

ASPECTOS FARMACOLÓGICOS DAS NOVAS NORCUCURBITACINAS GLICOSÍ-
DICAS DE WILBRANDIA (cf) VERTICILLATA

Fernanda Regina de Castro Almeida

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUA-
ÇÃO EM FARMACOLOGIA COMO REQUISITO PARCIAL PARA A OBTENÇÃO
DO GRAU DE MESTRE.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA - 1989

Esta Dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se a disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta Dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Fernanda Regina de Castro Almeida

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 18/08/89

Prof. Vietla Satyanarayana Rao
Orientador da Dissertação

Profa. Glauce Socorro de Barros Viana

Prof. Manassês Claudino Fonteles

A Deus, fonte de toda existência.

Aos meus pais (Pedro e Waldenira)
e aos meus irmãos (Fátima e Carlos)

Ao Marcus Vinícius, pelo
amor e compreensão.

Aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Vietla Satyanarayana Rao, meu mestre, orientador e amigo, pela sua inestimável e sincera orientação na área científica e humana, a quem todas as palavras de agradecimento tornam-se insignificantes.

À Profa. Maria Elisa de Oliveira Matos, pela obtenção do material estudado e pela dedicação durante a realização do trabalho.

Ao Prof. Francisco José de Abreu Matos, um grande nome na área de Plantas Medicinais, pelas valiosas sugestões quanto à parte botânica, e pela amizade desinteressada.

À Profa. Rita Maria Dantas Nogueira, por me ter iniciado no campo científico e pela sua amizade.

À Profa. Maria Gláucia Teixeira Gadelha pela amizade e colaboração.

À Dra. Glauce Socorro de Barros Viana e ao Dr. Manassés Claudino Fonteles, pelo apoio, amizade e incentivo.

Ao Prof. Francisco Ruy Capaz, que gentilmente me orientou quanto à elaboração dos gráficos.

Ao Prof. Manoel Odorico de Moraes Filho, pela cooperação na fase final do trabalho.

À Srta. Adelcir Oliveira Matos, sempre paciente e atenciosa para comigo, pelo excelente trabalho datilográfico

co realizado.

Aos demais Professores e Funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

À Bibliotecária Norma Carvalho Linhares, pela revisão das referências bibliográficas.

À Profa. Silene Carneiro do Nascimento, do Departamento de Antibióticos da UFPE pela colaboração no teste de citotoxicidade.

Carinhosamente, o meu agradecimento aos colegas do Curso de Pós-Graduação, em especial aos da minha turma, que caminharam sempre ao meu lado, numa troca mútua de consideração e amizade.

De forma especial, às amigas Cléa e Marta pelo incentivo e amizade.

Ao CNPq e FINEP pelos recursos financeiros indispensáveis à realização de qualquer trabalho científico.

SUMÁRIO

	página
<u>RESUMO</u>	xvii
<u>ABSTRACT</u>	xx
1 - <u>INTRODUÇÃO</u>	1
1.1 - <u>Generalidades</u>	1
1.2 - <u>A planta</u>	7
1.2.1 - <u>Descrição botânica e distribuição geográfica</u>	7
1.2.2 - <u>Uso popular</u>	8
1.2.3 - <u>As Cucurbitacinas</u>	10
1.2.4 - <u>Farmacologia das Cucurbitacinas</u>	14
1.3 - <u>Objetivos</u>	14
2 - <u>MATERIAL</u>	16
2.1 - <u>A planta</u>	16
2.2 - <u>Animais experimentais</u>	16
2.3 - <u>Soluções fisiológicas</u>	17
2.4 - <u>Reagentes e corantes</u>	17
2.5 - <u>Drogas</u>	18
3 - <u>MÉTODOS</u>	19
3.1 - <u>Purificação do extrato etanólico e isolamento de Wv_1 e Wv_2</u>	19

	página
3.2 - <u>Experimentos "in vivo"</u>	27
3.2.1 - Toxicidade aguda e efeitos comportamentais .	27
3.2.2 - Ação antiinflamatória	28
3.2.2.1 - Inflamação aguda - edema de pata induzido por carragenina em ratos	28
3.2.2.2 - Lesão granulomatosa induzida por carrage- nina em ratos	31
3.2.2.3 - Artrite induzida por formaldeído em ratos.	31
3.2.2.4 - Ação sobre a permeabilidade capilar	32
3.2.3 - Ação antifertilidade	33
3.2.3.1 - Efeito sobre o ciclo estral em camundongos	33
3.2.3.2 - Efeito sobre a implantação do ovo fertili- zado em ratos	33
3.2.3.3 - Efeito abortivo em ratos	34
3.2.4 - Ação estrogênica ou anti-estrogênica	35
3.2.5 - Ação laxativa	35
3.3 - <u>Experimentos "in vitro"</u>	36
3.3.1 - Reto abdominal de sapo	36
3.3.2 - Útero isolado de rata não prenha	37
3.3.3 - Íleo isolado de cobaia	38
3.4 - <u>Métodos estatísticos</u>	40
4 - <u>RESULTADOS</u>	41
4.1 - <u>Experimentos "in vivo"</u>	41

	página
4.1.1 - Toxicidade aguda e efeitos comportamentais	41
4.1.2 - Ação antiinflamatória	42
4.1.2.1 - Inflamação aguda - edema de pata induzi- do por carragenina em ratos	42
4.1.2.2 - Lesão granulomatosa induzida por carrage- nina em ratos	42
4.1.2.3 - Artrite induzida por formaldeído em ra- tos	45
4.1.2.4 - Ação sobre a permeabilidade capilar	45
4.1.3 - Ação antifertilidade	49
4.1.3.1 - Efeito sobre o ciclo estral em camundon- gos	49
4.1.3.2 - Efeito sobre a implantação do ovo ferti- lizado em ratos	51
4.1.3.3 - Efeito abortivo em ratos	51
4.1.4 - Atividade estrogênica ou anti-estrogênica	53
4.1.5 - Ação laxativa	57
4.2 - <u>Experimentos "in vitro"</u>	57
4.2.1 - Reto abdominal de sapo	57
4.2.2 - Útero isolado de rata não prenha	60
4.2.3 - Íleo isolado de cobaia	60
4.2.4 - Citotoxicidade	66
5 - <u>DISCUSSÃO</u>	68
6 - <u>CONCLUSÕES</u>	85
7 - <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	87

8 - Atividade estrogênica ou anti-estrogênica da fração purificada (FP) de <u>Wilbrandia (cf) verticillata</u> em ratos	56
9 - Efeito laxante da fração purificada (FP) de <u>Wilbrandia (cf) verticillata</u> e da Isocucurbitacina B em camundongos	58
10 - Efeito da fração purificada (FP) de <u>Wilbrandia (cf) verticillata</u> sobre as contrações induzidas por agonistas em útero isolado de rata ...	64

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	página
I - Rizoma de <u>Wilbrandia</u> (cf) <u>verticillata</u>	9
II - Cucurbitacinas clássicas isoladas de algumas plantas	11
III - Cucurbitacinas clássicas isoladas de algumas plantas (continuação)	12
IV - Estrutura das novas norcucurbitacinas aromáticas isoladas de <u>Wilbrandia</u> (cf) <u>verticillata</u> e de <u>Fevillea cordifolia</u>	13
V - Purificação do extrato etanólico e isolamento de wv_1 e wv_2 de <u>Wilbrandia</u> (cf) <u>verticillata</u>	20
VI A - Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio de wv_1	21
VI B - Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio de wv_2	22
VI C - Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C de wv_1	23
VI D - Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C de wv_2	24
VI E - Espectro na região do infravermelho de wv_1 ..	25
VI F - Espectro na região do infravermelho de wv_2 ..	26
VII - Pletismógrafo	30
VIII - Efeito da fração purificada de <u>Wilbrandia</u>	

FIGURA

página

	(cf) <u>verticillata</u> sobre a artrite induzida por formaldeído em ratos	47
IX -	Efeito da fração purificada de <u>Wilbrandia</u> (cf) <u>verticillata</u> sobre a gravidez em ratos, tratados do 9º ao 13º dia da gestação	55
X -	Efeito da fração purificada de <u>Wilbrandia</u> (cf) <u>verticillata</u> sobre as contrações produzidas por cloreto de potássio, acetilcolina e cafeína em reto abdominal de sapo	59
XI -	Efeito da fração purificada de <u>Wilbrandia</u> (cf) <u>verticillata</u> sobre as contrações evocadas por serotonina e bradicinina em útero isolado de rata	61
XII -	Efeito da fração purificada de <u>Wilbrandia</u> (cf) <u>verticillata</u> sobre as respostas* contráteis induzidas por cloreto de bário e ocitocina em útero isolado de rata	62
XIII -	Efeito da fração purificada de <u>Wilbrandia</u> (cf) <u>verticillata</u> sobre as respostas contráteis provocadas por cloreto de potássio e acetilcolina em útero isolado de rata	63
XIV -	Efeito da fração purificada (IC_{50}) de <u>Wilbrandia</u> (cf) <u>verticillata</u> sobre as respostas contráteis evocadas por acetilcolina, serotonina, bradicinina, ocitocina e cloreto de bário em útero isolado de rata	65
XV -	Efeito da fração purificada de <u>Wilbrandia</u>	

FIGURA

página

(cf) <u>verticillata</u> sobre as contrações induzidas pela histamina em íleo isolado de cobraia	67
--	----

RESUMO

Uma fração purificada do rizoma de Wilbrandia (cf) verticillata (cabeça de negro) contendo duas novas norcucurbitacinas glicosídicas denominadas Wv_1 e Wv_2 , foi avaliada quanto a uma possível ação antiinflamatória, antifertilidade, laxativa e citotóxica.

Em camundongos, os valores para a DL_{50} da fração, quando da administração intraperitoneal e oral, foram respectivamente, 345 ± 11 e 975 ± 99 mg/kg, enquanto que, em células KB, a mesma demonstrou baixa citotoxicidade, com DE_{50} de 12 μ g/ml.

Em modelos de inflamação utilizando ratos, a fração exibiu uma atividade antiinflamatória significativa ($p < 0,05$) por via oral. O edema de pata induzido por carragenina foi inibido em 25,4 e 39,5% nas doses de 100 e 200 mg/kg, respectivamente. Numa dose de 100 mg/kg, a lesão granulomatosa induzida por carragenina sofreu uma inibição percentual de 45,8 enquanto que a artrite induzida por formaldeído foi reduzida em 63,4% no décimo dia de observação. Paralelamente, a permeabilidade capilar induzida por ácido acético em camundongos, foi inibida efetivamente e de maneira dose-dependente. A redução foi de 69,1 e 90,4% em relação às doses de 50 e 100 mg/kg, respectivamente.

Numa dose oral de 50 mg/kg, a fração demonstrou ação laxante em camundongos, através da produção de fezes

úmidas, revelando um efeito comparável ao da Isocucurbitacina B numa dose de 0,5 mg/kg po.

Numa dose de 100 mg/kg po, a fração prolongou a fase diestro do ciclo estral de camundongos, sendo esse efeito reversível com a descontinuação do tratamento, sugerindo uma possível atividade anti-ovulatória. Quando administrada a ratos, nas doses de 100 e 200 mg/kg po, do 1º ao 7º dia da gravidez, a fração diminuiu o número de implantações fetais. A diminuição percentual foi de 33,3 e 66,6 respectivamente. Em doses similares, a fração não exibiu qualquer ação abortiva quando administrada do 9º ao 13º dia da gravidez. Entretanto, numa dose de 200 mg/kg, observou-se um retardo no crescimento fetal. A 100 mg/kg po, a fração não demonstrou nenhuma propriedade estrogênica ou anti-estrogênica em ratos imaturos.

Em útero isolado de rata, a fração (0,05 a 0,4 mg/ml) inibiu as respostas contráteis evocadas por acetilcolina ($5,5 \times 10^{-6} M$), bradicinina ($1,89 \times 10^{-7} M$), ocitocina ($2,98 \times 10^{-12} M$), serotonina ($2,84 \times 10^{-6} M$), cloreto de bário ($1,5 \times 10^{-3} M$) e cloreto de potássio ($1 \times 10^{-4} M$) de modo concentração-dependente. A ordem de inibição para os diferentes agonistas foi BRADICININA OCITOCINA ACETILCOLINA CLORETO DE BÁRIO SEROTONINA. Quando a concentração de cálcio no líquido nutritivo foi elevada de 2 a 3 vezes, uma clara tendência à reversão do efeito inibitório foi observada. Em reto abdominal de sapo, a fração produziu uma inibição concentração-dependente da resposta à acetilcolina ($1,1 \times 10^{-7} M$), mas não alterou as respostas evocadas pelo cloreto

de potássio ($4 \times 10^{-4} \text{M}$) nem pela cafeína ($3 \times 10^{-2} \text{M}$). E, em íleo isolado de cobaia, a fração não demonstrou efeito significativo sobre as respostas à histamina ($3,45 \times 10^{-7} \text{M}$).

Os possíveis mecanismos envolvidos nas propriedades farmacológicas apresentadas pela fração foram discutidos em relação aos efeitos bioquímicos conhecidos das cucurbitacinas em geral. O estudo fornece uma base científica para o uso tradicional do rizoma de Wilbrandia (cf) verticillata na artrite e doenças relacionadas, sugerindo uma fonte alternativa para a terapêutica antiinflamatória atual.

Os efeitos antiimplantação e anti-ovulatório observados, merecem estudos posteriores, no sentido de possibilitar o desenvolvimento de uma droga contraceptiva oral de origem vegetal.

ABSTRACT

The purified fraction of the rhizome of Wilbrandia (cf) verticillata (cabeça de negro) that contained two novel norcucurbitacin glucosides and identified as Wv₁ and Wv₂ was investigated for its possible anti-inflammatory, antifertility, laxative and cytotoxic effects.

In mice, the LD₅₀ values for the fraction by ip and oral routes were 345 ± 11 and 975 ± 99 mg/kg respectively while in KB cell lines, it demonstrated low cytotoxicity with an ED₅₀ of 12 µg/ml.

In rat models of inflammation, the fraction demonstrated significant (p = 0,05) anti-inflammatory activity. The carrageenan-induced paw edema was inhibited by 25,4 and 39,5% at doses of 100 and 200 mg/kg respectively. At 100 mg/kg, carrageenan-induced granulomatous lesion was inhibited by 45,82% where as the formaldehyde-induced arthritis was suppressed on the tenth day of observation by 63,42%. Besides, the capillary permeability induced by acetic acid in mice was effectively reduced in a dose dependent manner. The reduction was 69,11 and 90,36% for the respective doses of 50 and 100 mg/kg po.

The fraction at an oral dose of 50mg/kg exhibited laxative property by promoting wet faeces and its effect was comparable to 0,5 mg/kg of Isocucurbitacin B.

At 100 mg/kg po, the fraction prolonged the diestrus phase of the reproductive cycle in mice but this effect was however, found to be reversible upon discontinuation of medication, thus suggesting a possible anti-ovulatory activity of it. When administered orally to rats on days 1 to 7 of pregnancy, it decreased the number of fetal implantations at doses of 100 and 200 mg/kg. The extent of decrease was 33,3 and 66,6% for the respective doses. At similar doses, the fraction did not exhibit any abortifacient property, when treated on days 9-13 of pregnancy. At 200 mg/kg dose, it however, impaired fetal growth. The fraction (100 mg/kg po) was found to be devoid of either estrogenic or antioestrogenic property in immature rats.

In isolated rat uterus, the fraction (0,05-0,4 mg/ml) inhibited the contractile responses evoked by acetylcholine ($5,5 \times 10^{-6} \text{ M}$), bradykinin ($1,89 \times 10^{-7} \text{ M}$), oxytocin ($2,98 \times 10^{-12} \text{ M}$), BaCl_2 ($1,5 \times 10^{-3} \text{ M}$), serotonin ($2,84 \times 10^{-6} \text{ M}$) and KCl_2 ($1 \times 10^{-4} \text{ M}$) in a concentration dependent manner. The order of inhibition for the different agonists was as follows: BRADYKININ > OXYTOCIN > ACETYLCHOLINE > BaCl_2 > SEROTONIN. A tendency to overcome its inhibitory effect was however, observed when calcium concentration in the nutrient fluid was enhanced by 2 to 3 fold. In isolated toad rectus abdominis, the fraction produced concentration dependent inhibition of acetylcholine ($1,1 \times 10^{-7} \text{ M}$) evoked responses but did not modify the contractile responses evoked by KCl_2 ($4 \times 10^{-4} \text{ M}$) and caffeine ($3 \times 10^{-2} \text{ M}$). The fraction produced no significant effect on histamine ($3,45 \times$

10^{-7} M) evoked contractile responses of isolated guinea-pig ileum.

The possible mechanisms involved in the observed pharmacological properties of the fraction were discussed in relation to known biochemical effects of cucurbitacins in general. The study provided a scientific validation of the traditional use of the rhizome of Wilbrandia (cf) verticillata in arthritis and related disorders and suggest that it may be a useful alternative to presently available anti-inflammatory drugs.

The anti-implantation and antiovolatory effects observed in plant preparation treated animals merit further study to explore the possibility of developing an oral contraceptive drug of plant origin.

10^{-7} M) evoked contractile responses of isolated guinea-pig ileum.

The possible mechanisms involved in the observed pharmacological properties of the fraction were discussed in relation to known biochemical effects of cucurbitacins in general. The study provided a scientific validation of the traditional use of the rhizome of Wilbrandia (cf) verticillata in arthritis and related disorders and suggest that it may be a useful alternative to presently available anti-inflammatory drugs.

The anti-implantation and antioviulatory effects observed in plant preparation treated animals merit further study to explore the possibility of developing an oral contraceptive drug of plant origin.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Generalidades

A planta viva constitui um verdadeiro arsenal de substâncias químicas. Alguns compostos, incluindo a clorofila, as proteínas e os ácidos nucleicos, são fundamentalmente importantes para o crescimento de todas as plantas verdes, enquanto que outros desempenham funções menos claras, motivo pelo qual são conhecidos como metabólitos secundários. Eles podem variar em relação à sua natureza, de gênero para gênero e, frequentemente de espécie para espécie, embora possam apresentar uma estrutura química comum, dentro de um grupo de plantas geneticamente relacionadas, característica esta, frequentemente útil na taxonomia.

Alguns metabólitos secundários possuem cor, aroma ou sabor particulares, que dão à planta uma vantagem evolucionária, uma vez que podem atrair animais polinizadores ou afastar insetos nocivos e animais herbívoros. Muitos metabólitos secundários representam defesas específicas contra bactérias patogênicas e fungos que atacam a planta, enquanto outros são comumente úteis em termos medicinais, um conhecimento que anteriormente era empírico e que foi então passado de geração a geração, sendo mais tarde, também incluído na literatura antiga e Materia Médica.

Em geral, a Fitoterapia não é muito utilizada em

doenças graves na Medicina moderna, pelo fato de que os extratos de plantas representam misturas complexas de compostos biologicamente ativos, em proporções que mudam de estação a estação, ou ainda dependem do local onde a planta foi colhida. Outros compostos não são muito estáveis após certo tempo de armazenamento, especialmente em preparações no estado bruto, e mudanças químicas podem acontecer quando as partes das plantas secam, talvez tornando-as menos ativas. Tem-se realizado investigações sobre muitos desses medicamentos fitoterápicos, isolando seus princípios ativos, identificando suas estruturas, descobrindo vias sintéticas para produzi-las, e, ao mesmo tempo, avaliando suas propriedades farmacológicas, com o intuito de promover a sua industrialização. Um grande número de drogas em uso são derivadas de medicamentos nativos, como: Nicotina, as piretrinas e a rotenona, que são usados como pesticidas (GILBERT, 1977), e certos esteróides e alcalóides que são usados na manufatura de drogas pela indústria farmacêutica (TYLER et al, 1981). Os últimos incluem sapogeninas esteroidais (diosgenina, solasodina) e esteróis que podem ser utilizados na síntese de drogas antiinflamatórias, anabólicas e contraceptivas (HARDMAN, 1987), glicosídeos digitálicos, os alcalóides anticancerígenos do Catharantus, os alcalóides da Belladona (atropina, hiosciamina e escopolamina), cocaína, colchicina, os alcalóides do ópio (codeína, morfina e papaverina) e da Cinchona (quinina, quinidina), fisostigmina, pilocarpina, reserpina e d-tubocurarina. Alguns outros metabólitos secundários de plantas são instrumentos farmacológicos de inesti

mável valia para o estudo de vários processos bioquímicos. Podem ser citados como exemplos os ésteres de forbol, um grupo de diterpenos pró-inflamatórios promotores de tumor, que foram inicialmente isolados das espécies de Croton pertencentes à família Euphorbiaceae, e têm se mostrado valiosos no estudo das funções biológicas, propriedades e distribuição da proteína quinase C e na carcinogênese química (NISHIZUKA, 1986); Forskolin, um diterpeno isolado das raízes de Coleus forskolii (BHAT et al., 1977), tem sido muito útil no estudo das funções fisiológicas do AMP cíclico, já que se pode ativar assim, quase toda adenilato ciclase particulada e solúvel eucariótica de modo reversível (SEAMON et al., 1981); Rianodina, um alcalóide neutro isolado da raiz e caule de Ryania speciosa Vahl, representa uma substância muito importante para a identificação e caracterização do canal de liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático, tanto no músculo esquelético como cardíaco (MEISSNER, 1986) e Tapsigargina e as lactonas sesquiterpênicas relacionadas, isoladas da raiz de Thapsia garganica, representam uma nova classe de compostos que mimetizam as ações dos segundos mensageiros 1,4,5-trifosfato de inositol e 1,2-diacilglicerol (THASTRUP et al., 1987).

Durante os últimos anos várias plantas têm sido estudadas quanto aos seus princípios ativos. Etoposide, um agente antineoplásico semi-sintético derivado do Podophyllum peltatum (may apple - podofilo) tem sido referido como útil no tratamento quimioterápico de Carcinomas testiculares refratários, Carcinomas pulmonares de células pequenas,

Leucemias não linfocíticas e Linfomas exceto o de Hodkin (BALANDRIN et al., 1985). Tem-se conhecimento do isolamento de flavonóides citotóxicos com propriedades antitumorais como a Tomentina (isolado de espécies de Parthenium e Chrysosplenium), 3,7-dimetil-gossypetina (isolado de Larrea tridentata Cav.), Betuletol (isolado de espécies de Betula e Alnus) e 6-hidroxi-kaempferol-3,7-dimetiléter (isolado de Parthenium hysterophorus L.) (ARCAMONE et al., 1980). Algumas substâncias como a Cadsurenona, um terpeno oriundo da planta chinesa Piper futokadsurae, os gingolides A, B e C ou BN 52020, terpenóides isolados de uma outra planta chinesa Ginkgo biloba L. têm sido citadas como antagonistas competitivos da agregação plaquetária induzida pelo PAF (Fator de Agregação das Plaquetas), bem como da desgranulação de neutrófilos (MARUYAMA et al., 1967; BRAQUET, 1986).

