

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**ESTUDO DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES E
HEPÁTICOS DA *trans*-DESIDROCROTONINA (*t*-DCTN),
UM DITERPENÓ CLERODANO OBTIDO DO
Croton cajucara BENTH. (SACACA)**

Regilane Matos da Silva

Fortaleza – CE

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**ESTUDO DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES
E HEPÁTICOS DA *trans*-DESIDROCROTONINA (*t*-DCTN),
UM DITERPENO CLERODANO OBTIDO DO
Croton cajucara BENTH. (SACACA)**

Regilane Matos da Silva

Tese submetida à coordenação do curso de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Vietla Satyanarayana Rao

Fortaleza – CE

2005

Esta tese foi submetida como parte integrante dos requisitos necessários a obtenção do Grau de Doutor em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se a disposição dos interessados na biblioteca da Faculdade de Medicina da referida universidade.

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

Regilane Matos da Silva

Tese aprovada em: 20/04/2005

Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao
(Orientador)

Profa. Dra. Glória Isolina Boente Pinto Duarte

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento

Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade Cunha

Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães

*“O amor é a força mais abstrata, e também a
mais potente que há no mundo”*

Mahatma Gandhi

*Aos meus Pais, pela vida, amor, dedicação, incentivo e
cumplicidade de toda uma vida, que sempre me dão o
“colo” da mamãe e o “chamego” do papai na hora que mais necessito.
Aos meus irmãos Rejane, Reginaldo e Rogério, fontes de apoio e amor, e meus
sobrinhos-filhos, que não cansam de demonstrar carinho pela Tia Lulu.*

DE TUDO, FICARAM TRÊS COISAS:

*a certeza de que estamos sempre começando...
a certeza de que é preciso continuar...
a certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...*

PORTANTO DEVEMOS:

*fazer da interrupção um caminho novo...
da queda um passo de dança...
do medo, uma escada...
do sonho, uma ponte...
da procura... um encontro.*

Fernando Sabino

Pedacinhos de Amizade

E eu digo que é o tempo que ganhamos com cada amigo que faz cada amigo tão importante.

Amizades são feitas de pedacinhos. Pedacinhos de tempo que vivemos com cada pessoa. Não importa a quantidade de tempo que passamos com cada amigo, mas a qualidade do tempo que vivemos com cada pessoa.

Cinco minutos podem ter uma importância muito maior do que um dia inteiro.

Assim, há amizades que são feitas de risos e dores compartilhados; outras de saídas, cinemas, diversões; há ainda aquelas que nascem e a gente nem sabe de quê, mas que estão presentes.

Talvez essas sejam feitas de silêncios compreendidos, ou de simpatia mútua sem explicação.

Um amigo se torna importante pra nós, e nós para ele, quando somos capazes, mesmo na sua ausência, de rir ou chorar, de sentir saudade e nesse instante trazer o outro bem pertinho da gente.

Dessa forma, podemos ter vários melhores amigos de diferentes maneiras.

O importante é saber aproveitar o máximo cada minuto vivido e ter depois no baú das recordações horas para passar com os amigos, mesmo quando estes estiverem longe dos nossos olhos.

Aos meus amigos Adriana Rolim (Drica), Karina Moreira (Ka), Francisco de Assis (Chico), Roberto César (Bob) e Jeferson Falcão (Panda-Pai), que se tornaram “irmãos” de coração, pela amizade, companheirismo e boas risadas.

AGRADECIMENTOS

À **Deus** pela vida e por nunca me deixar desistir do meu caminho, apesar das adversidades da vida.

Ao **Prof. Vietla Satyanarayana Rao**, pela orientação científica, amizade, confiança, incentivo nas horas decisivas, pelo aprendizado de uma vida nesses dez anos de laboratório e por muitas vezes, pela palavra certa na hora certa.

À **Profa Maria Aparecida Maciel**, pelo fornecimento do material estudado, fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Prof Nilberto Robson Falcão do Nascimento**, pela colaboração nos experimentos cardiovasculares que nos rendeu bons frutos e pela grande pessoa que conheci nesses últimos anos.

Ao pessoal do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular da UECE em especial a **Marta Kerntopf, Lucília Maria, Rafael e Elaine** pelas sextas-feiras regadas a risadas, baião e claro, muitos experimentos cardiovasculares.

Ao colega de Pós-graduação **Hélio Vitoriano Nobre Júnior** pela amizade e colaboração nos experimentos de células imprescindível neste trabalho.

À **Profa Gerly Anne de Castro Brito**, pela colaboração nos trabalhos de análise histológica.

Aos meus companheiros de luta no Curso de Pós-graduação em especial **Adriana Rolim, Karina Moreira, Francisco de Assis, Roberto César, Jéferson Falcão, Laura Andréa, Luilma Gurgel, Juliana Lemos, Flávio Damasceno, Marjorie Moreira e Adriana Tomé**, pelos momentos de lazer.

Carinhosamente o meu agradecimento aos bolsistas e ex-bolsistas do Laboratório de Produtos Naturais **Kelcyana, Rafaela, Fabrício, Wilcare, Simony, Apoliana, Hermes, Ítalo, Deive, Jonny, Bruno, Alana, Cinthia, Livia**, pela ajuda nos mutirões no dia de experimento e que, agora, vão ficar livres da “Malvina” e nunca se esqueçam: “o bolsista é sempre o culpado”.

À **Karina Marques e Aline Bastos** pela colaboração técnica, apesar do pouco tempo de laboratório.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, em especial a **Rose** pelos “bom dia” calorosos, a **Íris** pelos “pretinhos básicos” (café) que sempre chegavam na hora certa, ao **Chiquinho**, sempre prestativo, **Fernando**, pelas xerox de última hora e **Edmilson** por sempre atender aos nossos pedidos.

À **Sílvia Maria e Áura Farias**, pela disponibilidade, amizade no decorrer do curso de Pós-Graduação e nossas conversas de final de dia.

À **Marta Araújo e Joana Barbosa**, pelo apoio na parte burocrática.

A todos os Professores, técnicos e funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A **Capes** pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	xii
Lista de Figuras	xiv
Lista de Tabelas	xvii
RESUMO	xix
ABSTRACT	xx
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Generalidades	1
1.2. Terpenos	6
1.3. Diterpenos	8
1.4. <i>Croton cajucara</i> Benth	11
1.4.1. Estudo fitoquímico e farmacológico	15
1.5. <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN)	19
1.6. Toxicidade de drogas hipolipidêmicas e hipoglicêmicas	24
1.7. Relevância e justificativa	30
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIAIS	32
3.1. Material botânico	32
3.2. Animais experimentais	32
3.3. Drogas e reagentes	33
3.4. Soluções fisiológicas	34
3.5. Aparelhos	34

4. MÉTODOS	36
4.1. Isolamento da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN)	36
4.2. Toxicidade aguda da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) para Camarão de Salmoura (<i>Artemia sp</i>) e determinação da CL ₅₀	38
4.3. Cultura primária de células mesencefálicas e hepatócitos	39
4.3.1. Efeito citotóxico da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) em células mesencefálicas de rato	40
4.3.2. Efeito citotóxico da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) e do etanol em células hepáticas de rato	41
4.3.3. Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) sobre a produção de nitrito em células mesencefálicas de rato	42
4.4. Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) na hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno em camundongos	43
4.5. Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) na hepatotoxicidade induzida por D-Galactosamina/Lipopolissacarídeo em camundongos	44
4.6. Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) sobre os níveis de malonaldeído hepático (MDA)	45
4.7. Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) sobre os grupos sulfidrila não protéicos hepáticos (NP-SH)	46
4.8. Avaliação histológica	47
4.9. Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos normotensos	48
4.10. Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) em átrio isolado de ratos	49
4.11. Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) em anéis de aorta isolado de rato com e sem endotélio	50

4.12. Análise estatística	52
5. RESULTADOS	53
5.1. Toxicidade aguda <i>Artemia sp</i>	53
5.2. Efeito citotóxico da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) sobre a viabilidade de células mesencefálicas de rato	53
5.3. Efeito citotóxico da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) sobre a viabilidade de células hepáticas de rato	59
5.4. Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) na hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno em camundongos	63
5.5. Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) na hepatotoxicidade induzida por D-Galactosamina/Lipopolissacarídeo em camundongos	72
5.6. Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos normotensos	81
5.7. Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) em átrio isolado de ratos	89
5.8. Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) em anéis de aorta isolado de rato com e sem endotélio	95
6. DISCUSSÃO	99
7. CONCLUSÕES	117
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120

LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA	Bromidrato de 6-Hidroxidopamina
Abs	Absorbância
Ach	Acetilcolina
ALT	Alanina Aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato Aminotransferase
bpm	Batimentos por minuto
CCF	Cromatografia de Camada Fina
CI ₅₀	Concentração Inibitória 50%
CL ₅₀	Concentração Letal 50%
DEX	Dexametasona
D-MEM	Meio Essencial de Eagle Modificado
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTNB	5,5'- dithil-bis (2-nitrobenzoic acid)
E. P. M.	Erro Padrão da Média
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacético sal dissódico
FC	Frequência cardíaca
Fen	Fenilalanina
GalN	Galactosamina
GSH	Glutationa reduzida
h	Hora (s)
HE	Hematoxilina-eosina
HEX	Hexametônio
i. p.	Intraperitoneal
L-NAME	<i>l</i> -N ^G -Arginina-Metil-Éster
LPS	Lipopolissacarídeo

M	Molar
MDA	Malonaldeído
MEM	Meio Essencial de Eagle
mg	Miligrama
min	Minuto (s)
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetros
MTT	3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio
NAC	N-acetilcisteína
nm	Nanômetro
NP-SH	Grupos sulfidrilas não protéicos
PAM	Pressão arterial média
PD	Pressão diastólica
PS	Pressão sistólica
PD ₂	Concentração Inibitória 50%
Phe	Fenilefrina
PPARs	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
Rec	Recuperado
SNP	Nitroprussiato de sódio
STZ	Estreptozotocina
TCA	Ácido tricloroacético
<i>t</i> -DCTN	<i>trans</i> -desidrocrotonina
TNB	Ácido trinitrobenzeno sulfônico
TZD	Tiazolidinas
U/L	Unidades por litro
v. o.	Via Oral

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1 - <i>Croton Cajucara</i> Benth.....	13
2 - Estruturas químicas de alguns dos constituintes isolados do <i>Croton Cajucara</i> Benth.....	18
3 - Estrutura química da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN).....	21
4 - Método de obtenção do diterpeno <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) a partir dos extratos hexânicos e clorofórmicos.....	37
5 - Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) sobre a viabilidade de células mesencefálicas de ratos na presença ou não de 6-OHDA.....	56
6 - Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) sobre os níveis de nitrito em cultura de células mesencefálicas de ratos na presença ou não de 6-OHDA.....	58
7 - Efeito citotóxico do etanol e <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) sobre a viabilidade de células hepáticas de rato.....	62
8 - Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) e N-acetilcisteína (NAC) sobre os níveis de grupos sulfidrílas não protéicos (NP-SH) na hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno em camundongos.....	67
9 - Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) e N-acetilcisteína (NAC) sobre os níveis de malonaldeído (MDA) na hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno em camundongos.....	68

10 -	Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) e N-acetilcisteína (NAC) sobre os níveis séricos de ALT e AST na hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno em camundongos.....	70
11 -	Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN), N-acetilcisteína (NAC) e dexametasona (DEX) sobre os níveis de grupos sulfidrílas não protéicos (NP-SH) na hepatotoxicidade induzida por D-Galactosamina/LPS em camundongos.....	76
12 -	Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN), N-acetilcisteína (NAC) e dexametasona (DEX) sobre os níveis séricos de ALT e AST na hepatotoxicidade induzida por D-Galactosamina/LPS em camundongos.....	78
13 -	Microfotografias de fígados de camundongos.....	80
14 -	Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos normotensos.....	83
15 -	Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) sobre a frequência cardíaca (FC) de ratos normotensos.....	84
16 -	Efeito do pré-tratamento com atropina na resposta hipotensiva da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) em ratos normotensos anestesiados.....	85
17 -	Efeito do pré-tratamento com propranolol na resposta hipotensora da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) em ratos normotensos anestesiados.....	86
18 -	Efeito do pré-tratamento com hexametônio (Hexa) na resposta hipotensiva da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) em ratos normotensos anestesiados.....	87

19 -	Efeito do pré-tratamento com L-NAME na resposta hipotensiva da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) em ratos normotensos anestesiados.....	88
20 -	Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) na frequência da atividade mecânica espontânea do átrio direito isolado de rato.....	91
21 -	Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) na frequência da atividade mecânica espontânea do átrio direito isolado de rato.....	92
22 -	Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) na contratilidade do átrio esquerdo de rato estimulado eletricamente <i>in vitro</i>	93
23 -	Efeito do inotropismo positivo da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) na contratilidade do átrio de rato estimulado eletricamente <i>in vitro</i> na presença de CaCl ₂	94
24 -	Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) em anéis de aorta de rato com e sem endotélio pré-contraídos com fenilefrina.....	96
25 -	Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) em anéis de aorta intáctos de rato pré-contraídos com fenilefrina.....	97
26 -	Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) em anéis de aorta de rato desendotelizados pré-contraídos com fenilefrina.....	98

LISTA DE TABELAS

TABELA		PÁGINA
1 -	Representação de várias espécies do gênero <i>Croton</i>	12
2 -	Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) sobre a viabilidade de células mesencefálicas de ratos expostas ou não a 6-OHDA.....	55
3 -	Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) sobre a produção de nitrito em cultura de células mesencefálicas de ratos expostas ou não de 6-OHDA.....	57
4 -	Efeito citotóxico do etanol sobre a viabilidade de células hepáticas de rato.....	60
5 -	Efeito citotóxico da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) sobre a viabilidade de células hepáticas de rato.....	61
6 -	Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) sobre os níveis de glutathiona e malonaldeído na hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno em camundongos.....	66
7 -	Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) sobre os níveis séricos de ALT e AST na hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno em camundongos.....	69
8 -	Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) nos escores de lesão hepática na hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno em camundongos.....	71
9 -	Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) sobre os níveis de glutathiona e malonaldeído na hepatotoxicidade induzida por D-Galactosamina/LPS em camundongos.....	75

10 -	Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) sobre os níveis séricos de ALT e AST na hepatotoxicidade induzida por D-Galactosamina/LPS em camundongos.....	77
11 -	Efeito da <i>trans</i> -desidrocrotonina (<i>t</i> -DCTN) nos escores de lesão hepática na hepatotoxicidade induzida por D-Galactosamina/LPS em camundongos.....	79

RESUMO

ESTUDO DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES E HEPÁTICOS DA *trans*-DESIDROCROTONINA (*t*-DCTN), UM DITERPENO CLERODANO OBTIDO DO *Croton cajucara* BENTH. (SACACA). Silva, R. M. Tese submetida à coordenação do curso de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia. Orientador: Vietla S. N. Rao.

Croton cajucara Benth. (Euphorbiaceae), planta medicinal da região Amazônica do Brasil, é usada no tratamento de desordens hepáticas, renais e hipercolesterolemia. A *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN), principal diterpeno clerodano isolado da casca do caule do *Croton cajucara*, possui efeito gastroprotetor, hipoglicêmico e hipolipidêmico. Uma vez que substâncias com esse perfil farmacológico são geralmente associadas a efeitos contraditórios sobre o sistema cardiovascular ou hepático com possíveis propriedades citoprotetora ou citotóxica, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos da *t*-DCTN (i) no teste de toxicidade para *Artemia* sp e para cultura de células mesencefálicas primárias e células hepáticas *in vitro*; (ii) na toxicidade induzida *in vivo* por acetaminofeno ou galactosamina/LPS em camundongos e (iii) na pressão arterial média e frequência cardíaca *in vivo*, e no cronotropismo e inotropismo em átrio isolado e anéis de aorta isolada de rato. A *t*-DCTN (3 - 300 μ M) possui baixa toxicidade para *Artemia* sp ($CL_{50} = 670 \pm 80$ μ M) não sendo detectada atividade citotóxica da *t*-DCTN sobre células mesencefálicas primárias *per se*, revertendo a diminuição da viabilidade celular induzida por 6-OHDA (200 μ M). Por outro lado, a *t*-DCTN (0,3 - 300 μ M) demonstrou citotoxicidade semelhante ao etanol (50 - 400 mM) em cultura primária de hepatócitos de rato de acordo com os teste do MTT, embora tenha apresentado proteção na hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno (500 mg/kg) em camundongos, pelos testes da glutatona, malonaldeído, AST e ALT em contraste, os escores histológicos de tecido hepático de camundongos não foram significativamente alterados pela *t*-DCTN para células tratadas com acetaminofeno, mas mostrou hepatoproteção na lesão induzida por galactosamina/LPS, revertendo os níveis de glutatona induzida pela hepatotoxina os níveis séricos de AST e ALT. Em animais normotensos anestesiados com pentobarbital, a *t*-DCTN produziu hipotensão e bradicardia de forma dose dependente. A hipotensão induzida por *t*-DCTN (10 mg/kg) não foi alterada pelo pré-tratamento com atropina, propranolol e hexametônio, sendo reduzida pelo L-NAME. A *t*-DCTN inibe a frequência de contração espontânea de átrio direito isolado, mas não interfere no aumento dos batimentos atriais induzido pelo isoproterenol. O inotropismo não foi alterado pela *t*-DCTN em átrio esquerdo isolado. A *t*-DCTN é capaz de relaxar contrações submaximais de fenilefrina (1 μ M), sendo seu efeito parcialmente inibido pela retirada do endotélio ou pela presença de L-NAME. Portanto, a *t*-DCTN possui baixa toxicidade para *Artemia* sp, nenhuma neurotoxicidade para células mesencefálicas, hepatotoxicidade e hepatoproteção, dependendo da técnica utilizada, sugerindo uma possível ação inibitória no citocromo P450. A hipotensão induzida pela *t*-DCTN provavelmente se deve a sua ação combinada bradicardizante e vasodilatadora sendo esse efeito parcialmente mediado pela liberação de NO endotelial e parte por efeitos na musculatura lisa vascular. Em conjunto, os dados disponíveis na literatura com as presentes observações sugerem que a *t*-DCTN está envolvida com propriedades citotóxicas bem como citoprotetoras e, portanto, cuidados deve ser tomados quanto a extrapolação dos dados em animais para a promissora atividade terapêutica, especialmente para tratamento de desordens hepáticas ou patologias associadas à diabetes.

ABSTRACT

STUDIES ON CARDIOVASCULAR AND HEPATIC EFFECTS OF *trans*-DEHYDROCROTONIN, A CLERODANE DITERPENE ISOLATED FROM *Croton cajucara* BENTH. (SACACA). Silva, R. M. Thesis Submitted to the Federal University of Ceara, Fortaleza, in Partial Fulfilment for the Award of Doctor Degree in Pharmacology. Guide: Vietla S. N. Rao.

Croton cajucara Benth (Euphorbiaceae) is a popular medicinal plant in the Amazon region of Brazil for the treatment of liver and kidney disorders and also to lower blood cholesterol. The *trans*-dehydrocrotonin (*t*-DCTN), is the major clerodane diterpene isolated from the stem bark of *Croton cajucara*, that showed gastroprotective, hypoglycemic and hypolipidemic effects. Since drugs that possess pharmacological properties are often associated with contradictory cardiovascular and hepatic effects with possible cytoprotection or cytotoxicity properties, the present study aimed to examine the effects of *t*-DCTN (i) in the tests of lethality to *Artemia* sp and in primary cultures of mesencephalic and hepatic cells *in vitro*; (ii) on hepatotoxicity induced *in vivo* by acetaminophen or galactosamine/LPS in mice and (iii) on arterial blood pressure and heart rate *in vivo*, and on chronotropism and inotropism on isolated preparations of rat atria and aortic rings. The *t*-DCTN (0.3 to 300 μ M) demonstrated low toxicity to *Artemia* sp (LC_{50} of 670 ± 80 μ M), and manifested no *per se* cytotoxicity on primary cultures of mesencephalic cells but could effectively revert the reduced cell viability induced by neurotoxin, 6-OHDA (200 μ M). On the other hand, *t*-DCTN (0.3 – 300 μ M) displayed cytotoxicity similar to ethanol (50-400 mM) in primary cultures of hepatocytes. It, however offered hepatoprotection against acetaminophen (500 mg/kg)-induced hepatotoxicity in mice, evidenced from biochemical parameters of hepatic glutathione, and malonaldehyde, and serum AST and ALT levels. Nevertheless, the histological scores in liver tissues were not significantly altered by *t*-DCTN pretreatment. *t*-DCTN pretreatment also offered protection against galactosamine/LPS-induced hepatotoxicity through restoration of glutathione and reductions in serum AST and ALT levels. In pentobarbital sodium anesthetized normotensive rats, *t*-DCTN produced hypotensive and bradycardia responses in a dose-dependent manner. The hypotensive effect of *t*-DCTN (10 mg/kg) was not affected by atropine, propranolol or hexamethonium but was abolished by L-NAME. In isolated right atria, *t*-DCTN inhibited the spontaneous beating but it was unable to reduce the isoproterenol-induced increase in heart beat. The inotropism was unchanged in the presence of *t*-DCTN in isolated left atria. In isolated rat aortic rings, *t*-DCTN relaxed the tonic contraction induced by phenylephrine (1 μ M), which was abolished in endothelium denuded or in L-NAME treated tissues. *t*-DCTN possessed low toxicity to *Artemia* sp; is devoid of neurotoxicity to mesencephalic cells; either induced hepatotoxicity or hepatoprotection, depending on the models used, and further suggested a possible inhibitory action on cytochrome-P450. The hypotensive action of *t*-DCTN may possibly involve in part the nitric oxide release from endothelium, and in part a direct relaxant effect on vascular smooth muscle. Taken together the data available in literature with the present observations suggest a caution while extrapolating animal data for a promising therapeutic utility of *t*-DCTN especially in the treatment of hepatic disorders or diabetes associated pathologies.

1. INTRODUÇÃO

1. 1. Generalidades

Um misto de ciência e curandismo: assim se pode definir o uso terapêutico de plantas ao longo da história humana, e apesar do respaldo científico que vem ganhando nos últimos anos, o conhecimento da ação medicinal das ervas é baseado no empirismo popular. O reino vegetal ainda permanece como uma grande incógnita cujos mistérios começam a ser desvendados.

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a civilização humana. Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (MACIEL *et al.*, 2002).

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, utilizados com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos. Dessa forma, usuários de plantas medicinais de todo o mundo, mantêm em voga a prática do consumo de produtos naturais, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos.

As plantas medicinais consistem em uma estratégia alternativa na procura de novos agentes terapêuticos sendo uma das mais antigas armas empregadas para o tratamento das doenças humanas e muito já se conhece a respeito de seu uso por parte da sabedoria popular. As primeiras descrições sobre plantas medicinais feitas pelo homem remontam às sagradas escrituras e ao papiro de Ebers onde, este último, enumera cerca de 100 doenças e descreve um grande número de drogas de natureza animal e vegetal (PINTO *et al*, 2002). Com os avanços científicos, esta prática milenar perdeu espaço para os medicamentos sintéticos, entretanto, o alto custo destes fármacos e os efeitos colaterais apresentados contribuíram para o ressurgimento da fitoterapia.

O uso de plantas medicinais pela população mundial tem sido muito significativo nos últimos tempos. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), estima que cerca de 80% da população mundial utiliza, preferencialmente, a medicina tradicional nos cuidados primários da saúde, sendo que a maior parte das terapias tradicionais envolve o uso de plantas *in natura* ou produtos manufaturados a partir de seus extratos ou princípios ativos (WHO, 1991).

Na Europa, plantas são largamente utilizadas na medicina, em particular para o tratamento de tosse, circulação, dores musculares, digestão, gripe, insônia, ansiedade, como também para o fígado, rins e bexiga. Algumas plantas também são utilizadas em países europeus na preparação de alimentos e como suplemento alimentar, além do uso de substâncias derivadas de plantas na produção de cosméticos e perfumes (SILANO *et al.*, 2004).

Em alguns países de clima tropical como o Brasil, a abundância de plantas medicinais oferece acesso a diversos produtos utilizados, através da automedicação, na prevenção e tratamento de doenças. No Brasil, a utilização de plantas como meio curativo é uma atividade altamente difundida e popular, às vezes, empregada de maneira equivocada e até mesmo malévola, afinal muitas plantas possuem princípios tóxicos e o seu uso indiscriminado pode causar sérios problemas (MATOS *et al.*, 2001; LORENZI, 2002).

A magnitude da biodiversidade brasileira não é conhecida com precisão tal a sua complexidade, estima-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microorganismos. O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 a 550.000 espécies (GUERRA & NODARI, 2001).

As plantas têm sido um grande atrativo nas últimas décadas conferindo benefícios à saúde como também, fonte material para o desenvolvimento de novas drogas. Produtos derivados de plantas medicinais são utilizados no tratamento de uma variedade de doenças (LEE *et al.*, 2001).

A investigação de produtos naturais e seus diversos metabólitos continua sendo uma fonte potencial para o desenvolvimento de novos produtos para o uso terapêutico e também como ferramentas farmacológicas indispensáveis para a compreensão de fenômenos moleculares complexos em nível celular e molecular.

A exploração deste recurso vegetal pode levar a identificação de metabólitos secundários valiosos que podem servir como drogas ou conduzir ao desenvolvimento de novas drogas terapêuticas. O isolamento das primeiras substâncias puras derivadas de plantas começou a acontecer no século XVIII e, juntamente com o século XIX, caracterizam-se pelos trabalhos de extração, principalmente de ácidos orgânicos e de alcalóides. É desta época o isolamento da morfina (1806), quinina e estriquinina (1820) (PINTO *et al.*, 2002).

A comunidade científica tem insistentemente buscado obter de fontes naturais substâncias que atuem contra diferentes patologias que ainda não possuem um tratamento adequado, como o câncer, AIDS, hepatite B, processos inflamatórios, dor e alergia. Inúmeros são os estudos que confirmam a ação farmacológica de uma variedade de plantas e de seus princípios ativos (FARIAS *et al.*, 1997; RAO *et al.*, 1997; SOUZA *et al.*, 1997; VELA *et al.*, 1997; CALIXTO *et al.*, 1998; PAIVA *et al.*, 1998; BADILLA *et al.*, 1999; ARAÚJO *et al.*, 1999; SOUZA *et al.*, 1999; CECHINEL FILHO *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2000; LUZZI *et al.*, 2000; CALIXTO *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2001a; SILVA *et al.*, 2001a).

O interesse em plantas medicinais cresceu bastante nas duas últimas décadas, fazendo com que indústrias farmacêuticas e institutos de pesquisa tenham como alvo as plantas, na busca de novas drogas e compostos (EVANS, 1996). Assim, o interesse e conseqüentemente os investimentos da indústria farmacêutica têm crescido de maneira expressiva nesta área (BORRIS, 1996; TURNER, 1996). Isto é devido em parte ao

reconhecimento do valor das farmacopéias tradicionais e indígenas e à incorporação de alguns derivados de plantas na terapêutica (ELVIN-LEWIS, 2001).

O único recurso terapêutico de parcela da população brasileira e de mais de 2/3 da população do planeta, o mercado mundial de fitoterápicos, movimenta cerca de US\$ 22 bilhões por ano e vem seduzindo a cada ano mais adeptos nos países desenvolvidos. Em 2000, o setor faturou US\$ 6,6 bilhões nos EUA e US\$ 8,5 bilhões na Europa, sendo a Alemanha o maior mercado mundial de fitoterápicos (FERNANDES *et al*, 2000).

A utilização de terapias não convencionais parece não estar confinada a uma única classe social, contudo indivíduos com patologias crônicas representam claramente um grupo. No Brasil, especialmente na região Nordeste, o uso de plantas medicinais e preparações caseiras assume importância fundamental no tratamento das patologias que afetam as populações de baixa renda, tendo em vista a deficiência da assistência médica, a influência da transmissão oral dos hábitos culturais e a disponibilidade da flora (MATOS, 1989).

O potencial tóxico das plantas medicinais não é novidade. Em alguns países como na Ásia e África, onde o uso de plantas medicinais é comum, algumas são utilizadas com cautela devido sua toxicidade para alguns órgãos como fígado, rins, pele e outros tecidos. É sabido que muitas plantas produzem substâncias que são potencialmente tóxicas. Riscos particulares de toxicidade são associados com o uso de plantas

concomitante com drogas convencionais. Certas ervas medicinais podem reduzir ou potencializar a eficácia de um medicamento (CAPASSO *et al.*, 2000).

A descoberta de novos fármacos, ou de fármacos acessíveis, pode determinar a melhoria da qualidade de vida em doenças crônicas ou a própria sobrevivência do paciente afetado. Socialmente, a descoberta de fontes naturais de compostos químicos usualmente importados e/ou o desenvolvimento de fitoterápicos de fabricação nacional, podem ter consequências econômicas significativas, além de possibilitar a autonomia de cada país no gerenciamento de suas políticas de saúde (ELIZABETSKY, 2001).

1. 2. Terpenos

Os terpenos representam uma classe de produtos naturais amplamente distribuída no reino vegetal, sendo uma família de compostos quimicamente diversos (DI STASI, 1996). Possuem uma composição molecular típica, formados por duas ou mais unidades isoprênicas ($C_{10}H_{15}$) (NABETA *et al.*, 1995).

Esses compostos representam a segunda classe com maior número de constituintes ativos obtidos de plantas, perdendo apenas para os flavanóides. São classificados de acordo com as unidades de carbonos e as formas de ciclização e estão subdivididos em monoterpenos (10 unidades carbonos), sesquiterpenos (15 unidades carbonos), diterpenos (20 unidades carbonos), sesterpenos (25 unidades carbonos),

triterpenos (30 unidades carbonos) e tetraterpenos (40 unidades carbonos) (DI STASI, 1996).

Muitos terpenos também possuem um interesse comercial, incluindo importantes atividades farmacológicas, por exemplo, atividade antitumoral (MUJOO *et al.*, 2001), sedativa (KELECOM, 1983), analgésica (MALHEIROS *et al.*, 2001), cardioprotetora (TORRES *et al.*, 2000), antioxidante (BARONE *et al.*, 1983), antialérgica (YAMAHARA *et al.*, 1982; KUBO *et al.*, 1987) e antihipertensiva (DUBEY, 1974).

Os monoterpenos estão entre os terpenos mais comuns como o citral, cânfora, linalol, terpinen-4-ol, cineol, carvacrol entre outros. Eles representam uma classe nova de agentes potencialmente terapêuticos contra o câncer de mama e ainda são utilizados em várias preparações farmacêuticas (JIRTLE, 1993; POZZI, 1989).

Os sesquiterpenos originam-se com o aumento do número de carbonos; aumentando o número de ciclizações e modificações nas moléculas ocasionando uma variedade de compostos. Alguns compostos antitumorais também são exemplos de sesquiterpenos como, por exemplo, fenolina, elefantina e vernolepina. Outros sesquiterpenos também possuem atividade antiúlcera, citotóxica, antiespasmódica e inibição da síntese de DNA (DI STASI, 1996).

Compostos da subclasse de sesteterpenos são pouco conhecidos e ocorrem em número muito pequeno na natureza. Possuem pouco interesse farmacológico e são mais comuns em esponjas marinhas e alguns fungos.

Os triterpenos caracterizam-se por sua abundância e grande número de constituintes ativos onde estão incluídos metabólitos de grande importância biológica, como o colesterol, vitamina D, hormônios sexuais e inúmeros esteróides. Inúmeros triterpenos possuem atividade antiprotozoária, especialmente contra amebíase e malária onde se destacam a chaparrinona, bruceantina, glaucarubole, bruceínas A, B e C e a quassina. Outros triterpenos como o ácido oleanólico e seu isômero o ácido ursólico, possuem atividade antioxidante, hepatoprotetora, antiinflamatória e antihipelipidêmica (DI STASI, 1996; LIU, 1994).

Os tetraterpenos representam uma subclasse de metabólitos que inclui a maioria dos carotenóides, pigmentos essenciais para a fotossíntese. Do ponto de vista farmacológico, são compostos importantes e extremamente úteis quanto ao seu papel biológico, como é o caso da vitamina A (DI STASI, 1996).

1. 3. Diterpenos

Os diterpenos constituem uma grande e diversificada classe de metabólitos secundários que podem ser considerados como resultados de fatores naturais. Possuem esqueleto básico com 20 átomos de carbono e derivam biogeneticamente do pirofosfato de

geranilgeranila, que resulta do encadeamento cabeça-cauda de quatro unidades de isopreno (TORSSELL, 1983).

Várias propriedades farmacológicas dos diterpenos foram estudadas, dentre elas podemos citar: antitumoral (ADOLF *et al.*, 1985; ROENGSUMRAN *et al.*, 2002), antiinflamatória (BRAQUET, 1988; DEMETZOS *et al.*, 2001), antireumática (GU *et al.*, 1995), antiulcerogênica (SHIRAKABE *et al.*, 1995; HIRUMA-LIMA *et al.*, 2001), antibiótica (NAKANISHI, 1974). Foram também descritas atividades vasculares tanto de relaxamento (DUARTE *et al.*, 1992; LAMBERTE *et al.*, 1994; TORRES *et al.*, 2000) como de contração (BAZAN *et al.*, 1993; MIRANDA *et al.*, 1998).

Dentre os diterpenos biologicamente ativos estudados incluem-se: forskolina, com atividade hipotensora e um ativador específico e reversível das isoformas particulada e solúvel da adenilil ciclase (SEAMON *et al.*, 1981; DALY, 1982); ésteres de forbol, isolados inicialmente de plantas do gênero *Croton* que são ativadores de proteína quinase C e têm sido largamente utilizados para o estudo das funções biológicas, propriedades e distribuição desta enzima e na investigação da carcinogênese química (NISHIZUKA, 1986; CHUANG, 1989) e cleonol com atividades hipotensora, espasmolítica inespecífica, cronotrópica positiva e vasodilatadora (DUBEY *et al.*, 1974).

Os clerodanos são uma classe de diterpenóides bicíclicos cujo nome genérico deriva da (-)-clerodina, primeiro diterpeno da série dos clerodanos isolado da *Clerodendron infotunatum* (BARTON & ELAD, 1956). Variadas atividades biológicas são

citadas para diferentes formas estruturais de clerodanos: antibiótica (ANDERSEN *et al.*, 1983; KHAN *et al.*, 2001), antiúlcero-gênica (APPENDIDO *et al.*, 2003), anti-hipertensiva (ODEK-OGUNDE & RAJAB, 1994), citotóxica (SHEN *et al.*, 2004; SAI *et al.*, 2002), hipoglicemiante (TASHMUKHAMEDOVA *et al.*, 1992), antiproteolítica e anti-hemorragica (JANUARIO *et al.*, 2004), tripanocida (ESPINDOLA *et al.*, 2004), antimalária (MAMBU *et al.*, 2002), antileishmania (HABTEMARIAM, 2003), antiviral e anti-fúngica (ROGERS *et al.*, 1979).

Vários diterpenos também isolados de produtos marinhos têm mostrado pronunciados efeitos cardiovasculares, como por exemplo, respostas inotrópicas positivas, como ativador de canal de sódio (grayanotoxin I) e resposta vasorelaxantes, como Jatrophone. Três diterpenos, flexibilide, dihidroflexibilide e sinulariolide, também isolados de produtos naturais marinhos (*S. jiexibilis* - coral) produzem respostas vasolaxante independente do endotélio, resposta inotrópica positiva e resposta cronotrópica positiva sem produzir toxicidade acentuada (ACERET *et al.*, 1996).

Compostos com atividade vasorelaxante e propriedades inotrópica positiva são interessantes na terapia da insuficiência cardíaca. Efeito cronotrópico positivo é potencialmente útil na insuficiência cardíaca por aumentar a demanda de oxigênio na isquemia miocárdica. Desse modo, estes compostos podem ser de grande utilidade no desenvolvimento de novas drogas no tratamento de insuficiência cardíaca (ACERET *et al.*, 1996).

1. 4. *Croton cajucara* Benth.

A família Euphorbiaceae é uma família de plantas amplamente distribuída em regiões tropicais e temperadas de todo o mundo possuindo cerca de 300 gêneros e 8000 espécies, sendo os gêneros com maior número de espécies o *Euphorbia* e *Croton* (FARNSWORTH, 1976; WEBSTER, 1967; WILSON, 1976).

