

Eliete Janaina Bueno Bighetti

**Efeitos de substâncias obtidas das cascas de *Croton cajucara*  
Benth. sobre o processo inflamatório e o agente etiológico da  
malária**

**Universidade Estadual Campinas**

**Campinas, 1999**

Eliete Janaina Bueno Bighetti

**Efeitos de substâncias obtidas das cascas de *C. cajucara* Benth.  
sobre o processo inflamatório e o agente etiológico da malária**

Dissertação apresentada ao Departamento  
de Farmacologia da Faculdade de Ciências  
Médicas da Universidade Estadual de  
Campinas, para obtenção do título de  
Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito  
Área de Concentração- Farmacologia  
Departamento de Farmacologia  
Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP

Universidade Estadual de Campinas  
Campinas, 1999

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	Ex.
TOMBO BC/	38785
PROC.	229199
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
VALOR	R\$ 11,00
N.º OPD	30109199

CM-00126209-0

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

B484e

Bighetti, Eliete Janaína Bueno

Efeitos de substâncias obtidas das cascas de *Croton cajucara* Benth sobre o processo inflamatório e o agente etiológico da malária / Eliete Janaína Bueno Bighetti. Campinas, SP : [s.n.], 1999.

Orientador : Alba Regina Monteiro Souza Brito  
Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

I. Malária. 2. Plantas medicinais. 3. Inflamação. 4. Fígado. I. Alba Regina Monteiro Souza Brito . II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

**Orientador:**

**Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito**

**Membros:**

1. Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito

2. Profa. Dra. Wilda Maria da Silva Cunha Yamashiro

3. Profa. Dra. Mirtes Costa

**Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas.**

02/01/2017

Ao meus pais  
Terezinha e Dorival,  
Que muitas vezes renunciaram a seus sonhos  
para que eu pudesse realizar os meus. E pela  
compreensão, cumplicidade, confiança e amor  
em todos os momentos de minha vida.

Que a força do medo que tenho não me impeça de ver o que anseio. Que a morte de tudo o que acredito não me tape os ouvidos e a boca. Porque metade de mim é o que eu grito, mas a outra metade é silêncio.

Que as palavras que falo não sejam ouvidas como prece nem repetidas com fervor. Apenas respeitadas como a única coisa que resta a um homem inundado de sentimento. Porque metade de mim é o que eu ouço, mas a outra metade é o que eu calo.

Que o medo da solidão se afaste, que o convívio comigo mesmo se torne ao menos suportável. Que o espelho reflita em meu rosto o doce sorriso que eu me lembro de ter dado na infância. Porque metade de mim é a lembrança do que fui, a outra metade eu não sei....

Que a arte nos aponte uma resposta, mesmo que ela não saiba, e que ninguém a tente complicar porque é preciso simplicidade para fazê-la florescer. Porque metade de mim é platéia e a outra metade é canção.

E que a minha loucura seja perdoada

Porque metade de mim é amor e a outra metade..... também

Metade (Oswaldo Montenegro)

***AGRADECIMENTOS***

---

À profa. Dra. Alba R.M. Souza Brito meus agradecimentos especiais por sua orientação, bem como estímulo e a confiança em mim depositadas, sem os quais este trabalho não seria concluído.

Ao químico Prof. Dr. Domingos Sávio Nunes pelo fornecimento das substâncias em estudo.

Ao Prof. Dr. Paulo Pimenta e à sua aluna Ana Cristina do Laboratório de Entomologia Médica do Instituto René Rachou, Belo Horizonte-MG, pela orientação e oportunidade de trabalhar nos experimentos de malária.

À profa. Dra. Marcela Haun do Departamento de Bioquímica, IB-UNICAMP e seu aluno Jayme pela orientação nos ensaios de citotoxicidade.

À profa. Wirla M.S.C. Tamashiro, do Departamento de Microbiologia e Imunologia, IB-UNICAMP, e à Ivani, aluna do Departamento de Farmacologia pela colaboração no trabalho de migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos.

Ao Dr. Bordin do Laboratório de Patologia Animal – Campinas, pela colaboração nas análises histológicas.

Ao Prof. Dr. Angelo e seu aluno João Marcos pela ajuda na preparação das lâminas e feliz convivência em seu laboratório.

À Prof. Dra. Mirtes Costa do Departamento de Farmacologia, UNESP-Botucatu, pela colaboração nos cálculos estatísticos.

À coordenação do Curso de Pós-graduação em Farmacologia e à coordenação do curso de Pós-graduação em Fisiologia local onde desenvolvi minha tese.

Aos colegas de laboratório Ana Beatriz, Clélia, Juliano, Ricardo e Leônia pela atenção, carinho e auxílio.

Aos professores e funcionários dos Institutos de Biologia da UNICAMP, da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, e da FIOCRUZ que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos amigos que me apoiaram direta ou indiretamente durante a realização deste trabalho.

Ao Luiz e Clarice pelo carinho e apoio constantes.

À FAPESP pelo apoio financeiro e à assessoria pelos comentários pertinentes.

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>i</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....</b>	<b>iii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>vi</b>
<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. MALÁRIA .....	1
a. Epidemiologia da Malária.....	1
b. Ciclo Evolutivo dos Plasmódios.....	3
c. Malária e Resposta Inflamatória.....	6
1.2. FÍGADO E SUAS LESÕES.....	8
a. Hepatotoxicidade e Lesões Hepáticas.....	8
b. Metabolismo Hepático de Drogas .....	8
1.3. PLANTAS MEDICINAIS.....	10
a. Malária, Plantas Medicinais e Citotoxicidade .....	10
b. <i>Croton cajucara</i> e Malária.....	14
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>III. METODOLOGIA.....</b>	<b>17</b>
3.1. ANIMAIS.....	17
3.2. OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL .....	17
a. Cascas da Planta.....	17
b. Isolamento da DHC.....	18
c. Infuso.....	19
d. Óleo essencial .....	19
3.3. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	20
3.3.1. MODELOS DE INFLAMAÇÃO.....	20
a. <i>Granuloma Cotton Pellet</i> .....	20
b. Edema de Pata Induzido por Carragenina.....	21
c. Migração de Neutrófilos para a Cavidade Peritoneal.....	22
3.3.2. ENSAIOS TOXICOLÓGICOS <i>IN VITRO</i> .....	23
a. Cultura de fibroblastos.....	23
3.3.3. CULTURA PRIMÁRIA DE HEPATÓCITOS .....	24
a. Redução do brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) .....	26
b. Conteúdo de DNA.....	27
c. Preparo das substâncias para tratamento.....	27
d. Estudo do efeito hepatoprotetor do óleo essencial.....	27
3.3.4. MODELOS DE LESÃO HEPÁTICA.....	28
a. Hepatite induzida pela d-galactosamina.....	28
b. Dosagem das transaminases.....	29
c. Análise microscópica.....	29
d. Dosagem de glicogênio.....	30
3.3.5. MODELOS DE MALÁRIA.....	30
a. Padronização do inóculo de formas sanguíneas .....	31
b. Preparação, Coloração e exame de esfregaços sanguíneos .....	31
3.3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	32
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>33</b>
4.1. MODELOS DE INFLAMAÇÃO .....	33
a. <i>Granuloma Cotton Pellet</i> .....	33
b. Edema de pata induzido por carragenina.....	34
c. Migração de Neutrófilos para a Cavidade Peritoneal.....	36
4.2. ENSAIOS TOXICOLÓGICOS <i>IN VITRO</i> .....	37
4.2.1. Testes para avaliar a Citotoxicidade em Culturas de Células V79 e hepatócitos.....	37
a. DHC.....	37

b. Infuso.....	39
c. Óleo essencial .....	41
d. Teste de hepatoproteção <i>in vitro</i> do Óleo essencial.....	42
4.3. MODELOS DE LESÃO HEPÁTICA.....	44
4.3.1. ESTUDO DO EFEITO DA HEPATITE INDUZIDA POR D-GALACTOSAMINA .....	44
a. Dosagem das transaminases.....	45
b. <i>Histologia</i> .....	47
c. Dosagem do glicogênio hepático e muscular .....	49
4.4. MODELOS DE MALÁRIA .....	50
a. Malária experimental para <i>P. yoelli</i> .....	50
b. Malária Experimental para <i>P. berghei</i> .....	52
c. Malária Experimental para <i>P. gallinaceum</i> .....	54
<b>V. DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
5.1. <i>CROTON CAJUCARA</i> EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO.....	56
5.2. ENSAIOS TOXICOLÓGICOS IN VITRO.....	61
5.3 MODELOS DE LESÃO HEPÁTICA E <i>CROTON CAJUCARA</i> .....	65
5.4. SUBSTÂNCIAS DE <i>CROTON CAJUCARA</i> E MALÁRIA .....	68
<b>VI. CONCLUSÕES.....</b>	<b>73</b>
<b>VII. ABSTRACT.....</b>	<b>75</b>
<b>VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>77</b>
<b>IX. ANEXO.....</b>	<b>90</b>

## Lista de Abreviaturas

<b><math>\lambda</math>:</b>	Comprimento de onda
<b><math>\gamma</math>-GT:</b>	Gama- glutamyl transferase
<b>5'- NT:</b>	5'- nucleotidase
<b>ADP:</b>	Difosfato de adenosina
<b>ALT:</b>	Alanina aminotransferase
<b>AMP:</b>	Monofosfato de adenosina
<b>ANOVA:</b>	Análise de variância
<b>AP:</b>	Fosfatase alcalina
<b>AST:</b>	Aspartato aminotransferase
<b>ATP:</b>	Trifosfato de adenosina
<b>CCL<sub>4</sub>:</b>	Tetracloroeto de carbono
<b>CG-MS:</b>	Cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa
<b>CS:</b>	Proteína circum-esporozoíta
<b>DHC:</b>	Desidroacetonina
<b>DL<sub>50</sub>:</b>	Dose letal mediana
<b>DMEM:</b>	Meio Eagle modificado por Dulbecco
<b>DNA:</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EDTA:</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>EE:</b>	Fase exoeritrocítica
<b>EHB:</b>	Extrato bruto hidroalcoólico
<b>FIOCRUZ:</b>	Fundação Instituto Oswaldo Cruz
<b>Ham-F12:</b>	Meio de cultura
<b>i.m.:</b>	Intramuscular (via)
<b>i.p.:</b>	Intraperitoneal (via)
<b>IC<sub>50</sub>:</b>	Concentração responsável por 50% de inibição da viabilidade celular em cultura celular
<b>IL:</b>	Interleucinas

<b>INF-<math>\gamma</math>:</b>	Interferon-gama
<b>KOH:</b>	Hidróxido de potássio
<b>L-15:</b>	Meio Leibovitz
<b>LDH:</b>	Lactato desidrogenase
<b>MTT:</b>	3- (4,5 – dimetiltrazol – 2,5 difeniltetrazolium) sal de tetrazólio
<b>NAOH:</b>	Hidróxido de sódio
<b>OCT:</b>	Ornitina carbamil transferase
<b>OMS:</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>P.:</b>	<i>Plasmodium</i>
<b>p.o.:</b>	Oral (via)
<b>PAF:</b>	Fator de agregação plaquetária
<b>PBS:</b>	Solução tampão de fosfato
<b>RMN:</b>	Ressonância magnética Nuclear
<b>RPMI:</b>	Meio de inositol, ribose e fosfato
<b>s.c.:</b>	Subcutânea (via)
<b>SDH:</b>	Sorbitol desidrogenase
<b>SFB:</b>	Soro fetal bovino
<b>SMF:</b>	Sistema monocítico fagocitário
<b>TCA:</b>	Ácido tricloroacético
<b>TNF:</b>	Fator de necrose tumoral
<b>V79</b>	Fibroblastos de pulmão de hamster chinês

## Lista de Ilustrações

### Tabelas

<b>Tabela 1:</b>	Efeito da administração oral do infuso, óleo essencial e DHC no ensaio do granuloma <i>cotton pellet</i> em ratos	33
<b>Tabela 2:</b>	Efeito da administração oral do infuso, óleo e DHC no modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos	34
<b>Tabela 3:</b>	Curva-dose resposta do óleo essencial comparado com a indometacina no modelo de edema de pata em camundongos	35
<b>Tabela 4:</b>	Efeito da administração oral do infuso, óleo e DHC sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por LPS, em camundongos	37
<b>Tabela 5:</b>	Efeito da administração oral do infuso, óleo e DHC de <i>C. cajucara</i> e cloroquina em animais infectados com <i>Plasmodium yoelli</i>	51
<b>Tabela 6:</b>	Efeito da administração oral do infuso, óleo e DHC de <i>C. cajucara</i> e cloroquina em animais infectados com <i>Plasmodium berghei</i>	53
<b>Tabela 7:</b>	Efeito da administração oral do infuso, óleo e DHC de <i>C. cajucara</i> e cloroquina em animais infectados com <i>Plasmodium gallinaceum</i>	54

## Figuras

<b>Figura 1:</b>	<i>Croton cajucara</i> em seu habitat natural	15
<b>Figura 2:</b>	Cascas de <i>Croton cajucara</i>	15
<b>Figura 3:</b>	Estrutura química espacial da trans-desidrocrotonina	18
<b>Figura 4:</b>	Efeito do estímulo do LPS em camundongos tratados intraperitonealmente, comparando com o PBS	36
<b>Figura 5:</b>	Viabilidade celular de culturas de células V79 avaliada pelo teste do MTT e conteúdo de DNA, tratada com DHC	38
<b>Figura 6:</b>	Viabilidade celular de culturas de células hepáticas avaliada pelo teste do MTT e conteúdo de DNA, tratada com DHC	39
<b>Figura 7:</b>	Viabilidade celular de culturas de células hepáticas e V79 avaliada pelo conteúdo de DNA, tratada com infuso	40
<b>Figura 8:</b>	Viabilidade celular de culturas de células hepáticas e V79 avaliada pelo teste do MTT, tratada com infuso	41
<b>Figura 9:</b>	Viabilidade celular de culturas de células hepáticas e V79 avaliada pelo conteúdo do DNA, tratada com óleo	42
<b>Figura 10:</b>	Viabilidade celular de culturas de hepatócitos após tratamento com óleo essencial e pós tratamento com cumarina, avaliada pelo teste do MTT	43
<b>Figura 11:</b>	Viabilidade celular de culturas de hepatócitos após tratamento com óleo essencial pós tratamento de cumarina, avaliada pelo teste do DNA	43
<b>Figura 12:</b>	Dosagem da transaminases (AST)	45

<b>Figura 13:</b> Dosagem da transaminases (ALT)	45
<b>Figura 14:</b> Dosagem da transaminases ( $\gamma$ -GT)	46
<b>Figura 15:</b> Fotomicrografia de lóbulo hepático	48
<b>Figura 16:</b> Dosagem do glicogênio hepático	49
<b>Figura 17:</b> Espectro do infuso	90

## Resumo

A malária, doença parasitária prevalente de países tropicais, atinge aproximadamente 300 milhões de indivíduos/ano no mundo e tem se agravado pela resistência do *Plasmodium* às drogas. A busca de novos anti-maláricos para substituir ou complementar a terapêutica atual é uma das prioridades da Organização Mundial da Saúde. A espécie *Croton cajucara* ou “sacaca”, uma planta tipicamente brasileira, é indicada popularmente no auxílio do tratamento de malária, inflamações no fígado e icterícia, entre outros. Os efeitos da *Croton cajucara* sobre os aspectos associados aos sinais e sintomas relacionados à infecção malárica, além do efeito sobre o parasita em si foram estudados devido aos danos hepáticos produzidos pela malária, assim como às indicações populares da espécie. Estudamos inicialmente os efeitos farmacológicos do infuso, óleo essencial e desidrocrotonina, obtidos das cascas de sacaca, em modelos experimentais de inflamação e hepatoproteção. O óleo essencial exerceu efeito antiinflamatório, dose-dependente, em modelos de inflamação aguda (edema de pata induzido por carragenina), e de inflamação crônica (granuloma *cotton pellet*); contudo, não foi capaz de inibir a migração de neutrófilos induzida por lipopolissacarídeo, para a cavidade peritoneal de camundongos. A desidrocrotonina foi capaz de inibir o processo inflamatório somente quando os animais foram tratados cronicamente, enquanto que o infuso não demonstrou efeito antiinflamatório em nenhum dos modelos estudados. Em ensaios de citotoxicidade, realizados em fibroblastos de pulmão de hamster chinês da linhagem V79 e em culturas primárias de hepatócitos de ratos, verificamos que a toxicidade das substâncias estudadas foi dependente da dose. Esses

resultados possibilitaram a comparação da citotoxicidade entre células metabolizantes (hepatócitos) e não metabolizantes (fibroblastos). O óleo essencial apresentou menor citotoxicidade nas células hepáticas do que em fibroblastos, diferente das demais drogas, onde ocorreu o inverso. Quando se testou o óleo essencial no modelo de hepatoproteção *in vitro*, utilizando como droga hepatotóxica a cumarina, o óleo essencial não foi capaz de proteger o fígado desse agente lesivo. Nos testes de hepatoproteção *in vivo* todas as drogas foram ineficazes em proteger o fígado; ao contrário, as substâncias vegetais potencializaram o efeito hepatotóxico do agente estudado, a galactosamina. Estudos preliminares do efeito das drogas na malária demonstraram que o infuso (com maior eficácia), o óleo essencial e a DHC foram capazes de inibir a parasitemia em animais (aves e camundongos) infectados principalmente por *P. berghei* e *gallinaceum*. Determinamos também a composição do infuso onde 13% de sua composição é de desidrocrotonina, além de óleo essencial e açúcares em menor quantidade. Nossos estudos demonstraram portanto que, apesar da citotoxicidade apresentada pelo infuso, o chá das cascas de sacaca usado popularmente no auxílio do tratamento da malária está, ainda que, preliminarmente, perfeitamente justificado.

## ***I. INTRODUÇÃO***

---

## 1.1. MALÁRIA

### a. *Epidemiologia da Malária*

A malária é uma doença que causa enorme sofrimento e é a causa de morbidade em vários países incluindo, principalmente, áreas pantropicais (TOUZE et al., 1993; WHO, 1993). Essa doença parasitária continua sendo a mais prevalente nas áreas tropicais, onde aproximadamente 300 milhões de indivíduos são afetados por ano, a maioria vivendo na África Tropical (CATTANI et al., 1993). O Brasil é responsável por aproximadamente 10% dos casos da doença assinalados anualmente fora do território africano, assumindo o segundo lugar mundial em número de casos (WHO, 1993). Estima-se que ocorra uma morte a cada 12 segundos, quase sempre entre crianças menores de cinco anos, principalmente na África, sub-Saara, e os dois terços restantes estão concentrados em apenas seis países. Esses países, em ordem decrescente de prevalência de malária são, Índia, Brasil, Sri-Lanka, Vietnã, Colômbia e a Ilha de Salomão (BUTLER et al., 1997).

Na América Latina, o maior número de casos de malária registrado é na região da Amazônia Legal, onde estima-se uma mortalidade anual de 6 a 10 mil pessoas, entre adultos e crianças (WHO, 1992). No Brasil, em 1997, foram registrados cerca de 405.000 casos de malária, sendo 99% deles na Amazônia brasileira, a maioria entre homens, adultos e jovens (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1997). A mortalidade nestes casos ocorre, sobretudo, em função do atraso do diagnóstico e do tratamento específico (KRETTLI, 1998).

A política de erradicação da malária, adotada a partir de 1950 pela Organização Mundial de Saúde (OMS), está baseada fundamentalmente no controle dos mosquitos vetores e no tratamento curativo dos indivíduos infectados. Esta política conseguiu eliminar a doença de numerosos países nas zonas temperadas, onde a mesma era relativamente instável (BRUCE-CHWATT, 1986). Entretanto, devido às dificuldades práticas na aplicação dos programas nas áreas mais afetadas do mundo como a África, Ásia e América Latina, as

campanhas de erradicação foram transformadas em campanhas de controle dos vetores que reduziram consideravelmente, o número de casos da doença nessas áreas.

O intenso desenvolvimento da Amazônia, a partir dos anos 70, ajudou a expandir rapidamente os focos de malária existentes, e a doença assumiu proporções alarmantes na última década (CASTILHO-SALGADO, 1992). Em 1993, aproximadamente 483 mil casos da doença foram notificados no Brasil, sendo 90% na Amazônia, onde os Estados de Mato Grosso, Pará e Rondônia se destacaram pela intensidade de transmissão.

Em áreas endêmicas de malária existem cepas de *Plasmodium falciparum* com fenótipo multi-resistente a drogas (COWMAN, 1991), inclusive no Brasil (COUTO et al., 1993). Tais fatores, associados à outras dificuldades de caráter operacional, como administrativo e político, têm levado a OMS a sugerir uma redefinição dos objetivos iniciais do programa, abandonando o princípio de erradicação para propor uma estratégia do controle da doença (NAJERA, 1989).

Dentro dessa perspectiva, tornou-se clara a necessidade de adaptação de medidas de controle às condições epidemiológicas, econômicas e sócio-culturais específicas, o que demanda conhecimento das áreas envolvidas, dos métodos disponíveis e da integração com os serviços de saúde e de saneamento básico existentes.

A busca de novos antimaláricos que possam substituir ou complementar a terapia antimalárica existente é uma prioridade da OMS. Estudos de quimioterapia experimental têm sido conduzidos por vários grupos de pesquisa com ênfase em plantas medicinais usadas contra a malária na Amazônia (FERRARI et al., 1992). Além disso, o uso de plasmódios não humanos como modelos experimentais tem permitido significativos avanços no conhecimento de vários aspectos da infecção malárica, na busca de novos antimaláricos para a terapia da doença e no desenvolvimento de vacinas.

## b. *Ciclo Evolutivo dos Plasmódios*

A malária é uma doença causada por protozoários do gênero *Plasmodium*. Os seres humanos são infectados pelos esporozoítos injetados pela picada dos mosquitos fêmea do gênero *Anopheles*, podendo, ser transmitida também por transfusão sanguínea.

A infecção malárica inicia-se com a inoculação dos esporozoítos no hospedeiro vertebrado através da picada do inseto vetor (mosquitos anofelinos no caso de mamíferos e culicídeos no caso da malária de aves). Os esporozoítos inoculados, após cerca de 30 min na circulação, penetram na célula do hospedeiro iniciando a fase exoeritrocítica (EE) do ciclo. No caso dos mamíferos, as células hospedeiras dos esporozoítos são os hepatócitos e na malária das aves são as células do sistema monocítico fagocitário (SMF).

Na malária de mamíferos não está ainda claro o mecanismo pelo qual os esporozoítos passam dos capilares sinusoidais do fígado para o hepatócito, ou seja, se é através das células fagocitárias de Kupffer ou das células endoteliais dos vasos sanguíneos (VANDERBERG et al., 1990). Evidências indiretas na malária de roedores demonstram que células fagocíticas podem facilitar a penetração de esporozoítos de *P. berghei*, porque estes plasmódios podem penetrar ativamente ou são fagocitados por macrófagos e sobrevivem no interior dessas células .

Foi demonstrado que o evento inicial na interação esporozoíto-hepatócito é a reconhecimento da proteína circum-esporozoíto (CS) por proteoglicanos presentes na membrana do hepatócito (SINNIS et al., 1994). O ligante para o receptor do hepatócito se localiza na região II da proteína CS, que é altamente conservada em todas as espécies de parasitas da malária de mamíferos (CERAMI et al., 1992).

Algumas horas após a penetração na célula hospedeira, os esporozoítos se arredondam e se multiplicam por esquizogônias, originando esquizontes maduros com merozoítos EE liberados com o primeiro rompimento da célula hospedeira (COULSTON & HUFF, 1947).

Os merozoítos EE liberados podem penetrar em novas células do SMF originando o ciclo EE secundário ou invadir hemácias, iniciando a fase eritrocítica da infecção. Nos plasmódios de mamíferos, a fase EE origina-se somente a partir de esporozoítos inoculados pelo inseto vetor.

Os merozoítos EE, que penetram nas hemácias, utilizam um processo complexo e específico envolvendo fases seqüenciais distintas que compreendem:

- a) interação inicial do tipo ligante-receptor entre o plasmódio e eritrócito; para o *P. falciparum*, as glicoforinas, sialo glicoproteínas presentes na membrana do eritrócito, são os principais receptores;
- b) reorientação do merozoíto com o extremo apical em estreito contato com a membrana do eritrócito;
- c) deformação da membrana da célula hospedeira e
- d) interiorização do parasita e formação do vacúolo parasitóforo (PERKINS, 1990).

