



Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Associação Ampla entre a
Universidade Estadual do Centro-Oeste e a
Universidade Estadual de Ponta Grossa



LARISSA LIMA GONÇALVES COSTA

SCREENING FITOQUÍMICO E ESTUDO BIOLÓGICO DE *Synadenium grantii* Hook.f.
(EUPHORBIACEAE)

PONTA GROSSA
2011

LARISSA LIMA GONÇALVES COSTA

SCREENING FITOQUIMICO E ESTUDO BIOLÓGICO DE *Synadenium grantii* Hook.f.
(EUPHORBIACEAE)

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas, como parte dos requisitos
para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas na Universidade
Estadual de Ponta Grossa.

Orientador : Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame

Co-orientadora: Profa. Dra. Rosi Zanoni da
Silva

Ponta Grossa
2011

*Dedico este trabalho as pessoas mais importantes
da minha vida: Joselito, Ana Luiza, Cecilia,
Vanessa, Adalci, Alexandre e Laura.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de estar com saúde e em paz.

À minha “amada” avó Olinda (*in memorian*) pelos seus ensinamentos, dedicação, amor e por me mostrar o caminho da moral e dignidade.

À minha irmã Vanessa, que sempre esteve ao meu lado, me incentivando, apoiando e sendo meu exemplo de “amor incondicional”.

Ao meu marido Joselito, pela paciência, apoio e por ser meu grande amor.

Às minhas filhas Ana Luiza e Cecília por estarem sempre comigo, aguentando a falta de paciência, ausência e estresse durante o trabalho. Amo vocês!

Ao meu cunhado Adalci, pelo incentivo e carinho.

Ao Alexandre e Laura, sobrinhos amados, obrigada pela “bagunça” na minha vida.

Aos meus amigos, por estarem sempre presentes, dando apoio, estímulo, conforto e compreensão.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Ao Prof. Dr. Flavio Luís Beltrame pela orientação exemplar, sempre disposto a colaborar, com empenho incansável e exemplo de profissionalismo, tendo acreditado e me incentivado desde o início, sendo o grande responsável pelo meu crescimento e desenvolvimento intelectual nesta área de produtos naturais.

A Prof.^a Dr.^a Rosi Zanoni da Silva, não só pela co-orientação, mas também pela grande amizade, carinho e oportunidade dada no início do trabalho, “abrindo-me as portas” para uma área de estudo totalmente nova e fascinante.

Ao Prof. Dr. Vitoldo Antonio Kozlowski Junior, por todo ensinamento, disposição e atenção dispensados a este trabalho.

Ao Prof. Dr. Fabio André dos Santos, pela atenção e ajuda na complementação dos resultados deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luis Antonio Esmerino pelo trabalho e disponibilidade.

Aos alunos de IC do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica: Bruno, Bruna, Vanessa, Danielle, Alexia pelo apoio e trabalho realizado.

A Ivani e Angela da biblioteca pelo apoio e competência no trabalho realizado.

Ao curador Osmar dos Santos Ribas do Museu Botânico de Curitiba pela identificação e depósito do exemplar da espécie em estudo.

A técnica do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Maria Aparecida Ribeiro da Luz por estar sempre disposta a ajudar.

A todos que participaram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho,
MUITO OBRIGADA.

RESUMO

A espécie *Synadenium grantii* Hook. f. é uma planta da família Euphorbiaceae, sendo conhecida popularmente como cega-olho, leitosinha, janaúba, cola-nota e outros. Há muitos anos é utilizada sob a forma de preparado do látex diluído (18 gotas/1 litro de água), para o tratamento de distúrbios gástricos, e de doenças neoplásicas. No entanto, não existem estudos científicos que comprovem esses efeitos, nem informações sobre a segurança de utilização dessa planta pelos seres humanos além de haver poucos estudos fitoquímicos sobre esta espécie. Assim, os objetivos deste trabalho foram realizar a triagem fitoquímica da espécie; determinar a toxicidade (CL_{50}) do látex e extrato bruto em teste de letalidade com *Artemia salina* Leach; avaliar parâmetros bioquímicos (contagem de leucócitos; determinação de alanina-amino transferase (TGP), aspartato-amino transferase (TGO), albumina, creatinina e proteína C reativa) e toxicológicos (avaliar macroscopicamente os órgãos (fígado, baço, rins, pâncreas, útero, ovários, glândulas suprarrenais e estômago), frente a modelos experimentais com ratos *Wistar* e determinar a atividade antiulcerogênica, visando contribuir para incrementar o conhecimento popular e acadêmico acerca desta espécie. A triagem fitoquímica foi realizada com o extrato bruto hidroalcoólico do caule e com o látex, nos quais se constatou a presença de diversas classes de metabólitos secundários de interesse farmacológico, entre eles: cumarinas, taninos, antraquinonas, compostos saponificáveis e terpenos. Os testes de toxicidade frente a *A. salina* foram realizados utilizando o látex e o extrato bruto do caule nas concentrações de 10 - 0,05% (v/v) e 1000 - 1 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Os resultados encontrados demonstraram que, nas concentrações testadas, o látex apresenta toxicidade acentuada ($CL_{50}=26,58\mu\text{g/mL}$) enquanto que o extrato bruto do caule demonstrou baixa toxicidade ($CL_{50}=778,66\mu\text{g/mL}$). Nos testes de toxicidade aguda, pode-se determinar que na dose de 2,4g/kg (0,5 mL) o látex de *S. grantii* apresentou alterações bioquímicas frente os parâmetros TGO, TGP avaliados. Para a determinação da atividade antiulcerogênica foram utilizados ratos *Wistar* fêmeas adultas que sofreram indução de úlcera por dois modelos: etanol e indometacina. O látex apresentou efeito gastroprotetor frente aos dois modelos avaliados e com inibição na formação de úlceras em 90%, já o preparado do látex demonstrou uma inibição de 5,7% quando realizado o modelo do etanol para indução de úlcera. Os resultados obtidos nesse trabalho indicam a importância e a necessidade de estudos adicionais na busca de comprovação das atividades biológicas popularmente propagadas para esta espécie vegetal e a necessidade de mais estudos em relação à segurança de utilização desta.

Palavra-chave: *Synadenium grantii*, Látex, Citotoxicidade, Gastroprotetor.

ABSTRACT

The *Synadenium grantii* Hook. f. species is a plant of the Euphorbiaceae family and is popularly known as *cega-olho*, *leitosinha*, *janaúba*, *cola-nota* among other names. It has been used for many years in the form of prepared diluted latex (18 drops/1 liter of water) for the treatment of gastric disorders, and neoplastic diseases. However, there are currently no scientific studies that prove these effects, no information about the safe use of this plant by humans, as well as few phytochemical studies about this species. Therefore, the objectives of this work were: to conduct a phytochemical screening of the species; to determine the toxicity (LC₅₀) of latex and crude extract in a lethality test with *Artemia salina* Leach; to evaluate the biochemical parameters (white blood cell count, determination of alanine aminotransferase [ALT], aspartate aminotransferase [AST], albumin, creatinine and C-reactive protein); to evaluate the toxicological parameters (macroscopically evaluate organs such as liver, spleen, kidneys, pancreas, uterus, ovaries, adrenal glands and stomach in animal experiments); and to determine its antiulcer activity with the aim of enhancing academic and popular knowledge about this species. Phytochemical screening was performed using the hydroalcoholic crude extract of the bark and the latex, in both of which the presence of several classes of secondary metabolites of pharmacological interest, including: coumarins, tannins, anthraquinones, saponifiable compounds and terpenes were found. Toxicity tests against *A. salina* were performed using the fresh latex and crude bark extract at concentrations of 10 - 0.05% (v/v) and 1000 to 1 µg/mL respectively. The results showed that in the tested concentrations, the latex has marked toxicity (LC₅₀ = 26.58 µg/mL) while the crude extract of the bark showed low toxicity (LC₅₀ = 778.66 µg /mL). In acute toxicity tests, it was possible to determine that a dose of 2.4 g/kg (0.5 ml) of *S. grantii* latex presented biochemical changes related to the AST, ALT parameters that were evaluated. To determine the antiulcer activity we used adult female Wistar rats that suffered from ulcers induced by two models (ethanol and indomethacin). The fresh latex showed a gastroprotective effect in relation to both the evaluated models and a 90 % rate of inhibition in the formation of ulcers, whilst the prepared latex showed a 5.7 % inhibition when the ethanol model was utilised to induce ulcers. The results of this study indicate the importance and need for additional studies in the search for evidence of biological activity for this popularly propagated plant species and the need for more studies regarding the safety of using it.

Keywords: *Synadenium grantii*, Latex, Cytotoxicity, Gastroprotective.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1	- Espécies do gênero <i>Synadenium</i>	16
Figura 1	- <i>Synadenium grantii</i> Hook.f. (Euphorbiaceae)	17
Figura 2	- Látex de <i>Synadenium grantii</i> Hook.f.	18

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DO MANUSCRITO

Figura 1	- Estruturas de esters de forbol identificadas em <i>S. grantii</i> . CG-MS. t_r : 4.76 min.- 12-deoxi-forbol-13-isobutirato; t_r :6.05 min.- 12,13,20-triacetil-4 deoxiforbol. A temperatura inicial da coluna foi de 50 ° C, a qual foi mantida por dois minutos e foi então programado para aumentos de 20 ° C / min. até atingir 90 ° C. Depois de um minuto, houve um aumento de 5 ° C / min. até atingir um máximo de 280 ° C.....	57
Figura 2	- Efeito do látex (EB1) e do diluído do látex (EB3) de <i>S. grantii</i> no índice de lesão ulcerativa induzida por etanol.....	57
Figura 3	- Imagens dos estômagos de ratos após tratamento de úlceras induzidas por indometacina	58
Figura 4	- Efeito do látex (EB1) e do diluído do látex (EB3) de <i>S. grantii</i> no índice de lesão ulcerativa induzida por indometacina.....	58
Figura 5	- Imagem do Estômago de rato com látex (A) e após a retirada do material (B).....	59

LISTA DE TABELAS DO MANUSCRITO

Tabela 1	- Parâmetros bioquímicos obtidos após tratamento de dose única do látex (EB1) e diluído do látex (EB3) em ratos.....	56
Tabela 2	- Contagem de leucócitos obtidos após tratamento de dose única do látex (EB1) e diluído do látex (EB3) em ratos.....	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1	FAMÍLIA EUPHORBIACEAE.....	14
2.1.1	GÊNERO <i>Synadenium</i> Hook.f.....	15
2.1.2	Espécie <i>Synadenium grantii</i> Hook. f.....	16
3	ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	19
3.1	ESTUDO FITOQUÍMICO.....	21
3.2	TOXICIDADE	22
3.3	ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA	24
4	OBJETIVOS	27
4.1	OBJETIVO GERAL	27
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
5	MANUSCRITO	28
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
	REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

A fitoterapia (do grego *therapeia* = tratamento e *phyton* = vegetal) é um recurso terapêutico muito utilizado pelas pessoas (automedicação), principalmente pela facilidade de acesso as plantas ditas medicinais. Entretanto, tal fato, pode agravar os riscos potenciais do seu uso, como o de intoxicação, uma vez que muitas delas não apresentam estudos que respaldem sua indicação.

Hoje com o advento da *internet*, fica cada vez mais fácil se encontrar diversas informações sobre determinadas plantas medicinais e suas indicações, mas, muitas vezes, faltam informações científicas que confirmem tais informações, tornando assim seu uso um potencial risco à saúde (MACHADO, 2007; COUTINHO, 2009; TREVISAN, 2010).

Desta forma, é necessária a divulgação de informações com comprovação científica que devem ser repassadas aos profissionais de saúde e usuários destes produtos, para se minimizar o surgimento de possíveis problemas relacionados ao seu uso.

Por outro lado, o potencial farmacológico das plantas medicinais como fonte de medicamentos e fármacos é ainda, nos dias de hoje, pouco explorado. Mesmo com o avanço de novos processos de síntese orgânica e biotecnologia, as plantas medicinais apresentam papel importante na terapêutica representando claramente uma janela de oportunidade na indústria de medicamentos (OMS, 1991; RATES, 2001; VILLAS BÔAS; GADELHA, 2007).

Sabe-se, que as plantas constituem uma das fontes mais importantes de substâncias utilizadas como agentes medicinais, fornecendo modelos para modificações estruturais, otimização das propriedades farmacológicas e bioquímicas e construção sintética de novas estruturas moleculares naturais (BRAZ-FILHO, 2010).

Esta informação se reforça, ao considerarmos que no arsenal terapêutico mundial, 44% das especialidades farmacêuticas existentes, têm origem em produtos biológicos e/ou naturais ou ainda, são derivados destes ou sintetizados a partir desses (SIANI; MICHILES, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2010; TREVISAN, 2010, MACHADO, *et al.*, 2011).

Como exemplos destas afirmativas, pode-se citar a planta denominada papoula (*Papaver somniferum* L.); da qual foi isolada em 1806 a morfina, utilizada até hoje nos tratamentos da dor, que tem papel importante para os pacientes terminais diagnosticados com vários tipos de câncer, por amenizar as dores intensas peculiares a estas enfermidades (RODRIGUES *et al.*, 2010). O paclitaxel, um triterpeno poliidroxilado extraído de *Taxus brevifolia*, uma árvore do Pacífico, que

foi isolado pela primeira vez nos EUA, para o tratamento do câncer de mama, tendo como alvo os microtúbulos, importantes para a replicação celular. O isolamento dos alcaloides vimblastina e vincristina, que são de grande utilidade no tratamento de linfomas, câncer de ovário e testículos são obtidos a partir de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, conhecida como vinca (SOUZA, 2004; BRANDÃO, 2010; BRAZ-FILHO, 2010).

Assim, o estudo de moléculas e extratos com possíveis atividades farmacológicas têm grande abrangência, sendo ponto crucial em vários setores do campo farmacêutico.

A utilização de modelos biológicos de estudo como primeiro *screening* na descoberta da atividade farmacológica de novos agentes é de extrema importância, principalmente em um país como o Brasil, que oferece uma imensa biodiversidade de plantas com potencial terapêutico (NASCIMENTO *et al.*, 2000; VILLAS BÔAS; GADELHA, 2007).

Neste sentido, os extratos vegetais obtidos de plantas e possíveis substâncias isoladas destas, apresentam-se como potenciais candidatos a agentes terapêuticos, pois determinados grupos de substâncias como os compostos fenólicos, óleos essenciais, taninos e outros são reconhecidos pelas suas diversas atividades farmacológicas (DI CARLO *et al.*, 1999; NASCIMENTO *et al.*, 2000; COLOMBO, 2008).

O estudo fitoquímico compreende as etapas de isolamento, elucidação estrutural e identificação dos constituintes mais importantes do vegetal, principalmente de substâncias originárias do metabolismo secundário, as quais podem relacionar-se com uma ação biológica.

Estes constituintes podem ser avaliados através da utilização de metodologias simples de cromatografia (cromatografia em camada delgada, cromatografia em coluna, cromatografia planar preparativa, entre outros), associadas a um conjunto de técnicas espectrais como ultravioleta (UV), infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN, ^1H e ^{13}C -1 D e 2 D) e espectrometria de massas (EM) e quando agregadas aos ensaios de atividade biológica, permitem caracterizar as frações ou substâncias bioativas e levantar possíveis moléculas novas para o arsenal terapêutico já existente (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; BRANDÃO, 2009).