O gênero *Croton*, cujo nome significa “carrapato”, pertence à família Euphorbiaceae, subfamília Crotonoideae e tribo Crotoneae. É encontrado principalmente como árvore de pequeno porte e arbusto, apresentando cerca de 1000 espécies, metade destas encontradas no Brasil. Algumas espécies do gênero *Croton* distribuídas no Brasil e em outros países são mostradas na **Tabela 1**.

O *Croton cajucara* Benth. (**Figura 1**), conhecido popularmente como “sacaca”, que na língua Tupi significa “feitiço”, representa um recurso medicinal de grande importância no tratamento e cura de várias doenças. Possui características de erva daninha e cresce em áreas abandonadas ou em clareiras abertas em áreas baixas da floresta. É uma árvore de até 6 a 10 metros de altura, encontrada na região amazônica e tendo como centro de dispersão o Estado do Pará. Possui madeira branco-amarelada com cascas aromáticas, folhas inteiras e simples, pecioladas, estipuladas, lanceoladas, peninérveas, verdes com limbos divididos em lobos ou segmentos, inflorescência racemosa com flores de sexo separado, fruto seco, esquizocárpico, separando-se em 3 cocos, bem como sementes ricas em endosperma (DI STASI, 1989; VAN DEN BERG, 1982).

Tabela 1 . Representação de várias espécies do gênero *Croton*.

Gênero <i>Croton</i>	
<i>Croton argyrophylloides</i> Müll. Arg.	<i>Croton matourensis</i> Aubl.
<i>Croton cajucara</i> Benth.	<i>Croton megalocarpus</i> Hutch.
<i>Croton californicus</i> Müll. Arg.	<i>Croton micans</i> Sw.
<i>Croton celtidifolius</i> Baill.	<i>Croton mucronifolius</i> Müll. Arg.
<i>Croton corylifolius</i> Lam.	<i>Croton nepetaefolius</i> Baill.
<i>Croton crassifolius</i> Geiseler.	<i>Croton rhamnifolius</i> Kunth.
<i>Croton erythrochilus</i> Müll. Arg.	<i>Croton salutaris</i> Casar.
<i>Croton essequiboensis</i> Klotzsch.	<i>Croton schiedeanus</i> Schltdl.
<i>Croton jacobinensis</i> Baill.	<i>Croton sincorensis</i> Mart.
<i>Croton joufra</i> Roxb.	<i>Croton sonderianus</i> Müll. Arg.
<i>Croton lacciferus</i> L.	<i>Croton sublyratus</i> Kurz.
<i>Croton lechleri</i> Müll. Arg.	<i>Croton tigilium</i> L.
<i>Croton levatii</i> Guillaumin.	<i>Croton urucurana</i> Baill.

No estado do Pará, as folhas e cascas do caule desta planta são utilizadas em forma de chá ou pílulas, no combate a diabetes, diarreia, malária, febre, problemas estomacais, inflamações do fígado, rins, vesícula e no controle de índices elevados de colesterol (VAN DEN BERG, 1982; DI STASI *et al.*, 1989; DI STASI *et al.*, 1994; MARTINS, 1989).

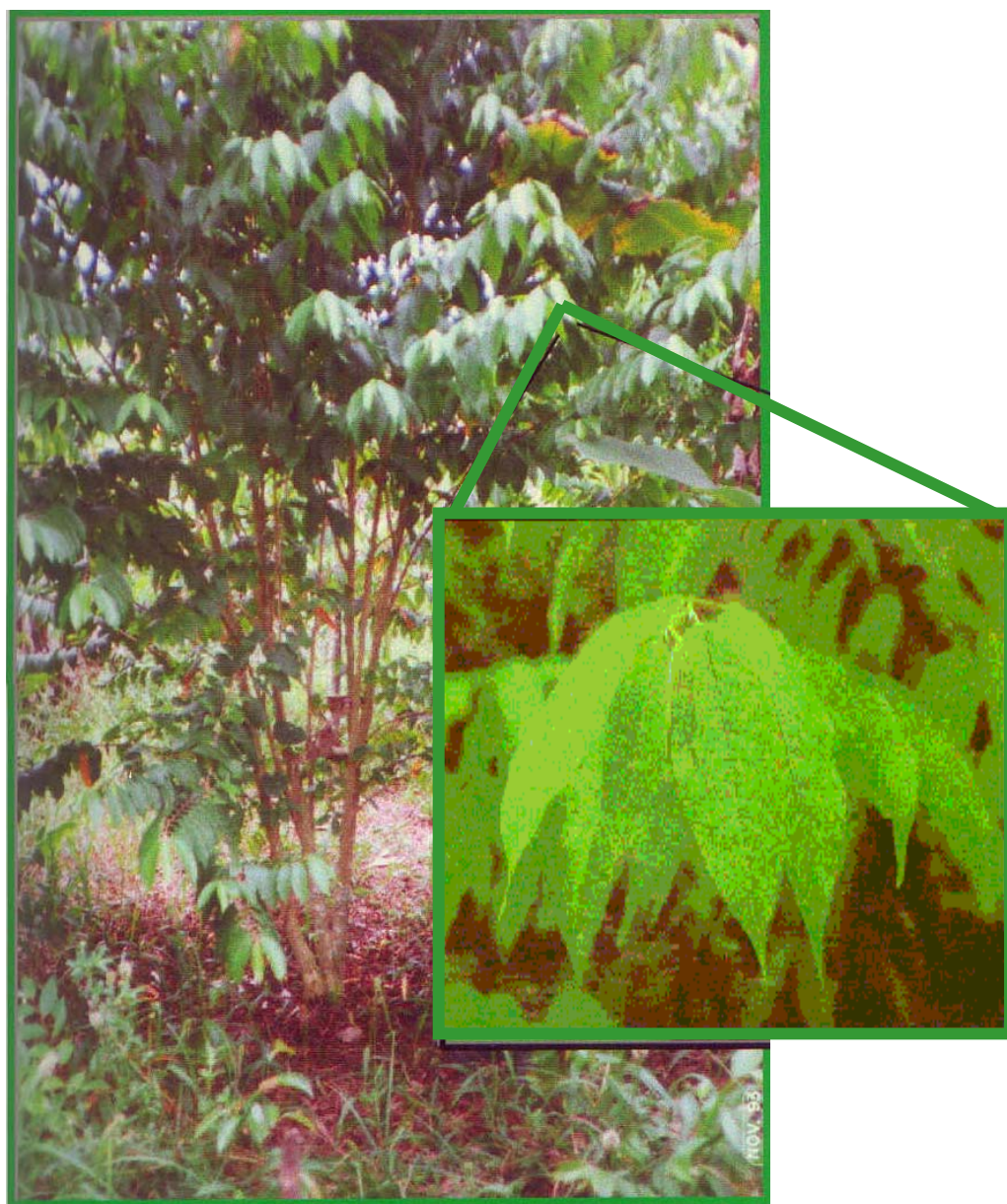


Figura 1. *Croton cajucara* Benth.

A sacaca também é comercializada em farmácias de manipulação e, neste caso, o pó das cascas do caule é vendido em cápsulas (concentração aproximada de 250 mg). As folhas são comercializadas em feiras livres da cidade de Belém-PA, para distúrbios do fígado e auxilia na digestão, principalmente após ingestão de alimentação rica em gorduras. O pó das folhas é vendido em farmácias de manipulação, com indicação hepatoprotetora, para tratamento de diabetes e para dietas de emagrecimento. Em alguns casos, este pó é comercializado em mistura com o pó do boldo do Chile (MACIEL *et al.*, 1998; MACIEL *et al.*, 2000).

O chá das folhas é indicado em academias de ginástica da cidade de Belém para diminuição de peso corporal, em dietas de emagrecimento. Porém, inúmeros casos de hepatite tóxica já foram notificados em hospitais públicos dessa cidade, devido ao uso prolongado deste chá, em dosagens concentradas. O uso recomendado do pó das cascas é 25 g de pó em 1000 mL de água, administrados 2 vezes ao dia durante 3-4 semanas, ou até que os sintomas da doença desapareçam. No caso do uso correto do chá das cascas, não se encontra descrito na literatura, nenhum tipo de efeito colateral (MACIEL *et al.*, 2000).

Apesar do *Croton cajucara* possuir uma grande representatividade na medicina tradicional da região Amazônica, até o final da década de 80, apenas uma avaliação farmacológica havia sido efetuada com esta espécie. Neste estudo, CAVALCANTE e colaboradores em 1988, comprovaram a eficácia hipoglicêmica e hipolipidêmica da sacaca, em ratos. Em 1995, OLIVEIRA e colaboradores, confirmaram o efeito hipolipidêmico em coelhos. Com relação aos estudos fitoquímicos, o óleo essencial das

folhas foi avaliado por ARAÚJO e colaboradores em 1971, e mais recentemente, por LOPES e colaboradores em 1999.

Outras atividades farmacológicas do *Croton cajucara* já foram evidenciadas, das quais podemos citar a atividade antinociceptiva dos extratos hexânicos, clorofórmico e metanólico das folhas (CAMPOS *et al.*, 2002) e o efeito hipolipidêmico, correlacionado com a redução de índices elevados de colesterol, foi evidenciado no extrato hidroalcoólico das folhas (FARIAS *et al.*, 1996). Também foi verificado que o extrato hidroalcoólico das folhas não produziu toxicidade em camundongos tratados oralmente com até 5g/kg (toxicidade aguda).

1. 4. 1. Estudos Fitoquímicos e Farmacológicos

Estudos fitoquímicos do *Croton cajucara* revelaram a presença dos principais constituintes químicos presentes nas folhas, cascas e caule. A presença de óleo essencial nas folhas do *Croton cajucara* foi identificada por CAMPBEL e colaboradores em 1974, possuindo a seguinte composição: 66% de linalol, 2,55% de 1-8 cineol e 1,65% de terpenóides. Nos galhos também se observou a presença de óleo essencial, porém em menor quantidade. Estudos posteriores identificaram a presença de α -pineno, β -cariofileno, α -humuleno, cadineno e mirceno no óleo essencial (HIRUMA-LIMA *et al.*, 1996).

Estudos demonstraram atividade gastroprotetora do óleo essencial obtido a partir das cascas da sacaca como também atividade citotóxica para células V79 (HIRUMA-LIMA *et al.*, 1999b). A atividade anti-leishmanicida foi identificada para o óleo essencial assim como demonstrou efeito antinociceptivo e antiinflamatório (DO SOCORRO *et al.*, 2003; BIGHETTI *et al.*, 1999).

As cascas do caule do *Croton cajucara* detém até o momento, o maior índice de estudos. O estudo fitoquímico clássico realizado com 6 kg das cascas do caule de árvores com idades variando entre 4 - 6 anos, mostrou que esta parte da planta é rica em diterpenos do tipo clerodano. (MACIEL *et al.*, 2000; ITOKAWA *et al.*, 1990; ICHIHARA *et al.*, 1990; KUBO *et al.*, 1991; MACIEL *et al.*, 1998).

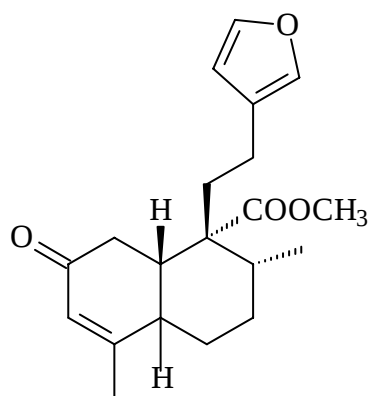
O triterpeno ácido acetilaleuritólico (AAA) também foi isolado das cascas do caule do *Croton cajucara* por MÜLLER e colaboradores em 1986 e MACIEL e colaboradores em 1995. O ácido acetilaleuritólico (AAA) foi isolado como componente majoritário em árvores com idade de 1½ ano. O triterpeno AAA foi também isolado em 0,08% de rendimento, nas árvores com idade variando entre 3-6 anos.

Experimentos biológicos realizados com o AAA mostraram que este triterpeno possui atividade antiespasmódica, ação antiinflamatória e antinociceptiva. Esta substância mostrou-se inativa em testes que avaliam atividades antitumoral e antiulcerogênica (MACIEL *et al.*, 2000; MACIEL *et al.*, 1998; PERAZZO *et al.*, 1997; VANDERLINDE *et al.*, 1997).

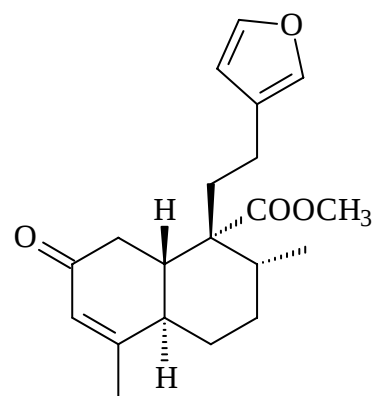
Das folhas do *Croton cajucara* foram isolados e identificados três esteróides (β -sitosterol, stigmasterol e sisterol-3-O- β -glucoside), dois flavanóides (3,4,7-trimetoxicampferol e 3,7-dimetoxicampferol) e um diterpeno nor-clerodano (cajucarinolida) (MACIEL *et al.*, 1995).

Outras investigações fitoquímicas com a casca da sacaca resultaram no isolamento de mais quatro clerodanos: cajucarina A, *cis*-cajucarina B, cajucarinolida e *iso*-cajucarinolida (ITOKAWA *et al.*, 1990; ICHIHARA *et al.*, 1992). O fracionamento dos extratos hexânico e metanólico das cascas do caule do *Croton cajucara* levou ao isolamento e caracterização dos terpenóides: ácido acetilaleuritólico, *trans*-desidrocrotonina, *trans*-crotonina, *cis*-cajucarina B, cajucarinolida e cajucarina A, previamente isolados das cascas do caule desta planta, e dois novos clerodanos: *trans*-cajucarina B e sacarina (**Figura 2**) (MACIEL, 1997).

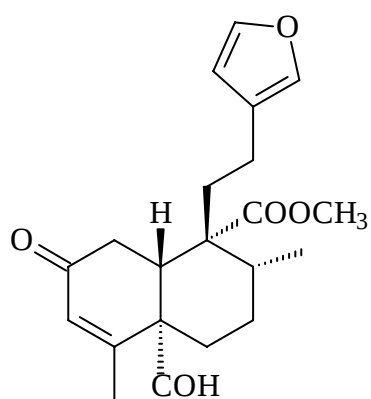
As cascas do caule do *Croton cajucara* foram investigadas pela primeira vez em 1979 na Universidade Federal do Pará, onde foi isolado e identificado o primeiro diterpeno clerodano desta planta. A comparação dos dados espectrais dessa nova substância com os da crotonina, levou a conclusão que se tratava de um derivado deste terpenóide, designado de desidrocrotonina, tendo sua estrutura química definida e possuindo como fórmula molecular $C_{19}H_{22}O_4$ (HIDEJI *et al.*, 1989; MACIEL *et al.*, 1996; MÜLLER *et al.*, 1986; SIMÕES *et al.*, 1979).



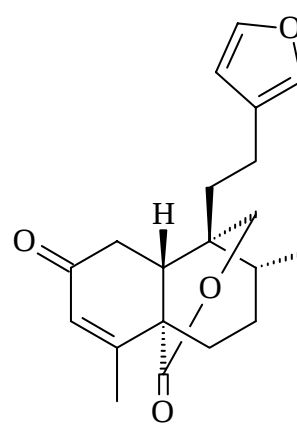
***cis*-cajucarina B**



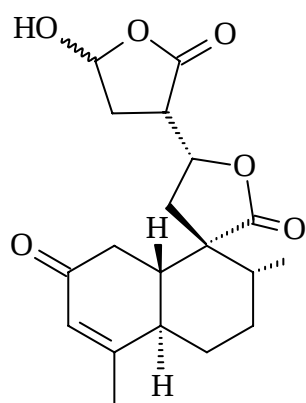
***trans*-cajucarina B**



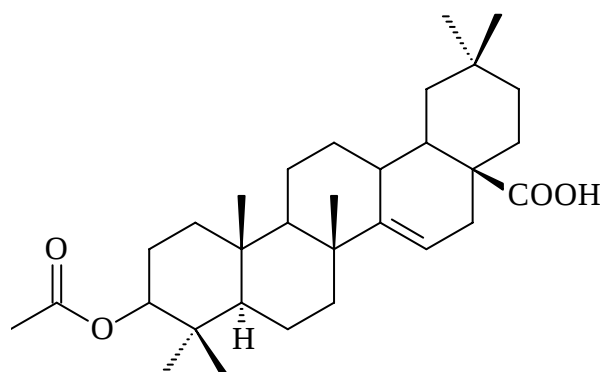
Cajucarina A



Sacarina



Cajucarinolida



Ácido acetilauritólico (AAA)

Figura 2. Estruturas químicas de alguns constituintes isolados do *Croton cajucara* Benth (Maciel, 1997).

Através de hidrogenação catalítica da *t*-DCTN foi obtido o derivado *trans*-crotonina (CTN), o qual possui atividade antiulcerogênica (MACIEL *et al.*, 2000; MACIEL *et al.*, 1998; ALBINO DE ALMEIDA *et al.*, 2003), ações antiinflamatória e antinociceptiva (PERAZZO *et al.*, 1997). No entanto, esta substância não demonstrou efeito em testes que avaliam atividades antitumoral (GRYNBERG *et al.*, 1999) e antiespasmódica (MACIEL *et al.*, 2000; MACIEL *et al.*, 1998), atividades estas, que foram observadas para a molécula-mãe *t*-DCTN.

1. 5. *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN)

A *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) (**Figura 3**) é um diterpeno 19-nor-clerodano obtido da casca do *Croton cajucara*, sendo o componente majoritário de árvores com idades variando entre 4 - 6 anos, com concentração moderada em árvores com 3 anos e não tendo sido detectada em árvores com idade de 1^{1/2} ano. Estes dados podem justificar o uso popular do chá da casca grossa da sacaca, sendo que a casca fina não é utilizada (MACIEL, 1997).

O estudo fitoquímico realizado em todas as partes do *C. cajucara* (raiz até folhas), mostrou que a *t*-DCTN também está presente nas raízes e caule. Estudos com HPLC (High Performance Liquid Chromatograph) realizados com o chá das cascas do *Croton cajucara*, mostraram que a *t*-DCTN é o constituinte majoritário tendo concentração mais elevada no chá obtido com as cascas moídas (MACIEL, 1997). Estes resultados

juntamente com os altos índices de isolamento do clerodano *t*-DCTN nas cascas desta planta, levaram à realização de diversos testes farmacológicos com esta substância.

A toxicidade da *t*-DCTN foi avaliada em camundongos, não sendo observado alterações comportamentais nos animais que justifiquem a ação da *t*-DCTN sobre o sistema nervoso central. A DL_{50} foi determinada e corresponde a 550 mg/kg, via oral (CARVALHO *et al.*, 1996).

O 19-*nor*-clerodano *t*-DCTN mostrou correlação com grande parte das propriedades terapêuticas da planta, evidenciando a atividade antiinflamatória e antinociceptiva correlacionados com as indicações da planta para cura de inflamações (CARVALHO *et al.*, 1996). No modelo de diabetes induzida por aloxana, a *t*-DCTN demonstrou atividade hipoglicêmica comparável àquela produzida pela glibenclamida, não sendo observado o mesmo efeito em animais normais (FARIAS *et al.*, 1997).

Evidenciaram-se ainda, para este diterpeno, propriedades biológicas não mencionadas pelos usuários da planta, tais como a atividade antitumoral e antiestrogênica. A *t*-DCTN possui efeitos citotóxicos basais em linhagem de células fibroblásticas V79 e citotoxicidade seletiva após metabolização em hepatócitos de ratos, como também atividade antitumoral sobre o tumor de sarcoma 180 injetados em camundongos (DA SILVA MELO *et al.*, 2001; MACIEL *et al.*, 1996; GRYNBERG *et al.*, 1999; RODRIGUEZ & HAUN, 1999; MELO *et al.*, 2002; MACIEL *et al.*, 2000).

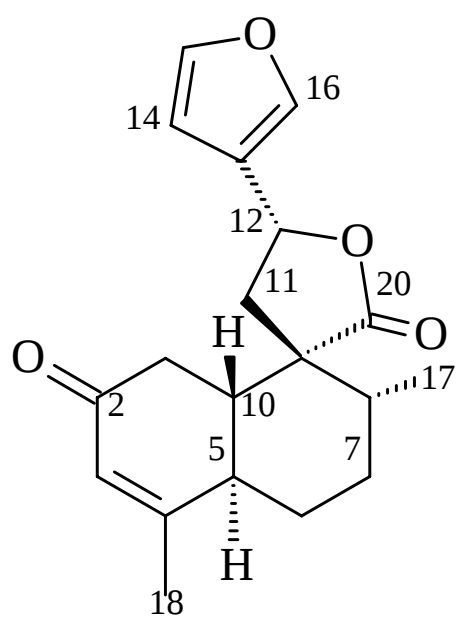


Figura 3. Estrutura química do diterpeno *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN).

Investigações adicionais demonstraram que *t*-DCTN possui atividade antitumoral em linhagem de células HL60 causando necrose celular devido ao estresse oxidativo evidenciado pelo aumento dos níveis de GSH, como também para células mononucleares de sangue periférico humano. Outros trabalhos relatam que a *t*-DCTN produz apoptose em células HL60 através da indução de estresse oxidativo na peroxidação lipídica (FREIRE *et al.*, 2003a; FREIRE *et al.*, 2003b; ANAZETTI *et al.*, 2003; ANAZETTI *et al.*, 2004).

BRITO e colaboradores em 1998 demonstraram que a *t*-DCTN possui significativa atividade antiulcerogênica, correlacionado com o uso da planta para o tratamento de problemas estomacais como azia, gastrite e úlcera gástrica. Este efeito provavelmente está relacionado às ações antissecretória e gastroprotetora por um aumento de prostaglandinas E₂ (HIRUMA-LIMA *et al.*, 1999). Derivados semi-sintéticos da *t*-DCTN foram estudados em diferentes modelos animais de úlcera gástrica e demonstraram possuir atividade gastroprotetora com redução da toxicidade (MELO *et al.*, 2004).

LUNA COSTA em 1999 e MACIEL em 2000 demonstraram as atividades antiestrogênica e antiespasmódica da *t*-DCTN em animais experimentais, respectivamente. Investigações adicionais confirmaram o efeito antimutagênico da *t*-DCTN, através de testes citogenéticos do micronúcleo e de aberrações cromossômicas em células de medula óssea de camundongos, demonstrando que esta não é genotóxica ou citotóxica para estas células (AGNER *et al.*, 2001; AGNER *et al.*, 1999).

Trabalhos demonstram que a administração oral de *trans*-desidrocrotonina é efetiva em reduzir a hiperlipidemia induzida por uma dieta rica em gordura ou por tiloxapol em camundongos, como também na hipertrigliceremia induzida por etanol e sugere seu uso benéfico como um agente antiaterogênico (SILVA *et al.*, 2001a; SILVA *et al.*, 2001b).

Em ratos diabéticos pelo uso da estreptozotocina (STZ), a *t*-DCTN demonstrou atividade antidiabética oral. O efeito hipoglicemiante da *t*-DCTN é maior quando administrada uma hora antes da estreptozotocina (efeito preventivo). Quando a *t*-DCTN foi administrada 48 horas após a STZ (efeito curativo), os níveis de glicose sangüínea caíram em torno de 49 % (SILVA *et al.*, 2001c).

A *trans*-desidrocrotonina não apresentou toxicidade em animais tratados oralmente com a dose de 50 mg/kg, por um período de 30 dias, demonstrando um bom perfil de segurança e eficácia (SILVA, 2000). Entretanto, trabalhos recentes demonstraram que o tratamento oral com altas doses de *t*-DCTN (100 mg/kg) por um período de 5 semanas, aumentou o peso dos fígados com significante redução dos níveis plasmáticos de fosfatase alcalina e colesterol, como também um aumento dos níveis de γ -glutamil transpeptidase (RODRIGUEZ *et al.*, 2004).

Outros derivados da *t*-DCTN estão sendo obtidos (GARDEN *et al.*, 1999; MARTINS, 2000) para que seja possível o estudo da relação estrutura/atividade e dos mecanismos de ação deste diterpeno bioativo que além de ser o componente majoritário

nas cascas do *Croton cajucara*, foi o que apresentou a melhor correlação com grande parte das propriedades terapêuticas da sacaca.

1.6. Toxicidade de drogas hipoglicêmicas e hipolipidêmicas

Diabetes mellitus Tipo 2 é um grave problema de saúde pública, responsável por sérias complicações como complicações microvasculares, cegueira, insuficiência renal, gangrena, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral entre outras (<http://www.diabetes.org.br>).

O tratamento da hiperglicemia tem sido baseado em mudanças no estilo de vida, dieta, exercícios físicos e drogas antidiabéticas orais reduzindo as complicações microangiopáticas e alto risco cardiovascular destes pacientes. Por décadas, foram utilizados sulfonilureias, metformina e inibidores de alfa-glucosidases. Porém, estas drogas não possuem efeitos sobre a resistência muscular à insulina, altos níveis de ácidos graxos livres, lipotoxicidade e perda progressiva das células pancreáticas beta (HALIMI, 2005).

Drogas hipoglicemiantes orais como as sulfonilureas (clorpropamida e glibenclamida) e biguanidinas (metformina), ocupam um importante lugar no tratamento de pacientes portadores de diabetes Tipo 2, os quais não respondem satisfatoriamente, a dieta e exercícios físicos. Embora o exato mecanismo de ação dessas drogas seja pouco entendido, há consenso que as sulfonilureas apresentam efeitos pancreáticos e extrapancreático, enquanto biguanidinas têm predominantemente ações extrapancreáticas.

Os efeitos tóxicos das drogas hipoglicemiantes orais são mais freqüentes na velhice e na presença de condições que possam levar a um acúmulo ou potenciação (aumento na dose, compostos de ação prolongada, doenças hepáticas e renais, interação com outras drogas), porém, a relação entre efeitos tóxicos e níveis plasmáticos tem sido registrado apenas como uso das guanidinas (MARCHETTI & NAVALESI, 1989).

Há um aumento nas evidências que sulfonilureas e biguanidinas, drogas hipoglicemiantes orais, influenciam nos fatores de riscos nas doenças cardiovasculares em pacientes com diabetes Tipo 2 devido a ações que não são relacionadas com alterações no controle glicêmico. Apesar das sulfonilureas apresentarem efeitos antiarrítmicos em arritmias secundárias a isquemia do miocárdio, há evidências que sua ação sobre os canais de potássio sensíveis a ATP localizados no leito vascular podem contribuir para elevação da pressão sanguínea e aumentar a responsividade vascular.

Em contraste com as sulfoniluréas, metformina (uma biguanidina) parece reduzir a pressão sanguínea e possuir efeitos benéficos sobre as lipoproteínas do plasma por reduzir as lipoproteínas de baixa densidade e possivelmente aumentar os níveis das lipoproteínas de alta densidade (HOWES *et al.*, 1996).

Glibenclamida atenua a resposta de proteção à abertura dos canais de potássio vascular, sensíveis a ATP durante a isquemia. Dessa forma, tratamento da diabetes Tipo 2 com glibenclamida pode apresentar perigosos efeitos cardiovasculares quando usado sob condições de isquemia. Glimepirida e metformina parecem não apresentar tais

características concluindo que o tratamento crônico de diabetes mellitus Tipo 2 com glimepirida ou metformina apresenta efeito similar sobre os canais de potássio vasculares sensíveis a ATP, quando comparado com tratamento crônico com glibenclamida (ABBINK *et al.*, 2002).

Glibenclamida diminui a incidência do infarto do miocárdio e o desenvolvimento de fibrilação ventricular em pacientes que sofrem de infarto agudo do miocárdio. Também diminui a incidência de contrações ectópicas ventriculares em pacientes fazendo uso de drogas digitálicas, quando comparados com pacientes tratados com outros compostos do tipo sulfonilureas. A sobrevivência dos pacientes tratados com glibenclamida, insulina ou terapia a base de dieta é maior após o primeiro ataque de angina peitoral ou após o primeiro infarto agudo do miocárdio comparado com outros tratados com biguanidinas (POGATSA, 1996).

Glibenclamida diminui a arritmogênese durante o infarto agudo do miocárdio em ratos e a cardiotoxicidade induzida por estiofantina em coelhos. A pressão sanguínea arterial e a força contrátil do miocárdio são influenciadas pela glibenclamida enquanto estes parâmetros estão aumentados por outros compostos de sulfonilureas. Conseqüentemente, efeitos cardiovasculares deletérios de certas drogas hipoglicêmicas, como sulfonilureas, podem contribuir para a alta taxa de mortalidade cardiovascular nos diabetes mellitus, devido parcialmente aos efeitos sobre os canais de membrana e parcialmente devido a ações independente do miocárdio e extracardíaca (POGATSA, 1996).

As tiazolidinas (TDZs) são conhecidas por serem ligantes dos PPAR-gama. Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) são fatores de transcrição pertencentes a uma superfamília de receptores nucleares. Atualmente, três isoformas de PPARs foram isoladas e denominadas alfa, beta (ou delta) e gama (TAKANO *et al.*, 2004). Vários estudos foram realizados, focalizando o papel dos PPAR-gama na regulação do metabolismo da glicose e do metabolismo lipídico, porém, pesquisas recentes sugerem papéis adicionais, principalmente no desenvolvimento de processos inflamatórios e aterosclerótico, tendo sido demonstrada sua presença em células da parede arterial e também em macrófagos (célula espumosas) no interior da lesão ateromatosa (MARX, 1998).

As drogas glitazona e pioglitazona, agonistas do PPAR-gama, não têm efeito só hipoglicemiantes, mas também efeito positivo sobre o metabolismo lipídico, endotélio, estresse oxidativo e inflamação vascular, e ações adicionais das glitazonas podem reduzir o desenvolvimento da aterosclerose. Além disto, o PPAR-alfa e seus agonistas são potentes agentes hipolipemiantes aumentando o colesterol-HDL plasmático e reduzindo os ácidos graxos livres (AGL), triglicerídeos (TG) e colesterol-LDL. Desta forma, estes mediadores reduzem a inflamação vascular e trombose, promovendo fibrinólise e inibindo a produção de endotelina-1 (ET-1) pelo endotélio (SCHIFFRIR, 2004).

Efeitos antihipertensivos de rosiglitazona, agonista do receptor PPAR γ , tem sido estudado em pacientes com diabetes ou obesidade. A correlação da expressão de PPAR γ com a pressão sanguínea e a aplicação terapêutica de rosiglitazona em ratos

espontaneamente hipertensos (REH) foi investigada. Tratamento crônico com rosiglitazona, mas não com agonista PPAR α (Wy14643) significativamente retardou o desenvolvimento da hipertensão e reverteu frequência cardíaca anormal em REH jovens. Um efeito desfavorável de rosiglitazona foi o aumento no índice de peso coração-corpo acompanhado por hipertrofia ventricular esquerda. Tratamento crônico com rosiglitazona retarda o desenvolvimento da hipertensão, mas a pró-hipertrofia associada, chama a atenção para o uso desta tiazolidinas no tratamento da síndrome da resistência a insulina associada com hipertensão (WU *et al.*, 2004).

Pacientes com diabetes mellitus têm uma alta incidência de doenças coronarianas e insuficiência cardíaca congestiva. As TZDs são uma nova classe de agentes farmacológicos no tratamento da diabetes mellitus Tipo 2, e que possuem muitos efeitos cardiovasculares benéficos. Porém, em obesos e diabéticos hipertensos as TDZs podem exacerbar uma disfunção diastólica ventricular esquerda não diagnosticada (SRIVASTAVA *et al.*, 2004).

As glitazonas são ligantes farmacológicos dos receptores PPAR γ , expressos principalmente no tecido adiposo branco. O efeito hipoglicemiante é moderado sendo mais pronunciado em associação com outras drogas antidiabéticas orais. Estudos a longo prazo possivelmente confirmarão os efeitos benéficos sobre a perda das células beta e de alguns parâmetros cardiovasculares no diabetes Tipo 2 e na síndrome metabólica (HALIMI, 2005).

Triglitazona, a primeira droga da classe das tiazolidinas, utilizada no tratamento da diabetes Tipo 2, foi comercializada em março de 1997 e retirada do mercado americano 36 meses após noventa casos de insuficiência hepática terem sido registrados (CLUXTON *et al.*, 2005). Troglitazona, uma tiazolidina, foi removida do mercado devido a sua hepatotoxicidade. Os casos registrados envolvendo novas TZDs de segunda geração, rosiglitazona e pioglitazona, são poucos em números e menos severos em danos (MARCY *et al.*, 2004).

Estatinas, agentes conhecidos por diminuir o colesterol, têm sido utilizado por 15 anos e estão dentre as drogas mais comumente prescritas. Estudos animais e ensaios clínicos têm mostrado sinais de hepatotoxicidade, primariamente por elevação nos níveis da enzima sérica alanina aminotransferase (ALT). Por esta razão, todas as drogas que diminuem os níveis de colesterol requerem monitoramento das enzimas hepáticas.

A primeira das estatinas, lovastatina, foi aprovada em 1986 sendo utilizada por milhões de pacientes ao ano. Pequena elevação nas enzimas hepáticas (ALT) ocorre em 2,6% e 5,0% dos pacientes que fazem uso de lovastatina nas doses de 20 e 80 mg/dia, respectivamente (TOLMAN, 2003).

Estas elevações são reversíveis com a continuação da terapia, são doses relacionadas, e são provavelmente, relacionadas à diminuição do colesterol *per se*. Raros casos de insuficiência aguda hepática têm sido registrados com todas as drogas que diminuem os níveis de colesterol. Com lovastatina, a frequência é de aproximadamente

1/1,14 milhões de pacientes tratados ao ano. Monitoramento da hepatotoxicidade não tem sido efetivo na prevenção das doenças hepáticas, devido a sua raridade e fraco valor de predição com relação às alterações da ALT (TOLMAN, 2003).

1.7. Relevância e justificativa

O *Croton cajucara* Benth. (sacaca) é popularmente utilizado no tratamento do diabetes, desordens hepática e renal, obesidade e hipertensão. Estudos etnofarmacológicos estabeleceram propriedades antiinflamatória, antinociceptiva, antiulcerogênica, antitumoral, hipoglicêmica, hipolipidêmica e citotóxica da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN), um diterpeno do tipo clerodano obtido da sacaca e componente majoritário desta planta.

Com base nos dados apresentados e de acordo com estudos anteriores que demonstram que drogas hipoglicemiantes, hipolipidêmicas e gastroprotetoras podem induzir efeitos deletérios a nível cardiovascular e hepático, decidimos investigar os efeitos tóxicos da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN).

2. OBJETIVOS

Uma vez que, muitas atividades já foram comprovadas para a *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) e que estudos demonstraram que algumas substâncias hipoglicemiantes, hipolipidêmicas e gastroprotetoras são associadas a efeitos contrditórios sobre os sistemas cardiovascular e hepático, este trabalho tem por objetivo geral avaliar a toxicidade da *t*-DCTN sobre os sistemas cardiovascular e hepático *in vivo* e *in vitro*.

Como objetivos específicos temos:

- ✎ Determinar a toxicidade aguda da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) para *Artemia* sp e determinação da CL₅₀;
- ✎ Avaliar o efeito citotóxico da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) em cultura de células primárias mesencefálicas e hepáticas de rato;
- ✎ Determinar a ação da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) em modelos animais de hepatite tóxica induzida por acetaminofeno e GalN/LPS;
- ✎ Avaliar a ação da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) em anéis de aorta isolada de rato com endotélio intacto ou desnudo;
- ✎ Estudar os efeitos potenciais da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) na pressão arterial média e frequência cardíaca, como também no cronotropismo e inotropismo de ratos, em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*, e os possíveis mecanismos de ação implicados.

3. MATERIAL

3. 1. Material botânico

A *t*-DCTN foi isolada a partir da casca do caule do *Croton cajucara* Benth. e fornecida pela Prof^a Maria Aparecida Maciel do Departamento de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Para utilização nos experimentos, a *t*-DCTN foi diluída na concentração de até 3% de Tween 80 em água destilada ou salina 0,9%.

3. 2. Animais experimentais

Camundongos albinos (*Mus musculus*), variedade Swiss Webster, adultos, de ambos os sexos, pesando entre 25-30g e ratos albinos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, adultos, de ambos os sexos, pesando entre 180-200g, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno, à temperatura variando entre 22-24 °C, com ciclos de claro/escuro de 12 em 12 h, recebendo ração padrão (Purina Chow) e água *ad libitum*. Os protocolos experimentais utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal – CEPA da Universidade Federal do Ceará.