Os merozoítos intra-eritrocíticos se diferenciam em trofozoítas os quais, por divisão esquizogônica, originam esquizontes sangüíneos que produzem um número variável de merozoítos, segundo a espécie. Após a lise dos eritrócitos parasitados, os merozoítos sangüíneos livres invadem novas hemácias. Assim, o ciclo sangüíneo se repete sucessivamente, dando origem à fase eritrocítica responsável pela patogenia da doença.

Na fase seguinte alguns dos trofozoítas diferenciam-se para originar as formas eritrocíticas sexuadas, os gametócitos masculinos e femininos, que amadurecem sem sofrer divisão celular. Os gametócitos só prosseguirão seu desenvolvimento no estômago do mosquito susceptível, originando o ciclo sexuado ou esporogônico. Quando a fêmeaingere sangue do vertebrado contendo gametócitos circulantes, esses são liberados da hemácia hospedeira. O gametócito masculino sofre enorme transformação, no estômago do mosquito processo denominado exflagelação, originando gametas masculinos. Após a fusão do

gameta feminino e masculino na luz do estômago, forma-se o oocineto, ovo móvel, que migra para se alojar na parede do estômago do mosquito, formando o oocisto. Após a divisão esporogônica e ruptura do oocisto maduro os esporozoítos são liberados na hemocele do mosquito. Os esporozoítos migram para as glândulas salivares do vetor, estando aptos então, a iniciar o ciclo do hospedeiro vertebrado, quando inoculados através da picada do mosquito.

As drogas antimaláricas têm ação seletiva sobre diferentes fases do ciclo de vida dos parasitas. Os esquizonticidas sangüíneos são drogas com ação sobre os estágios assexuados sangüíneos do parasita (trofozoítos e esquizontes), os responsáveis pelas manifestações clínicas da doença. Nesta categoria incluem-se a grande maioria dos antimaláricos disponíveis tais como, cloroquina, amodiaquina, quinina, pirimetamina pura ou em associações com sulfonamidas ou sulfonas, mefloquina, halofantrina e a artemisinina.

Drogas com ação contra os estágios teciduais do fígado são denominadas esquizonticidas teciduais ou profiláticos casuais, como o proguanil - um inibidor da dihidrofolato redutase do parasita, provocando tanto inibição da síntese de DNA, quanto depleção dos cofatores folatos.

Outros estágios do ciclo de vida do parasita são alvos para drogas; por exemplo, as drogas gametocitocidas que afetam irreversivelmente os gametócitos na circulação do hospedeiro vertebrado, impedindo seu posterior desenvolvimento no mosquito vetor. Drogas com ação sobre os esporozoítos, as quais tem ação logo após a inoculação no hospedeiro vertebrado através da picada do mosquito vetor não são conhecidas até o momento (CARVALHO et al., 1992).

### c. *Malária e Resposta Inflamatória*

Em última análise, a malária pode ser caracterizada por uma resposta inflamatória generalizada com um alto comprometimento hepático (FAURE, 1995). A presença, durante o ciclo da malária, de diferentes populações de células de defesa no compartimento extravascular do fígado, é de particular importância no entendimento dessa patologia. As células, no compartimento extravascular do fígado, podem ser o resultado de uma migração celular a partir da corrente sanguínea. Além disso, a presença do parasita no organismo aumenta a atividade fagocitária das células retículo endoteliais (ROBBINS, 1994).

As células do sistema retículo endotelial do fígado, por sua vez, participam da reatividade imunológica do órgão e constituem um fator importante na prevenção da lesão hepática (LASKIN, 1990).

O processo infeccioso envolve, portanto, respostas inflamatórias típicas que podem ser caracterizadas como um processo inicial protetor mas, que em seu decurso, pode levar a efeitos deletérios para o organismo como um todo.

A inflamação é a resposta do organismo, ou mais especificamente, dos tecidos vascularizados, aos estímulos lesivos, obedecendo a um padrão semelhante independentemente da natureza do estímulo. Apesar disso, pequenas variações podem ocorrer as quais dependem do agente lesivo, das características do tecido ou do órgão afetado e da coexistência de outros estados patológicos.

Após o desencadeamento da reação inflamatória observa-se uma primeira fase chamada aguda. A seguir, esta reação pode tornar-se crônica, dependendo do estímulo ser ou não persistente, ou então ocorrer a resolução do processo devido à eliminação do estímulo ou agente causal.

A formação do exsudato inflamatório, em função da permeabilidade vascular, desempenha um papel importante no processo inflamatório. Água, sais minerais e proteínas

plasmáticas formam o componente fluido do exsudato; o infiltrado de leucócitos, que migra para o local da injúria, constitui o componente celular. Durante a fase inflamatória inicial aguda, os neutrófilos podem constituir-se na maior parte do infiltrado celular (POPPER, 1974) e suas funções relacionam-se à fagocitose dos elementos que desencadearam a reação inflamatória (DALE, 1984). No estágio tardio da fase aguda e na inflamação crônica, predominam os leucócitos mononucleares (BROWN et al., 1978). Os macrófagos são células multifuncionais que participam, não só da fase crônica da reação inflamatória e da regulação da resposta imune, como também do desencadeamento e modulação de vários eventos da fase aguda da inflamação (WEIR, 1984).

O exsudato inflamatório contém vários mediadores que influenciam as células adjacentes e os próprios vasos sanguíneos. Estes mediadores incluem os componentes da cascata enzimática do sistema complemento, os quais podem gerar outros componentes que promovem a liberação de mediadores inflamatórios (COLTREN, 1992), fatores quimiotáticos de leucócitos (NOSSAL, 1987) e outras substâncias como as citocinas, que são potentes mediadores da resposta inflamatória e imunológica, as quais podem ser produzidas por um grande número de tipos celulares (CHATENOUD et al., 1990).

O modo pelo qual os leucócitos migram da circulação para os sítios de inflamação aguda e crônica, com alta especificidade sem afetar os tecidos não lesados, parece estar relacionado à aderência de populações específicas destas células ao endotélio vascular. Glicoproteínas ou Lectinas para adesão celular, as LEC/CAMs, coordenam a cascata celular de ativação, adesão e migração de leucócitos (LASKY, 1991); em adição, as respostas inflamatórias envolvem a formação e acúmulo de mediadores bioativos como o fator de agregação plaquetária (BAZAN, 1995).

Mais recentemente foi demonstrado que o óxido nítrico (NO) possui importante papel na regulação da resposta-imunes contra parasitas (WELL et al., 1995). Os linfócitos T CD8<sup>+</sup>

e interferon-gama (INF- $\gamma$ ) desempenham papel importante na regulação da óxido-nítrico-sintase no fígado o que, por sua vez, contribui para a resposta protetora deste órgão à ação deletérica dos parasitas. Esses componentes induzem os hepatócitos ou células de Kupffer a produzirem NO, o qual tem ação anti-parasitária importante (SEGUIN et al., 1994).

## 1.2. FÍGADO E SUAS LESÕES

### a. *Hepatotoxicidade e Lesões Hepáticas*

No início deste século, a hepatotoxicidade experimental passou a ser utilizada como modelo para o estudo das patologias hepáticas encontradas no homem ou em animais. Uma série de trabalhos sobre a lesão hepática provocada pelo clorofórmio foi publicada nesta época. Nos anos 30, foram realizados, conforme citação de ZIMMERMAN (1978) outros estudos sobre a toxicidade do tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>), pois o uso deste agente como vermífugo provocou doenças hepáticas e a morte de muitas pessoas. Desde então, um grande número de trabalhos foram realizados utilizando este e outros agentes farmacológicos como modelo para o estudo de lesões hepáticas.

A maioria dos eventos patológicos no fígado mostra um considerável grau de preferência zonal. A razão desta preferência ainda não está totalmente esclarecida, mas pode ser compreendida pelas alterações da macro e microcirculação, respostas imunológicas diferentes, bem como os vários aspectos do zoneamento do metabolismo e da biotransformação hepática, os quais são compatíveis com a configuração zonal acinar (GEBHARDT, 1992).

### b. *Metabolismo Hepático de Drogas*

Com relação ao metabolismo hepático de drogas e produtos químicos, duas fases fundamentais constituem o processo. A fase I envolve reações catalisadas pelas diversas

isoformas do citocromo P-450 e a fase II corresponde as reações cujos metabólitos gerados na fase I são conjugados com glutathione, sulfeto e ácido glicurônico entre outros, para facilitar a eliminação (ALLAMEH et al., 1997). Os compostos que sofrem bioativação habitualmente são produzidos na fase I e os compostos resultantes dependerão do nível hepático das enzimas transferases e dos substratos que participarão na fase II.

Um exemplo comum é de compostos que são bioativados por exemplo no fígado os quais, primeiramente esgotam a reserva de glutathione para, em seguida, exercerem seu efeito hepatotóxico (GAO et al., 1996; ALLAMEH et al., 1997). Esta toxicidade pode ser inibida experimentalmente elevando-se o conteúdo de glutathione reduzida (GAO et al., 1996) ou empregando-se inibidores do citocromo P-450, que impedirão a bioativação (HAMMOND et al., 1996; RODRÍGUEZ & ACOSTA; 1997).

As substâncias reativas produzidas pelo metabolismo de agentes lesivos como CCl<sub>4</sub>, paracetamol, galactosamina, entre outros, podem se ligar a macromoléculas celulares, iniciando uma variedade de reações incluindo peroxidação lipídica, mudanças no estoque de energia celular e interferência na síntese de proteína (TSAI et al., 1997; GILANI et al., 1998).

Estudos recentes sugerem que a toxicidade de agentes lesivos ao fígado não está limitada a um efeito direto do agente sobre os hepatócitos. Nas lesões hepáticas existem também a participação de leucócitos (LASKIN, 1990). Estas células, tornando-se ativadas, liberam grande quantidade de mediadores altamente reativos que podem ser inflamatórios, citotóxicos ou vasoativos, tais como: superóxido e peróxido de hidrogênio, óxido nítrico, leucotrienos, enzimas proteolíticas, fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas (IL) e fator ativador de plaquetas (PAF). Tais mediadores possuem a capacidade de lesar o tecido e, portanto, as células que os produzem participam dos processos fisiopatológicos levando à toxicidade.

As células de Kupffer estão fortemente implicadas na patogênese da lesão hepática induzida pela galactosamina, CCl<sub>4</sub>, acetaminofeno e outros. Isso é confirmado pelo fato de se observar um efeito hepatoprotetor quando os animais são tratados com cloreto de gadolínium ou sulfato de dextrana, os quais bloqueiam as funções das células de Kupffer (LASKIN, 1990).

Morfologicamente, a lesão hepática pode manifestar-se de diferentes formas: através do acúmulo de lipídios dentro dos hepatócitos (esteatose); aparecimento de processos degenerativos levando à morte celular (necrose) e diminuição ou cessação do fluxo biliar (colestase).

Assim, as lesões hepáticas podem levar a alterações estruturais, funcionais e bioquímicas que, convencionalmente, podem ser avaliadas pelo uso de testes que refletem sua: a) estrutura (celular); b) atividade de síntese (albumina, bilirrubina e tempo de protrombina); c) atividade excretória/secretória, determinação do fluxo biliar, excreção hepática, medidas do conteúdo hepático de lípidos e da permeabilidade celular, através das enzimas liberadas no plasma como fosfatase alcalina (AP), 5'-nucleotidase (5'-NT),  $\gamma$ -glutamil transferase (gama-GT), aspartato amino transferase (AST), alanina amino transferase (ALT), lactato desidrogenase (LDH), ornitina carbamil transferase (OCT), e sorbitol desidrogenase (SDH). Essas enzimas são liberadas devido à lesão e aumento da permeabilidade celular.

### 1.3. PLANTAS MEDICINAIS

#### a. *Malária, Plantas Medicinais e Citotoxicidade*

O uso de plantas medicinais muitas vezes representa o único recurso terapêutico para determinadas populações. Tem sido descrito que as plantas são importantes fontes de drogas para o tratamento da malária e das febres a ela associada (KIRBY et al., 1993)

LIKHITWITAYAWUID et al., 1993). A quinina, o antimalárico mais usado a dezenas de anos, é um produto de origem vegetal obtido a partir de uma espécie do gênero *Cinchona* (GOODMAN, 1996). A artemisinina obtida da *Artemisia annua*, uma planta da medicina tradicional chinesa, é o mais novo antimalárico usado no tratamento de cepas resistentes à quinina (DEWICK, 1989). Assim, muitas espécies tradicionalmente empregadas com esta finalidade merecem um exame cuidadoso usando métodos científicos modernos (WRIGHT et al., 1990; PHILLIPSON et al., 1991).

Os hepatoprotetores de origem vegetal mais estudados cientificamente são os flavonóides. Do ponto de vista farmacológico e clínico, as substâncias mais estudadas são os flavonóides silimarina e silibina da *Silybum marianum* (WAGNER, 1981).

A avaliação da atividade biológica de compostos obtidos de plantas medicinais deve incluir, além dos testes farmacológicos, um estudo referente à toxicologia dos compostos. O modelo de cultura celular vem ganhando espaço em estudo de toxicologia, principalmente pela redução do número de animais utilizados e por serem testes altamente sensíveis (RENZI, 1993). Mais recentemente, observou-se que é possível estabelecer relações entre a citotoxicidade e a toxicidade aguda oral ou DL<sub>50</sub> (CLEMEDSON et al., 1996). Além disso, a cultura celular permite o estudo do mecanismo de ação de drogas (BRUNER et al., 1996).

Os testes de citotoxicidade de um composto incluem a avaliação de múltiplos alvos celulares, (PHILLIPS, 1996) assim como a utilização de células que possuem capacidades distintas de metabolização de xenobióticos (PONSODA, 1995). Para os testes de citotoxicidade, diferentes tipos de células podem ser empregados. A linhagem V79 de fibroblastos é comumente utilizada com vantagens (CLEMEDSON et al., 1996).

As células V79 são clones de fibroblastos do pulmão do hamster chinês selecionados após modificação genética introduzida por SV40, ou vírus do sarcoma 40 (FRESHNEY, 1994). Como todos os fibroblastos, esta linhagem é dependente de ancoragem e possui um

tempo de duplicação de aproximadamente 14 horas (CINGI et al., 1991). Outra característica importante dessas células é que elas apresentam um genoma diplóide e estável (CERNÁKOVÁ et al., 1993).

As células V79 oferecem bons resultados nos testes de citotoxicidade quando os efeitos tóxicos observados são provocados diretamente pela droga em estudo e não por seus metabólitos. Isto se deve ao fato de que os microsomas dessas células não possuem expressão do citocromo P-450, sistema responsável pela metabolização de drogas (FENTEN et al., 1992; FRY et al., 1993). Por este motivo, os ensaios de citotoxicidade empregando células V79 representam um modelo para avaliar efeitos citotóxicos inespecíficos devido a ações diretas das drogas sobre as células (CLEMEDSON et al., 1996).

Quando se deseja estudar efeitos citotóxicos mais específicos induzidos pela metabolização de drogas são utilizadas culturas de hepatócitos (PONSODA et al., 1995). A cultura de células hepáticas mais empregada na atualidade é a cultura primária de hepatócitos humanos ou de rato, por apresentar melhor correlação com os dados da toxicidade *in vivo* (CLEMEDSON et al., 1996).

Os hepatócitos são células dependentes de ancoragem que não proliferam em cultura primária (FRY & HAMMOND, 1993) e, normalmente, apresentam um ou dois núcleos (BERTHIAUME et al., 1996). A cultura primária de hepatócitos deve ser utilizada levando-se em conta que, após isolamento, as células começam a perder rapidamente sua capacidade de diferenciar-se e, após um certo período, suas funções tornam-se alteradas. Foi estabelecido que, 48 horas após o isolamento, os hepatócitos humanos e de ratos perdem 85% do valor inicial do citocromo P-450, sendo que as diferentes isoformas deste citocromo têm decréscimos individuais variáveis (HAMMOND & FRY, 1996).

Os testes de citotoxicidade podem ser classificados em quatro categorias dependendo do alvo celular avaliado. A primeira pertence aos ensaios que avaliam alterações da

permeabilidade da membrana celular; neste grupo se enquadram os testes de inclusão e exclusão de corantes, os de liberação intracelular de substâncias exógenas e de substâncias endógenas como a enzima lactato desidrogenase. A segunda categoria reúne os testes que avaliam funções metabólicas da célula; pertencem a esse grupo os ensaios que detectam níveis celulares de ATP, ADP, AMP, DNA e proteínas, assim como os que determinam os gradientes de íons e aminoácidos, a atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase e a incorporação do corante vermelho neutro pelos lisossomos. Na terceira categoria estão agrupados os ensaios que avaliam alterações morfológicas das células, como a formação de vesículas da membrana celular, mudanças no volume da célula e modificações do citoesqueleto. No quarto e último grupo encontram-se os testes que avaliam os efeitos das drogas sobre a reprodução celular; neles estão incluídos os ensaios de formação de colônias e de velocidade de crescimento (COOK & MITCHELL, 1989; FRESNEY, 1994).

Dentre os testes de citotoxicidade de utilização mais comum encontram-se o da redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolium) ou MTT que avalia a atividade da enzima succinato desidrogenase e origina, como produto, o formazan, um composto azul que é solúvel em solventes orgânicos (MOSMAMM, 1983). Este ensaio estima o número de células viáveis e mostra-se apropriado na avaliação dos efeitos citotóxicos (CLEMEDSON et al., 1996).

Quando se trabalha com culturas de linhagens celulares que possuem genoma homogêneo e estável, como as células V79 que é diplóide (CERNÁKOVÁ et al., 1993), ou no caso de culturas estáticas (não proliferativas) de curta duração, como a cultura de hepatócitos, mesmo que não sejam células de genoma homogêneo, o número de células após tratamento com a droga pode ser estimado a partir do conteúdo de DNA na cultura (CINGI et al., 1991). Este tipo de ensaio compreende um modo adicional de estimar a citotoxicidade.

## b. *Croton cajucara* e Malária

A espécie *C. cajucara* Benth., pertencente à família Euphorbiaceae, vem sendo popularmente comercializada no "Ver o Peso", de Belém do Pará para o tratamento de variados sinais e sintomas da malária e é conhecida com o nome de sacaca, que significa "feitiço" (SIMÕES, 1986).

A *C. cajucara* ou sacaca é uma planta tipicamente brasileira, endêmica da região Amazônica, sendo citada como espécie medicinal no Acre e Amazonas (DI STASI et al., 1989). O chá da casca de sacaca é tido como auxiliar no tratamento de malária e também contra diabetes, inflamação do fígado, vesículas e rins, e para baixar os níveis de colesterol (VAN DER BERG, 1982). O chá das folhas é utilizado pelos índios Tenharins (Humaitá - AM) contra dores de estômago, febres, icterícia e malária. A hepatite é tratada incluindo-se as folhas de melão-de-São-Caetano ou *Mormodica charantia* L., no preparo do chá (DI STASI et al., 1989).

A sacaca é um arbusto grande que pode alcançar até 6 metros de altura com folhas pecioladas, biglandulosas, estipuladas, lanceoladas, longo-agudíssimo-acuminadas, perinervadas, verdes ou pardacentas, com até 14 cm de comprimento (figuras 1 e 2 ). As flores são dispostas em racemos terminais de 6 a 9 cm de comprimento e os frutos são tri-loculares (PIO CORREA, 1984).

Uma revisão bibliográfica do gênero *Croton* mostrou que de outra espécie, a *C. sublyratus*, foram isoladas diterpenolactonas denominadas de plaunol A, B, C, D e E muito semelhantes à trans-desidrocrotonina (DHC) isolada das cascas de *C. cajucara* as quais foram patenteadas para atividade antiúlcera (KITAZAWA et al., 1980). O problema relativo à não utilização das substâncias descritas e patenteadas pelo grupo de Kitazawa e colaboradores, foi de que o rendimento obtido para as substâncias ativas puras era de 1,5 - 4,5 g partindo-se de 85 Kg de material vegetal seco. Já na espécie em estudo, são obtidas entre 5 e 6 g de DHC para cada quilo de cascas do caule de *C. cajucara*.



Figura 1 - *C. cajucara* em seu habitat.



Figura 2- As cascas do caule *C. cajucara*.

## ***II. OBJETIVOS***

---

Considerando que a sacaca ou *Croton cajucara* Benth. é utilizada popularmente em “inflamações do fígado”, hepatite, febres, icterícia e malária e que o seu uso popular parece estar mais associado aos sinais e sintomas produzidos pela infecção malárica do que propriamente sobre o parasita em si, foram objetivos deste trabalho:

- investigar as ações farmacológicas do infuso, do óleo e DHC, sobre o processo inflamatório, uma vez que células e mediadores inflamatórios estão envolvidos na infecção malárica, utilizando modelos clássicos de inflamação como granuloma *cotton pellet*, o edema de pata induzido pela carragenina e estudo do exsudato peritoneal;
- avaliar se as substâncias em estudo são capazes de proteger o fígado em testes *in vitro* utilizando células íntegras e lesadas e em estudos *in vivo*;
- investigar o efeito das substâncias presentes na *Croton cajucara* sobre o agente etiológico da malária, os protozoários do gênero *Plasmodium*.

### ***III. METODOLOGIA***

---

### 3.1. ANIMAIS

Ratos e camundongos foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB) e mantidos em condições controladas de temperatura ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ), umidade ( $55 \pm 5\%$ ), luminosidade (ciclos de claro-escuro de 12 horas) e recebendo água e ração (Nuvilab<sup>®</sup>) *ad libitum*. Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso corporal variando entre 120 a 250 g, aclimatados previamente às condições do laboratório por 7 dias. Os animais foram reunidos ao acaso, em grupos de 5 à 7, submetidos a jejum, dependendo do experimento. Camundongos Balb/c e Swiss também foram utilizados com o peso corporal variando entre 25 a 30g e mantidos em nosso biotério sob as mesmas condições.

Foram utilizadas aves (pintos híbridos de corte) *Gallus gallus domesticus* de até duas semanas de idade, adquiridas em granjas ou estoque comerciais. As aves foram mantidas em gaiolas metálicas limpas diariamente e providas de ração (Cargil Agrícola S.A.) e água *ad libitum*. O aquecimento das aves foi feito através de lâmpada elétrica de 60 volts acoplada à gaiola.

### 3.2. OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

#### a. *Cascas da Planta*

As cascas de sacaca ou *Croton cajucara* foram obtidas a partir de uma coleta realizada pelo Prof. Dr. Domingos S. Nunes, em uma plantação experimental, na localidade de Benfica, próxima à Belém, Pará, Brasil. Um “voucher” florido da espécie, número 247, foi identificado pelo Sr. Nelson A. Rosa e depositado no herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi - Belém.

Todos os estudos foram realizados comparando-se a forma de utilização popular da *C. cajucara* (infuso a 5%), o óleo essencial e a DHC isolada, sempre que

possível. Isto se deve ao fato de que a população utiliza as cascas na forma de chá que contém, em sua composição, tanto DHC quanto óleo essencial. Todos os componentes do chá preparados na forma de infuso, bem como a composição do óleo, foram quantificados por cromatografia gasosa mediante utilização de padrões analíticos.

#### b. Isolamento da DHC

As cascas secas do caule da espécie *Croton cajucara* foram extraídas à quente, em soxhlet, por 12 horas com uma solução de água e etanol 3:7, originando o extrato hidroalcoólico bruto a 70% (EHB). O EHB de *C. cajucara* foi seco e submetido a fracionamento por cromatografia de coluna e submetido a posterior isolamento de substâncias, que seguiu os processos fitoquímicos habituais. A substância majoritária obtida foi cristalizada três vezes com isopropanol obtendo ao final, cristais de coloração branca, com 98% de pureza. A substância foi identificada, por métodos espectroscópicos (RMN, IV e massa), como trans-desidrocrotonina, uma sesquiterpenolactona que foi codificada como DHC (figura 3). O rendimento final do processo de obtenção de DHC a partir das cascas foi de 0,5%, (KUBO e t al., 1991).

