁻¹ i.p.) provocou diarreia, redução de peso e morte de um animal (11,11%). No teste do campo aberto, a FC diminuiu o número de cruzamentos (p<0,05) em relação ao controle negativo e ao diazepam em todas as doses avaliadas. Houve redução do número de *rearings* apenas na dose de 25 mg kg⁻¹ (p<0,05), não havendo nenhuma modificação significativa no número de *groomings*. No labirinto em cruz elevado, a FC diminuiu o número de entradas nos braços abertos em relação ao diazepam (p<0,05) em todas as doses testadas. Houve redução no tempo de permanência nos braços abertos nas maiores doses (10 e 25 mg kg⁻¹) e no número total de entradas. Na técnica do *rota rod*, a FC aumentou o tempo de permanência na barra giratória em relação ao diazepam e, conseqüentemente, diminuiu no número de quedas, achados que sugerem que as casearinas encontradas na FC reduzem a atividade locomotora espontânea e exploratória dos animais na ausência de efeitos sedativos e miorrelaxantes, provavelmente, devido à interação com o sistema dopaminérgico.

Palavras-chave: *Casearia sylvestris*, Campo aberto, Labirinto em cruz elevado, *Rota rod*.

ABSTRACT: Behavioral changes in mice induced by a fraction rich casearins extracted from *Casearia sylvestris* Swartz leaves.

Casearia sylvestris Swartz is a medicinal plant popularly used to treat snakebites, wounds, inflammation and gastric ulcers. There are a few studies regarding the actions of *C. sylvestris* on the central nervous system (CNS) and no evaluations about its neuropharmacological effects on animal cognition. This study aimed to examine the possible effects showed by the fraction rich in casearins (FC) on the behavior of adult mice using the open field, elevated plus maze and rota rod tests. The results demonstrate that the FC 25 mg kg⁻¹ ip caused diarrhea, weight loss and death of one animal (11.11%). In the open field test, the FC decreased the number of crossings ($p < 0.05$) in comparison with the negative control and diazepam at all doses evaluated. Rearings reduction was noticed only at 25 mg kg⁻¹, and there is no significant change in the number of groomings. In the elevated plus maze, FC decreased number of entries into the open arms compared to diazepam ($p < 0.05$) at all doses tested, the residence time in the open arm in the highest doses (10 and 25mg kg⁻¹) and the total number of entries. In the rota rod technique, FC exhibited a significant increase in time spent in the bar swivel relative to diazepam. Consequently, a decreasing in the number of falls ($p < 0.05$) was detected, findings which indicates that casearins found in FC reduce the spontaneous locomotor and exploratory activities of the animals in absence of sedative and myorelaxant effects, probably due to the interaction with the dopaminergic system.

Keywords: *Casearia sylvestris*, open field, elevated plus maze, rota rod.

5.1 INTRODUÇÃO

Há registros na literatura que as plantas medicinais, seus derivados e constituintes podem modificar o comportamento de animais induzindo ou tratando casos de ansiedade, depressão ou crises epiléticas. Medicamentos à base de plantas, cujo potencial farmacológico é avaliado em modelos animais e neuroquímicos, têm se tornado novas opções terapêuticas em psiquiatria clínica. O uso popular dessas preparações e de produtos farmacêuticos derivados no tratamento de quadros neurológicos é impulsionado pelo fato dessas substâncias possuírem origem natural e atividade reconhecida sobre o sistema nervoso central conforme estudos disponíveis na literatura científica (ZHANG, 2004; SILVA et al., 2011).

Almeida e colaboradores (2012), por exemplo, reportaram a ação ansiolítica e os efeitos sedativos em camundongos do (+)-epóxi-limoneno, terpenóide semissintético do limoneno que pode ser extraído de frutas cítricas, utilizado como adjuvante farmacêutico e aditivo alimentar. Souto-Maior e colaboradores (2011), relataram que a inalação do óxido de linalol, monoterpene presente em várias plantas medicinais aromáticas como a *Lavandula angustifolia* M., *Melissa officinalis* L., *Rosmarinus officinalis* L. e *Cymbopogon citratus* D. C., também reduz a ansiedade em animais, sem modificar sua atividade motora.

A *Casearia sylvestris* Sw., planta medicinal conhecida como guaçatonga, é utilizada popularmente no tratamento de envenenamentos ofídicos, ferimentos, inflamações e úlceras gástricas. Análises fitoquímicas demonstram que uma porção significativa do extrato etanólico das folhas da guaçatonga é composta por casearinas, diterpenos clerodânicos responsáveis pela maioria das propriedades farmacológicas dessa espécie, havendo uma relação direta entre sua concentração e o potencial medicinal da planta. A ação citotóxica contra diferentes tipos de cânceres é uma das atividades farmacológica atribuídas às casearinas que já foram devidamente comprovadas cientificamente (ITOKAWA et al., 1990; CARVALHO et al., 1998; WANG et al., 2009; SANTOS et al., 2010; FERREIRA et al., 2010, 2011).

As pesquisas com animais em laboratório geram informações que tornam possível prever efeitos adversos de medicamentos, cosméticos, alimentos e derivados vegetais para a saúde humana. Basicamente, a observação do peso corporal, do consumo de alimentos, a avaliação hematológica e bioquímica de fluidos biológicos, o exame de urina, análises fisiológicas e histopatológicas, bem como os ensaios neurológicos e funcionais complementam a avaliação toxicológica geral fundamentada na toxicidade aguda, subcrônica e crônica. A triagem com modelos comportamentais visa quantificar ou distinguir a presença

de sutis modificações biológicas que porventura podem estar relacionadas com lesões no SNC de origens diversas. A partir daí surge o interesse em realizar a avaliação neurofarmacológica de constituintes naturais farmacologicamente ativos como é o caso das casearinas (STEINBERG, 1987; BASU; HEAD, 2010).

Existem poucos estudos no que diz respeito às ações da *C. sylvestris* sobre o sistema nervoso central (SNC) e ainda não foi realizada nenhuma avaliação do *screening* neurofarmacológico da espécie que correlacione seus efeitos sobre a cognição animal. Diante do exposto esse estudo tem como objetivo examinar os possíveis efeitos que a fração rica em casearinas exerce sobre o comportamento de camundongos adultos mediante utilização de modelos experimentais clássicos de avaliação do comportamento animal.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos *Mus musculus* linhagem Swiss, pesando entre 25 e 30 g com aproximadamente 2 meses de idade provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí – UFPI. Os animais foram mantidos sob condições monitoradas de temperatura, equivalente a 25 ± 1 °C, e luminosidade em ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo a fase clara de 6h00 às 18h00, sob regime de ingestão *ad libitum* de ração comercial tipo Purina® e água durante todos os experimentos. Os protocolos experimentais e procedimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da UFPI (nº 0102/2011).

Obtenção da fração rica em casearinas (FC)

As folhas de *Casearia sylvestris* Swartz foram coletadas no Parque Estadual Carlos Botelho (São Miguel Arcanjo, São Paulo) por colaboradores do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Exsiccatas dos exemplares coletados foram depositadas no herbário Maria Eneida P. Kaufmann do Instituto Botânico do Estado de São Paulo com os seguintes registros: AGS04, AGS05, AGS06, AGS13 e AGS19. O extrato foi obtido a partir do material vegetal seco em estufa a 40 °C por sete dias seguido de fragmentação em moinho de facas.

O isolamento e a determinação estrutural dos diterpenos clerodânicos foi realizado no Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais - NuBBE, do Instituto de Química da UNESP (Araraquara, São Paulo). As folhas secas e moídas de *C. sylvestris* (20 kg) foram extraídas com cerca de 200 L de etanol em extrator de aço inox (capacidade 300 L) com sistemas de circulação de solvente e de aquecimento, à 40 °C por aproximadamente 24 h. O extrato líquido concentrado sob pressão reduzida seguidamente seco em capela e dessecador com sílica gel sob vácuo, forneceu o extrato seco. Parte deste extrato (473,6 g) foi fracionado através de uma extração em fase sólida (EFS) utilizando carvão ativo/sílica gel 60-200 µm (1:1, m/m), como fase estacionária, e os eluentes hexano/acetato de etila (95:5, v/v), acetato de etila e metanol, fornecendo 3 frações respectivamente.

Análises utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C revelaram que a fração rica em casearinas (FC) empregada nesse estudo corresponde à segunda fração (EFS2). A FC é caracterizada por possuir um percentual de casearinas totais de 56,5 % (mg g^{-1}), sendo a caseargrevina F e a casearina X as moléculas mais presentes (teor de 9,9 e 14,2 %, respectivamente).

Tratamento com drogas

A fração rica em casearinas (FC) foi previamente solubilizada com DMSO 4%, dissolvido em água purificada para posteriormente ser administrada via intraperitoneal nas doses 2,5, 5, 10 e 25 mg kg^{-1} durante 7 dias. Decorridos 30 minutos após a administração da última dose dos tratamentos foram realizados os experimentos. O grupo controle foi tratado com DMSO 4% em água purificada em volume constante de 10 mL kg^{-1} administrado pela mesma via dos demais grupos tratados. Foi utilizado diazepam (DZP, União Química) na dose 2 mg kg^{-1} via i.p. como controle positivo nos testes comportamentais.

Teste do campo aberto

Para esse experimento os animais foram divididos em 6 grupos de 9 animais e tratados conforme os protocolos experimentais com veículo (DMSO 4% em água destilada 10 mL kg^{-1} i.p.), fração rica em casearinas (2,5, 5, 10 e 25 mg kg^{-1} i.p.) e diazepam (2 mg kg^{-1} i.p.) durante 7 dias. A atividade exploratória dos animais foi verificada por meio de um campo aberto feito de acrílico (paredes transparentes e piso preto, com dimensões 30 x 30 x 15 cm) dividido em 9 quadrantes iguais, baseado no modelo descrito por Archer (1973).

Posteriormente, 30 minutos após os tratamentos, os animais foram colocados um por vez no centro do campo aberto no qual o número de cruzamentos com as quatro patas (atividade locomotora espontânea; ALE), número de comportamentos de autolimpeza (*grooming*) e o número de levantamentos sem encostar-se nas paredes (*rearing*) foram contabilizados durante 5 minutos. Após a realização do teste individualmente com cada animal dos grupos, foi efetuada a limpeza do campo com toalha de papel umedecida em álcool 96 °GL para remoção de excretas deixadas pelos animais.

Teste do labirinto em cruz elevado

Esse teste é utilizado para avaliar a presença de características de ansiedade em roedores. O labirinto em cruz elevado é feito de madeira e consiste em dois braços aberto (30 x 5 cm) e dois fechados (30 x 5 x 25 cm) cruzados perpendicularmente, no qual o animal é colocado 60 cm acima do solo exatamente na interseção dos braços (plataforma central 5 x 5 cm) com a cabeça voltada para a entrada dos braços fechados. Nesse protocolo é possível inferir que drogas ansiogênicas levam o animal a diminuir o número de entradas, bem como a sua permanência nos braços abertos (LISTER, 1987). Para esse teste os camundongos foram divididos em 6 grupos (9 animais/grupo) tratados respectivamente com o veículo (DMSO 4% com água destilada 10 mL kg⁻¹ i.p.), fração rica em caseínas (FC 2,5, 5, 10 e 25 mg kg⁻¹ i.p.) e diazepam (2 mg kg⁻¹ i.p.) durante 7 dias.

Os animais foram colocados na interseção entre os braços do labirinto 30 minutos após os tratamentos e observados durante 5 minutos. Os parâmetros quantificados no experimento foram o número de entradas nos braços abertos (NEBA), o tempo de permanência nos braços abertos em segundos (TPBA) e o número total de entradas nos braços abertos e fechados do labirinto. O teste foi realizado com um animal de cada vez e ao término do experimento foi realizada a limpeza do labirinto com toalha de papel umedecida em álcool 96 °GL para a remoção de qualquer vestígio deixado pelos animais.