Mesmo quando uma planta já foi exaustivamente estudada, sua avaliação frente a outros modelos experimentais e em situações diferentes pode ser desejável, pois, as plantas medicinais podem ter variabilidade química devido à influência da região onde é encontrada, sofrendo alterações influenciadas pela temperatura, umidade relativa, tempo de exposição ao sol, regime

de ventos e tipo de solo. Além disso, contribuem para a variação dos constituintes químicos das plantas, a variabilidade genética (em que plantas do mesmo gênero e espécie, com a mesma aparência externa podem diferir consideravelmente em sua composição química devido à polinização cruzada de plantas silvestres) (YARIWAKE *et al.*, 2005; ROSSATO *et al.*, 2006).

Isto se confirma ao se observar a variabilidade de constituintes químicos de plantas devido à sazonalidade, podendo ser citado o estudo de Cechinel Filho e Yunes (1998) com a espécie *Aleurite moluccana* L. Willd, a qual foi coletada e analisada no Brasil e no Havaí (EUA). O material coletado e analisado no Havaí apresentou atividade antiviral contra o vírus do HIV e também contra algumas bactérias, o mesmo não tendo acontecido com a espécie estudada no Brasil.

No mesmo sentido, Yariwake *et al.* (2005) constataram variações sazonais significativas na composição química das folhas de *Maytenus aquifolium* coletadas no final de cada estação do ano de 1992 a 1995, em relação à quantidade de flavonoides, triterpenos e fenóis totais. Beltrame *et al.* (2006) constataram através de uma avaliação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), variações na concentração do marcador químico da espécie vegetal *Trichilia catigua* (catuaba) em diferentes épocas do ano e em diferentes amostras adquiridas em várias regiões do Brasil quando procedia a avaliação dos extratos vegetais.

Considerando esse cenário, pesquisas voltadas a este objetivo podem contribuir significativamente no desenvolvimento do campo da saúde em nível regional, nacional e mundial, sendo possível encontrar substâncias mais eficazes e menos tóxicas do que as já existentes, na prevenção e tratamento contra as diversas doenças existentes no mundo atual (HO *et al.*, 2001; MICHELIN *et al.*, 2005; LEITÃO *et al.*, 2006; BARBOSA-FILHO *et al.*, 2007; SAÚDE-GUIMARÃES, 2007; TREVISAN, 2010).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FAMÍLIA EUPHORBIACEAE

A família Euphorbiaceae, possui cerca de 300 gêneros e 8900 espécies identificadas (BITTNER *et al.*, 2001). É uma família essencialmente tropical que ocorre em vários habitats diferentes, desde regiões áridas a trópicos úmidos. Como resultado, as plantas desta família, desenvolveram várias formas de vida, incluindo ervas, arbustos, plantas suculentas e árvores com folhas alternadas, inteiras ou partidas, em geral com estípulas, lactescentes ou não. Podem possuir flores pequenas, dotadas de estames e frutos deiscentes ou não, entre outras características (DUN&SINGH, 2007; ROGÉRIO *et al.*, 2007).

As Euphorbiaceae merecem destaque como uma família de importância na medicina popular e econômica, especialmente na alimentação humana, produção de látex (borrachas), óleos utilizados na indústria de tintas, plásticos, sabões duros, fibras sintéticas, pigmentos para tecidos, perfumes, batons e lubrificantes de motores e turbinas especialmente os extraídos de espécies do gênero *Ricinus* L. (MACHADO, 2007).

Estudos fitoquímicos da família Euphorbiaceae revelaram a presença de compostos químicos biologicamente ativos variados, tais como flavonoides, saponinas, terpenos (di e triterpenoides), ésteres, alcaloides, glicosídeos cianogênicos, taninos, lecitinas e glicoproteínas (BITTNER *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2005; ROGÉRIO *et al.*, 2007; RAJESH *et al.*, 2006).

Entre esses, chama-se a atenção alguns diterpenos (tiglianos, ingenanos e dafnanos), os quais produzem, além de efeitos urticantes, alguns tipos de câncer, ao mesmo tempo em que inibem outros, ações que a princípio, acredita-se serem determinada pela sua concentração (BITTNER *et al.*, 2001).

Ainda são relatados estudos que descrevem possíveis atividades antitumoral (PREMARATNA *et al.*, 1981), fibrinolítica (RAJESH *et al.*, 2006) e imunomoduladora (ROGÉRIO *et al.*, 2007).

Na medicina tradicional, o uso de espécies desta família é muito comum ao longo do desenvolvimento da própria humanidade (WATSON, 2008).

As plantas mais conhecidas, que representam esta família são: a seringueira (*Hevea* sp) , a mamona (*Ricinus communis*) entre outras. Entre suas características botânicas principais, tem-se a

presença de substâncias lactescentes, visíveis quando a planta é submetida a injúrias mecânicas (MACHADO, 2007; WATSON, 2008). Trease e Evans (1989) citam que *Manihot esculentus* (variedade amarga) contém heterosídeos cianogênicos. Recentemente, Ebuehi (2005) realizou o estudo dos extratos aquoso e etanólico dessa espécie, encontrando nos extratos de raízes cruas alcaloides, flavonoides, taninos, açúcares reduzidos e antocianosídeos; nos extratos de folhas, foi detectada a presença dos grupos alcaloides, flavonoides, taninos, antraquinonas, açúcares reduzidos e antocianosídeos, além de outros compostos de valor nutritivo.

2.1.1 GÊNERO *Synadenium* Hook.f.

A grande maioria dos estudos fitoquímicos que foram realizados até o momento, com este gênero datam do final da década de 80. Este gênero compreende 15 espécies do oeste da África que foram trazidas para as Américas e para a Europa com a finalidade de serem usadas como plantas ornamentais (KINGHORN, 1980). Segundo Bagavathi *et al.* (1988), na África e na Ásia, são bastante utilizadas como cercas-vivas em propriedades rurais.

As espécies do gênero *Synadenium* têm sido historicamente utilizadas pelas populações dos vários países onde ocorrem principalmente em países tropicais como o Brasil, como remédio para um grande e diversificado número de doenças. No entanto há pouca literatura disponível sobre a composição química destas plantas e sua suposta ação farmacológica (GRUPO, 1998; NOGUEIRA, 2008, MACHADO *et al.*, 2011). Este gênero é formado por 19 espécies:

- | | |
|---------------------------------|------------------------------------|
| • <i>Synadenium angolense</i> | • <i>Synadenium glabratum</i> |
| • <i>Synadenium arborescens</i> | • <i>Synadenium glaucescens</i> |
| • <i>Synadenium ballyi</i> | • <i>Synadenium grantii</i> |
| • <i>Synadenium calycinum</i> | • <i>Synadenium halipedicola</i> |
| • <i>Synadenium cameronii</i> | • <i>Synadenium kirkii</i> |
| • <i>Synadenium carinatum</i> | • <i>Synadenium molle</i> |
| • <i>Synadenium compactum</i> | • <i>Synadenium piscatorium</i> |
| • <i>Synadenium cupulare</i> | • <i>Synadenium umbellatum</i> |
| • <i>Synadenium cymosum</i> | • <i>Synadenium volkensii</i> |
| • <i>Synadenium gazense</i> | |

Quadro 1 – Espécies do gênero *Synadenium*

Fonte : GRUPO,1998.

2.1.2 Espécie *Synadenium grantii* Hook. f.

No Brasil, *Synadenium grantii* (Figura 1) é conhecida popularmente como “cola-nota”, “janauba”, “tiborna”, “leiterinha”, ou “cega-olho” e é utilizada sob a forma de preparado do látex (diluído em água) para o tratamento de distúrbios gástricos, como úlcera péptica, e gastrite, além de doenças neoplásicas (VALADARES, 2007; MACHADO, 2008). É um arbusto lactescente, de origem africana, que atinge de 3 a 5 metros e possui característica de alta toxicidade.

O látex (Figura 2) é empiricamente recomendado para o tratamento de várias enfermidades tais como alergia, câncer, doença de Chagas, diabetes, gripe, hemorragias internas, impotência sexual, lepra, obesidade, úlcera nervosa, cólicas menstruais e dores no corpo (ORTÊNCIO, 1997).



Figura 1: Fotografia de *Synadenium grantii* Hook.f.(Euphorbiaceae) - espécie usada para coleta do material de estudo



Figura 2: Fotografia do látex de *Synadenium grantii* Hook. f. – mostrando coleta do material vegetal para estudo.

Pela indicação popular, se toma pela manhã, à tarde e à noite um cálice de licor ou uma xícara pequena de café de uma solução preparada por 18 gotas do látex em 1 litro de água (conservar em geladeira) (ORTÊNCIO, 1997).

Trabalhos científicos sobre a espécie *S. grantii* relatam o isolamento e purificação de uma lecitina (do látex) com atividade de hemaglutinação. Algumas propriedades biológicas da lecitina também foram estudadas e se verificou a supressão do crescimento tumoral do fibrosarcoma e inibição da síntese de proteína em células de sarcoma ascítes Yoshida (PREMARATNA *et al.*, 1984).

Kinghorn (1980) isolou o composto éster de 4-deoxiforbol, que é um produto irritante a pele. Mais recentemente, Tarfut, Martínéz e Stashenko (2005), Machado (2008) e Melo-Reis (2010) descreveram a identificação de constituintes químicos como terpenos, flavonoides e demais compostos fenólicos.

São poucos os trabalhos científicos com a espécie *S. grantii* que comprovam as atividades citadas pela medicina popular, apesar de ser largamente utilizada no Brasil.

Neste contexto, o presente trabalho tem por finalidade gerar informações relevantes sobre a espécie *S. grantii* através da determinação de um perfil fitoquímico e avaliação de possíveis atividades biológicas.

3 ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

A vida de todo ser vivo é compreendida por etapas (nascimento, crescimento, reprodução, envelhecimento e morte) a qual é assegurada e controlada pelas transformações químicas realizadas pelo metabolismo deste organismo, que é um conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células.

No caso das plantas estas reações podem ser divididas didaticamente em metabolismo primário e secundário (SIMÕES, 2003). Basicamente, todos os organismos convivem com os mesmos tipos de metabólitos primários (carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos), que no vegetal tem como função essencial a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos (GOBBO-NETO, 2007).

Muitas vezes há a impossibilidade de produção destes metabólitos, surgindo assim à necessidade de providências para superar tal incapacidade com o fornecimento vindo de fonte externa. Os metabólitos secundários, por sua vez, são específicos dos seres autotróficos e são produzidos como substâncias de defesa, com função de atração de polinizadores, como agentes de coloração e outras funções. Estes compostos participam das interações intra e intercelular do próprio organismo ou com células de outros organismos, podendo sua síntese ser muitas vezes afetada por condições ambientais, influenciando assim a qualidade e quantidade dos compostos secundários das plantas (GOBBO-NETO, 2007; BRAZ-FILHO, 2010).

As plantas possuem uma ilimitada habilidade para sintetizar metabólitos secundários. Em muitos casos, estas substâncias servem como mecanismos de defesa da planta contra predadores. Além das características de proteção, os metabólitos secundários podem possuir efeitos diretos sobre os organismos em contato, podendo ser benéficos, como em uma atividade antimicrobiana ou antiparasitária para um vertebrado, ou mesmo tóxico ou mutagênico, como é o caso de várias plantas que possuem laticíferos (FERREIRA *et al.*, 2006; BRAZ-FILHO, 2010).

Em resumo, o metabolismo primário assume importância no crescimento e rendimento agrícola e o metabolismo secundário contribui com os aromas, as cores dos alimentos e com a

resistência contra pestes e doenças, mantendo a sobrevivência nas condições ambientais favoráveis.

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: terpenos, compostos fenólicos e alcaloides. Os terpenos são feitos a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto). Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico ou ácido mevalônico. Os alcaloides são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico, e também de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina) (HOSTETTMAN, 2003; BRAZ-FILHO, 2010; RODRIGUES, 2010).

Sabe-se que a concentração de princípios ativos na planta depende, naturalmente, do controle genético e dos estímulos proporcionados pelo meio, como, por exemplo, fatores climáticos, edáficos (relacionados com o solo), exposições a microrganismos, insetos, outros herbívoros, poluentes etc (BRAZ-FILHO, 2010).

Tal afirmativa pode ser verificada, por exemplo, no estudo realizado por Gobbo-Neto (2007), onde foram avaliados vários fatores como ritmo circadiano, temperatura, disponibilidade hídrica, nutrientes, altitude, poluição e radiação ultravioleta. O autor pode concluir que o conteúdo final de metabólitos secundários em plantas medicinais pode ser afetado, assim como condições de coleta, estabilização e estocagem, podem ter grande influência na qualidade e, consequentemente no valor terapêutico de preparados fitoterápicos.

Cita-se também Ferreira (2010) que observou em estudo com *Lychnophora granmongolense*, resultados que apresentaram grandes variações qualitativas e quantitativas tanto inter quanto intra populacionais, dado esse de extrema importância já que várias espécies do gênero *Lychnophora* Mart. são de uso na medicina popular e alterações na constituição do extrato podem influenciar diretamente no efeito terapêutico..

Tal afirmativa se reforça nos trabalhos de Sartori (2005) que avaliou a atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* Spreng, as quais apontaram resultados muito satisfatórios para estes experimentos.

Nos países em desenvolvimento as doenças estão relacionadas com a falta de saneamento básico, desnutrição e dificuldade de acesso aos medicamentos, Sendo assim a utilização de fitoterápicos é amplamente praticada. Considerando que poucas plantas medicinais utilizadas pela população têm ação comprovada, o uso popular tem servido como guia para pesquisas químico-farmacológicas (MICHELIN, 2005).

O que se espera com a indicação do uso de fitoterápicos para tratamento de doenças pela medicina humana é o aumento das opções terapêuticas, disponibilizando medicamentos equivalentes, de espectro de ação aumentado/melhorado, talvez redução de custo e que possibilite o tratamento e cura de doenças sem substituir os medicamentos alopáticos (LAPA, 2003; NOGUEIRA, 2008).

3.1 ESTUDO FITOQUÍMICO

O estudo das propriedades terapêuticas das espécies vegetais usualmente baseia-se nas informações etnofarmacológicas e no conhecimento popular a respeito delas, vindo a orientar muitos dos ensaios clínicos, farmacológicos e mesmo o isolamento das substâncias responsáveis pela eficácia terapêutica (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002; GBOLADE, 2009).

As Euphorbiaceae têm tido um papel muito significativo nas pesquisas fitoquímicas, em especial na determinação de novos compostos farmacologicamente ativos, pois espécies desta família vêm sendo usadas cada vez mais pela medicina popular (ORTÊNCIO, 1997; BITTNER *et al.*, 2001).

Estudos fitoquímicos da família Euphorbiaceae, revelaram a presença de compostos químicos biologicamente ativos variados, tais como flavonoides, saponinas, terpenos (di e triterpenoides), ésteres, alcaloides, glicosídeos cianogênicos, taninos, lecitinas e glicoproteínas (BITTNER *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2005; RAJESH *et al.*, 2006; ROGÉRIO *et al.*, 2007).

Machado *et al.* (2011) realizaram um *screening* fitoquímico em folhas frescas de *Synadenium* e os extratos apresentaram diversos metabólitos secundários de interesse farmacológico, entre eles: cumarinas, flavonoides, esteroides e/ou triterpenos, taninos e outros.

A espécie *S. grantii* segundo Kinghorn (1980) possui ésteres de forbol que são irritantes e cancerígenos como citados em várias espécies da família Euphorbiaceae.

Segundo Bagavathi *et al.* (1988), em seu trabalho com a espécie *S. grantii*, isolou a presença de ésteres diterpênicos do núcleo tigliano, os quais são característicos da espécie e poderiam ser indicados como marcadores quimiotaxonômicos, sendo a estes atribuídos as características irritantes da pele e carcinogênicas.

Como apresentado por Andersen *et al.* (2010) em seu trabalho, essa espécie apresenta também antocianidinas que foram isoladas e identificadas recentemente.