3. 3. Drogas e reagentes

3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT)	Sigma, USA
Acetilcolina	Sigma, USA
Ácido acético glacial P.A.	Synth
Ácido Etilenodiaminotetraacético sal dissódico (EDTA)	Proanalysis
Ácido fosfórico	Sigma, USA
Ácido tiobarbitúrico	Sigma, USA
Ácido tricloroacético P.A.	Sigma, USA
Ácido trinitrobenzeno sulfônico - TNB	Sigma, USA
Álcool etílico absoluto P.A.	Quimex, Brasil
Azul de Evans	Reagen, Brasil
Bicarbonato de sódio	Vetec, Brasil
Bromidrato de 6-Hidroxidopamina	Sigma, USA
Cloreto de cálcio	Vetec, Brasil
Cloreto de potássio	Vetec, Brasil
Cloreto de sódio	Vetec, Brasil
Dimetilfulfóxido (DMSO)	Reagen, Brasil
Éter etílico	Labsynth, Brasil
Fenilefrina	Sigma, USA
Glicose	Vetec, Brasil
Glutamina	Sigma, USA
L-NAME	Sigma, USA
Malonaldeído	Sigma, USA
Meio essencial mínimo de Eagle (MEM)	Gibco BRL
N-(1-naftil)-etilenodiamina diidrocloreto	Merck, Alemanha
N-Acetilcisteína	Fluimucil [®] , Eurofarma
Naftiletlenodiamina	Sigma, USA
Nitroprussiato de sódio	Merck, Alemanha
Poli-lisina	Sigma, USA

Soro de cavalo	Gibco BRL
Sulfanilamida	Sigma, USA
Sulfato de magnésio	Vetec, Brasil
Trizma	Sigma, USA
Tween 80	Riedel, Alemanha
n-butanol	Lafan
Glutation reduzido	Sigma, USA
Indometacina	Sigma, USA

3. 4. Soluções fisiológicas

As soluções foram preparadas com sais de pureza analítica e estocados em temperatura ambiente. As concentrações são expressas em milimolar (mM).

- Solução salina

NaCl (154)

- Solução de Krebs-Henseleit

NaCl (116), KCl (4,75), MgSO₄7H₂O (1,2), KH₂PO₄H₂O (1,2), NaHCO₃ (25),

CaCl₂ 2H₂O (0,25) e Glicose (11).

pH 7,4 e aerado com carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂), mantido a 37°C.

3. 5. Aparelhos

Agitador – aquecedor, modelo 258	Fanen [®] , Brasil
Agitador de tubos – VORTEX, AP 56	PHOENIX
Analizador bioquímico semi-automático: modelo DU640B	Beckman [®]
Analizador bioquímico semi-automático: modelo RA-50	Bayer [®] , Brasil
Balança analítica	Marte [®] , Brasil
Balança para animais	Filizola [®] , Brasil

Banho-maria: Modelo Q-249

Centrifuga refrigerada, modelo CT 5500 DR

Fisiógrafo

Freezer -75°C

Lavadora ultrasônica, modelo USC 700

pHmetro, modelo PM 608

Pipetas automáticas

QUIMIS[®], Brasil

CIENTEC[®], Brasil

Narco Biosystems[®], USA

Legaci System[®]

UNIQUE[®]

Alalion[®]

Jencons[®]

4. MÉTODOS

4. 1. Isolamento da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN).

A *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) foi isolada do extrato hexânico das cascas do *Croton cajucara* Benth., o qual forneceu, após filtração em gel de sílica, a fração CH₂Cl₂ (eluída em diclorometano).

A fração CH₂Cl₂ sofreu nova filtração em gel de sílica, tendo sido eluída com hexano- CH₂Cl₂-MeOH em gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas frações de 500 mL, que sofreram monitoramento por cromatografia de camada delgada - CCD, gerando a reunião de 6 grupos de frações.

Os grupos de frações 7-21/ 22-25/ 26-29/ 30-33/ 34-41, eluídos em hexano-CH₂Cl₂ (5:5 – 0:1) o grupo de frações 42-53, eluídos em CH₂Cl₂-MeOH (9:1-0:1), foram submetidos ao processo de recristalização em hexano-Me₂CO. Após as filtrações obteve-se aproximadamente 32 g de um sólido cristalino (rendimento) correspondente ao diterpeno *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN), como mostra a **FIGURA 4**.

Sólido cristalino. Ponto de fusão: 139-140 °C. Peso molecular: 314.

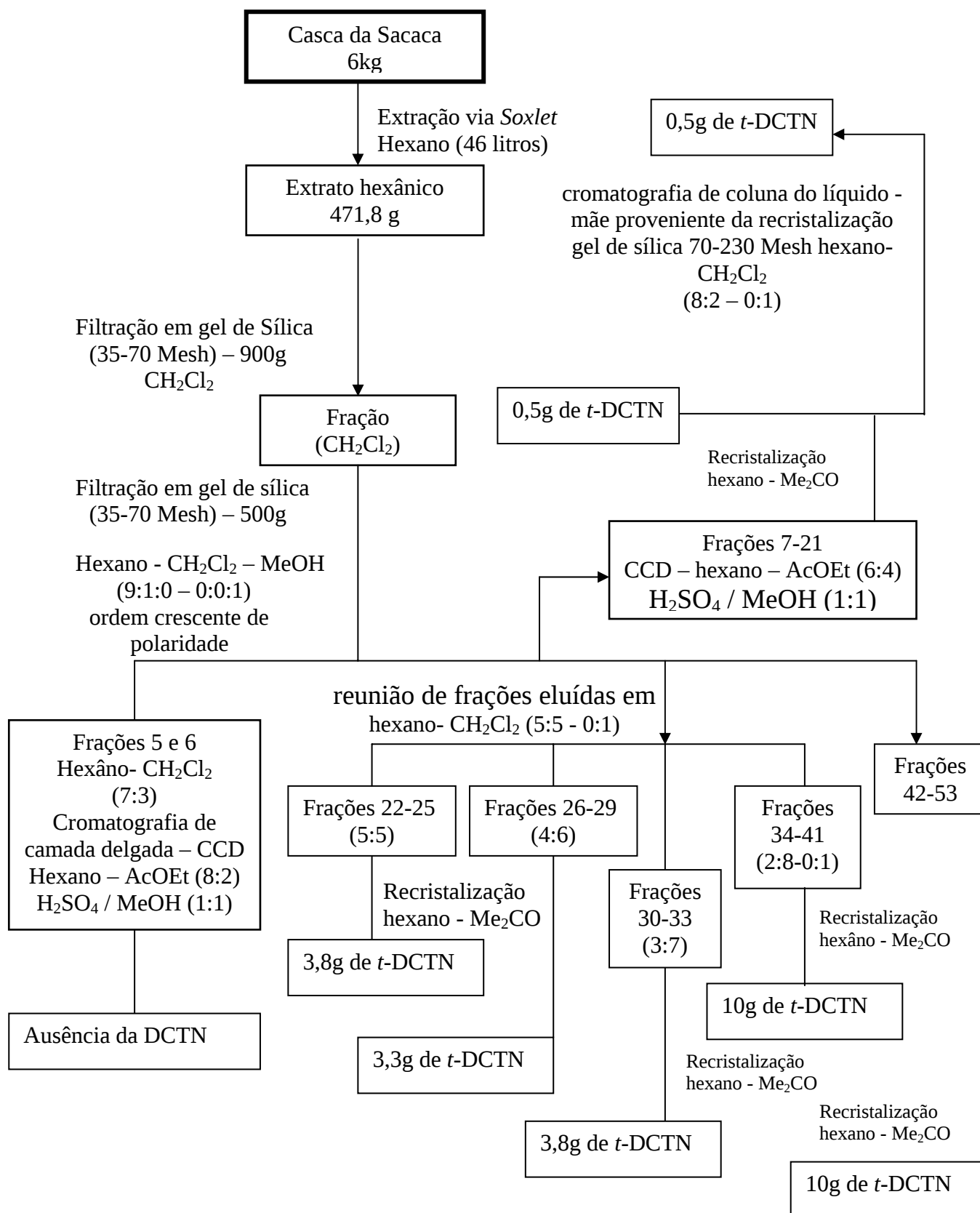


FIGURA 4. Método de obtenção do diterpeno *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) a partir dos extratos hexânico e clorofórmico.

4.2. Toxicidade aguda da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) para Camarão de Salmoura (*Artemia* sp) e determinação da CL₅₀.

A avaliação da toxicidade frente a *Artemia* sp segue o método descrito por MEYER e colaboradores em 1982. Os ovos de *Artemia* (50 mg) foram colocados para eclodir em um recipiente com água marinha (1000 mL), aerado durante 48h (colocado um foco de luz após as primeiras 24h). Após este período, as larvas foram coletadas com auxílio de uma pipeta de Pasteur.

Várias concentrações da *t*-DCTN (1 – 1200 µg/mL) foram preparadas e colocadas em frascos aos quais adicionou-se água marinha, sendo 5 mL o volume final em cada frasco. Dez larvas foram adicionadas a cada frasco e utilizados três frascos para cada dose da substância, sendo o número de mortes dentre as 30 larvas verificado após 24h.

A CL₅₀ (concentração letal para 50% das larvas) com intervalo de confiança de 95% foi determinada para a *t*-DCTN de acordo com o método descrito por MILLER & TAINTER (1944). Controles não tratados, veículo (Tween 80 a 3%) e tratado com dicromato de potássio (10 – 100 µg/mL) foram adicionados ao estudo com finalidade de comparação. As doses foram dadas em escala logarítmica (MEYER *et al.*, 1982).

4.3. Cultura primária de células mesencefálicas e hepatócitos.

A cultura de células mesencefálicas contendo células neuronais e gliais foram obtidas de mesencéfalo de embriões de rato Wistar de 17-20 dias de gravidez como descrito por CHOI e colaboradores em 1987. Dos mesmos animais foi retirado o fígado, para a cultura de células hepáticas seguindo o método descrito por LILJA e colaboradores em 1998.

O mesencéfalo foi dissecado mecanicamente e as células suspensas em Meio Essencial de Eagle (MEM) enriquecido com soro de cavalo 10%, estreptomicina (100 mg/mL), penicilina (1000 UI/mL), actinomicina C (2,5 mg/mL), glutamina (2 mM), bicarbonato de sódio (24 mM) e glicose (11 mM). A suspensão de células foi distribuída em placas de 96 poços com uma concentração de 5×10^4 células/poço e previamente tratadas com poli-lisina. As culturas foram mantidas a 37°C em estufa a 5% CO₂. Após cinco dias, as culturas foram utilizadas para experimentação.

Os fígados foram dissecados mecanicamente em solução de EDTA (2 mM) a 37°C em banho-maria com agitação. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas com solução de Hanks. O sobrenadante foi suspenso em Meio Essencial de Eagle Modificado (D-MEM) e soro bovino fetal 10%. A suspensão de células foi distribuída em placas de 96 poços com uma concentração de 10^5 células/poço e previamente tratadas com poli-lisina. As culturas foram mantidas em meio de Ham's F-12

contendo dexametasona (10^{-7} mol/L) e insulina (0,6 mg/L) a 37°C em estufa a 5% CO₂. Após 24 horas as culturas foram utilizadas para experimentação.

4.3.1. Efeito citotóxico da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) em células mesencefálicas de rato.

A neurotoxicidade foi avaliada usando o ensaio de 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium brometo - MTT, que se baseia na redução deste sal, pelas mitocôndrias das células viáveis, para o sal de Formazan, sendo a quantidade deste um indicativo da viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Após cinco dias da preparação da cultura, a *t*-DCTN nas concentrações de 3, 30 e 300 µM foi adicionada a cultura 24 horas antes do tratamento com 6-OHDA (200 µM). Após 24 horas de incubação foi então adicionado 150 µL de MTT, na concentração de 5 mg/mL em cada poço. As células foram incubadas por mais 3h e, após este período, o sobrenadante foi descartado e adicionado 150 µL de DMSO puro para a lise das células e solubilização do Formazan.

Passados 15 min de agitação, a absorbância foi medida com leitor de microplacas em 550 nm. A inibição da redução do MTT indica a diminuição da viabilidade celular.

4.3.2. Efeito citotóxico da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) e do etanol em células hepáticas de rato.

A viabilidade de células hepáticas foi quantificada utilizando o ensaio do MTT (MOSMANN, 1983). Para isto, após 24 horas do preparo da cultura de hepatócitos, foi adicionado a esta cultura etanol nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 mM ou *t*-DCTN nas concentrações de 0,3; 3, 30 e 300 μ M.

Após o período de 24 horas de incubação, foi adicionado 150 μ L de 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium brometo (MTT), na concentração de 5 mg/mL em cada poço. As células foram incubadas por mais 3h e, após este período, o sobrenadante foi descartado e adicionado 150 μ L de DMSO puro para a lise das células e solubilização do formazan.

Passados 15 min de agitação, a absorbância foi medida com leitor de microplacas em 550 nm. A inibição da redução do MTT indica a diminuição da viabilidade celular. Os experimentos foram realizados em sextuplicata e repetidos em três diferentes dias.

4.3.3. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) sobre a produção de nitrito em células mesencefálicas de rato.

Após o período de incubação, a concentração de nitrito foi determinada segundo o método de GREEN e colaboradores em 1981, que se baseia em revelar a presença de nitrito em uma amostra (urina, plasma, homogenato tecidual) por uma reação de diazotização que forma um cromóforo de cor rósea, com pico de absorbância de 560 nm.

Para isso, 100 µL do reativo de Griess (sulfanilamida a 1%; cloridrato de N-(1-naftil)-etilenediamina 0,1%; H₃PO₄ em 1% e água destilada, na proporção de 1:1:1:1) foi adicionado a 100 µL do sobrenadante da cultura de célula e incubado a temperatura ambiente por 10 min. A curva padrão foi elaborada com várias concentrações de NaNO₂ (variando de 0,75 à 100 µM) sob as mesmas condições.

Os brancos foram preparados pela adição de 100 µL do reativo de Griess a 100 µL do meio de cultura e a absorbância foi medida em leitor de microplacas em 560 nm.

4. 4. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) na hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno em camundongos.

Camundongos Swiss, fêmeas (25-30g), divididos em grupos de 8 animais cada, em jejum de sólidos de 18h, foram tratados com veículo (3% de Tween 80 em água destilada – 0,1 mL/10g, v.o.) ou *t*-DCTN (25 e 50 mg/kg, v.o.) 48, 24 e 2 horas antes, com exceção da N-acetilcisteína (NAC - 750 mg/kg, i.p.) que foi administrada apenas 2 horas antes, da administração oral de acetaminofeno na dose de 500 mg/kg (JANBAZ & GILANI, 2000).

Os animais que receberam apenas veículo foram incluídos no estudo como controle normal. Para avaliar o efeito hepatotóxico da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN), animais foram tratados durante o mesmo período com as doses de 25 e 50 mg/kg, via oral.

Após o período de 24 horas depois da administração do acetaminofeno, amostras de sangue, de todos os animais, foram obtidas através do plexo orbital, sob leve anestesia com éter, em tubos de coleta de soro com gel separador (Vacuette[®]) para determinação dos níveis de Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT) utilizando kits bioquímicos específicos (Labtest[®]) e um analisador bioquímico semi-automático (Bayer[®], modelo RA-XT).

Os animais foram então sacrificados e o tecido hepático coletado, pesado e processado para a dosagem de malonaldeído hepático - MDA (MIHARA & UCHIYAMA,

1978) e grupos sulfidrilas não protéicos hepáticos - NP-SH (SEDLACK & LINDSAY, 1968), como também processado para análise hirtológica (SILVA *et al.*, 2001).

4.5. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) na hepatotoxicidade induzida por D-Galactosamina/Lipopolissacarídeo em camundongos.

Camundongos Swiss, machos (25-30g), divididos em grupos de 8 animais cada, em jejum de sólidos de 18h, foram tratados com veículo (3% de tween 80 em água destilada – 0,1 mL/10g, v.o.) ou *t*-DCTN (25 e 50 mg/kg, v.o.) 48, 24 e 2 horas antes, com exceção da Dexametasona (DEX – 2 mg/kg, i.p.) e N-acetilcisteína (NAC - 750 mg/kg, i.p.) que foram administradas apenas 2 horas antes, da injeção intraperitoneal de uma solução de D-galactosamina (GalaN - 800 mg/kg) e Lipopolissacarídeo (LPS – 7,5 µg/kg), que foram dissolvidos em solução salina normal e administrados conjuntamente (GalN/LPS). Os animais que receberam apenas veículo foram incluídos no estudo como controle normal (MORIKAWA *et al.*, 1996).

Após duas horas da administração de GalN/LPS, amostras de sangue, de todos os animais, foram obtidas através do plexo orbital, sob leve anestesia com éter, em tubos de coleta de soro com gel separador (Vacuette[®]), para determinação dos níveis de Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT) utilizando kits bioquímicos específicos (Labtest[®]) e um analisador bioquímico semi-automático (Bayer[®], modelo RA-XT).

Seis horas após a administração de GalN/LPS, os animais foram sacrificados, o tecido hepático coletado, pesado e processado para a dosagem de grupos sulfidrilas não protéicos hepáticos - NP-SH (SEDLACK & LINDSAY, 1968), como também processado para análise hirtológica (SILVA *et al.*, 2001).

4.6. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) sobre níveis de malonaldeído (MDA) hepático.

O teor de TBARS (μg de MDA/g de tecido) foi quantificado pelo método de MIHARA & UCHIYAMA (1978), para estimar a peroxidação lipídica. O fígado foi removido, pesado e homogeneizado com KCl gelado 1,15% para preparar um homogenato a 10%. Uma alíquota de 0,5 mL foi retirada de cada amostra, adicionou-se 3 mL de H_3PO_4 1% e 1mL de ácido tiobarbitúrico - TNB 0,6% em solução aquosa.

Os tubos foram aquecidos por 45 minutos em um banho de água fervente, então a mistura reacional foi resfriada em um banho de gelo seguido da adição de 4 mL de *n*-butanol. O conteúdo foi misturado por 40 segundos com o auxílio de um vortex e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos.

A absorbância da camada orgânica (fase butanólica) foi medida a 520 e 535 nm e a diferença das absorbâncias obtidas nas duas leituras foi utilizada para calcular o malonaldeído. A concentração de MDA foi calculada através da curva de calibração de MDA e os resultados expressos por μg de MDA/g de tecido.

4.7. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) sobre os grupos sulfidrilas não proteicos (NP-SH) hepáticos.

A quantificação dos grupos sulfidrilas não proteicos (NP-SH) foi realizada segundo o método de SEDLACK & LINDSAY (1968). O fígado foi removido, pesado e homogeneizado com EDTA 0,02 M gelado, para preparar um homogenato a 10%. Uma alíquota de 4 mL de cada amostra foi retirada e adicionado 3,2 mL de água destilada e 0,8 mL de ácido tricloroacético - TCA 50% em solução aquosa.

Os tubos de ensaio contendo a mistura foram centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos. Um volume de 2 mL foi retirado do sobrenadante e adicionado 4 mL de Tris 0,4M, pH 8,9 e 0,1 mL de DTNB 0,01M.

A absorbância foi medida dentro de 5 minutos a 412 nm. A concentração de NP-SH foi calculada através de uma curva de calibração de glutathiona reduzida (GSH) e os resultados expressos em µg de NP-SH/g de tecido.

4.8. Avaliação histopatológica

Para avaliação das alterações teciduais microscópicas dos fígados, foram realizados cortes histológicos de todos os grupos. O órgão foi fixado em formalina neutra 10%, incluído em parafina, realizadas secções em micrótomo e corado com hematoxilina-eosina. As alterações histopatológicas foram examinadas em microscópio óptico e atribuídos escores numa escala de 0 a 5 para presença e intensidade das lesões de acordo com SILVA *et al.*, 2001, onde:

0 = nenhuma lesão;

1 = mínimo de lesões envolvendo poucas células necróticas;

2 = lesões suaves com 10-25% de células necróticas ou suaves mudanças degenerativas;

3 = lesões moderadas com 25-40% de células necróticas ou degenerativas;

4 = lesões marcadas com 40-50% de células necróticas ou degenerativas;

5 = lesões severas com mais de 50% de células necróticas ou degenerativas.

4.9. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos normotensos.

Ratos Wistar normotensos, machos, 180-200 g, foram utilizados para detectar os efeitos da *t*-DCTN sobre a pressão sanguínea. Os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.) e tiveram a artéria carótida direita e veia jugular esquerda canuladas com cateter de polietileno, para registro da pressão arterial e injeção das substâncias testes, respectivamente. A traquéia foi canulada para permitir a respiração espontânea. À temperatura corporal dos animais foi mantida a 37°C.

O registro da pressão intracarotidiana foi continuamente monitorado por intermédio de um transdutor de pressão Gould Statham P23 (Gould Co. Inc., Oxnard). A frequência cardíaca foi registrada concomitantemente através de um cardiotacômetro (Narco Biosystems) por meio de uma pena inscritora à tinta.

Após um período de 30 minutos de equilíbrio, valores basais controle da pressão arterial média (PAM) foram obtidos com registro contínuo da pressão. Veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%) ou dose crescentes de *t*-DCTN (5, 10 e 15 mg/kg) foram administrados lentamente pela veia jugular na forma de *bolus* de volume constante (0,2 mL) com intervalo mínimo entre as injeções de 15 minutos. As variações na frequência cardíaca (bpm). A pressão arterial média (Δ PAM) expressa em mmHg e calculada segundo a fórmula: $PAM = PD + (PS - PD)^2 / 3$, foram utilizadas para expressão dos dados.

Para caracterização farmacológica da resposta da *t*-DCTN (10 mg/kg) em animais normotensos, injeções em *bolus* de atropina (5 mg/kg), hexametônio (30 mg/kg), L-NAME (10 mg/kg) ou propranolol (2 mg/kg) foram administradas antes da injeção de *t*-DCTN (10 mg/kg).

4.10. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) em átrio isolado de rato.

Ratos Wistar, machos, 250-300 g, foram sacrificados por deslocamento cervical e exsanguinação, o coração foi rapidamente removido, o átrio esquerdo cuidadosamente dissecado, montado verticalmente em banhos com capacidade de 5 mL e superfundidos com solução de Krebs-Henseleit (pH 7,4), aerado (95% O₂ e 5% CO₂) e mantido a 37°C.

Uma tensão de 1 g foi aplicada no átrio e as preparações foram mantidas em equilíbrio por uma hora, com lavagens a cada 15 minutos, antes da execução dos experimentos. Os valores do controle inicial para a tensão de contração do átrio isolado foram registrados usando um transdutor de deslocamento de força (F-60, Narco Biosystems) acoplado a um fisiógrafo (DMP-4B, Narco Biosystems). Um eletrodo bipolar e um estimulador de *Grass* S6 (Grass, Quincy) foram acoplados às preparações. O estímulo teve duração de 5 ms e a voltagem foi 10% acima do limiar.

O inotropismo foi medido pelo índice máximo da força isométrica desenvolvida durante a estimulação elétrica numa frequência fixa de 150 batimentos/min. Os valores controles (100%) foram atribuídos à amplitude da contração antes da adição das drogas.

Em alguns experimentos a *t*-DCTN foi testada sobre o inotropismo positivo produzido pelo cloreto de cálcio (10^{-7} – 10^{-2} M) para se verificar um provável antagonismo via cálcio (SALAKO *et al.*, 1976).

Os efeitos das drogas testadas foram validados sobre o batimento espontâneo do átrio direito isolado e montado da mesma maneira como descrito para o átrio esquerdo. A frequência controle (batimentos/min) foi registrada continuamente em fisiógrafo após período de equilíbrio de 30 min., o qual foi considerado como 100%.

Após 30 minutos do período de equilíbrio, curvas cumulativas concentração-resposta para a *t*-DCTN (0,1 – 100 µg/mL) foram obtidas na presença e na ausência de atropina (2×10^{-7} M). O efeito da *t*-DCTN sobre o batimento cardíaco induzido por isoproteronol (10^{-12} – 10^{-3} M) também foi observado.

4.11. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) em anéis de aorta isolado de rato com ou sem endotélio.

A reatividade vascular da *t*-DCTN foi avaliada inicialmente em segmentos de aorta isolada nos quais o endotélio foi preservado. Em outro grupo de experimento, o endotélio foi retirado mecanicamente por fricção mecânica. A integridade funcional do endotélio foi testada por adição de uma dose única de acetilcolina (Ach, 1 µM) aplicada no platô da resposta contrátil tônica da fenilefrina (1 µM) e obtido 60-80 % de relaxamento (FURCHGOTT & ZAWADSKI, 1980).

Ratos Wistar, machos, 300-350 g, foram sacrificados por deslocamento cervical e, imediatamente após, a aorta torácica foi removida e cuidadosamente limpa em placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit. Anéis de 5 mm foram montados horizontalmente em banho isovolumétrico de 5 mL contendo solução de Krebs-Henseleit (pH 7,4), aerado (95% O₂ e 5% CO₂) e aquecido (37°C). A solução de Krebs-Henseleit utilizada apresentava a seguinte composição (g/L): NaCl 6,7, KCl 0,37, MgSO₄·7H₂O 0,144, KH₂PO₄·H₂O 0,17, NaHCO₃ 2,1, CaCl₂·2H₂O 0,3085, Glicose 0,65.

Os anéis foram ligados a um polígrafo (DMP-4B, Narco Biosystems) por meio de um transdutor de força, sob tensão de 1 g e mantidos em repouso por 1h com lavagens a cada 15 minutos antes do início do experimento.

Para os dois grupos de experimentos (endotélio intacto – e⁺ e endotélio removido – e⁻), o anel de aorta foi pré-contráído com fenilefrina (1 µM), e após atingir o platô, duas curvas cumulativas, para o veículo (Tween 80 3%, isovolumetricamente ao usado na curva de *t*-DCTN) ou para a *t*-DCTN (1, 3, 10, 30, 100 e 300 µg/mL) foram feitas. As doses são adicionadas em intervalos de 3 minutos sobre o platô da contração tônica.

Ao final da curva de *t*-DCTN, o tecido foi lavado e uma nova contração com fenilefrina foi feita, para mostrar a reversibilidade da ação da droga. Ach (1 µM) é adicionada ao platô, para mostrar a presença ou ausência de endotélio no anel de aorta. Para verificar a participação de óxido nítrico, outro grupo de tecido foi pré-tratado com L-

NAME (100 μ M) e curvas cumulativas com *t*-DCTN, nas mesmas concentrações, foram feitas.

4. 12. Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do programa GraphPad Prism 3.0 para Windows (GraphPad Software). Os cálculos de CI_{50} e pD_2 também foram obtidos utilizando-se o mesmo programa de computador GraphPad Prism 3.0 para Windows.

Os valores experimentais obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). Para comparação entre as médias foi utilizada a análise de variância (ANOVA), e a significância entre os grupos estabelecida pelos testes de Student Newman Keuls, para dados paramétricos, e teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunnett, para dados não paramétricos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5. 1. Toxicidade aguda para *Artemia* sp

Através da utilização do método dos probitos determinou-se a CL_{50} (concentração letal para 50% das larvas) da *t*-DCTN que foi de $200 \pm 25,60 \mu\text{g/mL}$, sendo assim menos tóxico do que o dicromato de potássio ($20 \pm 1,83 \mu\text{g/mL}$), conhecida substância tóxica para a *Artemia* sp que possui CL_{50} entre 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$.

5.2. Efeito citotóxico da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) sobre a viabilidade de células mesencefálicas de rato.

Os resultados demonstram que a neurotoxina 6-OHDA na concentração de 200 μM reduziu significativamente em 65% a viabilidade celular ($0,0716 \pm 0,0101$ abs) quando comparado ao controle ($0,2050 \pm 0,0116$ abs).

A viabilidade das células não foi influenciada pela administração isolada da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) nas concentrações de 3, 30 e 300 μM ($0,2183 \pm 0,0047$; $0,2077 \pm 0,0060$ e $0,2075 \pm 0,0047$ abs, respectivamente) quando comparado a 6-OHDA ($0,0716 \pm 0,0101$ abs). Entretanto, o pré-tratamento das células mesencefálicas com a *t*-DCTN, nas mesmas concentrações, 24 horas antes da administração da 6-OHDA, promoveu uma significativa citoproteção de forma dose dependente ($0,1872 \pm 0,0127$;

0,2243 $\pm$ 0,0150 e 0,2390 $\pm$ 0,0149 abs, respectivamente) quando comparado a neurotoxina 6-OHDA (0,0716 $\pm$ 0,0101 abs) (**Tabela 2 e Figura 5**).

As células mesencefálicas expostas a neurotoxina 6-OHDA, demonstraram um aumento na produção de óxido nítrico evidenciado pelo aumento dos níveis de nitrito (3,4270 $\pm$ 0,1801 μ M) quando comparado ao grupo controle (0,1927 $\pm$ 0,0321 μ M). A *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN), nas concentrações testadas (3, 30 e 300 μ M), não alterou os níveis de nitrito (0,1920 $\pm$ 0,0288; 0,2030 $\pm$ 0,0412 e 0,1655 $\pm$ 0,0500 μ M, respectivamente) quando comparado ao controle normal (0,1927 $\pm$ 0,0321 μ M).

A administração de *t*-DCTN, nas mesmas concentrações, reduziu os níveis de nitrito produzidos pela adição de 6-OHDA (1,308 $\pm$ 0,0808; 1,258 $\pm$ 0,0564 e 1,481 $\pm$ 0,1653 μ M, respectivamente) quando comparado ao grupo 6-OHDA (3,4270 $\pm$ 0,1801 μ M) (**Tabela 3 e Figura 6**).

Tabela 2. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) sobre a viabilidade de células mesencefálicas de ratos expostas ou não a 6-OHDA.

GRUPOS	DOSE (μ M)	MTT Abs
Controle	---	0,2050 $\pm$ 0,0116
6-OHDA	200	0,0716 $\pm$ 0,0101 ^a
<i>t</i> -DCTN	3	0,2183 $\pm$ 0,0047
	30	0,2077 $\pm$ 0,0060
	300	0,2075 $\pm$ 0,0047
<i>t</i> -DCTN + 6-OHDA	3	0,1872 $\pm$ 0,0127 ^b
	30	0,2243 $\pm$ 0,0150 ^b
	300	0,2390 $\pm$ 0,0149 ^b

Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). As células foram cultivadas durante 7 dias e, após este período foram tratadas com *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) 24 horas antes da 6-OHDA. Após o tratamento, a viabilidade celular foi determinada pelo MTT. ^ap<0,05 vs controle; ^bp<0,05 vs 6-OHDA (ANOVA e Teste de Dunnett).

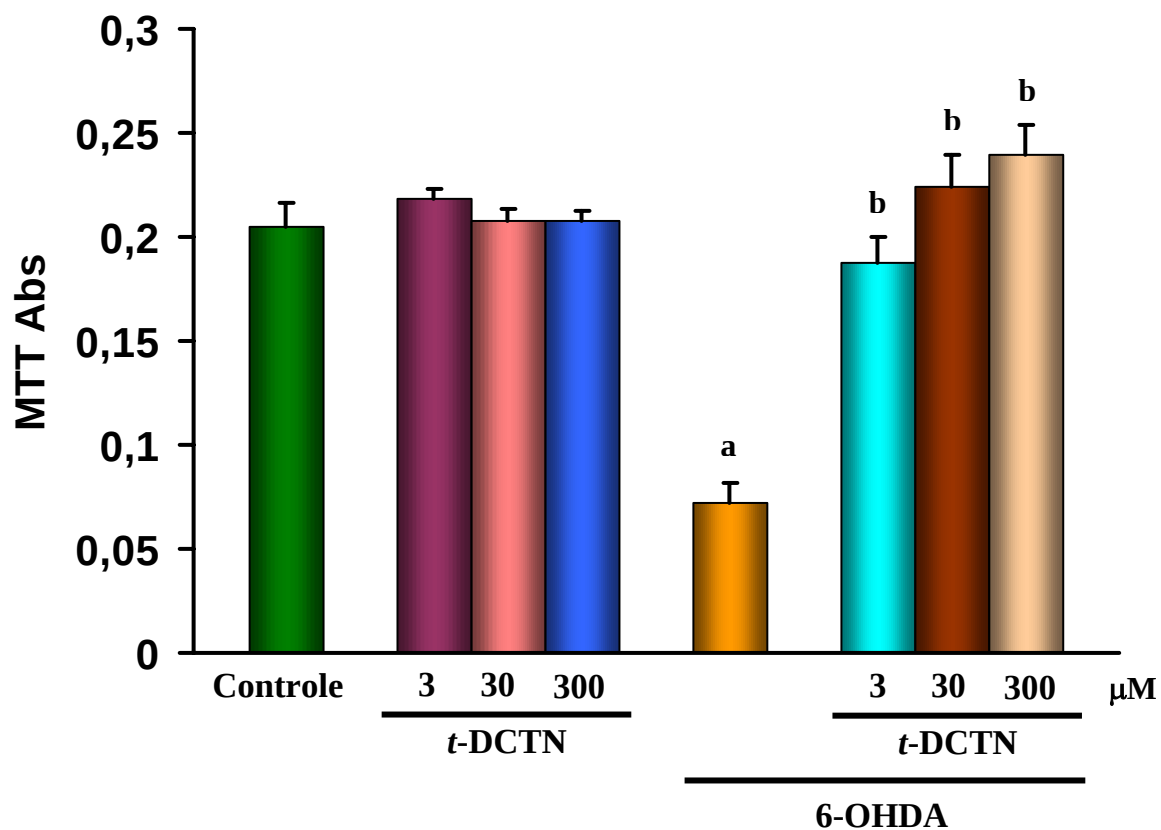


FIGURA 5. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) sobre a viabilidade de células mesencefálicas de ratos na presença ou não de 6-OHDA. As células foram cultivadas durante 7 dias e, após esse período, tratadas com *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN 3, 30 e 300 μM) 24 horas antes da 6-OHDA (200 μM). A viabilidade celular foi determinada pelo MTT. Cada coluna representa a média ± erro padrão da média (E.P.M.). ^ap<0,05 vs controle; ^bp<0,05 vs 6-OHDA (ANOVA e Teste de Dunnett).

Tabela 3. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) sobre a produção de nitrito em cultura células mesencefálicas de ratos expostas ou não a 6-OHDA.

GRUPOS	DOSE (μ M)	Nitrito (μ M)
Controle	---	$0,1927 \pm 0,0321$
6-OHDA	200	$3,4270 \pm 0,1801^a$
<i>t</i> -DCTN	3	$0,1920 \pm 0,0288$
	30	$0,2030 \pm 0,0412$
	300	$0,1655 \pm 0,0500$
<i>t</i> -DCTN + 6-OHDA	3	$1,308 \pm 0,0808^b$
	30	$1,258 \pm 0,0564^b$
	300	$1,481 \pm 0,1653^b$

Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). As células foram cultivadas durante 7 dias e, após este período foram cultivadas com *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) 24 horas antes da 6-OHDA. Após o tratamento os níveis de nitrito foram determinados. ^ap<0,05 vs controle; ^bp<0,05 vs 6-OHDA (ANOVA e Teste de Dunnett).