Teste do rota rod

O teste do *rota rod* avalia o grau do relaxamento muscular ou incoordenação motora produzidos por drogas nos animais (CARLINI; BURGOS, 1979). Os animais foram divididos em 6 grupos (9 animais/grupo) e tratados previamente durante sete dias com o veículo

(DMSO 4% com água destilada 10 mL kg⁻¹ i.p.), a fração rica em casearinas (2,5, 5, 10 e 25 mg kg⁻¹ i.p.) e diazepam (2 mg kg⁻¹ i.p.).

Os camundongos foram colocados, 30 minutos após a administração da última dose dos tratamentos, com as quatro patas sobre uma barra giratória de 2,5 cm de diâmetro, elevada a 25 cm do piso, com rotação de 17 rpm, por um período de 3 minutos. Foram registrados o tempo de permanência na barra giratória, em segundos, e o número de quedas, com no máximo três reconduções, permitindo assim a avaliação da atividade motora de cada animal.

Análise estatística

Todos os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os dados obtidos foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) seguida do teste *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste por meio do *software GraphPad Prism*® (versão 5.0). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5.3 RESULTADOS

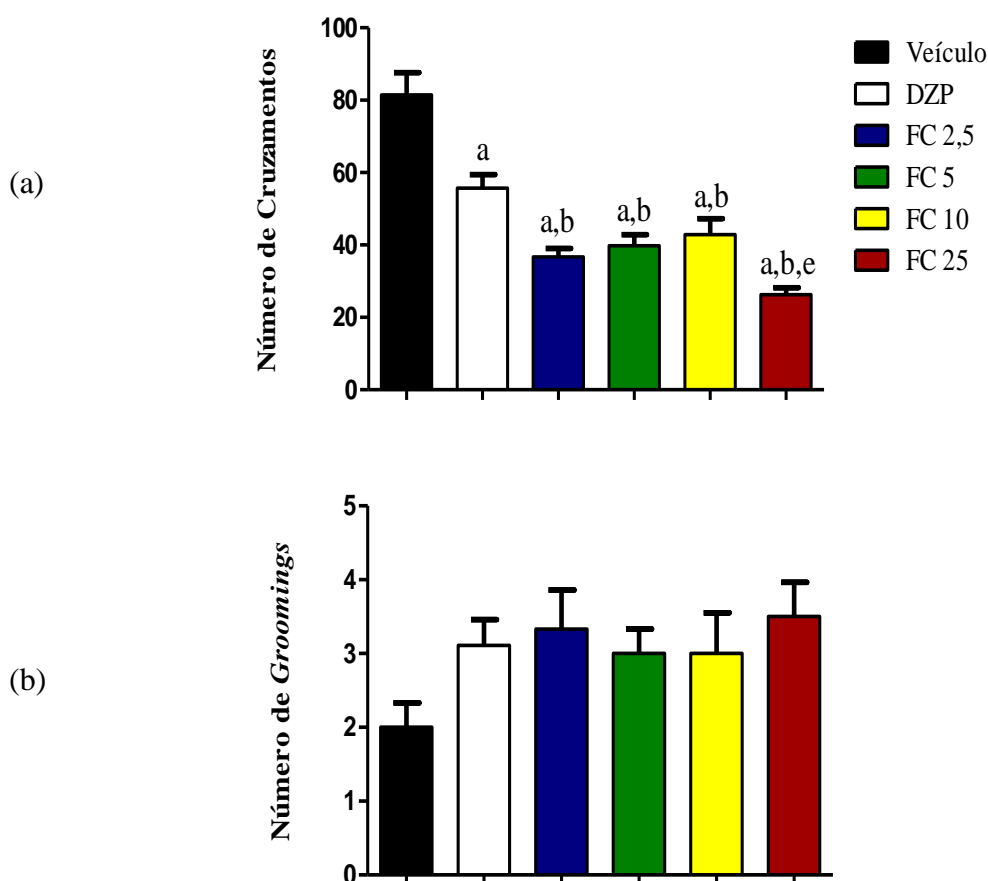
Tabela 1. Efeitos do tratamento com fração rica em casearinas (FC) administrado via intraperitoneal em camundongos *Swiss*.

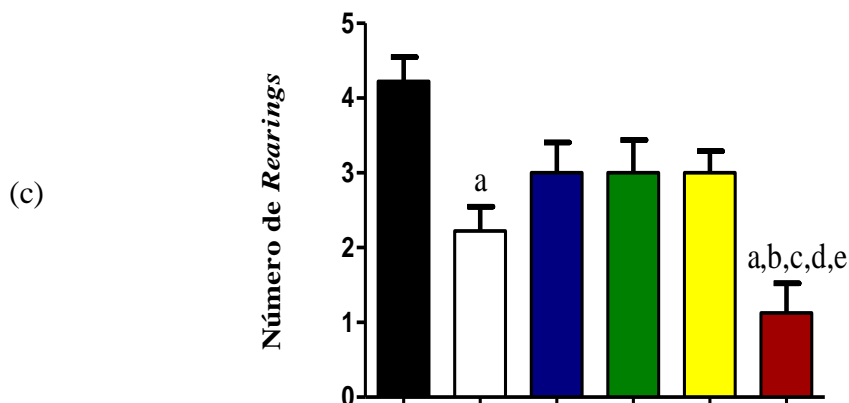
Doses de FC (mg kg ⁻¹)	Camundongo		Efeitos	
	n	Sexo	Mortalidade	Sinais de toxicidade
00	09	Feminino	-	Sem alterações
2,5	09	Feminino	-	Sem alterações
5	09	Masculino	-	Sem alterações
10	09	Feminino	-	Sem alterações
25	09	Masculino	01	Diarreia e discreta perda de peso.

Durante o estudo foi realizado o *screening* hipocrático com todos os animais que receberam as diferentes doses da FC o que forneceu uma estimativa geral da natureza toxicológica da substância, conforme descrito na tabela 1. Esse tipo de avaliação permite detectar previamente a influência da substância em estudos sobre o estado de consciência, reflexos, atividade e coordenação motora dos animais (LUCIO et al., 2000). Os resultados demonstram que a maior dose da FC provocou diarreia, redução de peso e morte de um animal (11,11%).

No teste do campo aberto foi evidenciada uma redução significativa no número de cruzamentos ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo, onde foi administrado apenas o veículo, e ao diazepam, droga ansiolítica padrão, sobretudo na maior dose FC 25 (Ilustração 1a). O número de *groomings* não sofreu nenhuma modificação significativa (Ilustração 1b) enquanto que o número *rearings* diminuiu significativamente apenas com a dose 25 mg kg⁻¹ comparativamente ao demais grupos e no grupo DZP em relação ao grupo que recebeu apenas o DMSO 4% (Ilustração 1c). Logo podemos perceber que a FC 25 é a dose da fração que mais exerce influencia sobre o padrão locomotor dos animais.

Ilustração 1. Efeitos da fração rica em casearinas (FC) em camundongos no teste do campo aberto.



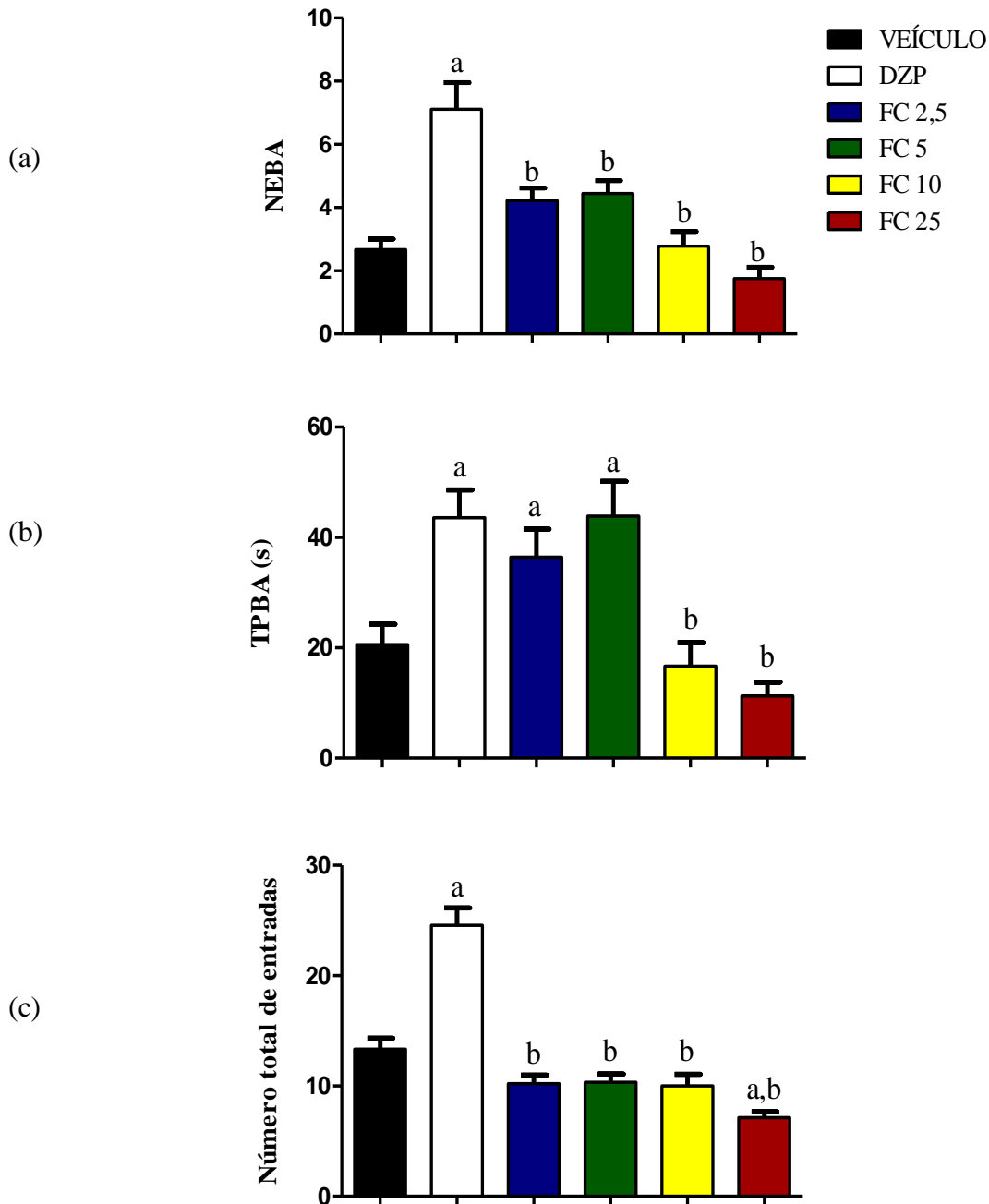


Efeitos da fração rica em casearinas (FC) no teste do campo aberto. Os valores foram expressos como a média \pm E.P.M. sobre o número de cruzamentos (a), *rearing* (b) e *grooming* (c) dos animais utilizados no experimento ($n=9$ por grupo). ^a $p<0,05$ comparado ao veículo (DMSO 4%) (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste). ^b $p<0,001$ (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste), quando comparado ao grupo diazepam. FC 2,5 = Fração rica em casearinas 2,5 mg kg⁻¹ i.p.; FC 5 = Fração rica em casearinas 5 mg kg⁻¹ i.p.; FC 10 = Fração rica em casearinas 10 mg kg⁻¹ i.p.; FC 25 = Fração rica em casearinas 25 mg kg⁻¹ i.p.; DZP = diazepam 2 mg kg⁻¹ i.p.

O labirinto em cruz elevado é um modelo experimental utilizado para pesquisar a modulação do estado de ansiedade e da atividade exploratória de animais. O teste é baseado na aversão natural que os roedores apresentam por espaços abertos. Dessa maneira substâncias ansiolíticas, como o diazepam, aumentam a frequência e a duração das entradas nos braços abertos do labirinto (BOURIN et al., 2007).