3.2 TOXICIDADE

Ainda são poucos os estudos toxicológicos sobre plantas medicinais e, apesar das evidências apontarem para a necessidade de maior critério para a utilização adequada das mesmas, o fator cultural ainda é preponderante. A maior parte dos problemas com a administração de drogas vegetais e fitoterápicos resulta da dose, posologia ou via de administração inadequadas; da forma imprópria do preparo; do uso contínuo, associação de várias plantas, interação com fármacos sintéticos, contaminação da planta por metais pesados, resíduos de pesticidas e adulteração de produtos não declarados na embalagem. Soma-se a isso o número de espécies diferentes com a mesma sinonímia popular e que são utilizadas como se fosse a mesma planta por não apresentarem a identificação botânica correta (SIMÕES *et al.*, 2003; COLOMBO, 2008; COUTINHO, 2009; CUNHA, 2009).

Compostos bioativos são quase sempre tóxicos em altas doses. Os efeitos tóxicos podem ser classificados relativamente ao período que se verificam os efeitos, isto é, toxicidade aguda ou crônica. A toxicidade aguda provoca uma resposta rápida num curto período de tempo (por convenção de poucas horas ou poucos dias), provocando geralmente uma elevada mortalidade. Na toxicidade crônica, os efeitos se manifestam num longo período de tempo (de semanas a meses) (DIAS *et al.*, 2002).

Desta maneira, a avaliação da letalidade em um organismo animal menos complexo pode ser usada para um monitoramento simples e rápido durante o fracionamento de extratos. O ensaio de letalidade para náuplios de *Artemia salina* Leach, tem sido introduzido na rotina de muitos grupos de pesquisa envolvidos isolamento, purificação e elucidação estrutural, já que muitos laboratórios de fitoquímica não estão preparados para a realização de ensaios biológicos (MACIEL; PINTO; VEIGA Jr., 2002; RUIZ *et al.*, 2005). Os náuplios de *A.salina* que é um microcrustáceo de água salgada comumente usada como alimento para peixes, são de baixo custo e facilmente encontrados no comércio, além de permanecerem viáveis por anos no estado seco (MEYER *et al.*, 1982; LUNA *et al.*, 2005).

O bioensaio de toxicidade com *A. salina* é em geral simples, rápido, sensível, e consiste na estimativa da concentração de uma substância através da medida de uma resposta biológica, na qual existe apenas um parâmetro envolvido: vida ou morte. O ensaio de letalidade permite a avaliação da toxicidade aguda e, portanto, é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica, sendo atualmente aceito pela comunidade científica (CAVALCANTE *et al.*, 2001). Essas vantagens contribuíram para a popularização do bioensaio, sobretudo a partir da década de 90. Estes ensaios também podem ser utilizados para expressar a toxicidade de um extrato com atividade moluscida contra organismos não alvos, como peixes e pequenos crustáceos (OLIVEIRA-FILHO; PAUMGARTTEN, 2000; LUNA *et al.*, 2005).

As Euphorbiaceae (família da planta em estudo) também são conhecidas pelo grande número de espécies tóxicas, dentre elas pode-se citar a *Euphorbia pulcherrima* Willd (bico-de-papagaio), *Euphorbia milii* L. (coroa-de-cristo) e a *Euphorbia tirucalli* L.(avelós) *Jatropha curcas* (pinhão de purga, pinhão paraguaio, pinhão bravo, purgão de cavalo); *Ricinus communis*(carrapateira, rícino, mamoeira, palma de cristo, carrapato); *Manihot utilissima* (mandioca amarga, mandioca branca, mandioca, anaçunipeba)(ALBUQUERQUE *et al.*, 2004).Segundo Valadares (2007) em levantamento no estado de Goiás, o Centro de Informações Toxicológicas (CITGO) constatou que, dentre as 18 espécies botânicas relatadas como responsáveis por ocorrências de intoxicações por plantas no Estado, cinco delas (28%) pertenciam à família Euphorbiaceae.

O princípio tóxico desta família ainda não é totalmente conhecido, podendo ser uma toxalbumina, saponina ou outra fração solúvel em água a qual seria responsável pelas intensas irritações gastrintestinais e complicações hidroeletrolíticas, com cólicas, vômitos e diarreias intensas (ALBUQUERQUE *et al.*, 2004).

Mariz *et al.*(2010) fizeram uma revisão descritiva das possibilidades terapêuticas e do risco toxicológico de *Jatropha gossypifolia* L., planta da família Euphorbiaceae, muito utilizada como antidiarreico, antimicrobiano, vermífugo entre outras atividades e que apresenta um duplo aspecto (terapêutico/tóxico) muito próximo.

Cunha *et al.* (2009) citam em seu trabalho que há relatos na literatura de toxicidade dérmica de *Synadenium grantii* cujo látex contém ésteres diterpenos, e por ser de uso ornamental, pode ocasionar intoxicação em crianças.

Do Campo *et al.* (2010) descrevem em seu trabalho quadro clínico de eritrodermia secundária por intoxicação aguda por *S. grantii* em criança de quatro anos e confirmam que a toxicidade de todas as espécies de *Synadenium* se devem aos ésteres de diterpenos de estrutura complexa.

3.3 ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA

O trato gastrointestinal é constituído pelo tubo digestivo, glândulas secretoras anexas, sendo responsável pela digestão e absorção dos nutrientes encontrados no bolo alimentar, funcionando ao mesmo tempo, como barreira seletiva de proteção entre o meio externo e o interno (FERREIRA, 2005).

O estômago pode ser dividido em quatro porções que são revestidas por mucosa: cárdia, fundo, corpo e antro. A face interior da parede do estômago é coberta por uma mucosa que contém células especializadas na secreção de várias substâncias, sendo que nos dois terços superiores do estômago essas células chamadas de parietais segregam ácido clorídrico e fator intrínseco e as células principais secretam pepsinogênio. O pepsinogênio dá origem a pepsina que tem função na digestão. No terço inferior do estômago que corresponde ao antro, as células da mucosa segregam gastrina (células G). A gastrina é um hormônio que estimula as células parietais do corpo do estômago a produzir ácido clorídrico (WOLFE; SOLL, 1988).

A elevada quantidade de ácido clorídrico produzida mantém o pH entre 0,9 e 2,0. Este ambiente além de participar do processo de digestão, ainda protege o organismo de agentes infecciosos. Os mecanismos citoprotetores consistem em secreção de fatores como ácido, muco, bicarbonato, imunoglobulinas, entre outros. O muco aderido à mucosa gástrica é formado por glicoproteínas em forma de gel denominada mucina, sendo esta camada insolúvel em água conferindo proteção ao epitélio contra ácido, pepsina e outros agentes necrotizantes, como o álcool absoluto e anti-inflamatórios não-esteroidais e ainda participa na recuperação da injúria gástrica (BIGHETTI, 2004; CARVALHO, 2006).

A etiologia das úlceras pépticas não é bem compreendida. Originalmente, acreditava-se que todas as úlceras do trato gastrointestinal eram causadas apenas pela ação agressiva do ácido clorídrico e da pepsina sobre a mucosa, ficando conhecidas como “úlceras pépticas”. Hoje, sugere-se existir um desequilíbrio entre os mecanismos lesivos da mucosa (a secreção e ação do

ácido e da pepsina) e os mecanismos protetores da mucosa (secreção e ação de muco e bicarbonato) e também a fatores exógenos relacionados a condições de vida e predisposição genética (BIGHETTI, 2004; FERREIRA, 2005).

Aproximadamente 10% da população mundial é vítima dessa doença independentemente de sexo ou classe social. A úlcera péptica causa grandes perdas econômicas e gastos com saúde por causa da baixa produtividade do trabalhador, visitas médicas e hospitalizações (FERREIRA, 2005; MIRANDA, 2006).

Os mecanismos de ação antiulcerogênica envolvem os fatores que controlam a secreção ácida ou aqueles que promovem a citoproteção, aumentando a resistência da mucosa contra agentes agressores ou ainda, limitando o acesso destes agentes a ela (CARVALHO, 2006).

Vários medicamentos têm sido utilizados no tratamento de úlceras gástricas e duodenais, incluindo os agentes anti-secretores gástricos, do tipo antagonistas dos receptores H_2 de histamina e análogos da prostaglandina, como misoprostol, droga citoprotetora. Em 1988 foram introduzidos no mercado o omeprazol e lansoprazol, que inibem a bomba protônica $H^+ K^+$ ATPase (transportador responsável pela etapa final da secreção gástrica) (BIGHETTI, 2004).

Hiruma-Lima *et al.* (2000) utilizaram 3 modelos diferentes de indução de úlcera em ratos para avaliação da atividade gastroprotetora do óleo essencial de *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae), sugerindo com os resultados obtidos, que estudos futuros são promissores para a elucidação do mecanismo de ação e isolamento dos princípios gastroprotetores.

Um dos modelos muito utilizados para indução de úlcera gástrica é com o etanol. O álcool possui um papel muito importante nas doenças do trato gastrointestinal. A lesão da mucosa gástrica ocorre devido a uma diminuição de função da barreira de muco, a principal proteção contra o ácido gástrico. Altas concentrações de etanol levam a um aumento da permeabilidade epitelial, como consequência de mudanças da diferença de potencial celular que é causado pela redifusão de íons H^+ através da mucosa lesada, e danos da mucosa principalmente devido aos distúrbios vasculares e diminuição do fluxo sanguíneo. O etanol também induz estresse oxidativo, danos ao DNA e diminuição dos grupamentos sulfidrílicos não-protéicos (GSH) das células que é um dos mais importantes fatores de proteção da mucosa (BONAMIN, 2010).

Nestes estudos com animais de laboratório, observa-se grande liberação de radicais livres, ultrapassando a capacidade antioxidante da célula. Com isso ocorre o estresse oxidativo,

levando a lesão das membranas celulares, DNA e também diminuição dos protetores gástricos como os grupamentos sulfidrilicos não-proteicos (SHs) das células gástricas.

Outro modelo utilizado é o de indução de lesão gástrica com indometacina. Trata-se de um potente inibidor não-seletivo da enzima ciclo-oxigenase, um elemento fundamental da cascata do ácido araquidônico: a via metabólica que permite a síntese de prostaglandinas e tromboxanos (BONAMIN, 2010).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar fitoquímica e biologicamente (atividade antiulcerogênica) as substâncias ativas presentes na espécie vegetal *Synadenium grantii* Hook.f. (Euphorbiaceae).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a triagem fitoquímica do látex e do extrato bruto do caule de *S. grantii*;
- Determinar a toxicidade aguda do látex e do extrato bruto em teste com *A. salina*, para obtenção da CL₅₀;
- Avaliar a toxicidade do látex e do diluído do látex em animais (órgãos e exames laboratoriais)
- Determinar a atividade antiulcerogênica da espécie em estudo frente a modelos experimentais com animais.

5 MANUSCRITO

Atividade antiulcerogênica do látex de *Synadenium grantii* HOOK. f. (EUPHORBIACEAE)

Larissa Lima Gonçalves Costa^a, Vanessa Cristina David^a, Rodrigo Moreira Caetano Pinto^a, Bruno Rodrigo Minozzo^a, Vitoldo Antonio Kozlowski Junior^b, Letícia Antonelo Campos^b, Rosi Zanoni Silva^a, Flávio Luís Beltrame^{a*}

^a Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Avenida Carlos Cavalcanti, 4748, Uvaranas, CEP: 84900-030, Ponta Grossa, Paraná, Brazil.

^b Departamento de Odontologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Avenida Carlos Cavalcanti, 4748, Uvaranas, CEP: 84900-030, Ponta Grossa, Paraná, Brazil.

* Autor para correspondência: E-mail: flaviobeltra@gmail.com, telefone: 55 42 3220-3782, 55 42 3220-3120.

Resumo

Synadenium grantii Hook. f. (Euphorbiaceae), popularmente conhecida como leitossinha ou Janaúba. O látex diluído é comumente usado no sul do país para o tratamento de úlceras gástricas, gastrite ou distúrbios gástricos. Este estudo avaliou triagem fitoquímica e toxicidade contra *Artemia salina* Leach do extrato bruto da casca e látex, toxicidade em ratos e a atividade antiulcerogênica do látex de *S. grantii*. Resultados fitoquímicos mostraram a presença de taninos, terpenos, substâncias não saponificáveis, cumarinas e antraquinonas no extrato bruto da casca e terpenos no látex. Os resultados de toxicidade contra *A. salina* apresentou $CL_{50} = 26,58 \mu\text{g} / \text{mL}$ e $CL_{50} = 778,66 \mu / \text{mL}$ para o látex e da casca bruto extrato, respectivamente. Os parâmetros hepáticos AST ($194,30 \pm 13,72 \text{ U} / \text{L}$) e ALT ($36,00 \pm 10,37 \text{ U} / \text{L}$) no grupo de látex mostraram maior atividade enzimática do que para o diluído do látex e grupo controle. Onde observaram um aumento nos linfócitos e eosinófilos (43.5 ± 3.94 e 56.67 ± 11.45 células / mm^3 , respectivamente). O látex mostrou uma proteção gástrica em comparação ao controle negativo (H_2O) com inibição da úlcera de 90% ($p < 0,05$) para o látex e 5,7% para o látex diluído. Em conclusão, os dados indicam que *S. grantii* látex, em condições de pesquisa, apresentou efeito de proteção gástrica, mas a toxicidade.

Palavras-chave: *Synadenium grantii*, Látex, Toxicidade, Gastroproteção

Abstract

Synadenium grantii Hook. f. (Euphorbiaceae) is popularly known as *leitosinha* or *janaúba*. The latex (diluted form – 18 drops of latex in 1 liter of water) is commonly used in the south of Brazil to treat gastric ulcers, gastritis or gastric disturbances. This study evaluated phytochemical screening and toxicity against *Artemia salina* Leach of crude stem bark extract and latex, toxicity in rats and the anti-ulcer activity of *S. grantii* latex. Phytochemical results showed presence of tannins, terpenes, unsaponifiable substances, coumarins and anthraquinones in the crude bark extract and terpenes in the latex. The gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis demonstrated the presence of diterpene tiglane esters in the latex, identified as 12-deoxyphorbol-13-(2-metilpropionate) and phorbol 12,13,20-triacetate. The toxicity results against *A. salina* presented $CL_{50}=26,58\mu\text{g/mL}$ and $CL_{50}=778,66\mu\text{g/mL}$ for the latex and the crude bark extract respectively. The toxicological hepatic parameters AST (194.30 ± 13.72 U/L) and ALT (36.00 ± 10.37 U/L) in the latex group showed higher enzymatic activity than the diluted and control group. Changes in the lymphocytes and eosinophile cells (43.5 ± 3.94 and 56.67 ± 11.45 cells/ mm^3 , respectively) in the latex group was observed. The latex showed gastric protection compared to the negative control (H_2O) with ulcer inhibition of 90% ($p<0.05$) to the latex and 6% to the diluted latex. In conclusion, the data indicate that *S. grantii* latex, under research conditions, presented gastric protection effect but also toxicity.

Keywords: *Synadenium grantii*, Latex, Toxicity, Gastric protection.