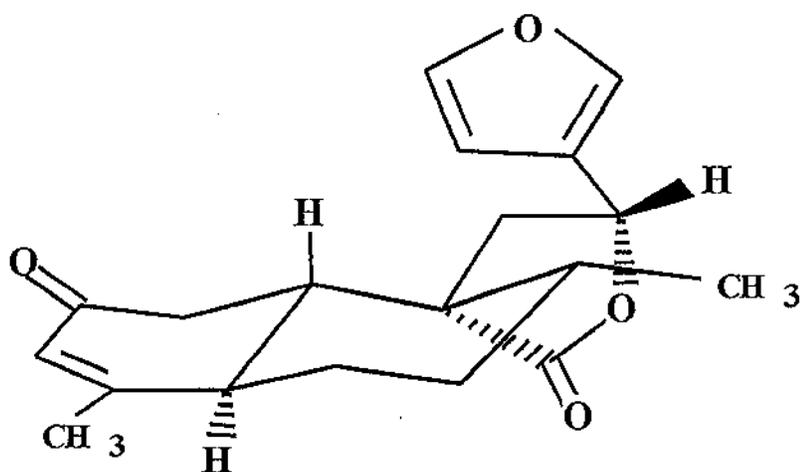


Figura 3 - Estrutura química espacial da DHC

### c. *Infuso*

O infuso das cascas de *C. cajucara* foi preparado imediatamente antes da sua utilização em cada ensaio experimental. Para a seleção da concentração utilizada nos experimentos foi considerado a forma pela qual a população utiliza o chá das cascas. Às 5 g do pó finamente triturado das cascas de sacaca foram adicionados 95 ml de água fervente e mantidos em recipiente fechado. Após 30 min o infuso foi filtrado em tecido de nylon e a solução obtida foi administrada em dose-volume final equivalente a 10 ml/kg. A análise da composição do infuso pode ser observada no registro cromatográfico de RMN  $C^{13}$  (anexo 1).

### d. *Óleo essencial*

A extração do óleo da sacaca foi feita por arraste a vapor d' água a partir das cascas frescas. O óleo essencial obtido apresentou odor agradável, doce, madeiroso, com coloração levemente amarelada, cujo rendimento final foi de 1%, o qual é compatível com trabalhos previamente realizados (ARAÚJO et al., 1971). Através de técnicas de CG/EM,  $^{13}C$  e RMN foi possível caracterizar alguns dos principais constituintes do óleo tais como:  $\alpha$ -pineno, canfeno, linalol, Z-cariofileno, calareno, germacreno, entre outros. Porém, dois constituintes, o  $\alpha$ -copaeno (21%) e o cipereno (29%) se destacaram quantitativamente na análise e foram caracterizados como os constituintes majoritários do óleo essencial. Estudos mais aprofundados acerca de sua composição estão em desenvolvimento (NUNES, *in press* ).

### 3.3. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

#### 3.3.1. Modelos de Inflamação

##### a. *Granuloma Cotton Pellet*

O método do granuloma *cotton pellet* desenvolvido por SWINGLE & SHIDEMAN, (1972) foi realizado utilizando ratos albinos Wistar machos, com peso corporal variando entre 200 a 250g. Foram separados, ao acaso, em grupos de 7 animais, submetidos a jejum de 12 horas antes do início do ensaio. Neste experimento, as doses utilizadas de DHC, óleo ou infuso foram determinadas a partir da DL<sub>50</sub> de cada substância e de resultados obtidos pelo nosso grupo quando investigada a atividade antiulcerôgena dessas substâncias (SOUZA BRITO et al., 1998; HIRUMA-LIMA et al., 1999). Estes animais foram tratados oralmente, por *gavage*, com diclofenaco sódico (Voltaren®; Geigy) na dose de 5mg/Kg (controle positivo); veículo utilizado para dissolução de todas as amostras (tween 80 a 12%) no volume final de 10ml/kg (controle negativo), infuso a 5% na dose-volume de 10 ml/Kg, óleo essencial e DHC na dose de 100 mg/Kg.

Decorridos trinta min, os animais foram anestesiados com uma mistura do pré-anestésico: solução aquosa a 2% de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Rompun®; Bayer) na dose de 0,01mg/Kg e cloridrato de ketamina (vetanarcol; König®) na dose de 50 mg/Kg e submetidos à adrenalectomia. Imediatamente após a cirurgia, foi implantado no dorso de todos os animais, subcutaneamente, um *pellet* de fio de algodão de aproximadamente 20-30 mg (controle do peso do pellet) previamente esterilizado em calor úmido (autoclave, 20-30 min à 121°C).

O *pellet* foi retirado 6 dias após a implantação. Durante este período, todos os grupos de animais receberam diariamente administrações das mesmas substâncias citadas anteriormente. Um dia após o último tratamento, o *pellet* foi retirado, seco a

70°C por 18 horas e finalmente então, seu peso seco determinado. Deste valor foi subtraído o peso inicial do *pellet* e o valor obtido foi considerado como relativo à fase proliferativa (celular) da resposta inflamatória. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. do aumento do peso do *pellet*.

#### b. *Edema de Pata Induzido por Carragenina*

Foram utilizados camundongos Swiss machos, com peso corporal variando entre 25 a 30 g, submetidos a jejum prévio de 12 horas, separados em grupos de 7 animais cada, por tratamento. Os grupos foram tratados com indometacina (Sigma) na dose de 20 mg/Kg, s.c. (controle positivo) e oralmente por gavagem com Tween 80 a 12% no volume de 10 ml/Kg (controle negativo), com DHC e óleo essencial na dose de 100 mg/Kg, e infuso a 5% no volume de 10 ml/Kg. Os tratamentos foram feitos 30 min antes da injeção subcutânea de 300  $\mu$ l de solução de carragenina à 1% na região subplantar da pata posterior direita e 300  $\mu$ l de solução fisiológica na pata posterior esquerda. Após 4 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e tiveram suas patas posteriores amputadas na articulação tibio-társica (LEVY, 1969). Cada uma das patas foi pesada separadamente e a diferença de peso entre elas foi considerada como o edema produzido pela carragenina. Os valores obtidos foram apresentados como porcentagem de inibição da resposta edematogênica. Como apenas o óleo essencial apresentou efeito antiedematogênico significativo, foi realizada uma curva dose-resposta do mesmo.

Os grupos foram tratados com indometacina na dose de 20 mg/Kg (controle positivo), preparada em bicarbonato de sódio 5%, administrada por via s.c, com veículo (controle negativo) e com o óleo essencial nas doses de 50, 100 e 200 mg/Kg. Seguiu-se então o mesmo protocolo descrito para o experimento inicial.

### *c. Migração de Neutrófilos para a Cavidade Peritoneal*

A metodologia para padronizar a técnica foi descrita por POPPER & WATNICK (1974) com algumas modificações. Camundongos albinos Balb/c machos, com peso corporal variando entre 25 a 30g, foram separados aleatoriamente em grupos de 5 animais, submetidos a jejum prévio de 12 horas. Os animais foram tratados intraperitonealmente com lipopolissacarídeo (LPS, Sigma) na dose de 0,1 ml/cavidade peritoneal na concentração de 2000 ng/ml (controle positivo), com o veículo utilizado para a dissolução do LPS, solução de fosfato de sódio tamponada (PBS) no volume de 0,1 ml/cavidade (controle negativo) e foram tratados (p.o.) trinta min antes da administração de LPS e do PBS. Os animais receberam infuso (10 ml/Kg), óleo essencial (100 mg/Kg), DHC (100 mg/Kg), ou Tween (controle negativo) pela via oral. Indometacina (20 mg/Kg diluída em solução de bicarbonato de sódio 5%; s.c) e glicocorticoide (fosfato dissódico de dexametasona- Decadron® 0,5mg/Kg; s.c) foram usados como controle positivo. Com exceção dos demais, a dexametasona foi administrada 1 hora antes do estímulo. Os animais foram inoculados e aguardaram 6 horas antes da coleta do lavado peritoneal. Sob efeito da anestesia com éter, uma incisão foi feita na pele do abdômem do animal, onde foi administrado lentamente 3 ml de meio RPMI (meio de inositol, ribose e fosfato). O abdômem do animal foi massageado por aproximadamente 2 min para formar um homogenato de células peritoneais. Imediatamente após este procedimento foi coletada a maior quantidade possível do lavado peritoneal, o qual foi depositado em frascos imersos em gelo, mantendo assim a viabilidade celular. Foi retirada uma alíquota deste concentrado celular e foi feita uma diluição de 1/20 com solução de Turk (3 ml de ácido acético glacial-Merck- em 0,1 ml de solução de cristal violeta a 1%-Merck em

96 ml de água destilada). A contagem de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer.

A seguir, o lavado peritoneal foi processado em citocentrífuga no volume de 65µl a 1250 rpm/7 min, para obter-se o material a ser empregado na preparação das lâminas para a contagem qualitativa dos leucócitos. As lâminas secas foram posteriormente coradas com Giemsa, com tempo de 10 min de fixação e de coloração. Em microscópio óptico foi feita a contagem diferencial dos leucócitos em 100 células, em objetiva de imersão e os resultados expressos em número de células/ml.

### **3.3.2. Ensaio Toxicológico *In Vitro***

#### *a. Cultura de fibroblastos – Células V79*

Foram utilizados clones de células V79 de fibroblastos de pulmão de hamster chinês provenientes de uma linhagem do laboratório do Prof. Rogério Meneghini, Instituto de Química, USP, SP.

As células foram cultivadas em meio DMEM (meio Eagle modificado por Dulbecco) suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10%, penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml), (todos da Nutricell – Campinas, SP). A incubação das células foi sempre realizada em estufa de cultura (Forma Scientific, Inc., modelo 3158) a 37°C, sob atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>, até atingirem o estado de semiconfluência (metade da área disponível preenchida).

Os fibroblastos foram mantidos em cultura contínua, através de repiques periódicos quando atingiam densidade de confluência. As células foram descoladas usando solução de tripsina-EDTA (tripsina – Sigma 1:250), a tripsina foi preparada a 0,1% e o EDTA a 0,016% todos em solução PBS sem cálcio e magnésio.

A composição da solução usada de PBS sem cálcio e sem magnésio em mM foi de: (136,9 de NaCl; 2,68 de KCl; 6,4 de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 1,46 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) pH 7.2.

Todos os experimentos de citotoxicidade com células V79 foram realizados antes das células atingirem a passagem de número 60. As células V79 foram plaqueadas na densidade de 3.10<sup>4</sup> células/poço em placas de cultura de 24 pocinhos (Corning, N° 25820-24) e cultivadas em estufa nas condições descritas anteriormente. Após atingirem o estágio de semi-confluência (48 horas) as células foram tratadas, durante 24 horas, em quadruplicata com diferentes concentrações de DHC, óleo essencial e infuso da *C. cajucara* dissolvidos em meio DMEM contendo 10% de SFB e 1% metanol, previamente esterilizado por filtração em membrana de poro 0.22 µm (Millipore). Estudos prévios tem demonstrado que o metanol 1% não interfere na viabilidade celular (BOREFREUND & PUERNER, et al., 1984),

### **3.3.3. Cultura Primária de Hepatócitos**

Os hepatócitos utilizados nestes experimentos foram obtidos do fígado de ratos Wistar machos pesando entre 200-250 g.

Para o isolamento das células hepáticas utilizou-se a técnica da perfusão do fígado, em duas etapas, com colagenase como descrito por SEGLEN (1976) e modificado por GUGUEN-GUILLOUZO & GUILLOUZO (1986). Os animais foram anestesiados com éter e imediatamente a pele foi lavada com solução de etanol 70%. Em seguida, foi realizada uma incisão na pele do animal desde a porção inferior do abdome até a base do pescoço. Após identificar e isolar a veia jugular, uma dose intravenosa de 100 UI/100g de peso corporal de heparina de sódio (Liquemine, Roche) foi administrada. Rapidamente, a parede muscular do abdome foi aberta e a veia porta hepática isolada.

A veia porta foi canulada, e os demais vasos sanguíneos foram seccionados (artérias e veias hepáticas), iniciando rapidamente, a perfusão *in situ* do fígado com 500 ml de uma solução tampão pH 7.65 à 37°C de Hepes sem cálcio (composição em mM: 160.8 de NaCl; 0.7 de Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 12H<sub>2</sub>O; 20 de Hepes). A velocidade de fluxo foi fixada em 25 ml/min utilizando-se uma bomba peristáltica (Cole-Parmer, modelo Masterflex 7518-10). Todo o procedimento cirúrgico foi realizado em condições estéreis. Após 20 min a solução foi substituída por 300 ml de uma solução de tampão Hepes, pH 7.65, contendo 25 mg/100ml de colagenase (Tipo IV, Sigma) e CaCl<sub>2</sub> 5,1 mM e a velocidade do fluxo fixada em 15 ml/min

Após a perfusão, o fígado foi retirado e levado para o fluxo laminar, onde rapidamente foi picotado várias vezes e suspenso em meio Leibovitz (L-15 - Nutricell) sem soro. Após breve homogeneização, a suspensão de fígado foi filtrada em gaze estéril e deixada em repouso por 20 min. Foi descartada a metade do volume e o sedimento foi centrifugado 3 vezes sucessivas a 700 r.p.m. por 45 segundos, trocando o meio a cada centrifugação para lavar e eliminar a colagenase das células. A viabilidade dos hepatócitos, após o isolamento, foi avaliada pelo método de exclusão Azul Trypan, sendo utilizada somente quando o rendimento final era superior aos 90% de viabilidade.

Para o plaqueamento dos hepatócitos foi seguido o seguinte protocolo: as células foram semeadas em placas de cultura de 24 poços em densidade de  $3 \cdot 10^5$  células/poço/ml de meio Ham-F12. O meio foi suplementado com soro fetal bovino SFB (10%), albumina de soro bovino (0,2% Fração V, Sigma), insulina bovina (0,1 UI/ml), dexametasona (1  $\mu$ M), penicilina (50 UI/ml), estreptomicina (50 ug/ml), incubado em estufa de cultura a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> (JOVER et al., 1992).

Quatro horas após o plaqueamento, tempo necessário para a aderência das células, o meio foi trocado para remoção das células não aderidas. Foi adicionado então meio sem soro contendo diferentes concentrações de DHC, óleo essencial, e infuso de *Croton cajucara*. As células foram tratadas durante 20 horas e cada concentração dos compostos foi testada em quadruplicata. O experimento foi repetido duas a três vezes usando hepatócitos isolados de animais diferentes.

Os estudos de citotoxicidade foram realizados dentro de 24 horas após o isolamento para reduzir a influência de alterações funcionais que sofrem os hepatócitos em cultura primária (GUGUEN-GUILLOUZO et al., 1988; HAMMOND & Fry, 1996). As concentrações utilizadas de cada material, em mg ou  $\mu\text{M}$  por ml de meio, estão descritas na parte de resultados, nos gráficos correspondentes.

#### a. Redução do brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT)

O ensaio de redução do MTT foi realizado de acordo com DENIZOT & LANG (1986). Após tratamento, as células foram lavadas com uma solução PBS a  $37^{\circ}\text{C}$  e incubadas com 1 ml de meio sem soro contendo MTT (0,5 mg/ml/poço). Após 4 horas de incubação o sobrenadante foi retirado e foi colocado 1 ml de etanol em cada poço para dissolver o formazan formado. Após 15 min de agitação, foi registrada a absorvância da solução de etanol em um espectrofotômetro (Beckman Du 640 B) a 570nm. Este procedimento foi utilizado para avaliar a viabilidade de hepatócitos e de células V79.

#### *b. Conteúdo de DNA*

A viabilidade celular foi avaliada à partir do número de células nos pocinhos tratados e no controle foi estimado a partir do conteúdo de DNA (CINGI et al., 1991). Após o tratamento, as células foram lavadas duas vezes com PBS-Ca<sup>2+</sup> gelado e fixadas durante 5 min com 1ml de solução aquosa a 5% de ácido tricloroacético (TCA) por poço. O TCA foi descartado e adicionado 1 ml de etanol gelado por poço. O etanol foi deixado durante 5 min para lavagem e descarte dos nucleotídeos solúveis. Finalmente, as células foram dissolvidas com 1ml de solução 0,5M de NaOH por poço, durante 1 hora à 37°C e a absorvância obtida em espectrofotômetro à 260nm. A absorvância a 260 nm da fração de NaOH foi utilizada como índice do número de células (BIANCHI & FORTUNATI, 1990).

#### *c. Preparo das substâncias para tratamento*

O infuso obtido, na concentração de 5% como descrito anteriormente, foi utilizado no preparo do meio DMEN ou Ham-F12 com o antibiótico. Diferentes diluições dessa solução foram usadas no ensaio.

O óleo, foi primeiramente dissolvido em metanol 1% e a seguir em meio de cultura DMEN ou Ham-F12. Ao controle foi adicionado a mesma concentração de metanol.

O experimento com DHC foi realizado utilizando-se diferentes concentrações da substância dissolvidas em metanol a 1% e em meio DMEN ou HAM-F12.

#### *d. Estudo do efeito hepatoprotetor do óleo essencial*

As culturas de hepatócitos foram preparadas como descrito anteriormente. As células foram primeiramente tratadas com óleo essencial derivado de sacaca e

posteriormente lesadas com cumarina (Sigma), um agente tóxico para células hepáticas (FENTEM et al., 1992). Quatro horas após o isolamento, os hepatócitos foram tratados com o agente supostamente hepatoprotetor que permaneceu na cultura durante 14 horas. Após esse tempo o meio contendo o agente hepatoprotetor foi retirado e foram realizados diferentes tipos de tratamento: 1) meio contendo metanol 1%, veículo utilizado para diluição do óleo; 2) meio contendo cumarina, 3) meio contendo o agente supostamente hepatoprotetor mais a cumarina. A concentração do óleo utilizada foi 50µg/ml, enquanto que a de cumarina foi 600 µM.

### **3.3.4. Modelos de Lesão Hepática**

#### *a. Hepatite induzida pela d-galactosamina*

A metodologia seguida foi aquela descrita por DUMONT et al. (1987). Foram utilizados ratos Wistar albinos machos que foram separados em grupos de 5 cada. Os grupos foram tratados com infuso a 5% (10 ml/Kg), óleo essencial (100 mg/Kg), DHC (100 mg/Kg), Tween 80 a 12% e salina (10 ml/Kg), os dois últimos utilizados como grupos controle. Todos os animais receberam por via i.p. uma solução neutra de cloridrato de galactosamina (Sigma) na dose de 500 mg/Kg, além de um grupo de animais que recebeu somente salina, i.p., no intuito de verificar o efeito produzido pela galactosamina.

Para determinação das transaminases foram coletadas amostras de sangue, por punção do plexo retro-orbital, de todos os animais no tempo 0 (antes da administração das substâncias supostamente hepatoprotetoras). Após 6 horas da administração desses compostos os animais receberam, concomitantemente, o agente hepatotóxico e as substâncias hepatoprotetoras. Para dar continuidade à determinação dos componentes sorológicos (transaminases) foram realizadas novas coletas de sangue às 12 e 24

horas após a administração da galactosamina. Em seguida, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o fígado foi retirado para ser processado e analisado microscopicamente, uma outra parte do fígado foi retirada para fazer a dosagem do glicogênio hepático, descritos no item d.

#### *b. Dosagem das transaminases*

O sangue foi retirado, sem anticoagulante, por punção do plexo retro-orbital, como descrito por KRAUS (1980). As amostras de sangue foram deixadas em temperatura ambiente por 2 horas para ocorrer o processo de coagulação. Logo após, as amostras foram centrifugadas a 4000 r.p.m., durante 5 min, para separar o soro dos outros componentes sanguíneos. O soro foi utilizado para determinação dos níveis de transaminases glutamo-pirúvica (GTP/ALT), glutamo-oxalacética (GOT/AST) e gama-glutamil-transferase ( $\gamma$ -GT). Essas dosagens foram realizadas empregando um analisador bioquímico automático-colorimétrico RA1000 da Technicon, (Laboratório-Prev Lab, Campinas, SP), utilizando kits da Laborlab.

#### *c. Análise microscópica*

Imediatamente após o sacrifício dos animais foram coletadas amostras de fígado. Essas amostras foram fixadas em Bouin, por 24 horas, sendo a seguir desidratadas em série alcoólica etílica crescente, diafanizadas em xilol e posteriormente incluídas em parafina e preparadas para a microtomia. Os cortes, com 6  $\mu$ m de espessura, foram desparafinizados e reidratados utilizando-se série alcóolica etílica decrescente. A seguir, as amostras foram submetidas à coloração com eosina-hematoxilina para posterior análise morfológica dos hepatócitos (YOSHITAKE et al., 1991).

#### d. Dosagem de glicogênio

Inicialmente foi feita uma solução mãe de glicose (20 mg de glicose dissolvidas em 10 ml de água destilada). Desta solução, alíquotas de 25, 50, 100 e 150 µl foram adicionadas a tubos contendo 5 ml de água destilada para se obter as soluções padrão nos seguintes pontos: 10, 20, 40, e 60 ng/ml. Nessa curva foram adicionados fenol e ácido sulfúrico para que a mesma pudesse ser utilizada como curva padrão do ensaio.

Imediatamente após o sacrifício dos animais amostras de fígado (500 mg) foram coletadas e processadas. Os tecidos coletados foram digeridos em KOH 30% à quente e o glicogênio precipitado a partir da passagem por etanol. Entre duas etapas de precipitação a amostra foi centrifugada a 3000 r.p.m. durante 15 min. O glicogênio obtido foi submetido à hidrólise ácida na presença de fenol de acordo com o método de LO (1970). A concentração de glicogênio ( $\text{mg} \times 100 \text{ mg}^{-1}$  de peso úmido) foi determinada pela leitura da absorvância a 490 nm em espectrofotômetro.

#### 3.3.5. Modelos de Malária

Os camundongos foram inoculados por via i.p. com  $1 \times 10^5$  hemácias parasitadas com *Plasmodium berghei* e *P. yoelli* em um volume final de 0.2 ml/animal e as aves, por via i.m., com  $1 \times 10^4$  hemácias parasitadas com *P. gallinaceum*. A parasitemia dos camundongos foi acompanhada em dias alternados a partir do 4º dia após a inoculação sendo, portanto, analisada no 4º, 7º e 9º dia após a infecção. A infectividade foi avaliada através dos seguintes parâmetros:

- 1) período pré-patente da infecção que corresponde ao número de dias decorridos entre a inoculação e o aparecimento de parasitas nas hemácias;
- 2) e a porcentagem de infecção dos camundongos em diferentes grupos inoculados.

Três esquemas de tratamento foram realizados: Grupo (A) animais que receberam infuso 5% (10 ml/Kg), óleo essencial e DHC (100 mg/Kg), durante três dias antes da inoculação do *Plasmodium*. Grupo (B) animais que receberam o mesmo tratamento descrito acima e mais quatro dias após a inoculação do plasmódio. Grupo (C) animais que receberam as drogas em estudo no dia da infecção e o tratamento continuou por mais 3 dias. Além disto, utilizou-se um grupo onde a água dos camundongos foi substituído por infuso, preparado a 5%. O experimento foi acompanhado por um grupo controle, negativo (Tween 80 a 12%) e um controle positivo, cloroquina (100 mg/Kg; Difosfato de cloroquina, Kinder<sup>®</sup> -S.A.). Todas as amostras foram administradas por via oral.

a. *Padronização do inóculo de formas sangüíneas*

Para padronizar o inóculo foi primeiramente determinada a parasitemia das aves e camundongos em esfregaços sangüíneos. O animal que apresentava 10% ou mais hemácias parasitadas foi selecionado e, posteriormente, sangrado pela asa e pela cauda, na ave e camundongo, respectivamente. O sangue foi coletado com anticoagulante (200 µl de citrato de sódio). O número de hemácias por ml de sangue foi determinado através de contagem em câmara de Neubauer após diluição (50 X).

b. *Preparação, Coloração e exame de esfregaços sangüíneos*

O sangue retirado com agulha hipodérmica, das veias da perna de aves inoculadas com *P. gallinaceum* ou da cauda de camundongos inoculados com *P. berghei* serviram para a preparação dos esfregaços. Os esfregaços de camundongos foram confeccionados à partir do 4º dia após a infecção e os de aves foram realizados no 11º dia após infecção. Foram então deixados à temperatura ambiente. A fixação foi

feita com álcool metílico por 1-2 min, e os esfregaços foram corados, por 15 min, com solução de Giemsa. Após esse tempo as lâminas foram lavadas em água corrente, secas em temperatura ambiente e posteriormente, foram examinadas ao microscópio óptico com objetiva de imersão (1000X). A parasitemia foi determinada através da contagem do número de hemácias infectadas em 3000 células. Essa avaliação é feita pela estimativa do número de hemácias distribuídas de forma homogênea por campo microscópico e a partir dessa área, calculado o número de parasitas encontrados em campos sucessivos contados. Os resultados foram expressos em percentagem de hemácias parasitadas (CARVALHO et al., 1992).

### **3.3.6. Análise Estatística**

Para análise estatística dos dados foi utilizada Análise de Variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, Newman-Keuls ou Tukey-Kramer. Nos experimentos de malária os dados em porcentagem foram transformados em arcoseno para pertencer a uma curva normal. Os resultados foram considerados significantes quando as diferenças foram obtidas com  $p \leq 0.05$ .