Os resultados demonstram que a fração rica em casearinas (FC) diminuiu em 40,9, 38,1, 60,3 e 75,4% o número de entradas nos braços abertos (NEBA) em relação ao diazepam ($p<0,05$), respectivamente com todas as doses testadas (Ilustração 2a). Entretanto, se observado o tempo de permanência no braço aberto (TPBA), fica clara a influência pungente das maiores doses da fração (FC 10 e FC 25) no padrão comportamental dos animais, quando comparado com o grupo que recebeu o diazepam (Ilustração 2b). Em relação à atividade da fração no número total de entradas nos braços do labirinto (Ilustração 2c), é observada uma relação direta com o número total de cruzamentos no campo aberto (Ilustração 1a) corroborando a existência de uma possível influência das casearinas na redução da atividade locomotora espontânea (ALE) dos animais comparativamente aos grupos controle negativo (DMSO 4%) e diazepam (DZP). Dessa maneira, os resultados ratificam a ação da fração rica por meio da diminuição da atividade exploratória dos camundongos quando correlacionado ao composto ansiolítico de referência e ao veículo utilizado.

Ilustração 2. Efeitos da fração rica em caseínas (FC) em camundongos no teste do labirinto em cruz elevado.



Efeitos da fração rica em caseínas (FC) no teste do labirinto em cruz elevado. Os valores foram expressos como a média \pm E.P.M. sobre o número de entradas nos braços abertos – NEBA (a), tempo de permanência nos braços abertos em segundos – TPBA (b) e número total de entradas nos braços (c) dos animais utilizados no experimento (n=9 por grupo). ^ap<0,05 comparado ao veículo (DMSO 4%) (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste). ^bp<0,001 (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste), quando comparado ao grupo diazepam. FC 2,5 = Fração rica em caseínas 2,5 mg kg⁻¹ i.p.; FC 5 = Fração rica em caseínas 5 mg kg⁻¹ i.p.; FC 10 = Fração rica em caseínas 10 mg kg⁻¹ i.p.; FC 25 = Fração rica em caseínas 25 mg kg⁻¹ i.p.; DZP = diazepam 2 mg kg⁻¹ i.p.

O teste do *rota rod* permite avaliar o possível efeito sedativo das casearinas nas mesmas doses utilizadas nos testes anteriores. A FC apresentou em todas as doses um aumento significativo ($p < 0,05$) no tempo de permanência na barra giratória em relação ao diazepam e conseqüentemente uma diminuição no número de quedas o que indica que a fração não possui efeito sedativo e miorelaxante semelhante aos compostos ansiolíticos como é o caso do diazepam (Tabela 2).

Tabela 2. Efeitos da fração rica em casearinas (FC) no teste do *rota rod*.

Grupos	Número de quedas	Tempo de permanência na barra giratória (s)
VEÍCULO	0,22 ± 0,14	179 ± 0,66
DZP	1,44 ± 0,38 ^a	161,3 ± 7,7 ^a
FC 2,5	0,33 ± 0,16 ^b	177,4 ± 1,3 ^b
FC 5	0,33 ± 0,23 ^b	177,8 ± 1,61 ^b
FC 10	0,33 ± 0,16 ^b	178 ± 1,01 ^b
FC 25	0,75 ± 0,25 ^b	174,6 ± 1,93 ^b

Os valores representam a média ± E.P.M. do número de quedas e do tempo de permanência sobre a barra giratória dos animais utilizados no experimento (n = 9 por grupo). ^a $p < 0,05$, quando comparado ao grupo veículo e ^b $p < 0,05$, quando comparado ao grupo diazepam (ANOVA e teste *t*-Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste). FC 2,5 = Fração rica em casearinas 2,5 mg kg⁻¹ i.p.; FC 5 = Fração rica em casearinas 5 mg kg⁻¹ i.p.; FC 10 = Fração rica em casearinas 10 mg kg⁻¹ i.p.; FC 25 = Fração rica em casearinas 25 mg kg⁻¹ i.p.; DZP = diazepam 2 mg kg⁻¹ i.p.

5.4 DISCUSSÃO

A *Casearia sylvestris* é uma planta medicinal brasileira de ocorrência típica nos biomas do cerrado e mata atlântica. As casearinas, clerodanos diterpenos oxigenados derivados do isopreno, são os metabólitos secundários bioativos majoritários das folhas da *C. sylvestris*, espécie pertencente à família Salicaceae com vasta aplicação na medicina tradicional. Vários estudos já demonstraram a atividade biológica das casearinas em

diferentes protocolos experimentais validando em muitos casos o conhecimento empírico obtido em levantamentos etnofarmacológicos. Entretanto, existem poucos relatos sobre os efeitos das casearinas no sistema nervoso central e no perfil cognitivo-comportamental de animais. Neste estudo foi realizada uma avaliação mediante os testes do campo aberto, labirinto em cruz elevado e *rota rod* e determinado que a fração rica em casearinas diminui a atividade locomotora espontânea dos animais sem produzir sedação (BORGES et al., 2000; OBERLIES et al., 2002; CARVALHO et al., 2009; FERREIRA et al., 2011).

Previamente à realização dos testes comportamentais, durante o tratamento com a fração rica em casearinas, os animais eram avaliados por meio de um *screening* hipocrático 30 minutos após a administração da fração rica em casearinas (FC). Foi realizado um acompanhamento visando quantificar alterações na aparência geral e irritabilidade dos animais, assim como na coordenação motora, tônus muscular e reflexos (resposta ao aperto da cauda, reflexos de endireitamento, auricular e corneal). Foi observado que na maior dose (FC 25) ocorreu diarreia, discreta perda de peso e morte de um dos animais (Tabela 1). Essa mesma dose causou diminuição na atividade locomotora e exploratória dos animais nos testes comportamentais (Ilustrações 1 e 2) havendo uma possível influência da diarreia ao debilitar os animais por desidratação (SILVA, 2002).

Os testes comportamentais fornecem evidências, de modo implícito ou explícito, da forma como determinadas substâncias alteram o estado emocional de animais. O comportamento exploratório e o padrão de locomoção são fatores diretamente relacionados com o estado de ansiedade das cobaias, o que por sua vez, pode ser o resultado de modificações neuroquímicas ou de lesões no sistema nervoso central havendo, portanto a possibilidade de associar modificações comportamentais com exposições neurotóxicas à fração rica em casearinas (STEINBERG, 1987; LISTER, 1990; BELLINGER, 2001; VIAUDELMON, et al., 2011).

O teste do campo aberto é utilizado para verificar o nível de ansiedade dos animais em função do número de quadrantes percorridos e da quantidade de *rearings* (comportamento exploratório) e *groomings* (imobilidade ao executar auto-limpeza) (ARCHER 1973; KOMOROWSKA; PISULA, 2003; MATAQUEIRO et al., 2004; NEUMANN et al., 2011). A fração rica em casearinas demonstrou efeito significativo em todas as doses ao promover a redução do número de cruzamentos em relação aos grupos que receberam apenas DMSO 4% e diazepam principalmente na dose de 25 mg kg⁻¹ (Ilustração 1a). Juntamente com esse resultado houve a redução no número de *rearings* (p<0,05) (Ilustração 1c). Dessa maneira, apenas com os resultados do campo aberto, pode ser comprovado o potencial da fração rica

em diminuir o comportamento exploratório dos animais e sua atividade locomotora espontânea.

O labirinto em cruz elevado consiste em um modelo de ansiedade mais específico que o campo aberto, no qual drogas ansiolíticas diminuem a refutação que o animal apresenta pelos braços abertos do aparelho, comportamento condicionado pelo medo ou estresse. Portanto, o nível de ansiedade é expresso pela frequência de entradas e pelo tempo gasto no ambiente aversivo (RODGERS et al., 1995; JARDIM et al., 1999; CAROLA et al., 2002). Os resultados demonstram que todas as doses da FC diminuíram o número de entradas nos braços abertos quando comparadas ao grupo diazepam (Ilustração 2a). Esse comportamento se repetiu com as maiores doses (FC 10 e FC 25) ao ser verificado o tempo de permanência nos braços abertos (Ilustração 2b). Dessa forma, pode ser averiguado que esses dois parâmetros, juntamente com o número total de entradas nos braços do labirinto, revelam mais uma vez que a FC na maior dose (25 mg kg^{-1}) diminui a atividade locomotora dos camundongos tanto em relação ao veículo como ao diazepam (Ilustração 2c). Os resultados evidenciam que a fração rica, em função da dose, pode modificar o comportamento dos animais e exercer influência sobre o SNC.

O teste do *rota rod* foi utilizado para mensurar a coordenação motora e modificações no tônus muscular dos animais após o tratamento farmacológico em função da sua permanência em uma barra giratória (SILVA et al., 2007; GOMES et al., 2010). No grupo que recebeu diazepam houve uma redução no tempo permanência na barra giratória e um conseqüente aumento no número de quedas comparado com o controle com DMSO 4% (Tabela 2) devido ao relaxamento muscular peculiar aos benzodiazepínicos. Todavia, a fração rica em casearinas (FC) não provocou déficit significativo na coordenação motora e nem depressão no SNC dos animais testados. Esses resultados indicam que a FC reduz a atividade locomotora espontânea sem provocar prejuízo motor aos animais.

Poucos trabalhos atribuem ação neurológica à *C. sylvestris* e aos seus constituintes. Silva e colaboradores (2006) descreveram que o extrato aquoso da guaçatonga (20 mg kg^{-1} v.o. durante 75 dias) é capaz de inibir enzimas típicas do SNC como a NTPDase, 5'-nucleotidase, Na^+/K^+ -ATPase e a acetilcolinesterase (AChE) o que demonstra o potencial da planta de modular enzimas neuronais e eventualmente causar modificações comportamentais. Em outro estudo Rodrigues e colaboradores (2008) relatam que povos quilombolas utilizam o decocto das folhas da *C. sylvestris* para o tratamento da insônia principalmente em crianças e idosos. Essa informação é confrontada por nossos resultados, visto que não houve

comprovação de ação sedativa ou hipnótica da fração rica em casearinas no teste do *rota rod* (Tabela 2).

Dessa maneira, em virtude da oposição entre os resultados da fração rica em casearinas (FC) com aqueles obtidos com o diazepam, benzodiazepínico com atividade ansiolítica caracterizado por aumentar a ação do ácido γ -aminobutírico (GABA) sobre os receptores GABA_A, pode ser proposto outro mecanismo responsável pela redução da atividade locomotora espontânea independente da inibição neuronal derivada do sistema gabaérgico (LILLY; TIETZE, 2000). Essa característica da FC pode ser decorrente da atividade sobre o sistema dopaminérgico. Schindler e Carmona (2002) relataram que a cocaína e outros inibidores da recaptação da dopamina aumentam a ALE de roedores. Em contrapartida, antagonistas D1 diminuem essa atividade tal como a FC. Fundamentado nesse estudo é possível sugerir que a FC antagoniza os efeitos do sistema dopaminérgico reduzindo assim a atividade locomotora espontânea nos animais. Entretanto, essa é uma abordagem que necessita de maiores estudos.

5.5 CONCLUSÃO

Diante do que foi exposto é possível inferir que a FC não modificou os reflexos dos animais em nenhuma das doses testadas, porém manifesta sinais de toxicidade, como diarreia e perda de peso, e provoca redução na atividade locomotora espontânea e exploratória dos animais na dose de 25 mg kg⁻¹. As alterações no comportamento animal não devem ser decorrentes do sistema gabaérgico, sugerindo que esse efeito pode ser decorrente da interação das casearinas com outras vias neuronais como, por exemplo, o sistema dopaminérgico, havendo a necessidade de novas investigações neuroquímicas *in vivo* complementares.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A.A.C.; COSTA, J.P.; CARVALHO, R.B.F.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+)-limonene epoxide and its anxiolytic-like action. **Brain Research**, v. 1448, p. 56-62, 2012.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice. A review. **Animal Behaviour**, v. 21, p. 205-35, 1973.
- BASU, N.; HEAD, J. Mammalian wildlife as complementary models in environmental neurotoxicology. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 32, p. 114-119, 2010.