1. Introdução

O estudo das propriedades terapêuticas de espécies vegetais é geralmente baseada em informações etnofarmacológicas e conhecimento popular, e essa informação muitas vezes dirige estudos clínicos e farmacológicos, e também o isolamento das substâncias responsáveis pela eficácia terapêutica [1-2]. Desta forma, a família Euphorbiaceae contém mais de 300 gêneros e 8.900 espécies descritas em todo o mundo [3], muitas das quais são utilizadas para fins medicinais. Esta família é predominantemente encontrada na África e nas Américas, principalmente em habitats tropicais e áridas [4]. Assim, plantas pertencentes a esta família têm desenvolvido várias formas de vida, incluindo ervas, arbustos e árvores de grande porte [3]. De particular interesse nesta família são os *Euphorbia*, *Jatropha*, *Ricinus*, *Manihot* e *Synadenium* gêneros, que apresentam várias classes de moléculas bioativas, tais como flavonoides, saponinas, diterpenos, ésteres de forbol [5-6], triterpenos [7], lecitina [8 -9] e glicoproteínas [10]. O gênero *Synadenium* contém 19 espécies, sendo um pequeno gênero da família Euphorbiaceae [11]. Diversas espécies deste gênero foram avaliados farmacologicamente contra o anti-inflamatória, antitumoral, analgésica, imuno-reguladoras e fibrinolítica em modelos experimentais [8-10-12-

14], mas há pouca informação científica sobre a avaliação da toxicidade aguda e de ação gastroprotetora [12-15-17]. Apesar disso, espécies pertencentes a este gênero são amplamente utilizadas na medicina popular para tratar várias doenças como câncer, úlceras pépticas e outros problemas de saúde [18-19]. *Synadenium grantii* Hook f. é uma planta medicinal popularmente conhecida no sul do Brasil como leitosinha e Janaúba. Ele é usado (na medicina popular) como látex diluído (18 gotas de látex em 1 litro de água) [18] para o tratamento de doenças neoplásicas e distúrbios gástricos, como úlcera péptica e gastrite [20]. Apresenta-se como um arbusto suculento que pode atingir de 3 a 5 metros de altura, com folhas ovais, pecíolos curtos e escuros flores vermelhas. Quando os galhos e cascas são removidos da planta libera um látex branco que é altamente irritante [11-21]. A literatura inclui alguns estudos desta espécie, tais como: Kinghorn (1980) que relataram o isolamento e identificação de ésteres de diterpeno apresentado no látex; Uzabakiliho, Largeau e Casdevall (1987) que identificaram a presença de triterpenos, compostos polifenólicos, ácidos orgânicos e ácidos graxos no látex, e Menon et al. (2002) que relataram o isolamento e caracterização de enzimas proteolíticas (serinoproteases). Todos os compostos acima mencionados têm propriedades medicinais, como moluscicida, [20] proteolíticas, fibrinolítico e ações hemaglutinante [15-22]. Para apoiar o uso popular e indicação etnofarmacológica de *S. grantii*, este estudo se propõe a investigar o perfil fitoquímico do látex e casca do caule, avaliar a toxicidade aguda in vivo (*A. salina*) e estabelecer a ação antiúlcera em modelos animais (lesões gástricas induzidas por indometacina e por etanol).

2. Experimental

2.1. Material vegetal e extratos

O látex (58 mL) e casca do caule de *S. grantii* (334,50 g) foram coletados em Ponta Grossa (altitude: 975 metros, latitude: 25 ° 05'38"S, longitude: 50o 09'30"W), Paraná, Brasil, em abril de 2010. A exsicata foi identificada por Osmar dos Santos Ribas e depositada no Herbário do Museu Botânico de Curitiba (Brasil) sob o número 363509. O látex (EB1) foi extraído através de incisões longitudinais no caule. O extrato bruto da casca do caule (EB2, solução hidroalcoólica 70%, v / v) foi preparada por maceração do material seco e moído por sete dias em temperatura ambiente e protegido da luz. O extrato foi filtrado e concentrado. A EB2 foi

lioofilizado e estocado a 0 ° C. Para preparar o látex diluído (EB3) 1 litro de água foi usado e 18 gotas do látex [18]. Estes extratos foram armazenados em geladeira até o uso.

2.2. Triagem fitoquímica

Triagem fitoquímica foi realizada com extratos EB1 e EB2 [23]. Os grupos de metabólitos secundários foram avaliados por meio de reações de compostos específicos, tais como terpenos / esteroides, alcaloides, flavonoides, antraquinonas, cumarinas, saponinas e taninos. A intensidade da cor e / ou o aparecimento de um precipitado na realização das reações foram interpretados como respostas aos ensaios qualitativos.

2.3. Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG / EM)

2.3.1. Aparelhos e *software*

CG foi realizada em um sistema (Palo Alto, CA) modelo Varian Saturn 2000R. A ionização foi obtida por técnica de impacto eletrônico, com Energia de 70 eV para análise e detecção de massa. Aquisição de dados foi realizada com software Analyst 1.4.2 (Applied Biosystems). A identificação dos compostos foi realizada pelos respectivos tempos de retenção e espectro de massa e fragmentação foi obtida por comparação com a massa biblioteca NIST (National Institute of Standards and Technology).

2.3.2. CG-EM- condições

A temperatura do injetor foi mantida a 250 ° C e a armadilha a 200 ° C. Hélio 5.0 foi utilizado como gás de transporte de análise a uma vazão de 1mL / min. As condições de operação foram as seguintes: as análises foram realizadas em uma coluna DB-225-MS. A temperatura inicial da coluna foi de 50 ° C, a qual foi mantida por dois minutos e foi então programado para aumentos de 20 ° C / min. até atingir 90 ° C. Depois de um minuto, houve um aumento de 5° C / min. até atingir um máximo de 280 ° C. Um montante de 10 mg de cada amostra foi diluída em 1 mL de metanol e, posteriormente, 0,1 mL desta solução foi injetado na coluna. Os compostos foram identificados por comparação com as bibliotecas de espectros de massa - NIST 12.

2.4. Animais

Ratos Wistar fêmeas (200 g) foram mantidos em temperatura ambiente com ciclo claro-escuro de 12/12h. Foram alimentados com uma dieta equilibrada e livre acesso à água. Todos os animais ficaram em abstinência de ração por 18 h antes do experimento. Eles foram obtidos do Biotério Central da Universidade estadual de Ponta Grossa. Os testes foram projetados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal do Conselho Brasileiro de Experimentação Animal. O protocolo experimental (nº 15.116) foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

2.5. Ensaios *in vivo*

2.5.1. Teste da letalidade com *Artemia salina* - Determinação da Concentração Letal (CL₅₀)

A toxicidade do extrato bruto liofilizado da casca (EB2) e do látex (EB1) de *S. grantii* foram realizadas de acordo com o procedimento descrito por Meyer et al. (1982). Resumidamente, os cistos de *Artemia salina* (100 mg) foram incubadas sob luz artificial e aeração constante com pH ajustado entre 8-9 e sem alimentação por 48 horas para a eclosão das larvas (náuplios). Soluções com o extrato e látex foram preparadas em solução salina (0,38 g / L) nas concentrações de 1000-1 µg / mL e 10-0,05% (v / v), respectivamente. O grupo controle positivo foi preparado pela adição de dicromato de potássio 1% e o controle negativo foi preparado em solução salina. As larvas (náuplios) de *A. salina* (10 por frasco) foram adicionados a cada tubo e após 24 h de contato as larvas sobreviventes foram contadas. Os dados foram analisados usando o método Probit [24] e expressa como CL₅₀ [25-26].

2.5.2. Avaliação de toxicidade oral

O estudo de toxicidade oral de *S. grantii* látex (EB1) e látex diluído (EB3) foi realizada em ratos. Neste ensaio, uma única dose de 0,5 mL / animal foi administrado oralmente a um grupo de seis animais após 18 horas de jejum de ração. Um grupo de animais (n = 6) receberam água que serviu como controle. Após 6 horas da administração, os animais foram sacrificados. Alterações macroscópicas nos órgãos dos ratos (fígado, rins, glândulas suprarrenais, baço, útero, ovários, pâncreas e estômago) foram avaliados e pesados para determinar os pesos relativos (g de

peso corporal 100-1). A avaliação laboratorial incluiu leucócitos, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), albumina, creatinina e proteína C-reativa. Estes testes foram realizados para avaliar os parâmetros bioquímicos dos animais usando seu soro (obtido após a centrifugação das amostras - 2500 rpm/10 min), utilizando um Vitalab Selectra II.

2.5.3. Ensaio de atividade antiulcerogênica

2.5.3.1. Lesões gástricas induzidas por indometacina

Grupo de animais (n = 6) recebeu uma administração oral de látex (EB1) e látex diluída (EB3) de *S. grantii*; ranitidina (100 mg / kg) e omeprazol (20 mg / kg) como controles positivo e água como controle negativo. Dez minutos antes da administração subcutânea de indometacina (agente ulcerogênico - 40mg/kg - para induzir úlceras gástricas) os respectivos grupos de animais receberam 0,5 mL de amostras, controles positivos e negativos, nos montantes acima indicados. Após 6 horas de tratamento, os animais foram eutanasiados. Os estômagos foram rapidamente removidos, abertos ao longo da curvatura maior, e gentilmente lavados com solução salina 0,9% e, em seguida, as lesões foram identificadas, medidas, quantificadas e qualificadas ao longo de seu comprimento maior [27-28-29].

2.5.3.2. Lesões gástricas induzidas por etanol

Os ratos (n = 6) foram tratados (por via oral) com as mesmas amostras, controles positivos e negativos, e os volumes utilizados no experimento indometacina. Depois de uma hora os ratos receberam por via oral, através de uma agulha de aço inoxidável intubação, 0,5 mL de etanol (Synth PA) para induzir úlceras gástricas. Os animais foram eutanasiados uma hora após o tratamento com o agente ulcerogênico. Os estômagos foram retirados, abertos ao longo da curvatura maior e gentilmente lavados com soro fisiológico 0,9%, e, em seguida, as lesões foram identificadas, medidas, quantificadas e qualificadas ao longo de seu comprimento maior [30-31].

2.5.3.3. Índices de Lesões Ulcerativas (ILU)

As lesões ulcerativas foram contadas e classificadas, recebendo uma pontuação de acordo com: área (grandes > 1 mm e pequenas <1 mm), número de lesões petequiais (até 10 petéquias = 1 ponto, até 20 = 2 pontos e 30 = 3 pontos), presença de lesão hemorrágica, perda de dobras e perda de cor (igual a 1 ponto). Os resultados foram expressos como índice de lesões ulcerativas (ILU) com a aplicação da fórmula abaixo [32].

$$ILU = (3 \times A) + (2 \times B) + (C) + (D) + (E) + (F)$$

* A = lesão ulcerativa > 1 mm, B = lesão ulcerativa <1 mm, C = lesão hemorrágica, D = perda de pregas, E = perda de cor e F = n.º lesões petequiais.

A fórmula utilizada para calcular a percentagem de grau de inibição da ulceração [33] nos grupos tratados foi:

$$\text{Inibição\% Ulceração} = \frac{\text{Controle Negativo ULI (1)} - \text{Teste ULI (2) ou (3)} \times 100}{\text{Controle negativo ILU}}$$

* (1) = grupo negativo (água), (2) = amostra e do grupo (3) = ranitidina ou omeprazol

2.6. Análise Estatística

A atividade antiulcerogênica e os ensaios bioquímicos foram avaliados pela diferença de significância estatística experimental utilizando análise de variância (ANOVA), teste de Tukey e teste *t* Student. As análises foram determinadas pelo GraphPad Prism 4.0. Significância estatística foi considerada quando $P < 0,05$.

3. Resultados e Discussão

A triagem fitoquímica para os principais grupos químicos de metabólitos secundários específicos usando reações colorimétricas [23] demonstraram a presença de terpenos, compostos fenólicos (taninos hidrolisáveis e condensados, cumarinas e antraquinonas) e substâncias não saponificáveis no extrato bruto da casca (EB2) de *S. grantii*, enquanto que no látex (EB1), apenas a presença de terpenos foi confirmada.

Estes dados estão de acordo com a literatura, que relata a presença desses grupos de metabólitos secundários em *S. grantii* ou em outra espécie do gênero *Synadenium* [5-7-11]. Compostos fenólicos foram identificados em *S. grantii* e outras espécies da família Euphorbiaceae [34]. Da mesma forma, terpenos e substâncias não saponificáveis estão presentes em grandes quantidades nas plantas que contêm látex [7-20-35-36]. Além disso, terpenos formam a maioria dos compostos nas espécies *S. grantii* [7]. De acordo com Kinghorn (1980), a fração de metanol de látex de *S. grantii* obtidos por uma separação líquido-líquido apresenta ésteres diterpenos do núcleo tigliano. Como a nossa triagem inicial fitoquímica confirmou a presença de terpenos no látex, a fração metanólica foi obtida e avaliada por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (CG-EM) para determinar a presença destes tipos de terpenos no látex. Dois ésteres de forbol (diterpenos tigliano - Fig.1) que já tenham sido relatados em *S. grantii* foram separados por cromatografia gasosa e identificados por comparação de espectros de massa e os dados obtidos na biblioteca NIST e da literatura [11]. Ésteres de diterpeno do núcleo tigliano são característicos do gênero *Synadenium*, podendo ser indicado como marcadores quimiotaxonômicos e também poderia ser responsável por propriedades irritantes da pele [37-38].

FIGURA 1

Devido à presença de ésteres de diterpeno do núcleo tigliano foi avaliado os parâmetros toxicológicos desta espécie. Portanto, foi realizada a avaliação da toxicidade aguda do látex em ensaio de *A. salina*. Esta avaliação permitiu a determinação da toxicidade intrínseca do extrato da planta e os efeitos causados por uma sobredosagem aguda [26].

Resumidamente, este teste foi baseado na capacidade do extrato da planta para matar culturas de laboratório deste microcrustáceo, criando uma relação entre o grau de toxicidade de extratos de plantas e CL_{50} contra larvas de *A. salina*. A CL_{50} maior que 1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$ indica que o extrato pode ser considerado atóxico [25-26].

O resultado obtido no experimento com *A. salina* e EB2 mostrou um $CL_{50} = 778,66 \mu\text{g} / \text{mL}$, indicando que este material apresenta uma baixa toxicidade. Por outro lado, o látex (EB1) mostrou um alto grau de toxicidade contra *A. salina*, demonstrando que esse efeito é dependente da concentração. Um valor de $CL_{50} 26,58 \mu\text{g} / \text{mL}$, confirmou a alta toxicidade desse material.

É importante notar que a literatura ainda não contém dados de avaliação da toxicidade aguda de látex e extrato de casca bruta de *S. grantii* em experimentos com *A. salina*. Assim, estes dados são importantes para pesquisas futuras, porque, segundo alguns autores, a toxicidade de extratos de plantas avaliadas em *A.salina* mostra boa correlação com atividade antitumoral, inseticida e anti-*Trypanosoma cruzi* de substâncias com $CL_{50} < 103 \mu\text{g/mL}$ [26-39-42]

Além disso, a toxicidade oral do látex (EB1) e látex diluído (EB3) foi avaliada em ratos. Os animais foram tratados com uma dose única de 0,6 g / rato e os órgãos dos animais do grupo controle e dos grupos tratados com EB1 e EB3. Alterações macroscópicas significativas não foram demonstradas. Além disso, o peso relativo desses órgãos não apresentou resultados com diferenças estatisticamente significantes. Os resultados obtidos para os parâmetros bioquímicos, albumina, creatinina e PCR não demonstraram diferenças significativas quando os dados entre os grupos foram comparados por ANOVA, teste de Tukey ($P > 0,05$). Os parâmetros hepáticos AST e ALT no grupo látex apresentaram maior atividade enzimática do que o grupo diluído e controle, respectivamente (Tabela 1). É plausível sugerir que o efeito biológico do látex de *S. grantii* pode estar relacionado ao potencial e sensibilização alérgica mediada por efeito de aumentar o número de eosinófilos no sangue dos ratos fêmeas verificado neste estudo. Além disso, essa resposta biológica foi independente da concentração de látex e foi acompanhada por uma alteração no número de linfócitos (Tabela 2).