A pesquisa moderna de algumas drogas tradicionalmente usadas tem produzido vários compostos de inestimável valor terapêutico. Substâncias como Artemisinina e seus derivados (lactonas sesquiterpênicas da planta rastejante Artemisia annua L.), foram efetivas contra malária maligna e cerebral, a qual é usualmente fulminante, Cloroquina-resistente e constitui uma séria ameaça à vida (KLAYMAN, 1985); Tetrahidropalmitina (um alcalóide obtido de Rhizoma corydalis) demonstrou ser um tranquilizante sedativo com propriedades analgésicas e algo hipnóticas (BUDA et al., 1984). O "screening" de uma espécie chinesa tradicional, Indigo naturalis, levou à descoberta da Indirubina, e esta provou ser útil no tratamento de leucemia granular crônica (WAN et

al., 1981). Cientistas chineses têm também isolado novos di-
 terpenóides chamados Yuanhuacina, Yuanhuadina, Yuanhuafina,
 outros da raiz de Daphne genkwa Sieb. et Zucc, e uma protei-
 na, Tricosantina, da raiz de Trichosanthes kirilowii Maxim,
 que possuem ação abortiva (KONG et al., 1986). Algumas subs-
 tâncias promissoras que regulam a fertilidade, têm sido co-
 locadas em uso, enquanto que outras estão sob rigoroso estu-
 do na República Popular da China, como por exemplo a Tangu-
 ticacina, Dafnegiraldicina, Dafnegiraldina e 15,16-diidro-
 dafnetoxina, isolados de algumas espécies de Daphne; com-
 postos tipo Ácido Pseudolárico isolados de Pseudolarix kae
 mpferi, que agem no início da gravidez; Ácido Triterpênico
 Cicloartânico isolado de Gardenia jasminoides e d- e l-gos-
 sipol, contraceptivos masculinos (XU & GAO, 1986).

As investigações têm sido intensificadas sobre
 uma larga variedade de plantas, tais como Phyllanthus ama-
 rus, que tem demonstrado inibir a reação entre o antígeno
 de superfície do vírus da hepatite B e seu respectivo anti-
 corpo, uma vez que inibe a DNA polimerase viral (THYAGARA-
 JAN et al., 1988), e Tanacetum parthenium, comprovadamente
 eficaz no tratamento da enxaqueca, possuindo efeitos colate-
 rais desprezíveis (JOHNSON et al., 1985), da qual foram iso-
 lados três compostos (Partenolide, Miquefuscalide e Acetato
 de Cis-crisantenil) que agem inibindo a conversão "in vi-
 tro" de ácido araquidônico a prostaglandinas, via ciclo-
 oxigenase (PUCI & SAMBO, 1988).

O Brasil pode contribuir para esse tipo de estu-
 do de maneira bastante significativa, já que, baseado na

sua variedade de climas e solos, possui uma das mais ricas e diversificadas floras de todo o mundo, muitas vezes explorada por pesquisadores estrangeiros na síntese orgânica de novos fármacos pelas Indústrias Farmacêuticas multinacionais. Já que se procura utilizar uma matéria-prima cem por cento nacional, a CEME (Central de Medicamentos) vem incrementando a pesquisa interna acerca de várias plantas empregadas popularmente (quebra-pedra, aroeira, hortelã, maracujá e outras), avaliando suas toxicidades e ações terapêuticas, utilizando ensaios pré-clínicos e clínicos para tal. Os resultados oriundos desse estudo têm sido preciosos para a comunidade em geral, científica ou não, uma vez que um maior conhecimento sobre o uso da nossa flora é obtido.

O Projeto de Integração Química-Farmacologia da Universidade Federal do Ceará vem realizando diversos trabalhos desde 1978, com os mesmos fins apresentados anteriormente, esclarecendo as propriedades farmacológicas de extratos, frações quimicamente purificadas, ou mesmo de substâncias definitivamente isoladas. E é nesse contexto que o presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC.

1.2 - A planta

1.2.1 - Descrição botânica e distribuição geográfica

A espécie estudada é Wilbrandia verticillata, segundo a tentativa de identificação realizada pelos professores Eloir Schenkel e Lilian Auler Mentz da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A planta era referida como Wilbrandia sp., sob o nome popular de cabeça de negro, desde cerca de 1919 (DIAS DA ROCHA, 1919), e atualmente encontra-se sob estudo visando sua identificação definitiva.

Wilbrandia verticillata Cogn. (tem como sinonímia Anguria aculeolata Schl., A. gaudichaudiana Schl., Momordica verticillata Vell., W. drastica M., W. fluminensis Wawra, W. riedeli Manso, W. scabra M.) é trepadeira de caule anguloso, glabro e estriado. Possui folhas curto-pecioladas, profundamente trilobuladas, com até 20cm de comprimento e 16 cm de largura. Os lóbulos são lanceolados e agudos ou breve-acuminados, áspero-pubescentes. As flores são brancas, sendo as masculinas dispostas em espigas e as femininas sêsses, axilares, presentes em grupos de 3 a 7.0 fruto é ovóide, pequeno, amarelo-alaranjado, liso, contendo sementes branco-sujas, oblongas e marginadas (PIO CORRÊA, 1984).

Abobrinha do mato, como Wilbrandia verticillata é vulgarmente conhecida do Espírito Santo até São Paulo e Minas Gerais, é nativa do Brasil e recebe outros sinônimos como ana pinta., azougue do Brasil, azougue dos pobres, cabacinha, cipô azougue e taiuiá em outras localidades do país

(PIO CORRÊA, 1984).

Pio Corrêa cita apenas uma outra espécie do gênero *Wilbrandia*, a *Wilbrandia hibiscóides* Manso, conhecida como gonu em Minas Gerais, abobrinha do mato e taiuiá de quia bo em São Paulo e Minas Gerais, azougue dos pobres, forquilha e quiabo-de-cipó em outros estados.

O material estudado arquivado no Herbário Prisco Bezerra da U.F.C. e designado cientificamente como *Wilbrandia* (cf) *verticillata* é conhecido popularmente como cabeça de negro ou batata de teiu, sendo encontrado em todo o Nordeste do Brasil (BRAGA, 1953), especialmente na área de caatinga, vegetação típica do Nordeste semiárido. O rizoma da planta pode ser visto na Figura 1.

1.2.2 - Uso popular

A raiz tuberosa de espécies de *Wilbrandia* é utilizada popularmente como anti-sifilítica, purgativa, depurativa, anti-reumática, febrífuga e emenagoga, além de ser empregada nas hidropsias e erisipelas crônicas (PIO CORRÊA, 1984; BRAGA, 1953).

Na medicina veterinária parece ser útil na cólera das galinhas, fazendo parte também de "garrafadas" (combinação de vários chás diferentes), utilizadas no tratamento de manifestações, tais como o "Mal triste", cujos agentes etiológicos são um protozoário e uma rickettsiae, que acometem o gado bovino (PIO CORRÊA, 1984; MELO, 1989).



FIGURA I - Rizoma de Wilbrandia (cf) verticillata (Foto: F. J.A. Matos).

1.2.3 - As Cucurbitacinas

Esse grupo de substâncias é constituído por compostos triterpênicos tetracíclicos, altamente oxigenados, que possuem um esqueleto único do tipo lanostano (LAVIE & GLOTTER, 1971). Foram inicialmente isolados de plantas pertencentes à família Cucurbitaceae, sendo depois também obtidos de várias espécies provenientes de outras famílias, como Elaeocarpaceae, Polemoniaceae, Euphorbiaceae e Escrofulariaceae. Os gêneros mais comuns da família Cucurbitaceae encontrados no Brasil, são: *Cucurbita*, *Citrullus*, *Luffa*, *Lagenaria*, *Cucumis*, *Momordica*, *Cayaponia* e *Wilbrandia*, aos quais pertencem espécies como *Cucurbita maxima*, *Citrullus vulgaris*, *Luffa operculata* e *Wilbrandia verticillata* (JOLY, 1977).

As principais cucurbitacinas já isoladas foram: B, D, E, F e I de *Acanthosicyos horridus* - Cucurbitaceae (HYLANDS & MAGD, 1986), *Ecballium elaterium* - Cucurbitaceae (LAVIE & SHVO, 1959-1960), *Elaeocarpus dolichostylus* - Elaeocarpaceae (FANG et al., 1984), e de *Spondianthus preussii* Euphorbiaceae (TESSIER & PARIS, 1978), dentre outras, presentes nas Figuras II e III.

Recentemente, com o isolamento do Fevicordin A e seu respectivo glicosídeo, de *Fevillea cordifolia* - Cucurbitaceae (ACHENBACH et al., 1987), um novo grupo de norcucurbitacinas aromáticas tornou-se conhecido (FIGURA IV).

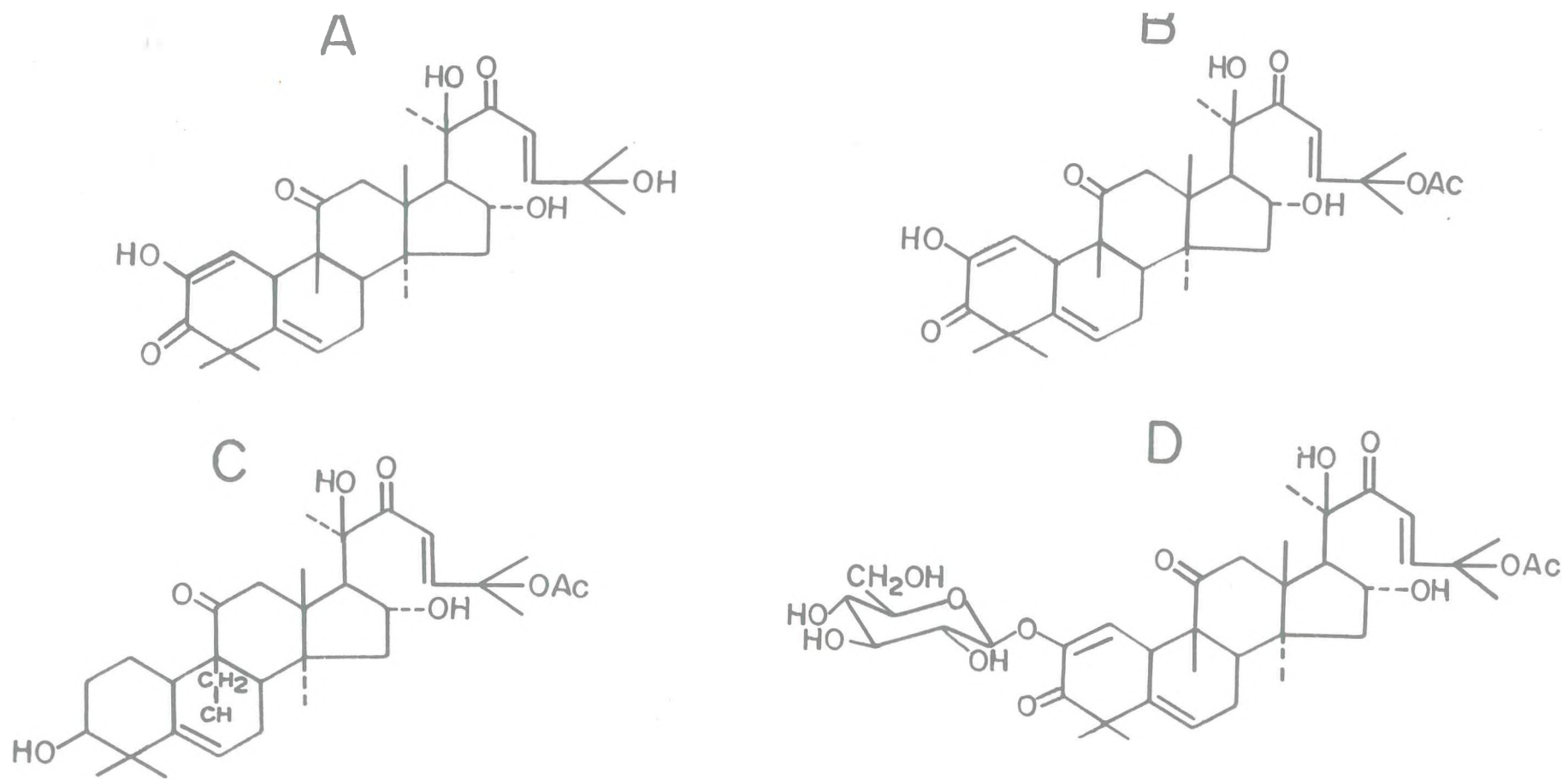


FIGURA II - Cucurbitacinas clássicas isoladas de algumas plantas.

A - Cucurbitacina I

B - Cucurbitacina E

C - Cucurbitacina C

D - Elaterinida (β -glicosídeo da Cucurbitacina E).

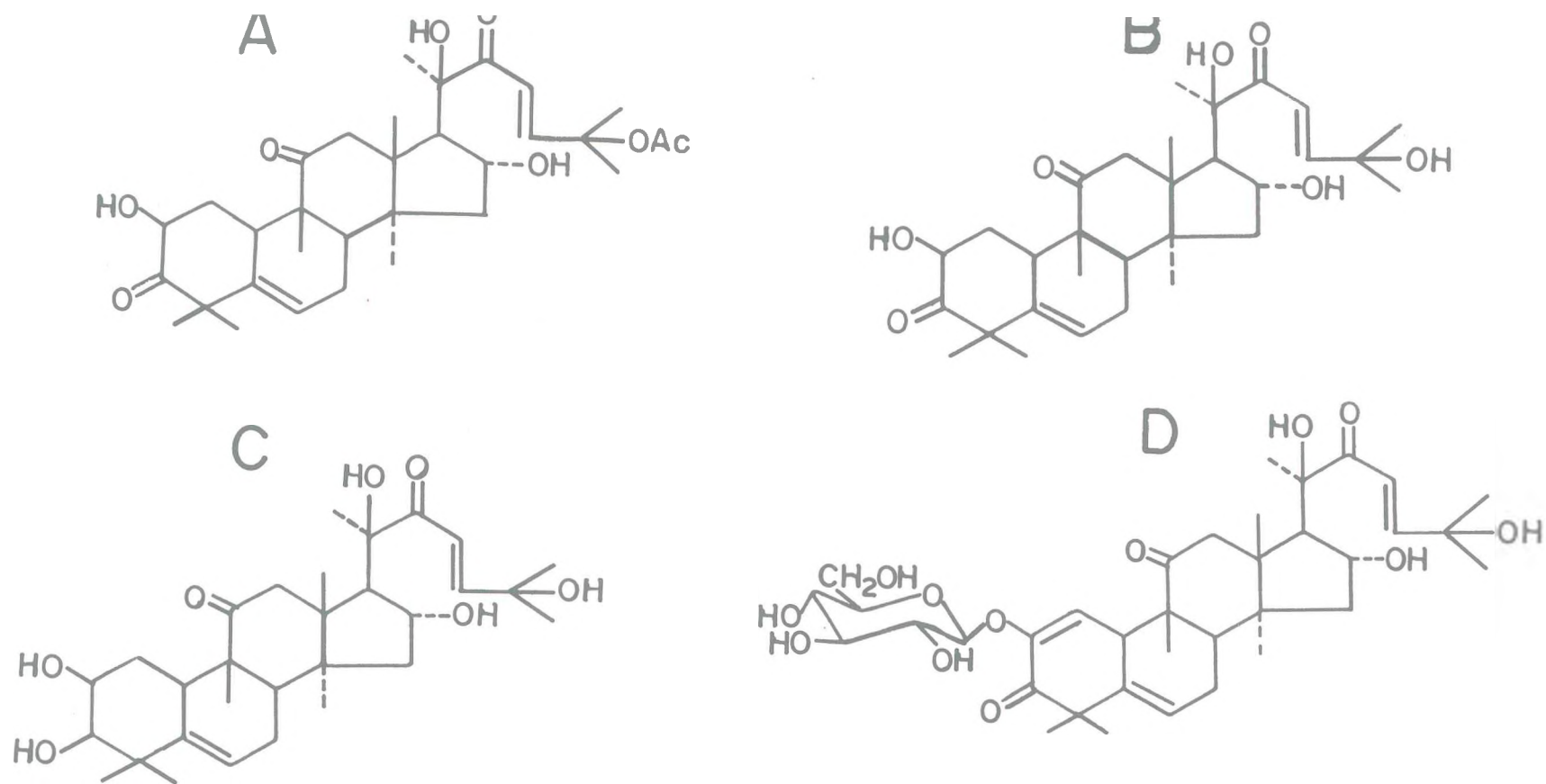


FIGURA III - Cucurbitacinas clássicas isoladas de algumas plantas.

A → Cucurbitacina B

B → Cucurbitacina D

C → Cucurbitacina F

D → Glicosídeo da Cucurbitacina I.

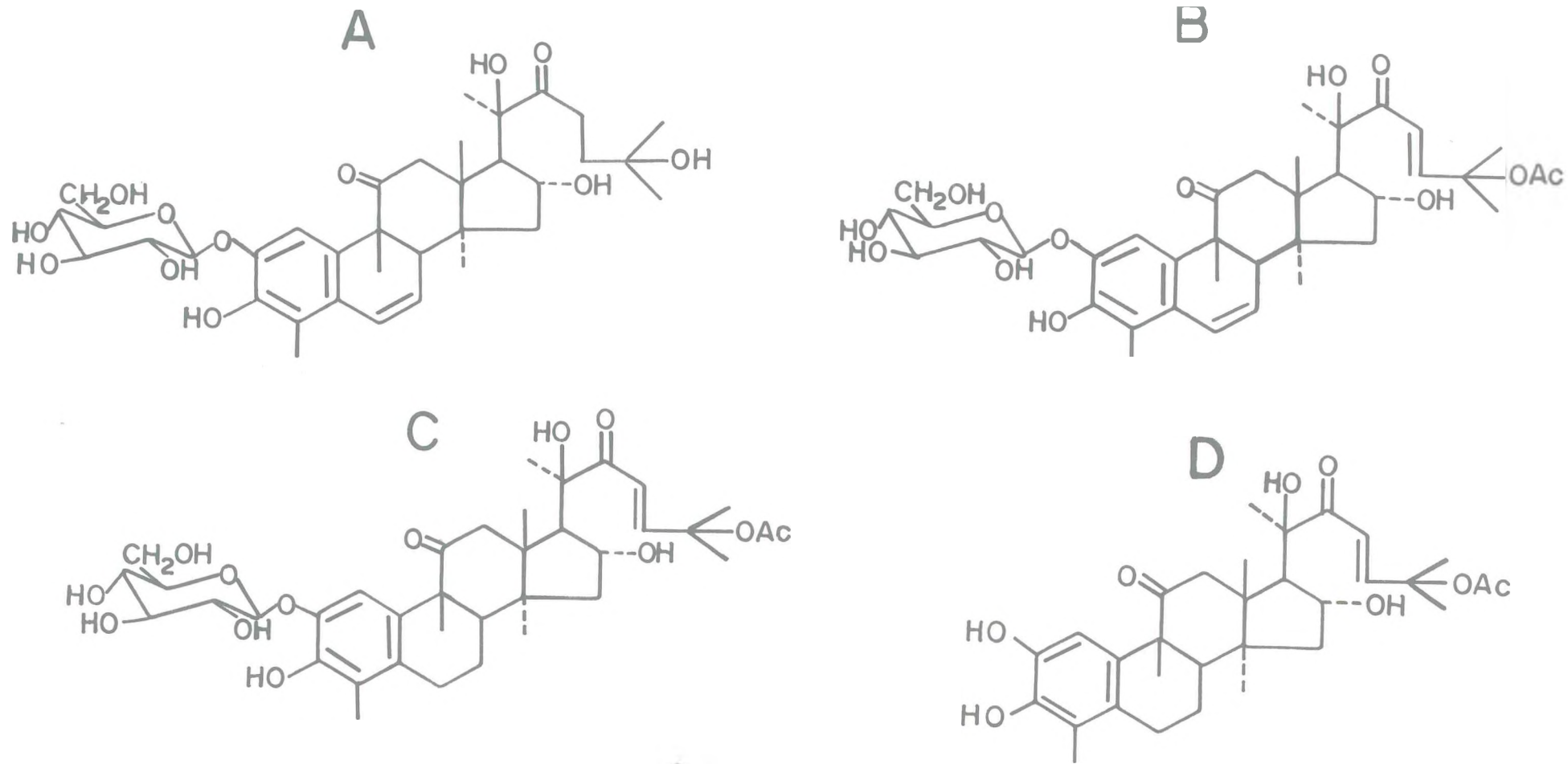


FIGURA IV - Estrutura das novas norcucurbitacinas aromáticas isoladas de Wilbrandia (cf) ver ticillata (A e B) e de Fevillea cordifolia (C e D).

A → Wv₁

B → Wv₂

C → glicosídeo do Fevicordin A

D → Fevicordin A

1.2.4 - Farmacologia das Cucurbitacinas

Embora o estudo de suas propriedades farmacológicas esteja ainda aquém das expectativas científicas, tem-se conhecimento de algumas atividades investigadas, tais como: Citotoxicidade, apresentada pelas cucurbitacinas B, D, E, I (KONOPA et al., 1974) e F (FANG et al., 1984); Ação antitumoral, por D e I principalmente (KONOPA et al., 1974 - SHOHAT et al., 1962); Ação antiinflamatória, demonstrada pela cucurbitacina B (YESILADA et al., 1988); Ação antifertilidade, demonstrada pela Diidroocucurbitacina D ou Diidroelatericina A (SHOHAT et al., 1972) e Ação laxativa, observada com as cucurbitacinas B, C, F, E glicosídica e I glicosídica (LE MEN et al., 1969).

Em relação ao grupo das norcucurbitacinas aromáticas, suas propriedades farmacológicas ainda constituem incógnitas, conhecendo-se até então o Fevicordin A e seu glicosídeo com ação antiinflamatória (ACHENBACH et al., 1987), e, agora, tendo em vista a realização deste trabalho, alguns aspectos farmacológicos dos Wvs isolados (Wv_1 e Wv_2) de Wilbrandia (cf) verticillata (MATOS et al., 1988) foram conhecidos, de acordo com os objetivos abaixo mencionados.

1.3 - Objetivos

Com base nos usos populares acima descritos bem como nas atividades farmacológicas demonstradas pelas cucurbitacinas já isoladas, resolvemos avaliar uma fração purifica

da da raiz de Wilbrandia (cf) verticillata, que contém duas novas norcucurbitacinas (Wv_1 e Wv_2), em concordância com os seguintes objetivos:

- 1 - Estudar sua toxicidade aguda e algumas de suas ações farmacológicas, como:
 - Ação antiinflamatória
 - Ação antifertilidade
 - Ação laxativa
 - Ação citotóxica
- 2 - Investigar os possíveis mecanismos de ação envolvidos nas referidas propriedades.

2 - MATERIAL

2.1 - A planta

A raiz de Wilbrandia sp foi coletada em Senador Pompeu - Ceará e utilizada na produção da fração purificada, pelo Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, sendo a última empregada nos ensaios experimentais. Posteriormente, a planta foi identificada como Wilbrandia (cf) verticillata pelos professores Eloir Schenkel e Lilian Auler Mentz da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2.2 - Animais experimentais

Camundongos albinos (Mus musculus), variedade Swiss-Webster, de ambos os sexos, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

Ratos albinos (Rattus norvegicus), variedade Wistar, de ambos os sexos, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

Cobaias albinos (Cavia porcellus), de ambos os sexos, provenientes do Biotério do HEMOCE (Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Ceará).

Sapos (*Bufo paracnemis*, Lutz), de ambos os sexos, capturados ao acaso nos arredores de Fortaleza - Ce.

Os camundongos, ratos e cobaias utilizados, foram mantidos em condições ambientais semelhantes, com ciclos claro/escuro de 12 em 12 horas, recebendo ração em "pellets" (Purina) e água "ad libitum".

2.3 - Soluções fisiológicas

As soluções fisiológicas foram preparadas com sais de pureza analítica (MERCK). As concentrações foram expressas em milimolar (mM).