BELLINGER, D.C. Future directions for neurobehavioral studies of environmental neurotoxicants. **NeuroToxicology**, v. 22, 645-656, 2001.

BORGES, M.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 127, p. 21-30, 2000.

BOURIN, M.; PETIT-DEMOULIÈRE, B.; DHONNCHADHA, B.N.; HASCOET, M. Animal models of anxiety in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 21, p. 567-574, 2007.

CARLINI, E.A., BURGOS, V. *Screening* farmacológico de ansiolíticos: metodologia laboratorial e comparação entre o diazepam e o clorobenzapam. **Revista da Associação Brasileira de Psiquiatria**, v. 1, p. 25-31, 1979.

CAROLA, V.; D'OLIMPIO, F.; BRUNAMONTI, E.; MANGIA, F.; RENZI, P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. **Behavioural Brain Research**, v. 134, p. 49-57, 2002.

CARVALHO, P.R.F.; FORLAN, M.; YOUNG, M.C.M.; KINGSTON, D.G.I.; BOLZANI, V.S. Acetylated DNA-damaging clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1659-1662, 1998.

CARVALHO, E.S.; SANTOS, A.G.; CAVALHEIRO, A.J.; Identificação de diterpenos clerodânicos em diferentes órgãos de *Casearia sylvestris* Sw. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 277-284, 2009.

FERREIRA, P.M.P.; SANTOS, A.G.; TININIS, A.G.; COSTA, P.M.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; PESSOA, C. Casearin X exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, p. 497-504, 2010.

FERREIRA, P.M.P.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; BARROS, F.W.A.; MARTINS, A.M.A.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; SANTOS, A.G.; PESSOA, C. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, p. 1373-1384, 2011.

GOMES, P.B.; FEITOSA, M.L.; SILVA, M.I.G.; NORONHA, E.C.; MOURA, B.A.; VENÂNCIO, E.T.; RIOS, E.R.V.; SOUSA, D.P.; VASCONCELOS, S.M.M.; FONTELES, M.M.F.; SOUSA, F.C.F. Anxiolytic-like effect of the monoterpene 1,4-cineole in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 96, p. 287-293, 2010.

ITOKAWA, H.; TOTSUKA, N.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITAKA, Y.; SCHENKEL, E.P.; MOTIDOME, M. New antitumor principles, casearins A-F from *C. sylvestris* Sw (Flacourtiaceae). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, p. 3384-3387, 1990.

JARDIM, M.C.; NOGUEIRA, R.L.; GRAEFF, F.G.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Evaluation of the elevated T-maze as an animal model of anxiety in the mouse. **Brain Research Bulletin**, v. 48, n. 4, p. 407-411, 1999.

KOMOROWSKA, J.; PISULA, W. Does changing levels of stress affect the characteristics of grooming behavior in rats? **International Journal of Comparative Psychology**, v. 16, p. 237-246, 2003.

LILLY, S.M.; TIETZ, E.I. Chronic cocaine differentially affects diazepam's anxiolytic and anticonvulsant actions Relationship to GABA_A receptor subunit expression. **Brain Research**, v. 882, p. 138-148, 2000.

LISTER, R.G. The use of a plus maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 25, p. 180-185, 1987.

LISTER, R.G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 46, p. 321-340, 1990.

LUCIO, E.M.R.A.; ROSALEN, P.L.; SHARAPIN, N.; SOUZA BRITO, A.R.M. Avaliação toxicológica aguda e *screening* hipocrático da episiopilosina, alcaloide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 9/10, p. 23-25, 2000.

MATAQUEIRO, M.I.; D'ANGELIS, F.H.F.; DE-CAROLINI-NETO, A.; ROSSI, C.A.; QUEIROZ-NETO, A. Comparative study of the sedative and antinociceptive effects of levomepromazine, azaperone and midazolam in laboratory animals. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 3, p. 340-345, 2004.

NEUMANN, I.D.; WEGENER, G.; HOMBERG, J.R.; COHEN, H.; SLATTERY, D.A.; ZOHAR, J.; OLIVIER, J.D.A.; MATHÉ, A.A. Animal models of depression and anxiety: What do they tell us about human condition? **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, p. 1357-1375, 2011.

OBERLIES, N.H.; BURGESS, J.P.; NAVARRO, H.A.; PINOS, R.E.; FAIRCHILD, C.R.; PETERSON, R.W.; SOEJARTO, D.D.; FARNSWORTH, N.R.; KINGHORN, A.D.; WANI, M.C.; WALL, M.E. Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 2, p. 95-99, 2002.

RODGERS, R.J.; COLE, J.C.; ABOUALFA, K.; STEPHENSON, L.H. Ethopharmacological Analysis of the Effects of Putative 'Anxiogenic' Agents in the Mouse Elevated Plus-Maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 52, n. 4, p. 805-813, 1995.

RODRIGUES, E.; TABACH, R.; GALDURÓZ, J.C.F.; NEGRI, G. Plants with possible anxiolytic and/or hypnotic effects indicated by three brazilian cultures - indians, afrobrazilians, and river-dwellers. **Studies in Natural Products Chemistry Atta-ur-Rhaman**, v. 35, p. 549-595, 2008.

SANTOS, A.G.; FERREIRA, P.M.P.; VIEIRA JÚNIOR, G.M.; PEREZ, C.C.; TININIS, A.G.; SILVA, G.H.; BOLZANI, V.S.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PESSOA, C.; CAVALHEIRO, A.J. Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from

leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumour human cells. **Chemistry and Biodiversity**, v. 7, p. 205-215, 2010.

SCHINDLER, C.W.; CARMONA, G. N. Effects of dopamine agonists and antagonists on locomotor activity in male and female rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 72, p. 857-863, 2002.

SILVA, G.A.P. Diarréia-aguda: fatores de risco e manejo. **Revista de Pediatria do Ceará**, v. 3, p. 5-9, 2002.

SILVA, A.C.; BALZ, D.; DE SOUZA, J.B.D.; MORSC, V.M.; CORRÊA, M.C.; ZANETTI, G.D.; MANFRON, M.P.; SCHETINGER, M.R.C. Inhibition of NTPDase, 5-nucleotidase, Na⁺/K⁺-ATPase and acetylcholinesterase activities by subchronic treatment with *Casearia sylvestris*. **Phytomedicine**, v. 13, p. 509-514, 2006.

SILVA, M.I.G.; NETO, M.R.A.; NETO, P.F.T.; MOURA, B.A.; AMARAL, J.F.; SOUSA, D.P.; VASCONCELOS, S.M.M.; SOUSA, F.C.F. Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 88, p. 141-147, 2007.

SILVA, F.O.; SILVA, M.G.V.; FENG, D.; FREITAS, R.M. Evaluation of central nervous system effects of iso-6-cassine isolated from *Senna spectabilis* var. excels (Schrad) in mice. **Fitoterapia**, v. 82, p. 255-259, 2011.

SOUTO-MAIOR, F.N.; CARVALHO, F.L.; MORAIS, L.C.S.L.; NETTO, S.M.; SOUSA, D.P.; ALMEIDA, R.N. Anxiolytic-like effects of inhaled linalool oxide in experimental mouse anxiety models. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 100, p. 259-263, 2011.

STEINBERG, M. The use of traditional toxicologic data in assessing neurobehavioral dysfunction. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 9, p. 403-409, 1987.

VIAUD-DELMON, I.; VENAULT, P.; CHAPOUTHIER, G. Behavioral models for anxiety and multisensory integration in animals and humans. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, p. 1391-1399, 2011.

WANG, W.; ZHAO, J.; WANG, Y-H.; SMILLIE, T. A.; LI, X-C.; KHAN, I.A. Diterpenoids from *Casearia sylvestris*. **Planta Medica**, v. 75, p. 1436-1441, 2009.

ZHANG, Z-J. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. **Life Sciences**, v. 75, p. 1659-1699, 2004.

CAPÍTULO IV

6 Avaliação da atividade antioxidante e das alterações histopatológicas no sistema nervoso central de camundongos tratados com a fração rica em casearinas.

Avaliação da atividade antioxidante e das alterações histopatológicas no sistema nervoso central de camundongos tratados com a fração rica em casearinas.

ARAÚJO, E.J.F.¹; OLIVEIRA, G.A.L.¹; TOME, A.R.²; FREITAS, R.M.¹; CAVALHEIRO, A.J.³; BOLZANI, V. S.³; SILVA, D.H.S.³; PESSOA, C.⁴; FERREIRA, P.M.P.^{1,5}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí (NTF/UFPI), 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

²Faculdade de Medicina Veterinária (FAVET), Universidade Estadual do Ceará, 60.000-000, Fortaleza, Ceará, Brasil.

³Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NubbE), Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 14.800-900, Araraquara, São Paulo, Brasil.

⁴Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará (UFC), 60.430-270, Fortaleza, Ceará, Brasil.

⁵Departamento de Ciências Biológicas, Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, Universidade Federal do Piauí (CSHNB-UFPI), 64.607-670, Picos, Piauí, Brasil.

RESUMO

A *Casearia sylvestris* Swartz é uma planta medicinal cujas propriedades farmacológicas são atribuídas a diterpenos clerodânicos presentes sobretudo nas suas folhas, conhecidos como casearinas. Este estudo visa avaliar a atividade antioxidante da fração rica em casearinas (FC) no sistema nervoso central de roedores e verificar as possíveis alterações histopatológicas provocadas no tecido cerebral e no tecido hepático dos animais após 7 dias de tratamento com a FC nas doses de 2,5 mg kg⁻¹ (FC 2,5), 5 mg kg⁻¹ (FC 5), 10 mg kg⁻¹ (FC 10) e 25 mg kg⁻¹ (FC 25). Os resultados demonstram que houve elevação significativa nos níveis de TBARS e nitrito ($p < 0,05$) após o tratamento. Nos grupos FC 5 e FC 10 houve redução dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) no hipocampo. Esse padrão se manteve no corpo estriado nos grupos FC 2,5 e FC 5. Houve um aumento gradual na atividade da catalase no hipocampo dos roedores à medida que se elevou a concentração da FC. Nos cortes histológicos foram visualizados vacuolização nuclear, núcleos picnóticos e hiperchromasia em neurônios do hipocampo nos grupos FC 2,5 e FC 5 com desorganização axonal no corpo estriado nesses mesmos grupos. Ocorreu degeneração hidrópica e congestão vascular no fígado de camundongos tratados com FC 2,5, FC 25 e DMSO 4% e necrose hepática no grupo FC 5. Portanto, a FC não apresentou atividade antioxidante *in vivo* equivalente à do ácido ascórbico em nenhum dos protocolos experimentais reproduzidos. Além disso, as menores doses se destacaram devido à maior ocorrência de lesões no tecido nervoso e no tecido hepático, principalmente com a dose de 5 mg kg⁻¹. Esses achados sugerem que a FC tem ação

neurotóxica indicando a necessidade de cautela na utilização de preparações à base da *C. sylvestris* para fins medicinais.

Palavras-chave: Antioxidante; *Casearia*; Histologia.

ABSTRACT: Evaluation of the antioxidant activity and histopathological changes on the central nervous system of mice treated with fraction rich in casearins.