#### ***IV. RESULTADOS***

---

## 4.1. MODELOS DE INFLAMAÇÃO

### a. *Granuloma Cotton Pellet*

Neste ensaio foi avaliada a atividade antiinflamatória do infuso, óleo essencial e DHC, obtidas de *Croton cajucara* sobre a fase proliferativa da resposta inflamatória em ratos. Os dados estão sumariados na tabela 1 e comparam os resultados dos grupos controle e tratados com as substâncias obtidas de *C. cajucara* e com o diclofenaco sódico.

Tabela 1: Efeito do DHC, óleo essencial e infuso de *Croton cajucara* e do diclofenaco sódico sobre a fase proliferativa do ensaio do granuloma *cotton pellet* em ratos. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m.

Tratamentos	Dose (mg/Kg)	N	Aumento do peso do <i>pellet</i>	% de inibição
			(mg)	
Controle	10 ml/kg	6	26,2 $\pm$ 3,9	—
Diclofenaco	5	6	16,8 $\pm$ 2,9*	35.7
Óleo	100	7	16,1 $\pm$ 2,8**	38
DHC	100	6	18,5 $\pm$ 0,6*	30
Infuso	5%	7	22,1 $\pm$ 6,5	15.3

ANOVA:  $F_{(4,27)} = 5.099$   $p < 0,005$ . Teste de Dunnet\*  $p < 0,01$  \*\* $p < 0.001$

Os resultados obtidos acima demonstram que tanto o óleo essencial, quanto a DHC e o diclofenaco sódico inibiram significativamente a fase proliferativa da resposta ao granuloma *cotton pellet*.

b. *Edema de pata induzido por carragenina*

Neste ensaio foram avaliados os efeitos do óleo essencial (100 mg/kg), DHC (100 mg/kg) e infuso a 5% (10 ml/kg), administrados p.o., sobre a resposta inflamatória induzida por carragenina no teste de edema de pata de camundongos. Os dados desse experimento estão demonstrados na tabela 2. Nesta tabela estão expressos os valores de porcentagem de inibição do edema e o aumento do peso da pata (mg) obtidos para os grupos controle e tratados com óleo, DHC e infuso. Só a indometacina (controle positivo) e o óleo apresentaram atividade anti-edematogênica estatisticamente significativa, 4 horas após a administração da carragenina.

Tabela 2: Efeitos da DHC, óleo essencial, infuso da *Croton cajucara* e da indometacina no edema de pata induzido por carragenina em camundongos. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  e.p.m.

Tratamentos	Dose (mg/Kg)	N	Aumento do peso da pata (mg)	% de inibição
Controle	—	6	73 $\pm$ 9	—
Indometacina	20	6	29 $\pm$ 9**	60%
DHC	100	6	50 $\pm$ 9	32%
Óleo	100	7	46 $\pm$ 6*	37%
Infuso	5%	7	71 $\pm$ 0,11	3%

ANOVA,  $F_{(4,27)} = 4.04$   $p < 0,05$ . Teste de Dunnett: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$

Em um outro experimento, usando o mesmo modelo de edema de pata em camundongos induzido por carragenina, foram avaliados os efeitos do óleo essencial (curva dose-efeito) administrados nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, pela via p.o., sobre a resposta inflamatória. Os dados obtidos nesse experimento estão demonstrados na tabela 3. Nesta tabela estão expressos os valores de porcentagem de inibição do edema e o aumento do peso da pata (mg) obtidos para os grupos controle e para aqueles tratados com óleo nas diferentes doses. A indometacina (controle positivo) e as diferentes doses do óleo essencial apresentaram atividade anti-edematogênica 4 horas após a administração da carragenina com diferenças estatisticamente significativas, sendo a dose do óleo de 200 mg/Kg a mais efetiva. As doses de 100 e 200 mg/Kg embora efetivas não foram estatisticamente diferentes entre si, mas ambas diferem da dose de 50 mg/kg.

Tabela 3. Efeitos de doses crescentes do óleo essencial de *Croton cajucara* e indometacina sob o edema de pata induzido por carragenina em camundongos. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  e.p.m.

Tratamento	Dose (mg/kg)	N	Aumento do peso da pata (mg)	% inibição
Controle	—	11	74 $\pm$ 8	—
Indometacina	20	14	24 $\pm$ 7**	67.5
Óleo	50	24	49 $\pm$ 5*	33.7
	100	22	37 $\pm$ 5**	50
	200	10	34 $\pm$ 8**	54

ANOVA  $F_{(4,76)} = 7,10$  ( $p < 0,05$ ); Teste de Dunnett \* $p < 0,005$ ; \*\*  $p < 0,001$ .

### c. Migração de Neutrófilos para a Cavidade Peritoneal

Inicialmente foram determinados os valores basais (controle PBS) e aqueles obtidos 6 horas após o estímulo quimiotático lipopolissacarídeo (LPS) de três tipos diferentes de células: leucócitos, neutrófilos e macrófagos.

Neste ensaio foram avaliados os efeitos do óleo essencial (100 mg/kg), DHC (100 mg/kg) e infuso (10 ml/kg, a 5%), administrados por via oral, sobre a migração de neutrófilos induzida pelo efeito quimiotático do LPS, em camundongos. As doses utilizadas foram selecionadas a partir dos resultados obtidos em modelos de inflamação, realizados anteriormente. Os dados obtidos nesse experimento estão demonstrados na tabela 4. Nesta tabela estão expressos os valores do número de leucócitos e neutrófilos em mL de lavado peritoneal. Após a indução do estímulo verificou-se que houve aumento significativo da migração de neutrófilos. Somente a dexametasona conseguiu inibir a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos, após 6 horas da administração do LPS.

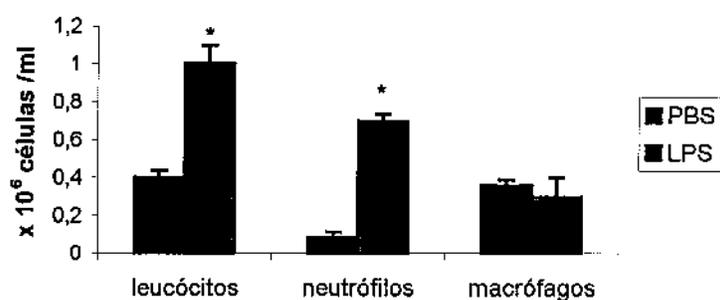


Figura 4. Efeito do estímulo do LPS (via i.p.) em camundongos comparado com o PBS. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Teste “t” de Student \* $p < 0.05$ .

Tabela 4: Efeito da administração oral do infuso, óleo essencial e DHC de *C. cajucara* sobre a migração de neutrófilos induzida por LPS. Os resultados expressam as média  $\pm$  e.p.m. do número de neutrófilos por mL de lavado peritoneal (n = 4 a 5).

Tratamentos (mg/Kg)	Dose (mg/kg)	Leucócitos (x 10 <sup>5</sup> ml)	Inibição %	Neutrófilos (x 10 <sup>5</sup> mL)	Inibição %
LPS <sup>@</sup>	—	13 $\pm$ 2	—	7 $\pm$ 1	—
Indo + LPS	20	14 $\pm$ 3	—	6 $\pm$ 2	15
Dexa + LPS	0,5	7,4 $\pm$ 0,9	26	0,8 $\pm$ 0,1*	88,5
Infuso + LPS	5%	12 $\pm$ 0,8	—	7 $\pm$ 0,7	—
Óleo + LPS	100	14 $\pm$ 2	—	4 $\pm$ 0,6	42,8
DHC + LPS	100	14 $\pm$ 2	—	10 $\pm$ 1	—

<sup>@</sup> 200ng/cavidade de LPS

Leucócitos : ANOVA:  $F_{(5,24)} = 3,35$  ( $p > 0,05$ ).

Neutrófilos: ANOVA:  $F_{(5,24)} = 6,90$  ( $p < 0,001$ ). Teste de Dunnett \*  $p < 0,005$ .

## 4.2. Ensaios Toxicológicos *In Vitro*

### 4.2.1. Testes para avaliar a Citotoxicidade em Culturas de Células V79 e hepatócitos

Nas figuras 5 a 11 estão apresentados os efeitos citotóxicos do infuso, óleo essencial e DHC, comparando-se os valores de IC<sub>50</sub> obtidos nos métodos MTT e DNA nos dois tipos de cultura celular, fibroblastos e hepatócitos, após 24 horas de tratamento.

#### a. DHC

Os resultados dos efeitos citotóxicos da DHC sobre culturas de células V79, após 24 horas de tratamento estão demonstrado na figura 5.

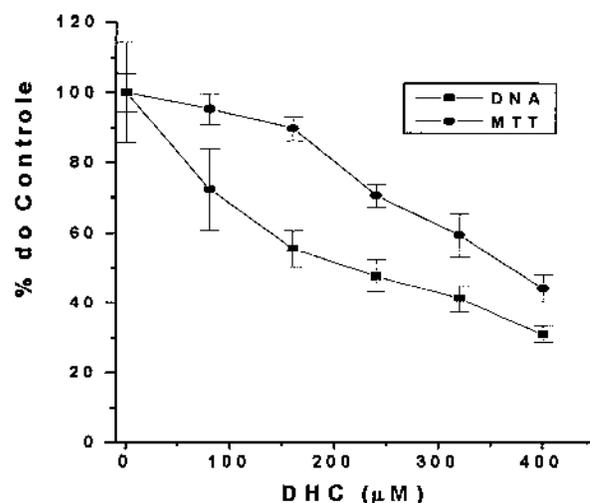


Figura 5. Viabilidade celular de culturas de células V79 após tratamento de 24 horas com DHC avaliada pelo conteúdo de DNA (Absorvância-Abs 260nm), e pela redução do MTT (Abs 570nm).

Foi possível observar que o efeito tóxico da DHC mostrou-se dependente da dose e que os valores da  $IC_{50}$  obtidos pelo dois métodos são próximos, ou seja, dentro de uma faixa que abrange desde 230uM para o conteúdo de DNA até 360uM para a redução do MTT. É interessante destacar que a curva de redução do MTT apresentou um deslocamento à direita, em relação ao conteúdo de DNA.

Na figura 6, estão apresentados os efeitos citotóxicos da DHC sobre culturas primárias de hepatócitos de rato. O valor da  $IC_{50}$  obtido nos testes de conteúdo de DNA (300 uM) encontra-se próximo, ou seja, é similar aos valores obtidos nos ensaios de citotoxicidade utilizando células V79, enquanto que pelo teste do MTT a DHC mostrou-se extremamente tóxica, com uma  $IC_{50}$  de 5 uM. Obviamente, o efeito citotóxico encontrado no ensaio do MTT não pode ser atribuído a um menor número de células, já que o conteúdo de DNA demonstra que o número de células não foi alterado. Em outras palavras, as células

se mantiveram aderidas e, portanto, “viáveis”; porém, estas células apresentaram alterações na capacidade mitocondrial de reduzir o MTT na concentração de 5 $\mu$ M de acordo com a análise do conteúdo de DNA.

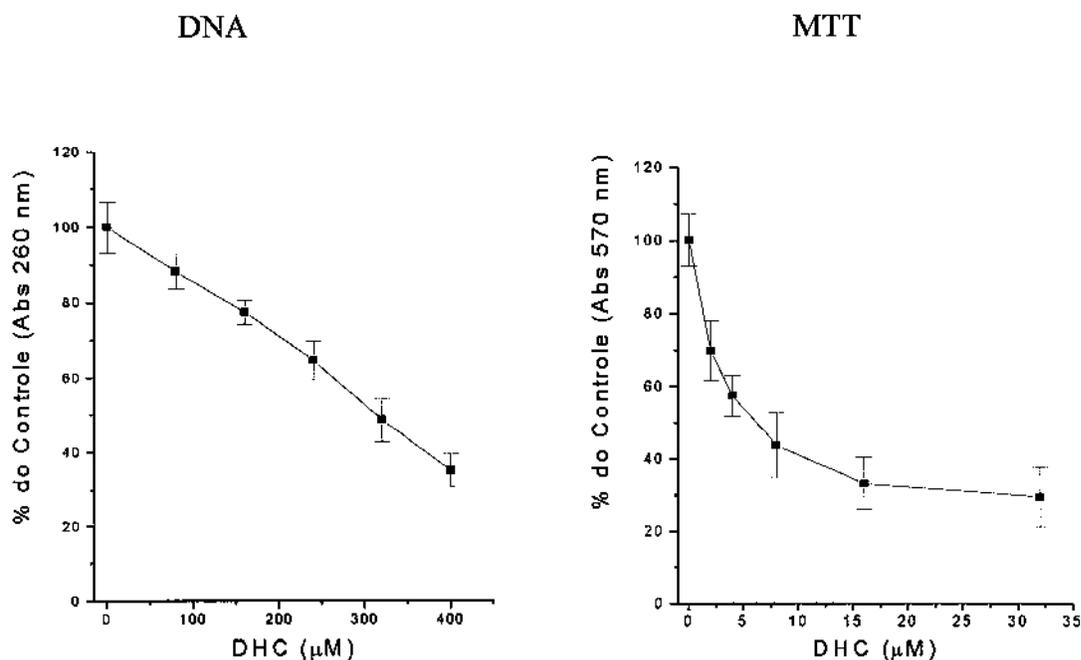


Figura 6. Viabilidade celular de culturas primárias de hepatócitos de rato (s) após tratamento de 20 horas com DHC, avaliada pelo conteúdo de DNA e pela redução do MTT.

#### b. Infuso

Os efeitos citotóxicos do infuso nas culturas de células V79 e hepáticas, também foram avaliados pelo conteúdo de DNA (figura 7) e pelo teste do MTT (figura 8). No teste do DNA foi possível observar que, para os hepatócitos, apesar da curva de viabilidade celular apresentar as mesmas características das células V79, a  $IC_{50}$  para hepatócitos é menor (figura. 7), estabelecendo a mesma característica que aquela da DHC pois o composto pode ser mais tóxico para células hepáticas, ou pode estar sendo metabolizado pelas células hepáticas gerando um ou mais metabólitos tóxicos. A faixa dos valores da

IC<sub>50</sub> ficou entre 0,05ml de infuso/ml de meio para hepatócitos, enquanto para V79 a concentração determinada foi cerca de 0,15ml de infuso/ml de meio. Avaliado pelo teste do MTT (figura 8), pode-se observar que houve um aumento no conteúdo de formazan, resultado de uma maior atividade mitocondrial devido à estimulação da succinato desidrogenase mitocondrial. No entanto, quando o conteúdo de DNA foi avaliado, o número de hepatócitos apresentou-se menor se comparado às células V79, indicando toxicidade.

Assim, nos modelos de cultura celular utilizando DHC e infuso, foi possível observar que não houve atividade hepatoprotetora. Para confirmar estes dados foi necessário analisar os resultados obtidos em experimentos de hepatotoxicidade *in vivo*, que são demonstrados no item b.

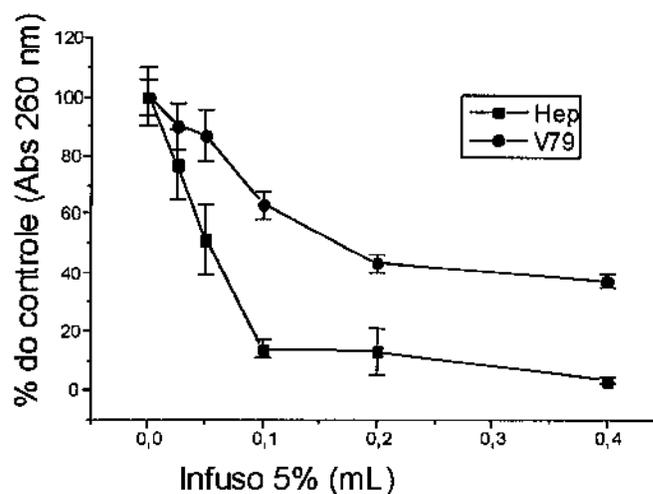


Figura 7. Viabilidade celular de culturas de células V79 e hepatócitos (Hep) após tratamento de 24 e 20 horas respectivamente com infuso de *Croton cajucara* avaliada pelo conteúdo de DNA (Abs 260nm).

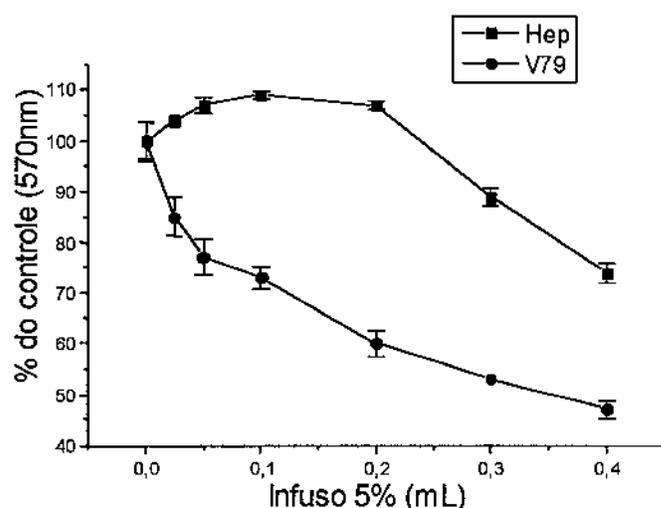


Figura 8. Viabilidade celular de culturas de células V79 e hepatócitos (Hep) após tratamento de 24 e 20 horas respectivamente com infuso de *Croton cajucara* avaliada pela redução do MTT ( Abs 570 nm).

### c. Óleo essencial

O efeito do óleo essencial sobre hepatócitos foi calculado a partir da  $IC_{20}$  para DNA que foi de  $41.9 \mu\text{g/mL}$ ; para o MTT a  $IC_{20}$  foi  $> 50 \mu\text{g/mL}$  e, ao contrário das outras substâncias, sua toxicidade foi menor para os hepatócitos do que para V79 em cultura de células. Foi calculado, a  $IC_{20}$ , pois o composto nas concentrações utilizadas para as células V79, foi bem menos tóxico para os hepatócitos. Esses resultados estão apresentados na figura 9. Os dados obtidos para as células V79 revelaram que pela avaliação de DNA a  $IC_{20}$  do óleo foi de  $11.6 \mu\text{g/mL}$ , enquanto que pelo método do MTT a  $IC_{20}$  foi de  $17.8 \mu\text{g/mL}$ . Os valores de  $DL_{50}$  para o óleo obtidos em experimento *in vivo* foram  $9.39 \text{ g Kg}^{-1}$ , p.o. e  $680 \text{ mg Kg}^{-1}$ , i.p. (Hiruma-Lima, dados não publicados). Esses resultados em conjunto sugerem que os componentes do óleo essencial podem ser metabolizados pelo fígado

através do sistema citocromo P-450 reduzindo sua toxicidade, ou serem menos tóxicos para células hepáticas.

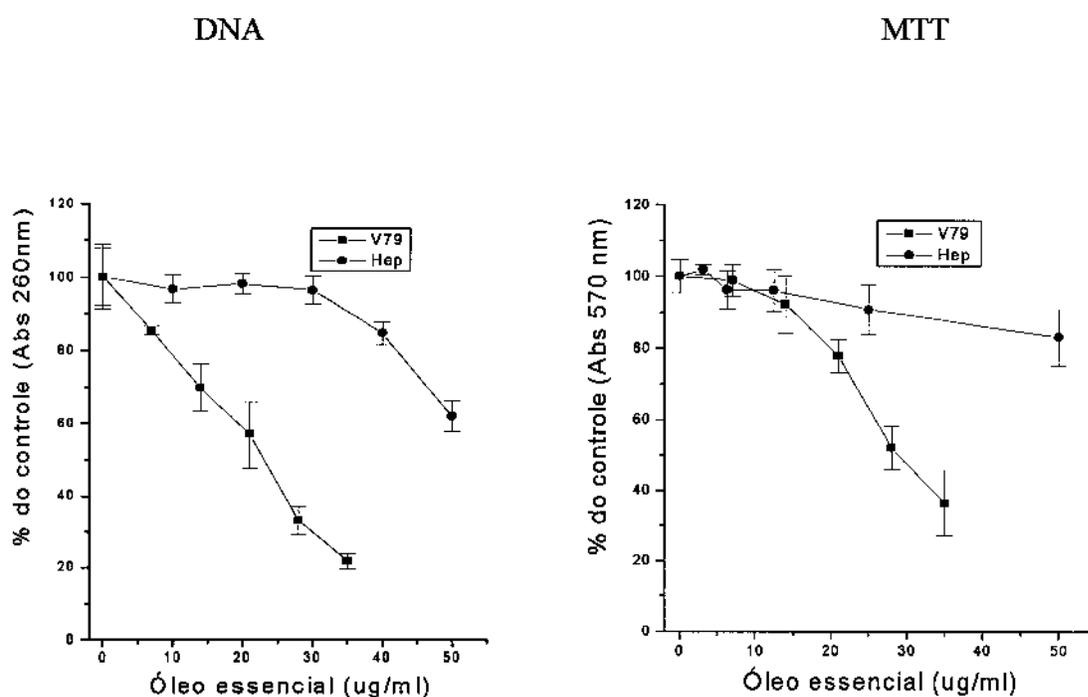


Figura 9. Viabilidade celular de culturas de células V79 e hepatócitos após tratamento de 24 e 20 horas respectivamente com óleo essencial de *Croton cajucara* avaliada pelo conteúdo de DNA (Abs 260nm), e pela redução do MTT (Abs 570nm).

### c. Teste de hepatoproteção *in vitro* do Óleo essencial

O pré-tratamento dos hepatócitos com óleo essencial (agente supostamente hepatoprotetor) não conseguiu reverter o dano causado pela cumarina. Nestas células as lesões causadas pela cumarina são reveladas através da diminuição da viabilidade celular, avaliada tanto pelo teste do MTT quanto pelo conteúdo de DNA.

O pré-tratamento das células com óleo essencial demonstrou, ao contrário do que se esperava, uma potencialização no efeito lesivo da cumarina sobre os hepatócitos. Estes resultados podem ser analisados nas figuras 10 e 11.

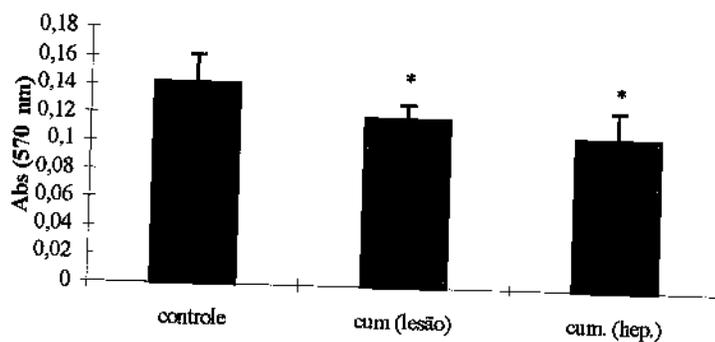


Figura 10. Estudo do efeito hepatoprotetor do óleo essencial de *C. cajucara* (expressos em absorbância) em culturas de hepatócitos após tratamento de 14 horas com óleo essencial de *Croton cajucara* com pós-tratamento da cumarina avaliada pela redução do MTT ( Abs 570nm). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  e.p.m.

ANOVA  $F_{(2,21)} = 6.85$   $p < 0,05$ . Teste de Dunnett: \* $p < 0,01$ .

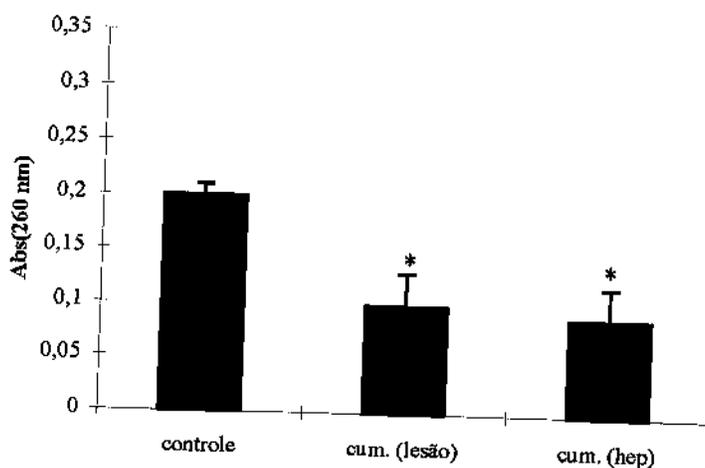


Figura 11. Estudo do efeito hepatoprotetor do óleo essencial de *C. cajucara* (expressos em porcentagem) em culturas de hepatócitos após tratamento de 14 horas com óleo essencial de *Croton cajucara* com pós-tratamento da cumarina, avaliada pelo conteúdo de DNA (Abs 260nm). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  e.p.m.