- Solução salina

NaCl 154

- Solução de De Jalon

NaCl 154; KCl 5,3; CaCl₂ 0,6; NaH₂PO₄ 0,3; NaHCO₃ 6,9; glicose 2,7

- Solução de Tyrode

NaCl 136; KCl 2,68; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 0,92; NaH₂PO₄ 0,36; NaHCO₃ 11,9; glicose 5,5

- Ringer batráquio

NaCl 111,2; KCl 1,8; CaCl₂ 1,0; NaH₂PO₄ 0,07; NaHCO₃ 2,38; glicose 11,1

2.4 - Reagentes e corantes

- Ácido acético glacial (MERCK)

- Álcool etílico (R.A.Prod.Químicos)
- Azul de Evans (SIGMA)
- Éter etílico (REAGEN)
- Formaldeído (HERZOG)
- Hidróxido de sódio (REAGEN)
- Lauril sulfato de sódio (REAGEN)

2.5 - Drogas

- Benzoato de estradiol (SIGMA)
- Bradicinina (SIGMA)
- Carragenina (SIGMA)
- Citrato de cafeína (SIGMA)
- Cloreto de acetilcolina (SIGMA)
- Cloreto de bário (REAGEN)
- Cloreto de cálcio (REAGEN)
- Cloreto de potássio (GRUPO QUÍMICA)
- Dexametasona (DECADRON-M.S.D.)
- Dietilestilbestrol (SIGMA)
- Dihidrocloreto de histamina (SIGMA)
- Fenilbutazona (CEME)
- 5-Hidroxitriptamina (SIGMA)
- Isocucurbitacina B (DEP.QUIM.ORG. INOR
GÂNICA DA UFC)
- Ocitocina (CEME)

3 - MÉTODOS

3.1 - Purificação do extrato etanólico e isolamento de Wv_1 e Wv_2

A raiz de Wilbrandia (cf) verticillata (4 kg) foi extraída em Soxhlet com etanol. O extrato etanólico resultante (223g) foi fracionado em coluna de sílica gel, fornecendo uma fração eluída com AcOEt-MeOH (80:20). Esta fração foi tratada com acetona e o extrato resultante após concentração, forneceu 15g de uma mistura constituída de duas norcucurbitacinas glicosídicas inéditas denominadas Wv_1 e Wv_2 (Figura V). Logo, o rendimento da fração constituída por Wv_1 e Wv_2 a partir de 4kg da raiz da planta, foi de 0,4%.

As proposições estruturais para as substâncias, envolveram a aplicação de métodos espectroscópicos de análise dos derivados acetilados (MATOS et al., 1988). Os espectros podem ser vistos nas Figuras VI - A a F. Essa metodologia foi realizada pela Profa. Maria Elisa de Oliveira Matos e colaboradores no Laboratório de Produtos Naturais (LPN) da Universidade Federal do Ceará.

A fração constituída por Wv_1 e Wv_2 , estando o Wv_2 em maior quantidade, foi submetida aos ensaios farmacológicos de que trata o presente trabalho.

WILBRANDIA (cf) VERTICILLATA (CUCURBITACEAE)
(RIZOMAS SECOS E PULVERIZADOS)

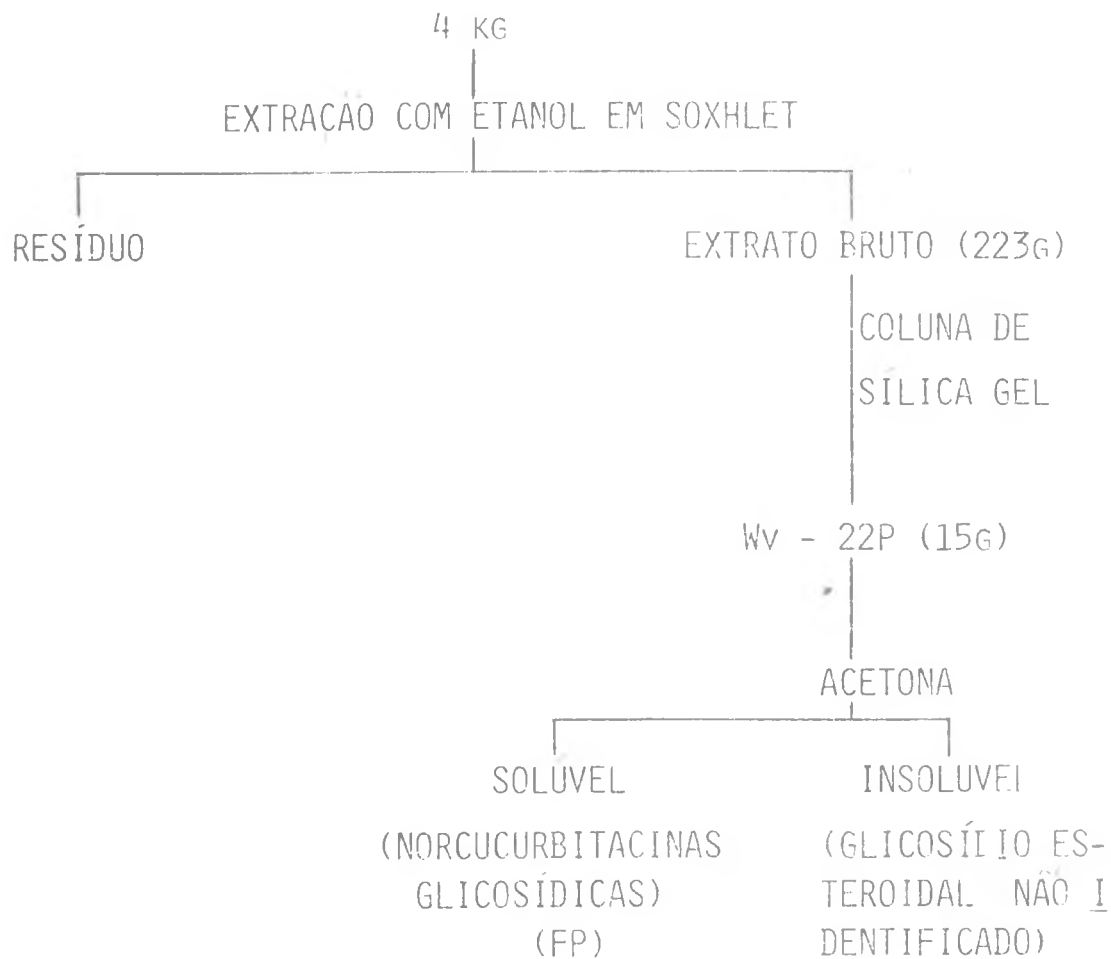


FIGURA V - Purificação do extrato etanólico de Wilbrandia (cf) verticillata e isolamento de wv_1 e wv_2 .

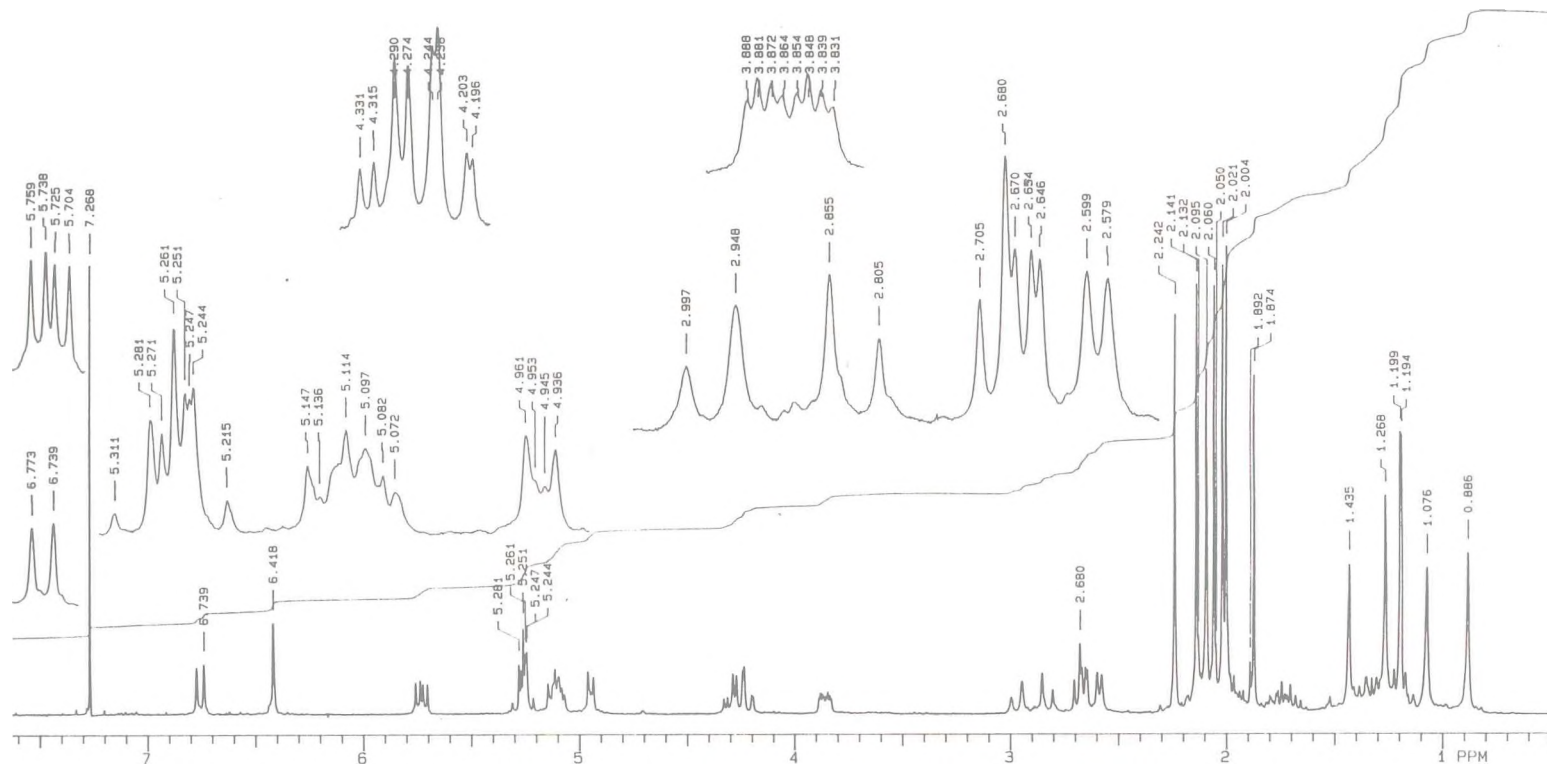


FIGURA VI A - Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (300 MHz), em CDCl_3 , da norcucurbitacina glicosídica peracetilada Wv_1 .

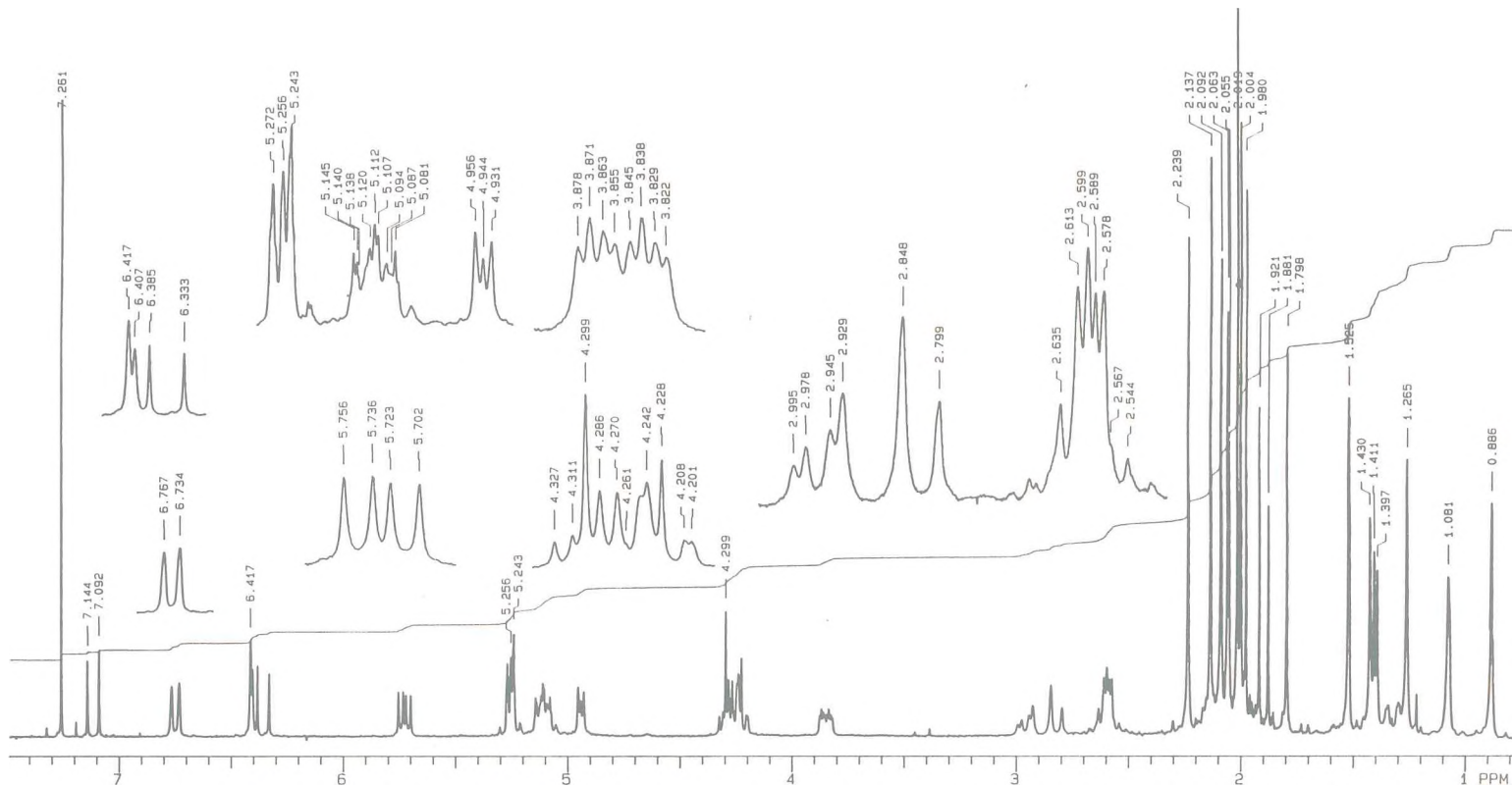


FIGURA VI B - Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (300 MHz), em CDCl_3 , da norcucurbitacina glicosídica peracetilada Wv_2 .

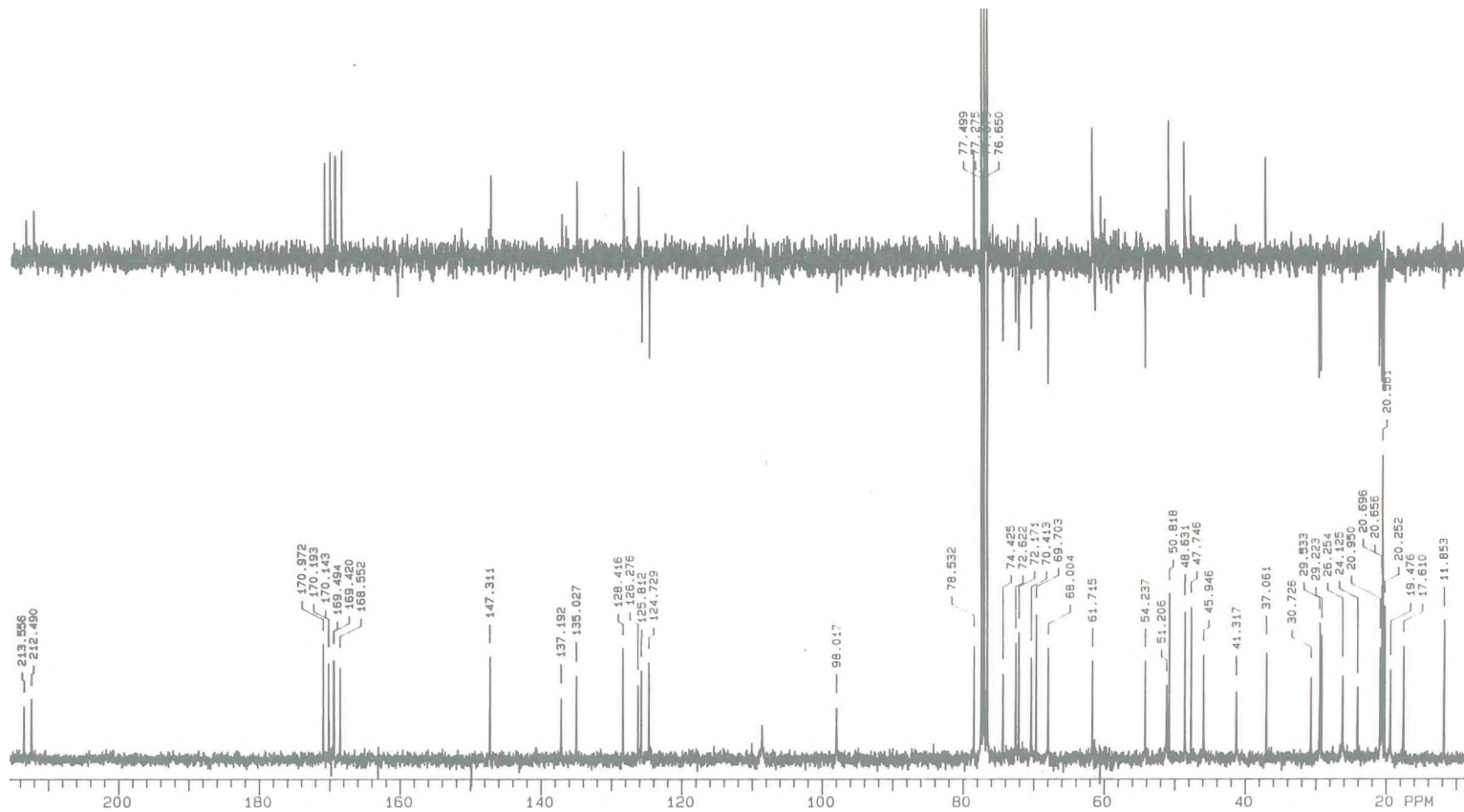


FIGURA VI C - Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C (75 MHz), em CDCl_3 , da norcurbitacina glicosídica peracetilada Wv_1 .

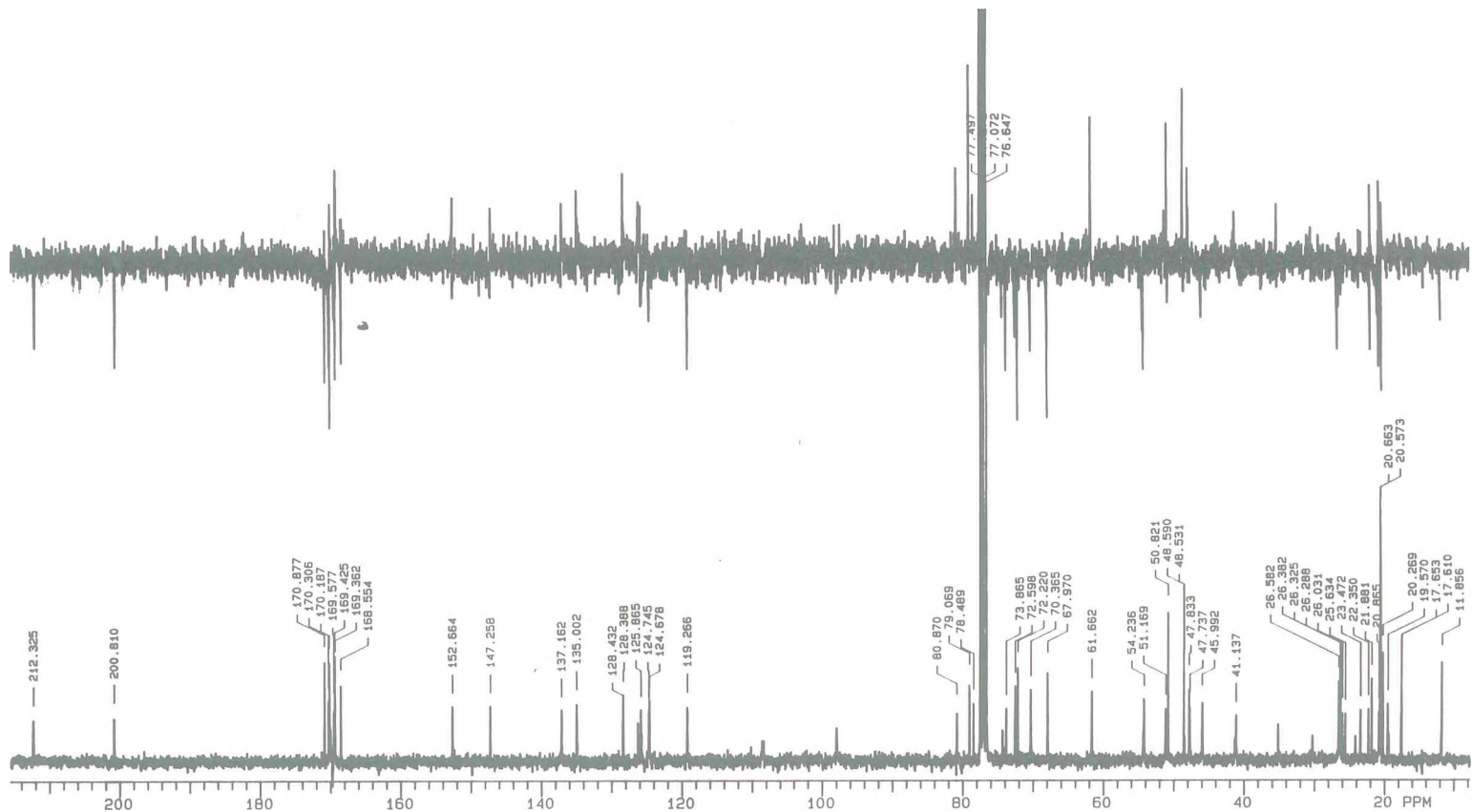


FIGURA VI D - Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C (75 MHz), em CDCl_3 , da norcucurbitacina glicosídica peracetilada Wv_2 .