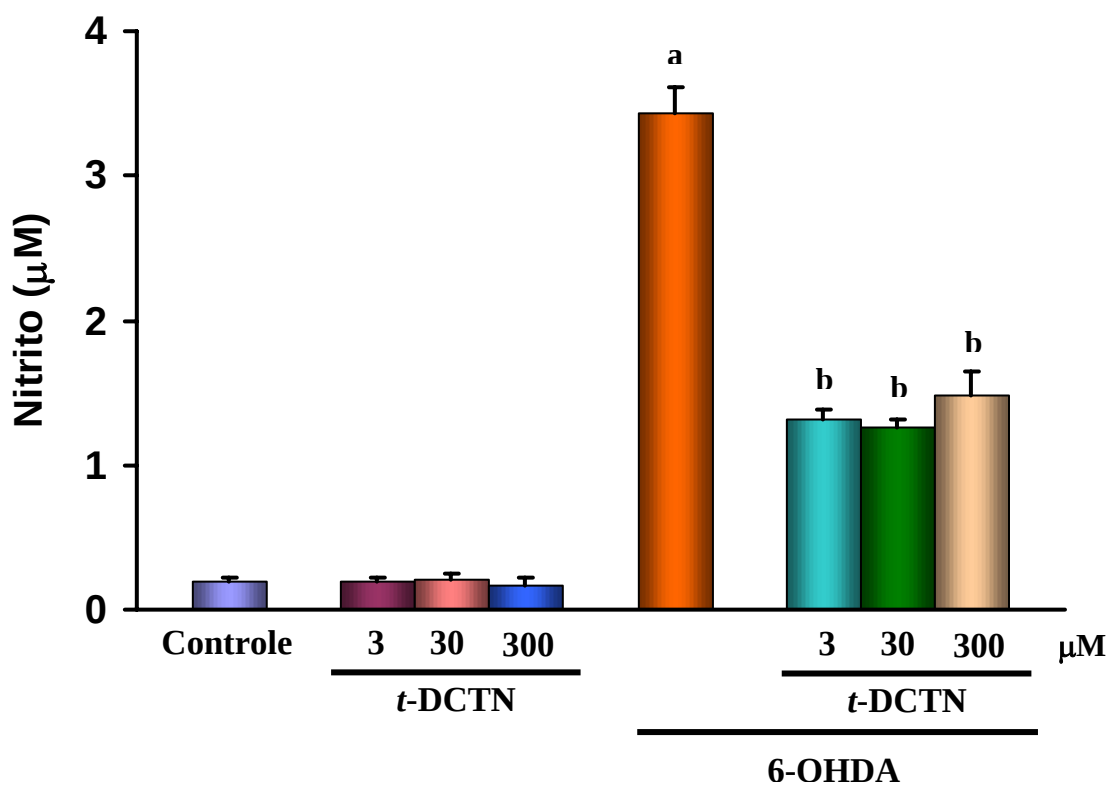


FIGURA 6. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) sobre os níveis de nitrito em cultura de células mesencefálicas de ratos na presença ou não de 6-OHDA. As células foram cultivadas durante 7 dias e, após este período, foram tratadas com *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN – 3, 30 e 300 μM) 24 horas antes da 6-OHDA (200 μM). Após o tratamento os níveis de nitrito foram determinados. Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.). ^ap<0,05 vs controle; ^bp<0,05 vs 6-OHDA (ANOVA e Teste de Dunnett).

5.3. Efeito citotóxico da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) sobre a viabilidade de células hepáticas de rato.

O etanol nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 mM apresentou uma significativa toxicidade dose dependente sobre as células hepáticas ($0,0986 \pm 0,0027$; $0,0820 \pm 0,0028$; $0,0585 \pm 0,0024$ e $0,0491 \pm 0,0021$ abs, respectivamente), diminuindo a viabilidade celular em 10, 25, 46 e 55% respectivamente, sendo seu efeito máximo na concentração de 400 mM, quando comparado ao grupo controle ($0,1092 \pm 0,0033$ abs) **(Tabela 4 e Figura 7 A)**.

A administração da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) nas concentrações de 0,3; 3, 30 e 300 μ M, demonstrou uma diminuição dose dependente na viabilidade celular ($0,0920 \pm 0,0026$; $0,0743 \pm 0,0065$; $0,0673 \pm 0,0026$ e $0,0570 \pm 0,0013$ abs, respectivamente) quando comparado ao grupo controle ($0,1092 \pm 0,0033$ abs), sendo seu efeito máximo (48%) na concentração de 300 μ M **(Tabela 5 e Figura 7 B)**.

Tabela 4. Efeito citotóxico do etanol sobre a viabilidade de células hepáticas de rato.

GRUPOS	DOSE (mM)	MTT Abs
Controle	---	0,1092 ± 0,0033
Etanol	50	0,0986 ± 0,0027 ^a
	100	0,0820 ± 0,0028 ^a
	200	0,0585 ± 0,0024 ^a
	400	0,0491 ± 0,0021 ^a

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.). As células foram cultivadas durante 24 horas e, após este período, foram tratadas com etanol. Após 24 horas do tratamento, a viabilidade celular foi determinada pelo MTT. ^ap<0,05 vs controle (ANOVA e Teste de Dunnett).

Tabela 5. Efeito citotóxico da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) sobre a viabilidade de células hepáticas de rato.

GRUPOS	DOSE (μ M)	MTT Abs
Controle	---	0,1092 $\pm$ 0,0033
<i>t</i> -DCTN	0,3	0,0920 $\pm$ 0,0026 ^a
	3,0	0,0743 $\pm$ 0,0065 ^a
	30	0,0673 $\pm$ 0,0026 ^a
	300	0,0570 $\pm$ 0,0013 ^a

Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). As células foram cultivadas durante 24 horas e, após este período, foram tratadas com *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN). Após 24 horas do tratamento, a viabilidade celular foi determinada pelo MTT. ^ap<0,05 vs controle (ANOVA e Teste de Dunnett).

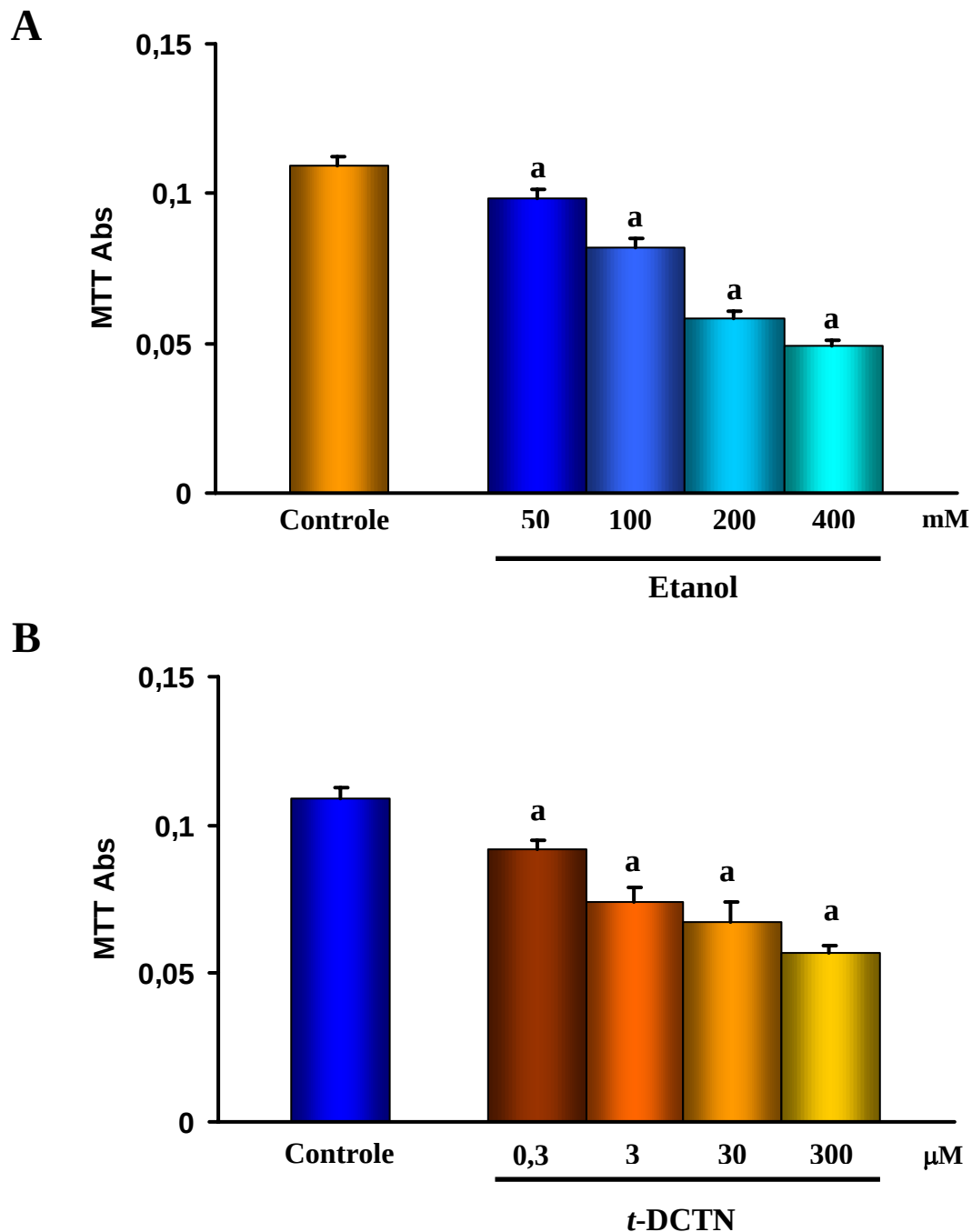


FIGURA 7. Efeito citotóxico do etanol e *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) sobre a viabilidade de células hepáticas de rato. As células foram cultivadas durante 24 horas e, após esse período, tratadas com etanol (50, 100, 200 e 400 mM, **A**) ou *t*-DCTN (0,3; 3; 30, e 300 µM, **B**) durante 24 horas. A viabilidade celular foi determinada pelo MTT. Cada coluna representa a média ± erro padrão da média (E.P.M.). ^ap<0,05 vs controle (ANOVA e Teste de Dunnett).

5. 4. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) na hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno em camundongos

A administração via oral de acetaminofeno (500 mg/kg) mostrou uma significativa redução ($p < 0,05$) nos níveis de NP-SH ($191,93 \pm 7,31 \mu\text{g/g}$ de tecido) quando comparado ao grupo controle normal ($245,87 \pm 9,54 \mu\text{g/g}$ de tecido).

O pré-tratamento via oral 48, 24 e 2h antes do acetaminofeno com a *t*-DCTN nas doses de 25 e 50 mg/kg, foi capaz de impedir a depleção dos grupos sulfidrilas produzidos pelo acetaminofeno ($294,65 \pm 26,90$ e $373,96 \pm 15,33 \mu\text{g/g}$ de tecido, respectivamente) quando comparado ao grupo acetaminofeno ($191,93 \pm 7,31 \mu\text{g/g}$ de tecido).

A *t*-DCTN administrada via oral nas doses de 25 e 50 mg/kg, durante o mesmo período, foi capaz de aumentar os níveis de glutathiona hepática ($368,66 \pm 16,38$ e $389,80 \pm 25,07 \mu\text{g/g}$ de tecido, respectivamente) quando comparado ao grupo controle normal ($245,87 \pm 9,54 \mu\text{g/g}$ de tecido).

A administração intraperitoneal de N-acetilcisteína (NAC, 750 mg/kg), inibiu de forma significativa ($p < 0,001$) a depleção dos grupos sulfidrilas produzidas pelo acetaminofeno (**Tabela 6 e Figura 8**).

Os níveis de malonaldeído hepático (MDA) no grupo acetaminofeno ($53,88 \pm 7,40 \mu\text{g/g}$ de tecido) aumentaram significativamente ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle normal ($20,17 \pm 2,15 \mu\text{g/g}$ de tecido). N-acetilcisteína foi capaz de reduzir os níveis de malonaldeído hepático ($20,44 \pm 2,43 \mu\text{g/g}$ de tecido) de forma significativa ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo controle acetaminofeno ($53,88 \pm 7,40 \mu\text{g/g}$ de tecido).

O pré-tratamento com a *t*-DCTN nas doses de 25 e 50 mg/kg via oral, foi capaz de reduzir ($p < 0,05$) os níveis de malonaldeído hepático ($36,07 \pm 6,00$ e $31,37 \pm 4,34 \mu\text{g/g}$ de tecido, respectivamente) quando comparado ao grupo acetaminofeno ($53,88 \pm 7,40 \mu\text{g/g}$ de tecido).

A *t*-DCTN *per se* administrada via oral nas doses de 25 e 50 mg/kg, durante o mesmo período, não exerceu influência significativa sobre os níveis de malonaldeído hepático ($34,43 \pm 2,55$ e $30,53 \pm 3,96 \mu\text{g/g}$ de tecido, respectivamente) quando comparado ao grupo controle normal ($20,17 \pm 2,15 \mu\text{g/g}$ de tecido) (**Tabela 6 e Figura 9**).

A administração de acetaminofeno (500 mg/kg, v.o.) aumentou de forma significativa ($p < 0,01$) os níveis AST e ALT séricos ($149,05 \pm 31,09$ e $165,06 \pm 14,32 \text{ U/L}$, respectivamente) quando comparado ao grupo controle normal ($41,60 \pm 3,20$ e $59,99 \pm 5,20 \text{ U/L}$, respectivamente).

O tratamento com *t*-DCTN nas doses de 25 e 50 mg/kg via oral, promoveu uma redução significativa ($p < 0,001$) dos níveis séricos de AST ($60,48 \pm 11,38$ e $65,19 \pm 10,34$ U/L, respectivamente) e ALT ($74,73 \pm 13,15$ e $51,05 \pm 4,91$ U/L, respectivamente) quando comparado ao grupo acetaminofeno ($149,05 \pm 31,09$ e $165,06 \pm 14,32$ U/L, respectivamente). Da mesma forma, N-acetilcisteína (750 mg/kg, i.p.) promoveu redução significativa ($p < 0,001$) em ambos os níveis de enzimas séricas ($61,53 \pm 8,22$ e $45,88 \pm 3,14$ U/L, respectivamente).

A administração oral de *t*-DCTN (25 e 50 mg/kg), durante o mesmo período, não exerceu influência significativa sobre os níveis séricos de AST ($44,49 \pm 0,85$ e $43,42 \pm 0,98$ U/L, respectivamente) e ALT ($70,44 \pm 2,53$ e $65,48 \pm 3,30$ U/L, respectivamente) quando comparado ao grupo controle normal ($41,60 \pm 3,20$ e $59,99 \pm 5,20$ U/L, respectivamente) (**Tabela 7 e Figura 10**).

Entretanto, o pré-tratamento com *t*-DCTN na dose de 50 mg/kg via oral, antes da administração de acetaminofeno, reduziu de forma significativa ($p < 0,01$) os escores de lesão hepática (2 [2-3]) quando comparado ao grupo acetaminofeno (5 [4-5]), o que também foi observado nos animais tratados com N-acetilcisteína (1 [0-1]). A administração oral isolada de *t*-DCTN nas doses de 25 e 50 mg/kg, não promoveu lesão hepática significativas nos animais tratados como podemos observar pelos escores de lesão (0 [0-1] e 0 [0-1], respectivamente) quando comparado ao grupo controle normal (0 [0-0]) (**Tabela 8**).

Tabela 6. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) sobre os Níveis de Glutathiona e Malonaldeído na Hepatotoxicidade induzida por Acetaminofeno em Camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	NP-SH (μ g/g tecido)	MDA (μ g/g tecido)
Controle normal	---	245,87 $\pm$ 9,54	20,17 $\pm$ 2,15
<i>t</i> -DCTN	25	368,66 $\pm$ 16,38 ^a	34,43 $\pm$ 2,55
	50	389,80 $\pm$ 25,07 ^a	30,53 $\pm$ 3,96
Acetaminofeno	500	191,93 $\pm$ 7,31 ^a	53,88 $\pm$ 7,40 ^a
<i>t</i> -DCTN + Acetaminofeno	25	294,65 $\pm$ 26,90 ^b	36,07 $\pm$ 6,00 ^b
	50	373,96 $\pm$ 15,33 ^b	31,37 $\pm$ 4,34 ^b
NAC + Acetaminofeno	750	261,18 $\pm$ 17,18 ^b	20,44 $\pm$ 2,43 ^c

Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) para os níveis hepáticos de glutathiona (NP-SH) e malonaldeído (MDA) de oito animais. As dosagens foram analisadas 24 horas após a administração oral de acetaminofeno (500 mg/kg). A N-acetilcisteína (NAC, 750 mg/kg, i.p.) foi administrada 2 horas antes e veículo (Tween 80) e a *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN, 25 e 50 mg/kg, v.o.) 48, 24 e 2 horas antes da administração de acetaminofeno. ^ap<0,001 vs controle normal; ^bp<0,05 vs controle acetaminofeno; ^cp<0,001 vs controle acetaminofeno (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

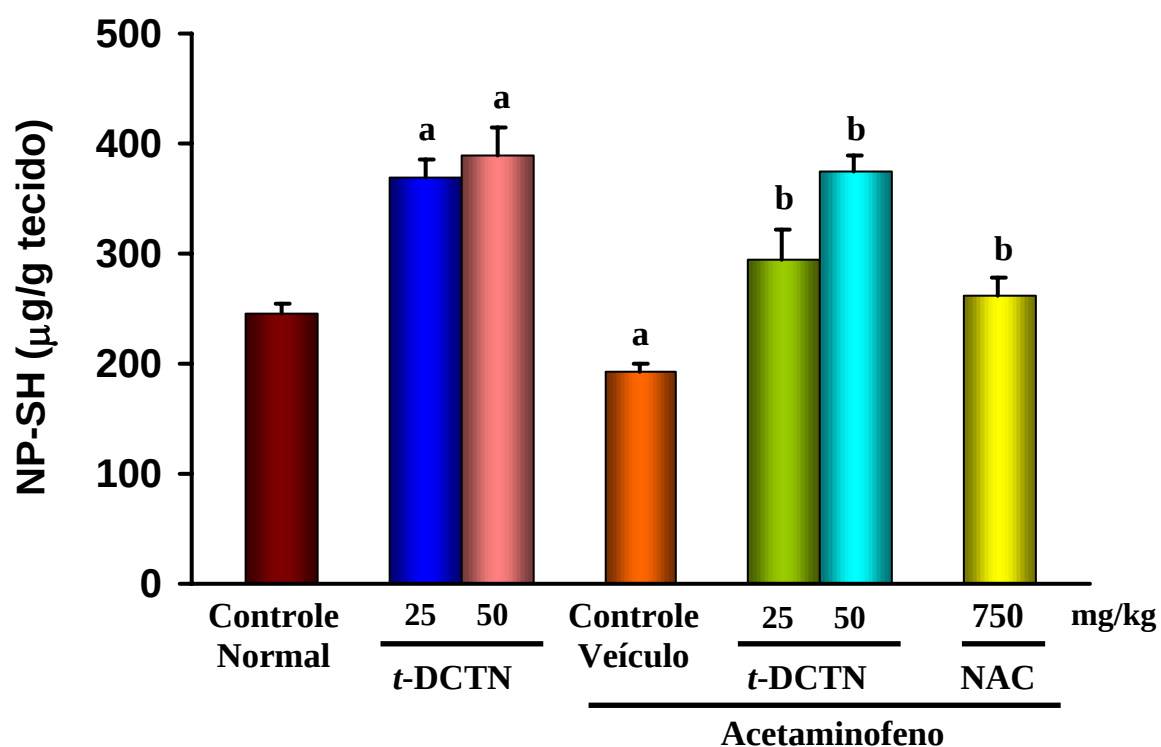


FIGURA 8. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) e N-acetilcisteína (NAC) sobre os níveis de grupos sulfidrílas não protéicos (NP-SH) na hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno em camundongos. Os níveis de glutathiona hepática (NP-SH) foram analisados 24 horas após a administração oral de acetaminofeno (500 mg/kg). A *t*-DCTN (25 e 50 mg/kg, v.o.) e veículo (controle normal) foram administrados 48, 24 e 2 horas antes e NAC (750 mg/kg, i.p.) 2 horas antes do tratamento com acetaminofeno. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) de oito animais. ^a $p < 0,001$ vs controle normal; ^b $p < 0,001$ vs controle acetaminofeno (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

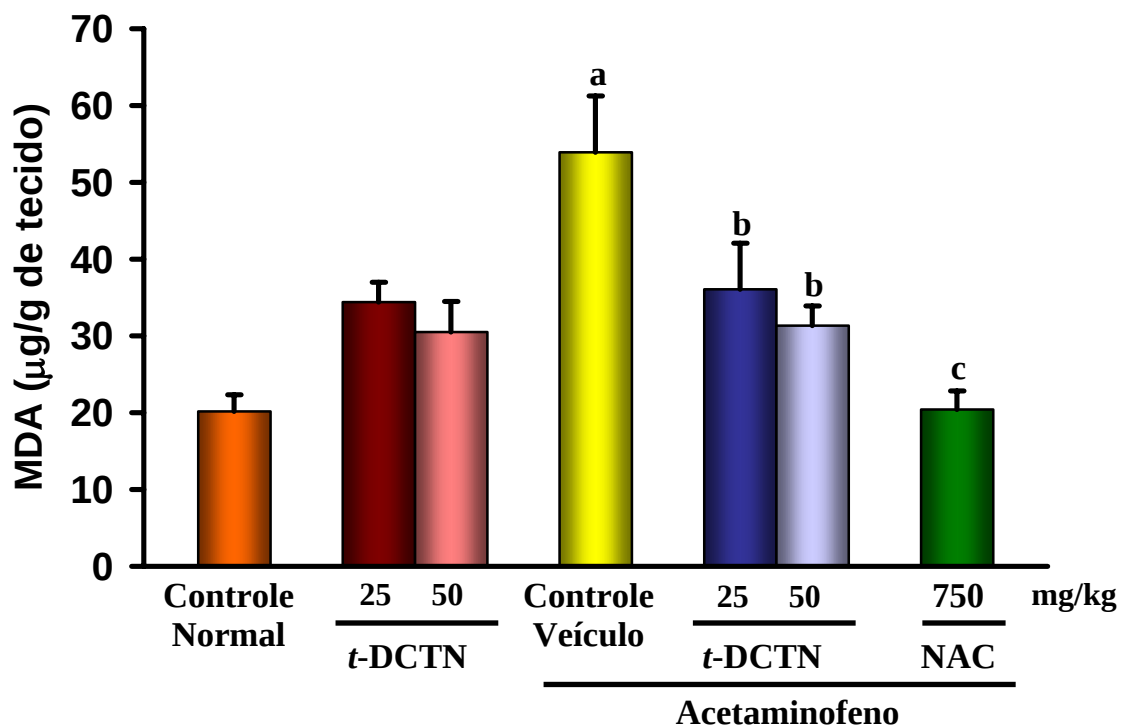


FIGURA 9. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) e N-acetilcisteína (NAC) sobre os níveis de malonaldeído (MDA) na hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno em camundongos. Os níveis de malonaldeído hepático (MDA) foram analisados 24 horas após a administração oral de acetaminofeno (500 mg/kg). A *t*-DCTN (25 e 50 mg/kg, v.o.) e veículo (controle normal) foram administrados 48, 24 e 2 horas antes e NAC (750 mg/kg, i.p.) 2 horas antes do tratamento com acetaminofeno. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) de oito animais. ^ap<0,05 vs controle normal; ^bp<0,05 vs controle acetaminofeno; ^cp<0,001 vs controle acetaminofeno (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

Tabela 7. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) sobre os Níveis Séricos de AST e ALT na Hepatotoxicidade induzida por Acetaminofeno em Camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)
Controle normal	---	59,99 ± 5,20	41,60 ± 3,20
<i>t</i> -DCTN	25	70,44 ± 2,53	44,49 ± 0,85
	50	65,48 ± 3,30	43,42 ± 0,98
Acetaminofeno	500	165,06 ± 14,32 ^a	149,05 ± 31,09 ^a
<i>t</i> -DCTN + Acetaminofeno	25	74,73 ± 13,15 ^b	60,48 ± 11,38 ^b
	50	51,05 ± 4,91 ^b	65,19 ± 10,34 ^b
NAC + Acetaminofeno	750	45,88 ± 3,14 ^b	61,53 ± 8,22 ^b

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) das concentrações séricas de ALT e AST (U/L) para oito animais. As transaminases foram analisadas 24 horas após a administração oral de acetaminofeno (500 mg/kg). A N-acetilcisteína (NAC, 750 mg/kg, i.p.) foi administrada 2 horas antes e veículo (Tween 80) e a *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN, 25 e 50 mg/kg, v.o.) 48, 24 e 2 horas antes da administração de acetaminofeno. ^ap<0,001 vs controle normal; ^b p<0,001 vs controle acetaminofeno (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

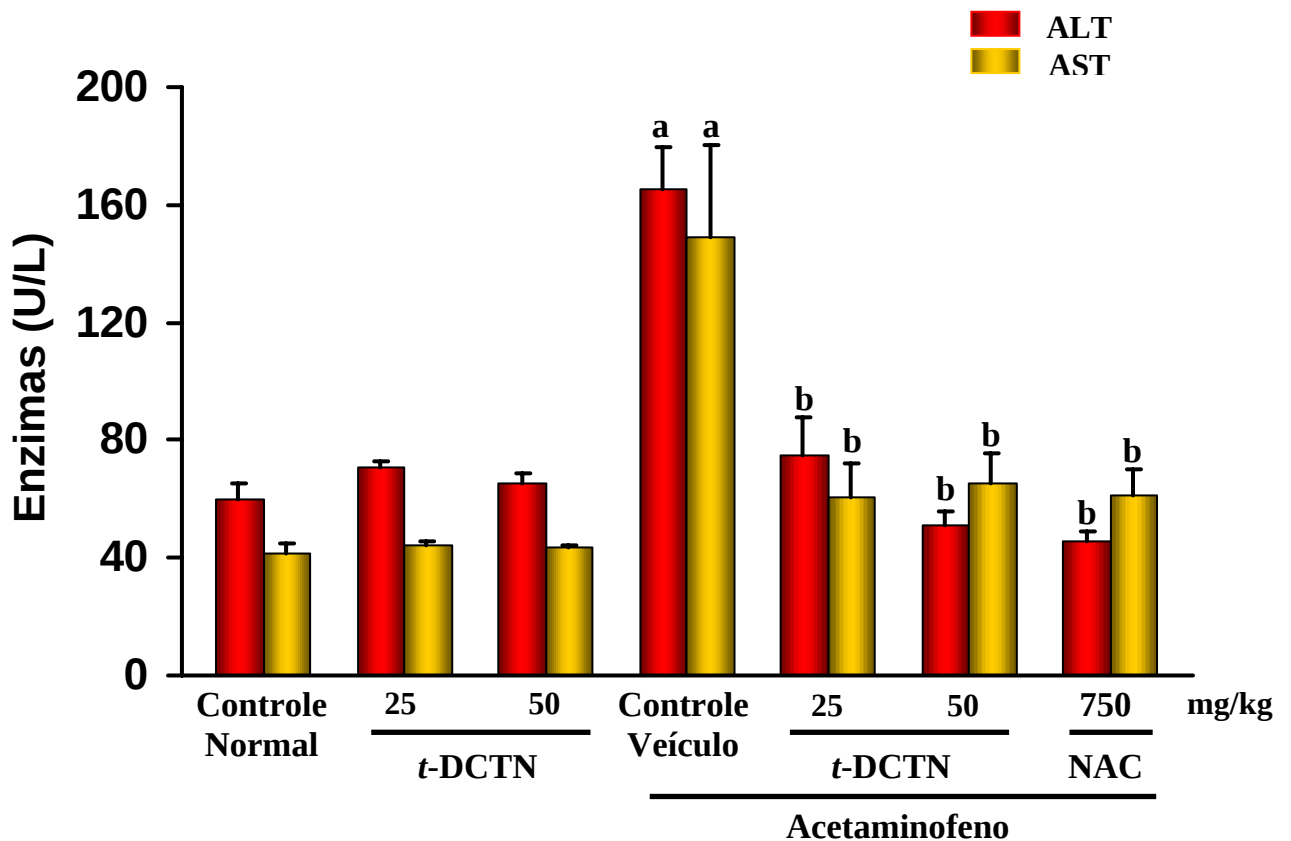


FIGURA 10. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) e N-acetilcisteína (NAC) sobre os níveis séricos de ALT e AST na hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno em camundongos. Os níveis séricos das transaminases ALT e AST foram analisados 24 horas após a administração oral de acetaminofeno (500 mg/kg). A *t*-DCTN (25 e 50 mg/kg, v.o.) e veículo (controle normal) foram administrados 48, 24 e 2 horas antes e NAC (750 mg/kg, i.p.) 2 horas antes do tratamento com acetaminofeno. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) para oito animais. ^a $p < 0,001$ vs controle normal; ^b $p < 0,001$ vs controle acetaminofeno (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

Tabela 8. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) nos Escores de Lesão Hepática na Hepatotoxicidade induzida por Acetaminofeno em Camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	Escores de Lesão Hepática
Controle Normal	---	0 (0 – 0)
<i>t</i> -DCTN	25	0 (0 – 1)
	50	0 (0 – 1)
Acetaminofeno	500	5 (4 – 5) ^a
<i>t</i> -DCTN + Acetaminofeno	25	2 (2 – 5)
	50	2 (2 – 3)
NAC	750	0,5 (0 – 1) ^b

Os resultados são expressos em termo de mediana, mínimos e máximos dos escores de lesão hepática para oito animais. Os animais foram sacrificados 24 horas após a administração oral de acetaminofeno (500 mg/kg). Os fígados foram coletados e examinados histologicamente e atribuídos escores numa escala de 0 a 5 para presença e intensidade das lesões. A N-acetilcisteína (NAC, 750 mg/kg, i.p.) foi administrada 2 horas antes e veículo (Tween 80) e a *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN, 25 e 50 mg/kg, v.o.) 48, 24 e 2 horas antes da administração de acetaminofeno (500 mg/kg). ^ap<0,001 diferente significativamente do controle normal; ^bp<0,01 diferente significativamente do controle acetaminofeno (ANOVA - Teste de Kruskal Wallis).

5.5. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) na hepatotoxicidade induzida por D-Galactosamina/Lipopolissacarídeo em camundongos

A **Tabela 9** mostra que a administração intraperitoneal simultânea de GalN/LPS (800/0,750 mg/kg) reduziu significativamente ($p < 0,05$) os níveis de NP-SH ($70,07 \pm 10,17$ $\mu\text{g/g}$ de tecido) quando comparado ao grupo controle normal ($155,91 \pm 4,03$ $\mu\text{g/g}$ de tecido).

Dexametasona (DEX, 2 mg/kg) inibiu de forma significativa ($p < 0,05$) a depleção dos grupos sulfidrilas produzidos pela GalN/LPS sendo o mesmo efeito observado com a administração intraperitoneal de N-acetilcisteína (NAC, 750 mg/kg) ($167,82 \pm 20,54$ e $125,45 \pm 16,15$ $\mu\text{g/g}$ de tecido, respectivamente) quando comparado ao GalN/LPS ($70,07 \pm 10,17$ $\mu\text{g/g}$ de tecido).

A administração de *t*-DCTN nas doses de 25 e 50 mg/kg promoveu um aumento significativo ($p < 0,001$) dos níveis de glutathiona hepática ($251,74 \pm 26,38$ e $296,92 \pm 16,42$ $\mu\text{g/g}$ de tecido, respectivamente) quando comparada ao grupo GalN/LPS (**Figura 11**).

Os níveis séricos das transaminases ALT e AST, aumentaram de forma significativa ($p < 0,01$) no grupo GalN/LPS ($120,64 \pm 51,32$ e $70,27 \pm 19,47$ U/L, respectivamente) quando comparado ao grupo controle normal ($16,40 \pm 2,58$ e $32,12 \pm 5,21$ U/L, respectivamente).

O tratamento oral com *t*-DCTN nas doses de 25 e 50 mg/kg, reduziu significativamente ($p<0,01$) os níveis séricos de ALT ($25,72 \pm 6,19$ e $49,76 \pm 8,69$ U/L, respectivamente) quando comparado ao grupo controle GalN/LPS ($120,64 \pm 51,32$ U/L). Entretanto, não houve diferença significativa nos níveis séricos de AST.

N-acetilcisteína (750 mg/kg, i.p.) e Dexametasona (2 mg/kg, s.c.) promoveram redução significativa ($p<0,001$) nos níveis de ALT ($22,52 \pm 6,61$ e $25,31 \pm 1,14$ U/L, respectivamente) e, somente a N-acetilcisteína, reduziu os níveis de AST ($32,12 \pm 3,41$ U/L), quando comparado ao grupo controle GalN/LPS ($120,64 \pm 51,32$ e $70,27 \pm 19,47$ U/L, respectivamente) (**Tabela 10 e Figura 12**).

O pré-tratamento oral com *t*-DCTN nas doses de 25 e 50 mg/kg, antes da administração de GalN/LPS, reduziu de forma significativa ($p<0,001$) os escores de lesão hepática (0 [0-1] e 1 [1-1]) quando comparado ao grupo GalN/LPS (5 [5-5]), observado também no grupo tratado com Dexametasona (1 [0-1]) (**Tabela 11**).

A análise histológica dos fígados dos animais tratados com veículo (3% de Tween 80) demonstrou tecido com arquitetura preservada, apresentando hepatócitos com disposição normal. Já o grupo tratado com GalN/LPS, mostrou extensas áreas hemorrágicas com presença de células necróticas e de infiltrado inflamatório com predomínio de polimorfo nucleares (PMN) e presença de células apoptóticas. O grupo que recebeu Dexametasona observou-se presença de pequenos focos de necrose com infiltrado

inflamatório (mononucleares), presença de neutrófilos e pontos de infiltração inflamatória e células apoptóticas.

Nos animais tratados com *t*-DCTN (25 e 50 mg/kg, v.o.) observou-se pequenos pontos de infiltrado inflamatório não observando áreas hemorrágicas e presença de células necróticas (**Figura 13**).