TABELA 1

TABELA 2

Como o látex é usado popularmente no sul do Brasil em forma diluída (18 gotas por litro de água) para o tratamento de úlceras pépticas [18], uma avaliação do diluído látex (EB3) e látex (EB1) foi realizado com relação ao potencial efeito protetor em ratos. Dois modelos diferentes de produção de úlceras pépticas (etanol e indometacina) [27-30] foram utilizados, com a intenção de verificar o uso tradicional desses dois materiais. Os resultados utilizando o modelo de lesão gástrica induzida pela administração oral de etanol demonstraram que a formação de ulcerações e petéquias foram induzidas em diferentes porcentagens na mucosa do estômago. A avaliação do controle negativo apresentaram índices de lesões ulcerativas (ILU) de $23,33 \pm 3,15$ e pré-tratamento dos animais com ranitidina e omeprazol reduziu significativamente ILU (51,78% e

67,85%, respectivamente) quando comparados com o controle negativo (água). Da mesma forma, o látex (EB1) de *S. grantii* apresenta um efeito protetor significativo (Fig. 2).

FIGURA 2

O uso do látex diluído (EB3), apresentou uma redução de 6% na formação das lesões ulcerativas e formação de petéquias, e não indicam diferenças significativas quando comparado com o controle negativo (água). O látex (EB1) apresentou valores significativamente reduzidos de ILU (** $P < 0,01$), quando obtidos pelo teste de Tukey, apresentando um valor proporcional de proteção gástrica de 90,01% em relação ao grupo controle negativo.

Para confirmar os resultados que demonstraram o efeito protetor gástrico do EB1 e EB3 amostras contra o modelo de etanol, realizou-se o modelo de indometacina (um medicamento que produz úlceras em animais de laboratório) [43-44]. Em relação à aplicação do referido modelo experimental, verificou-se que a amostra do látex apresentou atividade antiulcerogênica alta, impedindo a formação de lesões ulcerativas no estômago dos ratos tratados com este material (Fig. 3).

FIGURA 3

Os resultados obtidos foram estatisticamente semelhantes aos resultados verificados para os grupos controle positivo (ranitidina e omeprazol), e não apresentaram diferenças significativas entre esses grupos (Fig. 4).

FIGURA 4

O látex diluído (EB3) não apresenta ação protetora gástrica com o modelo etanol ou o modelo de indução de úlcera indometacina ($P > 0,05$, quando comparado com o grupo controle negativo Fig.3C).

Conforme indicado anteriormente, apesar do uso popular de látex diluída de *S. grantii* para o tratamento de úlceras gástricas, nenhum estudo científico foi feito até agora para avaliar como uma indicação terapêutica. Nos experimentos para induzir úlceras, os dados obtidos com relação

a um efeito de proteção gástrica do látex diluído demonstrou que esse material não apresenta efeitos diferentes quando comparados com água (controle negativo), indicando que não apresenta efeitos antiulcerativa que justificam o seu uso.

No entanto, quando os resultados obtidos com o látex foram avaliados um efeito de proteção gástrica foi verificado. Isto pode ser um indicativo de que o material vegetal, quando em contato com o conteúdo estomacal, pode gerar a formação de uma camada protetora impedindo os danos que sofrem mucosas causadas por agentes agressivos (etanol, por exemplo). Além disso, ele pode conter substâncias químicas que podem atuar para promover a ação antiulcergenica (Fig.5).

FIGURA 5

Os resultados preliminares fitoquímicos indicaram a presença de metabólitos secundários (compostos fenólicos / substâncias não saponificáveis) em *S. grantii* que sugerem que o efeito antiulcergenico do látex em relação aos modelos indometacina e etanol pode estar relacionado à presença dessas substâncias no material avaliado[33,45-51]. No entanto, deve-se notar que o látex apresentaram valores elevados de CL_{50} quando avaliados pelo experimento de toxicidade aguda com *A.salina* e apresentaram alterações bioquímicas frente aos parâmetros ALT, AST. Portanto, outros estudos devem ser realizados procurando isolar e identificar compostos responsáveis por essa ação protetora da mucosae stomacal e também para determinar o possível mecanismo de ação do látex. Desta forma, será possível avaliar a viabilidade do uso do látex de *S. grantii* para o tratamento de tais problemas patológicos ou para permitir a identificação de novas substâncias com propriedades farmacológicas desejadas. Finalmente, devido à toxicidade de descarga desse material, como observado, o seu uso contínuo (de acordo com o uso popular) inspira cuidados do usuário, sendo necessário estudo complementar para determinar a sua toxicidade crônica frente aos modelos in vivo.

4. Conclusão

A análise preliminar fitoquímica de *Synadenium grantii* indicou a presença de vários grupos fitoquímicos que nos permitiu inferir que o efeito antiulcerogênica determinado, pode

estar relacionado à presença destes compostos fenólicos e não saponificáveis neste material vegetal. Além disso, a análise por cromatografia gasosa destacou a presença de ésteres de forbol que, de acordo com a literatura, apresentam ação antitumoral. Tais resultados devem ser avaliados contra modelos antitumorais uma vez que esta planta também é utilizada na cultura popular para o tratamento de câncer.

Os dados obtidos com uma dose única nos experimentos antiulcerosos sugerem que o uso do látex de *S. grantii* pode potencialmente apresentar um efeito gastroprotetor em relação aos modelos avaliados. No entanto, outros estudos ainda devem ser realizados usando diferentes modelos pré-clínicos que permitam a avaliação possível da ação crônica deste material para corroborar os dados encontrados.

Reconhecimento

Este trabalho recebeu apoio financeiro da Fundação Araucária. Gostaríamos também de agradecer ao professor Dr. Fábio André dos Santos por ajudar em alguns experimentos.

ANTI-ULCER ACTIVITY OF *Synadenium grantii* HOOK. f. (EUPHORBIACEAE) LATEX

Larissa Lima Gonçalves Costa^a, Vanessa Cristina David^a, Rodrigo Moreira Caetano Pinto^a, Bruno Rodrigo Minozzo^a, Vitoldo Antonio Kozlowski Junior^b, Letícia Antonelo Campos^b, Rosi Zanoni Silva^a, Flávio Luís Beltrame^{a*}

^a Department of Pharmacy, Ponta Grossa State University, Carlos Cavalcanti Avenue, 4748, Uvaranas, CEP: 84900-030, Ponta Grossa, Paraná, Brazil.

^b Department of Odontology, Ponta Grossa State University, Carlos Cavalcanti Avenue, 4748, Uvaranas, CEP: 84900-030, Ponta Grossa, Paraná, Brazil.

* Corresponding author: E-mail address: flaviobeltra@gmail.com, telephone: 55 42 3220-3782, 55 42 3220-3120. Address: Department of Pharmacy, Ponta Grossa State University, Carlos Cavalcanti Avenue, 4748, Uvaranas, CEP: 84900-030, Ponta Grossa, Parana, Brazil.

Abstract

Synadenium grantii Hook. f. (Euphorbiaceae) is popularly known as *leitosinha* or *janaúba*. The latex (diluted form – 18 drops of latex in 1 liter of water) is commonly used in the south of Brazil to treat gastric ulcers, gastritis or gastric disturbances. This study evaluated phytochemical screening and toxicity against *Artemia salina* Leach of crude stem bark extract and latex, toxicity in rats and the anti-ulcer activity of *S. grantii* latex. Phytochemical results showed presence of tannins, terpenes, unsaponifiable substances, coumarins and anthraquinones in the crude bark extract and terpenes in the latex. The gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis demonstrated the presence of diterpene tiglane esters in the latex, identified as 12-deoxyphorbol-13-(2-metilpropionate) and phorbol 12,13,20-triacetate. The toxicity results against *A. salina* presented $CL_{50}=26,58\mu\text{g/mL}$ and $CL_{50}=778,66\mu\text{g/mL}$ for the latex and the crude bark extract respectively. The toxicological hepatic parameters AST (194.30 ± 13.72 U/L) and ALT (36.00 ± 10.37 U/L) in the latex group showed higher enzymatic activity than the diluted and control group. Changes in the lymphocytes and eosinophile cells (43.5 ± 3.94 and 56.67 ± 11.45 cells/ mm^3 , respectively) in the latex group was observed. The latex showed gastric protection compared to the negative control (H_2O) with ulcer inhibition of 90% ($p<0.05$) to the latex and 6% to the diluted latex. In conclusion, the data indicate that *S. grantii* latex, under research conditions, presented gastric protection effect but also toxicity.

Keywords: *Synadenium grantii*, Latex, Toxicity, Gastric protection.

1. Introduction

The study of the therapeutic properties of plant species is usually based on ethnopharmacological information and popular knowledge, and this information often directs clinical and pharmacological studies, and also the isolation of substances responsible for the therapeutic efficacy [1-2]. The Euphorbiaceae family contains over 300 genera and 8900 species described worldwide [3], many of which are used for medicinal purposes. This family is predominantly found in Africa and the Americas, mainly in tropical or arid habitats [4]. Thus, plants belonging to this family have developed various forms of life, including herbs, shrubs and large trees [3]. Of particular note in this family are the *Euphorbia*, *Jatropha*, *Ricinus*, *Manihot* and *Synadenium* genera, that present various classes of bioactive molecules such as flavonoids, saponins, diterpenes, phorbol esters [5-6], triterpenes [7], lecithin [8-9] and glycoproteins [10]. The genus *Synadenium* contains 19 species, being a small genus of the Euphorbiaceae family [11]. Several species of this genus have been pharmacologically evaluated against anti-inflammatory, antitumor, analgesic, immune-regulatory and fibrinolytic experimental models [8,10,12-14], but there is little scientific information relating to the evaluation of acute toxicity and gastro-protective action [12,15-17]. Despite this, species belonging to this genus are widely used in folk medicine to treat several diseases like cancer, peptic ulcers and other health problems [18-19]. *Synadenium grantii* Hook f. is a medicinal plant popularly known in southern Brazil as leitosinha and janaúba. It is used (in folk medicine) as a diluted latex (18 drops of latex in 1 liter of water) [18] for the treatment of neoplastic diseases and gastric disorders such as peptic ulcers and gastritis [20]. It presents as a succulent shrub that can reach 5 meters in height with oval leaves, short petioles and dark red flowers. When the branches and bark are removed the plant releases a white latex that is highly irritating [11,21]. The literature includes some studies of this species such as: Kinghorn [11] who reported the isolation and identification of diterpene esters presented in the latex; Uزابakiliho, Largeau and Casedevall [7] who identified the presence of triterpenes, polyphenolic compounds, organic acids and fatty acids in the latex, and Menon et al. [16] who reported the isolation and characterization of proteolytic enzymes (serineproteases). All the above-mentioned compounds have medicinal properties, such as molluscicidal, [20] fibrinolytic, proteolytic and hemagglutinating actions [15, 22]. To support the popular use and ethnopharmacological indication of *S. grantii*, this study proposes to investigate the phytochemical profile of latex and stem bark, to evaluate the acute toxicity in vivo (*Artemia*

saline and rats) and to establish the anti-ulcer action in animal models (indomethacin and ethanol-induced gastric lesions).

2. Material and Methods

2.1. Plant material and extracts

The latex (58 mL) and stem bark of *S. grantii* (334.50 g) were collected in Ponta Grossa (altitude: 975 meters, latitude: 25° 05' 38" S, longitude: 50° 09' 30" W), Parana, Brazil, in April 2010. A voucher specimen was identified by Osmar dos Santos Ribas and deposited in the Herbarium of the Botanical Museum of Curitiba (Brazil) under the number 363509. The latex (EB1) was extracted through longitudinal incisions in the trunk. The crude stem bark extract (EB2, hydro alcoholic 70%, v/v) was prepared by maceration of dried and powdered material for seven days at room temperature and protected from light. The extract was then filtered and concentrated. The EB2 was lyophilized and stocked at 0°C. To prepare the diluted latex (EB3) 1 liter of water was used and 18 drops of the latex [18]. These extracts were stored in a refrigerator until use.

2.2. Phytochemical screening

Phytochemical screening was carried out with extracts EB1 and EB2 [23]. The groups of secondary metabolites were assessed by reactions to specific compounds such as terpenes/steroids, alkaloids, flavonoids, anthraquinones, coumarins, saponins and tannins. The intensity of color and/or the appearance of a precipitate in carrying out the reactions were interpreted as responses to the qualitative assays.

2.3. Gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS)

2.3.1. Apparatus and software

GC was performed on a Varian (Palo Alto, CA) model Saturn 2000R system. The ionization was obtained by electronic impact mode, at 70 eV, for mass analysis and detection. Data acquisition was performed with Analyst 1.4.2 software (Applied Biosystems). The identification of compounds was performed by the respective retention times, and fragmentation mass spectrum was obtained by comparison with mass library NIST (National Institute of Standards and Technology).

2.3.2. GC-MS conditions

The injector temperature was maintained at 250° C and the trap at 200 ° C. Helium 5.0 was used as analytical carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. The operating conditions were as follows: analyses were performed on a column DB-225-MS. The initial column temperature was 50° C, which was maintained for two minutes and was then scheduled to increases of 20°C/min. until reaching 90° C. After one minute, there were increases of 5°C/min. until reaching a maximum of 280°C. An amount of 10 mg of each sample was diluted in 1 mL of methanol, and subsequently 0.1 mL of this solution was injected in the column. The compounds were identified by comparison with mass spectra libraries of NIST 05.

2.4. Animals

Female Wistar rats (200 grams) were maintained at room temperature with a light-dark cycle of 12/12h. They were fed a balanced diet and given free access to water. All animals were starved for 18 h before use. They were obtained from the Central Biotery of the UEPG University. The tests were designed according to the Ethical Principles of Animal Experimentation of the Brazilian Council for Animal Experiments. The experimental protocol (no 15116) was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the State University of Ponta Grossa.

2.5. In vivo assays

2.5.1. Brine shrimp lethality test - Determination of lethal concentration (LC50)

The toxicity of lyophilized bark crude extract (EB2) and the latex (EB1) of *S. grantti* were carried out according to the procedure described by Meyer et al. [24]. Briefly, the cysts of *Artemia saline* (100 mg) were incubated under artificial light and constant aeration with pH adjusted between 8-9 and without food for 48 hours for larvae hatching (nauplii). Extract solutions and latex tubes were prepared in saline (0.38 g/L) at concentrations of 1000-1 µg/mL and 10-0.05% (v/v) respectively. The positive control group was prepared by adding potassium dichromate 1% and the negative control was prepared in saline. The larvae (nauplii) of *A. saline* (10 per vial) were added to each tube and after 24 h of contact the surviving larvae were counted. The data were analyzed using the Probit method [25] and expressed as LC50 [26-27].

2.5.2. Evaluation of oral toxicity

The oral toxicity study of *S. grantii* latex (EB1) and diluted latex (EB3) was performed on rats. In this assay, a single dose of 0.5 mL/animal was administered orally to a group of six animals after 18 hours fast. A group of animals (n=6) received water that served as control. After 6 hours of administration, the animals were euthanized. Macroscopic changes in the organs of the rats (liver, kidneys, adrenal glands, spleen, uterus, ovaries, pancreas and stomach) were evaluated and weighed to determine the relative weights (g.100-1 corporal weight). Laboratory evaluation included leukocytes, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), albumin, creatinine and C-reactive protein. These tests were carried out to evaluate the biochemical parameters of the animals using their serum (obtained after centrifugation of samples, 2500 rpm/10 min.), using a Vitalab Selectra II.