Casearia sylvestris Swartz is a medicinal plant whose pharmacological properties are attributed to the clerodane diterpenes known as casearins especially found in its leaves. This study aims to evaluate the antioxidant activity of a fraction rich in casearins (FC) on the central nervous system of mice and evaluate histopathological changes in the brain and liver tissues of animals after 7 days of treatment with FC [2.5 mg kg⁻¹ (2.5 FC), 5 mg kg⁻¹ (FC 5), 10 mg kg⁻¹ (FC 10) and 25 mg kg⁻¹ (FC 25)]. Outcomes demonstrate that there was a significant elevation in levels of nitrite and TBARS (p<0.05) after treatment. In groups FC 5 and FC 10 decreased levels of reduced glutathione (GSH) levels in hippocampus were noticed. This pattern remained in the striatum of the groups FC 2.5 and FC 5. Dose-dependent increasing in catalase activity in the hippocampus of rodents was found. Histological analyzes detected nuclear vacuolization, pyknotic nuclei and hyperchromasia in hippocampal neurons and axonal disorganization in the striatum in FC 2.5 and FC 5 groups. There was hydropic degeneration and vascular congestion in the liver of mice treated with FC 2.5, FC 25 and 4% DMSO and hepatic necrosis in FC 5-treated group. FC showed no *in vivo* antioxidant activity equivalent to that of ascorbic acid. Moreover, lower doses caused injuries to the nervous and hepatic tissues, particularly at the dose of 5 mg kg⁻¹. These findings suggest that FC probably has neurotoxic action, indicating wariness to use it in preparations obtained from *C. sylvestris* for medicinal purposes.

Keywords: Antioxidant; *Casearia*; Histology.

6.1 INTRODUÇÃO

A *Casearia sylvestris* Swartz é uma planta medicinal amplamente distribuída no território brasileiro regionalmente conhecida como guaçatonga, café-do-diabo ou cafeeiro-domato. A espécie é dotada de atividade cicatrizante, antimicrobiana, antiulcerogênica e antitumoral sendo utilizada popularmente no tratamento de envenenamentos ofídicos (FERREIRA et al., 2011). As atividades farmacológicas da planta são atribuídas a diterpenos clerodânicos presentes, sobretudo nas suas folhas. Essas entidades químicas são conhecidas como casearinas. Atualmente já foram elucidadas 23 variações estruturais das casearinas com destaque para a casearina X, recentemente testada contra diferentes linhagens de células tumorais (FERREIRA et al., 2010).

Mosaddick e colaboradores (2004) demonstraram que várias espécies do gênero *Casearia* são dotadas de atividade antioxidante *in vitro* sem haver, porém, referências na literatura dessa propriedade para a *C. sylvestris* em modelos *in vivo*. Além disso, o fato de produtos derivados da guaçatonga possuírem efeitos citotóxicos estimula a realização de outros estudos para averiguação da sua atividade tóxica sobre células e tecidos normais, como por exemplo, no tecido cerebral (SILVA et al., 2008).

O estresse oxidativo corresponde ao dano celular ocasionado pelo acúmulo de radicais livres ou espécies reativas no meio biológico. Este processo é decorrente da exposição aumentada a agentes com potencial oxidativo ou a uma diminuição nas defesas antioxidantes endógenas, resultando em morte celular, necroses teciduais, envelhecimento precoce ou manifestação de doenças como, por exemplo, o mal de Alzheimer e da doença de Parkinson (ALAM et al., 2012; KUNWAR; PRIYADARSINI, 2011).

As doenças neurodegenerativas podem ser oriundas da ação de substâncias reativas sobre o tecido neuronal tais como o radical livre hidroxila ($\bullet\text{OH}$), hidroperoxila ($\text{HO}_2\bullet$) e o íon nitrito, que em excesso causam prejuízos à homeostase do sistema nervoso por meio da oxidação de lipídios e apoptose neuronais. Alguns estudos presentes na literatura têm relatado que uma vez instalado o quadro neurodegenerativo ocorre uma tendência ao aumento do conteúdo de radicais livres e conseqüentemente dos níveis de peroxidação lipídica em função do aumento da atividade de fosfolipases de membrana. Ou seja, o estresse oxidativo tanto pode deflagrar o distúrbio neuronal como agravá-lo, uma vez instituído (FREITAS, 2009; PALA; GURKAN, 2008; CAMPÊLO et al., 2011).

Em virtude dessa relação com a gênese e evolução de doenças degenerativas muitos estudos são realizados visando caracterizar as propriedades antioxidantes de derivados de

plantas medicinais, sobretudo para evitar lesões no sistema nervoso central (SNC). Tomé e colaboradores (2010) demonstraram que o α -tocoferol, vitamina encontrada em óleos vegetais, possui a capacidade de reduzir o estresse oxidativo durante crises epilépticas em modelos de convulsões induzidas por pilocarpina em ratos promovendo uma redução do nível de peroxidação lipídica e de nitrito bem como o aumento da atividade de enzimas protetoras no hipocampo dos roedores sem lhes causar danos histológicos.

Com base nesses pressupostos, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antioxidante da fração rica em casearinas no sistema nervoso central de roedores e verificar as possíveis alterações histopatológicas provocadas pela fração no tecido cerebral e no tecido hepático dos animais.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos *Mus musculus* linhagem Swiss, com 2 meses de idade e peso entre 25 a 30 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí – UFPI. Os animais receberam água e dieta (Purina®) *ad libitum* e foram mantidos sob condições monitoradas de iluminação (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura (25 ± 1 °C). Os protocolos experimentais e procedimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da UFPI (n° 0102/2011).

Obtenção da fração rica em casearinas (FC)

Folhas da *Casearia sylvestris* Swartz coletadas no Parque Estadual Carlos Botelho (São Miguel Arcaño, São Paulo) por colaboradores do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho foram utilizadas na obtenção de um extrato a partir do material vegetal seco em estufa a 40 °C durante sete dias, acompanhado de fragmentação em moinho de facas. As folhas secas e moídas de *C. sylvestris* (20 kg) foram extraídas com cerca de 200 L de etanol em extrator de aço inox (capacidade 300 L) com sistemas de circulação de solvente e de aquecimento, à 40 °C por aproximadamente 24 h. O extrato líquido concentrado sob pressão reduzida seguidamente seco em capela e dessecador com sílica gel sob vácuo, forneceu o extrato seco. Parte deste composto (473,6 g) foi fracionado através de uma extração em fase sólida (EFS) utilizando carvão ativo/sílica gel 60-200 μ m

(1:1, m/m), como fase estacionária, e os solventes hexano/acetato de etila (95:5, v/v), acetato de etila e metanol como fase móvel, fornecendo 3 frações respectivamente.

Os diterpenos clerodânicos presentes nas folhas da guaçatonga foram identificados no Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais - NuBBE, do Instituto de Química da UNESP (Araraquara, São Paulo). Análises utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C revelaram que a fração rica em casearinas (FC) empregada nesse estudo corresponde à segunda fração (EFS2). A FC é caracterizada por possuir um percentual de casearinas totais de 56,5 % (mg g^{-1}), sendo a caseargrevina F e a casearina X as moléculas mais presentes (teor de 9,9 e 14,2 %, respectivamente). Exsiccatas dos exemplares coletados foram depositadas no herbário Maria Eneida P. Kaufmann do Instituto Botânico do Estado de São Paulo com os seguintes registros: AGS04, AGS05, AGS06, AGS13 e AGS19.

Tratamento com drogas, preparo de homogenatos e cortes histológicos

A fração rica em casearinas (FC) foi previamente solubilizada com DMSO 4% em água purificada e posteriormente administrada via intraperitoneal nas doses 2,5, 5, 10 e 25 mg kg^{-1} durante 7 dias ($n=9$). Decorridos 30 minutos após a administração da última dose dos tratamentos foram realizados os experimentos. Os grupos para controle negativo e positivo foram tratados respectivamente com DMSO 4% dissolvido em água purificada 10 mL kg^{-1} , i.p., e com ácido ascórbico (AA) na dose 250 mg kg^{-1} via i.p. (Sigma Química, EUA).

Para a avaliação antioxidante, 7 dos animais tratados para cada grupo (FC 2,5, FC 5, FC 10, FC 25, DMSO e AA) foram decapitados sem anestesia, tiveram seus cérebros removidos e dissecados sobre gelo, os quais foram utilizados no preparo de homogenatos cerebrais a 10% (p/v) com tampão específico dependente da análise realizada. Foi efetuada previamente a aferição da concentração proteica dos homogenatos (LOWRY et al., 1951), seguido da determinação dos níveis de peroxidação lipídica, do íon nitrito e das enzimas glutathiona reduzida (GSH) e catalase (CAT) no hipocampo e no corpo estriado dos roedores.

Para a análise histopatológica, os cérebros dos 2 animais restante de cada um dos grupos tratados foram fixados em formalina a 10% por 72 horas. Obteve-se inicialmente cortes sagitais de 1 mm a partir de uma incisão inicial próxima aos corpos mamilares dos cérebros. A partir deles, foram realizadas secções de 50 μm , coradas com hematoxilina-eosina (HE) e analisadas com auxílio de um microscópio óptico em um aumento de 40. As áreas

cerebrais foram observadas e classificadas de acordo com as descrições do Atlas de Paxinos e Watson (1986).

Determinação do nível de peroxidação lipídica e do íon nitrito no hipocampo e no corpo estriado de camundongos

A peroxidação lipídica foi avaliada por meio da determinação dos níveis de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) conforme o método de Draper e Hadley (1990). Aos homogenatos cerebrais 10% (p/v) em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4, de cada área (250 µL), foram acrescentados 500 µL de ácido tricloroacético a 10% e 500 µL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,67%. Em seguida foram levados ao banho-maria a 37°C por 60 minutos, adicionados 500 µL de n-butanol e centrifugado a 1200 rpm durante 5 minutos. Por fim a fase butanólica foi analisada espectrofotometricamente a 535 nm em luz visível. Os resultados foram expressos em nmol de malonaldeído (MDA)/g de homogenato.

A determinação do conteúdo de nitrito nos homogenatos 10% (p/v) em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4, foi fundamentada na reação Griess (GREEN et al.,1981). Resumidamente, 500 µL da amostra foram incubados com 500 µL do reagente de Griess (1% de sulfanilamida em H₃PO₄ 1%, 0,1% de cloridrato de N-(1-naftil)etilenodiamina, 1% de H₃PO₄ e água destilada, 1:1:1:1, v/v/v/v) à temperatura ambiente durante 10 minutos seguido da leitura das absorbâncias a 550 nm. Os resultados foram expressos em µM.

Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e da atividade da catalase (CAT) no hipocampo e no corpo estriado de camundongos

A determinação da concentração da GSH foi realizada mediante a reação do reagente de Ellman, o ácido 2-nitrobenzoico (DTNB), com o tiol livre originando um dissulfeto misto mais ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (SEDLAK; LINSAY, 1988). O homogenato 10 % (p/v) foi preparado em EDTA 0,02 M. Para a reação foi necessário centrifugar o homogenato a 3000 rpm por 15 minutos, em seguida foi retirado 400 µL do sobrenadante e acrescentado 800 µL de tampão Tris-HCl 0,4 M, pH 8,9 e 20 µL de DTNB 0,01M. Após 1 minuto da reação foi realizada a leitura espectrofotométrica a 412nm. Os resultados expressos em U µg⁻¹ de proteína

A atividade da CAT foi baseada na medida da velocidade de produção de O₂ e H₂O à proporção que o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) utilizado como substrato era hidrolisado,

conforme preconizado por Chance e Maehly (1955). Foi preparado o meio reacional com H₂O₂ (18 mL), Tampão Tris-HCl 1M, EDTA 5 mM pH 8,0 (1,0 mL) e H₂O Milli-Q (0,8 mL). Posteriormente foi colocado em cubeta de quartzo 940 µL do meio de reação acrescido de 60 µL do homogenato de cada área a 10% preparado em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4 seguido de leitura em espectrofotômetro a 230 nm durante 6 minutos a temperatura de 37°C. Os resultados expressos em U µg⁻¹ de proteína.

Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.). As diferenças entre os grupos foram determinadas por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo teste *t*-Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste por meio do *software* *GraphPad Prism*® (versão 5.0). Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

6.3 RESULTADOS

A tabela 1 ilustra respectivamente os valores obtidos na determinação do conteúdo de peroxidação lipídica e de nitrito no hipocampo e no corpo estriado de camundongos adultos tratados com a fração rica em casearinas (FC), com o veículo (DMSO 4%) e com o ácido ascórbico (AA), antioxidante de referência.