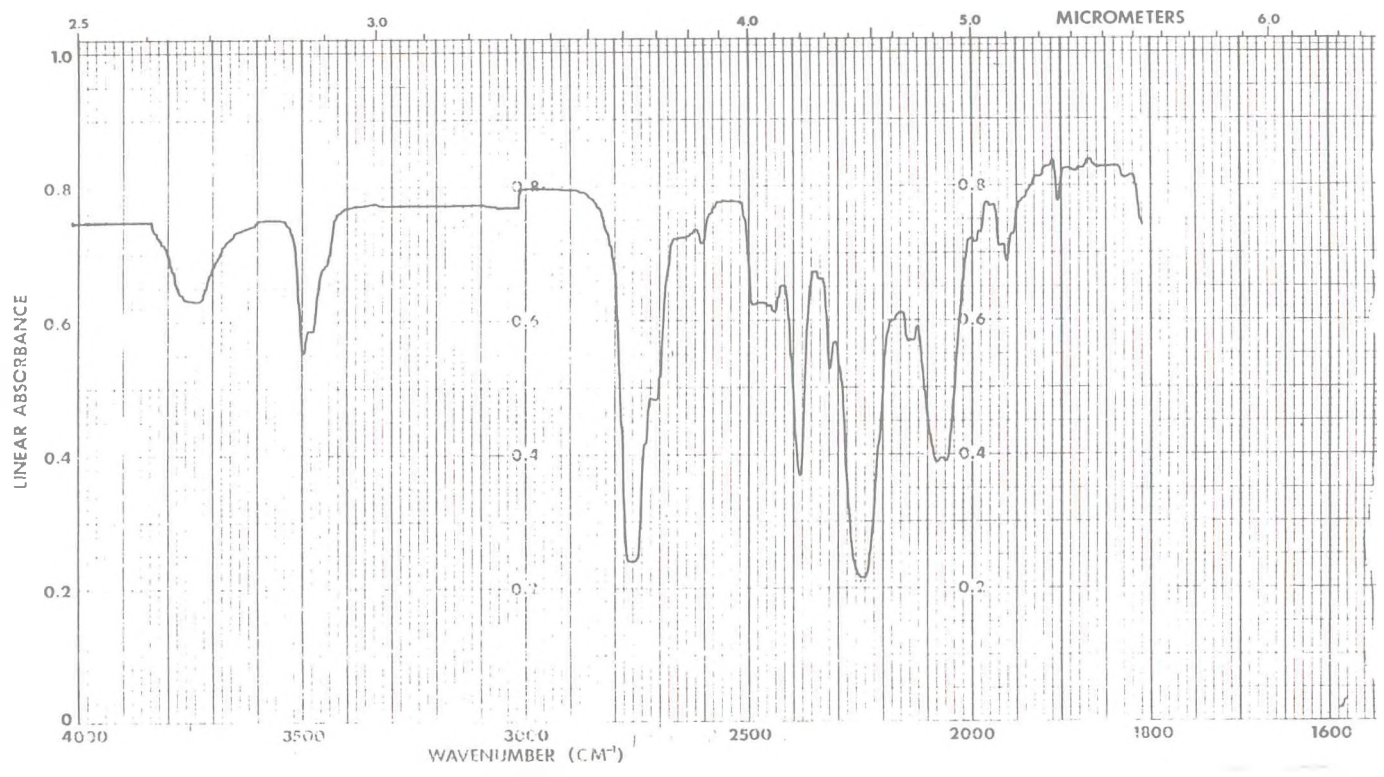


FIGURA VI E - Espectro na região do infravermelho, em CDCl_3 , da norcucurbitacina glicosídica peracetilada Wv_1 .

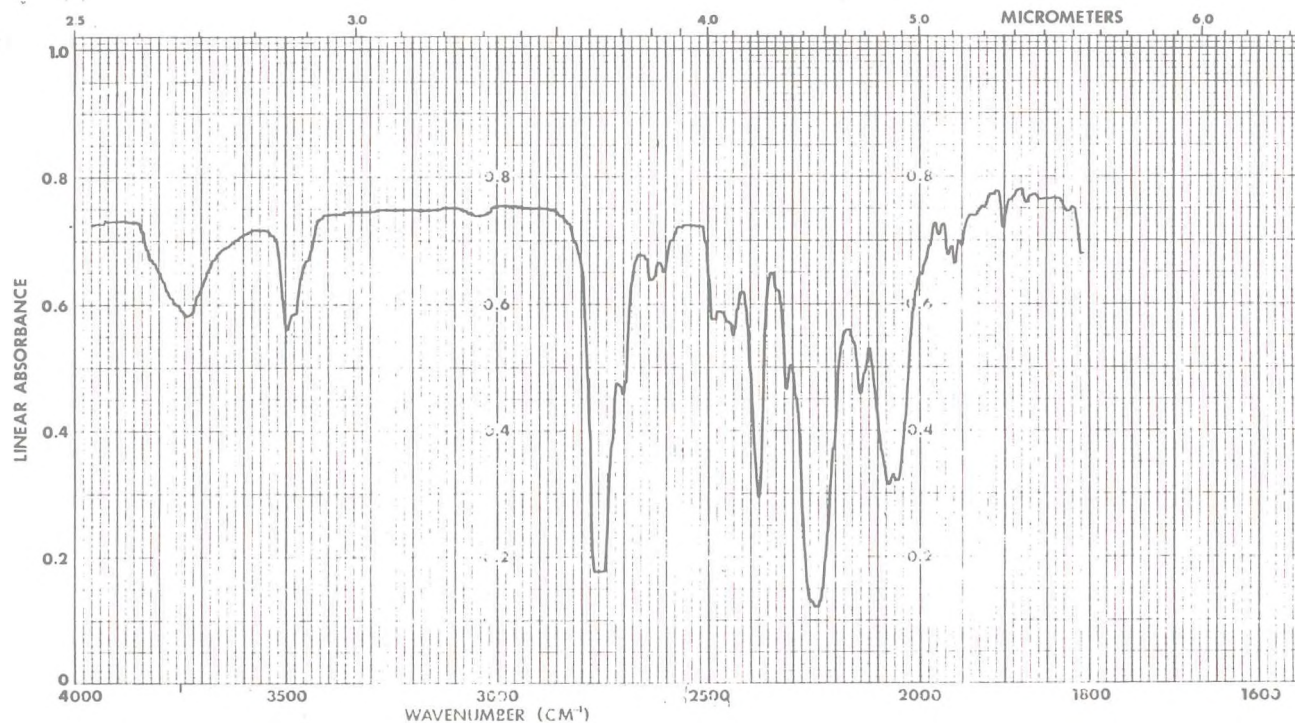


FIGURA VI F - Espectro na região do infravermelho, em CDCl_3 , da norcucurbitacina glicosídica peracetilada Wv_2 .

3.2 - Experimentos "in vivo"

3.2.1 - Toxicidade aguda e efeitos comportamentais

Nesse experimento foram utilizados camundongos de ambos os sexos, escolhidos ao acaso, pesando em torno de 35 a 40g, separados em grupos de 10 animais cada (5 fêmeas e 5 machos), e mantidos em jejum durante toda a noite.

A Fração Purificada (FP) foi administrada em doses crescentes que variaram de 200 a 2000mg/kg de peso por via oral e intraperitoneal, utilizando-se um volume constante de 20ml/kg e 10ml/kg de peso, respectivamente, enquanto que os grupos controle recebiam o volume equivalente do veículo (solução a 5% P/V de goma arábica em salina). Todos os grupos eram cuidadosamente observados durante 120 minutos após a administração da FP e então a intervalos previamente estabelecidos durante 72 horas. Os parâmetros comportamentais observados foram os seguintes: atenção, alerta, analgesia, atividade motora espontânea, locomoção, sedação, resposta ao tato, reflexo postural, secreção nasal, piloereção, ptose, dispnéia, micção, diarréia, convulsão, coma e morte.

A determinação da DL_{50} (dose que mata 50% dos animais) foi estabelecida pelo método de MILLER & TAINTER (1944). Realizou-se a contagem do número de animais mortos e calculou-se a percentagem de mortes para cada grupo, a qual foi convertida em probitos e colocada na ordenada enquanto que na abscissa constou o log dose da FP, e finalmente a DL_{50} foi determinada.

3.2.2 - Ação antiinflamatória

Com a finalidade de avaliar a ação da FP sobre o processo inflamatório em diferentes estágios, foram utilizados os seguintes modelos: Edema de pata induzido por carragenina, onde observou-se a ação da FP sobre a inflamação aguda; lesão granulomatosa induzida por carragenina, onde a ação da FP sobre a inflamação subaguda foi avaliada; artrite induzida por formaldeído, onde investigou-se a ação da FP sobre o processo crônico e a ação sobre a permeabilidade capilar, objetivando o esclarecimento do mecanismo de ação envolvido nesse tipo de atividade.

3.2.2.1 - Inflamação aguda - Edema de pata induzido por carragenina em ratos

Ratos Wistar machos pesando 120-450g, escolhidos aleatoriamente e divididos em 4 grupos de 8 animais cada, foram administrados por via oral com FP (100 e 200mg/kg de peso), fenilbutazona (100mg/kg de peso) ou veículo (solução a 5% P/V de goma arábica em salina), uma hora antes da injeção subplantar de 0,1ml de uma solução de carragenina a 1% na pata traseira direita (WINTER et al., 1962). O volume da pata foi medido por pletismógrafo imediatamente antes e após 3 horas da injeção de carragenina.

A atividade anti-edematogênica da FP e da droga-padrão utilizada (fenilbutazona) foi considerada em termos

de inibição percentual do edema, de acordo com a seguinte fórmula:

percentagem de inibição = $1 - \frac{V_t}{V_c} \times 100$, onde V_t e V_c representam a média das diferenças entre as medidas das patas nos grupos tratados e controle respectivamente.

Método pletismográfico:

Foi utilizada uma variante do método de DOMENJOZ (1954), descrito inicialmente por HILLEBRECHT (1954) e aperfeiçoado por WINDER et al. (1957). O pletismógrafo, aparelho utilizado no experimento, encontra-se representado na Fig. VII.

A pata traseira direita do animal foi estendida firmemente e introduzida até uma determinada região referencial (borda póstero-proximal da proeminência do calcanhar) em um recipiente cheio (B), por onde o fluido deslocado flui para dentro de um tubo horizontal graduado (0,01ml) (C), no qual a leitura do volume foi realizada. O fluido utilizado foi uma solução de lauril sulfato de sódio a 0,05% em 5% de álcool etílico hidratado. Após o esvaziamento da solução e zeragem do aparelho, a torneira da extremidade (D) foi girada de modo que a abertura ao vácuo fosse fechada e o tubo graduado (C) fosse aberto à atmosfera; a pata do animal foi então imersa no vaso (B) até que o ponto de referência estivesse alinhado com o menisco do fluido visto na parede do vaso durante 2 a 4 segundos, quando então ocorreu o deslocamento do fluido, remoção da pata do animal e realização da leitura

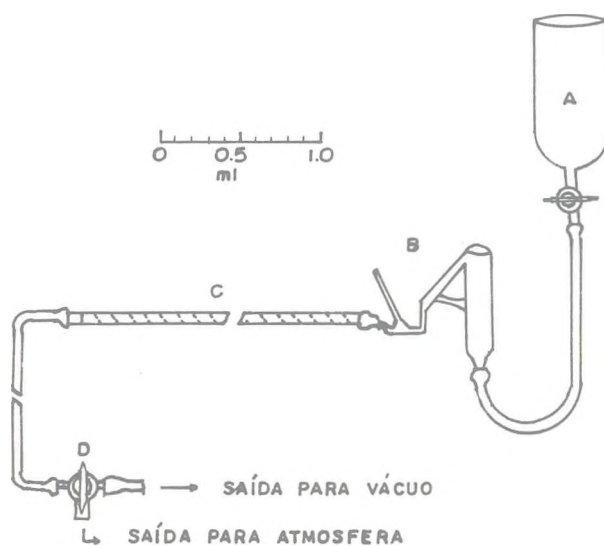


FIGURA VII - Pletismógrafo - Aparelho utilizado na medida do volume da pata de rato. Esta é imersa no vaso B, enchido por meio do reservatório A, e o líquido transborda para um tubo graduado C, onde se realiza a leitura referente à alteração do volume.

no tubo graduado.

3.2.2.2 - Lesão granulomatosa induzida por carragenina em ratos

Três grupos de 6 animais cada (ratos Wistar machos 180-220g), privados de alimento por toda a noite foram utilizados para esse experimento, segundo o método de BENITZ & HALL (1963). Injetou-se 0,5ml de uma suspensão de carragenina a 2%, subcutaneamente na área dorsal de todos os animais, após anestesia com éter etílico. As drogas testadas, FP (100mg/kg de peso), fenilbutazona (100mg/kg de peso) e veículo, foram administradas oralmente, imediatamente após a administração de carragenina e depois de 24 horas. Os animais foram então sacrificados 48 horas após a injeção do irritante, os granulomas removidos e pesados, e realizadas as respectivas comparações entre os grupos - teste e controle.

3.2.2.3 - Artrite induzida por formaldeído em ratos

A artrite foi induzida através da injeção de solução de formaldeído 2% na região subplantar da pata traseira esquerda dos animais (ratos Wistar fêmeas 100-150g de peso) no primeiro e terceiro dia do experimento (SELYE, 1949). A medida do volume da pata foi feita por pletismógrafo antes da injeção do irritante e 2 horas após esta no 1º dia, bem como uma vez diariamente durante 10 dias consecutivos

de tratamento com FP (100mg/kg de peso, p.o.), dexametasona (1mg/kg de peso, i.p.) e veículo. O aumento médio do volume das patas de cada grupo de 6 animais foi determinado e calculada a percentagem de inibição através da comparação dos grupos tratados com o controle.

Todos os animais utilizados nesse ensaio, foram privados de alimento 2 horas antes e 2 horas depois do tratamento, sendo permitido água "ad libitum".

3.2.2.4 - Ação sobre a permeabilidade capilar

O ensaio de permeabilidade vascular induzida por ácido acético em camundongos machos (25 ± 1g de peso) foi realizado segundo o método de WHITTLE com algumas modificações.

A substância-teste FP (50 e 100mg/kg), AAS (200mg/kg) e o veículo foram administrados oralmente aos animais presentes em cada grupo (5 - 8 animais/grupo), através de uma sonda intragástrica. Após 60 minutos, cada animal recebia intravenosamente 0,25ml de solução salina de Azul de Evans 2% P/V e, 10 minutos depois, todos recebiam 0,4ml de solução salina de ácido acético 0,5% V/V intraperitonealmente. Após 20 minutos os camundongos eram mortos por deslocamento cervical e realizava-se uma lavagem da cavidade abdominal com água destilada, sendo o líquido obtido colocado em frascos com capacidade para 10ml, previamente preparados com 0,1ml de solução de NaOH 0,1N bem como com lã de vidro para que a sua filtração fosse realizada. O volume era en-

tão completado com água destilada para um total de 10ml, sendo a solução final medida colorimetricamente a 590nm.

3.2.3 - Ação antifertilidade

Os ensaios realizados com a finalidade de detectar uma interferência da FP com a fertilidade de animais experimentais, seguiram a metodologia descrita por KHANNA & CHAUDHURY (1970), e foram eles: Efeito sobre o ciclo estral em camundongos, efeito sobre a implantação em ratas e efeito abortivo em ratas.

3.2.3.1 - Efeito sobre o Ciclo Estral em camundongos

Dois grupos de 6 animais cada (camundongos 25-30g de peso) escolhidos baseado na existência de 2 ciclos estrais consecutivos normais, foram tratados com FP (100mg/kg de peso, p.o.) ou com veículo durante um período de 10 dias, examinando-se simultaneamente a fase do ciclo estral na qual os animais se encontravam, através da colheita da secreção vaginal e observação à microscopia óptica. Após o período de tratamento, as fêmeas continuaram a ser examinadas por mais 10 dias, com o intuito de observar a persistência ou não do efeito.

3.2.3.2 - Efeito sobre a implantação do ovo fertilizado em ratos

Ratos Wistar de comprovada fertilidade foram aca

salados com fêmeas de ciclo regular, na fase Pró-estro do ciclo estral. A presença de espermatozóides no esfregaço vaginal, visualizados por microscopia óptica, indicava o 1º dia da gravidez. Estes animais foram selecionados ao acaso em 3 grupos de 6 animais cada (150-200g) e foram administrados com FP (100 e 200mg/kg de peso, p.o.) ou veículo, do 1º ao 7º dia da gravidez, através de um cateter intragástrico.

Os animais foram laparotomizados sob ligeira anestesia com éter etílico no 10º dia da gravidez, e o número de sítios de implantação nos cornos uterinos foi anotado para cada animal. A completa ausência de sítios de implantação em qualquer animal, era considerada como critério de efeito antifertilidade. O abdomen era fechado e esperava-se o término da gravidez, quando então verificava-se o número de recém-nascidos em cada grupo experimental, fazendo-se a respectiva diferença.

3.2.3.3 - Efeito abortivo em ratos

Após acasalamento de ratos machos comprovadamente férteis com fêmeas de ciclo regular na fase Pró-estro do ciclo estral, a existência de gravidez era detectada através da presença de espermatozóides no esfregaço vaginal. Os animais escolhidos eram separados ao acaso nos grupos experimental e controle (6 animais cada) e tratados com FP (100 e 200mg/kg de peso, p.o.) ou com veículo respectivamente, do 9º ao 13º dia da gravidez. Observou-se o aparecimen

to ou não de sangramento vaginal em todos os animais do 12º ao 16º dia da gravidez e, finalmente no 20º dia, os animais eram sacrificados e os fetos vivos e mortos eram quantificados.

3.2.4 - Ação estrogênica ou anti-estrogênica

Nesse ensaio foram utilizados 4 grupos de ratos Wistar imaturos com 24-37g de peso e 19-21 dias de idade, com 6 animais cada. Esses animais foram administrados com veículo (0,1ml de óleo de milho, sc+veículo da FP, p.o.), estrogênio padrão (benzoato de estradiol, 0,1 µg/animal, sc), estrogênio padrão mais FP (100mg/kg de peso, p.o.), ou ainda o veículo e a FP simultaneamente, durante 3 dias consecutivos, ao final dos quais os animais eram sacrificados por deslocamento cervical e seus úteros pesados e comparados entre os vários grupos.

3.2.5 - Ação laxativa

A potência laxativa da FP foi estudada segundo o método descrito por LOU (1949). Quatro grupos de 8 camundongos machos (30-40g de peso), privados de alimento durante 5 horas, foram administrados com FP (25 e 50mg/kg de peso, p.o.) através de uma sonda intragástrica, com veículo e uma droga-padrão (Isocucurbitacina B 0,5mg/kg de peso, p.o.) respectivamente. Após o tratamento, subgrupos de 2 a animais cada foram colocados em gaiolas metabólicas (6 x

18cm) que possuíam a parte inferior também gradeada. As fezes eram recolhidas em papel branco colocado sob as gaiolas, ao final de cada hora, durante um período total de 6 horas. O efeito laxante era medido através da contagem do número total de vezes que o animal defecava, no intervalo de tempo acima citado, quando então efetuava-se as diferenças entre os grupos.

3.3 - Experimentos "in vitro"

3.3.1 - Reto abdominal de sapo

Após a imobilização do animal (sapo 180-280 g de peso) pela destruição do Sistema Nervoso Central e dissecação do músculo abdominal, este era isolado e transferido para um recipiente contendo solução de Ringer batráquio continuamente aerada à temperatura ambiente. O músculo era separado da aponeurose e transferido para uma câmara muscular contendo 10ml de solução nutritiva, aerada e mantida à temperatura ambiente (DE JALON, 1947).

As contrações provenientes do músculo eram registradas quimograficamente por meio de uma alavanca isotônica de inscrição frontal, sendo aplicada uma tensão de 0,5g com uma amplificação de 6 vezes.

O tecido foi mantido em repouso por 30 a 40 minutos depois da sua montagem, quando então as respostas contráteis à Acetilcolina ($1,1 \times 10^{-7} M$); Cloreto de Potássio ($4 \times 10^{-4} M$) e Cafeína ($3 \times 10^{-2} M$), eram registradas antes e após a in-

cubação por 3 minutos de doses crescentes (0,5 a 4mg/ml) ou não (4mg/ml) da FP, em intervalos de 5 minutos.

3.3.2 - Útero isolado de rata não prenha

Esse ensaio foi realizado segundo o método de HOLTON (1948). Foram utilizadas ratas Wistar virgens (150-200g de peso) mediante estrogenização prévia (18 horas) com dietilestilbestrol (1ml/kg de peso i.p.). Os animais eram sacrificados por meio de pancada na nuca com secção posterior dos vasos cervicais, colocados em decúbito dorsal e feita uma incisão em forma de "V" na região abdominal. A pele e a camada muscular eram rebatidas, os intestinos afastados e os cornos uterinos localizados, quando então eram retirados 2 a 3cm de suas extremidades 1/3 distais do ovário e colo uterino, e imediatamente transferidos para uma placa de Petri contendo solução nutritiva de DE JALON continuamente aerada. Os tecidos foram montados em banho para musculatura lisa com capacidade de 10ml, contendo líquido nutritivo de DE JALON aerado, à temperatura constante de 29°C.

As contrações provenientes do uso de várias concentrações de drogas, foram registradas em tambor móvel de quimógrafo, através de uma alavanca isotônica com tensão de 0,5g e amplificação de 6 vezes.

A preparação foi mantida em repouso durante 30 a 40 minutos, quando então respostas contrãteis foram registradas para acetilcolina ($5,5 \times 10^{-6}$ M), 5-hidroxitriptamina ($2,84 \times 10^{-6}$ M); Bradicinina ($1,89 \times 10^{-7}$ M); Ocitocina

($2,98 \times 10^{-12}$ M); Cloreto de Bário ($1,5 \times 10^{-3}$ M) e Cloreto de Potássio (1×10^{-4} M), em intervalos de 5 minutos, antes e após a incubação da FP, em concentrações crescentes (0,5 a 4mg/ml) durante 3 minutos.

A IC₅₀ (concentração da preparação da planta necessária para produzir 50% de inibição da resposta do agonista) foi determinada a partir da realização de 4 registros com cada um dos agonistas a fim de avaliar o efeito da FP frente a cada um deles.

Foram utilizadas concentrações crescentes de CaCl₂ (1,2 e 1,8 mM), antes da incubação com FP (0,5 a 4mg/ml) e da resposta à acetilcolina em presença da primeira.

3.3.3 - Íleo isolado de cobaia

Esse ensaio seguiu o método de MAGNUS (1904). Os animais aqui utilizados foram cobaias de ambos os sexos (300-400g de peso) mantidos em jejum durante 48 horas antes do estudo. Após o sacrifício por intermédio de pancada na nuca seguida de secção dos vasos cervicais, o animal era colocado em decúbito dorsal e feita uma incisão em forma de "V" no seu abdomen. Um segmento da região terminal do íleo (2-3cm) foi retirado, lavado com solução nutritiva de Tyrode e montado adequadamente em uma câmara de vidro contendo 10ml de solução de Tyrode continuamente aerada e mantida a 37°C. Após um período de 30 a 40 minutos, o registro das respostas contráteis à histamina ($3,45 \times 10^{-7}$ M) foi então iniciado um intervalo de 5 minutos antes e após a incubação

da FP (0,5 a 4mg/ml) por 3 minutos. Os registros foram efetuados em um tambor móvel de quimógrafo, através de uma alavanca isotônica de inscrição frontal com uma tensão de 0,5g e uma amplificação de 6 vezes.

3.3.4 - Citotoxicidade

Para verificar a atividade citotóxica da FP, foram utilizadas células KB de Carcinoma Epidermóide Humano (EAGLE, 1955), seguindo o método adotado pelo CNI (National Cancer Institute) (GERAN et al., 1972). As células, cultivadas em meio básico de Eagle (EAGLE, 1959) com 10% de soro fetal bovino e antibiótico (Penicilina, Estreptomicina e Kanamicina - 100µg/ml), foram repicadas 24 horas antes do teste em monoextrato (PENSO & BALDUCCI, 1962), removidas com 0,25% de tripsina (EDWARDS & FOGH, 1959), sendo diluídas no meio a 30.000 células/ml.

A substância-teste (FP) e 6-mercaptopurina foram utilizadas no experimento, sendo que a primeira foi diluída no meio em concentrações de 100, 10, 1,0 e 0,1µg/ml, e, finalmente, o material foi incubado a 37°C por 72 horas numa atmosfera com 5% de CO₂.

A atividade da substância testada foi avaliada mediante a dose-resposta de citotoxicidade que consta no protocolo 1600 do CNI (GERAN et al., 1972).

Esse ensaio foi realizado no Departamento de Antibióticos da UFPE com a colaboração da Profa. Silene Carneiro do Nascimento.

3.4 - Métodos Estatísticos

Os resultados obtidos que exigiram uma análise estatística foram expressos como MÉDIA + S.E.M. A significância estatística foi calculada de acordo com o teste "t de Student", obedecendo aos níveis de significância de $p < 0,05$ e $p < 0,01$. Sempre que necessário, os resultados eram submetidos à análise de variância.