2.5.3. Antiulcerogenic activity assay

2.5.3.1. Indomethacin-induced gastric lesions

Groups of animals (n = 6) received an oral administration of latex (EB1) and diluted latex (50 µL/100mL- EB3) of *S. grantii*; ranitidine (100 mg/kg) and omeprazole (20 mg/kg) as positive controls and water as negative control. Ten minutes before the subcutaneous administration of indomethacin (ulcerogenic agent - 40mg/kg – to induce gastric ulcers) the respective groups of animals received 0.5 mL of samples, positive and negative controls, in the amounts listed above. After 6 hours of the treatment, the animals were euthanized. The stomachs were rapidly removed, opened along the greater curvature, and gently rinsed with 0.9% saline solution and then the lesions were identified, measured, quantified and qualified along their greater length [28-29-30].

2.5.3.2. Ethanol-induced gastric lesions

The rats (n = 6) were treated (by oral administration) with the same samples, positive and negative controls, and volumes used in the indomethacin experiment. After one hour the rats orally received 0.5 mL of ethanol (PA–Synth) via a stainless steel intubation needle to induce gastric ulcers. The animals were euthanized one hour after treatment with the ulcerogenic agent. The stomachs were removed, opened along the greater curvature and gently rinsed with 0.9% saline solution, and then the lesions were identified, measured, quantified and qualified along their greater length [31-32].

2.5.3.3. Ulcerative Lesion Index (ULI)

The ulcerative lesions were counted and classified, receiving a score according to their extensive area (large >1 mm and small <1 mm), number of petechial lesions (up to 10 petechiae = 1 point, up to 20 = 2 points and up to 30 = 3 points), presence of hemorrhagic lesion, loss of folds and loss of color (equal to 1 point). The results were expressed as an index of ulcerative lesions (ULI) applying the formula below [33].

$$\text{ULI} = (3 \times A) + (2 \times B) + (C) + (D) + (E) + (F)$$

* A = ulcerative lesion >1 mm, B = ulcerative lesion <1 mm, C = hemorrhagic lesion, D = loss of folds, E = loss of color and F = n ° petechial lesions.

The formula used to calculate the percentage of inhibition degree of ulceration [34] in the treated groups was:

$$\% \text{ Ulceration Inhibition} = \frac{\text{Negative Control ULI (1)} - \text{Test ULI (2) or (3)}}{\text{Negative Control ULI}} \times 100$$

Negative Control ULI

* (1) = negative group (water), (2) = group sample and (3) = ranitidine or omeprazole group

2.6. Statistical analysis

The anti-ulcer activity and the biochemical assays were assessed by the difference in experimental statistical significance using analysis of variance (ANOVA), Tukey's test and Student's t-test. The analyses were determined by GraphPad Prism 4.0 (2003). Statistical significance was considered when $P < 0.05$.

3. Results and Discussion

The phytochemical screening for the main chemical groups of secondary metabolites using specific colorimetric reactions [23] demonstrated the presence of terpenes, phenolic compounds (hydrolysable and condensed tannins, coumarins and anthraquinones) and unsaponifiable substances in bark crude extract (EB2) of *S. grantii*, while in the latex (EB1) only the presence of terpenes was confirmed.

These data are in agreement with the literature, which reports the presence of these groups of secondary metabolites in *S. grantii* or in another species of the *Synadenium* genus [5-7-11]. Phenolic compounds were identified in *S. grantii* and other species of the Euphorbiaceae family [35]. In the same way, terpenes and unsaponifiable substances are present in great amounts in plants that contain latex [7-20-36-37]. Furthermore, terpenes make up the majority of compounds in the *S. grantii* species [7]. According to Kinghorn [11], the methanol fraction of latex of *S. grantii* obtained by a liquid-liquid separation presents diterpenic tiglane esters. As our initial phytochemical screening confirmed the presence of terpenes in the latex, the methanolic fraction was obtained and evaluated by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) to determine the presence of these kinds of terpenes in the latex. Two phorbol esters, that were identified as 12-deoxyphorbol-13-(2-metilpropionate) and phorbol 12,13,20-triacetate (Fig.1) that have already been reported in *S. grantii* species were separated by gas chromatography and identified by comparison of mass spectra and data obtained in the NIST library and literature [11].

Based on fragmentation in electronic impact mode, the mass spectrum of 12-deoxyphorbol-13-(2-metilpropionate) presented m/z 41, 71, 83, 109, 312 and 320 and the base peak was m/z 71. In relation to phorbol 12,13,20-triacetate the mass spectrum presented ions m/z 43, 69, 83, 109, 173, 310 and 370 and the base peak was m/z 43 ($\text{CH}_3\text{-C=O}$) derived from the cleavage of C-O bond from the principal skeleton.

Diterpene tiglane esters are characteristic of the *Synadenium* genus, and could be indicated as chemotaxonomic markers and could also be responsible for skin irritant proprieties [38-39].

FIGURE 1

Due to the presence of diterpene tiglane esters was decided to evaluate the toxicological parameters of this species. Therefore, was performed the assessment of acute toxicity of the latex in *A. saline* assay. This evaluation enabled the determination of the intrinsic toxicity of the plant extract and the effects caused by an acute overdose [27].

Briefly, this test was based on the ability of the plant extract to kill laboratory cultures of this microcrustacean, creating a relationship between the degree of toxicity of plant extracts and LC50 against larvae of *A. saline*. A LC50 greater than 1000 $\mu\text{g/mL}$ indicates that the extract can be considered nontoxic [26-27].

The results obtained in the experiment with *A. saline* and EB2 showed a $LC_{50} = 778.66 \mu\text{g/mL}$, indicating that this material presents a low toxicity. On the other hand, latex (EB1) showed a high degree of toxicity against *A. saline*, demonstrating that this effect is concentration dependent. A LC_{50} value of $26.58 \mu\text{g/mL}$, confirmed the high toxicity of this material.

It is important to note that the literature does not yet contain data evaluating the acute toxicity of latex and crude bark extract of *S. grantii* in experiments with *A. saline*. Thus, these data are important for future research because, according to some authors, the toxicity of plant extracts evaluated in *A. saline* shows good correlation with antitumor activity, insecticide and anti-*Trypanosoma cruzi* for substances with $LC_{50} < 103 \mu\text{g/mL}$ [24,27,40-42].

Additionally, the oral toxicity of the latex (EB1) and diluted latex (EB3) were evaluated in female rats. The animals were treated with a single dose of 0.6 g/rat and the organs of the animals of the control group and of the treated groups with EB1 and EB3 were analyzed. Significant macroscopic alterations were not demonstrated. Furthermore, the relative weights of these organs did not present statistically differences. The results obtained for the biochemical parameters, albumin, creatinine and PCR did not demonstrate significant differences when the data between groups was compared using ANOVA, Tukey test ($P > 0.05$). The toxicological hepatic parameters AST and ALT in the latex group showed higher enzymatic activity than the diluted and control group, respectively (Table 1). It is plausible to suggest that the biological effect of the *S. grantii* latex may be associated to potential sensibilization and allergic effect mediated by eosinophiles improve in the blood the female rats verified in this study. This biological response was independent of latex concentration and was accompanied by a drop in the number of lymphocytes (Table 2).

TABLE 1

TABLE 2

As latex is popularly used in the south of Brazil in diluted form (18 drops per liter of water) for treatment of peptic ulcers [18], an evaluation of this diluted latex (EB3) and latex (EB1) was carried out with relationship to potential protective effects in rats. Two different models of production of peptic ulcers (ethanol and indomethacin) [28,31] were used, with the intention of checking the traditional use of these two materials. The results using the gastric

lesion model induced by the oral administration of ethanol demonstrated that the formation of ulcerations and petechiae were induced in different percentages in the mucous of the stomach. The evaluation of the negative control presented ulcerative lesion index (ULI) of 23.33 ± 3.15 and the pre-treatment of the animals with ranitidine and omeprazole reduced ULI significantly (51.78% and 67.85% respectively) when compared with the negative control (water). In the same way, the latex (EB1) of *S. grantii* induced significant protective effect (Fig. 2).

FIGURE 2

The use of diluted latex (EB3) provided a 6% reduction in the formation of the ulcerative lesions and petechiae formation, and did not indicate significant differences when compared with the negative control. The pure latex presented significantly reduced values of ULI (**P < 0.01), when obtained by the Tukey test, presenting a proportional value of gastric protection of 90.01% in relation to the negative control group.

To confirm the results that demonstrated the gastric protective effect of the EB1 and EB3 samples against the ethanol model, was carried out the indomethacin model (a medicine that produces ulcers in laboratory animals) [43-44]. Regarding the application of the referred experimental model, it was verified that the sample of the latex exhibited high antiulcerogenic activity, impeding the formation of ulcerative lesions in the stomach of the rats treated with this material (Fig. 3).

FIGURE 3

The obtained results were statistically similar to the results verified for the positive control groups (ranitidine and omeprazole), and did not present significant differences among these groups (Fig.4).

FIGURE 4

The diluted latex (EB3) did not present gastric protective action with the ethanol model or the indomethacin model of ulcer induction ($P > 0.05$, when compared with the negative control group Fig.3C).

As previously indicated, in spite of the popular use of diluted latex of *S. grantii* for the treatment of gastric ulcers, no scientific study has been made until now to evaluate such a therapeutic indication. In the experiments to induce ulcers, the data obtained with relationship to a gastric protection effect of the diluted latex demonstrated that this material did not present different effects when compared with water (negative control) indicating that it does not present anti ulcerative effects that justify its use.

However, when the results obtained with the latex were appraised a gastric protection effect was verified. This can be indicative that the vegetable material, when in contact with the stomach content, can generate the formation of a protective layer impeding the mucous suffering damage caused by aggressive agents (ethanol, for example). Also, it may contain chemical substances that can act to promote antiulcerogenic action (Fig.5).

FIGURE 5

The preliminary phytochemical results indicated the presence of secondary metabolites (phenolic compounds/unsaponifiable substances) in *S.grantii* that suggest that the antiulcerogenic effect of the latex in relation to the indomethacin and ethanol models may be related to the presence of those substances in the appraised material [34,45-51]. However, it should be noted that the latex presented high values of CL50 when evaluated by the experiment of sharp toxicity with *A. saline* and they presented biochemical alterations front to the parameters ALT, AST. Therefore, other studies should be undertaken seeking to isolate and to identify compounds responsible for this protecting action of the stomach mucosa and also to determine the possible mechanism of action of the latex. In this way, it will be possible to evaluate the viability of the use of the latex of *S. grantii* for treatment of such pathological problems or to allow the identification of new substances with the desired pharmacological properties. Finally, due to the toxicity of this material its continuing popular use in Brazil requires care on the part of the user. It is necessary to carry out further studies to determine its toxicity.

4. Conclusion

The preliminary phytochemical analysis of *Synadenium grantii* indicated the presence of several phytochemical groups that allowed to infer that the antiulcerogenic effect determined might be related to the presence of these phenolic and unsaponifiable compounds in this vegetable material. Furthermore, the analysis by gas chromatography showed the presence of phorbol esters that, according to the literature, present anti-cancerous actions. Such results should be evaluated against anti-cancerous models once this plant is also used in the popular culture for treatment of cancer.

The data obtained using a single dose in the anti-ulcer experiments suggest that the use of *S. grantii* latex may potentially present a gastroprotective effect in relation to the appraised models.

Acknowledgement

This work received financial support from the Araucaria Foundation. We would also like to thank Professor Fábio André dos Santos for help in some experiments and Zilda Mara Consalter for support.

References

- [1] U. P. Albuquerque, L. H. C. Andrade, Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no estado de Pernambuco, nordeste do Brasil, *Acta Botânica Brasileira* 16 (2002) 263-285.
- [2] A. A. Gbolade, Inventory of antidiabetic plants in selected districts of Lagos States, Nigeria, *J. Ethnopharmacol.* 121 (2009) 135-139.
- [3] D. Dun, B. S. M. P. Singh, The family Euphorbiaceae in India: a synopsis of its profile, taxonomy and bibliography/N.P. Balakrishnan, T. Chakrabarty 2007.
- [4] M. Bittner, J. Alarcón, P. Aqueveque, J. Becerra, V. Hernández, M. Hoeneisen, M. Silva, Estudio químico de especies de La familia Euphorbiaceae em Chile, *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* 46 (2001) 1-15.
- [5] G. Bagalkotkar, S. R. Sagineedu, M. S. Saad, J. Stanslas, Phytochemicals from *Phyllanthus niruri* Linn. and their pharmacological properties—a review, *J. Pharm. Pharmacol.* 8 (2006) 1559–1570.
- [6] A. R. Jassbi, Chemistry and biological activity of secondary metabolites in *Euphorbia* from Iran, *Phytochemistry* 67 (2006) 1977–1984.
- [7] B. Uzabakiliho, C. Largeau, E. Casadevall, Latex constituents of *Euphorbia candelabrum*, *E. grantii*, *E. tirucalli* and *Synadenium grantii*, *Phytochemistry* 26 (1987) 3041-3045.
- [8] A. Premaratna, M. Shadaksharaswamy, S. Nanjappa, S. Isolation, purification and properties of a lectin from the latex of *Synadenium grantii* Hook. f. ,*Indian J. Biochem. Biophys.* 18 (1981) 32-35.
- [9] A. P. Rogerio, C. R. Cardoso, C. Fontanari, M. A. Souza, S. R. Afonso-Cardoso, E. V. G. Silva, N. S. Koyama, F. L. Basei, E. G. Soares, J. B. Calixto, S. R. Stowell, M. D. Baruffi, L. H. Faccioli, Anti-asthmatic potential of a d-galactose-binding lectin Unrecorded Irritant Plant *Synadenium grantii*, *Br. J. Dermatol.* 77 (2007) 284.
- [10] R. Rajesh, A. Nataraju, C. D. R. Gowda, B. M. Frey, F. J. Frey, B. S. Vishwanath, Purification and characterization of 34-kDa, heat stable glycoprotein from *Synadenium grantii* latex: action on human fibrinogen and fibrin clot, *Biochemistry* 88 (2006) 1313–1322.
- [11] D. A. Kinghorn, Major skin-irritant principle from *Synadenium grantii*, *J. Pharm. Sci.* 69 (1980) 1446-1447.

- [12] A. K. Jager, Screening of Zulu medicinal plants for prostaglandin-synthesis inhibitors, *J. Ethnopharmacol.* 52 (1996) 95-100.
- [13] M. C. Valadares, N. C. Castro, L. C. Cunha, *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos, *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 43 (2007) 631-638.
- [14] I. A. L. Nogueira, A. B. B. Leão, M. S. Vieira, P. L. Benfica, L. C. Cunha, M. C. Valadares, Antitumoral and antiangiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax, *J. Ethnopharmacol.* 120 (2008) 474–478.
- [15] T. Govindappa, L. Govardhan, P. S. Jyothy, P.S. Veerabhadrappe, Purification and characterization of acetylcholinesterase isozymes from the latex of *Synadenium grantii* Hook. f., *Indian J. Biochem. Biophys.* 24 (1987) 209-217.
- [16] M. Menon, P. J. Vithayathil, S. M. Raju, C. S. Ramadoss, Isolation and characterization of proteolytic enzymes from the latex of *Synadenium grantii* Hook. f., *Plant. Sci.* 163 (2002) 131-139.
- [17] L. C. Cunha, F. S. Azeredo, A. C. V. Mendonça, M. S. Vieira, L. L. Pucci, M. C. Valadares, H. O. G. Freitas, A. A. S. Sena, R. S. L. Junior, Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax, *Rev. Bras. Farmacogn.* 19 (2009) 403-411.
- [18] W. B. Ortêncio, *Medicina popular do Centro-Oeste*, 2 edição. Thesaurus, Brasília, 1997.
- [19] M. A. Souza, F. A. Pereira, C. R. B. Cardoso, A. G. Silva, E. G. Silva, L. R. Andrade, J. D. O. Pena, H. Lanza, S. R. Afonso-Cardoso, Isolation and partial characterization of d-galactose-binding lectin from the Latex of *Synadenium carinatum*, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48 (2005) 705-716.
- [20] A. A. Machado, Caracterização fitoquímica e avaliação da citotoxicidade de *Synadenium carinatum* Boiss (Euphorbiaceae). Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, UFPR, 2008.
- [21] A. J. Rook, Unrecorded Irritant Plant *Synadenium grantii*, *Br. J. Dermatol.* 77 (1965) 284.
- [22] C. D. Dayanand, N. K. Murthy, Evidence of fibrinolytic protease in the latex of *Synadenium grantii* Hoof. F., *Int. J. Biotechnol. Biochem.* 6 (2010) 645-655.
- [23] H. Wagner, S. Bladt, *Plant drug analysis - A thin layer cromatography atlas* second edition. Berlin, 1996.