Tabela 1. Determinação dos níveis de peroxidação lipídica e de nitrito no hipocampo e no corpo estriado de camundongos.

Grupos	TBARS		Nitrito	
	(nmol de MDA/g homogenato)		(µM)	
	Hipocampo	Corpo Estriado	Hipocampo	Corpo Estriado
FC 2,5	59,87 ± 1,47 ^{a,b}	62,05 ± 1,27 ^b	26,23 ± 2,72 ^{a,b}	26,33 ± 1,33 ^{a,b}
FC 5	57,44 ± 1,44 ^{a,b}	53,53 ± 1,58 ^{a,b}	27,3 ± 0,43 ^{a,b}	25,41 ± 0,71 ^{a,b}
FC 10	60,71 ± 0,71 ^{a,b}	60,84 ± 0,64 ^b	30,27 ± 2,12 ^{a,b}	34,34 ± 2,39 ^{a,b}
FC 25	69,81 ± 1,71 ^b	66,16 ± 1,81 ^b	26,6 ± 1,35 ^{a,b}	27,51 ± 1,41 ^{a,b}
Veículo	68,66 ± 1,38 ^b	62,89 ± 1,86 ^b	11,39 ± 0,59	11,26 ± 0,39
AA	43,14 ± 1,92 ^a	47,57 ± 1,68 ^a	7,86 ± 0,39	8,14 ± 0,26

Camundongos machos (25-30 g, 2 meses de idade) tratados por via intraperitoneal com a fração rica em casearinas nas doses 2,5 (FC 2,5), 5 (FC 5), 10 (FC 10) e 25 mg kg⁻¹ (FC 25). Controles tratados com DMSO 4% dissolvido em água purificada (veículo 10 mL kg⁻¹, i.p.) e ácido ascórbico (AA 250 mg kg⁻¹, i.p.), n=7. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. As diferenças estatísticas entre os grupos foram determinados por Análise de Variância (ANOVA). ^ap<0,05 comparado com o grupo controle negativo com DMSO 4% (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste); ^bp<0,05 comparado com o grupo controle positivo com AA (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

A tabela 2 demonstra a atividade da glutathiona reduzida e da catalase no hipocampo e no corpo estriado de camundongos adultos tratados com a fração rica em casearinas (FC), com o veículo (DMSO 4%) e com o ácido ascórbico.

Tabela 2. Determinação dos níveis de glutathiona reduzida e da atividade da catalase no hipocampo e no corpo estriado de camundongos.

Grupos	Glutathiona Reduzida (U µg de proteína ⁻¹)		Catalase (U µg de proteína ⁻¹)	
	Hipocampo	Corpo Estriado	Hipocampo	Corpo Estriado
FC 2,5	1,35 ± 0,28	0,83 ± 0,15 ^{a,b}	4,26 ± 0,62 ^{a,b}	5,68 ± 0,93 ^{a,b}
FC 5	0,66 ± 0,06 ^{a,b}	1,02 ± 0,09 ^{a,b}	6,16 ± 0,36 ^{a,b}	6,32 ± 0,52 ^{a,b}
FC 10	0,72 ± 0,05 ^{a,b}	1,32 ± 0,11 ^b	8,42 ± 0,74 ^b	8,36 ± 0,72 ^a
FC 25	1,35 ± 0,22	1,25 ± 0,12 ^b	9,37 ± 0,35 ^b	8,91 ± 0,62 ^b
Veículo	1,58 ± 0,16	1,54 ± 0,02	9,88 ± 0,70 ^b	10,88 ± 0,88
AA	1,17 ± 0,07	1,82 ± 0,02	13,58 ± 0,39 ^a	13,11 ± 0,41

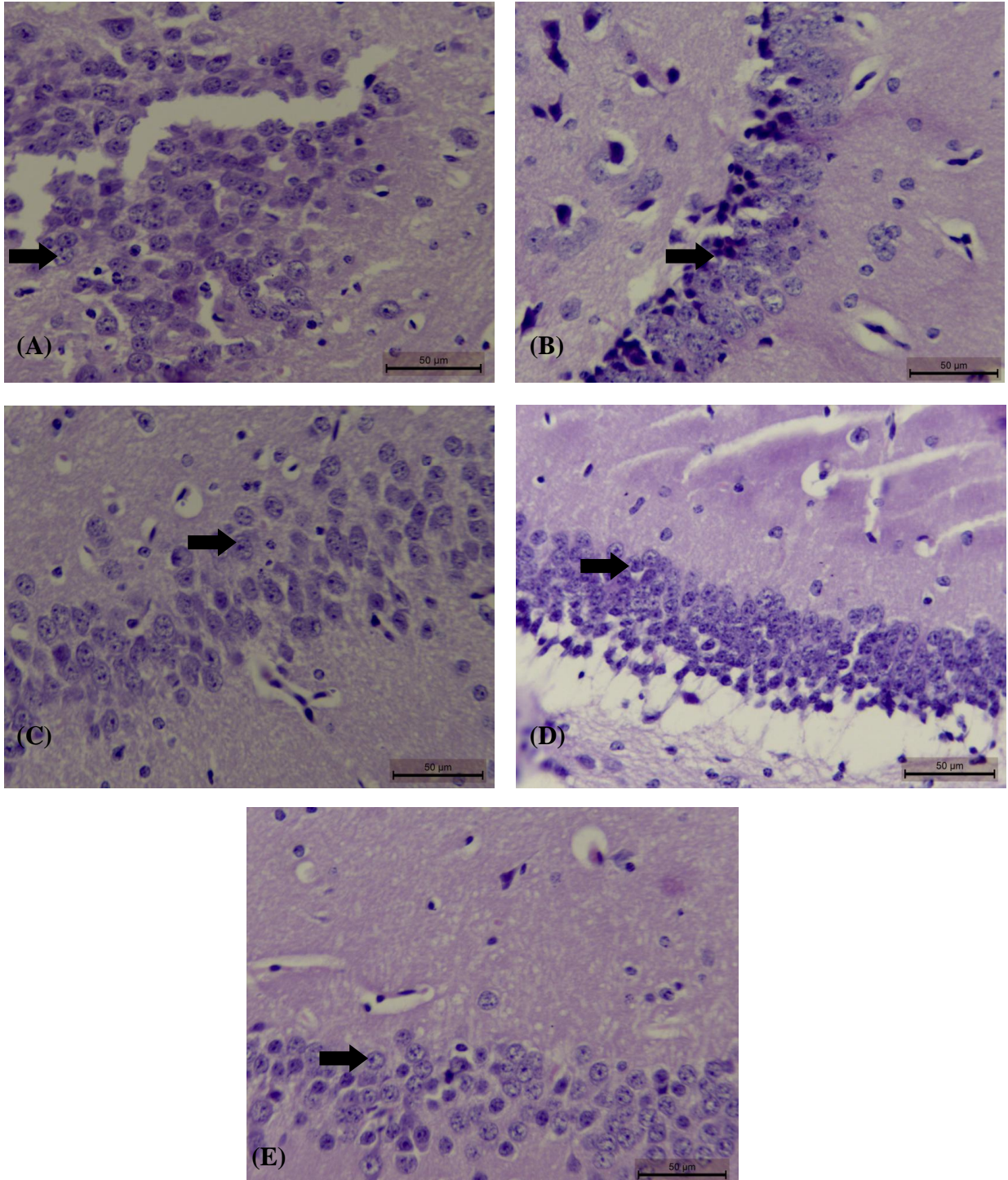
Camundongos machos (25-30 g, 2 meses de idade) tratados por via intraperitoneal com a fração rica em casearinas nas doses 2,5 (FC 2,5), 5 (FC 5), 10 (FC 10) e 25 mg kg⁻¹ (FC 25). Controles tratados com DMSO 4% dissolvido em água purificada (veículo 10 mL kg⁻¹, i.p.) e ácido ascórbico (AA 250 mg kg⁻¹, i.p.), n=7. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. As diferenças estatísticas entre os grupos foram determinados por Análise de Variância (ANOVA). ^ap<0,05 comparado com o grupo controle negativo com DMSO 4% (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste); ^bp<0,05 comparado com o grupo controle positivo com AA (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

A ilustração 1 apresenta as alterações histopatológicas no hipocampo de camundongos adultos com presença de vacuolização nuclear, núcleos picnóticos e hiperchromasia do material nuclear nas menores doses da fração rica (FC 2,5 e FC 5). Houve ainda discreta congestão vascular nos animais que receberam apenas o veículo (DMSO 4%) e ausência de alterações patológicas nos demais grupos com presença de neurônios homogêneos e nucléolos centrais.

A ilustração 2 mostra as alterações histopatológicas no corpo estriado de camundongos adultos com a presença de desorganização dos axônios nas menores doses (FC 2,5 e FC 5) e de estrias características do tecido nos demais tratamentos.

A ilustração 3 exibe a presença de degeneração hidrópica e congestão vascular no tecido hepático dos camundongos que receberam o DMSO 4% e dos grupos FC 2,5, FC 5 e FC 25 tratados com fração rica em casearinas havendo também sinais de necrose no grupo FC 5. Naqueles animais pertencentes ao grupo FC 10 houve manutenção da integridade celular do tecido hepático.

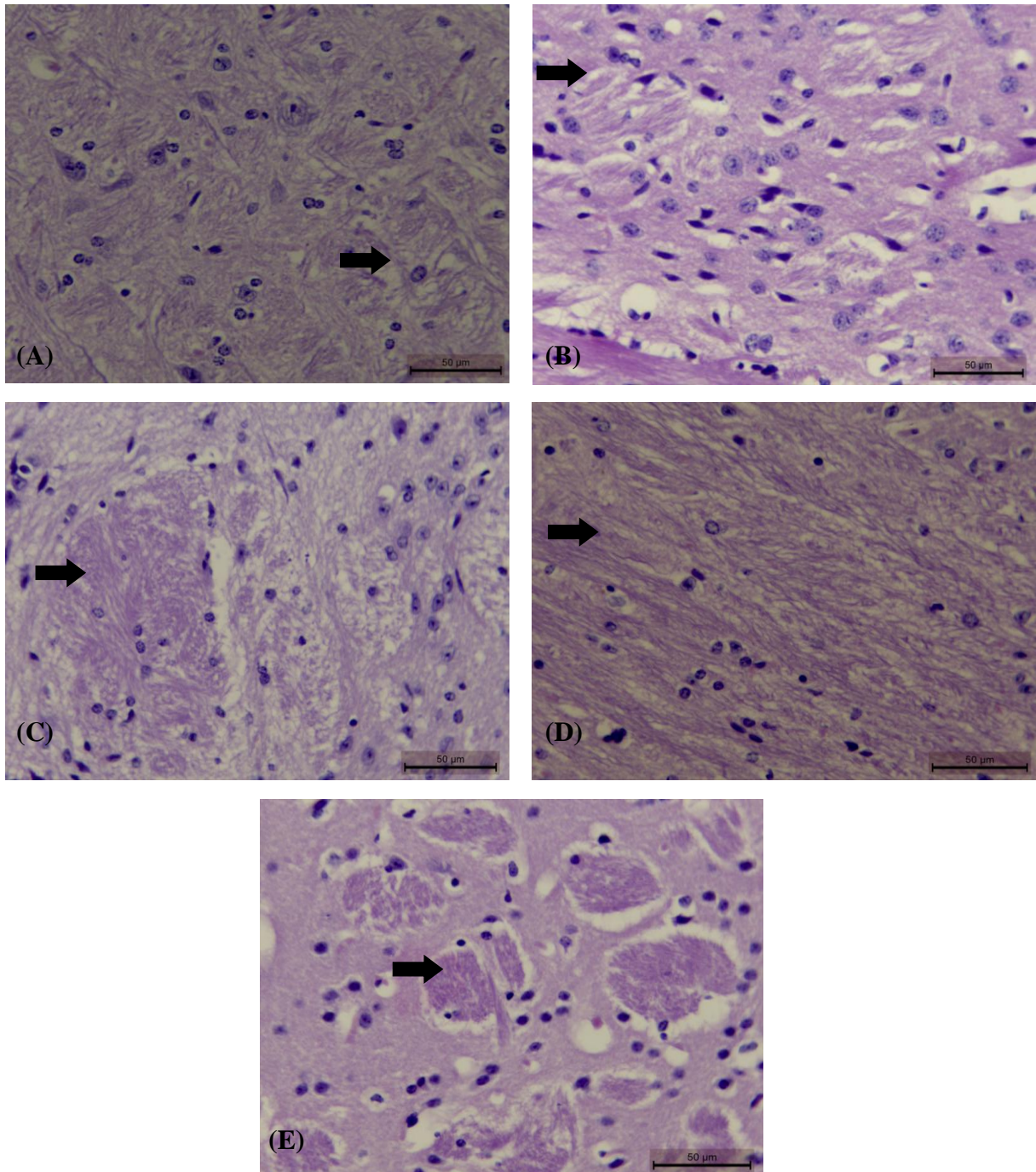
Ilustração 1. Avaliação do tratamento com fração rica em caseínas (FC) no hipocampo de camundongos Swiss adultos (X40) nas doses $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$ (A), 5 mg kg^{-1} (B), 10 mg kg^{-1} (C), 25 mg kg^{-1} (D) e DMSO 4% 10 mL kg^{-1} (E).