4 - RESULTADOS

4.1 - Experimentos "in vivo"

4.1.1 - Toxicidade aguda e efeitos comportamentais

Os principais sinais apresentados pelos camundongos com a administração intraperitoneal ou oral da fração purificada (FP) numa dose acima de 250mg/kg, foram: aumento da atividade motora espontânea durante 20 minutos e em seguida redução gradual desta, aparecimento de áreas de sudorese e diarreia acompanhada de secreção mucosa, efeitos estes observados 2 horas após o tratamento. Com doses acima de 500mg/kg i.p. ou p.o., os animais demonstraram sinais de broncoconstrição, convulsões, parada respiratória e morte. Todas as mortes aconteceram dentro de 24 horas.

A dose de 250mg/kg p.o. ou i.p., não produziu nenhuma morte dentro de 72 horas, assim como o grupo controle tratado com veículo não apresentou qualquer alteração comportamental.

A DL_{50} da FP administrada intraperitonealmente foi de 345 ± 11 mg/kg e oralmente de 975 ± 99 mg/kg, segundo o método de MILLER & TAINTER (1944).

4.1.2 - Ação antiinflamatória

4.1.2.1 - Inflamação aguda - edema de pata induzido por carragenina em ratos

Os resultados referentes à ação antiinflamatória da FP sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos, encontram-se na Tabela 1.

A FP nas doses de 100 e 200 mg/kg p.o., reduziu significativamente ($p < 0,05$) o volume (ml) médio do edema de pata induzido por carragenina ($0,85 \pm 0,09$ e $0,69 \pm 0,09$ respectivamente), quando comparado ao grupo controle administrado com veículo ($1,14 \pm 0,03$). A FP nas referidas doses exibiu uma inibição percentual do volume (ml) médio do edema de pata, de 25,4 e 39,5% respectivamente. Essa inibição foi dose dependente, sendo aquela produzida com a dose de 200mg/kg mais próxima à observada com a droga padrão utilizada, fenilbutazona (47,4%), numa dose de 100mg/kg p.o., uma vez que o volume médio do edema de pata deste grupo foi de $0,60 \pm 0,09$.

4.1.2.2 - Lesão granulomatosa induzida por carragenina em ratos

Os resultados obtidos com a FP e fenilbutazona no granuloma induzido por carragenina em ratos, encontram-se demonstrados na Tabela 2.

TABELA 1 - Efeito da fração purificada (FP) de Wilbrandia (cf) verticillata no edema de pata induzido por carragenina em ratos.

Tratamento	Dose oral (mg/kg)	Nº de Animais/Grupo	Volume da pata (ml) Média ± SEM	% de inibição
CONTROLE (veículo)	-	8	1,14 ± 0,03	-
FP	100	8	0,85 ± 0,09*	25,4
	200	8	0,69 ± 0,09*	39,5
FENILBUTAZONA	100	8	0,60 ± 0,09*	47,4

* p < 0,05

TABELA 2 - Efeito da fração purificada (FP) de Wilbrandia (cf) verticillata no granuloma induzido por carragenina em ratos.

Tratamento	Dose oral (mg/kg)	Nº de Animais/grupo	Peso dos granulomas (g) Média ± SEM (% de inibição)
CONTROLE (veículo)	-	6	2,27 ± 0,26
FP	100	6	1,23 ± 0,13* (45,82)
FENILBUTAZONA	100	6	1,82 ± 0,24 (19,82)

* p < 0,05

Os grupos tratados com FP (100mg/kg, p.o.) e fenilbutazona (100mg/kg, p.o.) apresentaram o peso médio dos granulomas de $1,23 \pm 0,13$ e $1,82 \pm 0,24$ respectivamente, com uma inibição em termos percentuais correspondente a 45,8 e 19,8%. Apenas a inibição causada pela FP diferiu estatisticamente do grupo controle ($2,27 \pm 0,26$) a um nível de significância de $p < 0,05$.

4.1.2.3 - Artrite induzida por formaldeído em ratos

O efeito da FP e dexametasona sobre o processo inflamatório crônico induzido por formaldeído, encontra-se demonstrado na Tabela 3 e Figura VIII.

O volume médio das patas (ml) dos grupos tratados com FP (100 mg/kg, p.o.) ou dexametasona (1mg/kg, i.p.), foram significativamente ($p < 0,05$ e $p < 0,01$) menores quando comparados ao grupo controle em alguns dias de tratamento, resultando numa inibição em termos percentuais, no 10º dia de tratamento, de 63,4 e 90,2%, respectivamente. Com a utilização da análise de variância, as diferenças estatísticas entre os grupos durante o período total de tratamento foram demonstradas, a um nível de significância de $p < 0,05$.

4.1.2.4 - Ação sobre a permeabilidade capilar

A ação da FP sobre a permeabilidade capilar induzida por ácido acético em camundongos, encontra-se demonstrada na Tabela 4.

TABELA 3 - Efeito da fração purificada (FP) de Wilbrandia (cf) verticillata na artrite induzida por formaldeído em ratos.

Tratamento	Dose e via de admin. (mg/kg)	Volume da pata em ml - Média ± SEM no dia									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CONTROLE (veículo)	-	0,49 ± 0,03	0,79 ± 0,03	0,56 ± 0,04	0,73 ± 0,04	0,53 ± 0,03	0,45 ± 0,02	0,49 ± 0,03	0,53 ± 0,05	0,46 ± 0,03	0,41 ± 0,03
		(14,29)	(34,18)	(32,14)	(24,66)	(13,21)	(15,56)	(28,57)	(49,06)	(47,83)	(63,42)
F P	100-po	0,42* ± 0,02	0,52** ± 0,04	0,38* ± 0,05	0,55* ± 0,06	0,46 ± 0,04	0,38 ± 0,04	0,35* ± 0,06	0,27** ± 0,09	0,24* ± 0,09	0,15** ± 0,07
		(14,29)	(34,18)	(32,14)	(24,66)	(13,21)	(15,56)	(28,57)	(49,06)	(47,83)	(63,42)
DEXAME- TASONA	1,0-ip	0,35** ± 0,02	0,42** ± 0,05	0,29** ± 0,07	0,32** ± 0,04	0,32** ± 0,03	0,29** ± 0,03	0,21** ± 0,05	0,13** ± 0,05	0,07** ± 0,02	0,04** ± 0,03
		(28,57)	(46,84)	(48,22)	(56,17)	(39,62)	(35,56)	(57,14)	(75,47)	(84,78)	(90,24)

Cada valor representa a média de 6 animais.

O número entre parênteses indica a % de inibição.

* p < 0,05 ** p < 0,01

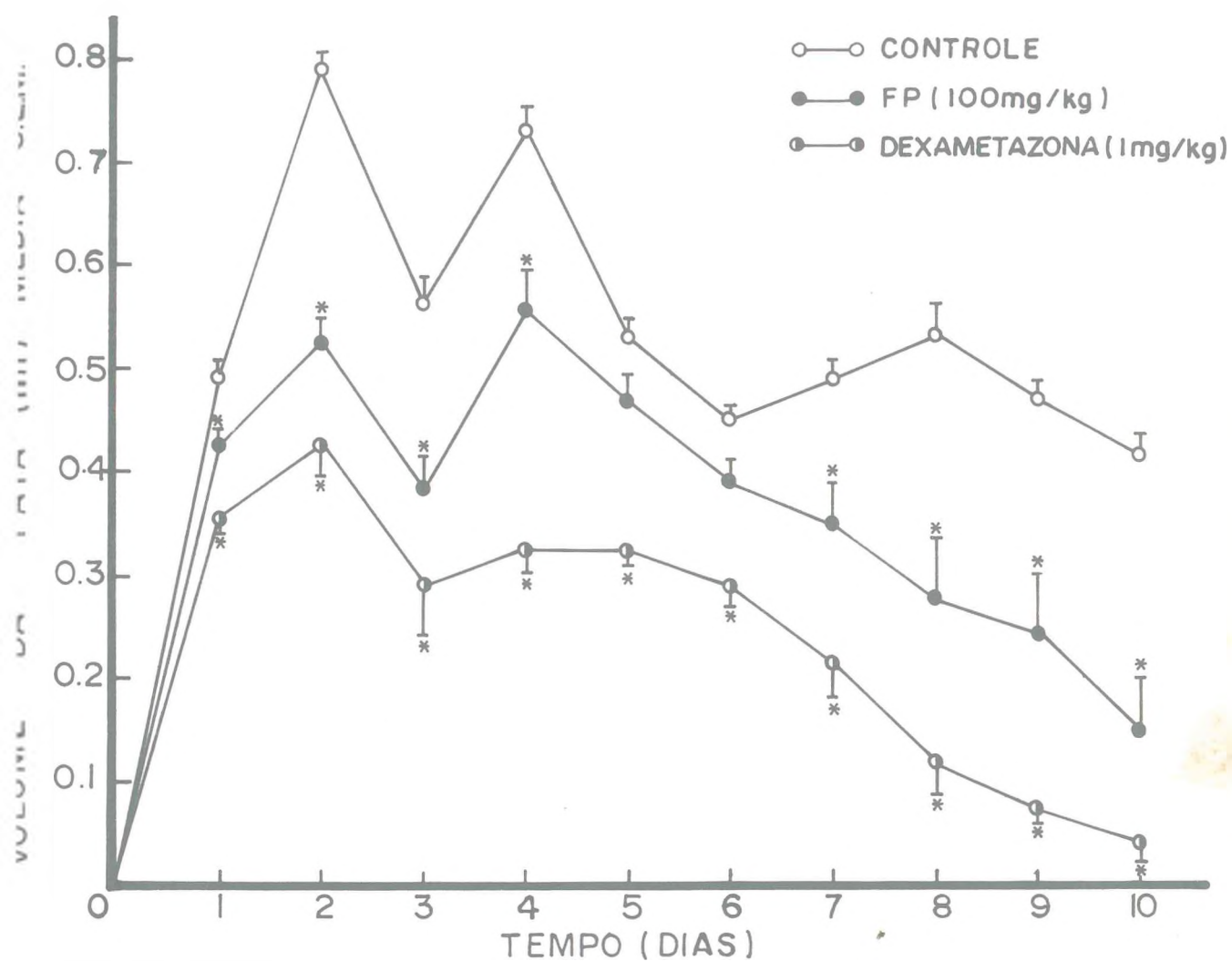


FIGURA VIII - Alteração no volume da pata após indução de artrite por injeção subplantar de formaldeído a 2% no 1º e 3º dia do experimento, em ratos tratados com veículo, FP (100 mg/kg, po) e de xametazona (1 mg/kg, ip) durante 10 dias.

- Os valores são expressos como média \pm SEM provenientes de 8 observações.

(*) $p < 0,05$

TABELA 4 - Efeito da fração purificada (FP) de Wilbrandia (cf) verticillata sobre a permeabilidade capilar induzida por ácido acético em camundongos.

Tratamento	Dose oral (mg/kg)	Nº de Animais/grupo	Extravasamento do corante (Média ± SEM)	% de inibição
CONTROLE (veículo)	-	8	374,26 ± 10,63	-
FP	50	5	115,63 ± 17,40**	69,11
	100	5	36,08 ± 7,24**	90,36
ÁCIDO ACETIL- SALICÍLICO	200	5	141,29 ± 10,49**	62,25

** p < 0,01

Os grupos de animais tratados com FP nas doses de 50 e 100 mg/kg p.o., apresentaram intensidade de coloração relativa ao extravasamento do corante de $115,63 \pm 17,40$ e $36,08 \pm 7,24$, respectivamente, enquanto que, o grupo controle e aquele tratado com a droga padrão utilizada, ácido acetilsalicílico (200mg/kg, p.o.), apresentaram intensidade de coloração de $374,26 \pm 10,63$ e $141,29 \pm 10,49$, respectivamente. A FP demonstrou ter um efeito dose dependente, além de apresentar uma melhor atividade que o ácido acetilsalicílico, uma vez que apresentou percentagens de inibição da permeabilidade capilar de 69,11 e 90,36%, relativas às doses acima, enquanto que o ácido acetilsalicílico inibiu a permeabilidade capilar em 62,25%.

4.1.3 - Ação antifertilidade

4.1.3.1 - Efeito sobre o ciclo estral em camundongos

Os resultados referentes à ação da FP sobre o ciclo estral em camundongos, encontram-se demonstrados na Tabela 5.

Os animais que receberam FP na dose de 100mg/kg p.o., apresentaram-se em estro $2,0 \pm 0,0$; $0,5 \pm 0,22$ e $1,6 \pm 0,24$ vezes no período de pré-tratamento, tratamento e pós-tratamento, respectivamente; enquanto que, os animais pertencentes ao grupo controle apresentaram a fase estro $2,0 \pm 0,0$; $1,67 \pm 0,21$ e $1,83 \pm 0,31$ vezes em relação aos períodos de observação do esfregaço vaginal descritos aci-

TABELA 5 - Efeito da fração purificada (FP) de Wilbrandia (cf) verticillata sobre o ciclo estral em camundongos.

Tratamento	Dose oral (mg/kg)	Nº de Animais/grupo	Média = SEM do número de ocorrência da fase estro/animal		
			Pré-tratamento (10 dias)	Tratamento (10 dias)	Pós-tratamento (10 dias)
CONTROLE (veículo)	-	6	2,0 ± 0,0	1,67 ± 0,21	1,83 ± 0,31
FP	100	6	2,0 ± 0,0	0,5 ± 0,22*	1,6 ± 0,24

* p < 0,05

ma. Quando comparado ao controle, o grupo que recebeu FP apresentou um número significativamente ($p < 0,05$) menor de ocorrência da fase estro por animal observado, durante o período de tratamento. Após este, os animais demonstraram uma clara tendência em voltar a apresentar a fase estro, semelhante ao período pré-tratamento.

4.1.3.2 - Efeito sobre a implantação do ovo fertilizado em ratos

A Tabela 6 demonstra o efeito da FP sobre a implantação em ratos.

A FP nas doses de 100 e 200mg/kg p.o., exibiu um efeito antiimplantação percentual de 33,3% e 66,6% respectivamente, revelando um caráter dose dependente. Com a dose de 100mg/kg p.o. da FP, dentre os quatro animais que conceberam normalmente e apresentaram 8,6,8 e 8 sítios de implantação respectivamente, apenas o primeiro pariu todos os filhotes normais, enquanto que os outros três, demonstraram perda fetal parcial, concebendo 4,6 e 7 filhotes respectivamente. Na dose de 200mg/kg p.o., dentre os dois animais que apresentaram 10 e 9 sítios de implantação respectivamente, aquele portando 10 sítios levou a gravidez a termo com filhotes normais, enquanto que o outro animal perdeu completamente seus filhotes.

4.1.3.3 - Efeito abortivo em ratos

Os resultados oriundos da avaliação do efeito a-

TABELA 6 - Efeito da fração purificada (FP) de Wilbrandia (cf) verticillata sobre a implantação em ratos.

Tratamento	Dose oral (mg/kg)	Nº de animais grávidas/tratadas	% de redução da gravidez	Nº de implantações em cada animal	Nº de animais que levaram a gravidez a termo	Nº de filhotes nascidos para cada animal
CONTROLE (veículo)	-	10/10	0	9,9,10,11,9	10	9,9,10,11,9
				10,9,10,11,9		10,9,10,11,9
FP	100	4/6	33,3	8,0,6,8,8,0	4	8,0,4,6,7,0
	200	2/6	66,6	0,0,0,10,9,0	1	0,0,0,10,0,0

- Todos os animais foram tratados do 1º ao 7º dia da gravidez.

bortivo da FP em ratos, encontram-se demonstrados na Tabela 7.

Os animais tratados com FP nas doses de 100 e 200 mg/kg p.o. do 9º ao 13º dia da gravidez, não apresentaram qualquer sinal de aborto. Entretanto, no 20º dia da gravidez, após o sacrifício dos animais foi verificado que a FP na dose de 200mg/kg p.o., retardou o crescimento fetal (Figura IX) em 5 dos 6 animais tratados, ao mesmo tempo em que, apenas 1 exibiu todos os fetos vivos e normais.

4.1.4 - Atividade estrogênica ou anti-estrogênica

Os resultados referentes à atividade estrogênica ou anti-estrogênica da FP em ratos imaturos, encontram-se demonstrados na Tabela 8.

O peso médio dos úteros dos animais que receberam FP (100mg/kg p.o.) + benzoato de estradiol (0,1µg, sc) (150,33 ± 30,84mg) não foi significativamente diferente quando comparado ao peso médio dos úteros dos animais que receberam apenas benzoato de estradiol (162,67 ± 17,85mg). Da mesma forma, o peso médio dos úteros dos animais administrados com FP (100mg/kg p.o.) + veículo do benzoato de estradiol, (20,33 ± 4,38mg), não diferiu estatisticamente daquele dos animais controle que receberam o veículo da FP + o veículo do benzoato de estradiol (17 ± 1,39mg).

bortivo da FP em ratos, encontram-se demonstrados na Tabela 7.

Os animais tratados com FP nas doses de 100 e 200 mg/kg p.o. de 9º ao 13º dia da gravidez, não apresentaram qualquer sinal de aborto. Entretanto, no 20º dia da gravidez, após o sacrifício dos animais foi verificado que a FP na dose de 200mg/kg p.o., retardou o crescimento fetal (Figura IX) em 5 dos 6 animais tratados, ao mesmo tempo em que, apenas 1 exibiu todos os fetos vivos e normais.

4.1.4 - Atividade estrogênica ou anti-estrogênica

Os resultados referentes à atividade estrogênica ou anti-estrogênica da FP em ratos imaturos, encontram-se demonstrados na Tabela 8.

O peso médio dos úteros dos animais que receberam FP (100mg/kg p.o.) + benzoato de estradiol (0,1ug, sc) ($150,33 \pm 30,84$ mg) não foi significativamente diferente quando comparado ao peso médio dos úteros dos animais que receberam apenas benzoato de estradiol ($162,67 \pm 17,85$ mg). Da mesma forma, o peso médio dos úteros dos animais administrados com FP (100mg/kg p.o.) + veículo do benzoato de estradiol, ($20,33 \pm 4,38$ mg), não diferiu estatisticamente daquele dos animais controle que receberam o veículo da FP + o veículo do benzoato de estradiol ($17 \pm 1,39$ mg).

TABELA 7 - Efeito abortivo da fração purificada (FP) de Wilbrandia (cf) verticillata em ratos.

Tratamento	Dose oral (mg/kg)	Nº de animais/ grupo	Nº de fetos vivos no 20º dia da gravidez/ animal
CONTROLE (veículo)	-	10	9,11,9,10,12 10,11,10,9,10
	100	6	8,8,8,8,10,9
FP	200	6	0,0,0,0,0,9

- Todos os animais foram tratados do 9º ao 13º dia da gravidez sendo sacrificados no 20º dia.

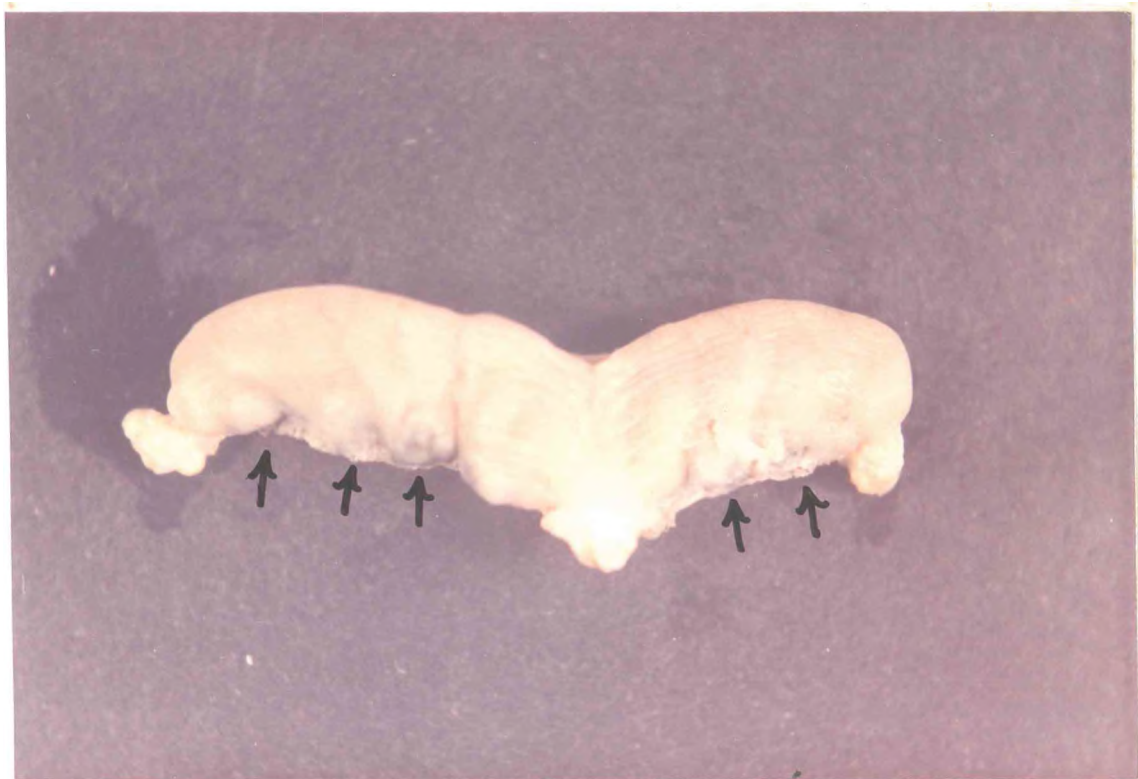


FIGURA IX - Efeito da FP (200 mg/kg, po) sobre a gravidez em ratos, quando estes eram tratados do 9º ao 13º dia da gestação. As setas indicam a presença de fetos mortos, demonstrando citotoxicidade.

TABELA 8 - Atividade estrogênica ou anti-estrogênica da fração purificada (FP) de Wilbrandia
(cf) verticillata em ratos.

Tratamento	Dose e via de admin.	Nº de Animais/grupo	Peso corporal(g) Média ± SEM	Peso do útero(mg) Média ± SEM
CONTROLE (veículo)	-	6	36 ± 1,50	17 ± 1,39
BENZOATO DE ESTRADIOL (BE)	0,1µg, sc	6	24,67 ± 1,26	162,67 ± 17,85
FP +	100mg/kg, p.o.	6	24 ± 0,58	150,33 ± 30,84
BE FP + (veículo)	0,1µg, sc 100mg/kg, p.o.	6	24,5 ± 0,72	20,33 ± 4,38

4.1.5 - Ação laxativa

O efeito laxante da FP e Isocucurbitacina B em camundongos, encontra-se demonstrado na Tabela 9.

As doses de 25 e 50mg/kg p.o. da FP, aumentaram o número médio de evacuações dos animais durante um período total de 6 horas ($5,33 \pm 0,99$ e $9,33 \pm 1,71$ respectivamente) quando comparado ao grupo controle ($4 \pm 0,86$). Apenas a dose de 50mg/kg p.o., exibiu um efeito significativo ($p < 0,05$) e semelhante ao da droga padrão, Isocucurbitacina B, numa dose de 0,5mg/kg p.o. ($8,17 \pm 1,35$), sendo este estatisticamente diferente ao mesmo nível de significância.

4.2 - Experimentos "in vitro"

4.2.1 - Reto abdominal de sapo

A FP quando adicionada ao banho nas concentrações de 0,5 a 4mg/ml, reduziu de maneira concentração-dependente as contrações provocadas pela acetilcolina ($1,1 \times 10^{-7}$ M), mas não alterou as respostas ao Cloreto de potássio (4×10^{-4} M) nem à cafeína (3×10^{-2} M) (Figura X). O bloqueio produzido pela FP foi reversível em cerca de 30 minutos após lavagem do tecido. A IC_{50} (concentração da FP(mg/ml) requerida para produzir 50% de inibição da resposta do agonista) foi $0,41 \pm 0,05$ mg/ml para a acetilcolina. A FP não demonstrou nenhum efeito "per si" sobre o tecido utilizado. A adição de veículo ao banho também não provocou nenhuma altera-

TABELA 9 - Efeito laxante da fração purificada (FP) de Wilbrandia (cf) verticillata e da Iso cucurbitacina B em camundongos.