ANOVA,  $F_{(2,21)} = 6.52$   $p < 0,01$ . Teste de Dunnett \* $p < 0,01$ .

### 4.3. MODELOS DE LESÃO HEPÁTICA

#### 4.3.1. Estudo do efeito da hepatite induzida por d-galactosamina

Para avaliar a hepatotoxicidade *in vivo*, os animais foram tratados com a galactosamina, um agente hepatotóxico, na ausência ou na presença de pré-tratamentos adicionais com as substâncias vegetais em estudo. Foram feitas três tipos de análise: a) dosagem das transaminases hepáticas, b) análise histológica, e c) dosagem do glicogênio hepático.

Na avaliação dos parâmetros bioquímicos após indução de lesão hepática *in vivo* por galactosamina não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos tratados com as amostras vegetais e seus controles, nas concentrações séricas de enzimas que permitissem uma avaliação promissora em relação ao efeito hepatoprotetor das substâncias em estudo. As enzimas gama glutamil transferase ( $\gamma$ -GT), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) tiveram um aumento significativo nos grupos tratados com galactosamina em relação ao grupo tratado com salina, o que era previsível. No entanto, esse aumento, ao contrário do esperado, parece ter sido potencializado com os tratamentos das drogas supostamente hepatoprotetoras, principalmente nos animais do grupo tratado com DHC (Figuras. 12, 13 e 14).

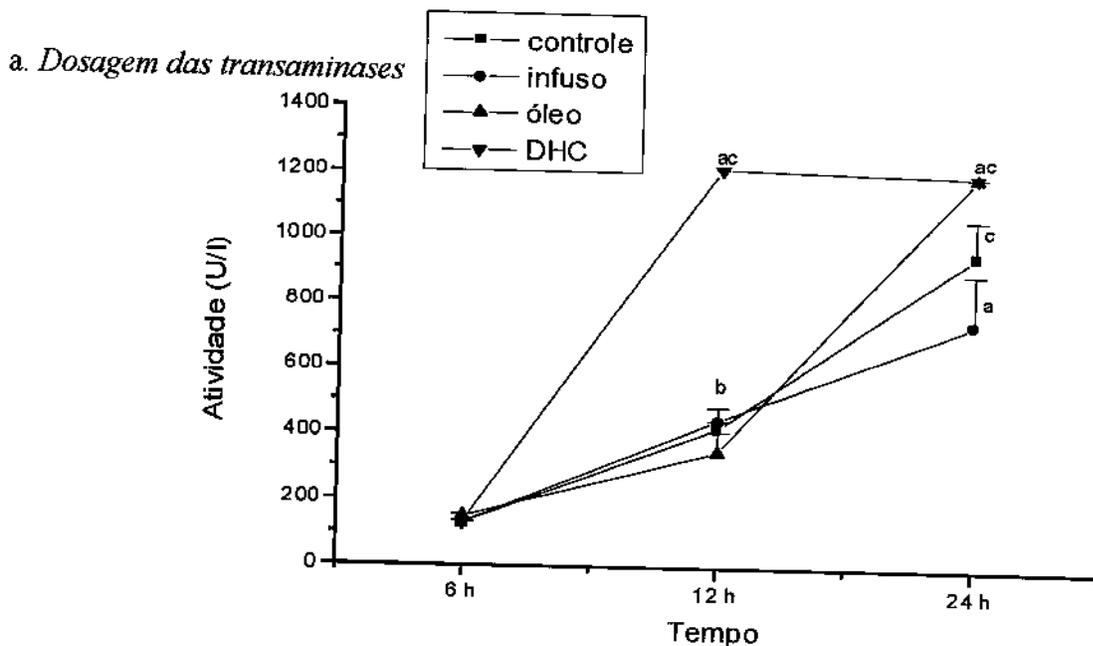


Figura 12. Atividade do infuso, óleo e DHC sobre a enzima aspartato aminotransferase (AST), no soro de ratos machos Wistar, após o tratamento com galactosamina. Cada ponto representa a média  $\pm$  e.p.m. de 4 a 8 animais por grupo.

Anova de duas vias: Efeito grupo:  $F_{(3,15)} = 18,35$ ,  $p \leq 0,001$ ; Efeito tempo:  $F_{(2,16)}$ ,  $p \leq 0,001$ ; Interação  $F_{(6,30)} = 14,85$ ;  $p \leq 0,001$ . <sup>a</sup> $p \leq 0,05$  em relação ao controle no respectivo tempo; <sup>b</sup> $p \leq 0,05$ ; <sup>c</sup> $p \leq 0,001$ , em cada grupo, em relação aos 2 intervalos de tempo anteriores (Newman-Keuls).

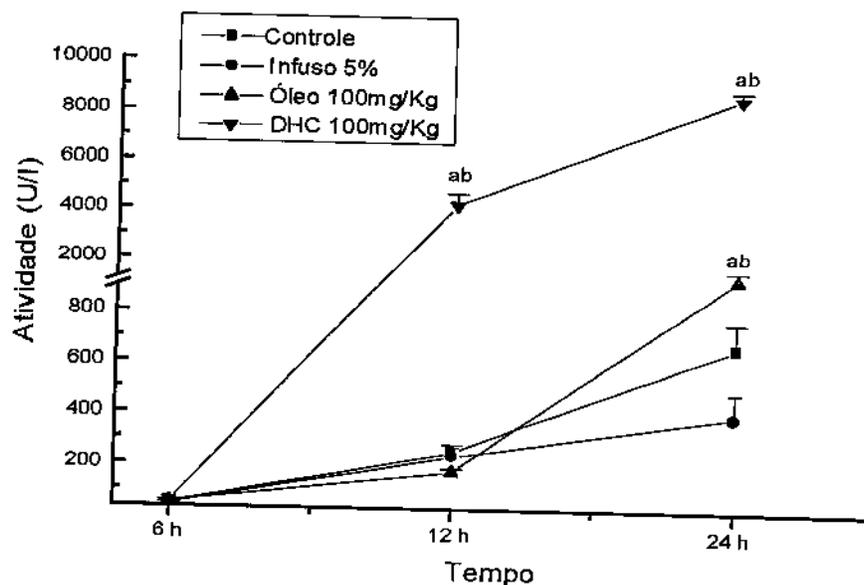


Fig. 13. Atividade do infuso, óleo e DHC sobre a enzima alanina aminotransferase, no soro de ratos machos Wistar, após o tratamento com galactosamina. Cada ponto representa a média  $\pm$  e.p.m. de 4 a 8 animais por grupo.

Anova de duas vias: Efeito grupo:  $F_{(3,16)} = 264,47$ ;  $p \leq 0,001$ . Efeito tempo:  $F_{(2,32)} = 240,20$ ;  $p \leq 0,001$ . Interação  $F_{(6,32)} = 111,86$ ;  $p \leq 0,001$ . <sup>a</sup> $p \leq 0,05$  em relação ao controle no respectivo tempo; <sup>b</sup> $p \leq 0,05$  em cada grupo, em relação aos dois intervalos de tempo anteriores (Newman-Keuls).

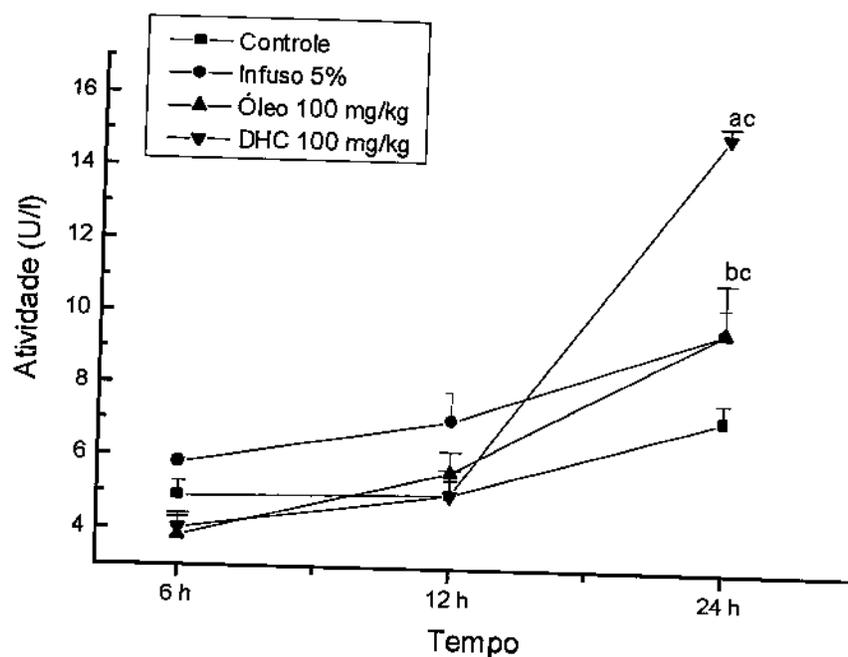


Fig. 14. Atividade do infuso, óleo e DHC sobre a enzima gama glutamil transferas ( $\gamma$ -GT), no soro de ratos machos Wistar, após o tratamento com galactosamina. Cada ponto representa a média  $\pm$  e.p.m. de 4 a 8 animais por grupo. Anova de duas vias: Efeito grupo:  $F_{(3,18)} = 8,544$   $p \leq 0,001$ ; Efeito tempo:  $F_{(2,36)} = 69,42$   $p \leq 0,001$ . Interação  $F_{(6,36)} = 8,18$ ;  $p \leq 0,001$ . <sup>a</sup> $p \leq 0,001$ ; <sup>b</sup> $p \leq 0,05$  em relação ao controle no respectivo tempo <sup>c</sup> $p \leq 0,05$  em cada grupo em relação aos 2 intervalos de tempo anteriores (Newman-Keuls).

É importante ressaltar que o que é chamado de controle nesse experimento é a união dos animais tratados com salina e tween, pois estes não apresentaram diferença significativa. As dosagens de transaminases mostraram claramente a potencialização do efeito lesivo da galactosamina pelas substâncias vegetais em estudo. A enzima ALT (figura 13) foi aquela em que os efeitos foram mais evidentes sendo que seus níveis nos animais tratados com DHC, se encontram extremamente aumentados tornando difícil a comparação com os demais grupos. Apesar do grupo tratado com infuso diminuir o nível de transaminase, isso não ocorreu com os outros parâmetros avaliados. Os níveis de AST mostraram a mesma característica da enzima ALT (figura 12) confirmando portanto a

indução do dano hepático. A enzima  $\gamma$ -GT também se mostrou aumentada no soro de ratos, após 24 h de tratamento com a galactosamina, nos diferentes grupos tratados: DHC, óleo e infuso de *Croton cajucara*, (figura 14) evidenciado, portanto, o efeito lesivo da galactosamina o qual é agravado pela administração concomitante das amostras vegetais.

#### b. *Histologia*

As mudanças morfológicas foram analisadas em paralelo, às dosagens de ALT, AST e ainda  $\gamma$ -GT. As mudanças iniciais observadas no fígado, após 24 horas da administração com galactosamina foram similares às descrições encontradas na literatura: necrose hepática focal. A observação histológica basicamente suportou os resultados obtidos com a análise das transaminases, (fig. 15 – animal tratado com galactosamina). As substâncias vegetais não foram capazes de reverter as lesões provocadas pela galactosamina. A descrição histológica segue-se abaixo:

Grupo – Controle (galactosamina + salina e galactosamina + tween): Esse grupo apresentou moderado processo congestivo, núcleos preservados. Notam-se também, em algumas áreas limítrofes a áreas centrais, uma moderada necrose coagulativa focal.

Grupo - Infuso e Óleo essencial: Ocorreu como nos demais grupos necrose focal coagulativa.

Grupo – DHC: Foram observadas as mesmas características patológicas dos grupos anteriores, só que mais intensa pois as áreas necróticas apresentaram-se mais acentuadas e hemorrágicas.

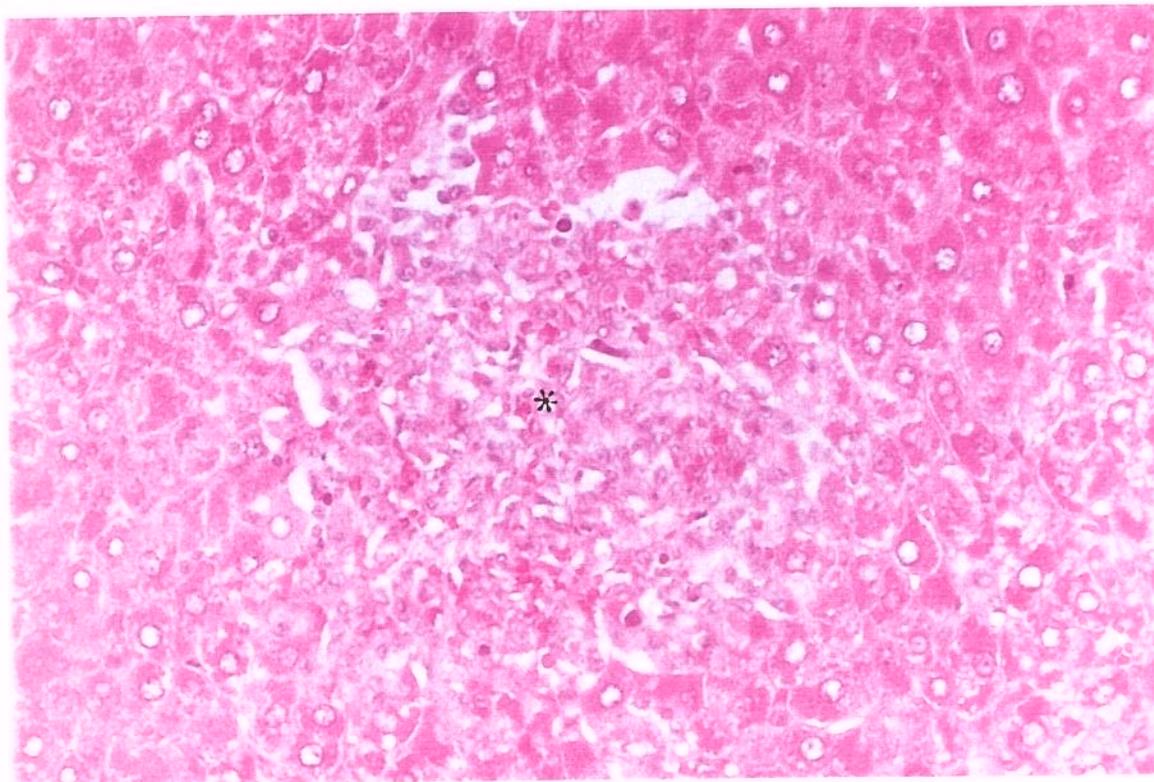


Figura 15. Lóbulo hepático mostrando um foco necrótico em fase avançada, (\*) no qual pode se perceber que os núcleos e a organização trabecular dos hepatócitos já desapareceram. HE; 200X (animal tratado com galactosamina).

### c. Dosagem do glicogênio hepático

Na dosagem de glicogênio hepático foi possível analisar a depleção de glicogênio, possivelmente pelo fato da galactosamina inibir a síntese de glicogênio como um dos mecanismos de ação. Os resultados estão demonstrados na figura 16.

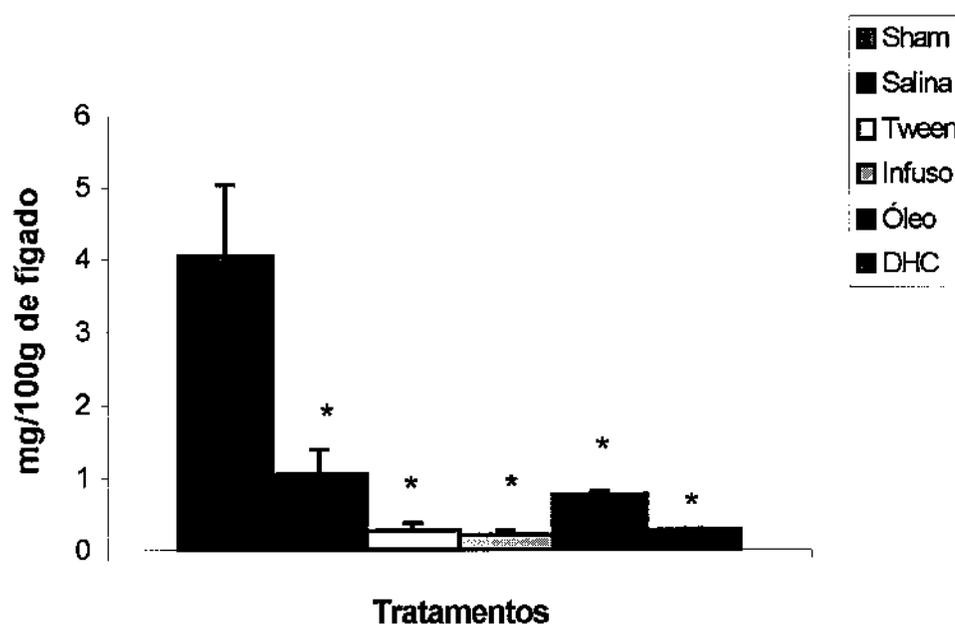


Fig. 16. Dosagem do glicogênio hepático de ratos após indução de lesão hepática com galactosamina e tratamentos com infuso e o óleo essencial, além da substância isolada DHC de *Croton cajucara*.

ANOVA  $F_{(5,23)} = 12,3$  ( $p < 0,05$ ); Teste de Dunnett  $*p < 0,001$ .

#### 4.4. MODELOS DE MALÁRIA

Foram testados os efeitos do infuso, do óleo essencial e da DHC, em 3 esquemas distintos de tratamento (A, B e C) e cloroquina, sobre três diferentes parasitas: *Plasmodium yoelli*, *P. berghei* e *P. gallinaceum*. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média das porcentagens de parasitas obtidas nos esfregaços no 5º, 7º e 9º dias após a infecção para *P. yoelli* e *P. berghei*, e no 11º e 13º dias após a infecção de *P. gallinaceum*, em camundongos e aves respectivamente.

Nos esquemas de tratamentos: A representa os animais que receberam as amostras vegetais 3 dias antes da inoculação dos parasitas; B representa tratamentos feitos 3 dias antes e 4 dias após o inóculo; C representa tratamentos feitos no dia do inóculo seguidos de mais 3 dias, após a infecção. Deste modo, DHC-A representa um grupo de camundongos ou aves que recebeu DHC no esquema de tratamento A, Óleo B representa aves ou camundongos que receberam a amostra no esquema de tratamento B, e assim sucessivamente.

##### a. *Malária experimental para P. yoelli*

Os resultados obtidos para as amostras vegetais aplicadas nos 3 esquemas de tratamento, controle negativo e cloroquina (controle positivo) estão demonstrado na tabela 5.

Tabela 5. Efeito da administração oral do infuso, óleo e DHC de *C. cajucara* e cloroquina em animais infectados com *Plasmodium yoelli*. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. da porcentagem de parasitemia obtidas através de esfregaços sanguíneos, realizados em diferentes dias, (n=5). <sup>x</sup> representa o valor do arcosseno e <sup>y</sup> representa o valor real da parasitemia.

Tratamentos (p.o)	Dose (mg/Kg)	Parasitemia no 5º dia (%)	Parasitemia no 7º dia (%)	Parasitemia no 9º dia (%)	% de redução em relação ao controle			
					5º	7º	9º	
<b>Controle</b>	—	0,09 $\pm$ 0,01 <sup>x</sup> 0,84 $\pm$ 0,09 <sup>y</sup>	0,08 $\pm$ 0,01 <sup>x</sup> 0,8 $\pm$ 0,3 <sup>y</sup>	0,08 $\pm$ 0,02 <sup>x</sup> 0,9 $\pm$ 0,3 <sup>y</sup>				
<b>A<sup>1</sup></b>	<b>DHC</b>	100	0,06 $\pm$ 0,01 <sup>x</sup> 0,54 $\pm$ 0,18 <sup>y</sup>	0,08 $\pm$ 0,02 <sup>x</sup> 0,85 $\pm$ 0,3 <sup>y</sup>	0,13 $\pm$ 0,03 <sup>x</sup> 1,83 $\pm$ 0,5 <sup>y</sup>	33	0	0
	<b>Infuso</b>	10 ml/kg	0,09 $\pm$ 0,01 <sup>x</sup> 1,11 $\pm$ 0,4 <sup>y</sup>	0,10 $\pm$ 0,01 <sup>x</sup> 1,5 $\pm$ 0,6 <sup>y</sup>	0,14 $\pm$ 0,02 <sup>x</sup> 1,9 $\pm$ 0,9 <sup>y</sup>	0	0	0
	<b>Óleo</b>	100	0,08 $\pm$ 0,01 <sup>x</sup> 0,78 $\pm$ 0,4 <sup>y</sup>	0,067 $\pm$ 0,02 <sup>x</sup> 0,4 $\pm$ 0,08 <sup>y</sup>	0,08 $\pm$ 0,02 <sup>x</sup> 0,97 $\pm$ 0,5 <sup>y</sup>	11	16	0
<b>B<sup>2</sup></b>	<b>DHC</b>	100	0,076 $\pm$ 0,01 <sup>x</sup> 0,61 $\pm$ 0,1 <sup>y</sup>	0,074 $\pm$ 0,02 <sup>x</sup> 0,61 $\pm$ 0,2 <sup>y</sup>	0,07 $\pm$ 0,02 <sup>x</sup> 0,56 $\pm$ 0,1 <sup>y</sup>	15	7,5	12,5
	<b>Infuso</b>	10 ml/kg	0,09 $\pm$ 0,001 <sup>x</sup> 1,47 $\pm$ 0,2 <sup>y</sup>	0,10 $\pm$ 0,01 <sup>x</sup> 1,47 $\pm$ 0,2 <sup>y</sup>	0,10 $\pm$ 0,02 <sup>x</sup> 2,4 $\pm$ 1,13 <sup>y</sup>	0	0	0
	<b>Óleo</b>	100	0,077 $\pm$ 0,001 <sup>x</sup> 0,65 $\pm$ 0,1 <sup>y</sup>	0,06 $\pm$ 0,01 <sup>x</sup> 0,85 $\pm$ 0,66 <sup>y</sup>	0,04 $\pm$ 0,02 <sup>x</sup> 0,3 $\pm$ 0,1 <sup>y</sup>	14	25	50
<b>C<sup>3</sup></b>	<b>DHC</b>	100	0,09 $\pm$ 0,01 <sup>x</sup> 0,9 $\pm$ 0,2 <sup>y</sup>	0,08 $\pm$ 0,01 <sup>x</sup> 0,85 $\pm$ 0,3 <sup>y</sup>	0,07 $\pm$ 0,02 <sup>x</sup> 1 $\pm$ 0,6 <sup>y</sup>	0	0	12,5
	<b>Infuso</b>	10 ml/kg	0,10 $\pm$ 0,01 <sup>x</sup> 1,22 $\pm$ 0,1 <sup>y</sup>	0,12 $\pm$ 0,01 <sup>x</sup> 1,55 $\pm$ 0,3 <sup>y</sup>	0,14 $\pm$ 0,02 <sup>x</sup> 2,3 $\pm$ 0,5 <sup>y</sup>	0	0	0
	<b>Óleo</b>	100	0,09 $\pm$ 0,01 <sup>x</sup> 1 $\pm$ 0,2 <sup>y</sup>	0,07 $\pm$ 0,01 <sup>x</sup> 0,56 $\pm$ 0,1 <sup>y</sup>	0,07 $\pm$ 0,02 <sup>x</sup> 0,53 $\pm$ 0,06 <sup>y</sup>	0	12,5	12,5
<b>Cloroquina</b>	100	0*	0*	0*	100	100	100	

5º dia: ANOVA <sup>1</sup>F<sub>(3,13)</sub> = 0,98 p  $\geq$  0,05; <sup>2</sup>F<sub>(3,15)</sub> = 0,52 p  $\geq$  0,05; <sup>3</sup>F<sub>(3,16)</sub> = 2,07 p  $\geq$  0,05;

<sup>123</sup>Tukey-Kramer \*p  $\leq$  0,05. 7º dia: ANOVA <sup>1</sup>F<sub>(3,13)</sub> = 0,98 p  $\geq$  0,05; <sup>2</sup>F<sub>(3,16)</sub> = 0,52 p  $\geq$  0,05; <sup>3</sup>F<sub>(3,16)</sub> = 0,65 p  $\geq$  0,05; <sup>123</sup>Tukey-Kramer \*p  $\leq$  0,05; 9º dia: ANOVA <sup>1</sup>F<sub>(3,13)</sub> = 1,33 p  $\geq$  0,05; <sup>2</sup>F<sub>(3,15)</sub> = 1,5 p  $\geq$  0,05; <sup>3</sup>F<sub>(3,16)</sub> = 2,40 p  $\geq$  0,05; <sup>123</sup>Tukey-Kramer \*p  $\leq$  0,05.