A e B - Presença de vacuolização nuclear, núcleos picnóticos e hiperchromasia do material nuclear em neurônios do hipocampo de camundongos adultos (setas pretas) tratados respectivamente com FC 2,5 e FC 5, i.p., durante 7 dias (Hematoxilina-Eosina X40. Barra de Escala = $50 \mu\text{m}$). **C e D** - Presença de neurônios homogêneos e nucléolos centrais no hipocampo de camundongos adultos (setas pretas) tratados respectivamente com FC 10 e FC

25, i.p., durante 7 dias (Hematoxilina-Eosina X40. Barra de Escala = 50 μm). **E** - Discreta congestão vascular no hipocampo de camundongos adultos (seta preta) tratados com DMSO 4% dissolvido em água purificada i.p. (Hematoxilina-Eosina X40. Barra de Escala = 50 μm).

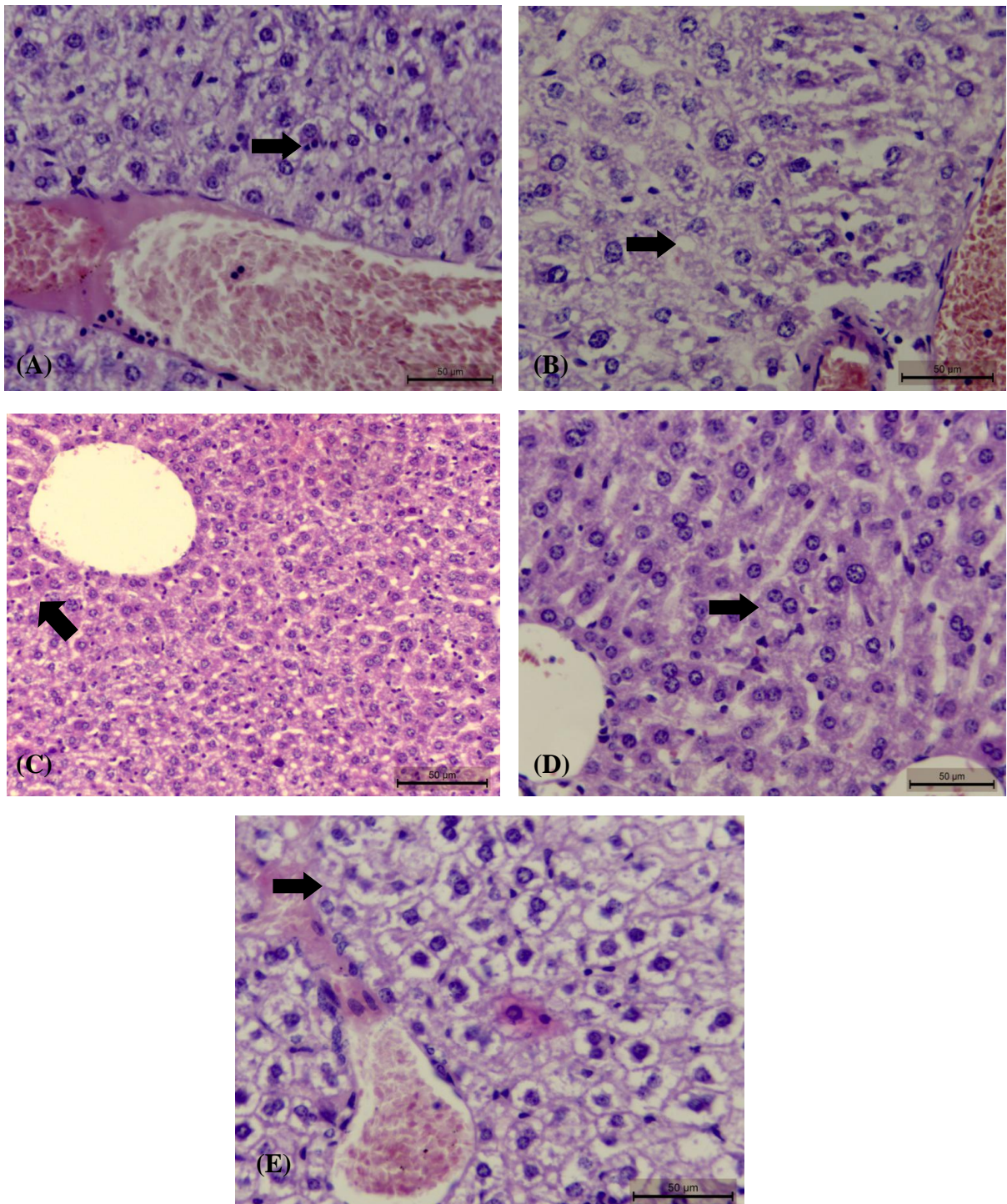
Ilustração 2. Avaliação do tratamento com fração rica em caseínas (FC) no corpo estriado de camundongos Swiss adultos (X40) nas doses 2,5 mg kg^{-1} (A), 5 mg kg^{-1} (B), 10 mg kg^{-1} (C), 25 mg kg^{-1} (D) e DMSO 4% 10 mL kg^{-1} (E).



A - Presença de desorganização axonal no corpo estriado de camundongos adultos (seta preta) tratados com FC 2,5, i.p., durante 7 dias (Hematoxilina-Eosina X40. Barra de Escala = 50

μm). **B** - Presença de desorganização axonal com vacuolizações no corpo estriado de camundongos adultos (seta preta) tratados com FC 5, i.p., durante 7 dias (Hematoxilina-Eosina X40. Barra de Escala = 50 μm). **C, D e E** - Presença estriações típicas (setas pretas) no corpo estriado de camundongos adultos tratados respectivamente com FC 10, 25 e DMSO 4% dissolvido em água purificada, i.p. (Hematoxilina-Eosina X40. Barra de Escala = 50 μm).

Ilustração 3. Cortes de tecido hepático (X40) de camundongos Swiss adultos tratados com a fração rica em caseínas (FC) nas doses 2,5 mg kg⁻¹ (A), 5 mg kg⁻¹ (B), 10 mg kg⁻¹ (C), 25 mg kg⁻¹ (D) e DMSO 4% 10 mL kg⁻¹ (E).



A, D e E - Presença de degeneração hidrópica e congestão vascular no fígado de camundongos adultos (setas pretas) tratados respectivamente com FC 2,5, FC 25 e DMSO 4% dissolvido em água purificada, i.p., durante 7 dias (Hematoxilina-Eosina X40. Barra de Escala = 50 μ m). **B** - Presença de degeneração hidrópica, congestão vascular e necrose no fígado de camundongos adultos (seta preta) tratados com FC 5, i.p., durante 7 dias (Hematoxilina-Eosina X40. Barra de Escala = 50 μ m). **C** - Celularidade íntegra no tecido hepático de camundongos adultos (seta preta) tratados com FC 10, i.p., durante 7 dias (Hematoxilina-Eosina X40. Barra de Escala = 50 μ m).

6.4 DISCUSSÃO

O estresse oxidativo é o estado de desequilíbrio entre as defesas antioxidantes do organismo e o excesso de radicais livres, cenário diretamente relacionado com a patogênese de diversas enfermidades e desordens, como aterosclerose, câncer e quadros neurodegenerativos. O organismo se defende através de enzimas de proteção como, por exemplo, a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT), que causam a depleção das espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enxofre (EROs, ERNs e EREs). Outra forma de vencer o efeito deletério dos radicais é por meio de micromoléculas obtidas na dieta que reagem e formam espécies mais inertes, como é o caso do ácido ascórbico (BARREIROS et al., 2006; NIKI, 2010).

De um modo geral, os antioxidantes estão presentes em pequenas quantidades nos alimentos e nas plantas. A busca por novos compostos antioxidantes é o foco principal de muitas pesquisas devido à participação dos radicais livres no surgimento e progresso de doenças crônicas e, sobretudo, ao aumento da expectativa de vida populacional. Os produtos naturais atuam por meio de suas propriedades *scavenger*, bloqueando reações em cadeia com ferro e cobre que levariam à produção de radicais ou modulando positivamente as enzimas de defesa nos sistemas orgânicos, prevenindo doenças (BIANCHI; ANTUNES, 1999; HALLIWELL, 2011; LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013).

Dessa forma, a avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais, como as casearinas, torna-se importante especialmente em órgãos mais vulneráveis ao estresse oxidativo, como o cérebro. Todos os tecidos humanos sofrem lesões oxidativas, porém as células do tecido cerebral não possuem poder mitótico e o metabolismo cerebral é muito dependente de oxigênio e ATP para manutenção das suas funções. Além disso, a presença de íons e de neurotransmissores oxidáveis favorece a ocorrência de danos (BARBOSA et al., 2006; PALA; GURKAN, 2008).

A peroxidação lipídica é outro evento ao qual o tecido cerebral está propenso devido ao seu alto conteúdo lipídico. A oxidação dos lipídios insaturados das membranas celulares produz aldeídos eletrofílicos causadores de modificações em proteínas funcionais promovendo colapso celular (LIMA; ABDALLA, 2001; REED, 2011). Foi utilizado um protocolo experimental cuja magnitude da peroxidação lipídica é proporcional ao conteúdo de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), como é o caso do malonaldeído (MDA) (CHOWDHURY; SOULSBY, 2002; CAMPÊLO et al., 2011).

Os resultados (Tabela 1) sugerem que a fração rica em casearinas não se equipara ao ácido ascórbico na redução dos níveis de TBARS tanto no hipocampo como no corpo estriado de camundongos em todas as doses testadas. Deve ser observado ainda que foi significativa ($p < 0,05$) a elevação nos níveis de TBARS promovida pelo DMSO a 4%. Desse modo o aumento de TBARS no hipocampo do grupo FC 25 pode ser oriundo da toxicidade do próprio veículo. Este comportamento se repete na análise realizada no corpo estriado, exceto no grupo FC 5.

O íon nitrito corresponde a uma espécie reativa de nitrogênio que pode atuar como iniciador da peroxidação lipídica através da remoção de átomos de hidrogênio das moléculas de ácidos graxos. Os níveis de nitrito foram avaliados em função da clássica reação colorimétrica com o reagente de Griess em que a concentração do ânion é proporcional à cor formada em função do tempo (RAMOS et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2007).