Tabela 9. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) sobre os Níveis de Glutathiona e Malonaldeído na Hepatotoxicidade induzida por D-Galactosamina/LPS em Camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	NP-SH (μ g/g tecido)
Controle normal	---	155,91 $\pm$ 4,03
GalN/LPS	800/0,075	70,07 $\pm$ 10,17 ^a
<i>t</i> -DCTN + GalN/LPS	25	251,74 $\pm$ 26,38 ^b
	50	296,92 $\pm$ 16,42 ^b
NAC + GalN/LPS	750	125,45 $\pm$ 16,15 ^c
DEX + GalN/LPS	2,0	167,82 $\pm$ 20,54 ^c

Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) para os níveis hepáticos de glutathiona (NP-SH) de oito animais. As dosagens foram analisadas 6 horas após a administração de GalN/LPS (800/0,075 mg/kg). A N-acetilcisteína (NAC, 750 mg/kg, i.p.) e Dexametasona (DEX, 2 mg/kg, s.c.) foram administradas 2 horas antes e, veículo (Tween 80) e a *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN, 25 e 50 mg/kg, v.o.) 48, 24 e 2 horas antes da administração de GalN/LPS. ^ap<0,05 vs controle normal; ^bp<0,001 vs controle GalN/LPS; ^cp<0,05 vs controle GalN/LPS (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

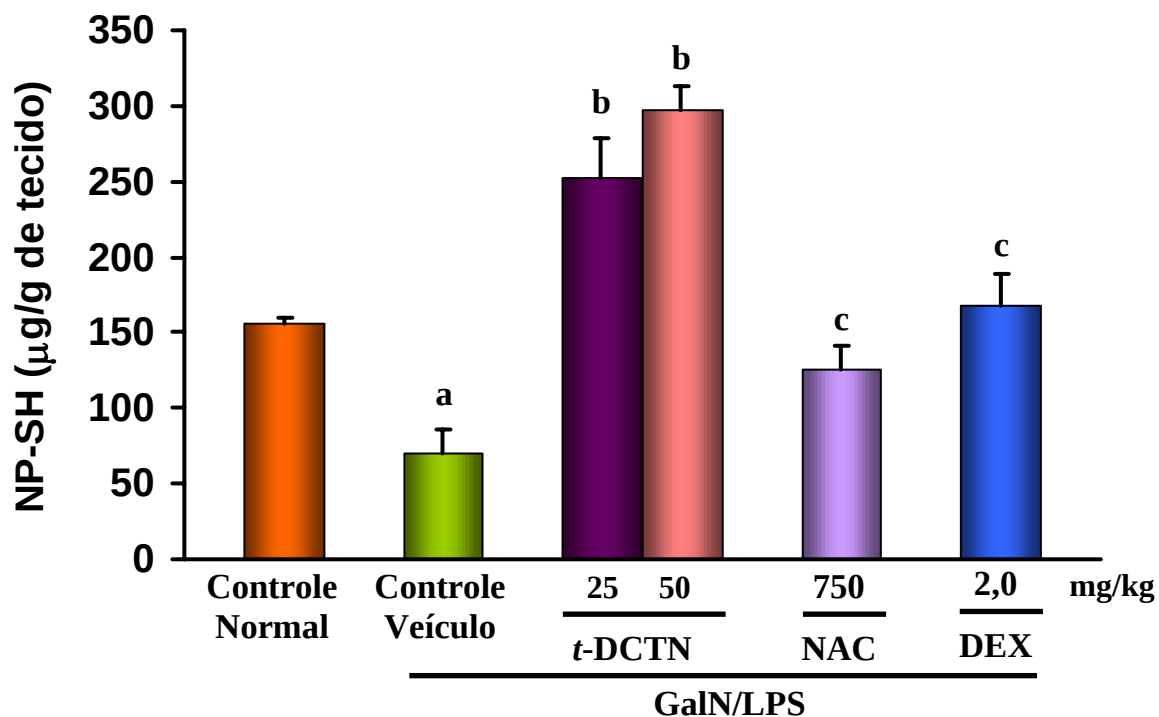


FIGURA 11. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN), N-acetilcisteína (NAC) e dexametasona (DEX) sobre os níveis de grupos sulfidrila não protéicos (NP-SH) na hepatotoxicidade induzida por D-Galactosamina/LPS em camundongos. Os níveis de glutathiona hepática (NP-SH) foram analisados 6 horas após a administração intraperitoneal de GalN/LPS (800/0,075 mg/kg). A *t*-DCTN (25 e 50 mg/kg, v.o.) e veículo (controle normal) foram administrados 48, 24 e 2 horas antes, NAC (750 mg/kg, i.p.) e DEX (2,0 mg/kg, s.c.) 2 horas antes, do tratamento GalN/LPS. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) para oito animais. ^a $p < 0,05$ vs controle normal; ^b $p < 0,001$ vs controle GalN/LPS; ^c $p < 0,05$ vs controle GalN/LPS (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

Tabela 10. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) sobre os Níveis Séricos de AST e ALT na Hepatotoxicidade induzida por D-Galactosamina/LPS em Camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)
Controle normal	---	16,40 ± 2,58	32,12 ± 5,21
GalN /LPS	800/0,075	120,64 ± 51,32 ^a	70,27 ± 19,47 ^a
<i>t</i> -DCTN + GalN/LPS	25	25,72 ± 6,19 ^b	49,76 ± 8,69
	50	19,55 ± 1,84 ^c	47,31 ± 5,32
NAC + GalN/LPS	750	22,52 ± 6,61 ^c	32,12 ± 3,41 ^c
DEX + GalN/LPS	2,0	25,31 ± 1,14 ^c	44,34 ± 4,51

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) das concentrações séricas de ALT e AST (U/L) para oito animais. As transaminases foram analisadas 2 horas após a administração intraperitoneal de GalN/LPS (800/0,075 mg/kg). A N-acetilcisteína (NAC, 750 mg/kg, i.p.) foi administrada 2 horas antes e, veículo (Tween 80) e a *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN, 25 e 50 mg/kg, v.o.) 48, 24 e 2 horas antes da administração de GalN/LPS. ^ap<0,01 vs controle normal; ^bp<0,01 vs controle GalN/LPS; ^cp<0,001 vs controle GalN/LPS (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

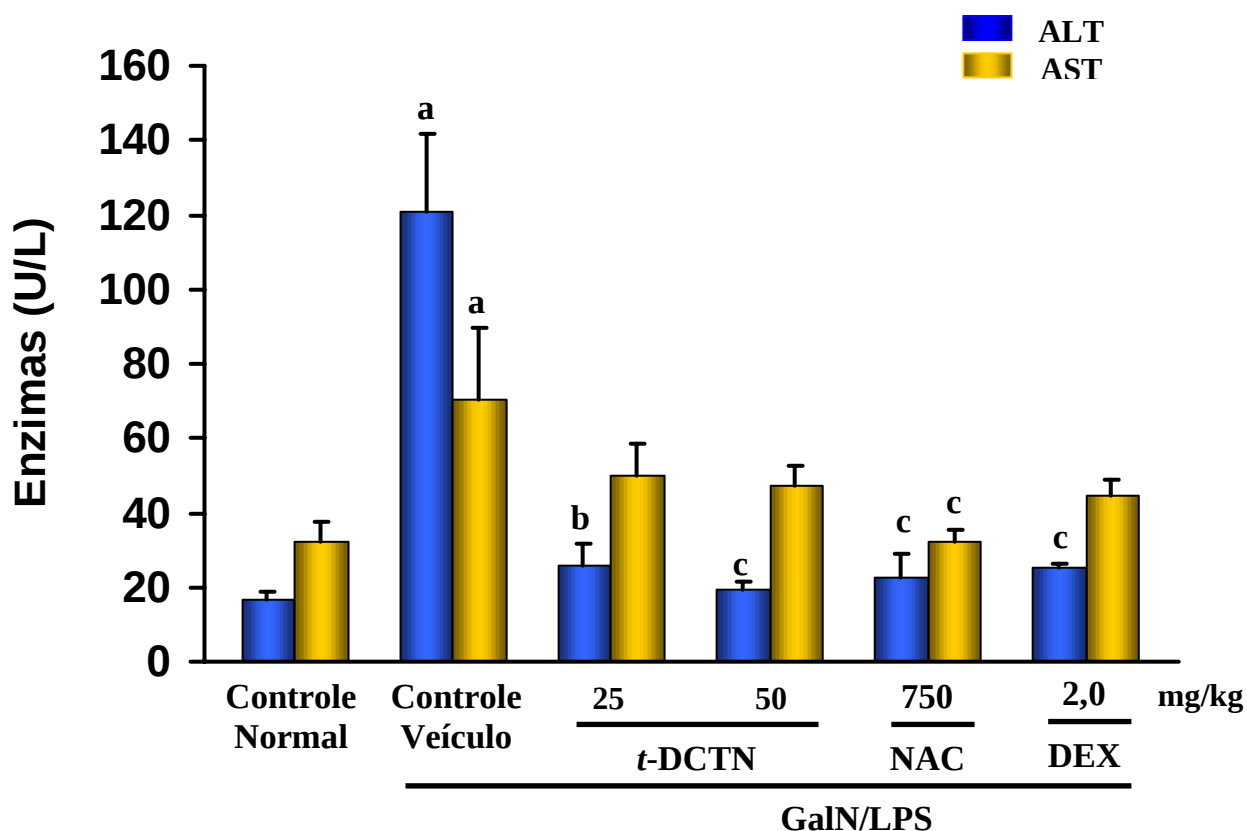
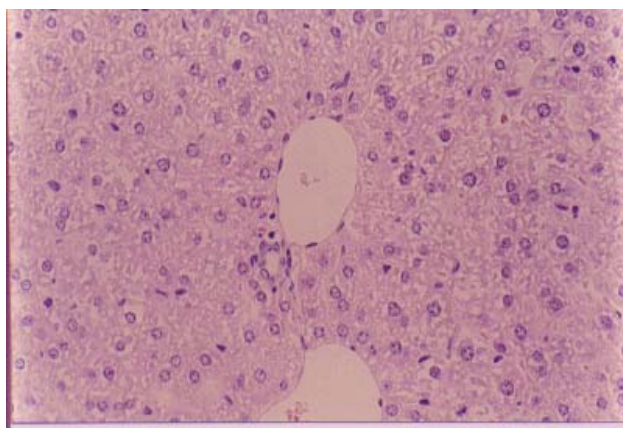


FIGURA 12. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN), N-acetilcisteína (NAC) e dexametasona (DEX) sobre os níveis séricos de ALT e AST na hepatotoxicidade induzida por D-Galactosamina/LPS em camundongos. Os níveis séricos das transaminases ALT e AST foram analisados 2 horas após a administração intraperitoneal de GalN/LPS (800/0,075 mg/kg). A *t*-DCTN (25 e 50 mg/kg, v.o.) e veículo (controle normal) foram administrados 48, 24 e 2 horas antes, NAC (750 mg/kg, i.p.) e DEX (2,0 mg/kg, s.c.) 2 horas antes, do tratamento GalN/LPS. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) para oito animais. ^a $p < 0,01$ vs controle normal; ^b $p < 0,01$ vs controle GalN/LPS; ^c $p < 0,001$ vs controle GalN/LPS (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

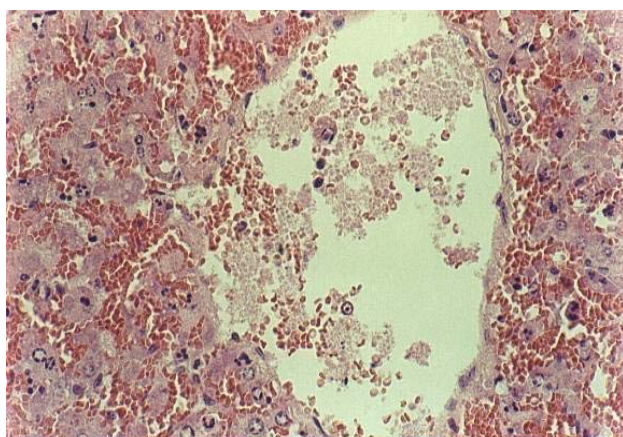
Tabela 11. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) nos Escores de Lesão Hepática na Hepatotoxicidade induzida por D-Galactosamina/LPS em Camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	Escores de Lesão Hepática
Controle Normal	---	0 (0 – 0)
GalN/LPS	800/0,075	5 (5 – 5) ^a
<i>t</i> -DCTN + GalN/LPS	25	0 (0 – 1) ^b
	50	1 (1 – 1) ^b
DEX + GalN/LPS	2,0	1 (0 – 1) ^b

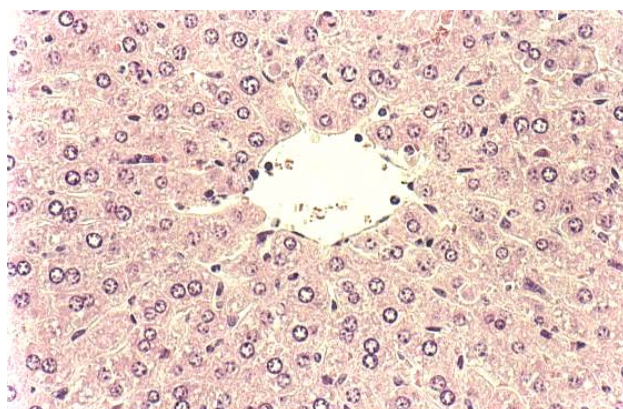
Os resultados são expressos em termo de mediana mínimos e máximos dos escores de lesão hepática para oito animais. Os animais foram sacrificados 6 horas após a administração intraperitoneal de GalN/LPS (800/0,075 mg/kg). Os fígados foram coletados e examinados histologicamente e atribuídos escores numa escala de 0 a 5 para presença e intensidade das lesões. A dexametasona (DEX, 2,0 mg/kg, s.c.) foi administrada 2 horas antes, veículo (Tween 80) e a *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN, 25 e 50 mg/kg, v.o.) 48, 24 e 2 horas antes, da administração de GalN/LPS. ^ap<0,001 vs controle normal; ^bp<0,001 vs controle GalN/LPS (ANOVA - Teste de Kruskal Wallis).



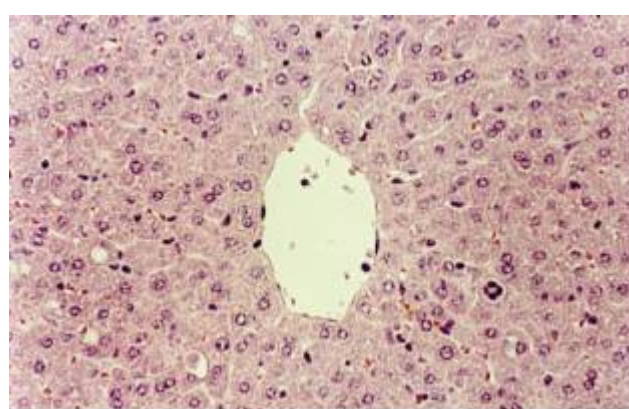
A - Controle Veículo



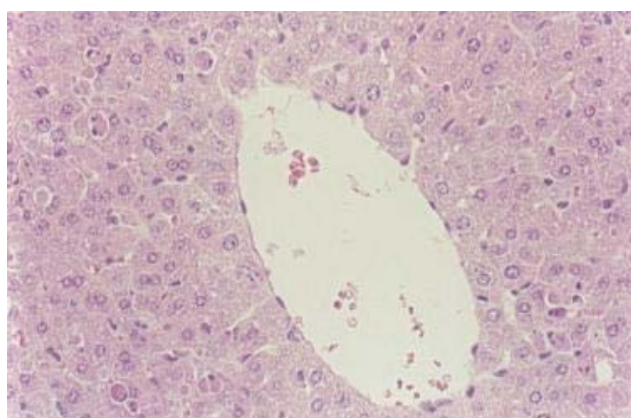
B - Controle GalN/LPS



C - *t*-DCTN 25 mg/kg + GalN/LPS



D - *t*-DCTN 50 mg/kg + GalN/LPS



E - Dexametasona + GalN/LPS

FIGURA 13. Microfotografias de fígados de camundongos. (A) animais tratados com veículo (3% de Tween 80 - controle normal); (B) animais tratados com GalN/LPS; (C) animais tratados com *t*-DCTN 25 mg/kg; (D) animais tratados com *t*-DCTN 50 mg/kg; (E) animais tratados com dexametasona (2,0 mg/kg) (HE, 400x).

5.6. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos normotensos

Em ratos normotensos anestesiados, comparando com valores basais, ocorreu uma significativa diminuição ($p < 0,05$) na pressão arterial média (PAM) após injeção endovenosa em *bolus* da *t*-DCTN nas doses de 10 e 15 mg/kg, mas, o mesmo não foi observado com a dose de 5 mg/kg. A variação percentual da PAM nessas doses foi de 21, 28 e 54 %, respectivamente quando comparados com valores basais anteriores a administração de *t*-DCTN (**Figura 14**).

Na frequência cardíaca (FC) destes animais também ocorreu bradicardia nas mesmas doses de 10 e 15 mg/kg na ordem de 51 e 79 %, respectivamente comparados a valores basais. A dose de 5 mg/kg (17%) não apresentou mudança significativa em comparação aos valores basais. O mesmo volume do veículo (20 µL de DMSO 3% em salina) não produziu mudanças significativas na PAM ou na FC (**Figura 15**).

Os efeitos da dose de 10 mg/kg de *t*-DCTN foi estudado na ausência e presença de atropina (5 mg/kg), propranolol (2 mg/kg), hexametônio (30 mg/kg) e L-NAME (10 mg/kg).

A administração de atropina (5 mg/kg) ou propranolol (2 mg/kg) não bloqueou o efeito hipotensor da *t*-DCTN (10 mg/kg). Entretanto, o pré-tratamento com hexametônio

(30 mg/kg) quando associado a *t*-DCTN, potencializou seu efeito hipotensor. Hexametônio *per se* produziu significativa queda da PAM (**Figuras 16, 17 e 18**).

L-NAME sozinho causou um aumento significativo na PAM o que não foi observado quando este foi associado com a *t*-DCTN (10 mg/kg). Os valores da PAM obtidos com L-NAME em associação com a *t*-DCTN não foram estatisticamente diferentes dos valores basais indicando um bloqueio efetivo da *t*-DCTN evocando hipotensão (**Figura 19**).

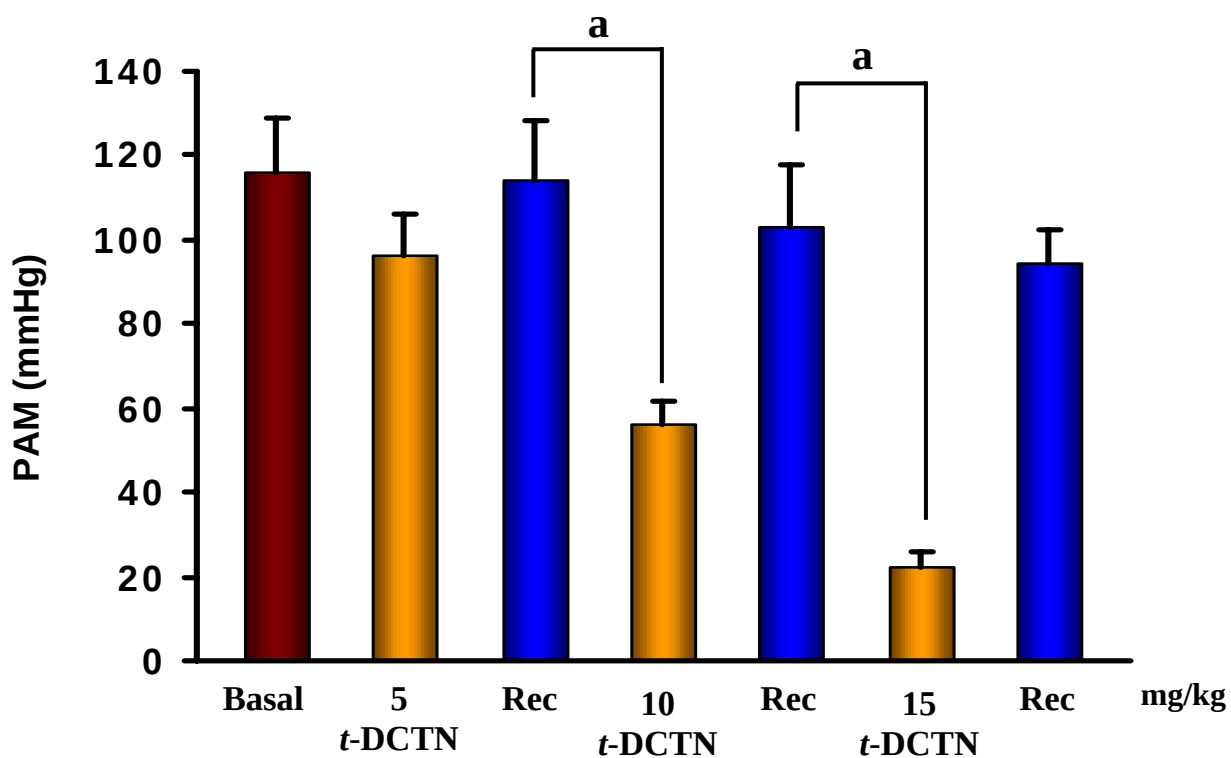


FIGURA 14. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos normotensos. A *t*-DCTN (5, 10 e 15 mg/kg) foi administrada por via intravenosa na forma de *bolus* em ratos normotensos anestesiados após a obtenção dos valores basais. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais. Rec = Recuperado ^a $p < 0,05$ diferente significativamente do valor recuperado.

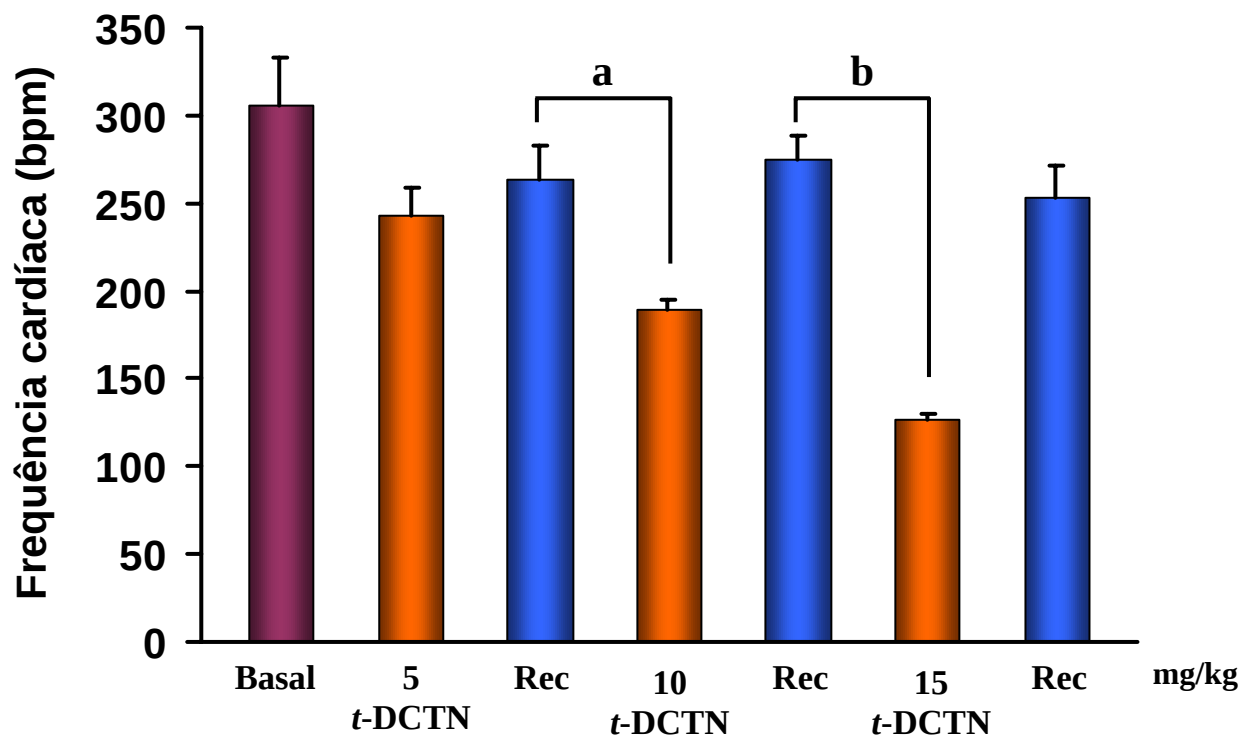


FIGURA 15. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) sobre a frequência cardíaca (FC) de ratos normotensos. A *t*-DCTN (5, 10 e 15 mg/kg) foi administrada por via intravenosa na forma de *bolus* em ratos normotensos anestesiados após a obtenção da média basal. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais. Rec = Recuperado ^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$ diferente significativamente do valor recuperado.

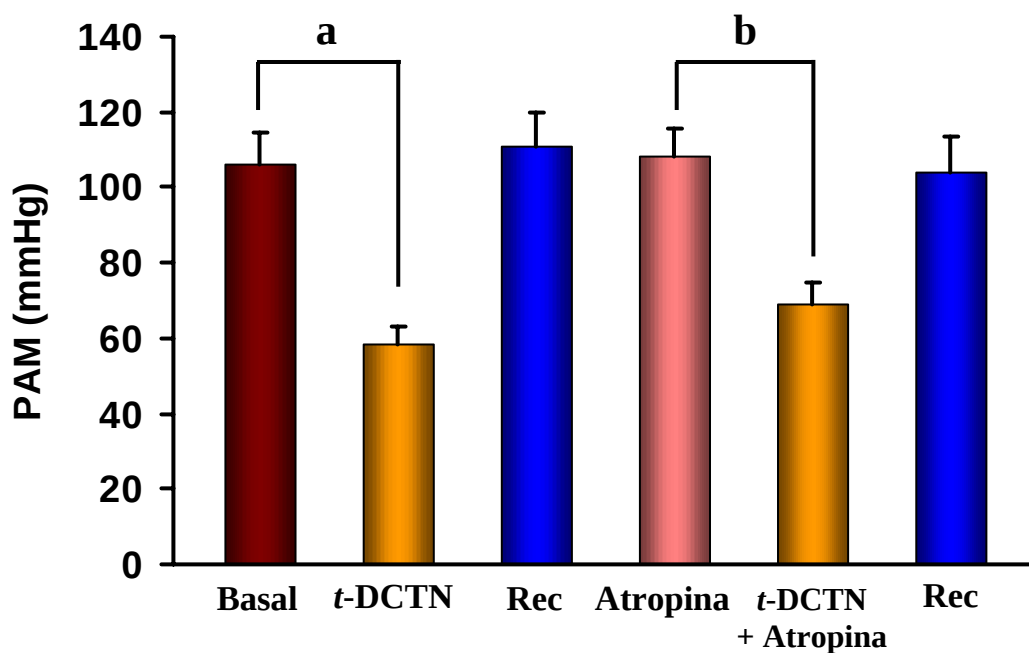


FIGURA 16. Efeito do pré-tratamento com atropina na resposta hipotensiva da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) em ratos normotensos anestesiados. A *t*-DCTN (10 mg/kg) e atropina (5 mg/kg) foram administradas por via intravenosa em ratos normotensos anestesiados após a obtenção da média basal. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais. Rec = Recuperado; ^a**p<0,01 diferente significativamente do valor basal; ^b**p<0,01 diferente significativamente do valor de atropina.

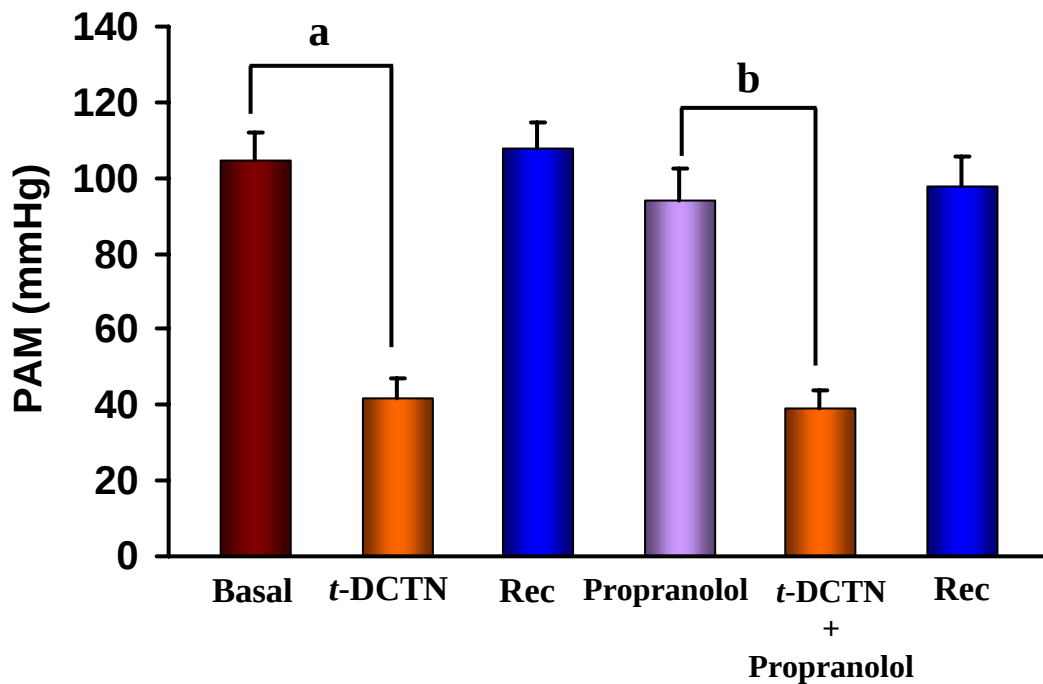


FIGURA 17. Efeito do pré-tratamento com propranolol na resposta hipotensora da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) em ratos normotensos anestesiados. A *t*-DCTN (10 mg/kg) e propranolol (2 mg/kg) foram administrados por via intravenosa em ratos normotensos anestesiados após a obtenção da média basal. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais. Rec = Recuperado ^a**p<0,01 diferente significativamente do valor basal; ^b**p<0,01 diferente significativamente de propranolol.

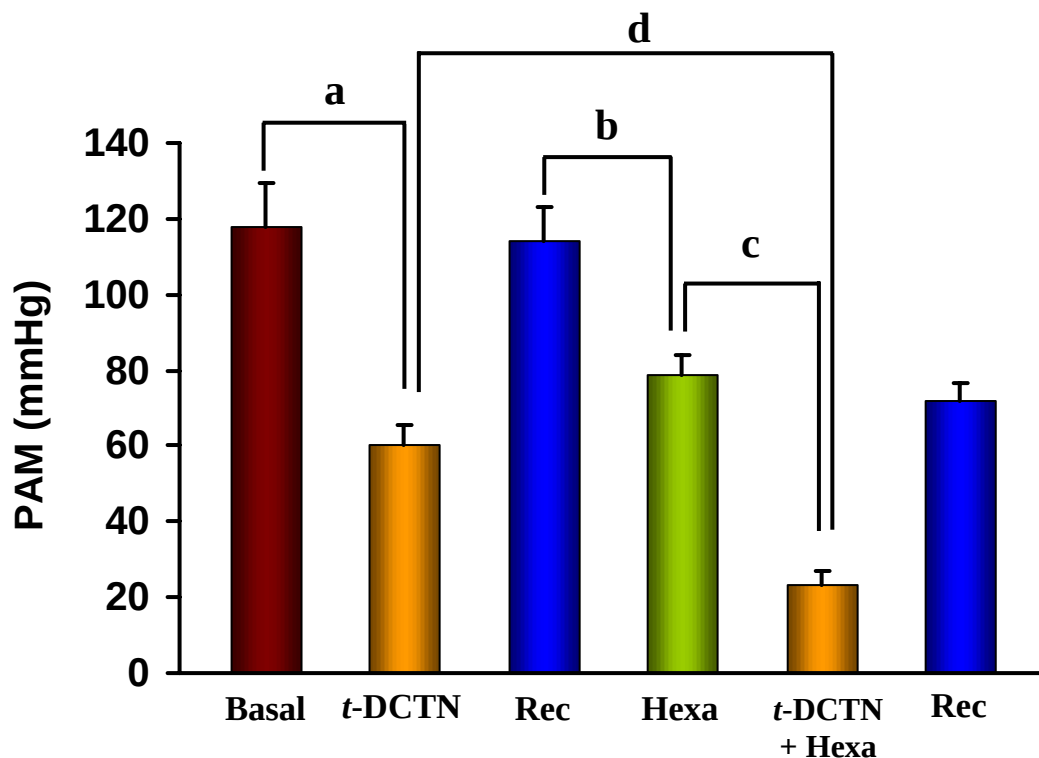


FIGURA 18. Efeito do pré-tratamento com hexametônio (Hexa) na resposta hipotensiva da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) em ratos normotensos anestesiados. A *t*-DCTN (10 mg/kg) e o hexametônio (Hexa, 30 mg/kg) foram administrados por via intravenosa em ratos normotensos anestesiados após a obtenção da média basal. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais. Rec = Recuperado; ^a $p < 0,01$ diferente significativamente do valor basal; ^b $p < 0,05$ diferente significativamente do valor Rec (basal); ^c $p < 0,01$ diferente significativamente de Hexametônio; ^d $p < 0,05$ diferente significativamente de *t*-DCTN.

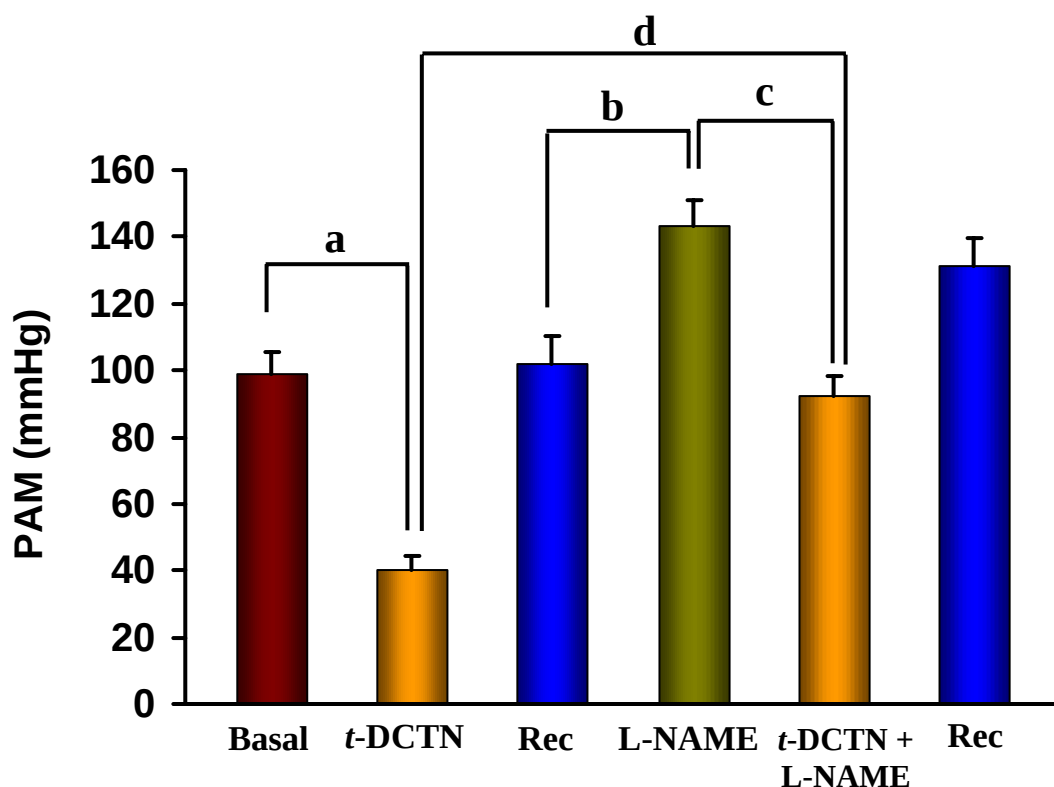


FIGURA 19. Efeito do pré-tratamento com L-NAME na resposta hipotensiva da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) em ratos normotensos anestesiados. A *t*-DCTN (10 mg/kg) e o L-NAME (10 mg/kg) foram administrados por via intravenosa em ratos normotensos anestesiados após a obtenção da média basal. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais. Rec = Recuperado ^a $p < 0,01$ diferente significativamente do valor basal; ^b $p < 0,05$ diferente significativamente do valor Rec (basal); ^c $p < 0,05$ diferente significativamente de L-NAME; ^d $p < 0,01$ diferente significativamente de *t*-DCTN.

5.7. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) em átrio isolado de ratos

Para estudar o efeito da *t*-DCTN na frequência de contração cardíaca, foi utilizado o átrio direito isolado de rato. A **Figura 20** mostra o efeito cronotrópico negativo da *t*-DCTN na frequência de contração espontânea do átrio isolado de ratos. A *t*-DCTN produziu uma inibição de forma dose-dependente na frequência da atividade mecânica espontânea com valores de CI_{50} de 69,3 [37,5 – 128,1] $\mu\text{g/mL}$. Atropina (2×10^{-7} M) não bloqueou o efeito cronotrópico negativo da *t*-DCTN. A CI_{50} para este efeito foi de 56,3 [28,0 – 113,4] $\mu\text{g/mL}$.

A adição de isoproterenol isoladamente (10^{-12} - 10^{-3} M) aumentou a frequência com valores de pD_2 de 9,1 [9,5 – 8,7]. Entretanto, o isoproterenol quando administrado na presença da *t*-DCTN na concentração de 69,3 $\mu\text{g/mL}$, concentração esta que causou 50% de inibição na frequência, não teve a frequência atrial alterada pela *t*-DCTN na frequência atrial. Porém, esta foi eficazmente bloqueada pelo propranolol (1 μM), um antagonista β -adrenérgico ($pD_2 = 6,3$ [7,0 – 5,7]) (**Figura 21**).

Na estimulação elétrica do átrio esquerdo isolado de rato, *t*-DCTN sozinha produziu aumento na força de contração estatisticamente significativo (**Figura 22**). Além disso, não conseguiu modificar o efeito cronotrópico positivo do cálcio como observado nos valores obtidos de pD_2 na ausência e presença da *t*-DCTN (69,3 $\mu\text{g/mL}$, e.v.). Os

valores de pD_2 para o cálcio foram na ordem de 4,43 [4,6 – 4,2] e 4,57 [4,8 – 4,2], respectivamente (**Figura 23**).

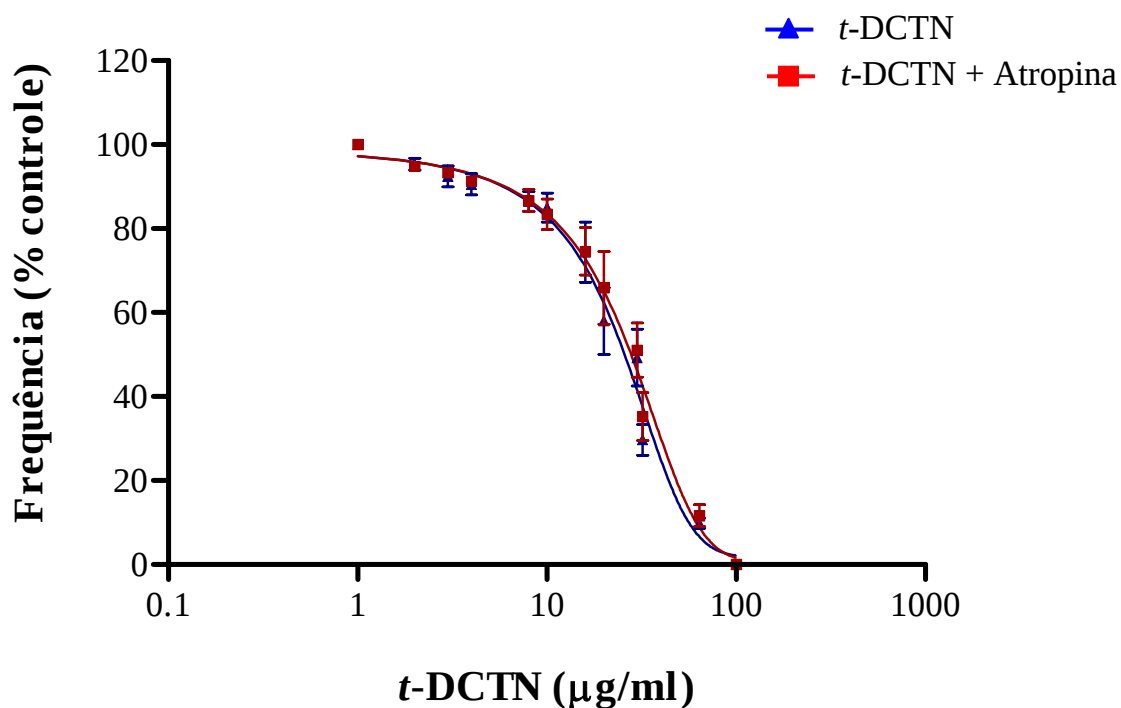


FIGURA 20. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) na frequência da atividade mecânica espontânea do átrio direito isolado de rato. Após um período de equilíbrio, curvas concentração-resposta para a *t*-DCTN (0,1 - 100 µg/mL) foram obtidas na presença e na ausência de atropina (2×10^{-7} M). Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) para 5 animais.