Os tratamentos infuso, óleo e DHC, não foram eficazes em diminuir a parasitemia em camundongos infectados com *P. yoelli*.

A cloroquina, utilizada como droga de referência, foi eficaz em diminuir a parasitemia já no quinto dia, efeito este que se manteve durante todo o tempo de avaliação.

#### b. *Malária Experimental para P. berghei*

A tabela 6 apresenta os resultados obtidos nos experimentos utilizando as amostras vegetais aplicadas nos 3 esquemas de tratamentos, controle negativo e cloroquina.

Em todos os tratamentos as drogas diminuíram a parasitemia dos animais infectados. Nesse ensaio, no esquema de tratamento A, onde os animais receberam as drogas em estudo 3 dias antes da infecção com o parasita, somente o óleo foi eficaz em diminuir a parasitemia dos animais infectados. Com relação ao grupo B todas as drogas foram eficazes em diminuir a parasitemia, enquanto que o infuso *ad libitum* foi capaz de inibir a parasitemia em 100% como a cloroquina droga padrão utilizada. Já quando o tratamento foi curativo ou seja, dado depois da infecção dos animais o infuso não conseguiu diminuir a parasitemia dos animais infectados.

Portanto, o óleo essencial foi capaz de inibir a parasitemia em todos os esquemas de tratamento, enquanto que a DHC inibiu a parasitemia somente quando os animais foram tratados no esquema de tratamento B e C, e quando foi administrada previamente essa não foi eficaz. Já o infuso somente demonstrou efeito significativo, quando foi administrado por 07 dias, enquanto que quando administrados *ad libitum*, esse efeito foi potencializado.

Tabela 6. Efeito da administração oral do infuso, óleo e DHC de *C. cajucara* e cloroquina em animais infectados com *Plasmodium berghei*. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. da porcentagem de parasitemia obtidas através de esfregaços sanguíneos, realizados em diferentes dias (n=5). <sup>x</sup> representa o valor do arcoseno e <sup>y</sup> representa o valor real da parasitemia.

Tratamentos (p.o)	Dose (mg/Kg)	Parasitemia no 5º dia (%)	Parasitemia no 7º dia (%)	Parasitemia no 9º dia (%)	% de redução em relação ao controle			
					5º	7º	9º	
Controle	10 ml/kg	0,04 $\pm$ 0,006 <sup>x</sup> 0,23 $\pm$ 0,07 <sup>y</sup>	0,3 $\pm$ 0,04 <sup>x</sup> 10,1 $\pm$ 2 <sup>y</sup>	0,57 $\pm$ 0,11 <sup>x</sup> 30,2 $\pm$ 4 <sup>y</sup>				
A <sup>1</sup>	DHC	100	0,047 $\pm$ 0,007 <sup>x</sup> 0,23 $\pm$ 0,04 <sup>y</sup>	0,29 $\pm$ 0,04 <sup>x</sup> 2,36 $\pm$ 1 <sup>y</sup>	0,39 $\pm$ 0,11 <sup>x</sup> 19 $\pm$ 5 <sup>y</sup>	0	3	31,5
	Infuso	10 ml/kg	0,03 $\pm$ 0,005 <sup>x</sup> 0,13 $\pm$ 0,03 <sup>y</sup>	0,2 $\pm$ 0,03 <sup>x</sup> 4,42 $\pm$ 1 <sup>y</sup>	0,47 $\pm$ 0,09 <sup>x</sup> 21,1 $\pm$ 2,7 <sup>y</sup>	25	33	17,5
	Óleo	100	0,04 $\pm$ 0,005 <sup>x</sup> 0,2 $\pm$ 0,001 <sup>y</sup>	0,06 $\pm$ 0,03 <sup>x</sup> ** 0,94 $\pm$ 0,07 <sup>y</sup>	0,20 $\pm$ 0,08 <sup>x</sup> * 8 $\pm$ 4 <sup>y</sup>	0	80	64
B <sup>2</sup>	DHC	100	0,02 $\pm$ 0,007 <sup>x</sup> 0,09 $\pm$ 0,057 <sup>y</sup>	0,05 $\pm$ 0,04 <sup>x</sup> * 0,44 $\pm$ 0,3 <sup>y</sup>	0,23 $\pm$ 0,09 <sup>x</sup> * 10,2 $\pm$ 2 <sup>y</sup>	50	83	60
	Infuso	10 ml/kg	0,06 $\pm$ 0,007 <sup>x</sup> 0,48 $\pm$ 0,07	0,17 $\pm$ 0,04 <sup>x</sup> 4,86 $\pm$ 2 <sup>y</sup>	0,16 $\pm$ 0,09 <sup>x</sup> * 30,2 $\pm$ 4 <sup>y</sup>	0	43	97,6
	Óleo	100	0,039 $\pm$ 0,005 <sup>x</sup> 0,2 $\pm$ 0,01 <sup>y</sup>	0,1 $\pm$ 0,03 <sup>x</sup> ** 5,6 $\pm$ 1 <sup>y</sup>	0,69 $\pm$ 0,09 <sup>x</sup> 8 $\pm$ 3 <sup>y</sup>	2,5	36	0
	Infusão	Ad libitum	0,004 $\pm$ 0,006 <sup>x</sup> * 0,01 $\pm$ 0,007 <sup>y</sup>	0,004 $\pm$ 0,006 <sup>x</sup> ** 0,01 $\pm$ 0,007 <sup>y</sup>	0,07 $\pm$ 0,08 <sup>x</sup> * 0,81 $\pm$ 0,3 <sup>y</sup>	99	98	88
C <sup>3</sup>	DHC	100	0,07 $\pm$ 0,006 <sup>x</sup> 0,64 $\pm$ 0,1 <sup>y</sup>	0,103 $\pm$ 0,04 <sup>x</sup> * 1,9 $\pm$ 1 <sup>y</sup>	0,24 $\pm$ 0,07 <sup>x</sup> * 7,9 $\pm$ 2 <sup>y</sup>	0	65	58
	Infuso	10 ml/kg	0,05 $\pm$ 0,005 <sup>x</sup> 0,28 $\pm$ 0,03 <sup>y</sup>	0,18 $\pm$ 0,03 <sup>x</sup> 3,91 $\pm$ 1 <sup>y</sup>	0,29 $\pm$ 0,08 <sup>x</sup> 10,7 $\pm$ 4 <sup>y</sup>	0	40	50
	Óleo	100	0,03 $\pm$ 0,005 <sup>x</sup> 0,14 $\pm$ 0,03 <sup>y</sup>	0,08 $\pm$ 0,03 <sup>x</sup> * 0,91 $\pm$ 0,2 <sup>y</sup>	0,30 $\pm$ 0,06 <sup>x</sup> 9,96 $\pm$ 2,1 <sup>y</sup>	25	73	47
Cloroquina	100	0**	0**	0**	100	100	100	

5º dia: ANOVA <sup>1</sup>F<sub>(3,13)</sub> = 0,99 p  $\geq$  0,42; <sup>2</sup>F<sub>(4,14)</sub> = 12,60 p  $\leq$  0,05; <sup>3</sup>F<sub>(3,14)</sub> = 9,34 p  $\leq$  0,05; <sup>123</sup>Tukey-Kramer \*p  $\leq$  0,01; \*\*p  $\leq$  0,001. 7º dia: ANOVA <sup>1</sup>F<sub>(3,13)</sub> = 5,56 p  $\leq$  0,05; <sup>2</sup>F<sub>(4,14)</sub> = 8,60 p  $\leq$  0,05; <sup>3</sup>F<sub>(3,14)</sub> = 5,17 p  $\leq$  0,05; <sup>123</sup>Tukey-Kramer \*p  $\leq$  0,05; \*\*p  $\leq$  0,001. 9º dia: ANOVA <sup>1</sup>F<sub>(3,13)</sub> = 5,56 p  $\leq$  0,05; <sup>2</sup>F<sub>(4,14)</sub> = 8,60 p  $\leq$  0,05; <sup>3</sup>F<sub>(3,14)</sub> = 5,17 p  $\leq$  0,05; <sup>123</sup>Tukey-Kramer \*p  $\leq$  0,01; \*\*p  $\leq$  0,001.

c. *Malária Experimental para P. gallinaceum*

Os resultados obtidos para as amostras vegetais, aplicados nos 3 esquemas de tratamento, controle negativo e cloroquina (controle positivo), estão demonstrados na tabela 7.

Tabela 7. Efeito da administração oral do infuso 5%, óleo, e DHC de *C. cajucara*, e cloroquina em animais infectados com *Plasmodium gallinaceum*. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. da porcentagem de parasitemia obtidas através de esfregaços sanguíneos, realizados em diferentes dias, (n=5). <sup>x</sup> representa o valor do arcoseno e <sup>y</sup> representa o valor real da parasitemia

Tratamentos (p.o)	Dose (mg/kg)	Parasitemia no 11° dia (%)	Parasitemia no 13° dia (%)	% de redução em relação ao controle		
				11°	13°	
Controle	—	0,14 $\pm$ 0,03 <sup>x</sup> 2,13 $\pm$ 1,5 <sup>y</sup>	0,46 $\pm$ 0,03 <sup>x</sup> 20,96 $\pm$ 3,1 <sup>y</sup>	11°	13°	
A <sup>1</sup>	DHC	100	0,02 $\pm$ 0,04 <sup>x*</sup> 0,11 $\pm$ 0,007 <sup>y</sup>	0,08 $\pm$ 0,04 <sup>x*</sup> 1,95 $\pm$ 1 <sup>y</sup>	86	82
	Infuso	10 ml/kg	0,12 $\pm$ 0,05 <sup>x</sup> 1,55 $\pm$ 0,3 <sup>y</sup>	0,65 $\pm$ 0,05 <sup>x</sup> 36,8 $\pm$ 3 <sup>y</sup>	15	0
	Óleo	100	1,4 $\pm$ 0,8 <sup>x</sup> 2,13 $\pm$ 1,5 <sup>y</sup>	0,31 $\pm$ 0,05 <sup>x</sup> 9,5 $\pm$ 1 <sup>y</sup>	35	30
B <sup>2</sup>	DHC	100	0,47 $\pm$ 0,09 <sup>x</sup> 2,5 $\pm$ 1,7 <sup>y</sup>	0,40 $\pm$ 0,09 <sup>x</sup> 14 $\pm$ 9 <sup>y</sup>	0	9
	Infuso	10 ml/kg	0,08 $\pm$ 0,07 <sup>x</sup> 1,1 $\pm$ 0,6 <sup>y</sup>	0,36 $\pm$ 0,07 <sup>x</sup> 16 $\pm$ 6 <sup>y</sup>	43	47
	Óleo	100	0,01 $\pm$ 0,008 <sup>x</sup> 1,13 $\pm$ 1,5 <sup>y</sup>	0,10 $\pm$ 0,09 <sup>x*</sup> 2,33 $\pm$ 2,1 <sup>y</sup>	92*	77
C <sup>3</sup>	DHC	100	0,06 $\pm$ 0,04 <sup>x</sup> 2,4 $\pm$ 0,8 <sup>y</sup>	0,30 $\pm$ 0,07 <sup>x</sup> 11,2 $\pm$ 5 <sup>y</sup>	57	47
	Infuso	10 ml/kg	0,016 $\pm$ 0,04 <sup>x</sup> 0,13 $\pm$ 0,1 <sup>y</sup>	0,09 $\pm$ 0,07 <sup>x*</sup> 4,4 $\pm$ 1 <sup>y</sup>	88	80
	Óleo	100	0,087 $\pm$ 0,04 <sup>x</sup> 1,3 $\pm$ 1 <sup>y</sup>	0,33 $\pm$ 0,09 <sup>x</sup> 12,5 $\pm$ 2,4 <sup>y</sup>	38	25
Cloroquina	100	0**	0**	100	100	

11° dia: ANOVA <sup>1</sup>F<sub>(3,15)</sub> = 1,78 p  $\geq$  0,05; <sup>2</sup>F<sub>(3,13)</sub> = 5,12 p  $\leq$  0,05; <sup>3</sup>F<sub>(3,16)</sub> = 1,87 p  $\geq$  0,05;

<sup>123</sup>Tukey-Kramer \*p  $\leq$  0,05; \*\*p  $\leq$  0,001. 13° dia: ANOVA <sup>1</sup>F<sub>(3,13)</sub> = 22,65 p  $\leq$  0,05; <sup>2</sup>F<sub>(3,13)</sub> = 3,36 p  $\leq$  0,05; <sup>3</sup>F<sub>(3,16)</sub> = 4,34 p  $\leq$  0,05; <sup>123</sup>Tukey-Kramer \*p  $\leq$  0,05; \*\*p  $\leq$  0,001.

Os resultados apresentados no modelo aviário demonstraram diferentes resultados em relação ao de camundongos. No esquema de tratamento preventivo grupo A somente a DHC foi eficaz em diminuir a parasitemia. Enquanto que no esquema de tratamento B o óleo essencial, foi eficaz em diminuir a parasitemia. Já com o tratamento curativo somente o infuso conseguiu diminuir a parasitemia no último dia analisado.

Apesar dos resultados diferirem entre si, deve se levar em consideração os diferentes modelos experimentais utilizados e os diferentes tipos de parasitas, sem esquecer dos diferentes esquemas de tratamento; as drogas utilizadas nesses estudos de uma maneira ou de outra tiveram ação efetiva em diminuir a parasitemia na fase eritrocítica.

## V. DISCUSSÃO

---

### 5.1. *Croton cajucara* em Modelos de Inflamação

A inflamação é uma resposta do tecido a qualquer tipo de injúria, seja por um agente mecânico, químico ou por microorganismos. Esta resposta inflamatória envolve um complexo conjunto de atividades enzimáticas, liberação de mediadores, extravazamento de fluidos corpóreos, migração e reparo celular (VANE & BOTTING, 1995).

Efeitos antiinflamatórios podem ser atribuídos a uma grande variedade de agentes químicos distintos, muito deles de origem vegetal, e não existe uma correlação evidente entre a atividade farmacológica e suas estruturas químicas (SERTIÉ et al., 1990). As plantas podem se constituir em alternativas para o tratamento de doenças inflamatórias, como sugerido na medicina tradicional.

O edema de pata induzido por carragenina, o granuloma *cotton pellet* e a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por LPS, entre outros, são modelos usados para avaliar a contribuição de mediadores envolvidos em mudanças vasculares e celulares associadas à inflamação.

O edema de pata induzido pela carragenina é comumente empregado como modelo experimental de inflamação aguda. Neste ensaio, o óleo essencial de *C. cajucara* apresentou um efeito dose-dependente, mas sua inibição foi menor do que aquela produzida pela indometacina, utilizada como droga de referência. As drogas capazes de inibir a formação do edema de pata são inibidores típicos da cicloxigenase como a indometacina (ENGELHARDT et al., 1995).

Além disso, o edema de pata induzido por carragenina é usado para avaliar a contribuição de mediadores envolvidos em mudanças vasculares, associadas à inflamação aguda, e apresenta duas fases: a primeira ocorre pela liberação de histamina e 5-hidroxitriptamina, enquanto que a segunda, é devida à liberação de bradicinina,

proteases, prostaglandinas e enzimas lisossomais; o envolvimento do NO, entretanto, está associado às duas fases (SALVEMINI et al., 1996).

Alguns mediadores como leucotrieno B<sub>4</sub> e tromboxano estão também envolvidos na inflamação induzida por carragenina e sugere-se que esses mediadores contribuam então para a resposta inflamatória. A histamina atua na fase inicial do edema de pata e tem um papel dominante em aumentar a vasodilatação e, conseqüentemente, a permeabilidade vascular através da interação com os receptores histaminérgicos H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub> (SALVEMINI et al., 1996).

Como dito anteriormente, as substâncias endógenas como as cininas e prostaglandinas contribuem para aumentar a permeabilidade vascular nesse modelo de inflamação. As prostaglandinas podem mediar a infiltração de proteínas plasmáticas induzida pela carragenina. Antiinflamatórios não esteroidais podem diminuir o acúmulo de neutrófilos, através da supressão do infiltrado de proteínas plasmáticas. A inibição do acúmulo de neutrófilos é independente dos efeitos sobre a via da cicloxigenase e pode estar relacionada à redução da atividade celular tal como proliferação, bloqueio da quimiotaxia ou geração de fatores quimiotáxicos.

A atividade antiinflamatória apresentada pelo óleo mas não pelo infuso e DHC, demonstram que a presença de componentes com efeito anti-edematogênico das cascas de *Croton cajucara* estão de acordo com o trabalho de ICHIHARA, et al., (1992) que, no modelo experimental de inflamação de edema de orelha em ratos não demonstrou a atividade antiinflamatória da DHC.

Assim, foi avaliada também a capacidade das drogas em estudo de inibirem a migração celular, principalmente neutrófilos, para a cavidade peritoneal de camundongos, utilizando como drogas de referência antiinflamatórios não-esteroidais

(indometacina) e esteroidais (dexametasona). Nesse modelo foi possível observar que as drogas em estudo, juntamente com a indometacina, não foram capazes de inibir a migração de neutrófilos, 6 horas após o estímulo com LPS. A indometacina apresentou uma diminuição no número de neutrófilos que migraram para a cavidade peritoneal, mas esta diminuição não foi estatisticamente significativa.

Esses resultados mostraram claramente que a inflamação é um processo multimediado, e talvez, nesse sentido, a resposta do óleo essencial e DHC possam ter efeito antiinflamatório sem inibir os mediadores envolvidos com a migração celular, pode-se até mesmo considerar que o óleo e a DHC teriam participações na inibição da inflamação agindo como antiinflamatórios não esteroidais, diferente da dexametasona que é capaz de inibir a migração de neutrófilos.

A migração de neutrófilos é o evento chave nas reações inflamatórias agudas, o qual é um evento complexo e multimediado, além de não ser totalmente esclarecido. (CYBULSKY et al., 1989; IMHOF et al., 1997).

Os mediadores quimiotáticos envolvidos na migração de neutrófilos para dentro do tecido inflamado incluem o 5º componente do sistema complemento, leucotrieno B<sub>4</sub>, citocinas como o fator de necrose tumoral e interleucinas (IL-1 e IL-8) (CECÍLIO et al., 1997).

A principal função dos neutrófilos, células predominantes no exsudato inflamatório na fase aguda, é a liberação de enzimas citotóxicas que acabem com o estímulos que desencadearam a reação inflamatória (IMHOF et al., 1997).

Os efeitos das drogas não esteroidais sobre os leucócitos ainda não são bem compreendidos. Em doses que bloqueiam a síntese de prostaglandinas e, subsequentemente a febre, o edema e a dor inflamatória, estas drogas não interferem

com a migração de leucócitos, sugerindo que esses mediadores têm pequena participação na migração leucocitária (HIGGS et al., 1980). No entanto, doses mais elevadas, inibem parcialmente a migração, embora os mecanismos envolvidos ainda não estejam totalmente esclarecidos. Como nessas doses ocorre inibição da síntese do leucotrieno B<sub>4</sub> foi sugerido que o bloqueio da migração se deve à inibição da lipoxigenase.

Os glicocorticóides, por sua vez, inibem a produção dos eicosanóides através da síntese de um peptídeo, a lipocortina, o qual atua inibindo a fosfolipase A<sub>2</sub>, enzima que libera o ácido araquidônico dos fosfolídeos de membrana. Portanto, os glicocorticóides bloqueiam tanto a síntese de prostaglandinas, quanto aquela de leucotrienos. Isto explica pelo menos em parte a grande eficácia destes esteróides na inibição dos eventos inflamatórios (FLOWER, 1988). O bloqueio da migração de leucócitos deve-se à ação dessa droga em vários sítios. Muitas evidências demonstram que os glicocorticóides bloqueiam a síntese e/ou liberação de fatores quimiotáticos (BARJA-FIDALGO et al., 1992). Assim, o bloqueio das fosfolipases, pelos glicocorticóides, ocasiona inibição da síntese de leucotrieno B<sub>4</sub>, que é quimiotático para neutrófilos, além de outras citocinas como IL-1 e TNF. Os glicocorticóides também inibem a aderência dos leucócitos ao endotélio (IMNOF et al., 1997).

Os macrófagos são considerados células multifuncionais, participando não só da fase crônica da reação inflamatória e da regulação da resposta imune, como também do desencadeamento e modulação de vários eventos da fase aguda da inflamação. Este tipo celular libera muitas substâncias que participam de vários eventos da reação inflamatória aguda. Neste contexto, dados da literatura demonstram que os macrófagos participam do início da migração de neutrófilos para o foco da lesão (DALLEGRI et al.,

1997). Além disso, RUSSO (1980) demonstrou que a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos induzida por LPS é dependente dos macrófagos peritoneais. Com relação à importância dos macrófagos peritoneais para o recrutamento de neutrófilos para a cavidade abdominal existem vários estudos visando esclarecer o modo pelo qual os antiinflamatórios exercem seus efeitos.

Nesse resultado foi possível observar que quando foi utilizado um inibidor da ciclooxigenase, a indometacina, o efeito inibidor da migração de neutrófilos não pode ser demonstrado; entretanto, quando o agente antiinflamatório usado foi a dexametasona, houve redução significativa da migração de neutrófilos.

Assim, admite-se que a migração de neutrófilos para o exsudato inflamatório tem dois estágios bem definidos: adesão às células endoteliais dos vasos e migração para o espaço extravascular, ambos orientados por substâncias quimiotáticas. Os glicocorticóides interferem com os dois eventos (OTTONELLO et al., 1995).

No modelo experimental do granuloma induzido por *pellet* de algodão, empregado para o estudo da inflamação crônica, o fluido absorvido pelo *pellet* reproduz o peso úmido do granuloma bem como a quantidade de tecido granulomatoso. O granuloma formado no processo de inflamação crônica é composto de células compactadas de macrófagos, monócitos, células epiteliais e células gigantes, com consequente formação de filamentos de fibrina ao redor do algodão (ROOK, 1985).

Os resultados mostraram que tanto o infuso, quanto a DHC e o óleo foram eficazes em promover uma resposta antiinflamatória no modelo de granuloma *cotton pellet*; entretanto, só a DHC e o óleo apresentaram resultados estatisticamente significativos. Portanto, o óleo essencial e a DHC mostraram-se equivalentes em inibir a fase proliferativa do granuloma. Esse modelo experimental caracteriza um processo

inflamatório crônico e sistêmico. A fase proliferativa, compreendida entre o 3º ao 6º dia, pode ser inibida por agentes antiinflamatórios não esteroidais e também por drogas esteroidais (SWINGLE & SHIDEMAN, 1972).

Foi possível verificar que o óleo essencial apresentou efeito antiinflamatório com características de drogas semelhantes a aspirina pois reduziu a inflamação aguda (edema) e crônica (*cotton pellet*) mas não conseguiu inibir a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, enquanto o glicocorticóide foi capaz de inibir cerca de 90% da migração induzida pelo LPS.

Os dados obtidos sugerem que óleo e DHC poderiam ter participação sobre os mediadores envolvidos na resposta inflamatória que são liberados no local da injúria e são responsáveis pela migração celular para o sítio lesado.

Por outro lado, a pesquisa na busca de drogas antiinflamatórias seguras, as quais não apresentem efeitos gástricos indesejáveis, continua em andamento. Parte dessas pesquisas envolve o estudo de plantas medicinais, conhecidas popularmente no tratamento de desordens inflamatórias, sem relatos de efeitos colaterais sobre o trato gastrointestinal (SINGH et al., 1989). Concomitantemente, o composto utilizado neste trabalho apresenta atividade antiulcerogênica em vários modelos experimentais (SOUZA BRITO et al., 1998; HIRUMA-LIMA et al., 1999).

Assim, a resposta antiinflamatória obtida para a DHC e óleo é muito mais importante quando suas atividades antiúlcera são consideradas.

## 5.2. *Ensaio Toxicológico in vitro*

Recentemente, os efeitos citotóxicos dos produtos químicos tem sido classificados em três categorias. A primeira delas é a citotoxicidade geral ou basal a qual se refere a

efeitos adversos sobre a integridade das membranas ou do citoesqueleto, metabolismo, síntese, degradação ou liberação de componentes ou produtos celulares, até a regulação dos íons e à divisão celular, em células não diferenciadas (SEIBERT et al., 1996). Nos fenômenos de citotoxicidade basal todos os tipos celulares apresentam uma sensibilidade similar, e os valores do  $IC_{50}$  obtidos nos ensaios de citotoxicidade, avaliando diferentes alvos celulares, geralmente se encontram próximos (CLEMEDSON et al., 1996).