De acordo com a tabela 1 pode ser demonstrado que a FC em todas as doses trabalhadas não reduz os níveis da espécie reativa nas áreas cerebrais avaliadas. Há também diferença estatística entre os níveis de nitrito atingidos pelo DMSO 4% e a FC em todas as doses testadas, tanto no hipocampo quanto no corpo estriado dos animais, revelando que a elevação do íon nitrito promovida pela fração não é decorrente da ação do veículo.

De acordo com o capítulo 2 da presente dissertação de mestrado, foi determinado que a fração rica em casearinas apresenta significativa atividade antioxidante contra TBARS e nitrito em testes *in vitro* não ocorrendo o mesmo na análise *in vivo*. A avaliação *in vitro* ocorre sob condições controladas de temperatura e pH, com concentrações bem definidas de substratos e meio reacional ideal dependendo basicamente das propriedades químicas intrínsecas da substância antioxidante. Portanto, a não manutenção da propriedade antioxidante da FC nos homogenatos provavelmente ocorreu em virtude da complexidade dos sistemas orgânicos ou em decorrência da biotransformação da fração rica em subprodutos com potencial antioxidante inferior (ANDERSON; PHILLIPS, 1999; ALVES 2010).

A glutathiona reduzida (GSH) é uma substância antioxidante encontrada principalmente no fígado, cérebro e rins. É formada pelos peptídeos glicina, cisteína e ácido glutâmico e ao ser oxidada por meio da enzima glutathiona peroxidase (GPx) contribui para a redução dos níveis de peróxidos. A GSH também possui atividade redox contra espécies reativas de oxigênio, característica muito importante quando se trata do radical hidroxila, visto que, não existe sistema enzimático de defesa para esse radical. A GSH também contribui para a manutenção da atividade de antioxidantes exógenos como o ácido ascórbico e o tocoferol. No sistema nervoso pode atuar ainda como neurotransmissor via receptores NMDA (N-metil-D-aspartato). Por conseguinte, sua avaliação no SNC é de extrema relevância (MANDAL et al., 2012; CAROCHO; FERREIRA, 2012).

As concentrações de glutathiona nos homogenatos cerebrais foram determinadas a partir da reação colorimétrica de referência com o reagente de Ellman (ALAM et al., 2012). Os resultados demonstram que a FC 5 e a FC 10 reduzem os níveis de glutathiona reduzida e portanto, têm menor ação antioxidante nesse parâmetro. Esse padrão se manteve no corpo estriado nos grupos que receberam a FC 2,5 e FC 5. Não houve diferença estatística nos níveis de glutathiona reduzida no hipocampo e nem no corpo estriado dos grupos que receberam DMSO 4 % e AA (Tabela 2). Esses dados evidenciam que o veículo empregado na pesquisa não exerce influência sobre a redução dos níveis da GSH promovida pela fração rica em casearinas no hipocampo (nas doses 5 e 10 mg kg⁻¹) e no corpo estriado (nas doses doses 2,5 e 5 mg kg⁻¹) dos animais.

Uma das vias enzimáticas de defesa do organismo contra lesões oxidativas é intermediada pela catalase. Sua avaliação no tecido cerebral é importante devido ao metabolismo oxidativo do cérebro e à típica produção de EROs no sistema nervoso. Os níveis de catalase são tipicamente baixos no cérebro e a enzima ocorre no interior de microperoxissomos. Entretanto esta é a enzima de defesa mais específica contra o H₂O₂ produzido sob condições patológicas. Logo, a elevação dos seus níveis pode representar ganho significativo no combate ao estresse oxidativo (SHIM et al., 2003; BARBOSA et al., 2006).

A atividade da CAT foi avaliada em função da capacidade da enzima de degradar o peróxido de hidrogênio no decorrer do tempo (SANTOS et al., 2008). Os resultados evidenciam que no hipocampo dos animais que receberam a fração rica em casearinas a atividade da catalase estava inferior àquela apresentada no grupo que recebeu o ácido ascórbico. Entretanto há um aumento gradual na atividade da catalase no hipocampo à medida que se eleva a concentração da FC, sugerindo que uma dose maior que 25 mg kg⁻¹ poderia

superar a vitamina C na modulação da enzima ou que o DMSO 4% causou uma redução na atividade da fração, uma vez que, houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre o grupo veículo e o grupo AA. Houve comportamento similar nas análises realizadas no corpo estriado (Tabela 2).

Na análise dos cortes histológicos foi evidenciado que os grupos tratados com a fração rica em casearinas nas doses de 2,5 e 5 mg kg⁻¹ apresentaram lesões nos neurônios da área do hipocampo caracterizadas por vacuolização nuclear, fragmentação da cromatina nuclear (núcleos picnóticos) e hipercromasia do material nuclear sugestivo de morte celular. Além dessas lesões foi observada intensa congestão vascular. Este quadro foi parcialmente revertido nos tratamentos com 10 e 25 mg kg⁻¹, havendo nesses grupos maior homogeneidade dos neurônios além de nucléolos centralizados característicos da morfologia neuronal. O grupo tratado com DMSO 4% apresenta apenas discreta congestão vascular (Ilustração 1).

Em relação ao corpo estriado, os grupos FC 2,5 e FC 5 novamente se destacaram por apresentarem desorganização dos axônios com a presença de vacuolizações na dose de 5mg kg⁻¹, comprometendo as estriações típicas dessa área cerebral. Este quadro não foi observado nos demais tratamentos (Ilustração 2). Esses resultados podem ser decorrentes da elevação nos níveis de TBARS e nitrito ocasionados pela fração rica nos grupos FC 2,5 e FC 5 juntamente com a menor ação das defesas enzimática, cuja atividade foi mais notória nos grupos FC 10 e FC 25, justificando a menor lesão no hipocampo e no corpo estriado dos animais que receberam as maiores doses.

Como o fígado exerce papel central na biotransformação de xenobióticos, foi realizada a análise histopatológica desse órgão nos animais que receberam a FC (PUGH et al., 2009). Já nos tecidos hepáticos houve degeneração hidrópica intensa e congestão vascular de moderada a intensa em todos os tratamentos ocorrendo áreas de necrose no grupo FC 5. Na dose de 10 mg kg⁻¹ permaneceu preservada a arquitetura e a integridade celular das áreas adjacentes à veia centrolobular (Ilustração 3). O fato das menores doses da fração terem causado maior redução nos níveis de GSH no SNC sugere que a FC, nessas doses, pode também interferir no processo de desintoxicação com glutathione-S-transferase reduzindo seus níveis e expondo o fígado a danos oxidativos.

6.5 CONCLUSÃO

Fundamentado nos resultados da pesquisa é possível inferir que a fração rica em casearinas não apresentou atividade antioxidante no SNC equivalente à do ácido ascórbico em

nenhum dos protocolos experimentais realizados o que demonstra que a atividade antioxidante *in vitro* caracterizada em outros estudos não se mantém *in vivo*. Todas as doses estudadas não apresentaram ação antioxidante nos experimentos realizados e as menores doses se destacaram devido à maior ocorrência de lesões no tecido nervoso, fato mais perceptível com a dose de 5 mg kg⁻¹ na avaliação do tecido hepático. Esses achados sugerem que a FC tem ação neurotóxica, sobretudo nas menores doses testadas, indicando a necessidade de cautela na utilização de preparações populares à base da *C. sylvestris* para fins medicinais.

REFERÊNCIAS

- ALAM, M. N.; BRISTI, N.J.; RAFIQUZZAMAN. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 2012.
- ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ANDERSON, D.; PHILLIPS, B.J. Comparative *in vitro* and *in vivo* effects of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 1015-1025, 1999.
- BARBOSA, L.F.; MEDEIROS, M.H.G.; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: o que aprendemos com animais transgênicos e nocautes? **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1352-1360, 2006.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.; DAVID, J. Estresse oxidativo: relação entre geração das espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição, Campinas**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.
- CAMPÊLO, L.M.L.; ALMEIDA, A.A.C.; FREITAS, R.L.M.; CERQUEIRA, G.S.; SOUSA, G.F.; SALDANHA, G.B.; FEITOSA, C.M.; FREITAS, R.M. Antioxidant and antinociceptive effects of *Citrus limon* essential oil in mice. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1-8, 2011.
- CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, 2012.
- CHANCE, B., MAEHLY, A.C. Assay catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v. 2, p. 764-768, 1955.

CHOWDHURY, P.; SOULSBY, M. Lipid peroxidation in rat brain is increased by simulated weightlessness and decreased by a soy-protein diet. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 32, n. 2, 2002.

DRAPER, H.H.; HADLEY, M.; Malondialdehyde determination as an index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 421-431, 1990.

FERREIRA P.M.P.; SANTOS, A.G.; TININIS, A.G.; COSTA, P.M.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; PESSOA, C. Casearin X exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, p. 497-504, 2010.

FERREIRA, P.M.P.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; BARROS, F.W.A.; MARTINS, A.M.A.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; SANTOS, A.G.; PESSOA, C. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, p. 1373-1384, 2011.

FREITAS, R.M. The evaluation of effects of lipoic acid on the lipid peroxidation, nitrite formation and antioxidant enzymes in the hippocampus of rats after pilocarpine-induced seizures. **Neuroscience Letters**, v. 455, p. 140–144, 2009.

GREEN, L.C.; TANNENBAUM, S.R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, p. 56-58, 1981.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants – *quo vadis?* **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 3, p. 125-130, 2011.

KUNWAR, A.; PRIYADARSINI, K.I. Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. **Journal of Medical & Allied Sciences**, v. 1, n. 2, p. 53-60, 2011.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 763, p. 1-10, 2013.

LOWRY, H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurements with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MANDAL, P.K.; TRIPATHI, M.; SUGUNAN, S. Brain oxidative stress: Detection and mapping of anti-oxidant marker 'Glutathione' in different brain regions of healthy male/female, MCI and Alzheimer patients using non-invasive magnetic resonance spectroscopy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 417, p. 43–48, 2012.

MOSADDICK, M.A.; BANBURY, L.; FORSTER, P.; BOOTH, R.; MARKHAM, J.; LEACH, D.; WATERMAN, P.G. Screening of some Australian Flacourtiaceae species for in

vitro antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity. **Phytomedicine**, v. 11, p. 461-466, 2004.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 503-515, 2010.

PALA, F.S.; GURKAN, H. The role of free radicals in ethiopathogenesis of diseases. **Advances In Molecular Biology**, v. 1, p. 1-9, 2008.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The brain in stereotaxic coordinates**. New York: Academic Press, 1986.

PUGH, A.J.; BARVE, A.J.; FALKNER, K.; PATEL, M.; MCCLAIN, C.J. Drug- induced hepatotoxicity or drug- induced liver injury. **Clinical Liver Disease**, v. 13, p. 277-294, 2009.

RAMOS, L.A.; CAVALHEIRO, C.C.S.; CAVALHEIRO, E.T.G. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1114-1120, 2006.

REED, T. T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, p. 1302-1319, 2011.

SANTOS, L.F.L.; FREITAS, R.L.M.; XAVIER, S.M.L.; SALDANHA, G.B.; FREITAS, R.M. Neuroprotective actions of vitamin C related to decreased lipid peroxidation and increased catalase activity in adult rats after pilocarpine-induced seizures. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 89, p. 1-5, 2008.

SEDLAK, J., LINSAY, R.H. Estimation of protein bound and nonprotein solfhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Anal. Biochem.**, v. 25, p. 192-205, 1988.

SHIM, I-S.; MOMOSE, Y.; YAMAMOTO, A.; KIM, D-W.; USUI, K. Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to salicylic acid accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 39, p. 285-292, 2003.

SILVA, S.L.; CHAAR, J.S.; FIGUEIREDO, P.M.S.; YANO, T. Citotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazonica**, v. 38, p. 107-118, 2008b.

TOMÉ, A.R.; FENG, D.; FREITAS, R.M. The effects of alpha-tocopherol on hippocampal oxidative stress prior to in pilocarpine-induced seizures. **Neurochemical Research**, v. 35, p. 580-587, 2010.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.