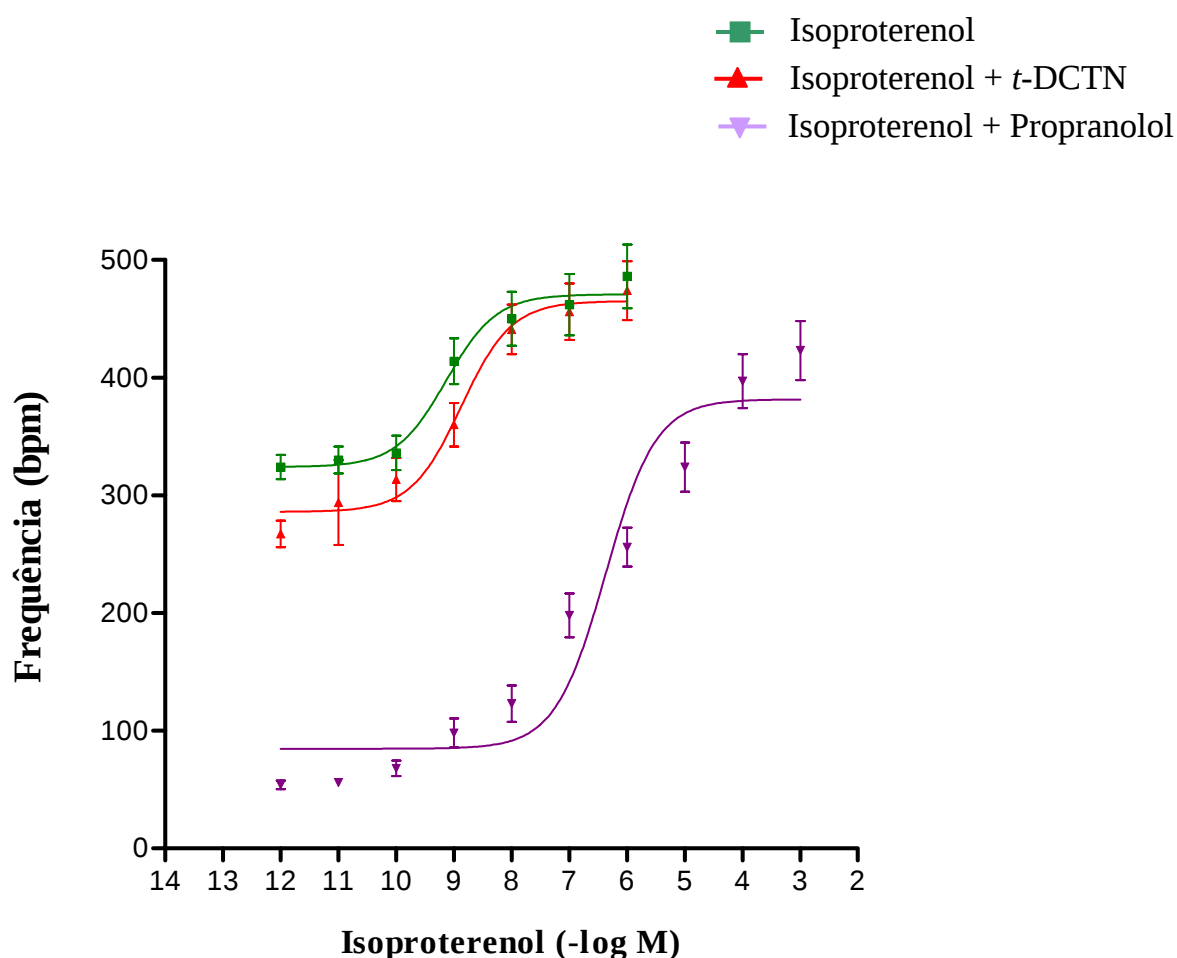
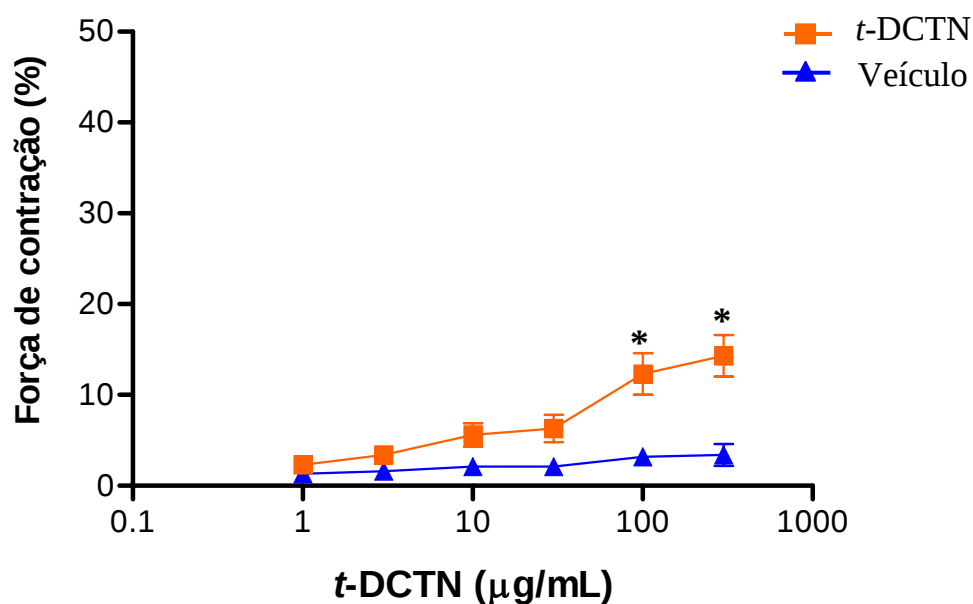


FIGURA 21. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) na frequência da atividade mecânica espontânea do átrio direito isolado de rato. A figura demonstra a resposta cronotrópica positiva do isoproterenol ($10^{-12} - 10^{-3}$ M) no átrio isolado de rato e o efeito da pré-incubação de propranolol ($1\mu\text{M}$) ou da *t*-DCTN ($69,3\text{ }\mu\text{g/mL}$, dose que causou 50% de inibição da frequência atrial). Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) para 5 animais.

A



B

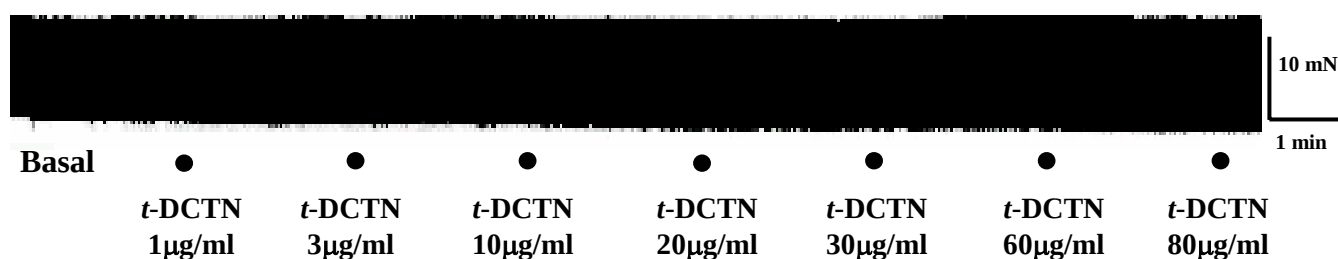


FIGURA 22. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) na contratilidade do átrio esquerdo de rato estimulado eletricamente *in vitro*. O painel **A** representa o aumento percentual da força de contração na presença de diferentes concentrações de *t*-DCTN (1-80 µg/mL). Em **B** é mostrado um gráfico representativo do efeito inotrópico positivo da *t*-DCTN. Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) para 5 animais.

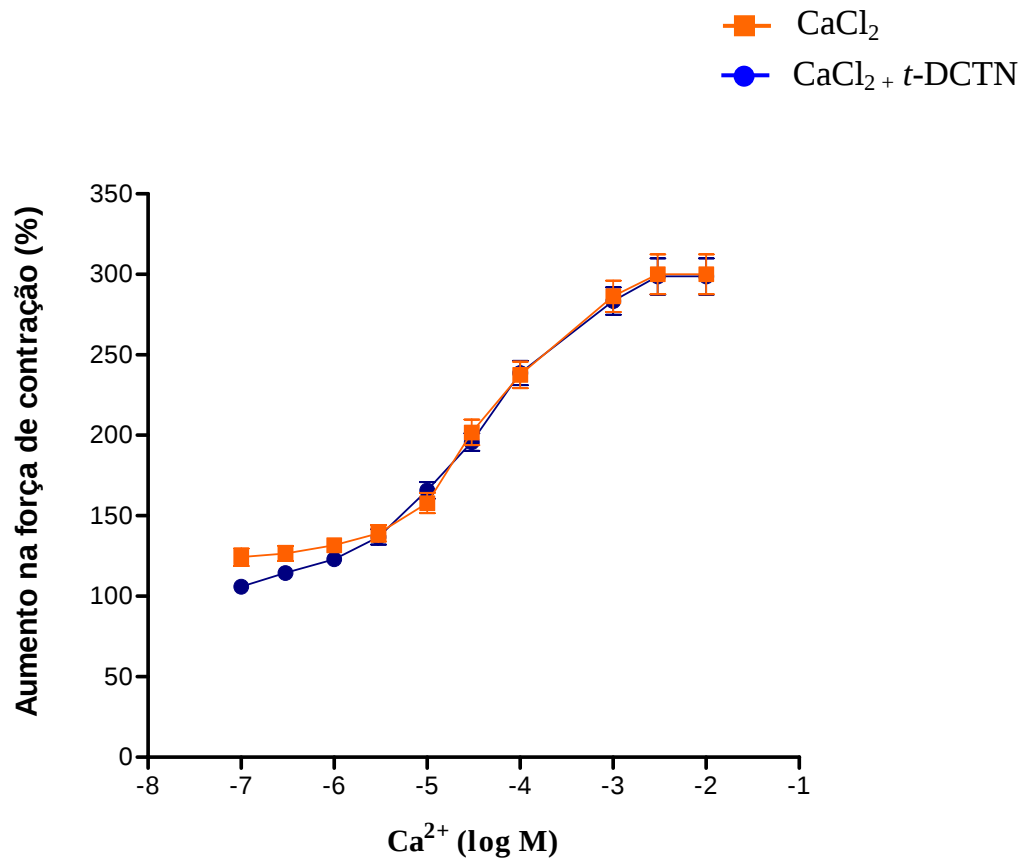


FIGURA 23. Efeito do inotropismo positivo da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) na contratilidade do átrio de rato estimulado eletricamente *in vitro* na presença de CaCl_2 . Curvas concentração-resposta para o CaCl_2 sozinho e após 10 minutos de incubação com a *t*-DCTN (69,3 $\mu\text{g/mL}$, dose que causou 50% de inibição da frequência atrial). A *t*-DCTN não potencializou nem antagonizou a contratilidade induzida pelo cálcio. Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) para 5 animais.

5.8. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) em anéis de aorta isolado de ratos com e sem endotélio.

As **Figuras 24 e 25 B** mostram o efeito da fenilefrina (1 μ M) em preparações de anel de aorta com endotélio intacto (e^+) e endotélio removido (e^-) produzindo contrações tônicas. A *t*-DCTN nas maiores concentrações (100 e 300 μ g/mL) produziu efeito relaxante contra a contração induzida pela fenilefrina. L-NAME (100 μ M) quando adicionado as preparações de anel de aorta com endotélio intacto (e^+), induziu um aumento nas contrações produzidas pela fenilefrina.

Na **Figura 25 A**, podemos observar que a incubação do veículo (3% de Tween 80), utilizado para diluir a *t*-DCTN, não produziu efeito significativo no tônus vascular.

Nas preparações com endotélio intacto ou nas preparações pré-tratadas com L-NAME (100 μ M), o efeito relaxante da *t*-DCTN nas altas concentrações (100 e 300 μ g/mL) persistiu (**Figura 25 B**). Contudo, nas preparações com anéis de aorta com endotélio removido, a resposta relaxante da *t*-DCTN ocorreu na concentração de 30 μ g/mL (**Figura 26**).

O nitroprussiato de sódio (SNP) foi adicionado as preparações ao final do experimento, aplicado no platô da resposta contrátil tônica da fenilefrina (1 μ M), demonstrando a atividade do tecido.

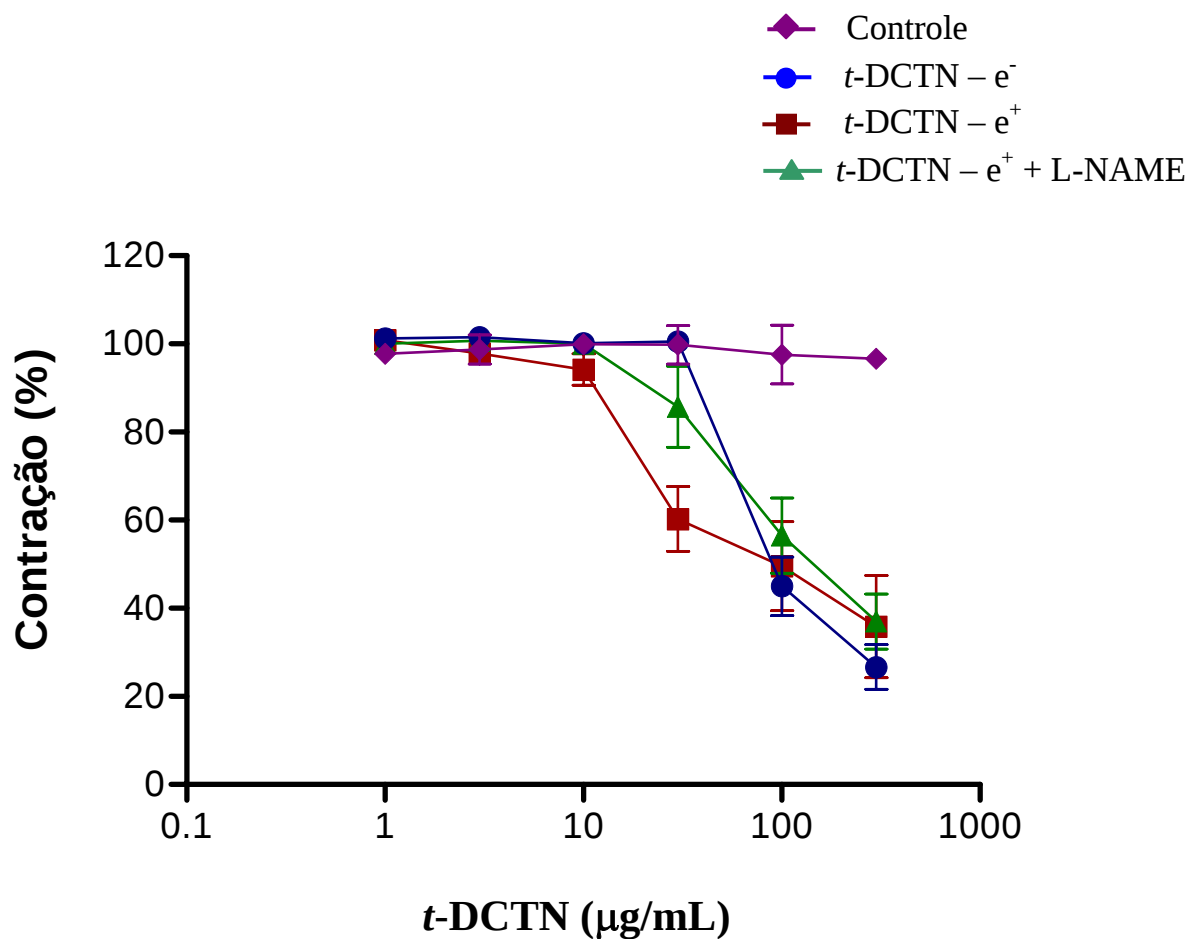


FIGURA 24. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) em anéis de aorta de rato com e sem endotélio pré-contraídos com fenilefrina. O relaxamento induzido pela *t*-DCTN (1 - 300 µg/mL) em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina (1 µM) com endotélio intacto (*t*-DCTN - e⁺), desnudo (*t*-DCTN - e⁻) ou pré-tratados com L-NAME (*t*-DCTN - e⁺ + L-NAME). Cada ponto representa a média ± erro padrão da média (E.P.M.) para 5 animais.

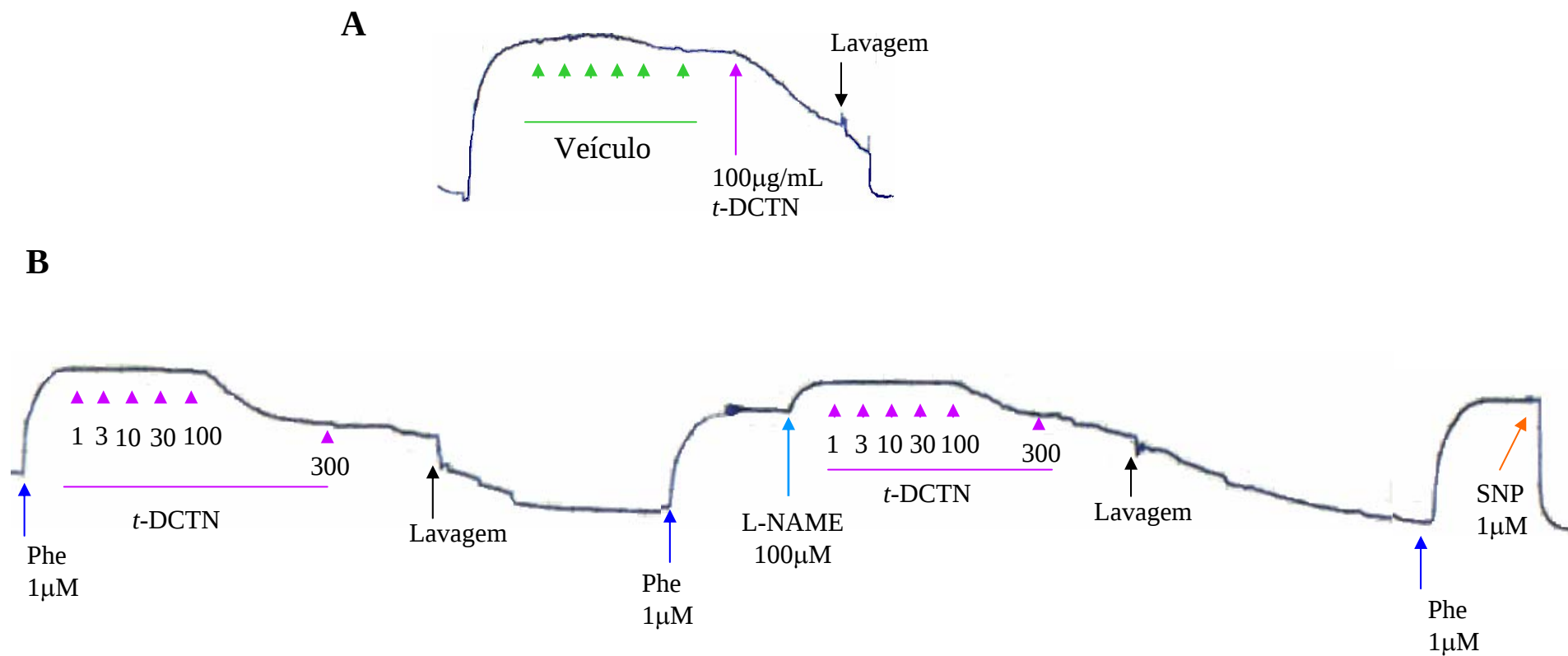


FIGURA 25. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) em anéis de aorta intáctos de rato pré-contraídos com fenilefrina. O painel **A** mostra a adição do veículo (Tween 80) isovolumetricamente ao banho e o efeito relaxante da *t*-DCTN (100 µg/mL). O painel **B** mostra o traçado registrado em polígrafo representativo do efeito relaxante induzido pela *t*-DCTN (1 - 300 µg/mL) em anéis de aorta com endotélio intacto pré-contraídos com fenilefrina (Phe - 1 µM) e o pré-tratado com L-NAME (100 µM) aplicado no platô da resposta contrátil à fenilefrina.

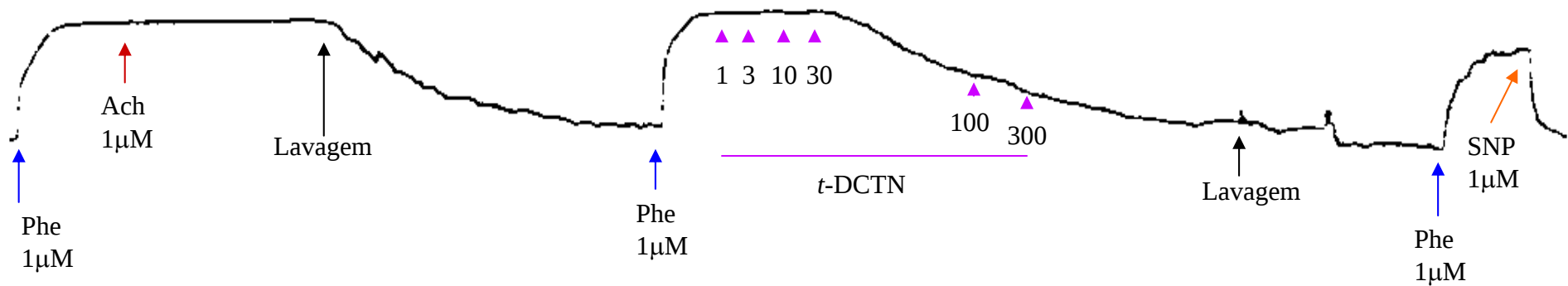


FIGURA 26. Efeito da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) em anéis de aorta de rato desendotelizados pré-contraídos com fenilefrina. Traçado registrado em polígrafo representativo do efeito relaxante da *t*-DCTN (1 – 300 µg/mL) em anéis de aorta desendotelizado pré-contraídos com fenilefrina (Phe - 1 µM). O painel demonstra que os anéis de aorta estão sem endotélio pela adição de acetilcolina (Ach - 1 µM) e não obtendo resposta relaxante. Ao final do experimento ocorre o relaxamento pela adição de nitroprussiato de sódio (SNP - 1 µM) aos anéis pré-contraídos com fenilefrina (Phe – 1 µM).

6. DISCUSSÃO

A biotecnologia pode, potencialmente, ser utilizada em muitos problemas de saúde em todo o mundo (DANT, 2002). A biodiversidade brasileira, com numerosos biomas, incluindo o Cerrado, a Floresta Amazônica, o Pantanal, Caatinga e Floresta Atlântica, é incomparável no continente sul-americano e em todo o mundo, possuindo regiões com grandes potenciais na descobertas de novas drogas.

A Organização Mundial de Saúde (OMS), tem enfatizado o papel dos genomas na melhoria da saúde nos países em desenvolvimento. Em resposta a isso, em 2004 um banco de DNA foi instalado no Jardim Botânico do Rio de Janeiro com o objetivo de preservar o material genético de espécies vegetais com risco de extinção e o desenvolvimento de medicamentos à base de plantas medicinais (FERRER, 2004).

O governo tem criado regulamentos para o uso destes recursos, o qual pode reforçar o potencial do país no intuito de capitalizar sua biodiversidade na produção de novos fármacos objetivando o interesse nacional e mundial. De acordo com a OMS (WHO, 1991), a diabetes afetou cerca de 33 milhões de pessoas na América do Sul em 2000, e em 2030 espera-se um aumento para 66,8 milhões de pessoas que sofrerão com esta doença. O Brasil ocupa o oitavo lugar no ranking mundial de diabetes na população.

A demanda no setor público de saúde, como por exemplo, no cuidado com a diabetes, criam grandes custos para o Brasil. Um exemplo para o uso da biotecnologia brasileira no cuidado da diabetes foi o desenvolvimento da insulina recombinante humana nos anos 90, resultado da pesquisa em parceria entre a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e a Biobrás (FERRER, 2004).

Em anos recentes, vários extratos de plantas e seus constituintes ativos, que apresentam potencial atividade antidiabética, têm sido investigados, com objetivo de desenvolver fitofármacos de baixo custo para tratar a diabetes e complicações associadas à doença. Uma das espécies de plantas é a *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae), uma planta da Amazônia, importante na região, e muito utilizada na medicina tradicional no tratamento de problemas de fígado e rins (DI STASI *et al.*, 1989; MARTINS, 1989). A casca do caule é usada no tratamento da diabetes e na diminuição do “mau” colesterol no sangue (VAN DEN BERG, 1993; DI STASI *et al.*, 1994).

Estudos prévios estabeleceram efeitos antiinflamatórios, gastroprotetor, antihiperglicêmico e antihiperlipidêmico da *t*-DCTN, o principal diterpeno presente nas cascas do caule da *C. cajucara* (CARVALHO *et al.*, 1996; HIRUMA-LIMA *et al.*, 1999; SILVA *et al.* 2001a, 2001b, e 2001c). Os efeitos já estabelecidos da *t*-DCTN mostram uma estrita correlação com o uso tradicional do material da casca nas doenças estomacais, obesidade ou suas complicações (DI STASI *et al.*, 1989; MARTINS, 1989).

Os custos associados com a pesquisa farmacêutica e o desenvolvimento de novas drogas têm aumentado substancialmente nos últimos anos, com a diminuição paradoxal no número de novas moléculas aprovadas. Estima-se que aproximadamente 50 bilhões de dólares sejam gastos com o desenvolvimento de apenas 18 novas moléculas. Embora para aprovação de uma nova droga eram necessários cerca de U\$ 140 milhões em 1970 e U\$ 310 milhões em 1980, em 1990 os custos subiram para U\$ 800 milhões (FERRER, 2004).

A área da pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos parece sofrer com os custos na produção de novos medicamentos, além do mais um número substancial de drogas que alcançam as fases II e III não são utilizados na clínica (DIX, 2004). Se a avaliação da segurança fosse realizada satisfatoriamente nos ensaios pré-clínicos, poderia melhorar a eficiência e diminuir os custos nas pesquisas e desenvolvimento de novos fármacos. Em um passado recente, muitas drogas foram retiradas do mercado devido aos ensaios insuficientes de segurança nos estudos pré-clínicos.

Alguns exemplos foram: astigmazol, uma droga antialérgica, associada com aumento da mortalidade em homens e mulheres devido à prolongação do intervalo QT (SHOUTEN, 1991); triglitazona pertencente à classe denominada tiazolidinas (TDZs), efetivo em controlar a glicemia mas foi retirado do mercado devido a sérios efeitos hepatotóxicos (ISLEY, 2003), além de provocar edema e insuficiência cardíaca congestiva, conhecidos efeitos colaterais dos TDZs, particularmente quando combinado com insulina em pacientes portadores de diabetes tipo 2 (DELEA, 2003) e risco de ataque cardíaco, choque e morte em pacientes que fazem uso de agentes antiinflamatórios pertencente a

classe de drogas inibidoras de COX-2, como rofecoxib (Vioxx-Merck & Co. Inc.), etoricoxib (Arcoxia- Merck & Co. Inc), lumiracoxib (Prexige-Novartis) etc. (DAVIES & JAMALI, 2004; GOTTLIEB, 2005).

Há uma grande discussão sobre o provável efeito hepatotóxico da *Teucrium chamaedrys* L (germander), seu principal constituinte, teucrin, um diterpeno furanoclerodano e sobre o extrato de *Croton cajucara* (sacaca) e seu constituinte bioativo, *t*-DCTN. Estudos mostram que pessoas que fazem uso prolongado dos extratos dessas plantas visando emagrecer sofrem de hepatotoxicidade (KOUZI *et al.*, 1994; LEKEHAL *et al.*, 1996; SOARES, 2004).

Existe um grande interesse sobre os prováveis efeitos hepatotóxicos dos extratos de *Croton cajucara* e seu constituinte bioativo, *t*-DCTN. Estudos com pessoas obesas que fazem uso desta planta por longos períodos têm demonstrado que estas pessoas sofrem com hepatite tóxica. Os estudos mostram ainda que a *t*-DCTN é citotóxica para fibroblastos V79 e tóxica para hepatócitos de ratos *in vitro* e que a hepatotoxicidade parece ser uma possível limitação para o seu uso clínico (RODRIGUEZ & HAUN, 1999; MELO *et al.*, 2002). Afora estes dados, uma atividade antitumoral de *t*-DCTN também é encontrada na literatura (GRYNBERG *et al.*, 1999; MELO *et al.*, 2004).

Tendo em vista que a *t*-DCTN exerce efeitos benéficos como antiinflamatório, gastroprotetor, hipoglicêmico e hipolipidêmico, interessou-nos verificar seu potencial terapêutico e segurança através do modelo de toxicidade utilizando *Artemia sp*, além de

uma possível atividade citotóxica em culturas de hepatócitos primários e células mesencefálicas *in vitro*.

Um dos fatores a ser considerado no estágio inicial no desenvolvimento de um droga é a avaliação *in vitro* da potencial toxicidade de um novo fármaco, sob estudo, que pode dar indicação da toxicidade *in vivo* (LUBER-NAROD *et al.*, 2001). Assim, a avaliação de toxicidade *in vitro* é uma ferramenta indispensável na seleção de compostos com propriedade indesejáveis.

Artemia sp (Artemidae), uma larva de camarão de salmoura, é um invertebrado usado como teste alternativo para se determinar a toxicidade de produtos naturais e químicos. Este teste foi empregado no presente estudo como objetivo de relacionar os resultados dos valores da CL₅₀ registrados em cultura de células. Os resultados mostram que a CL₅₀ da *t*-DCTN no teste de *Artemia* foi $670 \pm 80 \mu\text{M}$ ($200 \pm 25,60 \mu\text{g/mL}$), contra os valores da CL₅₀ de 310 e 180 μM , observados nas culturas de leucemia humana promielocítica (HL60) e células de carcinoma de Ehrlich, respectivamente (GRYNBERG *et al.*, 1999; FREIRE *et al.*, 2003b). Estes resultados sugerem que a *t*-DCTN exerce toxicidade mais seletiva para células tumorais ou cancerígenas que células normais. Os dados mostram que a toxicidade para *Artemia* é comparativamente menor que nas culturas de células cancerígenas.

Estudo recente descreveu o efeito antitumoral da *t*-DCTN em camundongos portadores do tumor de ascite de Ehrlich (MELO *et al.*, 2004). Neste estudo, quando os

camundongos foram tratados com 20 mg/kg de *t*-DCTN foi obtida atividade antitumoral, significativa (%T/C = 80%) como verificado por um aumento na sobrevivência dos animais. Além disso, *t*-DCTN não mostrou citotoxicidade *in vitro* no carcinoma de Ehrlich até 1 mM.

Nos estudo de Agner e colaboradores (2001), *t*-DCTN não exibiu genotoxicidade nem citotoxicidade às células de medula óssea de camundongos nos ensaios de micronúcleo e aberração cromossômica, respectivamente. Embora não esteja claramente estabelecida sua seletividade tóxica às células normais ou tumorais, os dados experimentais obtidos *in vivo* fornecem base para uma potencial aplicação de *t*-DCTN na quimioterapia do câncer, bem como, no tratamento da diabetes e úlcera gástrica.

O efeito da *t*-DCTN foi investigada no modelo de neurotoxicidade induzida por 6-hidroxidopamina (6-OHDA) em culturas de células mesencefálicas primárias. A *t*-DCTN *per se* não diminui a viabilidade celular nas concentrações de 3, 10 e 30 µM, como evidenciado pelo teste do MTT. Uma diminuição nos valores de MTT correlaciona-se diretamente com morte celular. Porém, exposição prévia das culturas neuronais nas concentrações de *t*-DCTN (3, 10 e 30 µM) ofereceu significativa proteção contra toxicidade celular induzida por 6-OHDA.

Evidências indicam que 6-OHDA produz espécies reativas de oxigênio tais como ânion superóxido, radicais hidroxilas e peróxido de hidrogênio e induz apoptose em células dopaminérgicas localizadas na substância negra em ratos (COHEN *et al.*, 1974;

WALKINSHAW & WATERS, 1994; HE *et al.*, 2001) através da ativação de caspase-3, NF- κ B, P53 e fatores de transcrição C-*Jun* (DEL RIO & VELEZ-PARDO, 2002).

A neurotoxina 6-OHDA parece destruir não apenas os neurônios dopaminérgicos, mas também outras células presentes na cultura. Isto foi observado no experimento, onde neurônios dopaminérgicos representam 10% das células nas culturas e uma diminuição da viabilidade celular, acima de 50% foi obtido no teste com MTT, o que certamente reflete uma diminuição na atividade metabólica em outras células. Estudos de RIOBO e colaboradores em 2002 sugerem que a formação de peroxinitrito durante as reações redox se dá após reação de 6-OHDA com óxido nítrico. Devido a tal possibilidade, foi analisado o aumento de 6-OHDA associado ao aumento na produção de NO (como um indicador do estresse oxidativo) em culturas de células na presença e ausência *t*-DCTN.

Os resultados mostram que *t*-DCTN apenas parcialmente poderia inibir a 6-OHDA associado ao aumento do NO. Nosso estudo é o primeiro que usa culturas mesencefálicas primárias que mostram o efeito neuroprotetor de um diterpeno clerodano. Porém, estudos posteriores são necessários para mostrar a eficácia em modelos *in vivo* e estabelecer o mecanismo molecular pelo qual *t*-DCTN exerce sua neuroproteção.

Embora várias linhagens celulares como de hepatoma sejam usadas na avaliação de toxicidade e estudo de mecanismo, estas células não podem ser utilizadas em triagens de toxicidade mediada por metabólitos reativos, devido a suas deficiências para certas funções

metabólicas, tais como enzimas do citocromo P450 ou mesmo em algumas células que conservem atividades enzimáticas (WANG *et al.*, 2002).

Os dados obtidos nos estudos de WANG e colaboradores em 2002 sugerem que o uso de culturas de células primárias de hepatócitos de ratos permitem analisar mais precisamente a citotoxicidade de compostos os quais são conhecidos por serem influenciados pelo metabolismo hepático. A *t*-DCTN também foi testada em cultura primária de hepatócitos de ratos para verificar uma possível toxicidade.

Estudos *in vivo* e *in vitro* têm mostrado que etanol induz danos hepáticos (FRANK & RAICHT, 1985; FRENCH, 1996; BAILEYM *et al.*, 1998). Em adição, a ingestão excessiva de álcool está também associada com danos à mucosa gástrica (KVIETYS *et al.*, 1990). Uma vez que, em estudos anteriores, a *t*-DCTN demonstrou gastroproteção contra danos hepáticos induzidos por etanol, o presente estudo tem por objetivo avaliar o efeito de várias concentrações de etanol sobre a morte celular em cultura de hepatócito de ratos, usando MTT como teste de viabilidade celular.

Os resultados obtidos mostram que o etanol nas concentrações variando de 1 a 8 mM e *t*-DCTN nas concentrações de 0,3 a 300 µM reduziram a viabilidade celular de forma concentração-dependente. Vários trabalhos têm mostrado que o etanol aumenta a morte de hepatócitos através do estresse oxidativo. Na citotoxicidade induzida por etanol, radicais livres podem ser derivados da indução da atividade do citocromo P450E1 (MORIMOTO

et al., 1993) ou por disfunção mitocondrial após redução do conteúdo de GSH e geração de ATP (CUNNINGHAM *et al.*, 1990; COLLELL *et al.*, 1998).