Tratamento	Dose oral (mg/kg)	Nº de animais/ grupo	Nº de evacuações/ 6 horas Média ± SEM
CONTROLE (veículo)	-	8	4 = 0,86
FP	25	8	5,33 = 0,99
	50	8	9,33 = 1,71*
ISOCUCURBITACINA B	0,5	8	8,17 = 1,35*

* p < 0,05

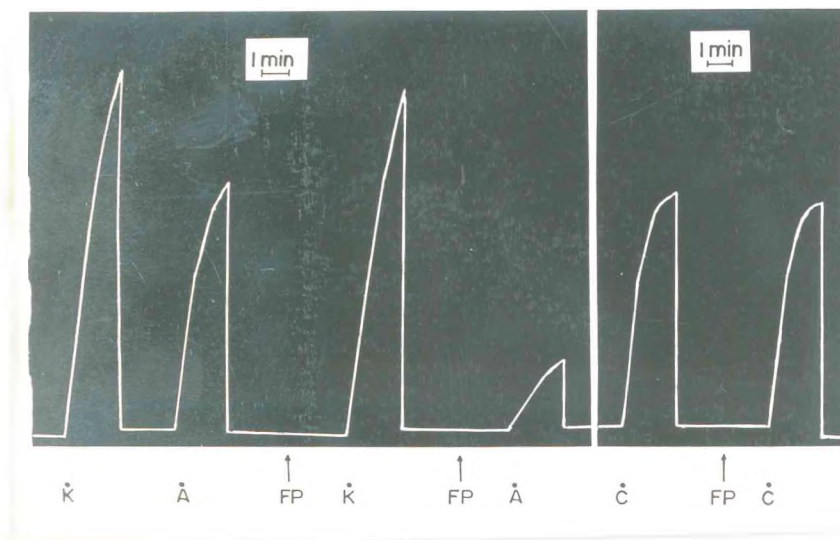


FIGURA X - Efeito da FP nas contrações evocadas pelo cloreto de potássio ($4 \times 10^{-4} M$), acetilcolina ($1,1 \times 10^{-7} M$) e cafeína ($3 \times 10^{-2} M$) em reto abdominal de sapo.

K → Cloreto de potássio
 A → Acetilcolina
 C → Cafeína
 FP → FP (0,4 mg/ml)

ção nas contrações da acetilcolina.

4.2.2 - Útero isolado de rata não prenha

As respostas contráteis provocadas por acetilcolina ($5,5 \times 10^{-6}$ M), serotonina ($2,84 \times 10^{-6}$ M), bradicinina ($1,89 \times 10^{-7}$ M), ocitocina ($2,98 \times 10^{-12}$ M), cloreto de bário ($1,5 \times 10^{-3}$ M), e cloreto de potássio (1×10^{-4} M), foram inibidas de maneira concentração-dependente quando a FP foi incubada em concentrações crescentes (0,5 a 4mg/ml) no banho (Figura XI, XII e XIII). Essa inibição foi reversível em cerca de 30 minutos após lavagem do tecido. As IC_{50} (mg/ml) para os agonistas empregados foram $0,24 \pm 0,05$; $0,29 \pm 0,06$; $0,06 \pm 0,01$; $0,15 \pm 0,11$ e $0,25 \pm 0,06$ respectivamente (Tabela 10 e Figura XIV). Com a incubação de concentrações crescentes de cálcio (1,2 e 1,8 mM) a resposta contrátil à acetilcolina foi gradativamente restaurada, tendendo à reversão (Figura XIII).

A FP não apresentou nenhum efeito "per si" sobre este tecido, assim como o seu veículo não influenciou as respostas aos agonistas estudados.

4.2.3 - Íleo isolado de cobaia

A adição de FP nas concentrações de 0,5 a 4mg/ml potenciou ligeiramente ou não alterou a resposta à histamina ($3,45 \times 10^{-7}$ M). Quando havia potenciação, esta possuía um caráter concentração-dependente. A FP não exibiu nenhum efeito "per si", bem como o seu veículo também não influen-

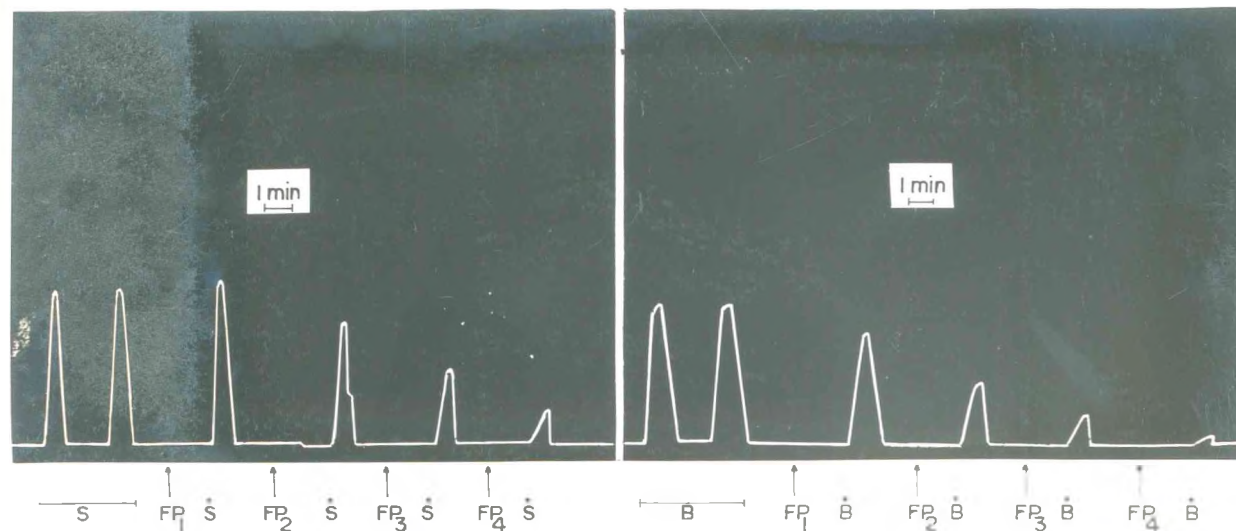


FIGURA XI - Efeito da FP nas contrações evocadas por serotonina ($2,84 \times 10^{-6}$ M) e bradycinina ($1,89 \times 10^{-7}$ M) em útero isolado de rata.

- S → Serotonina na ausência da FP.
- B → Bradycinina na ausência da FP.
- FP → FP (0,05 mg/ml)
- FP₁ → FP (0,1 mg/ml)
- FP₂ → FP (0,2 mg/ml)
- FP₃ → FP (0,3 mg/ml)
- FP₄ → FP (0,4 mg/ml)

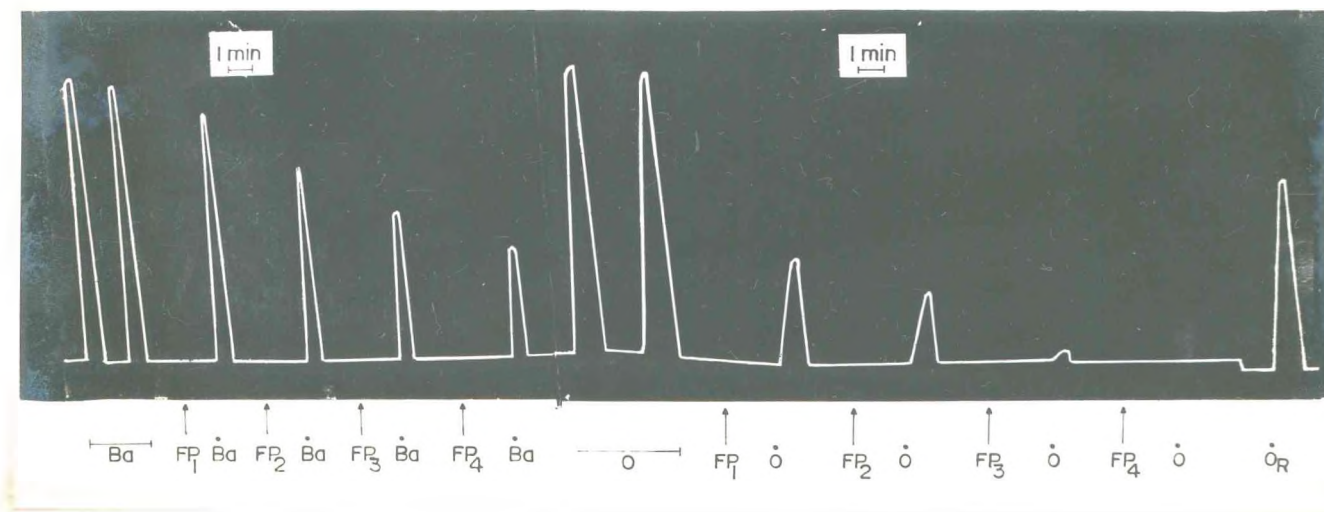


FIGURA XII - Efeito da FP nas contrações induzidas por cloreto de bário ($1,5 \times 10^{-3}M$) e ocitocina ($2,98 \times 10^{-12}M$) em útero isolado de rata.

Ba → Cloreto de bário na ausência da FP.

O → Ocitocina na ausência da FP.

FP₁ → FP (0,05 mg/ml)

FP₂ → FP (0,1 mg/ml)

FP₃ → FP (0,2 mg/ml)

FP₄ → FP (0,4 mg/ml)

O_R → Ocitocina 20 minutos após a retirada da FP do banho.

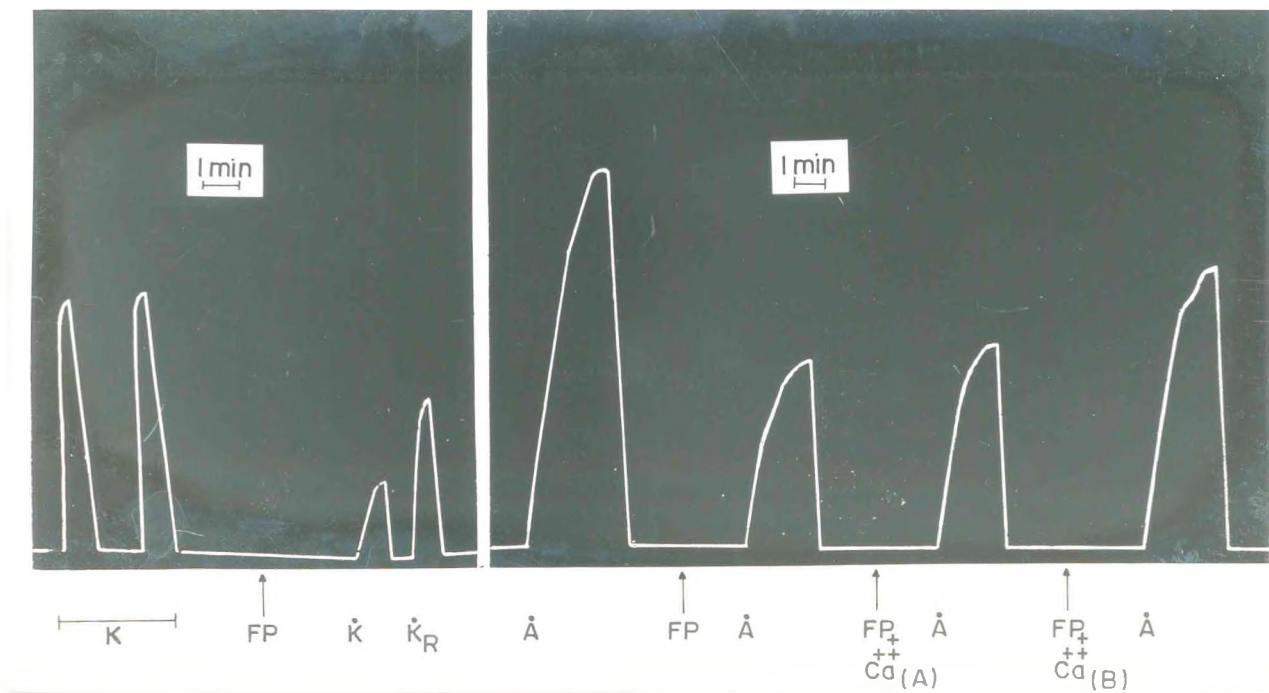


FIGURA XIII- Efeito da FP nas contrações provocadas pelo cloreto de potássio ($1 \times 10^{-4}M$) e acetilcolina ($5,5 \times 10^{-6}M$) em útero isolado de rata.

- K₀ → Cloreto de potássio na ausência da FP
- A → Acetilcolina na ausência da FP
- FP → FP (0,4 mg/ml)
- FP + Ca⁺⁺ (A) → FP (0,4 mg/ml) + Cloreto de cálcio (1,2 mM)
- FP + Ca⁺⁺ (B) → FP (0,4 mg/ml) + Cloreto de cálcio (1,8 mM)
- K_R → Cloreto de potássio 10 minutos após a retirada da FP do banho.

TABELA 10 - Efeito da fração purificada (FP) de Wilbrandia (cf) verticillata sobre as contrações induzidas por agonistas em útero isolado de rata.

Agonistas	Dose(M)	Porcentagem de redução da resposta contrátil em presença de FP nas doses de (mg/ml):				Valor da IC ₅₀ (mg/ml) da FP (MÉDIA ± SEM)
		0,05	0,1	0,2	0,4	
Acetilcolina	5,5 x 10 ⁻⁶	19,01	27,35	42,00	65,95*	0,24 ± 0,05
5-Hidroxitriptamina	2,84 x 10 ⁻⁶	3,56	17,1	44,4*	64,18*	0,29 ± 0,06
Bradicinina	1,89 x 10 ⁻⁷	48,17*	64,75*	78,97*	88,48*	0,06 ± 0,01
Ocitocina	2,98 x 10 ⁻¹²	46,28*	63,12*	78,67*	85,22*	0,15 ± 0,11
Cloreto de Bário	1,5 x 10 ⁻³	18,45	34,06	46,85*	61,46*	0,25 ± 0,06

* p < 0,05

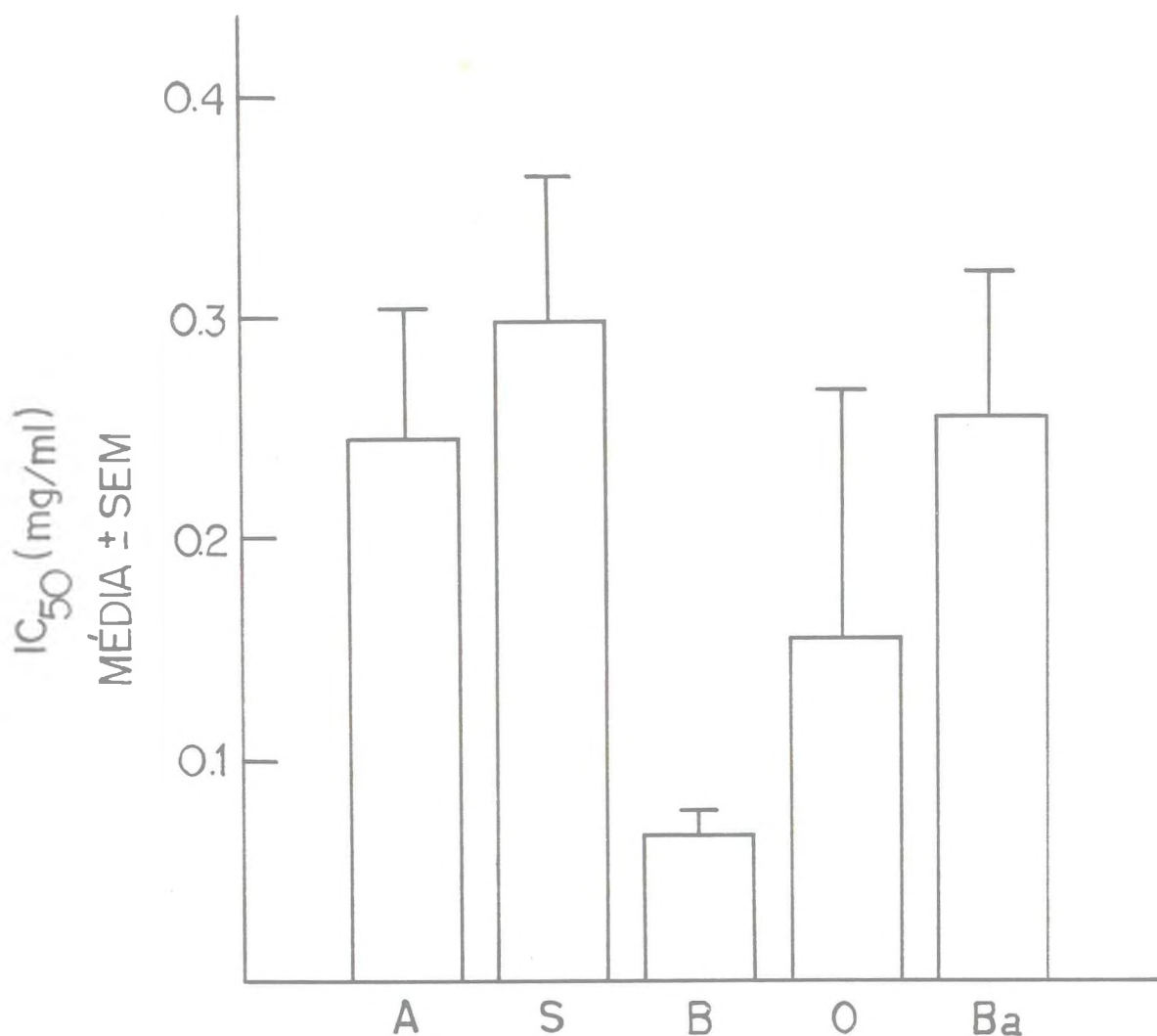


FIGURA XIV - Concentração da FP (mg/ml) necessária para inibir 50% (IC₅₀) das respostas à acetilcolina, serotonina, bradicinina, ocitocina e cloreto de bário em útero isolado de rata.

A → Acetilcolina ($5,5 \times 10^{-6}$ M)

S → Serotonina ($2,84 \times 10^{-6}$ M)

B → Bradicinina ($1,89 \times 10^{-7}$ M)

O → Ocitocina ($2,98 \times 10^{-12}$ M)

Ba → Cloreto de bário ($1,5 \times 10^{-3}$ M)

ciou a resposta ao agonista acima. Os resultados são vistos na Figura XV.

4.2.4 - Citotoxicidade

A FP quando testada em células KB de Carcinoma Epidermóide Humano "in vitro", exibiu uma DE_{50} (dose que inibe 50% do crescimento celular) em torno de 12ug/ml. Enquanto que, a droga padrão utilizada para comparação, 6-mercaptopurina, apresenta DE_{50} entre 0,05 e 0,5ug/ml (Cancer Chemotherapy Reports, 1972).

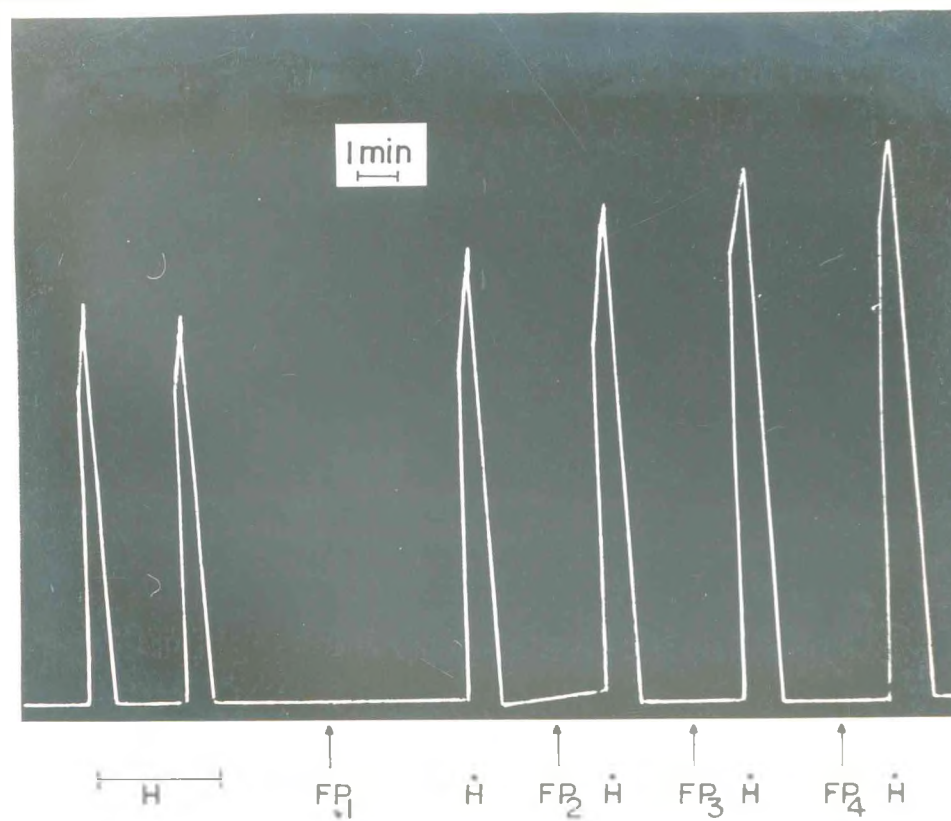


FIGURA XV - Efeito da FP nas contrações produzidas pela histamina ($3,45 \times 10^{-7} M$) em íleo iso lado de cobaia.

- H - Histamina na ausência da FP
 FP₁ - FP (0,05 mg/ml)
 FP₂ - FP (0,1 mg/ml)
 FP₃ - FP (0,2 mg/ml)
 FP₄ - FO (0,4 mg/ml)

5 - DISCUSSÃO

As cucurbitacinas, substâncias originadas de diversas plantas pertencentes às mais variadas famílias, são possuidoras de importantes atividades farmacológicas, como: ação citotóxica, antineoplásica, antiinflamatória, antifertilidade, hepatoprotetora, anti-helmíntica e laxativa. Entretanto os dados concernentes a essas atividades ainda não dizem respeito a todas as substâncias já isoladas. Dentre as principais cucurbitacinas que apresentam propriedades farmacológicas, encontram-se aquelas que receberam a denominação de: B, C, D, F, F, I, diidroelatericina A e os glicosídeos das cucurbitacinas E e I (Figuras II e III).

O advento de um novo grupo de norcucurbitacinas aromáticas, inicialmente formado pelo Fevicordin A e seu glicosídeo isolados de Fevillea cordifolia (ACHENBACH et al., 1987), e, mais tarde, pelos glicosídeos Wv₁ e Wv₂ isolados de Wilbrandia (cf) verticillata (MATOS et al., 1988) (Figura IV), despertou o interesse em atribuir-lhes ou não atividades semelhantes às conhecidas, tendo início o estudo de suas possíveis ações farmacológicas. O Fevicordin A e seu glicosídeo demonstraram ação antiinflamatória em modelos animais de inflamação (ACHENBACH et al., 1987). O presente trabalho veio esclarecer algumas propriedades perti-

mentes a Wv_1 e Wv_2 , bem como fornecer uma base farmacológica para o uso popular da raiz da referida planta. A fração purificada contendo as substâncias acima apresentou ação antiinflamatória, antifertilidade e laxativa significantes, nos modelos experimentais utilizados.