- [24] B. N. Meyer, N. R. Ferrigni, J. E. Putnam, L. B. Jacobsen, D. E. Nichols, J. L. McLaughlin, Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 45 (1982) 31-34.
- [25] D. J. Finney, *Probit Analysis*. Cambridge, Cambridge University Press, 1962.
- [26] W. B. Lopes, F. T. Moroni, M. I. H. Brandeburgo, A. Hamaguchi, Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais. *Revista Eletrônica Horizonte Científico* 1 (2002) 1-11.
- [27] A. L. Parra, R. S. Yhebra, I. G. Sardiñas, L. I. Buela, Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts, *Phytomedicine* 8 (2001) 395–400.
- [28] L. Hayden, G. Thomas, G. B. West, Inhibitors of gastric lesions in the rat, *J. Pharm. Pharmacol.* 30 (1978) 244-246.
- [29] C. A. Hiruma-Lima, J. S. Gracioso, J. A. Rodriguez, M. Haun, D. S. Nunes, A. R. M. Souza Brito, Gastroprotective effect of essential oil from *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae), *J. Ethnopharmacol.* 69 (2000) 229–234.
- [30] A. L. Ferreira, Atividade Antiulcerogênica da espécie *Anacardium humile* St. Hil. (Anacardiaceae) Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Unicamp, 2005.
- [31] G. B. Glavin, S. Szabo, Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies, *FASEB J* 6 (1992) 825-831.
- [32] K. S. L. Mota, J. C. L. R. Pita, E. C. Estevam, V. M. Medeiros, J. F. Tavares, M. F. Agra, M. F. F. M. Diniz, M. S. Silva, L. M. Batista, Evaluation of the toxicity and antiulcerogenic activity of the ethanol extract of *Maytenus obtusifolia* Mart. Leaves, *Rev. Bras. Farmacogn.* 18 (2008) 441-446.
- [33] M. T. Gamberini, Atividades anti-úlceras e antiácidas do extrato aquoso e frações obtidas da *Baccharis trimera* Mart. (carqueja), Dissertação de Mestrado-INFAR, USP, 1992.
- [34] C. E. P. Araújo, R. F. O. Rodrigues, F. Oliveira, L. Schreiner, Análise Preliminar da Atividade Antiulcerogênica do Extrato Hidroalcoólico de *Solanum cernuum* Vell, *Acta Pharm. Bon.* 21 (2002) 283-286.
- [35] T. Sekar, K. Francis, Some plant species screened for Energy, Hydrocarbons and Phytochemicals, *Bioresour. Technol.* 65 (1998) 257-259.

- [36] H. P. S. Makkar, K. Becker, *Jatropha curcas*, a promising crop for the generation of biodiesel and value-added coproducts, *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 111 (2009) 773-787.
- [37] P. R. Melo Reis, L. S. Andrade, C. B. Silva, L. M. M. Araújo, M. S. Pereira, F. Mrue, L. Chen-Chen, Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum*, *Braz. J. Biol.* 70 (2010) 189-194.
- [38] R. Bagavathi, B. Sorg, E. Hecher, Tiglane-type diterpene esters from *Synadenium grantii*, *Planta Med.* 54 (1988) 506-510.
- [39] F. J. Evans, *Naturally occurring phorbol esters*. Boca Raton, FL: CRC Press 1986.
- [40] A. L. T. Ruiz, E. G. Magalhães, A. F. Magalhães, A. D. Faria, M. C. F. Amaral, D. R. Serrano, E. M. Zanotti-Magalhães, L. A. Magalhães, Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.* 15(2005 b) 98-102.
- [41] J. L. McLaughlin, C. J. Chang, D. L. Smith, Bench top “bioassay for the discovery of bioactive natural products: an update”. In: *Studies in Natural Products Chemistry* (Edited by: AU Rahman), 1991, 383-409.
- [42] M. M. Mackeen, A. M. Ali, N. H. Lajis, K. Kawazu, Z. Hassan, M. Amran, M. Habsah, L. Y. Mooi, S. M. Mohamed, Antimicrobial, antioxidant, antitumour- promoting and cytotoxic activities of different plant part extracts of *Garcinia atroviridis* Griff. Ex.T. Anders. J. *Ethnopharmacol.* 72 (2000) 395-402.
- [43] Y. Morimoto, K. Shimohara, S. Oshira, S. Takayuki, Effects of the new anti-ulcer agent KB 5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of trepene and cimetidine. *Jpn. J. Pharmacol.* 57 (1991) 495-505.
- [44] F. Borrelli, A. A. Izzo, The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies, *Phytother. Res.* 14 (2000) 581-591.
- [45] M. J. Alcaraz, J. R. Hoult, Actions of flavonoids and the novel anti-inflammatory flavone, hypolaetin-8-glucoside, on prostaglandin biosynthesis and inactivation, *Biochem. Pharmacol.* 34 (1985) 2477-2482.
- [46] C. Bronner, Y. Landry, Kinetics of the inhibitory effect of flavonoids on histamine secretion from mast cells, *Agents Actions* 16 (1985) 147-151.
- [47] W. Beil, C. Birkholz, K. F. Sewing, Effects of flavonoids on parietal cell acid secretion, gastric mucosal prostaglandin production and *Helicobacter pylori* growth, *Arzneim. Forsch.* 45 (1995) 697-700.

- [48] H. Matsuda, Y. Li, T. Murakami, J. Yamahara, M. Yoshikawa, Protective effects of oleanolic acid oligoglycosides on ethanol- or indomethacin-induced gastric mucosal lesion in rats, *Life Science* 63 (1998) 245-50.
- [49] C. N. Aguwa, C. O. Okunji, Gastrointestinal Studies of *Pyrena canthastaudtii* Leaf, *J. Ethnopharmacol.* 15 (1986) 45-55.
- [50] C. N. Aguwa, Gastrointestinal effects of the extracts of *Rhigio caryaracemifera* (Menispermaceae), *Gen. Pharmacology* 16 (1985) 387-90.
- [51] M. Scarlat, V. Sandor, M. Tamas, B. Cuparencu, Experimental anti-ulcer activity of *Veronica officinalis* L. extracts, *J. Ethnopharmacol.* 13 (1985) 157-6

Tables

Table 1. Biochemical parameters of female rats obtained after treatment with single dose (v.o.) of the latex and diluted latex of *S. grantii* (0.6 g/rat)(Mean $\pm$ SD).

Biochemical Parameters	Control	Latex (EB1)	Diluted latex (EB3)	<i>P</i>
Albumin (mg/dL)	3.35 $\pm$ 0.19	3.47 $\pm$ 0.30	3.00 $\pm$ 0.20	>0.05
Creatinine (mg/dL)	0.81 $\pm$ 0.18	0.62 $\pm$ 0.17	0.63 $\pm$ 0.09	>0.05
PCR (U/L)	5.9 $\pm$ 0.17	10.63 $\pm$ 3.66	17.45 $\pm$ 17.16	>0.05
AST (U/L)	100.40 $\pm$ 11.24	194.30 $\pm$ 13.72*	101.80 $\pm$ 14.61	<0.02
ALT (U/L)	20.40 $\pm$ 5.41	36.00 $\pm$ 10.37*	18.17 $\pm$ 6.64	<0.01

*Versus Control, Student's t-test

Table 2. Blood leukocytes of female rats obtained after treatment with single dose (v.o.) of the latex and diluted latex of *S.grantii* (0.6 g/rat)(Mean $\pm$ SD).

Cells mm ³	Control	Latex (EB1)	Diluted latex (EB3)	<i>P</i>
Lynfocytes	57.50 $\pm$ 7.36	43.5 $\pm$ 3.94*	50.33 $\pm$ 5.89*	<0.05
Monocyte	3.16 $\pm$ 2.85	3.83 $\pm$ 1.94	2.16 $\pm$ 1.47	>0.05
Segmented	37.50 $\pm$ 7.37	38.83 $\pm$ 11.20	45.67 $\pm$ 3.88	>0.05
Eosinophile	3.00 $\pm$ 8.39	56.67 $\pm$ 11.45*	52.00 $\pm$ 4.19*	<0.001
Basophile	0.00 $\pm$ 0.00	0.33 $\pm$ 0.52	0.17 $\pm$ 0.41	>0.05

* Versus Control, ANOVA, Tukey test

FIGURE 1

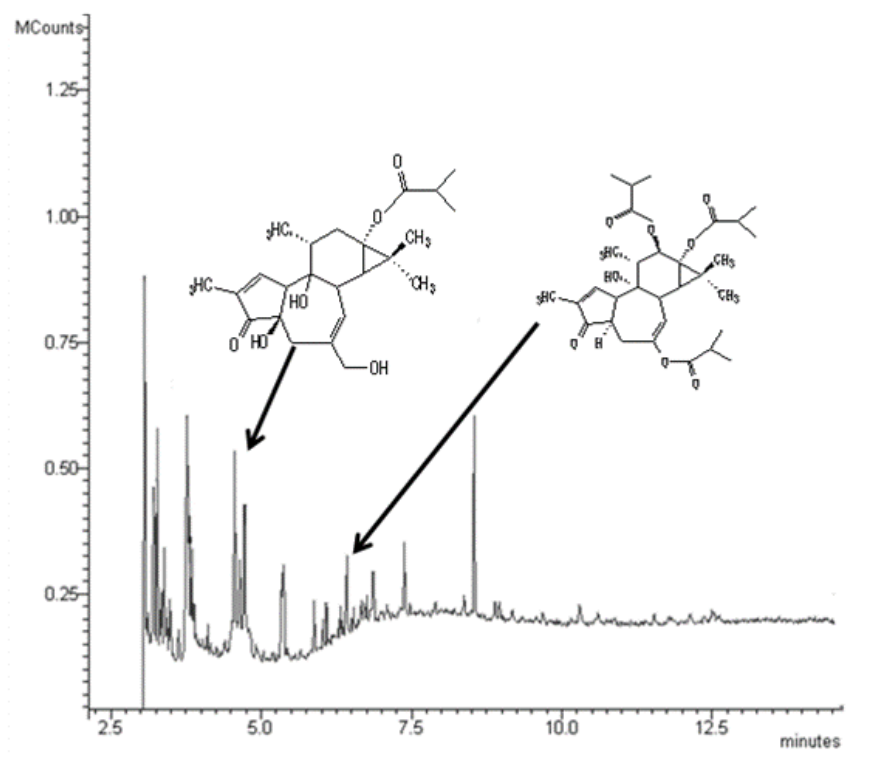


FIGURE 2

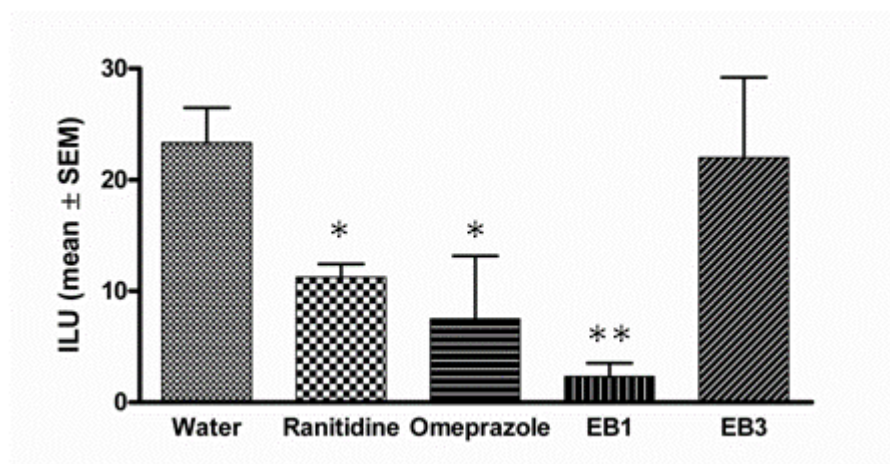


FIGURE 3

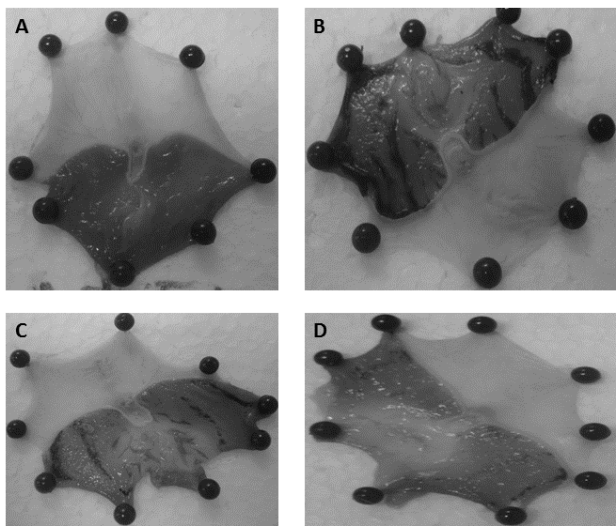


FIGURE 4

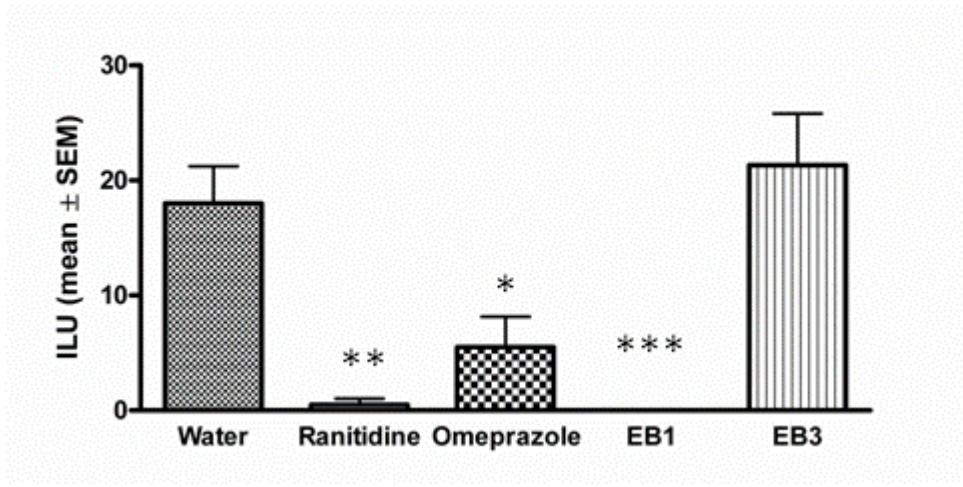
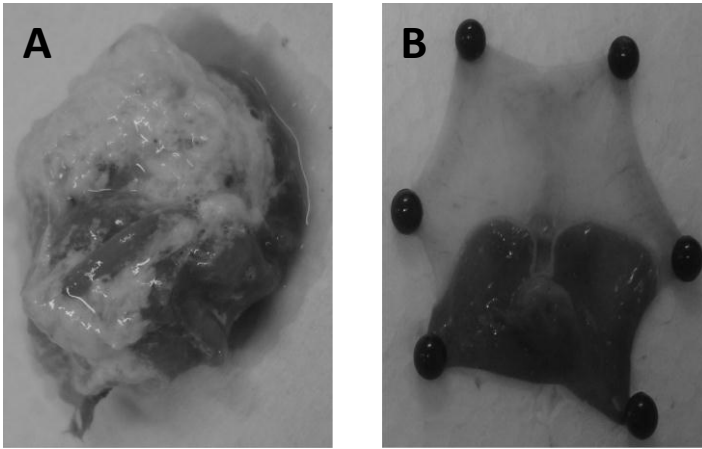


FIGURE 5

LEGENDAS

Fig.1. Estruturas dos ésteres de forbol identificados em *S. grantii*. CG-EM. tr: 4,76 min .- 12-deoxi-forbol-13-isobutirato; tr: 6,05 min .- 12,13,20-triacetil-4deoxiforbol. A temperatura inicial da coluna foi de 50 ° C, a qual foi mantida por dois minutos e foi então programado para aumentos de 20 ° C / min. até atingir 90 ° C. Depois de um minuto, houve um aumento de 5 ° C / min. até atingir um máximo de 280 ° C.