No passado, a pesquisa experimental e clínica confirmou a eficácia de poucas plantas, como a *Silybum marianum*, *Picrorhiza kurroa*, *Curcuma longa*, *Camellia sinensis*, e *Glycyrrhiza glabra* (LUPER, 1999). Em muitos casos, a pesquisa nasceu da experiência tradicional e sabedoria popular e a partir daí os mecanismos e vias da ação destas plantas, foram sendo descobertos, confirmando, nos estudo clínicos, a eficácia terapêutica de certas plantas ou extratos derivados de plantas. Por outro lado, as formulações a base de plantas medicinais também são importantes fontes de danos hepáticos *in vivo*.

Não é surpresa, já que o fígado é predominantemente um local de “clearance”, biotransformação e excreção de drogas. A partir do uso tradicional do extrato da sacaca (*Croton cajucara*) nas doenças hepáticas, da hepatotoxicidade registrada após o uso crônico em algumas pessoas e da toxicidade observada *in vitro* da *t*-DCTN aos hepatócitos, verificamos um possível efeito hepatoprotetor, nos modelos de hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno e galactosamina/LPS em camundongos.

Acetaminofeno é uma droga amplamente utilizada na clínica devido aos efeitos analgésicos e antipiréticos. Uma overdose dessa droga, na forma acidental ou intencional (tentativa de suicídio), ou mesmo em combinação com consumo abusivo de álcool, causa insuficiência hepática fulminante e contribui significativamente para aumentos nos gastos

com cuidados e hospitalização de pacientes (PRESCOTT, 2000; GYAMLANI & PARIKH, 2002).

Insuficiência hepática induzida por acetaminofeno é a segunda causa de transplante de fígado e explica os níveis consideráveis de morbidade e mortalidade (LEE, 2004). A hepatotoxicidade é resultado da formação do metabólito tóxico, N-acetil-p-benzoquinonaimina (NAPQI) pelo citocromo P4502E1 que pode induzir depleção, dose dependente, da glutathiona intracelular (GSH) e perturbações na homeostase do cálcio (LEE *et al.*, 1996; CHEN *et al.*, 1999; HOLOWNIA & BRASZKO, 2004).

Quando os níveis de GSH no fígado estão esgotados, o metabólito reativo liga-se covalentemente as proteínas celulares, incluindo as proteínas da membrana plasmática e mitocôndria. Isto pode resultar na redução da atividade Ca^{2+} ATPase e aumento nos níveis de Ca^{2+} citosólico. Os efeitos diretos das proteínas mitocondriais modificadas ou aumento na captação do Ca^{2+} pode, ambos, levar a um aumento na quantidade de superóxido (JAESCHKE *et al.*, 2003).

Atualmente, N-acetilcisteína (NAC) é o tratamento de escolha, uma vez que aumenta os níveis de GSH no citosol hepático e mitocondrial para destoxificar o metabólito altamente reativo e citotóxico, NAPQI (MITCHELL *et al.*, 1973). Em nossos experimentos, acetaminofeno, administrado por via oral, a camundongos, na dose de 500 mg/kg, causou uma necrose hepática centrolobular fatal, o que foi evidenciado pela alto índice de mortalidade, mudanças histológicas e bioquímicas.

Além disso, a elevação da atividade de ALT e AST séricas associada com a toxicidade do acetaminofeno foi reduzida pela *t*-DCTN (25 e 50 mg/kg), de forma dose-dependente. N-acetilcisteína (NAC), um conhecido hepatoprotetor e repositor de sulfidrilas (PRESCOTT, 2000) preveniu o aumento das transaminases séricas. A melhoria nos níveis da GSH pelo NAC é considerado o mais significativo mecanismo de proteção por esta droga na toxicidade induzida por acetaminofeno (BRUNO *et al.*, 1998).

NAC é conhecido por atuar no aumento da concentração intracelular de glutathione reduzida (GSH) e/ou por inibir espécies reativas do oxigênio (ARUOMA *et al.*, 1989). GSH é um tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina sendo um importante antioxidante na defesa do hospedeiro. Similar ao NAC, *t*-DCTN restabeleceu os níveis hepáticos de GSH depletados pelo acetaminofeno, presumivelmente devido a diminuição do metabólito tóxico, N-acetil-p-benzoquinonaimina (NFPQI). Ao contrário do NAC, *t*-DCTN falhou em modificar ou reduzir o aumento de MDA induzido por acetaminofeno.

Os escores de lesão hepática indicam apenas uma proteção parcial no grupo tratado com *t*-DCTN na dose de 50, mas não na dose de 25 mg/kg no modelo de toxicidade induzida por acetaminofeno. Os cortes obtidos a partir do fígado mostraram necrose centrilobular com infiltrações de células inflamatórias nos camundongos tratados apenas com acetaminofeno. Necrose centrilobular, uma característica da hepatotoxicidade por acetaminofeno, foi significativamente reduzida nos camundongos tratados com NAC o qual

ofereceu melhor proteção que *t*-DCTN na toxicidade pelo acetaminofeno, como evidenciado pela atenuação na depleção da GSH.

Além disso, a congestão e a infiltração de células inflamatórias induzidas pelo acetaminofeno foi consideravelmente diminuído pela *t*-DCTN, indicando uma possível ação antiinflamatória. Recentemente, GARDNER e colaboradores em 2003, verificaram o papel potencial dos mediadores inflamatórios usando camundongos transgênicos tendo como alvo o gene do fator de necrose tumoral-1 (TNFR1) e os resultados mostraram que ocorre um aumento na hepatotoxicidade induzida pelo acetaminofeno em camundongos nocaute para TNFR1.

Estudos iniciais estabeleceram a atividade antiinflamatória da *t*-DCTN (CARVALHO *et al.*, 1996). Assim, nós propomos que o efeito hepatoprotetor da *t*-DCTN pode possivelmente envolver, em parte, uma ação antiinflamatória e em parte uma possível inibição da atividade do citocromo P450. Ultimamente, há um maior interesse na procura de inibidores do citocromo P450 que possuem potencial terapêutico na prevenção de danos hepáticos associados com overdoses de acetaminofeno (WALUBO *et al.*, 2004).

Sabe-se que o metabolismo e conjugação do pentobarbital ocorre no fígado, sobretudo no Citocromo P450 (NEBERT & GONZALEZ, 1997). Uma possível inibição das enzimas do Citocromo P450 e formação do NAPQI, via citocromo P450E1, o qual é predominantemente localizado no fígado (LEE *et al.*, 1996), pode contribuir para a

hepatoproteção, se a *t*-DCTN inibe ou não algumas isoformas específicas do citocromo P450, e para isso serão necessário estudos posteriores.

Examinamos os efeitos da *t*-DCTN em um modelo, *in vivo*, de hepatite tóxica induzido por GalN/LPS que é caracterizado por apoptose e subsequente lise das células hepáticas (LEIST *et al.*, 1996). Lipopolissacarídeo (LPS) é um componente da membrana externa de bactérias gram-negativas, as quais são usadas frequentemente em combinação com GalN para induzir danos hepáticos em roedores por aumento na produção de TNF- α (TIEGS *et al.*, 1989; ENDO *et al.*, 1999; JOSEPHS *et al.*, 2000).

TNF- α é sintetizado e secretado por macrófagos, incluindo células de Kupffer - macrófagos residentes no fígado, em resposta a estimulação por LPS. Nas doses de 25 e 50 mg/kg, por via oral, *t*-DCTN inibe a necrose hepática e oferece proteção contra a mortalidade no modelo de hepatotoxicidade induzido GalN/LPS como evidenciado por diminuição nos níveis das transaminases séricas, ALT e AST. Além disso, *t*-DCTN preveniu moderadamente as alterações histopatológicas, principalmente a necrose e a hemorragia, de forma notavelmente melhor que a dexametasona, uma droga antiinflamatória esteroideal. Tem-se demonstrado que a apoptose precede a necrose nas células hepáticas e que a prevenção desta por inibidores de caspases que modulam os receptores de TNF-1, foi um meio efetivo de suprimir os efeitos observados no modelo de choque séptico induzido por GalN/LPS em camundongos (JAESCHKE *et al.*, 2003).

Uma grande variedade de substâncias têm mostrado inibir TNF, incluindo antioxidantes (XIE *et al.*, 1999), inibidores da fosfolipase A₂ (SPRIGGS *et al.*, 1990), óxido nítrico sintase (ROJAS *et al.*, 1993), lipoxigenase (SCHADE *et al.*, 1991), fosfodiesterase (GANTNER *et al.*, 1997), colquicinas (TIEGS *et al.*, 1992) e melatonina (LISSONI *et al.*, 1996). Porém, estes estudos não analisaram a extensão da apoptose como causa do dano hepático em camundongos tratados com GalN/LPS. Diferente da necrose, a apoptose tem sido considerada via de eliminação (morte) de células não inflamatórias (HE *et al.*, 2001). Apoptose *per se* não é a causa direta da injúria hepática, o que é em grande parte devido a infiltração de neutrófilos (LEIST *et al.*, 1996).

Compostos com atividade antiinflamatória podem impedir danos celulares no modelo de hepatotoxicidade induzido por GalN/LPS. CARVALHO e colaboradores em 1996, demonstraram o efeito antiinflamatório utilizando *t*-DCTN e a hepatoproteção observada em nossos estudos poderia estar relacionada a uma ação observada com catequinas (HE *et al.*, 2001). A *t*-DCTN atenuou a depleção da glutathiona nos tecidos hepáticos associada a GalN/LPS, sugerindo um possível mecanismo antioxidante.

Neste contexto, é bom lembrar que certos agentes antiinflamatórios, como diclofenaco, pode induzir danos ao fígado através de vários mecanismos tais como permeabilidade mitocondrial (MASUBUCHI *et al.*, 2002), ativação do citocromo P450 (CANTONI *et al.*, 2003) e produção de espécies reativas do oxigênio (GOMEZ-LECHON *et al.*, 2003).

Nossos estudos sobre a *t*-DCTN são consistente com os trabalhos de HANDA & SHARMA (1990) os quais observaram uma hepatoproteção similar utilizando *andrographolide*, o principal diterpenoide ativo de *Andrographis paniculata* nos modelos de hepatotoxicidade aguda induzido por galactosamina e paracetamol em ratos.

O mecanismo de hepatoproteção exercido pela *t*-DCTN contra hepatotóxicos pode incluir proteção contra a depleção de glutathione, ativação de metabólitos e ação antiinflamatória. Assim, o mecanismo da glutathione é vital para manter uma variedade de funções intracelulares incluindo detoxificação, antioxidante e balanço redox (KIDD, 1997).

Como parte da avaliação de segurança, este estudo foi realizado para verificar os efeitos da *t*-DCTN nos parâmetros hemodinâmicos, particularmente em relação aos seus efeitos sobre a pressão sanguínea e frequência cardíaca. Estudo anterior (GUERRERO, 2004), mostrou que a *t*-DCTN possui atividade vasorelaxante, mas seu potencial hipotensivo ou sua atividade antihipertensiva não foi investigado.

Os resultados mostram que a *t*-DCTN em altas doses (10 e 15 mg/kg) induz hipotensão e bradicardia significantes, quando administrada intravenosamente, enquanto em baixas doses (5 mg/kg), produz apenas ligeira e insignificante queda da pressão arterial média (PAM). Uma vez que a PAM e a frequência cardíaca dependem diretamente da função colinérgica (JANSSEN, 2000), nós verificamos os efeitos do pré-tratamento de atropina e hexametônio.

A ação hipotensiva da *t*-DCTN não foi afetada nos animais pré-tratados com atropina, um agente anticolinérgico, e hexametônio, um bloqueador ganglionar. Hexametônio *per se* induziu queda na PAM, a qual foi acentuada (efeito aditivo) quando associado com *t*-DCTN. Propranolol, um antagonista β -adrenérgico também falhou em modificar a resposta hipotensiva da *t*-DCTN. Estes resultados indicam que outro(s) mecanismo(s), não colinérgico e não β -adrenérgico, pode(m) estar envolvido(s) na ação hipotensiva da *t*-DCTN.

O alvo celular da hipotensão induzida pela *t*-DCTN é presumivelmente as células endoteliais e/ou as células da musculatura lisa. O desenvolvimento das lesões vasculares tem sido associado ao efeito farmacológico de drogas, uma vez que o alvo farmacológico é frequentemente localizado nestas células. Vários receptores (endotelina, dopamina 1 – D1, prostaciclina e adenosina, canais de K^+ e óxido nítrico) presentes nas células endoteliais e/ou da musculatura lisa, regulam o tônus vascular através de efeitos vasodilatores e vasoconstrictores (CINES *et al.*, 1998; JOSEPH *et al.*, 1996a; JOSEPH *et al.*, 1996b).

A toxicidade vascular pode resultar da interação farmacológica com os alvos moleculares que iniciam uma série de cascatas interativas entre os componentes celulares e não-celulares, levando a eventuais danos. Assim, uma alteração neste delicado balanço resulta em perda da vasoconstrição ou vasodilatação podendo levar a danos vasculares.

No experimento utilizando átrio isolado de rato, *t*-DCTN exibiu um aumento significativo na força de contração cardíaca. O pequeno aumento na força de contração não

reflete uma possível inibição Na^+ , K^+ -ATPase. Estudos prévios têm mostrado que o átrio esquerdo de ratos normotensos tem uma grande reserva de receptores β -adrenérgicos (DOGGRELL, 1990). É provável que o efeito da *t*-DCTN seja devido a uma liberação endógena de noradrenalina e/ou possivelmente estar associado com a mobilização de cálcio intracelular através do aumento da atividade de PKC, que é consistente com a observação que a *t*-DCTN não exibe antagonismo ao cálcio no átrio direito de rato. Paradoxalmente, *t*-DCTN induziu um efeito cronotrópico negativo no batimento do átrio direito de rato, consistente com o efeito de bradicardia visto *in vivo*.

Com o objetivo de estudar este mecanismo básico, átrios foram incubados com atropina, um agente bloqueador muscarínico. Este tratamento falhou em reverter o efeito cronotrópico negativo da *t*-DCTN, sugerindo que este efeito não envolve a estimulação de receptor muscarínico. O diterpeno também falhou em modificar o efeito cronotrópico positivo induzido pela isoprenalina, indicando que o bloqueio dos receptores β -adrenérgicos não estão envolvidos nesta ação. Estes dados sugerem que outro mecanismo, não colinérgico e não β -adrenérgico, esteja envolvido na ação depressora da *t*-DCTN no átrio direito.

É interessante notar, a partir do presente estudo, que L-NAME, um inibidor da óxido nítrico sintase, causou, *per se*, uma significativa elevação da PAM a partir do nível basal, o qual foi, porém, inibido quando associado com *t*-DCTN. Esse resultado sugere uma possível participação da óxido nítrico sintase depende do endotélio (eNOS) na ação hipotensiva da *t*-DCTN. Contudo, uma ação direta sobre o músculo cardíaco ou sobre a

musculatura lisa vascular necessitaria ser investigada. Desta forma, nós verificamos um possível efeito relaxante da *t*-DCTN sobre preparações de anéis de aorta isolado e pré-contráídos com fenilefrina, com o endotélio intacto ou desnudo.

Nas preparações com endotélio intacto, *t*-DCTN produziu um relaxamento concentração-dependente. Por outro lado, utilizando o endotélio desnudo ou tecido pré-tratados com L-NAME, a resposta relaxante a 30 µg/mL de *t*-DCTN foi completamente revertida, sugerindo o envolvimento de um componente endotélio-dependente relacionado com a atividade da eNOS em seu efeito vasorelaxante.

Entretanto, em altas concentrações (100 e 300 µg/mL), o efeito relaxante da *t*-DCTN persiste mesmo após a remoção do endotélio, indicando mecanismos dependente e independente do endotélio no efeito vasorelaxante da *t*-DCTN. Esta observação está de acordo com estudos iniciais que descrevem efeitos vasorelaxantes de alguns diterpenos (TIRAPELLI *et al.*, 2004a; 2004b). Seria interessante estudar a atividade anti-hipertensiva da *t*-DCTN em modelos de hipertensão em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) ou induzidos hipertensão com drogas como o L-NAME ou desoxicorticosterona (DOCA-Salt).

7. CONCLUSÕES

A investigação realizada com a *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) nos permite delinear as seguintes conclusões:

- ✎ A *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN), um diterpeno isolado do *Croton cajucara* (sacaca), apresentou baixa toxicidade para o teste de *Artemia* sp sendo sua CL₅₀ de $670 \pm 80 \mu\text{M}$, exercendo portanto, mais toxicidade para células cancerígenas. Os dados fornecem uma base para uma potencial aplicação da *t*-DCTN na quimioterapia do câncer, bem como, no tratamento da diabetes e úlcera gástrica.
- ✎ A *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) *per se* não apresentou neurotoxicidade em cultura de células mesencefálicas e demonstrou uma significativa neuroproteção contra a toxicidade celular induzida pela 6-OHDA.
- ✎ Em cultura primária de hepatócitos, a *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) *per se* diminuiu a viabilidade celular de forma concentração-dependente, semelhante ao etanol.
- ✎ A administração oral de *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) ofereceu proteção moderada contra a hepatite tóxica induzida pela administração de acetaminofeno

em camundongos. Neste modelo, a *t*-DCTN demonstrou similaridade como a mostrada pela N-Acetilcisteína (NAC) evidenciado pela melhoria dos níveis de glutathiona (GSH), considerado o mais significativo mecanismo de proteção na toxicidade induzida pelo acetaminofeno.

✎ A *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) oferece proteção contra a hepatite tóxica induzida pela administração de GalN/LPS em camundongos evidenciado pela capacidade de inibir a depleção de glutathiona, como também os níveis das enzimas ALT e AST, e os escores de lesão hepática.

✎ O efeito hepatoprotetor da *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) pode possivelmente envolver, em parte, uma ação antiinflamatória e em parte uma possível inibição da atividade do citocromo P450, necessitando de estudos futuros.

✎ A *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) induz hipotensão e bradicardia significantes. Os resultados indicam que outros mecanismos que não o colinérgico e o adrenérgico, podem estar envolvidos na ação hipotensiva da *t*-DCTN.

✎ A *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) exibiu aumento significativo na força de contração cardíaca. Os dados sugerem que outros mecanismos que não o colinérgico e o adrenérgico, pode estar envolvido na ação depressora da *t*-DCTN no átrio de rato.

✂ Em preparações de anéis de aorta isolado pré-contraídos com fenilefrina, a *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) produziu um efeito relaxante de forma concentração-dependente tanto nas preparações com endotélio intacto como desnudo. Os resultados encontrados indicam que mecanismos dependente e independente do endotélio atuam no efeito vasorelaxante da *t*-DCTN.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBINK EJ, PICKKERS P, JANSSEN VAN ROSENDAAL A, LUTTERMAN JA, TACK CJ, RUSSEL FG, SMITS P. Vascular effects of glibenclamide vs. glimepiride and metformin in Type 2 diabetic patients. **Diabet Med.** 19 (2): 136-43, 2002.

ACERET TL, BROWN L, MILLER J, COLL JC, SAMMARCO PW. Cardiac and vascular responses of isolated rat tissues treated with diterpenes from *Sinularia flexibilis* (coelenterata: octocorallia). **Toxicon.** 34, 1165-71, 1996.

ADOLF, W.; DOSSAJI, S. F.; SLIP, E. H.; HECKER, E. Skin irritant diterpene orthoesters of the daphnane type from *Peddiea africana* and *P. Volkensii* **Phytochemistry**, v. 24, p. 2047-2049, 1985.

AGNER AR, MACIEL MA, PINTO AC, COLUS IM. Antigenotoxicity of trans-dehydrocrotonin, a clerodane diterpene from *Croton cajucara*. **Planta Med.** 67 (9), 815-9, 2001

AGNER AR, MACIEL MA, PINTO AC, PAMPLONA SG, COLUS IM .Investigation of genotoxic activity of trans-dehydrocrotonin, a clerodane diterpene from *Croton cajucara*. **Teratog Carcinog Mutagen.** 19 (6), 377-84, 1999.

ALBANO, E., TOMASI, A., PERSSON, J. O., TERELIUS, Y., GORIA-GATTI, L., INGELMAN-SUNDBERG, M., DIANZANI, M. V. Role of ethanol-inducible cytochrome P450 (P450 IIE1) in catalysing the free radical activation of aliphatic alcohols. **Biochemical Pharmacology.** 41, 1895–1902, 1991.

ALBINO DE ALMEIDA AB, MELO PS, HIRUMA-LIMA CA, GRACIOSO JS, CARLI L, NUNES DS, HAUN M, SOUZA BRITO AR. Antiulcerogenic effect and cytotoxic activity of semi-synthetic crotonin obtained from *Croton cajucara* Benth. **Eur J Pharmacol.** 11; 472 (3), 205-12, 2003.

ANAZETTI MC, MELO PS, DURAN N, HAUN M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology.** 30;188 (2-3), 261-74, 2003.

ANAZETTI MC, MELO PS, DURAN N, HAUN M. Dehydrocrotonin and its derivative, dimethylamide-crotonin induce apoptosis with lipid peroxidation and activation of caspases-2, -6 and -9 in human leukemic cells HL60. **Toxicology.** 15; 203 (1-3), 123-37, 2004.

ANDERSEN, N. R.; LORCK, H. O. B.; RASMUSSEN, P. R. Fermentation, isolation and characterization of antibiotic PR-1350. **J. Antibiot.** v. 36, p. 753-760, 1983.

APPENDINO G, BORRELLI F, CAPASSO R, CAMPAGNUOLO C, FATTORUSSO E, PETRUCCI F, TAGLIALATELA-SCAFATI O. Minor diterpenoids from cascarilla (*Croton eluteria* Bennet) and evaluation of the cascarilla extract and cascarillin effects on gastric acid secretion. **Agric Food Chem.** 19; 51 (24), 6970-4, 2003.

ARAUJO VT, DIOGO DC, DA SILVA MAP, RIGGIO LLMT, LAPA AJ, SOUCCAR C. Evaluation of the antiurolithiatic activity of the extract of *Costus spiralis* Roscoe in rats. **J Ethnopharmacol.** v. 66, p. 193-198, 1999.

ARAUJO, V. C.; CORRÊA, G. C.; MAIA, J. G. S.; SILVA, M. L. S.; GOTTLIEB, O. R.; MARX, M. C.; MAGALHÃES, M. T. **Acta Amazônica.** 1, 45, 1971.

ARUOMA, O.I., HALLIWELL, B., HOEY, B.M., BUTLER, J. The antioxidant action of N-acetylcysteine its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. Free Radical. **Biology & Medicine**. 6, 593-7, 1989.

BADILLA B, MORA G, LAPA AJ, EMIM JA. Anti-inflammatory activity of *Urera baccifera* (Urticaceae) in Sprague-Dawley rats. **Rev Biol Trop**. v: 47, p: 365-371, 1999.

BAILEYM, S. M., CUNNINGHAM, C. C. Acute and chronic ethanol increases reactive oxygen species generation and decreases viability in fresh, isolated rat hepatocytes. **Hepatology**. 28, 1318–1326, 1998.

BANDA, P. W., QUART, B. D. The effect of mild alcohol consumption on the metabolism of acetaminophen in man. **Research Communication Chemical Pathology and Pharmacology**. 38, 57–70, 1982.

BARONE, M, AZZARONE, A, ANGELINI, A, ZAMPARELLA, M, DELLAQUILA, P, FRANCAVILLA, A. Effect of epomediolon taurocholate uptake in hepatocytes isolated from normal rats or rats with ethinylestradiol-induced cholestasis. **Pharmacol. Toxicol**. v: 72, p: 296-299, 1983.

BARTON, D. H. R.; ELAD, D. J. Colombo root bitter principles. 1. The functional groups of columbin. **J. Chem. Soc.**, p. 2085-2090, 1956.

BAZAN, E.; CAMPBELL, A. K.; RAPOPORT, R. M. Effects of protein kinase C activation on norepinephrine-induced phosphatidylinositide hydrolysis in intact rat aorta **Eur. J. Pharmacol.**, v. 245, n. 2, p. 173-177, 1993.

BELARDINELLI L, ANTZELEVITCH C, VOS MA. Assessing predictors of drug-induced torsade de pointes. **Trends in Pharmacological Sciences**. 24 (12), 619-625, 2003.

BIGHETTI EJ, HIRUMA-LIMA CA, GRACIOSO JS, BRITO AR. Anti-inflammatory and antinociceptive effects in rodents of the essential oil of *Croton cajucara* Benth. **J Pharm Pharmacol.** 51 (12), 1447-53, 1999.

BORRIS RP. Natural products research: Perspective from a major pharmaceutical company. **Journal of Ethnopharmacology.** v: 51, p: 29 – 38, 1996.

BRAQUET, P. Ginkgolides: chemistry, biology, pharmacology and clinical perspectives. Barcelona: J. R. Prous, 1988.

BRITO, A. R.; RODRIGUEZ, J. A.; HIRUMA-LIMA, C. A.; HAUN, M.; NUNES, D. S. Antiulcerogenic activity of *trans*-dehydrocrotonin from *Croton cajucara*. **Planta Med.**, v. 64, p. 126-129, 1998.

BRUNO, M.K., COHEN, C.D., KHAIRALLAH, E.A. Antidotal effectiveness of N-acetylcysteine in reversing acetaminophen-induced hepatotoxicity. **Biochemical Pharmacology.** 37, 4319-25, 1998.

CALIXTO JB, BEIRITH A, FERREIRA J, SANTOS ARS, CECHINEL FILHO V, YUNES RA. Naturally-occurring antinociceptive substances from plants (review). **Phytotherapy Research.** v. 14, p: 401-418, 2000.

CALIXTO JB, SANTOS ARS, CECHINEL FILHO V, YUNES RA. A review of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology and therapeutic potential. **Medicinal Research Review.** v: 18, p; 225-258, 1998.

CAMPOS AR, ALBUQUERQUE FA, RAO VS, MACIEL MA, PINTO AC. Investigations on the antinociceptive activity of crude extracts from *Croton cajucara* leaves in mice. **Fitoterapia.** 73 (2), 116-20, 2002.

CANTONI, L., VA;APERTA, R., PONSODA, X., CASTELL, J.V., BARELLI, D., RIZZARDINI, M., MANGOLINI, A., HAURI, L., VILLA, P. Induction of hepatic heme-oxygenase-1 by diclofenac in rodents: role of oxidative stress and cytochrome P-450 activity. *Hepatology*. 38, 776-783, 2003.

CAPASSO R, IZZO AA, PINTO L, BIFULCO T, VITOBELLO C, MASCOLO N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**. v: 71, p: 58-65, 2000.

CARVALHO, J. C.; SILVA, M. F.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A . C.; NUNES, D. S.; LIMA, R. M.; BASTOS, J. K.; SARTI, S. J. Investigation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *trans*-dehydrocrotonin, a 19-*nor*-clerodane diterpene from *Croton cajucara*. Part 1. **Planta Med.**, v. 62, p. 402-404, 1996.

CAVALCANTE, F. L. M. Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FESBE), Caxambu, Brasil, 1988.

CECHINEL FILHO V, VAZ ZR, ZUNINO L, CALIXTO JB, YUNES RA. Antinociceptive and anti-oedematogenic properties of astilbin, taxifolin and some related compounds. *Arzneimittelforschung*. v: 50, p: 281-285, 2000.

CHEN, W., SHOCKCOR, J.P., TONGE, R., HUNTER, A., GARTNER, C., NELSON, S.D. Protein and nonprotein cysteinyl thiol modification by N-acetyl-p-benzoquinone imine via a novel ipso adduct. **Biochemistry**. 38, 8159-66, 1999.

CHOI DW, MAULUCCI-GEDDE M, KRIEGSTEIN AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. **J Neurosci**. 7 (2), 357-68, 1987.

CHOI, J. S.; SUH, S. S.; YOUNG, H. S.; PARK, H. J. Hypolipemic and hypoglycemic activities of *Prunus davidiana* in high fat-fed rats. **Arch. Pharm. Res.**, v. 14, p. 44-47, 1991a.

CHUANG, D. M. Neurotransmitter receptors and phosphoinositide turnover. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 29, p. 71-110, 1989.

CLUXTON RJ JR, LI Z, HEATON PC, WEISS SR, ZUCKERMAN IH, MOOMAW CJ, HSU VD, RODRIGUEZ EM. Impact of regulatory labeling for troglitazone and rosiglitazone on hepatic enzyme monitoring compliance: findings from the state of Ohio Medicaid program. **Pharmacoepidemiol Drug Saf.** 14 (1), 1-9, 2005.

COHEN G, HEIKKILA RE. The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. **J Biol Chem.** 25; 249 (8), 2447-52, 1974.

COLLELL, A., GARCÍA-RUIZ, C., MIRANDA, A., ARDITE, E., MARI, M., MORALES, A., CORRALES, F., KAPLOWITZ, N. AND FERNANDEZ-CHECA, J. C. Selective glutathione depletion of mitochondria by ethanol sensitizes hepatocytes to tumor necrosis factor. **Gastroenterology.** 115, 1541–1551, 1998.

CUNNINGHAM, C. C., COLEMAN, W. B. AND SPACH, P. I. The effects of chronic ethanol consumption on hepatic mitochondrial energy metabolism. **Alcohol and Alcoholism.** 25, 127–136, 1990.

DA SILVA MELO P, DURAN N, HAUN M. Cytotoxicity of derivatives from dehydrocrotonin on V79 cells and Escherichia coli. **Toxicology.** 28;159 (3), 135-41, 2001.

DAI, Y., CEDERBAUM, A. I. Cytotoxicity of acetaminophen in human cytochrome P450E1-transfected HepG2 cells. **Journal of Pharmacology Experimental Therapy.** 273, 1497–1505, 1995.

DALY, J. W.; PADGETT, W.; SEAMON, K. B. Activation of cyclic AMP-generating systems in brain membranes and slices by the diterpene forskolin: augmentation of receptor-mediated responses. **J. Neurochem.**, v. 38, n. 2, p. 532-544, 1982.

DANT, AS. **Nat. Gent.** 32: 229-232, 2002.

DAVIES, NM., JAMALI, F. (2004). COX-2 selective inhibitors: cardiac toxicity: getting to the heart of the matter. **J Pharma Sci.** 7 (3), 332-336, 2004.

DEL RIO MJ, VELEZ-PARDO C. Monoamine neurotoxins-induced apoptosis in lymphocytes by a common oxidative stress mechanism: involvement of hydrogen peroxide (H₂O₂), caspase-3, and nuclear factor kappa-B (NF-kappaB), p53, c-Jun transcription factors. **Biochem Pharmacol.** 15; 63 (4), 677-88, 2002.

DELEA TE, EDELSBERG JS, HAGIWARA M. Use of thiazolidinediones and risk of heart failure in people with type 2 diabetes: a retrospective cohort study. **Diabetes Care;** 26, 2983–2989, 2003.

DEMETZOS C, DIMAS K, HATZIANTONIOU S, ANASTASAKI T, ANGELOPOULOU D. Cytotoxic and anti-inflammatory activity of labdane and clerodane type diterpenes. **Planta Med.** 2001 Oct;67(7):614-8, 2001.

DEVIÉRE, J., DENYS, C., SCHANDENE, L., ROMASCO, F., ADLER, M., WYBRAN, J., DUPONT, E. Decreased proliferative activity associated with activation markers in patients with alcoholic liver cirrhosis. **Clinical Experimental Immunology** 72, 377–382, 1998.

DI STASI, L. C.; HIRUIMA, C. A.; SANTOS, E. M. G.; *et al.* Medicinal plants popularly used in brasilian amazon. **Fitoterapia**, v. 65, n. 6, p 529-540, 1994.

DI STASI, L. C.; SANTOS, E. M. G.; SANTOS, C. M.; HIRUIMA, C. A. **Plantas medicinais da Amazônia.** São Paulo: Ed. UNESP, p. 127-128, 1989.

DI STASI, LC. **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar.** São Paulo: Ed. UNESP, 1996.

DIX R. Experimental medicine: developing biomarkers in early discovery to bridge preclinical to clinical development. Program and abstracts of the 9th **Annual Drug Discovery Technology World Congress**; 8-13, 2004.

DO SOCORRO S ROSA MDO S, MENDONCA-FILHO RR, BIZZO HR, DE ALMEIDA RODRIGUES I, SOARES RM, SOUTO-PADRON T, ALVIANO CS, LOPES AH. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. **Antimicrob Agents Chemother.** 47 (6), 1895-901, 2003.

DOGGRELL, S.A. The effects of bromoacetylalprenololmenthane (BAAM), an irreversible β -adrenoceptor antagonist, on the rat isolated left atria and portal vein. **J. Auton. Pharmacol.** 10, 333-344, 1990.

DUARTE, D. F.; SANT'ANA, A. E.; CALIXTO, J. B. Analysis of the vasorelaxant action of jatrophone in the isolated aorta of the rat: influence of potassium channel blockers. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 215, p. 75-81, 1992.

DUBEY, M. P.; SRIMAL, R. C.; PATANAIK, G. K.; DHAVAN, B. N. Hypotensive and spasmolytic activities of coleonol, active principle of *Coleus forsholii* Briq. **Ind. J. Pharmacol.**, p. 6-15, 1974.

ELIVIN-LEWIS M. Should we be concerned about herbal remedies. **Journal of Ethnopharmacology.** v: 75, p: 141 – 164, 2001.

ELIZABETZKY E. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, MO et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3a. ed. Porto Alegre: Ed. da UFSC, 2001.

ENDO Y, SHIBAZAKI M, YAMAGUCHI K, KAI K, SUGAWARA S, TAKADA H, KIKUCHI H, KUMAGAI K. Enhancement by galactosamine of lipopolysaccharide

(LPS)-induced tumour necrosis factor production and lethality: its suppression by LPS pretreatment. **Br J Pharmacol.** 128 (1), 5-12, 1999.

ESPINDOLA LS, VASCONCELOS JUNIOR JR, DE MESQUITA ML, MARQUIE P, DE PAULA JE, MAMBU L, SANTANA JM. Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* var. *lingua*. **Planta Med.** 70 (11), 1093-5, 2004.

EVANS CW. Pharmacognosy. 14th ed. WB Saunders Company Limited, UK, 1996.

FARIAS, R. A. F.; ORIÁ NETO, M. F.; VIANA, G. S. B.; RAO, V. S. N. Effects of *Croton cajucara* Extract on serum lipids of rats fed a high fat diet. **Phytother. Res.**, v. 10, p. 697-699, 1996.

FARIAS, R. A. F.; RAO, V. S. N.; VIANA, G. S. B.; SILVEIRA, E. R.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C. Hypoglycemic effect of *trans*-dehydrocrotonin, a *nor*-clerodane diterpene from *Croton cajucara*. **Planta Med.**, v. 66, p. 558-560, 1997.

FARNSWORTH, N. R.; MORRIS, R. W. Higher plants the sleeping giant of drug development. **Am. J. Pharm. Sci.**, v. 148, n. 2, p. 46-52, 1976.

FATTORE, P. C.; SIRTORI, C. R. Nicotinic acid and derivatives. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 2, p. 43-47, 1991.

FERNANDES LR, ANTUNES AS. Informações estratégicas sobre plantas medicinais. Escola de Química, UFRJ; Rio de Janeiro, 2000.

FERRER, M., THORSTEINS, H., QUACH, U., SINGER, PA., DAAR, AS. **Nature Biotechnology.** 23 (Suppl), DC8-12, 2004

FRANK, D. AND RAICHT, R. F. Alcohol-induced liver diseases. **Alcohol Clinical Experimental Research.** 9, 66–82, 1985.

FREIRE AC, DA SILVA MELO P, AOYAMA H, HAUN M, DURAN N, FERREIRA CV. Cytotoxic effect of the diterpene lactone dehydrocrotonin from *Croton cajucara* on human promyelocytic leukemia cells. **Planta Med.** 69 (1), 67-9, 2003b.

FREIRE AC, DE ASSIS CF, FRICK AO, DA SILVA MELO P, HAUN M, AOYAMA H, DURAN N, SAUER MM, KALLAS EG, FERREIRA CV .Influence of protein phosphatase inhibitors on HL60 cells death induction by dehydrocrotonin. **Leuk Res.** 27 (9), 823-9, 2003a.