No ensaio de toxicidade aguda a fração exibiu uma DL_{50} de 975 ± 99 mg/kg quando administrada por via oral, e 345 ± 11 mg/kg com a administração intraperitoneal em camundongos. As cucurbitacinas geralmente apresentam DL_{50} oral entre 5 e 340 mg/kg. Contudo, os glicosídeos das cucurbitacinas E e I apresentam DL_{50} oral de 40 e 650 mg/kg, respectivamente (LE MEN et al., 1969). Os Wvs glicosídicos demonstraram toxicidade aguda ainda mais baixa que as substâncias citadas.

Dentre os diversos sinais apresentados pelos animais 2 horas após a administração da fração, encontra-se o aparecimento de áreas de sudorese, sinal este que pode estar relacionado ao uso popular de Wilbrandia (cf) verticillata em manifestações febris (BRAGA, 1953).

Segundo KONOPA et al. (1974), a toxicidade das cucurbitacinas em geral é excepcionalmente alta, sendo possível a correlação entre sua citotoxicidade e toxicidade aguda (DL_{50}). A DE_{50} (dose que inibe 50% do crescimento celular) de $1\mu\text{g/ml}$ foi utilizada como critério de atividade citotóxica recomendado pelo CCNSC (Cancer Chemotherapy National Service Center, USA) (KONOPA et al., 1969; LEITER et al., 1962). Com base nesse critério, as cucurbitacinas B

(DE₅₀ = 0,005µg/ml), D (DE₅₀ = 0,005-0,01µg/ml) e I (DE₅₀ = 0,005-0,01µg/ml) exibem tanto ação citotóxica quanto toxicidade aguda elevadas, enquanto que J (DE₅₀ = 0,1-1µg/ml) e K (DE₅₀ = 0,1-1µg/ml) apresentam tanto toxicidade quanto citotoxicidade reduzidas. Já a cucurbitacina E (DE₅₀ = 0,01 µg/ml) constitui uma exceção, uma vez que possui atividade citotóxica significativa, aliada a uma toxicidade relativamente baixa. Os Wvs, integrantes do novo grupo de norcucurbitacinas, exibiram ação citotóxica relativamente baixa em bora satisfatória em células KB, apresentando DE₅₀ de 12 µg/ml. Em comparação às cucurbitacinas anteriormente isoladas, as novas substâncias presentes na fração purificada, mostraram-se menos tóxicas, quer em relação à sua toxicidade aguda quer à sua citotoxicidade.

LE MEN et al. (1969) sugerem que a hidrogenação da dupla ligação entre C-1 e C-2, a presença de um grupo metil em C-9 e de uma hidroxila em C-25, bem como de uma ligação dupla entre C-23 e C-24 elevam notavelmente a toxicidade. Por outro lado, a esterificação das hidroxilas da parte osídica da molécula e da aglicona, assim como a presença de um grupo acetil em C-25 diminuem a toxicidade dos compostos. Uma das características químicas supostamente mais relacionadas à toxicidade, seria a presença da dupla ligação na cadeia lateral, entre C-23 e C-24. Em relação aos constituintes da fração, ambos possuem um grupo metil em C-4, com os anéis A, B, C e D idênticos, diferindo quanto à cadeia lateral, já que Wv₁ possui uma hidroxila em C-25 enquanto que Wv₂ possui um grupo acetil

nessa posição, além de uma dupla ligação entre C-23 e C-24. Com base no exposto acima, Wv_2 parece contribuir mais que Wv_1 para a toxicidade exibida pela fração, além de encontrar-se em maior concentração na mesma.

Os Wvs presentes na fração purificada de Wilbrandia (cf) verticillata demonstraram uma considerável ação laxativa numa dose de 50mg/kg po, enquanto que a 25mg/kg po não produziram efeito significativo.

Dentre as cucurbitacinas clássicas, B, C, E e e-laterinida (β -glicosídeo da cucurbitacina E) exibem ação laxativa marcante, numa dose igual ou inferior a 5mg/kg po. Outras cucurbitacinas, quando apresentam atividade laxante, o fazem numa dose mais elevada, como é o caso da cucurbitacina I, inativa a 5mg/kg po, mas, a 25mg/kg po desempenha uma boa atividade, no mesmo modelo experimental utilizado no presente trabalho (LE MEN et al., 1969). Portanto, as novas substâncias demonstram uma menor potência laxante quando comparadas àquelas até então isoladas que possuem esse tipo de atividade.

LE MEN et al. (1969) correlacionam a estrutura com a atividade laxante de várias cucurbitacinas, bem como de alguns de seus glicosídeos. Supõe-se que a presença de um grupamento acetil em C-25 no lugar de uma hidroxila, de uma ligação dupla entre C-23 e C-24, de uma carbonila em C-22 e de uma hidroxila no carbono terciário em C-20, desempenhe um papel importante no sentido de condicionar a atividade laxante. Ao mesmo tempo, supõe-se que a cadeia lateral como um todo, seja um elo indispensável entre a estrutura

dessas substâncias e seu efeito laxante.

De acordo com as características químicas dos compostos estudados, Wv_2 parece ser o principal responsável pela atividade laxante, desde que possui todos os requisitos abordados acima.

As drogas laxantes agem basicamente aumentando o peristaltismo intestinal, as secreções, ou reduzindo a absorção de água e eletrólitos. Podem alterar a tensão superficial da massa fecal, facilitando a penetração de água e gorduras nesta, elevar a permeabilidade da mucosa, proporcionando o aumento de secreções e acúmulo de fluido no lúmen intestinal, ou ainda podem reter água na luz intestinal por osmolaridade.

O mecanismo de ação dos Wvs como agentes laxantes ainda não se encontra inteiramente elucidado. Cogita-se a hipótese de que venham a agir aumentando as secreções mucosas do trato gastrointestinal, provavelmente por um efeito direto sobre as células a esse nível, pois, quando da realização do ensaio de toxicidade aguda da fração, esta aumentou as secreções de um modo geral nos animais observados. Dificilmente poderão vir a agir a nível de Sistema Nervoso Central, pois tratam-se de substâncias de peso molecular relativamente elevado e baixa lipossolubilidade. Presume-se que o aumento do peristaltismo não esteja envolvido, já que a fração não demonstrou esse tipo de ação em músculo intestinal isolado.

O largo emprego da raiz de Wilbrandia (cf) verti-

cillata na medicina popular como anti-reumática, levou-nos a avaliar o seu potencial antiinflamatório em modelos animais de inflamação.

A artrite reumatóide é uma doença inflamatória crônica, sistêmica, de etiologia desconhecida, caracterizada pela deformidade e destruição progressiva da articulação, bem como por manifestações extra-articulares (RODNAN & SCHUMACHER, 1983). Além da artrite, outras doenças reumáticas também se desenvolvem com a presença de frequentes exacerbações, sendo responsáveis por um número significativo de mortalidade, bem como de invalidez. As exacerbações ou remissões espontâneas (DECKER, 1984) estão associadas a alterações progressivas e prolongadas no bem estar nutricional do paciente. Já que a desordem é sistêmica, funcional e metabólica, o estado geral pode ser afetado, alterando a ingestão, digestão, absorção ou excreção de nutrientes (RODNAN & SCHUMACHER, 1983; ROBINSON, 1981).

Embora a etiologia da artrite reumatóide ainda seja desconhecida, existe uma forte evidência de que a inflamação imunologicamente mediada, constitua a principal causa de destruição articular (STUART et al., 1988). Tem sido proposto ainda, que as reações celulares no tecido sinovial circundante às junções envolvidas, podem originar mediadores que atraem células inflamatórias e levam à destruição da cartilagem (HARRIS, 1985).

Os principais mediadores envolvidos na artrite reumatóide, são: A IL-1 (Interleucina 1), que parece ser o

principal mediador das respostas agudas presentes em invasões microbianas, reações imunológicas, inflamação e injúria tissular. Esta seria ainda um mediador central da artrite reumatóide, com base num grande número de evidências experimentais, porque poderia contribuir para a produção e liberação de PGE_2 e enzimas líticas da cartilagem e células sinoviais (SCHNYDER & PAYNE, 1985), para a erosão do tecido ósseo e cartilaginoso (TYLER, 1985; GOWEN et al., 1983; THOMSON et al., 1985), bem como para a fibrose observada (SCHMIDT et al., 1982; KRANE et al., 1985). A PGE_2 (Prostaglandina E_2) seria o principal representante da via da ciclooxygenase e, juntamente com a prostaciclina, levariam à dor articular (BALINT et al., 1977), provavelmente sensibilizando os receptores da dor ao estímulo químico. O LTB_4 (Leucotrieno B_4) já foi detectado no líquido sinovial, e, sua concentração neste parece ser elevada (GOETZL et al., 1988). O TNF (Fator de necrose tumoral) também pode estar envolvido, já que induz a produção de colagenase e PGE_2 pelas células sinoviais (DAYER et al., 1985), estimula a reabsorção óssea (BERTOLINI et al., 1986), além de possuir outras ações.

A IL-1 é sintetizada quando células fagocíticas, primariamente macrófagos, são ativadas, mediante baixas concentrações de endotoxinas ou fagocitose de algumas bactérias.

Os fagócitos ativados na junção reumatóide, também geram compostos oxidantes, como o radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidróxi ($-OH$) e o ácido hipocloroso ($HOCl$), os quais, posteriormente, con

tribuem para o dano tissular (HALLWELL et al., 1988).

Segundo RODNAN & SHUMACHER (1983), existem pelo menos sete classes de drogas empregadas no tratamento da artrite reumatóide. São elas: 1) Salicilatos, 2) Antiinflamatórios não-hormonais, 3) Esteróides, 4) Antimaláricos, 5) Sais de ouro, 6) D-penicilamina e 7) Agentes imunossuppressores. Algumas dessas substâncias têm por finalidade a remissão da doença, enquanto que outras visam o combate apenas das manifestações inflamatórias. Devido aos efeitos adversos dos agentes remissivos, as drogas antiinflamatórias são, em geral, as mais utilizadas nos esquemas terapêuticos, embora não correspondam às expectativas de cura do processo patológico. Por esta razão, a busca de uma droga anti-reumática ideal continua. É provável que a inibição da síntese ou o antagonismo da ligação da IL-1 a receptores específicos, alivie muitos dos sintomas da doença, além de lentificar ou deter o processo de erosão tissular (HENDERSON et al., 1987).

A fração purificada contendo Wv_1 e Wv_2 , exibiu uma potente inibição do edema de pata induzido por carrageenina, (100 e 200 mg/kg po) bem como da lesão granulomatosa induzida pelo mesmo agente em ratos, numa dose de 100 mg/kg po. Mostrou-se também efetiva a 100 mg/kg po, no modelo de artrite induzida por formaldeído em ratos. Dessa maneira, revelou-se ativa tanto na fase exsudativa quanto proliferativa da inflamação.

Embora o modelo empregado no presente estudo não seja imunológico e não tenha relevância direta para a doen-

ça humana, existe uma excelente correlação entre os efeitos antiinflamatórios de um grande número de drogas testadas por esse método e sua eficácia clínica na artrite reumatóide (LOMBARDINO et al., 1975).

A fração apresentou ainda redução dose-dependente da permeabilidade vascular, nas doses de 50 e 100 mg/kg po. A cucurbitacina B revelou uma ação semelhante a 5,9 mg/kg po no mesmo modelo experimental, demonstrando 70% de atividade (YESILADA et al., 1988). Contudo, os autores utilizaram apenas a diminuição da permeabilidade vascular como parâmetro para atividade antiinflamatória, sem avaliar a substância em outros modelos animais de inflamação. Por outro lado, a cucurbitacina D produziu aumento considerável da permeabilidade vascular, quando testada na pele de ratos (EDERY et al., 1961). Essa discrepância de efeitos deve-se certamente à diferença estrutural entre os referidos compostos. De acordo com a sua conformação estrutural, algumas características químicas podem estar relacionadas às suas atividades biológicas. Uma delas seria a presença do acetato em C-25 na Cucurbitacina B e no Wv_2 , o que poderia ter influenciado a redução da permeabilidade vascular demonstrada por essas substâncias. No entanto, a Cucurbitacina D apresenta em lugar do acetato, uma hidroxila nessa posição. Nesse caso, essa característica pode estar relacionada ao aumento da permeabilidade exibido pela substância.

Recentemente, vários dados sobre o mecanismo de ação de cucurbitacinas têm surgido na literatura. Eles di-

zem respeito à alteração de sistemas bioquímicos, o que explicaria o efeito antiinflamatório, além de outros efeitos observados in vivo. Os dados incluem: i) ligação a receptores glicocorticóides, o que parece ser uma etapa necessária para a ação citotóxica dessas substâncias (WITKOWSKI & KONOPA, 1981); ii) inibição da biossíntese de ácido desoxirribonucleico e ribonucleico em células HeLa S₃, o que pode explicar a ação antitumoral de cucurbitacinas (WITKOWSKI et al., 1984) e iii) inibição da biossíntese de eicosanóides, particularmente LTB₄ (leucotrieno B₄) em leucócitos humanos (PANOSYAN, 1985).

Os metabólitos do ácido araquidônico desempenham um papel primordial na expressão das respostas inflamatórias, por atuarem como mediadores da dor, febre e permeabilidade vascular aumentada, assim como formação de edema (LARSEN & HENSEN, 1983). O leucotrieno B₄, além de ser o principal metabólito do ácido araquidônico de neutrófilos (SAMMUELSON, 1983), é considerado o fator quimiotático lipídico mais potente para leucócitos polimorfonucleares (GOLDMAN et al., 1987), demonstrando uma atividade tal, que excede a de outros eicosanóides em cerca de 100 vezes (MARCUS, 1985). E, como o mesmo já foi detectado no líquido sinovial em concentrações elevadas, é concebível que a inibição da biossíntese de LTB₄ pelos Wvs glicosídicos, explique a ação antiinflamatória bem como a redução da permeabilidade vascular observadas. Ao mesmo tempo, a baixa citotoxicidade exibida por esses compostos também pode contribuir para esse tipo de ação. Compostos citotóxicos como ciclofosfamida

e metotrexato têm inibido o edema agudo induzido por carra
genina em ratos (MENEZES & RAO, 1986), e produzido efeitos
benéficos no tratamento da artrite reumatóide, em pacientes
refratários à terapia com antiinflamatórios clássicos (FU-
SDICLE, 1968; WILKE et al., 1987). Como a fração produz um
efeito antiinflamatório significativo a 100 mg/kg po, o que
corresponde a aproximadamente 1/10 da DL₅₀, seria interes-
sante a continuação do trabalho, no sentido de avaliar a
sua eficácia em modelos imunológicos de inflamação, bem co-
mo estudar sua toxicidade crônica em animais, antes que a
mesma pudesse ser testada clinicamente em pacientes reumáti-
cos.

Com base no uso clandestino da raiz de Wilbrandia
(cf) verticillata como anticoncepcional e abortiva, verifi-
cou-se seu efeito sobre a fertilidade em animais de labora-
tório. A fração purificada da planta preveniu de modo rever-
sível a ocorrência da fase estro do ciclo reprodutivo de ca-
mundongos a 100 mg/kg po, indicando um possível efeito anti-
ovulatório. Esse efeito se deve provavelmente a uma interfe-
rência com o funcionamento normal do eixo hipotálamo-hipófi-
se-ovário ou mesmo do próprio ovário. A implantação do ovo
fertilizado em ratos foi significativamente e de maneira dose-depen-
dente inibida, assim como a manutenção da gravidez afetada, quando
os animais eram tratados com a fração do 1º ao 7º dia da
gravidez. A ação antiimplantação bem como sobre a manuten-
ção da gravidez, podem estar relacionadas a uma supressão
da síntese hormonal ovariana, ou a um aumento da motilidade
uterina. Entretanto, quando testada em útero isolado de ra-

ta, a fração não produziu qualquer efeito estimulante "per si", nem tão pouco potenciou as contrações induzidas pela ocitocina, e, em ratos imaturos, não demonstrou nenhum efeito estrogênico ou anti-estrogênico.

A atividade oral assim como a reversibilidade, são características importantes para que uma droga seja considerada um contraceptivo útil no controle da fertilidade. Como a fração é portadora dessas características, supõe-se que a mesma possa vir a ser utilizada com essa finalidade.

Quando a fração foi administrada do 9º ao 13º dia da gravidez, numa dose de 100 mg/kg po, nada foi observado em relação à interrupção desta ou ação abortiva. No entanto, a dose de 200 mg/kg po, revelou um retardo no crescimento fetal, indicando inerente citotoxicidade.

Dentre as cucurbitacinas conhecidas, apenas a diidroelatericina A, um derivado da elatericina A (Cucurbitacina D), demonstrou esse tipo de atividade, exibindo efeito anti-ovulatório em camundongos, e, ao mesmo tempo, não apresentando nenhum efeito antagônico ou sinérgico do estrógeno exógeno (SHOHAT et al., 1972). A diidroelatericina A possui uma certa semelhança estrutural com Wv_1 presente na fração. Ambas apresentam uma hidroxila em C-25, e não possuem a dupla ligação na cadeia lateral entre C-23 e C-24. Provavelmente, essas características estão envolvidas nos efeitos demonstrados pelas substâncias acima.

O efeito antiimplantação da fração purificada de

Wilbrandia (cf) verticillata merece um estudo mais aprofundado após a separação das substâncias, já que a prevenção da implantação do ovo fertilizado é de grande valia para a contracepção (SHELESNYAK, 1965).

As respostas contráteis evocadas por acetilcolina, serotonina, bradicinina, ocitocina, cloreto de bário e cloreto de potássio em útero isolado de rata, foram inibidas de maneira concentração-dependente pela fração purificada. A fração demonstrou maior efeito frente à resposta da bradicinina, ao mesmo tempo em que exibiu uma menor ação frente à serotonina. A ordem decrescente de inibição da ação dos agonistas pela fração, é a seguinte: BRADICININA > OCITOCINA > ACETILCOLINA > CLORETO DE BÁRIO > SEROTONINA.

Sabe-se que a acetilcolina (CUATRECASSAS, 1974), ocitocina (SOLOFF, 1975), serotonina (ROTH & CHUANG, 1987) e bradicinina (ELLIOTT et al., 1960) interagem especificamente com receptores de membrana, desencadeando um processo contrátil. Como a fração não interferiu apenas com a atividade de agonistas específicos, mas também afetou a resposta ao cloreto de bário e cloreto de potássio, o seu efeito parece ser inespecífico. O potássio e a acetilcolina induzem mudanças na permeabilidade celular, permitindo a entrada de íons cálcio do fluido extracelular (EDMAN & SCHILD, 1962). Existem pelo menos dois tipos diferentes de canais, por onde ocorre passagem de fluxo iônico: um dependente de voltagem e outro operado por receptor (VANBREEMEN et al., 1979). Há evidência de que o potássio atua predominantemente através do canal iônico dependente de voltagem (BOLTON,

1979). Portanto, é provável que a fração exerça seu efeito inibitório alterando o fluxo de íons cálcio transmembrana. Em consonância com essa visão, a concentração de cálcio do banho foi elevada (1,2 e 1,8 mM), com o intuito de estudar o seu efeito sobre a ação da fração nas respostas contráteis da acetilcolina. Interessantemente, o aumento crescente na concentração de cálcio do banho revelou uma clara tendência em mascarar o efeito inibitório da fração, de maneira concentração-dependente.

Com a finalidade de conhecer o efeito da fração em músculo esquelético, sua ação sobre as contrações induzidas por acetilcolina, cloreto de potássio e cafeína foi avaliada na preparação de reto abdominal de sapo. A fração exibiu efeito inibitório concentração-dependente sobre a resposta à acetilcolina, mas não afetou as respostas ao potássio nem à cafeína.

A inibição da resposta de alguns agonistas apresentada pela fração, pode ser o resultado de algumas mudanças físico-químicas na membrana plasmática, alterando o balanço iônico transmembrana. A pronta reversibilidade do efeito dos agonistas após a lavagem do tecido com solução nutritiva, apóia a hipótese de que a ação da fração não compromete a função das proteínas contráteis.

Em íleo isolado de cobaia, a fração demonstrou pouca potenciação da resposta à histamina. A Cucurbitacina D' quando testada em íleo de cobaia, não apresentou qualquer efeito frente às contrações evocadas pela histamina (EDERY et al., 1961), ao mesmo tem-

po em que o extrato aquoso de Luffa operculata, da qual fo
ram isoladas as Cucurbitacinas B, D e isocucurbitacina B, po
tenciou de modo concentração-dependente as contrações indu
zidas pela histamina em íleo de cobaia (SILVA, 1983). Logo,
são necessários maiores estudos eletrofisiológicos, no sen
tido de esclarecer algumas observações e proposições salien
tadas no decorrer do presente trabalho.

A correlação entre os efeitos observados em ór
gãos isolados e as propriedades citotóxica, antiinflamató
ria e antifertilidade demonstradas pela fração, torna-se
muito difícil.

Um mecanismo citotóxico direto ou indireto leva à
lesão da membrana celular e conseqüente desbalanço iônico,
aumentando o fluxo de íons e metabólitos de baixo peso mole
cular para o meio extracelular. Foi demonstrado que, desde
que haja uma elevação da concentração extracelular de cálcio
e zinco, o vazamento através da membrana pode ser preveni
do (PASTERNAK & MAHADEVAN, 1988). Se o efeito da fração em
órgãos isolados estiver associado a uma certa citotoxicida
de, esse pode ser o mecanismo pelo qual o aumento de cálcio
esteja influenciando sua ação.

O metabolismo oxidativo de polimorfonucleares é
inibido pela maioria das drogas antiinflamatórias conheci
das (BIEMOND et al., 1986; BERRADIA et al., 1988). Visto que
as cucurbitacinas inibem a captação de oxigênio em células
de carcinoma de Erlich (SHOHAT et al., 1962) além de supri
mirem a biossíntese de DNA, RNA e proteína em células HeLa
S₃ (WITKOWSKI et al., 1984), é provável, que a citotoxicida

de possa estar envolvida na ação antiinflamatória evidenciada pelas novas norcucurbitacinas.

As cucurbitacinas isoladas de Bryonia alba têm de mostrado inibição da liberação de ácido araquidônico de neutrófilos. Nessa situação, a aglicona é menos ativa que os glicosídeos. Entretanto, quando as células são estimuladas por um ionóforo de cálcio, A23187, a aglicona potencia a inibição anteriormente observada, enquanto que os glicosídeos mostram-se pouco ativos, indicando ao mesmo tempo, que há um envolvimento dos íons cálcio na liberação de ácido araquidônico (PANOSYAN, 1985), e que os glicosídeos parecem estar agindo por interferir com esses íons. É provável então, que as substâncias glicosídicas em questão possam agir de modo semelhante, interferindo com a liberação de ácido araquidônico, e, por conseguinte, com a produção de eicosanóides, os quais desempenham um papel chave no processo inflamatório.

O ácido araquidônico é considerado um ácido graxo biologicamente essencial, e é sabido que a sua deficiência inibe a fertilidade em ratas, o que seria contornado através da suplementação do mesmo pela dieta (BURR & BURR, 1930; HAFIEZ, 1974). Assim, a interferência com a liberação e o metabolismo do ácido araquidônico, poderia explicar os efeitos antiinflamatório e antifertilidade observados com as novas norcucurbitacinas.

Tendo em vista a baixa toxicidade das novas substâncias, ao lado da sua capacidade em produzir ações farma-

cológicas tão relevantes quanto antiinflamatória e antifertilidade, as mesmas teriam uma boa aplicabilidade na terapêutica atual. Estudos posteriores têm por objetivo separar Wv_1 e Wv_2 presentes na fração purificada e avaliar cada composto quanto à sua eficácia e toxicidade em modelos animais.