Na segunda categoria está a citotoxicidade seletiva ou órgão específica que refere-se a situações onde alguns tipos de células diferenciadas são mais sensíveis que outras aos efeitos tóxicos de um produto químico. Isso pode ocorrer como consequência da biotransformação do composto ou sua interação com receptores específicos das células ou ainda à presença de carreadores específicos de incorporação do composto, localizados na membrana celular (SEIBERT et al., 1996).

A terceira e última categoria é chamada citotoxicidade específica de funções celulares ou toxicidade de organização, e corresponde a efeitos tóxicos que afetam estruturas ou processos comuns das células em geral e, conseqüentemente, envolvem todo o organismo. São exemplos deste tipo de toxicidade as alterações das comunicações entre as células que ocorrem através de síntese, liberação, degradação e ligação com seus respectivos receptores de citocinas, neurotransmissores e hormônios.

No modelo experimental de cultura celular foi examinada a citotoxicidade dos compostos em estudos utilizando inicialmente cultura de fibroblastos da linhagem V79. Estes resultados subsidiaram os estudos das concentrações em cultura de hepatócitos. Os valores da  $IC_{50}$  das substâncias testadas apresentaram-se tóxicos para as células V79, mas as mesmas concentrações foram utilizadas na cultura de hepatócitos pois, em se

tratando de células hepáticas, pode ocorrer metabolização do composto, transformando-se em um metabólito menos tóxico.

Os resultados de citotoxicidade apresentados pela DHC, infuso e óleo essencial sobre as células não diferenciadas V79 permitem que os mesmos sejam classificados como fenômenos de citotoxicidade basal, já que as células apresentaram uma resposta similar, independentemente da linhagem ou do alvo celular avaliado no ensaio (CLEMEDSON et al., 1996).

Os resultados com DHC permitem propor ainda que sua biotransformação hepática produz metabólito(s) com efeito tóxico a nível mitocondrial, o que poderia ser classificado como citotoxicidade seletiva (SEIBERT et al., 1996), observada no teste de redução do MTT.

O infuso, apesar de ter o mesmo comportamento inicial que a DHC (toxicidade maior para hepatócitos que para células V79), apresentou uma acentuada redução do MTT nas concentrações mais baixas, mostrando um estímulo das desidrogenases mitocondriais. No entanto, a viabilidade celular está diminuída (conteúdo de DNA) revelando uma toxicidade ainda maior visto que hepatócitos não proliferam em cultura, ao contrário da capacidade proliferativa das células V79 (ROGIERS et al., 1995); portanto, as leituras de DNA correspondem somente às células que foram capazes de sobreviver ao tratamento.

Certas substâncias tóxicas como o infuso podem acentuar a redução do MTT em células hepáticas. Isso é explicado por alguns autores que sugerem que a redução do MTT é predominantemente uma avaliação do balanço NAD(P)/NAD(P)H citosólico. A presença de inibidores ou indutores da manutenção desse balanço interfere na capacidade de redução do MTT (FRY et al., 1995).

Com os resultados obtidos com o óleo essencial é possível propor que esse composto é capaz de ser metabolizado, como os demais, pelo fígado. Isto é evidente na diferença da toxicidade apresentada em células V79 e em hepatócitos, onde o óleo parece sofrer metabolização a nível hepático pelo sistema P-450, uma vez que originou metabólito(s) menos tóxicos. Pode ser ainda que essas células sejam menos sensíveis aos metabólitos, sendo o(s) metabólito(s) menos tóxicos para os hepatócitos que para as células V79 (PONSODA et al., 1995).

A partir desses resultados foi proposto o ensaio de hepatoproteção *in vitro* somente com o óleo, já que os demais compostos apresentaram-se mais tóxicos para essas células.

A cumarina foi utilizada como agente lesivo para os hepatócitos, pois é metabolizada pelo sistema P-450 e sua toxicidade para as células hepáticas é maior comparada àquela das células V79, além deste composto ter mostrado efeito tóxico em culturas de hepatócitos com o tempo de exposição de 24 horas (RENZI, 1993; HAMMOND et al., 1996). A galactosamina era o agente hepatotóxico de escolha; no entanto, não alterou a cultura de hepatócitos em concentrações acima de 1000  $\mu\text{M}$  ou seja, não houve modificação nos valores do conteúdo de DNA e do MTT em relação ao controle na presença de galactosamina.

Esse experimento, realizado no mesmo protocolo de verificação de hepatotoxicidade, não foi positivo, pois as células tratadas com o suposto agente hepatoprotetor (óleo) tiveram a viabilidade celular diminuída. Esses resultados também foram confirmados pelos estudos *in vivo*.

### 5.3. Modelos de Lesão Hepática e *Croton cajucara*

Foram estudados também os efeitos do óleo, do infuso e da DHC em modelo experimental *in vivo* de lesão hepática induzida pela galactosamina. O mecanismo de ação da galactosamina compreende principalmente a diminuição da síntese de RNA e, portanto a síntese de proteínas, e a síntese das demais macromoléculas como glicoproteínas, glicolípideos e glicogênio. Isso leva à morte da membrana celular e também sugere-se que ocorra alteração do sistema reticulo-endotelial, endotoxemia e acumulação de  $Ca^{2+}$  dentro das células parenquimais contribuindo para a necrose hepática (DUMONT et al., 1987).

A galactosamina mimetiza os aspectos patológicos da hepatite (KEPPLER et al., 1974) e a intensa exposição das estruturas das membranas a esta droga pode ser responsável pela perda das bombas iônicas, principalmente a bomba de  $Ca^{+2}$ . O consequente aumento do  $Ca^{+2}$  intracelular levaria à morte celular (TSAI et al., 1997).

Inicialmente, duas razões nortearam a escolha desse modelo experimental: a seletividade da galactosamina em causar morte celular de hepatócitos, além de impedir a capacidade proliferativa dos hepatócitos residuais novamente em 48 horas. Além disso, esse modelo apresenta ainda a vantagem de não ser carcinogênico.

Os níveis alterados de transaminases no soro, dependendo do caso, são indicativos de lesão nos hepatócitos, que liberam essas substâncias citoplasmáticas na corrente circulatória. Como os resultados de ALT e AST encontrados apresentaram-se alterados horas após a administração da galactosamina foi confirmada a lesão de hepatócitos.

Quando a galactosamina é administrada, uma série de reações metabólicas específicas ocorrem no hepatócito, com completo consumo de nucleotídeos que leva a um bloqueio da síntese de RNA seguindo-se de inibição da síntese protéica. Em doses

altas, a galactosamina produz necrose hepática e intensa resposta inflamatória no local da injúria. Se a galactosamina lesa os hepatócitos e mimetiza alguns aspectos patológicos da hepatite viral (KEPPLER et al., 1974), e portanto, aumenta o número de células inflamatórias (SHIATORI et al., 1986), poder-se-ia então comparar os resultados de hepatoproteção com aqueles de ação antiinflamatória (LASKIN, 1990).

A princípio, era intenção desse trabalho comparar os resultados antiinflamatórios do óleo essencial e da DHC, pois as mesmas poderiam diminuir a lesão hepática inibindo o efeito inflamatório desencadeado pela galactosamina. A ação antiinflamatória, obtida para ambas as substâncias de *Croton cajucara*, poderia estar ocorrendo através da inibição da migração de células inflamatórias para o local da injúria. No entanto, no experimento de hepatoproteção não se obteve o resultado esperado.

Embora na dosagem de ALT o infuso tenha se mostrado estatisticamente diferente em relação ao controle no sentido da enzima estar menos presente no plasma do que no grupo controle, não é possível interpretar esse resultado como um efeito hepatoprotetor.

Em outros parâmetros analisados isso não ocorreu, levando em consideração os valores das demais enzimas. A tendência de proteger o fígado, apresentada pelo infuso pode se dever à presença de compostos que realmente possam proteger o fígado como indicado na medicina popular, já que o infuso apresenta uma mistura de compostos.

Esse fato corroborou aqueles resultados de citotoxicidade onde, principalmente o infuso e a DHC se mostraram tóxicos para os diferentes tipos de células estudados, enquanto que o óleo essencial se mostrou menos tóxico em cultura de hepatócitos, (células metabolizantes) do que em fibroblastos (células não metabolizantes). Mesmo com essa característica, o efeito hepatoprotetor esperado não foi obtido em culturas de hepatócitos lesados com uma droga conhecida, a cumarina.

Esses ensaios *in vitro* puderam mostrar que as substâncias objetos de nosso estudo são metabolizadas pelo fígado, mais especificamente pelo citocromo P-450. Esta metabolização transforma as substâncias estudadas em metabólitos mais tóxicos, no caso da DHC e infuso (bioativação), mas pode transformar também em metabólitos menos tóxicos, detoxificação, no caso do óleo (LIEBER, 1997).

Em experimentos realizados em nosso laboratório foi possível observar que somente o óleo foi capaz de aumentar a duração do tempo de sono induzido por pentobarbital. Este modelo experimental é conhecido por subsidiar um perfil farmacológico da droga sobre o SNC mas também demonstra o envolvimento da droga com o sistema P-450.

O estudo *in vitro* pode complementar os resultados com o estudo *in vivo*. Técnicas *in vitro* para o *screening* de produtos naturais tem sido plenamente exploradas. A combinação de vários métodos pode ser usada para detectar diferentes efeitos e mecanismos celulares, incluindo metabolismo hepático, danos na membrana e diminuição do crescimento tal como alterações genéticas (PHILLIPS, 1996).

Contudo, não foi possível avaliar o efeito hepatoprotetor das drogas em estudo, na hepatite experimental induzida pela galactosamina em ratos, em nenhum dos parâmetros analisados.

É bem sabido, que mamíferos respondem aos danos no tecido iniciando uma complexa rede de interações celulares e moleculares para ajudar o reparo dos tecidos e facilitar o retorno à homeostase fisiológica. A inflamação no retículo endotelial hepático invoca uma reação de defesa pré-sistêmica que ativa macrófagos e atrai monócitos e células polimorfonucleares no intuito de se livrar dos microorganismos, produtos de toxina microbiana e outros xenobióticos. As células de Kupffer e os macrófagos desenvolvem um papel chave no sistema imune não específico.

Apesar da atividade antiinflamatória da DHC e do óleo, o efeito hepatoprotetor dessas drogas não pode ser demonstrado na hepatite experimental induzida pela galactosamina em ratos. Além disso, em experimentos de toxicidade subcrônica onde ratos foram tratados durante 35 dias com DHC, na dose de 100 mg/Kg, apresentou efeito tóxico para o fígado; porém, não foi estudado se essa toxicidade poderia ou não ser revertida (RODRÍGUEZ et al., 1999)

Deste modo, a utilização do infuso como antiinflamatório em inflamações hepáticas como aquelas causadas por hepatite e malária se justifica pelo efeito antiinflamatório da DHC e do óleo presentes no infuso, mas não pelo efeito hepatoprotetor destas substâncias como era nossa hipótese inicial.

#### 5.4. Substâncias de *Croton cajucara* e Malária

O modelo da malária em camundongos tem sido extensivamente usado para determinar a ação de drogas que suprimem a fase eritrocítica da doença (HILL, 1975) e o modelo aviário tem sido usado também para se estudar as formas eritrocíticas e exoeritrocíticas (GUADZ et al., 1983).

Descartado o efeito hepatoprotetor do infuso e seus componentes era necessário estudar então a atividade anti-malárica profilática e curativa da *Croton cajucara* conhecida como sacaca. Segundo, informações da medicina popular, essa planta é utilizada para cura da doença (VAN DER BERG, 1982).

Devido a importância do uso popular da sacaca, investigamos a atividade preventiva e curativa contra as formas sangüíneas utilizando modelos experimentais com três diferentes tipos de plasmódios.

O teste de antimaláricos, a partir da inoculação de esporozoítas dos plasmódios e utilizando drogas-testes em diferentes esquemas de tratamento é empregado na avaliação de novas drogas, permitindo seu uso nas triagens de drogas profiláticas (BRANDÃO et al., 1997). A redução do parasitismo dos animais tratados em relação aos animais controle demonstrou a relevância do modelo na avaliação da eficácia dessas drogas.

Os compostos originados da sacaca, como demonstrados nos resultados, apresentaram diferentes respostas de acordo com o esquema de tratamento. Contudo, foi possível observar que tanto o infuso, quanto o óleo e a DHC com diferenças intrínsecas importantes, apresentaram resultados estatisticamente significativos. Não há dúvidas, entretanto, de que o tratamento em que o infuso foi administrado *ad libitum* aos animais apresentou resultados muito semelhantes à cloroquina ou droga-padrão utilizada como controle positivo no tratamento. É importante ressaltar ainda que todas as drogas em estudo estão presentes no infuso evidenciando, portanto, esse resultado.

Esses resultados mostraram, que as substâncias de *C. cajucara* foram ativas contra o estágio esquizogônico no sangue de animais infectados com *P. berghei* e *P. gallinaceum*, confirmando a indicação popular, pois o chá dessa planta é extensivamente utilizado em algumas áreas da Amazônia para a profilaxia da malária humana por populações indígenas (Di STASI et al., 1989).

Plantas brasileiras utilizadas como esquizonticidas sangüíneos são usadas na medicina popular para tratar os sintomas clínicos da doença, em geral a febre que é muito característica por ser intermitente. Como as manifestações clínicas da doença são decorrentes das formas sangüíneas, o modelo mais usado por ser mais econômico e de fácil manuseio é o de plasmódio em roedores, *P. berghei* em camundongos albinos

(CARVALHO et al., 1991). Outras plantas brasileiras testadas anteriormente também apresentaram atividade sobre o parasita, como é o caso de *Vernonia brasiliiana* e o *Eupatorium squalidum* (Asteraceae) (CARVALHO et al., 1991).

Atualmente, os testes antimaláricos de produtos naturais concentram-se em extratos e frações isoladas de plantas tidas na medicina popular brasileira como anti-térmicas e/ou anti-maláricas.

A quinina isolada das cascas de *Cinchona* (Rubiaceae), tem sido usada como antimalárica desde do século XVI e sua estrutura química deu origem a outros antimaláricos sintéticos utilizados, como a cloroquina, e continua sendo a droga de escolha para a administração endovenosa em pacientes com malária grave causada por *P. falciparum* resistentes à cloroquina (CARVALHO et al., 1991). A artemisinina, isolada de uma planta usada há 2000 anos na China como anti-febrífugo – *Artemisia annua* – Ginghaosu (Asteraceae) – é um potente esquizotocida sanguíneo e vários derivados semi-sintéticos mais ativos já foram desenvolvidos a partir de sua molécula (BENOIT et al., 1996).

A artemisinina é uma sequiterpeno lactona (fórmula empírica  $C_{15}H_{22}O_5$ ), da mesma classe química da DHC, difere dos demais anti-maláricos por não apresentar o núcleo quinólico como as demais drogas utilizadas para este fim. O seu mecanismo de ação permanece incerto; parece que a mesma ativa o grupo heme parasitário gerando compostos oxidativos, esse stresse oxidativo já imposto pelo parasita é aumentado, promovendo maior citotoxicidade, fagocitose e clearance pelos leucócitos do hospedeiro. Além de prevenir a cito-aderência (aderência dos eritrócitos contendo parasitas no endotélio vascular). Esses fatores podem ser importantes no mecanismo patofisiológico da malária (HIEN & WHITE, 1993).

Foi realizada uma triagem farmacológica na Amazônia utilizando 23 espécies de plantas, na forma de extrato bruto, para avaliar o efeito antimalárico. Os resultados mostraram que 5 dessas espécies apresentaram atividade antimalárica. São elas: *Acanthospermum australe* (Asteraceae), *Esenbeckia febrifuga* (Rutaceae), *Lisianthus speciosus* e *Tachia guianensis* (Gentianaceae) e, mais recentemente, a *Bidens pilosa* e *B. bipinnatus*, popularmente conhecidas como picão. Este último resultado é de grande interesse uma vez que esta planta ocorre em todo Brasil (CARVALHO et al., 1991).

A cloroquina utilizada como controle positivo é conhecida como uma droga esquizonticida (esquizonticidas sangüíneos) essas agem nos estágios eritrocíticos assexuados dos parasitas da malária, para interromper a esquizogonia eritrocitária e portanto, acabar com os ataques clínicos da doença. Esses agentes podem produzir cura supressiva que refere-se a eliminação completa dos parasitas do sangue pela terapia continuada. O mecanismo de ação dessas drogas pode ser explicado em parte devido a capacidade de se concentrarem nos eritrócitos infectados, são bases fracas, que concentram-se em altos níveis e elevam o pH nos vacúolos alimentares acídicos dos parasitas maláricos sensíveis. A digestão da hemoglobina, do hospedeiro, dentro dos vacúolos alimentares acídicos dos plasmódios libera o grupo heme (ferriprotoporferina IX), um composto tóxico com propriedades membranolíticas. O heme por sua vez é detoxificado pela conversão a pigmento malárico insolúvel inofensivo (hemozoína). A atividade da polimerase inibida pela cloroquina, foi observada catalisando essa reação, dando a idéia que o heme poderia acumular-se em níveis tóxicos, na presença dessa droga (SLATER & CERAMI, 1992). Outro mecanismo possível, é a formação de complexos-heme tóxicos (SCHLESINGER et al., 1988), outras sugestões foram avançadas como a intercalação do fármaco com o DNA do parasita, interferência com a

biossíntese do DNA/RNA parasitário, inibição da protease da hemoglobina, ou outras enzimas pela ligação direta com a droga ou elevando o pH intra-vacuolar. A sensibilidade dos plasmódios intra-eritrocitários aos antimaláricos alcaloide está relacionado à capacidade destes organismos concentrarem estas drogas de modo seletivo. Por exemplo as cepas de *P. falciparum* sensíveis a cloroquina acumulam altos níveis desta substância, enquanto os níveis são mais baixos nos parasitas resistentes. Além disso, bloqueadores do canal de  $\text{Ca}^{++}$  que reduzem o efluxo da cloroquina podem restabelecer parcialmente a sensibilidade dos parasitas resistentes à cloroquina (BITONTI et al., 1988).

Plantas com atividade antimalárica são promissoras no desenvolvimento de novos medicamentos. Entretanto, é um longo caminho a percorrer para obtenção do protótipo de um medicamento, um produto com atividade farmacológica desejável para estudos toxicológicos e de metabolismo.

Embora, os dados apresentados sejam preliminares e apresentem controles parciais é de relevante importância, mostrar os resultados obtidos, devido a magnitude dos efeitos encontrados.

## ***VI. CONCLUSÕES***

---

Os ensaios experimentais *in vivo* e *in vitro* com o infuso, óleo essencial e DHC de *Croton cajucara* Benth. demonstraram que:

- A administração aguda oral do óleo essencial e DHC, mas não de infuso, apresentou significativa atividade antiinflamatória no modelo de inflamação do granuloma *cotton pellet* em ratos,
- O óleo essencial apresentou atividade antiinflamatória no modelo experimental de inflamação aguda (edema de pata em camundongos induzido por carragenina). No entanto, nenhuma das drogas foi eficaz em inibir a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos.
- Foi possível determinar a citotoxicidade desses compostos em modelos de cultura celular, utilizando fibroblastos isolados do pulmão de hamster chinês e células hepáticas. O infuso e a DHC mostraram-se mais tóxicas em culturas de células hepáticas. O óleo essencial não demonstrou sinais de hepatotoxicidade, pois apresentou menor toxicidade nessas células se comparado com fibroblastos (células não metabolizantes).
- O óleo essencial, no modelo de hepatoproteção *in vitro*, não demonstrou eficácia em proteger os hepatócitos do efeito lesivo da cumarina avaliado pelo teste do MTT e conteúdo de DNA.
- Nos testes de hepatoproteção *in vivo* as drogas em estudo não foram capazes de proteger o fígado do dano hepático induzido por galactosamina,
- No teste de quimioterapia experimental a sacaca usada para aliviar os sintomas da malária humana foi ativa em suprimir a fase eritrocítica do ciclo, ou seja, reduziu a parasitemia em animais inoculados com diferentes tipos de plasmódios.

- Portanto, o uso popular das cascas de sacaca para o tratamento de inflamações e da malária, pode ser devido à associação das atividades apresentadas pelos compostos, DHC e óleo essencial, ambos presentes na preparação tradicionalmente utilizada.

*VII. ABSTRACT*

---

Malaria a parasitic disease prevalent in tropical countries strikes approximately 300 million individuals/year in the world and has recently become more serious due to *Plasmodium* resistance to drugs. The search for new antimalarial drugs to replace or complement the current therapeutic arsenal is one of the priorities of the World Health Organization. The species *Croton cajucara* or “sacaca”, a typically Brazilian plant, is popularly indicate as an aid for the treatment of malaria, inflammation of the liver and jaundice, among other conditions. The effects of *Croton cajucara* on the aspects associated with the signs and symptoms of malarial infection were studied in addition to the effect on the parasite itself due to the liver damage produced by malaria and in view of the popular indications of this species. We initially studied the pharmacological effect of an infusion, of the essential oil and of dehydrocrotonin obtained from “sacaca” bark on experimental models of inflammation and of liver protection. The essential oil had a dose dependent anti-inflammatory effect on models of acute inflammation (paw edema induced by carrageenin) and of chronic inflammation (cotton pellet granuloma) but did not inhibit lipopolysaccharide-induced neutrophil migration to the peritoneal cavity of mice. Dehydrocrotonin inhibited the inflammatory process only when the animals were treated chronically, while the infusion had no anti-inflammatory effect on any of the models studied. In citotoxicity assays carried out on lung fibroblasts from Chinese hamsters of the V79 strain and on primary rat hepatocyte cultures, we noted that the toxicity of the substances under study was dose dependent. These results permitted us to compare citotoxicity on metabolizing cells (hepatocytes) and non-metabolizing cells (fibroblasts). The essential oil showed lower citotoxicity on hepatic cells than on fibroblasts, whereas the opposite occurred with the other products. When the essential oil was tested on the model of *in vitro* liver protection using coumarin as a hepatotoxic drug, the essential oil was

unable to protect the liver against this damaging agent. In the *in vivo* liver protection assays all products were ineffective in protecting the liver and indeed potentiated the hepatotoxic agent studied, galactosamine. Preliminary studies of the effects of these products on malaria demonstrated that the infusion (with higher potency), the essential oil and dehydrocrotonin inhibited parasitemia in animals (birds in mice) mainly infected with *P. berghei* and *P. gallinaceum*. We also determined the composition of the infusion, which consists of 13% dehydrocrotonin plus essential oils and sugars in lower amounts. Thus, the present studies demonstrated that, despite the cytotoxicity of the infusion the popular use of tea of “sacaca” bark for the treatment of malaria is perfectly justified, although in a preliminary manner.

***VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

- Allameh, A.; Vansoun, E. & Zarghi, A. (1997). Role of glutathione conjugation in protection of weanling rat liver against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Mech. Ageing Dev.* **95**: 71-79.
- Araújo, V.C.; Correia, G.C.; Maia, J.G.S.; Silva, M.L.; Gottlieb, O.R.; Marx, M.C. & Magalhães, M.T. (1971). Óleos essenciais da Amazônia contendo linalol, *Acta Amazônica*, **1**(3): 45-47.
- Barja-Fidalgo, C.; Carlini, C.R.; Guimarães, J.A.; Flores, F.Q., and Ferreira, S.H. (1992). Role of resident macrophages in canatoxin-induced in vivo neutrophil migration. *Inflammation*, **1**(1): 2-12.
- Bazan, N.G. (1995). A signal terminator. *Nature*, **374**: 501-502.
- Benoit, F.; Valentin, A.; Pelissiei, Y.; Diafouka, F.; Marion C., Kone-Bamba, D.; Kone, M. Mallie, M.; Yapo A.; Bastide, J.M. (1996). *In vitro* antimalarial activity of vegetal extracts used in West African traditional medicine. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **54**(1):67-71.
- Berthiaume, F.; Moghe, P.; Toner, M. & Yarmush, M. (1996). Effect of extracellular matrix topology on cell structure, function and physiological responsiveness: hepatocytes cultures in a sandwich configuration. *Faseb Journal*, **10**: 1741-1484.
- Bianchi, V. & Fortunati, E. (1990). Cellular effects of an anionic surfactant detected in (V/79) fibroblasts by different cytotoxicity tests. *Toxicology in vitro*, **4**: 9-16.
- Bitonti, A.J. (1988). Reversal of chloroquine resistance in malaria parasite *Plasmodium falciparum* by desipramine. *Science*. Dec **2**; **242**(4883): 1301-1303.
- Borefreund, E. and Puener, J.A. (1984). A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR 90). *Journal of Tissue Culture Methodology*, **9**: 7-9.