FRENCH, S. W. Ethanol and hepatocellular injury. **Clinical Laboratory Medicine** 16, 289–306, 1996.

FURCHGOTT, R. F., ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature.** v. 288, p. 373-376, 1980.

GANTNER F, KUSTERS S, WENDEL A, HATZELMANN A, SCHUDT C, TIEGS G. Protection from T cell-mediated murine liver failure by phosphodiesterase inhibitors. **J Pharmacol Exp Ther.** 280(1), 53-60, 1997.

GARCÍA-RUIZ, C., MORALES, A., BALLESTA, A., RODÉS, J., KAPLOWITZ, N. AND FERNÁNDEZ-CHECA, J. C. Effect of chronic ethanol feeding on glutathione and functional integrity of mitochondria in periportal and perivenous rat hepatocytes. **Journal of Clinical Investigation.** 94, 193–201, 1994.

GARDEN, S. J.; MARTINS, J. R; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M.; Resumos da 22^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, Brasil, 1999.

GARDNER, C.R., LASKIN, J.D., DAMBACH, D.M., CHIU, H., DURHAM, S.K., ZHOU, P., BRUNO, M.K., GERECKE, D.R., GORDON, M.K., LASKIN, D.L. Exaggerated hepatotoxicity of acetaminophen in mice lacking tumor necrosis factor

receptor-1: Potential role of inflammatory mediators. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 192,119-30, 2003.

GERGEL, D., MISÍK, V., RIESZ, P. AND CEDERBAUM, A. I. Inhibition of rat and human cytochrome P4502E1 catalytic activity and reactive oxygen radical formation by nitric oxide. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 337, 239–250, 1997.

GOMEZ-LECHON, M.J., PONSODA, X.O.C.E., DONATO, T., CASTELL, J.V., JOVER, R. Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes by alteration of mitochondrial function and generation of ROS. **Biochemical Pharmacology**. 66, 2155-2167, 2003.

GREEN LC, TANNENBAUM SR, GOLDMAN P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**. 3; 212 (4490), 56-8, 1981.

GRYNBERG, N. F., ECHAVARRIA, A., LIMA, J. E.; PAMPLONA, S. S.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. Antitumor activity of two 19-*nor*-clerodane diterpenes, *trans*-dehydrocrotonin and *trans*-crotonin, from *Croton cajucara*. **Planta Med.**, v. 65, p. 687-699, 1999.

GU WZ, CHEN R, BRANDWEIN S, MCALPINE J, BURREN N. Isolation, purification, and characterization of immunosuppressive compounds from tripterygium: triptolide and triptodioid. **Int J Immunopharmacol**. 17 (5), 351-6, 1995.

GUERRA, MP, NODARI, RO. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, MO et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3a. ed. Porto Alegre: Ed. da UFSC, p: 13-26, 2001.

GUERRERO, M.F., PUEBLA, P., CARRÓN, R., MARTÍN, M.L., SAN ROMAN, L., Vasorelaxant effect of new *neo*-clerodane diterpenoids isolated from *Croton schiedeana* **J. Ethnopharmacol**. 94, 185-189, 2004.

GYAMLANI, G.G., PARIKH, C.R., Acetaminophen toxicity: suicidal vs. accidental. **Critical Care**. 6, 155-9, 2002.

HABTEMARIAM S. In vitro antileishmanial effects of antibacterial diterpenes from two Ethiopian *Premna* species: *P. schimperi* and *P. oligotricha*. **BMC Pharmacol**. 6; 3 (1), 6, 2003.

HALIMI S. The glitazones. **Rev Med Interne**. 26 (1), 54-7, 2005.

HANDA SS, SHARMA A. Hepatoprotective activity of andrographolide against galactosamine & paracetamol intoxication in rats. **Indian J Med Res**. 92, 284-92, 1990.

HE, P., NODA, Y., SUGIYAMA, K. Green tea suppresses lipopolysaccharide-induced liver injury in d-galactosamine-sensitized rats. **Journal of Nutrition**. 131, 1560-1567, 2001.

HESSLER, J. R.; ROBERTSON, A. L.; CHISOLM, G. M. LDL cytotoxicity and its inhibition by HDL in human vascular smooth muscle and endothelial cell culture. **Atherosclerosis**, v. 32, p. 213, 1979.

HIDEJI, I.; ICHIHARA, Y.; KOJIMA, H.; WATANABE, K.; TAKEYA, K. Norclerodane diterpenes from *Croton cajucara*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 6, p. 1667-1669, 1989.

HIGUCHI, H., KUROSE, I., KATO, S., MIURA, S. AND ISHII, H. Ethanol-induced apoptosis and oxidative stress in hepatocytes. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**. 20, 340A–346A, 1996.

HIRUMA-LIMA CA, GRACIOSO JS, TOMA W, ALMEIDA AB, PAULA AC, BRASIL DS, MULLER AH, SOUZA BRITO AR. Gastroprotective effect of aparisthman, a

diterpene isolated from *Aparisthmium cordatum*, on experimental gastric ulcer models in rats and mice. **Phytomedicine**. 8 (2), 94-100, 2001.

HIRUMA-LIMA, C. A.; COTA, R. H. S.; NUNES, D. S. Estudos preliminares das ações centrais do óleo das cascas de *Croton cajucara* Benth. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14., Florianópolis, 1996. **Resumos...** p.117.

HIRUMA-LIMA, C.A., SPADARI-BRATFISCH, R.C., GRASSI-KASSISSE, D.M., BRITO, A.R. Antiulcerogenic mechanisms of dehydrocrotonin, a diterpene lactone obtained from *Croton cajucara*. **Planta. Med.** 65, 325-330, 1999a.

HIRUMA-LIMA CA, GRACIOSO JS, NUNES DS, SOUZA BRITO AR. Effects of an essential oil from the bark of *Croton cajucara* Benth. on experimental gastric ulcer models in rats and mice. **J Pharm Pharmacol**. 51, 341-6, 1999b.

HOLOWNIA, A., BRASZKO, J.J. Acetaminophen alters microsomal ryanidine Ca^{2+} channel in HepG2 cells overexpressing CYP2E1. **Biochemical Pharmacology**. 68, 513-21, 2004.

HOWES LG, SUNDARESAN P, LYKOS D. Cardiovascular effects of oral hypoglycaemic drugs. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. 23 (3), 201-6, 1996.

ICHIHARA, Y.; TAKEYA, K.; HITOTSUYANAGI, Y.; MORITA, H.; OKUYAMA, S.; SUGANUMA, M.; FUJIKI, H.; MOTIDOME, M.; ITOKAWA, H. Cajucarinolide and isocajucarinolide: anti-inflammatory diterpenes from *Croton cajucara*. **Planta Med.**, v. 58, p. 549-551, 1992.

ISLEY WL. Hepatotoxicity of thiazolidinediones. **Expert Opin Drug Saf**. 2 (6), 581-6, 2003.

ITOKAWA, H.; ICHIHARA, Y.; SHIMIZU, M.; TAKEYA, K.; MOTIDOME, M. Cajucarins A and B, new clerodanes diterpenes from *Croton cajucara*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 38, p. 701-705, 1990.

JAESCHKE, H., KNIGHT, T.R., BAJT, M.L. The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. **Toxicology Letters**. 144, 279-288, 2003.

JANBAZ KH, GILANI AH. Studies on preventive and curative effects of berberine on chemical-induced hepatotoxicity in rodents. **Fitoterapia**. 71 (1), 25-33, 2000.

JANSSEN, B.J., LEENDERS, P.J., SMITS, J.F. Short-term and long-term blood pressure and heart rate variability in the mouse. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol**. 278, 215-225, 2000.

JANUARIO AH, SANTOS SL, MARCUSSI S, MAZZI MV, PIETRO RC, SATO DN, ELLENA J, SAMPAIO SV, FRANCA SC, SOARES, AM. Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloproteases snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti proteolytic and anti-hemorrhagic properties. **Chem Biol Interact**. 7, 150 (3), 243-51, 2004.

JIRTLE RL, HAAG JD, ARIAZI EA, GOULD MN. Increased mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor and transforming growth factor beta 1 levels during monoterpene-induced regression of mammary tumors. **Cancer Res**. 1;53 (17), 3849-52, 1993.

JOSEPHS, M.D., BAHJAT, F.R., FUKUZUKA, K., KSONTINI, R., SOLORZANA, C., EDWARDS, C.K., TANNAHILL, C.L., MACKAY, S.L., COPELAND, E.M., MOLDWER, L.L. Lipopolysaccharide and D-galactosamine-induced hepatic injury is mediated by TNF-alpha and not by Fas ligand. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol** 278: R1196-R1201, 2000.

KELECOM, A. Isolation, structure determination and absolute configuration of barbatusol, a new bioactive diterpene with a rearranged abietane skeleton from the labiate *Coleus barbatus*. **Tetrahedron**. v. 19, p. 3603-3608, 1983.

KHAN S, JABBAR A, HASAN CM, RASHID MA. Antibacterial activity of *Barringtonia racemosa*. **Fitoterapia**. 72 (2), 162-4, 2001.

KIDD, PM. Glutathione: systemic protection against oxidative and free radical damage. **Altern. Med. Rev.** V:2, 155-176, 1997.

KOOP, D. R., KLOPFENSTEIN, B., IIMURO, Y. AND THURMAN, R. G. Gadolinium chloride blocks alcohol-dependent liver toxicity in rats treated chronically with intragastric alcohol despite the induction of CYP2E1. **Molecular Pharmacology** 51, 944–950, 1997.

KOUZI, SA., MCMURTRY, RJ., NELSON, SD. Hepatotoxicity of germander (*Teucrium chamaedrys* L.) and on of its constituent neoclerodane diterpenes teucrin A in the mouse. **Chem res Toxicol**. 7 (6), 850-856, 1994.

KUBO, I.; ASAKA, Y.; SHIBATA, K. Insect growth inhibitory *nor*-diterpenes, *cis*-dehydrocrotonin and *trans*-dehydrocrotonin, from *Croton cajucara*. **Phytochemistry**. 30, 2545, 1991.

KUBO, M, MATSUDA, H, TOMOHIRO, N, YOSHIKAWA, M. Studies on alismatis rhizoma. I. anti-allergic effect of methanol extract and six terpene components from alismatis rhizoma (dried rhizome of *Alisma orientale*). **Bio. Pharm. Bull.** v. 20, p. 511-516, 1987.

KUROSE, I., HIGUCHI, H., KATO, S., MIURA, S., WATANABE, N., KAMEGAYA, Y., TOMITA, K., TAKAISHI, M., HORIE, Y., FUKUDA, M., MIZUKAMI, K. AND ISHII, H. Oxidative stress on mitochondria and cell membrane of cultured rat hepatocytes and perfused liver exposed to ethanol. **Gastroenterology**. 112, 1331–1343, 1997.

KVIETYS, P. R., TWOHIG, B., DANZELL, J. AND SPECIAN, R. D. Ethanol-induced injury to the rat gastric mucosa. Role of neutrophils and xanthine oxidase-derived radicals. **Gastroenterology**. 98, 909–920, 1990.

LAMB, R. G., KOCH, J. C., SNYDER, J. W., HUBAND, S. M. AND BUSH, S. R. An *in vitro* model of ethanol-dependent liver cell injury. **Hepatology**. 19, 174–182, 1994.

LAMBERT TL, DEV V, RECHAVIA E, FORRESTER JS, LITVACK F, EIGLER NL. Localized arterial wall drug delivery from a polymer-coated removable metallic stent. Kinetics, distribution, and bioactivity of forskolin. **Circulation**. 90(2):1003-11, 1994.

LEE KJ, YOU HJ, PARK SJ, KIM YS, CHUNG YC, JEONG TC, JEONG HG. Hepatoprotective effects of Platycodon grandiflorum on acetaminophen-induced liver damage in mice. **Cancer Lett**. v: 174, p: 73-81, 2001.

LEE, S.S.T., BUTERS, J.T.M., PINEAU, T., FERNANDEZ-SALGUERO P., GONZALEZ, F.J., Role of CYP2E1 in the hepatotoxicity of acetaminophen. **Journal of Biological Chemistry**. 271, 12063-7, 1996.

LEE, W.M. Acetaminophen and the U.S. acute liver failure group: lowering the risks of hepatic failure. **Hepatology**. 40, 6-9, 2004.

LEIST, M., AUER-BARTH, S., WENDEL, A. Tumor necrosis factor production in the perfused mouse liver and its pharmacological modulation by nethylxanthines. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 276, 968-976, 1996.

LEKEHAL, M., PESSAYRE, D., LEREAU, JM., MOULIS, C., FOURASTE, I., FAU, D. Hepatotoxicity of the herbal medicine germander: metabolic activation of its furano diterpenoids by cytochrome P450 3^A depletes cytoskeleton-associated protein thiols and forms plasma membrane blebs in rat hepatocytes. **Hepatology**. 24 (1), 212-218, 1996.

LILJA H, BLANC P, DEMETRIOU AA, ROZGA J. Response of cultured fetal and adult rat hepatocytes to growth factors and cyclosporine. **Cell Transplant.** 7 (3), 257-66, 1998.

LISSEONI P, PAOLOROSSO F, TANCINI G, BARNI S, ARDIZZOIA A, BRIVIO F, ZUBELEWICZ B, CHATIKHINE V. Is there a role for melatonin in the treatment of neoplastic cachexia? **Eur J Cancer.** 32A (8), 1340-3, 1996

LIU, J., LIU, Y., MÃO, Q. et al. The effects of 10 triterpenoid compounds on experimental liver injury in mice. **Fun Appl Toxicol.**, v. 22, p. 34-40, 1994.

LOPES, D.; BIZZO, H. R.; SOBRINHO, A. F. S.; PEREIRA, M. V. G. 30th International Symposium on Essential Oils, Leipzig, 1999.

LORENZI H, MATOS FJA. Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas. São Paulo: Instituto Plantarum; 2002.

LUBER-NAROD, J., SMITH, B., GRANT, W., JIMENO, JM., LOPEZ-LAZARO, L., FAIRCOTH, GT. Evaluation of the use of *in vitro* methodologies as tools for screening new compound for potential *in vivo* toxicity. **Toxicol. In Vitro.** 15: 571-577, 2001.

LUNA COSTA, A. M.; SILVA, J. C.; CAMPOS, A. R.; RAO, V. S.; MACIEL, M. A.; PINTO, A. C. Antioestrogenic effect of *trans*-dehydrocrotonin, a *nor*-clerodane diterpene from *Croton cajucara* Benth. in rats. **Phytother. Res.**, v. 13, p. 689-691, 1999.

LUPER, S. A review of plants used in the treatment of liver disease: part two. **Alternative Medicine Review.** 4, 178-188, 1999.

LUZZI R, SCHEIDT C, ROOS JF, CECHINEL FILHO V, SANTOS AR, CALIXTO JB, MACIEL, M. A. M. ***Croton cajucara*: uma escolha etnobotânica.** 1997. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p. 19-20, 23-33, 67, 117, 1997.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; ARRUDA, A. C., PAMPLONA; S. G. S. R., VANDERLINDE; F. A.; LAPA, A. J.; CÓLUS, I. M. S.; ECHEVARRIA, A.; GRYNBERG, N. F.; FARIAS, R. A. F.; LUNA COSTA, A. M.; RAO, V. S. N. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. **J. Ethnopharmacol.** 70, 41, 2000.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; BRABO, S. N. *et al.* Investigação sazonal e farmacológica de desidrocrotonina, um diterpeno 19-nor-clerodano de *Croton cajucara*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 19., SIMPÓSIO NACIONAL DE QUÍMICA INORGÂNICA, 8., Poços de Caldas. **Resumos...** 1996.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; BRABO, S. N.; SILVA, M. N. Terpenoids from *Croton cajucara*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 823-828, 1998.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; GRYNBERG, N. F. *et al.* Atividade antitumoral da desidrocrotonina, um diterpeno nor-clerodano de *Croton cajucara*. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 11., Caxambu. **Resumos...** 1996. p. 417.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; NUNES, D. S. Flavanóides e cajucarinolida de *Croton cajucara*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 18. Caxambu. **Resumos...** 1995.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; PAMPLONA, S. G. S. R.; VANDERLINDE, F. A.; LAPA, A. J.; CARVALHO, J. C. T.; ECHEVARRIA, A.; GRYNBERG, N. F.; FARIAS, R. A. F.; LUNA COSTA, A. M.; RAO, V. S. N.; XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Águas de Lindóia, Brasil, 1998.

MACIEL, MAM, PINTO, AC, VEIGA JR., VF, GRYNBERG NF, ECHEVARRIA A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v: 25, nº: 03, p: 429-438, 2002.

MALHEIROS, A, FILHO, VC, SCHMITT, CB, SANTOS, ARS, SCHEIDT, C., CALIXTO, JB, MANCHE, FD, YUMES, RA. A sesquiterpene drimane with antinociceptive activity from *Drimys winteri* bark. **Phytochemistry**. v. 257, p. 103-107, 2001.

MAMBU L, RAMANANDRAIBE V, MARTIN MT, BLOND A, GRELLIER P, FRAPPIER F. Constituents of *Burasia madagascarensis*: a new clerodane-type diterpene. **Planta Med.** 68 (4), 377-9, 2002.

MARCHETTI P, NAVALES R. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of oral hypoglycaemic agents. **An update. Clin Pharmacokinet.** 16 (2), 100-28, 1989.

MARCY TR, BRITTON ML, BLEVINS SM Second-generation thiazolidinediones and hepatotoxicity. **Ann Pharmacother.** 38 (9), 1419-23, 2004.

MARTINS, J. R.; Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2000.

MARTINS, JEC. *Plantas Medicinais de uso na Amazônia*; Centro de Estudos Jurídicos do Pará: Belém, 1989, p. 92.

MARX, N. Macrophages in human atheroma contain PPAR-g differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor g expression and reduction of MMP-9 activity through PPAR-g activation in mononuclear phagocytes in vitro. **Am. J. Pathol.**, 153: 17-23, 1998.

MASUBUCHI, Y., MAKAYAMA, S., HORIE, T., Role of mitochondrial permeability transition in diclofenac-induced hepatic injury in rats. **Hepatology**. 35, 544-551, 2002.

MATOS FA, VIANA GSB, BANDEIRA MM. Guia Fitoterápico. Ceará. Governo do Estado do Ceará, 2001.

MATOS FJA. Plantas Medicinais. IOCE, Fortaleza, 1989.

MELO PS, DURAN N, HAUN M. Derivatives of dehydrocrotonin, a diterpene lactone isolated from *Croton cajucara*: cytotoxicity in rat cultured hepatocytes and in V79 cells. *Hum Exp Toxicol*. 21 (5), 281-8, 2002.

MELO, PS., JUSTO, GZ., DURAN, N., HAUN, M. Natural killer cell activity and anti-tumour effects of dehydrocrotonin and its synthetic derivatives. **European Journal of Pharmacology**. 487: 47-54, 2004.

MEYER, B.N., FERRIGNI, N.R., PUTNAM, J.E., JACOBSEN, L.B., NICHOLS, D.E., MCLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med.**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MIHARA M, UCHIYAMA M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal Biochem**. 86 (1), 271-8, 1978.

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.**, v. 57, p. 261, 1944.

MIRANDA F. J.; ALABADI, J. A.; ORTI, M.; CENTENO, J. M.; PINON, M.; YUSTE, A.; SANZ-CERVERA, J. F.; MARCO, J. A.; ALBORCH, E. Comparative analysis of the vascular actions of diterpenes isolated from *Euphorbia canariensis*. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 50, p. 237-241, 1998.

MORIKAWA A, SUGIYAMA T, KATO Y, KOIDE N, JIANG G, TAKAHASHI K, TAMADA Y, YOKOCHI T. Apoptotic Cell Death in the Response of D-Galactosamine-Sensitized Mice to Lipopolysaccharide as an Experimental Endotoxic Shock Model. **Infection and Immunity**. vol. 64, n. 3, p. 734–738, 1996.

MORIMOTO, M., HAGBJÖRK, A. L., NANJI, A. A., INGELMAN–SUNDBERG, M., LINDROS, K. O., FU, P. C., ALBANO, E. AND FRENCH, S. W. Role of cytochrome P4502E1 in alcoholic liver disease pathogenesis. **Alcohol** 10, 459–464, 1993.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**. 16; 65 (1-2), 55-63, 1983.

MUJOO K, HARIDAS V, HOFFMANN JJ, WACHTER GA, HUTTER LK, LU Y et al. Triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth) decrease tumor cell proliferation and induce apoptosis. **Cancer Res**. v. 61, p. 5486-5490, 2001.

MÜLLER, A. H.; OSTER, C.; LUNA, M. S. Terpenóides de *Croton cajucara* Benth.. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 38., 1986, Curitiba. **Resumos...** p. 631.

NABETA, K.; ISHIKAWA, T.; OKUYAMA, H. Sesqui- and di-terpene biosynthesis from C-13 labelled acetate and mevalonate in cultured cells of *Heteroscyphus planus*. **J. Chem. Soc. Perkin. Trans.**, v. 1, n. 24, p. 3111-3115, 1995.

NAKANISHI, K.; GOTO, T.; ITO, S.; NATARI, S.; NOZOE, S. Diterpenes. **Natural products chemistry**. New York: Academic Press, 1974. p. 185.

NEBERT, W.D., GONZALEZ, F.J. P450 genes: structure, evolution and regulation. **Annual Review of Biochemistry**. 56, 945-93, 1997.

NISHIZUKA, Y. Studies and perspectives of protein kinase C. **Science**, v. 223, n. 4761, p. 305-312, 1986.

ODEK-OGUNDE M, RAJAB MS. Antihypertensive effect of the clerodane diterpene ajugarin I on experimentally hypertensive rats. **East Afr Med J**. 71 (9), 587-90, 1994.

OLIVEIRA, M. C.; BORRÁS, M. R. L.; SILVA, E. A.; ROLAND, I. A. Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FESBE), Serra Negra, Brasil, 1995.

PAIVA LAF, RAO VS, GRAMOSA NV, SILVEIRA ER. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. **J Ethnopharmacol**. v. 62:, p. 73-78, 1998.

PARRA, A.L., YHEBRA, R.S., SARDIÑAS, I.G., BUELA, L.I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**. 8 (5), 395-400, 2001.

PERAZZO, F. F.; RODRIGUES, M.; CARVALHO, J. C. T.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; ARRUDA, A. C.; PAMPLONA, S. G. S. R.; III Jornada Paulista de Plantas Medicinais, Campinas, Brasil, 1997.

PINTO AC, SILVA DHS, BOLZANI VS, LOPES NP, EPIFANIO RA. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**. v: 25, p: 45-61, 2002.

POGATSA G. What kind of cardiovascular alterations could be influenced positively by oral antidiabetic agents? **Diabetes Res Clin Pract**. 31 Suppl:S27-31, 1996.

POZZI E. Sobrerol and chronic bronchitis. **Arch Monaldi Mal Torace**. 44 (4-6), 797-806, 1989.

PRESCOTT, L.F. Paracetamol, alcohol and the liver. **British Journal of Pharmacology** 49, 291-301, 2000.

RAO VS, SANTOS FA, SOBREIRA TT, SOUZA MF, MELO CL, SILVEIRA ER. Investigations on the gastroprotective and antidiarrhoeal properties of ternatin, a tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa*. **Planta Med.** v. 63: 146-149, 1997.

REINKE, L. A., KAUFMAN, F. C., BELINSKY, S. A. AND THURMAN, R. G. Interactions between ethanol metabolism and mixed-function oxidation in perfused rat liver: inhibition of *p*-nitrosanisole *O*-demethylation. **J. Pharm Exp Ther.** 213, 70–78, 1980.

REINKE, L. A., MOORE, D. R.; MCCAY, P. B. Free radical formation in livers of rats treated acutely and chronically with alcohol. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research.** 21, 642–646, 1997.

RIOBO NA., SCHOPFER FJ, BOVERIS AD, CADENAS E, PODEROSO JJ. The reaction of nitric oxide with 6-hydroxydopamine: implications for Parkinson`s disease. **Free Radical Biological Medicine.** 32 (2), 115-121, 2002.

RODRIGUEZ, JA., HIRUMA-LIMA, CA., SOUZA BRITO, AR. Antiulcer activity and subacute toxicity of trans-dehydrocrotonin from *Croton cajucara*. **Human Experimental Toxicology.** 23 (9), 455-456, 2004.

ROENGSUMRAN S, MUSIKUL K, PETSOM A, VILAIVAN T, SANGVANICH P, PORNPAKAKUL S, PUTHONG S, CHAICHANTIPYUTH C, JAIBOON N, CHAICHIT N. Croblongifolin, a new anticancer clerodane from *Croton oblongifolius*. **Planta Med.** 68 (3), 274-7, 2002.

ROGERS, D.; UNAL, G. G.; WILLIAMS, D. J. Crystal-structure of 3-epicryoptin and the reversal of the currently accepted absolute-configuration of clerodin. **Chem. Soc. Chem. Commun.**, v. 3, p. 97-99, 1979.

ROUACH, H., FATACCIOLI, V., GENTIL, M., FRENCH, S. W., MORIMOTO, M.; NORDMANN, R. Effect of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology. **Hepatology**. 25, 351–355, 1997.

SAI PRAKASH CV, HOCH JM, KINGSTON DG. Structure and stereochemistry of new cytotoxic clerodane diterpenoids from the bark of *Casearia lucida* from the Madagascar rainforest. **J Nat Prod**. 65 (2), 100-7, 2002.

SALACO, L.A., WILLIAMS, V., WITTING, J.H. Investigations to characterize a new antiarrhythmic drug, ORG 6001 including a simple test for calcium antagonism. **Br. J. Pharmacol**. 57, 251-262, 1976.

SANTOS FA, RAO VS. 1,8-cineol, a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury in rats. **Dig Dis Sci**. v. 46, p. 331-337, 2001.

SANTOS FA, RAO VSN. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. **Phytother Res**. v. 14, p. 240-244, 2000.

SATO, C., MATSUDA, Y. AND LIEBER, C. S. Increased hepatotoxicity of acetaminophen after chronic ethanol consumption in the rat. **Gastroenterology**. 80, 140–148, 1981.

SCHADE UF, ENGEL R, JAKOBS D. The role of lipoxygenases in endotoxin-induced cytokine production. **Prog Clin Biol Res**. 367: 73-82, 1991.

SCHIFFRIR, EL. Peroxisome proliferator-activated receptors and cardiovascular remodelling. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 43 (8): 1481-8, 2004.

SCHIMMELKJ, RICHEL DJ, VAN DEN BRINK RB, GUCHELAAR HJ. Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. **Cancer Treat Rev.** 30 (2), 181-91, 2004.

SCHOUTEN EG, DEKKER JM, MEPPELINK P, KOK FJ, VANDENBROUCKE JP, POOL J. QT interval prolongation predicts cardiovascular mortality in an apparently healthy population. **Circulation.** 84 (4), 1862-1865, 1991.

SEAMON, K. B.; PADDGETT, W. L.; DALY, J. W. Forskolin: unique diterpene activator of adenylyl cyclase in membranes and intact cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 78, p. 3367-3369, 1981.

SEDLAK J, LINDSAY RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem.** 24; 25 (1), 192-205, 1968.

SEGLEN, P. O. Preparation of isolated rat liver cells. **Methods in Cell Biology** 13, 29–83, 1976.

SHEN YC, WANG CH, CHENG YB, WANG LT, GUH JH, CHIEN CT, KHALLIL AT. New cytotoxic clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia membranacea*. **J Nat Prod.** 67, (3), 316- 21, 2004.

SHIRAKABE, H.; TAKEMOTO, T.; KOBAYASHI, K.; OGOSHI, K.; KIMURA, K.; NAKAMURA, K.; WATANABE, H. Clinical evaluation of teprenone, a mucosal protective agent, in the treatment of patients with gastric ulcers: a nationwide, multicenter clinical study. **Clin. Ther.**, v. 17, n. 5, p. 924-935, 1995.

SILANO M, DE VINCENZI M, DE VINCENZI A, SILANO V. The new European legislation on traditional herbal medicines: main features and perspectives. **Fitoterapia**. v: 75, p:107-116, 2004.

SILVA RM, SANTOS FA, MACIEL MA, PINTO AC, RAO VS. Effect of trans-dehydrocrotonin, a 19-nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara* on experimental hypertriglyceridaemia and hypercholesterolaemia induced by Triton WR 1339 (tyloxapol) in mice. **Planta Med**. 67 (8), 763-5, 2001b.

SILVA RM, SANTOS FA, RAO VS, MACIEL MA, PINTO AC. The lipid-lowering effect of trans-dehydrocrotonin, a clerodane diterpene from *Croton cajucara* Benth. in mice fed on high-fat diet. **J Pharm Pharmacol**. 53 (4), 535-9, 2001c.

SILVA RM. Estudo dos efeitos da *trans*-desyhydrocrotonina, um diterpeno 19-nor-clerodano do *Croton cajucara* Benth. em hiperlipidemia e hipertrigliceremia experimental. **Dissertação de Mestrado em Farmacologia**. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.

SILVA, R. M., SANTOS, F. A., RAO, V. S., MACIEL, M. A. M., PINTO, A. C. Blood glucose- and triglyceride- lowering effect of *trans*-dehydrocrotonin, a diterpene from *Croton cajucara* Benth., in rats. **Diabetes, Obesity and Metabolism**. v: 3, p: 452 - 456, 2001a.

SILVA, V.M., CHEN, C., HENNING, G.E. Changes in susceptibility to acetaminophen-induced liver injury by organic anion indocyanine green. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, p. 271-278, 2001.

SIMÕES, J. C.; SILVA, A. J. R.; SERRUYA, H.; *et al.* Dehydrocrotonina, a new norditerpenoid from *Croton cajucara*. **Ciênc. Cult.**, v. 31, n. 10, p. 1140-1141, 1979.

SOARES, M.C. Would sacaca, *Cróton cajucara Benth* (Euphorbiaceae) be an hepatotoxic plant like germander, *Teucrium chamaedrys* L. (Labiatae). **Rev Soc Bras Med Trop.** 37 Suppl 2:96-7, 2004.

SOUZA MF, TOME AR, RAO VS. Inhibition by the bioflavonoid ternatin of aflatoxin B1-induced lipid peroxidation in rat liver. **J Pharm Pharmacol.** v. 51, p. 125-129, 1999.

SOUZA, MF, RAO, VSN, SILVEIRA, ER. Inhibition of lipid peroxidation by ternatin, a tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa* L. **Phytomedicine.** v. 4, p. 27-31, 1997.

SPRIGGS DR, SHERMAN ML, IMAMURA K, MOHRI M, RODRIGUEZ C, ROBBINS G, KUFEL DW. Phospholipase A2 activation and autoinduction of tumor necrosis factor gene expression by tumor necrosis factor. **Cancer Res.** 50 (22), 7101-7, 1990.

SRIVASTAVA PM, CALAFIORE P, MACISAAC RJ, HARE DL, JERUMS G, BURRELL LM. Thiazolidinediones and congestive heart failure--exacerbation or new onset of left ventricular dysfunction? **Diabet Med.** 21 (8), 945-50, 2004.

TAKANO H, HASEGAWA H, ZOU Y, KOMURO I. Pleiotropic actions of PPAR gamma activators thiazolidinediones in cardiovascular diseases. **Curr Pharm Des.** 10 (22), 2779-86, 2004.

TASHMUKHAMEDOVA MA, MUKHINA OA, SYROV VN, KHUSHBAKTOVA ZA, KATKOVA SP, KOSOVSKII MI. Hypoglycemic activity of bicyclic diterpenoids of the clerodane series as compared to adegite and maninil. **Probl Endokrinol.** 38 (1), 48-50, 1992.

TIEGS G, FREUDENBERG MA, GALANOS C, WENDEL A. Colchicine prevents tumor necrosis factor-induced toxicity in vivo. **Infect Immun.** 60 (5), 1941-5, 1992.

TIEGS, G., WALTER, M., WENEL, A. Tumor necrosis factor is a terminalmediator in galactosamine/endotoxin-induced hepatitis in mice. **Biochemical Pharmacology**. 38: 669-672, 1989.

TIRAPELLI, C.R., AMBROSIO, S.R., DA COSTA, F.B., COUTINHO, S.T., DE OLIVEIRA, A. M., DE OLIVEIRA, A. M. Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acid in the isolated rat aorta. **Eur. J. Pharmacol.** 492, 233-241, 2004b.

TIRAPELLI, C.R., AMBROSIO, S.R., DA COSTA, F.B., DE OLIVEIRA, A. M. Evidence for the mechanisms underlying the effects of pimaradienoic acid isolated from the roots of *Viguiera arenaria* on rat aorta. **Pharmacology**. 70, 31-38, 2004a.

TOLMAN KG, CHANDRAMOULI J. Hepatotoxicity of the thiazolidinediones. **Clin Liver Dis**. 7 (2), 369-79, 2003.

TORRES LM, GAMBERINI MT, ROQUE NF, LIMA-LANDMAN MT, SOUCCAR C, LAPA AJ. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. **Phytochemistry**. 55 (6), 617-9, 2000.

TORSSELL, K. G. B. The melavonic acid pathway. New York: John Wiley, 1983. v. 189.

TREDGER, J. M., SMITH, H. M., READ, R. B., PORTMANN, B. AND WILLIAMS, R. Effects of ethanol ingestion on the hepatotoxicity and metabolism of paracetamol in mice. **Toxicology**. 36, 341–352, 1985.

TURNER DM. Natural product source material use in the pharmaceutical industry: the glaxo experience. **Journal of Ethnopharmacology**. :v 51, p: 39 – 43, 1996.

VAN DEN BERG, ME. Plantas Medicinais na Amazônia. Contribuição ao seu conhecimento sistemático, 2 Ed. Belém. CNPq/MCT, Brasil, 1999.

VAN DEN BERG, ME. Plantas Medicinais na Amazônia - Contribuição ao seu conhecimento sistemático. Gráfica Editora Falangola, Belém, Brasil, 1982.

VAN DEN BERG, ME. Plantas Medicinais na Amazônia - Contribuição ao seu conhecimento sistemático, 2ª Ed. Museu Paraense Emílio Goeldi, CNPq-MCT (Coleção Adolpho Ducke), Belém, Brasil, 1993.

VANDERLINDE, F. A.; SOUCCAR, C.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M.; PAMPLONA, S. G. S. R.; LAPA, A. J. XV Congresso Latino Americano de Farmacologia, Colômbia, 1997.

VELA SM, SOUCCAR C, LIMA-LANDMAN MT, LAPA AJ. Inhibition of gastric acid secretion by the aqueous extract and purified extracts of *Stachytarpheta cayennensis*. **Planta Med.** v. 63, p. 36-39, 1997.

WALKINSHAW G, WATERS CM. Neurotoxin-induced cell death in neuronal PC12 cells is mediated by induction of apoptosis. **Neuroscience.** 63 (4), 975-87, 1994.

WALUBO, A., BARR, S., ABRAHAM, A.M., COETSEE, C. The role of cytochrome P450 inhibitors in the prevention of hepatotoxicity after paracetamol overdose in rats. **Human Experimental Toxicology** 23, 49-54, 2004.

WANG, K., SHINDOH, H., INOUE, T., HORII, I. Advantages of *in vitro* cytotoxicity testing by using primary rat hepatocytes in comparison with established cell lines. **J Toxic Sci.** 27 (3), 229-237, 2002.

WEBSTER, G. L. The genera of the Euphorbiaceae in the South-Eastern United States. **J. Arnold. Arbor**, v. 48, p. 303, 1967.

WHO. Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines, World Health Organization, Geneva; 1991.

WILSON, S. R.; NEUBERT, L. A.; HUFFMAN, J. C. The chemistry of the Euphorbiaceae. A new diterpene from croton californicus. **J. Am. Chem. Soc.** v. 98, n. 12, p. 3669-3374, 1976.

WU L, WANG R, DE CHAMPLAIN J, WILSON TW. Beneficial and deleterious effects of rosiglitazone on hypertension development in spontaneously hypertensive rats. **Am J Hypertens.** 17 (9), 749-56, 2004.

YAMAHARA, J, YAMADA, T, KIMURA, H, SAWADA, T, FUJIMURA, H. Biologically active principles of crude drugs in antiallergic principles. **J. Pharmacobiodyn.** v. 5, p. 921-929, 1982.

YUNES RA, NIERO R. Antinociceptive activity of a hydroalcoholic extract obtained from aerial parts of *Sebastiania schottiana* (Euphorbiaceae). **Pharmazie.** v. 55, p. 681-683, 2000.