6 - CONCLUSÕES

1) As novas norcucurbitacinas glicosídicas presentes na fração purificada de Wilbrandia (cf) verticillata demonstraram atividades semelhantes e contrárias às das cucurbitacinas farmacologicamente estudadas. Essa observação deve-se às várias diferenças estruturais existentes entre as novas e as antigas cucurbitacinas.

2) As novas substâncias demonstraram toxicidade aguda e citotoxicidade mais baixas que a maioria das cucurbitacinas conhecidas, glicosídicas ou não.

3) Os resultados oriundos da ação da fração em modelos experimentais de inflamação, revelaram que a mesma possui uma considerável atividade antiinflamatória, de maneira semelhante ao Fevicordin A, Fevicordin A glicosídico e à Cucurbitacina B, mas não à Cucurbitacina D.

4) Em modelos experimentais relevantes para a reprodução, a fração alterou o ciclo estral em camundongos de modo reversível; apresentou boa atividade antiimplantação em ratos, assim como não exibiu ação abortiva nesses animais, embora tenha apresentado toxicidade fetal; e, não apresentou qualquer efeito estrogênico ou anti-estrogênico em ratos, semelhante ao comportamento da diidroelatericina A, anteriormente estudada.

5) A fração exibiu ainda, efeito laxante razoável, embora menos potente que o da maioria das cucurbitacinas a-

validadas nesse sentido.

6) Dentre as propriedades observadas, as ações antiinflamatória e antifertilidade indubitavelmente são as mais relevantes. E, já que a fração estudada é uma mistura de dois compostos, almeja-se a sua separação e consequente elucidação do princípio ativo realmente responsável por cada um desses efeitos.

7) O presente trabalho fornece um alicerce científico para o uso popular de Wilbrandia (cf) verticillata como anti-reumática, apoiando simultaneamente um provável emprego terapêutico dos novos compostos isolados desta, visto que não possuem toxicidade tão alta quanto as demais cucurbitacinas estudadas anteriormente.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ACHENBACH, H.; HEFTER-BUBL, U.; CONSTENLA, M.A. Die Fevicordine - Neuartige biologischaktive norcucurbitane aus Fevillea cordifolia. Arch. Pharm., 9 (320): 875, 1987.
- 2 - ———. Fevicordin A and Fevicordin A glucoside, novel norcucurbitacins from Fevillea cordifolia. J.Chem. Soc. Chem. Commun., 6:441-2, 1987
- 3 - ARCAMONE, F.; CASSINELLI, G.; CASSAZZA, A.M. New antitumor drugs from plants. J. Ethnopharmacol., 2: 149-60, 1980.
- 4 - BALANDRIN, M.F.; KLOCKE, J.A.; WURTELE, E.S.; BOLLINGER, W.H. Natural plant chemicals: Sources of industrial and medical materials. Science, 228:1154-60, 1985.
- 5 - BALINT, G.P.; MARRIKAKIS, M.E.; LEE, P.; ROONEY, P.J.; BUCHANAN, W. W. Standardization in clinical measurement. In: DUMONDE, D.C. & JASANI, M.K. eds. The recognition of anti-rheumatic drugs., Lancaster, M.T.P., 1977, p. 251-65.
- 6 - BENITZ, K.F. & HALL, L.M. The carrageenan-induced abscess as a new test for antiinflammatory activity of steroids and monosteroids. Arch. Int. Pharmacodyn; 144:185-95, 1963.
- 7 - BERRADIA, N.; MARCHAND-ARVIER, M.; HUMBERT, J.C.; VIGNERON, C. Effects of indomethacin and dichlofenac on some functions of polymorphonuclear neutrophils.

- J. Pharm. Pharmacol., 40: 806-8, 1988.
- 8 - BERTOLINI, D.R.; NEDWIN, G.E.; BRINGMAN, T.S.; SMITH, D.D.; MUNDY, G.R. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. Nature, 319: 516-8, 1986.
- 9 - BHAT, S.V.; BAJWA, B.S.; DORNAVER, H.; DE SOUZA, N.J.; FEHLHABER, H.W. Structures and stereochemistry of new labdane diterpenoids from Coleus forskolii. Briq. Tet. Lett., 19: 1669, 1977.
- 10 - BIEMOND, P.; SWAAK, A.J.G.; PENDERS, J.M.A.; BEINDORFF, C.M.; KOSTER, J.F. Superoxide production by polymorphonuclear leukocytes in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: in vivo inhibition by the antirheumatic drug piroxicam due to interference with the activation of the NADPH oxidase. Ann.Rheum. Dis., 45: 249-55, 1986.
- 11 - BOLTON, T.B. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. Pharmacol.Rev., 59: 606-718, 1979.
- 12 - BRAGA, R. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. Fortaleza, Centro de Divulgação Universitária, 1953, p. 94.
- 13 - BRAQUET, P. Involvement of PAF-acether in various immune disorders using BN 52021 (Ginkgolide B) a powerful PAF-acether antagonist isolated from Ginkgo biloba L. In: Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene research. vol. 16, Raven Press, New York, 1986, pp. 179-98.

- 14 - BUDA, C.; SOLLANON, M.; JIN, G.Z. Effects of 1-tetrahydrophalmitine on sleep-waking cycle of cats. Acta Pharmacol. Sin., 5: 5-8, 1984.
- 15 - BURR, G.O. & BURR, M.M. On the nature and the role of fatty acids essential in nutrition. J. Biol.Chem., 86: 587-621, 1930.
- 16 - CUATRECASSAS, P. Membrane receptors. Annu. Rev. Biochem., 43: 169-214, 1974.
- 17 - DAYER, J.M.; BEUTLER, B.; CERAMI, A. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E₂ production by human synovial cells and dermal fibroblasts. J. Exp. Med., 162: 2163-68, 1985.
- 18 - DECKER. J.L. moderator: Rheumatoid arthritis: Evolving concepts of pathogenesis and treatment. Ann. Intern. Med., 102: 810, 1984.
- 19 - DE JALON, P.D.J. A simple biological assay of curare preparation. Q. J. Pharm. Pharmacol., 20: 28-33, 1947.
- 20 - DIAS DA ROCHA, F. Botânica Médica Cearense.Fortaleza, Tip. Moderna, 1919.
- 21 - DOMENJOZ, R. Sur la mecanisme d'action des substances antiinflamatoires. Actual. Tes. Pharmacol., 7: 73, 1954.
- 22 - EAGLE, H. Amino acid metabolism in mammalian cell culture. Science, 130: 432, 1959.
- 23 - ———. Propagation in a fluid medium of human epider-

- moid carcinoma, strain KB. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 89: 362, 1955.
- 24 - EDERY, H.; SCHATZBERG-PORATH, G.; GITTER, S. Pharmacodynamic activity of elatericin (Cucurbitacin D). Arch. Int. Pharmacodyn. 3-4: 315-35, 1961.
- 25 - EDMAN, K.A.P. & SCHILD, H.O. The need for calcium in the contractile responses induced by acetylcholine and potassium in the rat uterus. J. Physiol., 161: 424-44, 1962.
- 26 - EDWARDS, G.A. & FOGH, Micromorphologic changes in human amnion cells during trypsinization. J. Cancer Res., 19: 608, 1959.
- 27 - ELLIOTT, D.F.; HORTON, E.W.; LEWIS, G.P. Actions of pure bradykinin J. Physiol., 153: 473, 1960.
- 28 - FANG, X.; PHOEBE JR., C.H.; PEZZUTO, J.M.; FONG, H.H.S.; FARNSWORTH, N.R.; YELLIN, B.; HECHT, S.M. Plant anticancer agents XXXIV. Cucurbitacins from Elaeocarpus dolichostylus. J. Nat. Prod. 47(6): 988-93, 1984.
- 29 - FUSDICLE, W.M. Cytotoxic therapy in rheumatoid arthritis. Med. Clin. North. Am. 52: 747, 1968.
- 30 - GERAN, R.I.; GREENBERG, N.H.; MACDONALD, N.N.; SCHUMACHER, A.M.; ABOTT, B.J. Apud: FANG, X., PHOEBE JR., C.H.; PEZZUTO, J.M.; FONG, H.H.S.; FARNSWORTH, N.R.; YELLIN, B.; HECHT, S.M. Plant anticancer agents XXXIV. Cucurbitacins from Elaeocarpus dolichostylus. J. Nat. Prod., 47(6): 988-93, 1984.
- 31 - GOETZEL, E.J.; BURALL, B.A.; BAUD, L., SCRIVEN, K.H.; LEVINE, J.D.; KOO, C.H. Generation and recognition

- of leukotriene mediators of hypersensitivity and inflammation. Dig. Dis. Sci., 33 (Suppl): 365-405, 1988.
- 32 - GOLDMAN, D.W.; GIFFORD, L.A.; MAROTTI, T.; KOO, C.H.; GOETZL, E.J. Molecular and cellular properties of human polymorphonuclear leukocyte receptors for leukotriene B₄. Fed. Proc., 46: 200-3, 1987.
- 33 - GOWEN, M.; WOOD, D.D.; IIRIE, E.J.; MCGUIRE, M.K.B.; RUSSEL, R.G.G. An interleukin 1-like factor stimulates bone resorption in vitro. Nature, 306: 378-80, 1983.
- 34 - HAFIEZ, A.A. Prostaglandin E₂ prevents impairment of fertility in rats fed a diet deficient in essential fatty acids. J. Reprod. Fertil., 38: 273-86, 1974.
- 35 - HALLWELL, B.; HOULT, J.R.; BLAKE, D.R. Oxidants, inflammation and anti-inflammatory drugs. FASEB J.; 2: 2867-73, 1988.
- 36 - HARDMAN, R. Recent developments in our knowledge of steroids. Planta Medica, 60: 233-8, 1987.
- 37 - HARRIS, E.D. JR. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: KELLEY, W.N.; HARRIS, E.D. JR.; RUDDY, R.; SLEDGE, C.B. eds. Textbook of rheumatology, 2. ed. Philadelphia, Penn, Saunders, 1985, p. 886-903.
- 38 - HENDERSON, B.; PETTIPHER, E.R.; HIGGS, G.A. Mediators of arthritis. Br. Med. Bull., 43 (2): 415-28, 1987.
- 39 - HILLEBRECHT, J. The routine assay of anti-phlogistic compounds in the rat foot test. Arzneimittelforschung, 4: 607-14, 1954.
- 40 - HOLTON, P.W. A modification of the method of Dale and

- Laidlaw for standardization of posterior pituitary extract. Br. J. Pharmacol. Chemoter., 3: 328, 1948.
- 41 - HYLANDS, P.J. & MAGD, M.S. Cucurbitacins from Acanthosicyos horridus. Phytochemistry, 25 (7): 1681-4, 1986.
- 42 - JOHNSON, E.S.; KADAM, N.P.; HYLANDS, D.M.; HYLANDS, P.J. Efficacy of feverfew as prophylactic treatment of migraine. Br. Med. J., 291: 569-73, 1985.
- 43 - JOLY, A.B. Botânica-Introdução à taxonomia vegetal., 4 ed. São Paulo, Companhia Editora Nacional, 1977, p.498.
- 44 - KHANNA, U. & CHAUDHURY, R.R. Antifertility screening of plants: I. Investigations on Butea monosperma Lam (Kuntze) In: Advances in research in Indian Medicine. K.N. Udupa, Varanasi, India. B.H.U., 1970, p. 213-4.
- 45 - KLAYMAN, D.L. Qinghaosu (artemisinin) an antimalarial drug from China. Science, 228: 1049-55, 1985.
- 46 - KONG, Y.C.; XIE, J.X.; BUT, P.P.H. Fertility regulating agents from traditional chinese medicines. J. Ethnopharmacol., 15: 1-44, 1986.
- 47 - KONOPA, J.; LEDÓCHOWSKI, A.; MATUSZKIEWICZ, A.; JEREK ZEK-MORAWSKA, E. Apud: KONOPA, J.; MATUSZKIEWICZ, A.; HRABOWSKA, M.; ONOSZKA, K. Cucurbitacines, cytotoxic and antitumor substances from Bryonia alba L. Part. II: Biological studies. Arzneimittelforschung 24 (11): 1741-3, 1974.
- 48 - KONOPA, J.; MATUSZKIEWICZ, A.; HRABOWSKA, M.; ONOSZKA,

- K. Cucurbitacines, cytotoxic and antitumor substances from Bryonia alba L. Part. II: Biological studies. Arzneimittelforschung, 24 (11): 1741-3, 1974.
- 49 - KRANE, S.M.; DAYER, J.M.; SIMON, L.S.; BYRNE, S. Mononuclear cell-conditioned medium containing mononuclear cell factor (MCF), homologous with interleukin 1, stimulates collagen and fibronectin synthesis by adherent rheumatoid synovial cells: Effects of prostaglandin E₂ and indomethacin. Collagen Rel. Res., 5: 99-117, 1985.
- 50 - LARSEN, G.L. & HENSEN, P.M. Mediators of inflammation. Annu. Rev. Immunol. 1: 335-59, 1983.
- 51 - LAVIE, D. & GLOTTER, E. In: Fortschritte Der. Chemie. Organischer Naturstoffe, ed. by L. ZECHMENTER, vol. 29, Springer-Verlag, New York, 1971, pp. 307-62.
- 52 - LAVIE, D. & SHVO, Y. Proposed structures for elatericin A and B. J. Am. Chem. Soc., 82: 966-70, 1960.
- 53 - ———. The functions of elatericin A. J. Am. Chem. Soc., 81: 3058-61, 1959.
- 54 - LEITER, J.; MACDONALD, M.M.; SCHEPARTZ, S.A. Apud: KONOPA, J.; MATUSZKIEWICZ, A.; HRABOWSKA, M.; ONOSKA, K. Cucurbitacines, cytotoxic and antitumor substances from Bryonia alba L. Part II: Biological studies. Arzneimittelforschung, 24 (11):1741-3, 1974.
- 55 - LE MEN, J.; BUFFARD, G.; PROVOST, J.; TIBERGIHEN, R.; FORGACS, P.; LAGRANGE, E.; ALBERT, O.; AUROUSSEAU, M. Relations entre la structure de quelques cucurbitacines, leur toxicité et leur activité laxative.

- Chimie Thérapeutique., 6: 459-65, 1969.
- 56 - LOMBARDINO, J.G.; OTTERNESS, K.G.; WISEMAN, E.H. Acid anti-inflammatory agents correlations of some physical, pharmacological and clinical data. Arzneimittelforschung, 25: 1629-35, 1975.
- 57 - LOU, T.C. The biological assay of vegetable purgatives. J. Pharm. Pharmacol. 1: 673-81, 1949.
- 58 - MAGNUS, R. Versuche am überleben den dundarm von sagnetieren. I. Mitterlung. Arch. F.D. Ge. Physiol., 102: 123-51, 1904.
- 59 - MARCUS, A.J. Eicosanoids as bioregulators in clinical medicine. Am. J. Med. 78: 805-10, 1985.
- 60 - MARUYAMA, M.; TERAHARA, A.; ITAGAKI, Y.; NAKANISHI, K. The ginkgolides II. Derivatives of partial structures. Tetrahydron. Lett. 4: 303-13, 1967.
- 61 - MATOS, M.E.O.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A.; BRAZ FILHO, R. Nor-cucurbitacinas glicosídicas de Wilbrandia sp. In: Encontro Brasileiro-Alemão de Química de Produtos Naturais. Rio de Janeiro, 1988. Resumos. p. 100.
- 62 - MEISSNER, G. Ryanodine activation and inhibition of the Ca^{+2} release channel of sarcoplasmic reticulum. J. Biol. Chem. 261: 6300, 1986.
- 63 - MELO, M.E. ESPLAR-Projeto de Tecnologia Alternativa (PTA). Informação pessoal, 1989.
- 64 - MENEZES, A.M.S. & RAO, V.S.N. A study of interaction of cyclophosphamide and dichlofenac with carrageenan-induced hind paw edema in rats. Braz. J. Med.

- Biol. Res. 19: 599A, 1986.
- 65 - MILLER, L.C. & TAINTER, M.L. Estimation of the LD₅₀ and its error by means of logarithmic probit graph paper. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 57: 261-4, 1944.
- 66 - NISHIZUKA, Y. Studies and perspectives of protein Kinase C. Science, 233(4761): 305-12, 1986.
- 67 - PANOSYAN, A.G. Influence of cucurbitacins of Bryonia alba L. on the biosynthesis of eicosanoids in human leukocytes. Bioorg. Khim. 11: 264-9, 1985.
- 68 - PASTERNAK, C.A. & MAHADEVAN, D. Novel role of extracellular calcium and zinc: protection against membrane damage induced by cytotoxic agents. Indian J. Biochem. Biophys. 25: 1-7, 1988.
- 69 - PENSO, G. & BALDUCCI, D. Le colture dei tessuti nella ricerca biologica. 2. ed. Roma, Pensiero Scientifico, 1962.
- 70 - PIO CORRÊA, M. In:———. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas, Rio de Janeiro, Min. da Agricultura, IBDF, 1984, v. 1. p. 10.
- 71 - PIO CORRÊA, M. In:———. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas, Rio de Janeiro, Min. da Agricultura, IBDF, 1984, v. 6, p. 173.
- 72 - PUGH, W.J. & SAMBO, K. Prostaglandin synthetase inhibitors in feverfew. J. Pharm. Pharmacol. 40: 743-5, 1988.
- 73 - ROBINSON, W. Nutrition in rheumatic diseases. In: KELLEY, W.; HARRIS, E.; RUDDY, S.; SLEDGES, C. eds. Textbook of rheumatology. Philadelphia, Saunders,

1981.

- 74 - RODNAN, G.P. & SCHUMACHER, H.R. Rheumatoid arthritis. In: RODNAN, G.P. & SCHUMACHER, H.R. eds. Primer on the Rheumatic Diseases 8 ed. Atlanta, Arthritis Foundation, 1983.
- 75 - ROTH, B.L. & CHUANG, D. Multiple mechanisms of serotonergic signal transduction. Life Sci., 41: 1051-64, 1987.
- 76 - SAMMUELSON, B. Leukotrienes: Mediators of immediate hypersensitive reactions and inflammation. Science, 220: 568-75, 1983.
- 77 - SCHMIDT, J.A.; MIZEL, S.B.; COHEN, D.; GREEN, I. Interleukin 1, a potential regulator of fibroblast proliferation. J. Immunol., 128: 2177-82, 1982.
- 78 - SCHNYDER, J. & PAYNE, T. Effect of interleukin-1 and -2 on enzyme secretion and prostaglandin formation by chondrocytes. Br. J. Rheumatol., 24 (Suppl 1): 128-32, 1985.
- 79 - SEAMON, K.B.; PADGETT, W.; DALY, J.W. Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and intact cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:3363, 1981.
- 80 - SELYE, H. Further studies concerning the participation of the adrenal cortex in the pathogenesis of arthritis. Br. Med. J., 2: 1129-35, 1949.
- 81 - SHELESNYAK, M.C. The implantation of ovum - a target for fertility control. Fam. Plann., 65: 105, 1965.
- 82 - SHOHAT, B.; BEEMER, A.M.; GITTER, S.; LAVIE, D. Anti-

- fertility activity of Dihydroelatericin A in the female mouse. Experientia, 28 (10): 1203-5, 1972.
- 83 - SHOHAT, B.; GITTER, S.; LAVIE, D. Antitumor activity of cucurbitacins: Metabolic aspects. Cancer Chemother. Rep., 23: 19-24, 1962.
- 84 - SILVA, E.A. Estudo farmacológico da Luffa operculata (L) Cogniaux. Tese (Mestrado) Fortaleza, 1983. p. 56. Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Universidade Federal do Ceará.
- 85 - SOLOFF, M.S. Uterine receptor for oxytocin: effects of estrogen. Biochem. Biophys. Res. Comm., 65:205-12, 1975.
- 86 - STUART, J.M.; WATSON, W.C.; KANG, A.H. Collagen autoimmunity and arthritis. FASEB J., 2: 2950-56, 1988.
- 87 - TESSIER, A.M. & PARIS, R.R. Study of some African toxic Euphorbiaceae containing cucurbitacins. Toxicol. Eur. Res., 1(5): 329-36, 1978.
- 88 - THASTRUP, O.; FODER, B.; SCHARFF, O. The calcium-mobilising and tumour promoting agent, thapsigargin, elevates the platelet free calcium concentration to a higher steady-state: a possible mechanism of action for tumour promotion. Biochem. Biophys. Res. Commun., 94: 654, 1987.
- 89 - THOMSON, B.M.; SAKLATVALA, J.; CHAMBERS, T.J. The effect of pig interleukin-1 (catabolin) on bone resorption by osteoclasts disaggregated from rat bone. Br. J. Rheumatol., 24 (Suppl 1): 140-2, 1985.
- 90 - THYAGARAJAN, S.P.; THIRUNALASUNDARI, T.; SUBRAMANIAN,

- S.; VENKATESWARAN, P.S.; BLUMBERG, B.S. Effect of Phyllanthus amarus on chronic carriers of hepatitis B virus. Lancet, 1: 764-6, 1988.
- 91 - TYLER, J.A. Chondrocyte mediated depletion of articular cartilage proteoglycan in vitro. Biochem. J., 225: 493-507, 1985.
- 92 - TYLER, V.E.; BRADY, L.R.; ROBBERS, J.E. Pharmacognosy. 8. ed. Philadelphia, LEA and FEBIGER, 1981.
- 93 - VANBREEMEN, C.; AARSON, P.; LOUTZENHISER, T. Na-Ca interactions in mammalian smooth muscle. Pharmacol. Rev., 30: 167, 1979.
- 94 - WAN, J.H.; YOU, Y.C.; MI, J.X.; YING, H.G. Effect of indirubin on hemopoietic cell production. Acta Pharmacol. Sin., 2: 241-4, 1981.
- 95 - WHITTLE, B.A. The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and nonnarcotic analgesics. Br. J. Pharmacol., 22:246-53, 1964.
- 96 - WILKE, W.S.; BIRD, J.A.; SECAL, A.M. Methotrexate in the treatment of arthritis and connective tissue disease. Cleve Clin. J. Med., 54: 327-38, 1987.
- 97 - WINDER, C.V.; WAX, J.; BEEN, M.A. Rapid foot volume measurements on anaesthetized rats, and the question of a phenilbutazone effect on anaphylactoid oedema. Arch. Int. Pharmacodyn., 112: 174, 1957.
- 98 - WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenan induced oedema in hind paw as an assay for anti-inflammatory drugs. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 111:544-

7, 1962.

- 99 - WITKOWSKI, A. & KONOPA, J. Binding of the cytotoxic and antitumor triterpenes, cucurbitacins to glucocorticoid receptors of HeLa cells. Biochim. Biophys. Acta., 674 (2): 246-55, 1981.
- 100 - WITKOWSKI, A.; WOYNAROWSKA, B., KONOPA, J. Inhibition of the biosynthesis of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and protein in HeLa S_3 cells by cucurbitacins, glucocorticoid-like cytotoxic triterpenes. Biochem. Pharmacol., 33 (7): 995-1004, 1984.
- 101 - YESILADA, E.; TANAKA, S.; SEZIK, E.; TABATA, M. Isolation of an anti-inflammatory principle from the fruit juice of Ecballium elaterium. J. Nat. Prod., 51 (3): 504-8, 1988.
- 102 - XU, R.S. & GAO, Y.S. Recent advances in chemical studies on the active principles from plants for fertility regulation. Pure. Appl. Chem., 58 (5): 811-6, 1986.