- Brandão, M.G.L.; Soares, L.S.R.; Nery, C.G.C.; Marinuzzi, H.C. & Krettli, A.U. (1997). Antimalarial of extracts and fractions form *Bidens pilosa* and other *Bidens* species correlate with the present of acetylene and flavonoid compounds. *Journal Ethnopharmacology*, **57**(2):131-138.
- Brown, K.A. & Collins, A.J. (1978). *In vitro* effects of drugs on human polymorphonuclear cells and lymphocyte migration. *Brithish Journal Pharmacology*, **64**: 347-352.
- Bruce-Chwatt, L.J. (1986). From malaria eradication to malaria control: the past, the present and the future. In: *Essential Malariology*. 2<sup>nd</sup> Ed., William Heinemann Medical Book Ltda., 360-386, London.
- Bruner, L.H.; Carr, G.J.; Chamberlain, M. & Curren R.D. (1996). Validation of Alternative methods for toxicity testing. *Toxicology in vitro*, **10** (4): 479-501.
- Butler, D.; Maurice, J.; O'Brien, C. (1997). Time to put malaria control on the global agenda. *Nature*, **386**(6625), 535-536.
- Carvalho, L.H. (1990). Quimioterapia experimental antimalárica com extratos brutos de plantas e compostos quimicamente definidos. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 146p. Tese-Mestrado.
- Carvalho, L.H.; Brandão, M.G.L.; Santos-Filho, D.; Lopes, J.L.C. and Krettli, A.U. (1991). Antimalarial activity of crude extracts from brazilian plants studied *in vivo* in *Plasmodium berghei*-infected mice and *in vitro* against *Plasmodium falciparum* in culture. *Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research*. **24**: 1113-1123.
- Carvalho, L.H.; Ferrari, W.M.S. and Krettli, A.U. (1992). A method for screening drugs against the liver stages of malaria using *Plasmodium gallinaceum* and *Aedes* mosquitos. *Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research*. **25**: 247-255.
- Castilho-Salgado, C. Epidemiological risk stratification of malaria in the Americas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **87** (suppl. III): 115-120, 1992.

- Cattani, J.; Davidson, D & Engers, H. Malária. (1993). In: *Tropical Disease Research. Progress 1991-1992*, 15-27. Eleventh Programme Report, UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, Geneva.
- Cecílio, C.A.; Costa, E.H.; Ucelli, P.; Chaves, C.A.A.; Toffoli, M.C.; Flores, C.A.; Cunha, F.Q.; Ferreira, S.H. and Tamashiro, W.M.S.C. (1997). The neutrophil migration induced by tumour necrosis factor alpha in mice is unaffected by glucocorticoids. *Mediators of Inflammation*, **6**: 46-52.
- Cerami, C.; Frevert, U.; Sinnis, P.; Iakacs, B.; Clavijo, P.; Santos, M.J. & Nussenzweig, V. (1992). The basolateral domain of the hepatocyte plasma membrane bears receptors for the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Cell Press*, **70**: 1021-1033.
- Cernáková, M.; Slamenová, D.; Golis, E. & Sutý L. (1993). Application of the cell growth and DNA-inhibition tests for characterizing sulfate pulp mill waste waters. *Folia Microbiology*, **38**:406-410.
- Chatenoud, L. & Bach, J.F. (1990). Inflammation et rejet. *Nephrologie*, **11**(4): 189-193.
- Cingi, M.R.; DE Angelis, I.; Fortunati, E.; Reggiani, D.; Bianchi, V., Tiozzo, R. & Zucco, F. (1991). Choice and standardization of test protocols in cytotoxicology: a multicentre approach. *Toxicology in Vitro*: **52**, 119.
- Clemenson, C.; Mcfarlane-Abdulla, E.; Anderson, M.; Barile, F.A.; Calleja, M.C.; Chesné, C.M. (1996). MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Part II. *In vitro* results from 68 toxicity assays used to test the first 30 reference chemicals and a comparative citotoxicity analyses. *Atla I*, **24**(2): 273-311.
- Coltren, H.R. (1992). Tissue-specific regulation of inflammation. *Journal Applied Physiology*, **72** (1): 1-7,
- Cook, J.A. & Mitchell, J.B. (1989). Viability measurements in mammalian cells systems. *Analytical Biochemistry*, **179**: 1-7.

- Coulston, F. & Huff, C.G. (1967) The morphology of cryptozoites and metacryptozoites of *P. relictum* and the relationships of these stages to parasitemia in canaries and pigeons. *J. Inf. Dis.*, **80**: 209-213.
- Couto, A.A. Calvosa, V.S.; Santos, M.A. & Souza, J.M. (1993). Resistência *in vitro* de cepas de *Plasmodium falciparum* isolados no Sul do estado do Pará, em diferentes períodos. Emergências de casos de multiresistência. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. **26**(1):5-9.
- Cowman, A.F. (1991). The P-glycoprotein homologues of *Plasmodium falciparum*: are they involved in chloroquine resistance? *Parasitology Today*. **7**(4): 70-75.
- Cybulsky, M.I., McComb D.J.; & Movat H.Z. (1989). Protein synthesis dependent and independent mechanisms of neutrophil emigration. Different mechanisms of neutrophil emigration. Different mechanisms of inflammation in rabbits induced by interleukin-1, tumor necrosis factor alpha or endotoxins versus leucocyte chemoattractants. *American Journal of Pathology*, **135**: 227.
- Dale, M.M. (1984). The neutrophil leucocyte. In: Dale, M.M. & Foreman, J.C. (editores) (1984) *Textbook of Immunopharmacology*, Blackwell Scientific Publications, pp 36-52.
- Dallegri, F. & Otonello, L. (1997). Tissue injury in neutrophilic inflammation. *Inflammation Research*, **46**: 382-391.
- Denizot, F.; & Lang; R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunology and Methods*. **89**:271-277.
- Di Stasi, L.C.; Santos, E.M. G.; Santos, C.M. & Hiruma, C.A., (1989). In: *Plantas Medicinais da Amazônia*, Ed. UNESP, São Paulo, 194p.
- Dumont, J.M.; Maignan, M.F. & Perrissoud, D. (1987). Protective effect of malotilate against galactosamine intoxication in the rat. *Archive internacional of Pharmacodynamic*, **289**: 296-310.

- Englhardt, G.; Homma, D.; Schlegel, K.; Utzmann, R. & Schnitzler, C. (1995). Anti-inflammatory, analgesic, antipyretic and related properties of meloxicam, a new non-steroidal anti-inflammatory agent with favourable gastrointestinal tolerance. *Inflammation Research*, **44**: 423-433.
- Faure, P.; Hulier, E.; Miltgen, F.; Renia, L. & Mavier, D. (1995). Protective immunity against malaria: cellular changes in the liver vary according to method of immunization. *Parasite Immunology*, **17**: 469-477.
- Fenten, J.H.; Hammond, A.H.; Garle, M.J. & Fry, J.R. Toxicity of coumarin and various methyl derivatives in cultures of rat hepatocytes and V79 cells. *Toxicology in vitro*, **6**: 21-25,1992.
- Ferrari, W.M.S.; Brandão, M.G.L. & Krettli, A.U. (1992) Prophylactic activity of *Ampelozizyphus amazonicus* (AZA) against malaria. VIII Reunião da Sociedade Brasileira de Protozoologia (Caxambu, MG. 10-11/nov. PZ-52). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **87**(suppl. II): 256.
- Flower, R.J. (1988). Lipocortin and the mechanism of action of the glucocorticoids. *British Journal Pharmacology*, **94**: 57-62.
- Fresney, R.I. (1994). Measurement of viability and citotoxicity. *Culture of animal cells*. Ed. R.I. Fresney. John Wiley and Sons, Inc., New York, 287-307.
- Fry, J.R.; Hammond, A.H.; Garle, M.J. & Lal, K. (1993). Comparison of xenobiotic-mediated citotoxicity in rat cultured hepatocytes and V79 chinese hamster lung fibroblast cell line: can metabolically-activated hepatotoxins be identified by selective cytotoxicity to hepatocytes?. *Atla-Alternative laboratory animal*, **21**: 8-12.
- Fry, J.R.; Hammond A.H.; Atmaca, M.; Dhanjal, P. & Wilkinson, D. J. (1995). Toxicity testing using hepatocytes: some methodological aspects. *Atla*, **23**: 91-96.

- Gao, P.; Thornton-Manning, J. & Pegran, R. (1996). Protective effects of glutathione on bromodichloromethane *in vivo* macromolecular binding in Fisher 344 rats. *Journal toxicology Enviroment Health*, **49**: 145-159.
- Gebhardt, R. (1992). Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. *Pharmacology Therapeutics*, **53**:275-354.
- Gilani, A.H.; Janbaz, K.H. & Shah, B.H. (1998). Esculetin prevents liver damage induced by paracetamol and CCL<sub>4</sub> *Pharmacological Research*, **37**(1): 31-35.
- Goodman, L.S.; & Gilman, A. (1996). Fármacos usados no tratamento das Protozoonoses – Malária. In: *As bases Farmacológicas da Terapêutica*. Editores Hardman, J.G.; Limbrid, L.E. Molinoff, P.B.; Ruddon, R.W. Mc Graw Hill Companies, Inc., México, **9<sup>a</sup> ed.** 709-723.
- Guadz, R.W.; Koontz, L.C. and Miller, L.H. (1983). *Plasmodium gallinaceum*: avian screen for drugs with radical curative properties. *Experimental Parasitology*, **55**: 188-196.
- Guguen-Guillouzo C. & Guillouzo A. (1986). Methods for preparation of adult and fetal hepatocytes. In: *Isolated and Cultured Hepatocytes*. Ed. A. Guillouzo and C. Guguen-Guillouzo. Les Editions INSERM, Paris and John Libbey Eurotext, London, 1-12.
- Guguen-Guillouzo, C.; Gripon, P.; Vandenberghe, Y.; Lamballe, F.; Ratanasavanh, D. & Guillouzo, A. (1988). Hepatotoxicity and molecular aspects of hepatocyte function in primary culture. *Xenobiotica*, **18**: 773-783.
- Hammond, A. Garle, M. & Fry, J. (1996). Toxicity of dichloropropanols in rat hepatocyte cultures. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **1**: 39-43.
- Hien, T.T. & White, N.J. (1993). Qinghaosu. *The lancet*, **341**:603-609.
- Higgs, G.A.; Eakins, K.E.; Mugridge, K.G.; Moncada, S. & Vane, J.R. (1980). The effects of non-steroid antiinflammatory drugs on leucocyte migration in carragenin induced inflammation. *European Journal of Pharmacology*, **66**:81-86.

- Hill, J. (1975). The activity of some antibiotics and long – acting compounds against the tissue stages of *Plasmodium berghei*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **69**: 421-427.
- Hiruma-Lima, C.A.; Cota, R.H.S.; Nunes, D.S. & Souza Brito, A.R.M. (1996) Estudos preliminares das ações centrais do óleo das cascas de *Croton cajucara* Benth. *XIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil*, 117p.
- Hiruma-Lima, C.A.; Gracioso, J.S.; Nunes, D.S. & Souza Brito, A.R.M. (1999). Effects of essential oil from de bark of *Croton cajucara* Benth. on Experimental gastric ulcer models in rats in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **51**: 1-7.
- Ichihara, Y.; Takeya, K., Hitotsuyanagi, Y.; Morita, H.; Okuyama, S., Suganuma, M.; Fujiki, H.; Motidome, M. & Itokawa, H. (1992). Cajucarinolide and isocajucarinolide: anti-inflammatory diterpenes from *Croton cajucara*. *Planta Medica*, **58**: 549-551.
- Imhof, B.A. & Dunon, D. (1997). Basic Mechanism of Leucocyte Migration. *Hormone and Metabolic Research*, **29**: 614-621.
- Itokawa, H.; Ichihara, Y.; Kojima, H. Watanabe, K. & Takeya, K., (1989). Nor-clerodane diterpenes from *Croton cajucara*. *Phytochemistry*, **28**(6): 1667-1669.
- Jover, R.; Ponsoda, X.; Gomes-Lechon M.J. Castell, J.V. (1992). Potentiation of heroin and methadone hepatotoxicity by ethanol: an *in vitro* study using cultured human hepatocytes. *Xenobiotica*, **22**(4): 471-478.
- Keppler, D.; Lesch, R.; Reutter, W. & Decker, K. (1974). Selective uridine triphosphate deficiency induced by D-galactosamine in liver and reversed by pyrimidine nucleotide precursors. Effect on ribonucleic acid synthesis. *Experimental and Molecular Pathology*, **9**: 279-290.
- Kirby, G.C.; Khmalo-ngwenya, N.B.; Grawehr, B.A.; Fison, T.W.; Warhurst, D.C. & Phillipson, J.D. (1993). Antimalarial activity from “Mhekara” (*Upaca nitida* Mull. Arg.) a Tanzanian tree. *Journal of Ethnopharmacology*, **40**: 47-51.

- Kitazawa, E.; Sato, A., Takahashi, S.; Kuwano, H.; Ogiso, A. (1980). Novel diterpenolactones with anti-peptic ulcer activity from *Croton sublyratus*. *Chem. Pharm. Bull.*, **28**(1): 227-234.
- Kraus, A.L. Research Applications (1980). In: The Laboratory Rat, Vol II. Ed. Baker, H.J., Russel, J. and Weisbroth, S.H. Academic Press, Inc. New York, 2-28.
- Krettli, A.U. (1998). A pesquisa da malária no Brasil. *Journal da Ciência Hoje*, 4-12 de junho.
- Kubo, I., Asaka, Y., Shibata, K. (1991). Insect growth inhibitory nor-diterpenes, cis-dehidrocrotonin and trans-dehidrocrotonin from *Croton cajucara*. *Phytochemistry*, **30**(8) 2545-2546.
- Laskin, C.A.; Vidins, E.; Blendis, L.M.; Soloninka, C.A. (1990). Autoantibodies in alcoholic liver disease. *American Journal of Medicine* .**89**(2): 129-133.
- Lasky, L.A. (1991). Lectin cell adhesion molecules (LEC-CAMs): a new family of cell adhesion proteins involved with inflammation. *Journal Cell. Biochemistry*, **45**: 139-146.
- Levy, L. (1969). Carrageenan Paw edema in the mouse. *Life Sciences*, **8**: 601-606.
- Lieber, C.S. (1997). Cytochrome P-4502E1: its physiological and pathological role. *Physiological Reviews*. **77**: 517-544.
- Likhitwitayawuid, K.; Angerhofer, C.K.; Cordell, G.A.; Pezzuto, J.M. & Ruangrungrui, N. (1993). Tradicional medicinal plants of Thailand. 20. Cytotoxic and antimalarial bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania erecta*. *Journal of Natural Products*, **56**: 30-38.
- Lo Siu Jcr., Taylor, W. (1970). Determination of glycogen in small tissue samples. *Journal Appl. Physiology*, **28**:234-236.

- Ministério da Saúde Brasil. (1997). Fundação Nacional de Saúde. Casos de Malária no Brasil. *DATASUS*, Internet.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, **65**: 55-63.
- Najera, J.A. (1989). Malaria and the work of WHO. *Bull. WHO*, **67**: 229-243.
- Nossal, G.J.V. (1987). The basic components of the immune system. *New England Journal of Medicine*, **316**: 1320-1325.
- Nunes, D.S. *Jogo aberto sobre 300 plantas medicinais da Amazônia*. (In press).
- Ottonello, L.; Dapino, P., Scirocco, M.; Balbi, A.; Bevilacqua, M. & Dallegri, F. (1995). Sulphonamides as anti-inflammatory agents: old drugs for new therapeutic strategies in neutrophilic inflammation? *Clinic Science*, **88**: 331-6.
- Perkins, M.E. (1990). Cell Biology of *Plasmodium*. In: *Modern Parasite, Biology, Cellular, Immunological and Molecular Aspects* (Wyler, D.J., ed.), New York, W.H. Freeman and Company, 1990. Cap. 1, 5-25.
- Phillips, B.J. (1996). Development of cell culture techniques for assessment of the toxicity of plant products. *Toxicology in vitro*. **10**: 69-76.
- Phillipson, J.D. & O' Neill, J.M. (1987). Antimalarial and amoebicidal natural products. In: *Biologically Active Natural Products*. Editores. Hostettmann, K. and Lea, P.J. Clarendon press, Inc., Oxford, 49-65.
- Phillipson, J.D. & Wright, C.W., (1991). Medicinal plants against tropical diseases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicinal and Hygiene*, **85**: 18-21.

- Pio Correa, (1984). M. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Rio de Janeiro. Imprensa Nacional. Vol. 2, p.213.
- Ponsoda, X.; Jover, R.; Núnes, C.; Royo, M.; Castell, J.V. & Gómez-Lechón, M.J. (1995). Evaluation of the cytotoxicity of 10 chemicals in human and rat hepatocytes and in cell line: correlation between *in vitro* data human lethal concentration. *Toxicology in vitro*, 9: 959-966.
- Popper, T.L. & Watnick, A.S. (1974). In: *Antiinflammatory agents - Chemistry and pharmacology*. Academic Press, London, Eds. R.A. Scherrer and M. Whitehouse, 1: 245-290.
- Renzi, D.; Valtolina, M. & Forster, R. (1993). The evaluation of a mult-endpoint cytotoxicity assay system. *Atla*, 21: 89-96.
- Robbins, S.L.; Kumar, V.K. & Cotran, R.S., (1994). *Patologia estrutural e funcional*, 5ª ed., ABDR editora afiliada.
- Roberfroid, M. (1995). Toxicology: a science and art. *Atla- Alternative Laboratory Animal*, 9: 839-844.
- Rodríguez, J.A., Hiruma-Lima, C.A., Haun, M., Souza Brito, A.R.M. (1999) Antiulcerogenic effects and subchronic toxicity of trans-dehydrocrotonin obtained from *Croton cajucara*. *Pharmacology and Toxicology* (submetido).
- Rodríguez, R. & Acosta, D. Jr. (1997). N-deacetyl ketoconazole-induced hepatotoxicity in a primary culture system of rat hepatocytes. *Toxicology*, 117: 123-131.
- Rogiers, V.; Blaauboer, B.; Maurel, P.; Phillips, I & Shephard, E. (1995). Hepatocyte-based *in vitro* models and their application in pharmaco-toxicology. *Toxicology in vitro*, 9: 685-694.

- Rook, A.; Wilkinson, D.S.; Ebling, F.J.G. (1985). *Textbook of Dermatology*, 1, 3<sup>a</sup> Oxford, Blackwell Scientific Publications, 248p.
- Russo, M. (1980). The role of macrophages in the chemotactic response of polymorphonuclear leukocytes to bacterial lipopolysaccharides. *Proceedings of Society for Experimental Biology and Medicine*, **164**: 326-330.
- Salvemini, D.; Wang, Z.; Wyatt, P.S.; Bourdon, D.M.; Marino, M.H.; Manning, P.T. & Currie, M.G. (1996). Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *British Journal of Pharmacology*, **118**, 829-838.
- Schlesinger, P.H.; Krogstad, D.J.; Hewaldt, B.L. (1988). Antimalarial agents: Mechanism of action. *Antimicrob. Agents Chemoth.* **32**(6) 793-798.
- Seguin, M.C.; Klotz, F.W.; Schneider, I.; Weir, J.P.; Goodbary, M.; Slayter, M.; Raney, J.J.; Anigolu, J.U. & Green S.J. (1994). Induction of oxide nitric synthase protects against Malaria in mice exposed to irradiated *Plasmodium berghei* infected mosquitoes: Involvement of interferon  $\gamma$  and CD8<sup>+</sup> T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, **180**: 353-358.
- Seibert, H.; Balls, M.; Fentem, J.; Bianchi, V.; Clothier, R.H. (1996). Acute toxicity testing *in vitro* and the classification and labelling of chemicals. *Atla-Alternative Laboratory Animal*, **24**: 499-510.
- Sertiié, J.A.; Basile, A.C.; Panizza, S.; Matida, A.K. & Zelnik, R. (1990). Anti-inflammatory activity and sub acute toxicity of artemetin. *Planta Medica*, **56**: 36-40.
- Shiratori, Y.; Takikawa, H.; Kawase, T. & Sugimoto T. (1986). Superoxide anion generating capacity and lysosomal enzyme activities of Kupffer cells in galactosamine induced hepatitis. *Gastroenterologia japonica*. **21**(2): 135-144.
- Simões, J.C.; Silva, A.J.R.; Serruya, H.; Bentes, M.H.S. (1986) Desidrocrotonina, uma norditerpeno de *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae) *Ciência e Cultura*, **31**(10): 1140-1141.

- Sinnis, P.; Clavijo, P.; Fenyó, D.; Chait, B.T.; Cerami, C. and Nussenzweig, V. (1994) Structural and functional properties of region II-plus of the malaria circumsporozoite protein. *Journal Experimental of Medicine*. **180**: 297-306.
- Slater, A.F.; Cerami, A. (1992). Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. *Nature*. **355**: 167-9.
- Slater, A.F.; Swiggard, W.J.; Orton, B.R.; Flitter, W.D.; Goldberg, D.E.; Cerami, A. and Henderson, G.B. (1991). A iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**:325-329.
- Souza Brito, A.R.M.; Rodríguez J.A.; Hiruma-Lima, C.A.; Haun, M. & Nunes D.S. (1998). Antiulcerogenic Activity of trans-Dehydrocrotonin from *Croton cajucara*. *Planta Medica*, **64**: 126-129.
- Swingle, K.F. & Shideman, F.E. (1972). Phases of the inflammatory response to subcutaneous implantation of *cotton pellet* and their modification by certain antiinflammatory drugs. *Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics*, **183**: 226-234.
- Touze, J.E. & Charmot, G. (1993). Le palusdime à *Plasmodium falciparum*: situation actuelle et perspectives. *Cahiers Santé*, **3**: 217-219.
- Tsai, C.; Kao, C.; Hsu, C.; Lin, C. & Lin, J. (1997). Evaluation of four prescriptions of traditional Chinese medicine: Syh-Mo-Yiin, Guizhi-Fuling-Wan, Shieh-Qing-Wan and Syh-Nih-Sann on experimental acute liver damage in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **55**: 213-222.
- Van der berg, M.E., (1982). In: *Plantas medicinais da Amazônia - Contribuição ao seu conhecimento sistemático*, Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, 223p., 1982.
- Vanderberg, J.P. & Stewart, M.J. (1990). Plasmodium sporozoite-host interactions during sporozoite invasion. *Bull World Health organ*, **68**:74-79.

- Vane, J.R. & Botting, R.M. (1995). New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Inflammation Research*, **44**(1), 1-10.
- Wagner, H. (1981). Plant Constituents with antihepatotoxic activity. *Natural Products as Medicinal Agents*. eds. Beal, J.B. and Reinhard, E.
- Weir, D.M. (1984). Macrophage signal recognition. *Agents and Actions*, **15**(1/2): 3-11.
- Well, X.; Charles, I.G.; Smith, A.; Ure, J.; Feng, G., Huang, F.; Xu, D.; Muller, W.; Moncada, S. & Liew, F.Y. (1995). Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature*, **375**: 408-411.
- White, N.J. & Ho, M. (1992). The pathophysiology of malaria. *Advances in Parasitology*, **31**: 84-173.
- World Health and Organization (WHO) And Organization Mondiale de La Sante. Ministerial conference on malaria.(1992). Report of the Interregional Meeting on malaria in the Americas, Malaria Unit, Division of control of Tropical diseases. Brasília, 26-30, april, 41p.(CTD/MCM/IM/92.3).
- Who Malaria Unit. (1993). Global malaria control. *Bulletin of the World Health Organization*, **71**: 281-284.
- Wright, C.W. & Phillipson, J.D. (1990). Natural products and the development of selective antiprotozoal drugs. *Phytotherapy Research*, **4**: 127-139.
- Yoshitake, I.; Ohishi, E. & Kubo, K. (1991). Hepatoprotective effects of 1-2-Thiazolin-2-yl-amino acetyl-4-1,3-dithiol-2-ylidene-2,3,4,5-tetrahydro-1H-1-benzazepin-3,5-dione hydrochloride (KF- 14363) in various experimental liver injuries. *Japan. Journal of Pharmacology*, **57**: 127-136.
- Zimmerman, H.J. (1978). Drug-induced liver disease. *Drugs*, **16**(1): 25-45.

***IX. ANEXO***

---

Main components found in the freeze-dried infuse

LAB RMN UFPA  
 COQUINOS  
 ANGISTRAC (DMSO)  
 RMN 528097  
 OPERADOR MARCAL  
 10-10-97

2.0 H 1.0'