Fig.2. Efeito do látex e do diluído do látex de *S. grantii* no índice de lesão ulcerativa (ILU), induzida por etanol. Os resultados são expressos pela média $\pm$ SEM de seis animais. As análises estatísticas foram realizadas utilizando ANOVA passou pelo teste de Tukey. * $P < 0,05$ em comparação com a água (controle negativo), ** $P < 0,01$ em comparação com a água (controle negativo).

Fig.3. Imagens fotográficas dos estômagos dos ratos após o tratamento, avaliado pelo modelo de indução de úlcera por indometacina (40mg/kg -6 horas). A) estômago do rato tratados com látex; B) estômago do rato tratados com látex diluído; C) estômago do rato tratados com água (controle negativo) e D) estômago do rato tratado com omeprazol (controle positivo).

Fig.4. Efeito do látex e do látex e diluída de *S. grantii* no índice de lesão ulcerativa (ULI), induzida por indometacina. Os resultados são expressos pela média $\pm$ SEM de seis animais. As análises estatísticas foram realizadas utilizando ANOVA passou pelo teste de Tukey. * $P < 0,05$, * $P < 0,01$ e * $P < 0,001$ em comparação com a água (controles negativos).

Fig.5. Imagens fotográficas do estômago do rato com látex (A) e após a retirada do material (B)

Figures Captions

Fig.1.Structures of the phorbol esters identified in *S.grantii*. CG-MS. tr : 4.76 min.-12-deoxyphorbol-13-(2-metilpropionate);tr:6.05 min.- phorbol 12,13,20-triacetate.The initial column temperature was 50° C, which was maintained for two minutes and was then scheduled to increases of 20°C/min. until reaching 90° C. After one minute, there were increases of 5°C/min. until reaching a maximum of 280°C.

Fig.2. Effect of the latex and of the diluted latex of *S. grantii* in the ulcerative lesion index (ULI), induced by ethanol. The results are expressed by mean $\pm$ SEM for six animals. The statistical analyses were accomplished using ANOVA proceeded by the Tukey test. *P <0.05 in comparison to the water (it controls negative), **P <0.01 in comparison to the water (it controls negative).

Fig.3. Photographic images of the stomachs of the rats after treatment, evaluated by the model of ulcer induction by indomethacin (40mg/kg -6 hours). A) Stomach of the treated mouse with latex; B) Stomach of the treated mouse with diluted latex; C) Stomach of the treated mouse with water (negative control) and D) Stomach of the treated mouse with omeprazole (positive control).

Fig.4. Effect of the latex and of the diluted latex of *S. grantii* in the ulcerative lesion index (ULI), induced by indomethacin. The results are expressed by mean $\pm$ SEM for six animals. The statistical analyses were accomplished using ANOVA proceeded by the Tukey test. *P <0.05, *P < 0.01 and * * *P < 0.001 in comparison to the water (it controls negative).

Fig.5. Photographic images of the stomach of the mouse with latex (A) and after the retrieval of the material (B)

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O screening fitoquímico preliminar de *Synadenium grantii* indicou a presença de vários grupos de metabólitos secundários que nos permitiu inferir que a atividade antiulcerogênica determinada, pode estar relacionada à presença de compostos fenólicos e insaponificáveis neste material vegetal. Além disso, a análise por cromatografia gasosa destacou a presença de ésteres de forbol que, de acordo com a literatura, apresentam atividade anti-cancerígena. Tais resultados devem ser avaliados em modelos anti-cancerígenos, uma vez que esta planta também é utilizada na cultura popular para o tratamento do câncer.

Os dados obtidos com uma dose única nos experimentos antiulcerosos sugerem que o uso do látex de *S. grantii* pode potencialmente apresentar um efeito gastroprotetor em relação aos modelos avaliados. No entanto, outros estudos ainda devem ser realizados utilizando-se diferentes modelos pré-clínicos que permitem a avaliação possível da ação crônica deste material para corroborar os dados encontrados.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, H. N. et al. Utilização da Maniçoba (*Manihot glaziovii* Mull Euphorbiaceae) na caça de aves em Sertânia-PE. **Revista Biologia e Ciências da Terra**, Pernambuco, v. 4, 2004.

ALBUQUERQUE, U.P.; Andrade, L.H.C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no estado de Pernambuco, nordeste do Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v.16, p. 263-285, 2002.

BAGAVATHI, R; SORG,B.;Hecker,E. Tiglane-type diterpene esters from *Synadenium grantii*. **Planta Medica**,v. 54, p.506-510,1988.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Natural products with antileprotic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**,v.17, 141-148, 2007.

BELTRAME, F. L. et al. A validated higher-performance liquid chromatography method for quantification of cinchonain Ib in bark and phytopharmaceuticals of *Trichilia catigua* used as Catuaba. **Journal of Chromatography A**,v. 1119, p.257–263, 2006.

BIGHETTI, E.A. **Atividade antiulcerogênica, isolamento e identificação dos princípios ativos da *Mikania laevigata* Schultz.Bip.**152 f. Tese (Doutorado em Clínica Médica) -Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas,Campinas,2004.

BITTNER, M. et al. Estudio quimico de especies de La família Euphorbiaceae em Chile. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**, v.46, p.1-15, 2001.

BRANDÃO, H.N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos e antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v.33, p. 1359-1369, 2010.

BRANDÃO,M.G.L. et al. Traditional uses of American plant species from the 1st edition of Brazilian official Pharmacopoeia, **Revista Brasileira de Farmacognosia**,v. 19 ,p. 478-487, 2009.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v.33, p. 229-239,2010.

BONAMIN, F. **Atividade antiulcerogênica e avaliação dos mecanismos de ação antiulcerogênicos do β -Mirceno**, 2010. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2010.

CARVALHO, J. E. Multiciência: construindo a história dos produtos naturais, **Química Nova**, v.7, 2006.

CAVALCANTE, M.F. et al. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach, **Química Nova**, v. 23, 2001.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p. 99-105, 1998.

Colombo. **Introdução à fitoterapia: utilizando adequadamente as plantas medicinais**. Colombo: Herbarium Lab. Bot. Ltda. 92p, 2008.

COUTINHO, E.M.O. **Estudo fitoquímico e de atividade biológica de espécies de *Solanum***. (Solanaceae). 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

CUNHA, L.C. et al. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 403-411, 2009.

DI CARLO, G. et al. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Science**, v. 65, p. 337–353, 1999.

DIAS, A. et al. Testes de Toxicidade em *Artemia salina*: contaminantes (K_2CrO_7) e efluentes químicos (tratados e não tratados). Universidade do Algarve, 2002.

DO CAMPO, P. et al. Eritrodermia secundaria a planta productora de látex (*Synadenium grantii*). **Archivos Argentinos de Pediatría**, v. 108, p. 126-129, 2010.

DUN, D.; SINGH, B.S.M.P. **The family Euphorbiaceae in India: a synopsis of its profile, taxonomy and bibliography**/N.P. Balakrishnan, T. Chakrabarty, p. 500, 2007.

EBUEHI, O. A. T. et al. Phytochemical, nutritive and anti-nutritive composition of cassava (*Manihot esculenta* L.) tubers and leaves. **Nigerian Food Journal**, v. 23, p. 40-46, 2005.

FERREIRA, L. S.; MARSOLA, F. J.; TEIXEIRA, S. P. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Dieffenbachia picta* Schott (Araceae) com ênfase na distribuição de cristais, laticíferos e grãos de amido. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 664-670, 2006.

FERREIRA, A.L. **Atividade Antiulcerogênica da espécie *Anacardium humile* St. Hil. (Anacardiaceae)**. 2005. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)- Faculdade de Farmácia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

FERREIRA, L.S. **Análise da variação populacional e caracterização dos metabólitos secundários presentes nas folhas de *Lychnophora granmongolense* (Duarte) Semir & Leitão Filho**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de São Paulo, 2010.

GBOLADE, A.A. Inventory of antidiabetic plants in selected districts of Lagos States. **Journal of Ethnopharmacology**, v.121, p. 135-139, 2009.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.

GRUPO, L. R. P. 1998. **Contribuição ao estudo anatômico, fitoquímico e farmacológico de *Synadenium carinatum* Hook f. (Euphorbiaceae)**. 1998. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1998.

HIRUMA-LIMA, C.A., et al. Gastroprotective effect of essential oil from *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.69, p. 229–234, 2000.

HO, K.Y. et al. Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitis-idaea* L. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, p. 187-19, 2001.

KINGHORN, D. A. Major skin-irritant principle from *Synadenium grantii*. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 69, p. 1446-1447, 1980.

LAPA, A.J. et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: Simões, C.M.O, Farmacognosia – da planta ao medicamento. Porto Alegre. v.11, p. 247-267, 2003.

LUNA, J.S, et al. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97,p. 199-206, 2005.

MACHADO, A.A. **Caracterização fitoquímica e avaliação da citotoxicidade de *Synadenium carinatum* Boiss (Euphorbiaceae)**. 2008. Dissertação. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

MACHADO,M.M. **Perfil fitoquímico e avaliação dos efeitos biológicos e imunológicos *in vitro* de *Euphorbia tirucalli* L.**2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Santa Maria-RS, 2007.

MACIEL, M.A.M; PINTO, A.C; VEIGA Jr, V.F. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos interdisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MARIZ,S.R. et al. Possibilidades terapêuticas e risco toxicológico de *Jatropha gossypifolia* L.: uma revisão narrativa. **Revista Brasileira Plantas Medicinais**,v.12,p. 346-357, 2010.

MELO-REIS,P.R. et al. Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* .**Brazilian Journal of Biology** ,v. 70,p. 189-194, 2010.

MEYER, B.N.et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**,v. 45, p. 31-34, 1982.

MICHELIN, D. C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia** ,v. 15, p. 316-320, 2005.

MIRANDA, M.C. **Atividade antiulcerogênica de plantas nativas do cerrado do Estado de São Paulo - Pertencentes ao gênero *Indigofera***.2006.Tese. (Doutorado em Farmacologia). Universidade Estadual de Campinas, Campinas,2006.

NASCIMENTO, G. G. F.et al . Antibacterial activity of plants extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 247-256, 2000.

NOGUEIRA, I.A.L.et al. Antitumoral and antiangiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax, **Journal of Ethnopharmacology** v. 120,p. 474–478, 2008.

OLIVEIRA-FILHO, E.C, PAUMGARTTEN, F.J.R. Toxicity of *Euphorbia milii* latex and niclosamide to snails and nontarget aquatic species, **Ecotox Environ Safe**,v. 46,p. 342-350, 2000.

OMS- Organización Mundial de la Salud. Pautas para a avaliação de medicamentos herbarios. Genebra, 1991. Disponível em <http://www.who.it>. Acesso em 05/05/10.

ORTÊNCIO, W.B. **Medicina popular do Centro-Oeste**. 2nd edition. Thesaurus, Brasília, 322p, 1997.

PREMARATNA, A. SHADAKSHARASWAMY, M., NANJAPPA, S. Isolation, purification and properties of a lectin from the latex of *Synadenium grantii* Hook. f.**Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**,v.18,p. 32-35, 1981.

PREMARATNA, A. et al. Some Biological properties of *Synadenium grantii* Lectin, **Indian Journal of Pathology & Microbiology**, v. 27, p. 91-97, 1984.

RAJESH, R., et al. Purification and characterization of 34-kDa, heat stable glycoprotein from *Synadenium grantii* latex: action on human fibrinogen and fibrin clot, **Biochimie** v. 88, p. 1313–1322, 2006.

RAO, V. S.,et al.Dragon's blood from *Croton urucurana* (Baill.) attenuates. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113,p. 357-360,2007.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon** , v. 39, p. 603–613, 2001.

RODRIGUES, E.; ALMEIDA,J.M.D.; PIRES,J.M.,2010. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos caboclos do Parque Nacional do Jaú (AM) como potenciais analgésicas. Parte I, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, p.810-821,2010.

ROGERIO, A.P., et al. Anti-asthmatic potential of a d-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex, **Glycobiology** , v.17, p. 795-804, 2007.

ROSSATO, M. et al. Avaliação do óleo essencial de *Aloysia sellowii* (Briquet) Moldenke (Verbenaceae) do sul do Brasil, **Química Nova**, v. 29, p. 200-202, 2006.

RUIZ, A.L.T.G. **Estudo fitoquímico de algumas espécies do gênero Eleocharis R. Br. (Cyperaceae): isolamento, elucidação estrutural e atividade biológica.** 2003. Tese (Doutorado em Química)- Instituto de Química) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

SARTORI, M.R. **Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores de *Acmela brasiliensis* Spreng, (*Wedelia paludosa*) (Asteraceae).** 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade do Vale do Itajaí, 2005.

SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; FARIA, A. R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p. 455-465, 2007.

SIANI, A. C.; MICHILES, E. Medicamentos de Origem Vegetal: Cenário atual de desenvolvimento, produção e mercado. **Fármacos e Medicamentos**, v.37, p. 14-18, 2005.

SILVA, N.L.A.; MIRANDA, F.A.A.; CONCEIÇÃO, G.M. 2010. Triagem fitoquímica de plantas de Cerrado, da área de proteção ambiental Municipal do Inhamum, Caxias- Maranhão. **Scientia Plena**, v. 6, 2010.

SIMÕES, C. M. O.; PETROVICK, V.P.R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento.** 2ed. rev. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2003.

SOUZA, M.A., et al. Isolation and partial characterization of d-galactose-binding lectin from the latex of *Synadenium carinatum*, **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 705-716, 2005.

SOUZA, M.V.N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**, v. 27, p. 308-312, 2004.

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

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

TREVISAN, R.R. **Estudo Fitoquímico e Avaliação das Atividades Biológicas das cascas de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent Ulmaceae**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Setor de Ciências da Saúde , Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

VALADARES, M.C.; CASTRO, N.C.; CUNHA, L.C. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos, **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 631-638, 2007.

VILLAS BÔAS, G. K.; GADELHA, C. A. G. Oportunidades na indústria de medicamentos e a lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para a discussão de uma política nacional, **Cadernos de Saúde Pública** ,v. 23, 2007.

WATSON, L.; DALLWITZ, M.J. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval, 2008. Versão: 25/11/2008. <http://delta-intkey.com>.

WOLFE, M.M., SOLL, A.H. The physiology of gastric acid secretion. **New England Journal of Medicine**, v. 319, p. 1707-1715, 1988.

YARIWAKE, J. et al. Variabilidade sazonal de constituintes químicos (triterpenos, flavonoides e polifenóis) das folhas de *Maytenus aquifolium* Mart. (Celastraceae), **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, p.162-168, 2005.