

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

KARINA MOREIRA DE ALENCAR CUNHA

**ESTUDO DE SEGURANÇA FARMACOLÓGICA DO
ÁCIDO CAURENÓICO, UM DITERPENÓ BIOATIVO
ISOLADO DO ÓLEO RESINA DE *Copaifera langsdorfii*.**

Fortaleza – CE

2006

KARINA MOREIRA DE ALENCAR CUNHA

**ESTUDO DE SEGURANÇA FARMACOLÓGICA DO
ÁCIDO CAURENÓICO, UM DITERPENÓ BIOATIVO
ISOLADO DO ÓLEO RESINA DE *Copaifera langsdorfii*.**

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

2006

C978e

Cunha, Karina Moreira de Alencar

Estudo de segurança farmacológica do ácido caurenóico, um diterpeno bioativo isolado do óleo resina de *Copaifera langsdorfii* / Karina Moreira de Alencar Cunha . – Fortaleza, 2006.

209 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza-Ce, 2006

1.Diterpenos de Caurano 2. Copaiva 3. Toxicologia 4.
Plantas medicinais - Brasil I. Rao, Vietla Satyanarayana
(orient.) II. Título

CDD: 615.3274

KARINA MOREIRA DE ALENCAR CUNHA

**ESTUDO DE SEGURANÇA FARMACOLÓGICA DO
ÁCIDO CAURENÓICO, UM DITERPENÓ BIOATIVO
ISOLADO DO ÓLEO RESINA DE *Copaifera langsdorfii*.**

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.

Aprovada em: 19 / 07 /2006

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Fernanda Regina Castro Almeida

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento

Profa. Dra. Maria Bernadete de Souza Maia

Profa. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo

Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao (Orientador)

A Deus, que nunca esquece ou descuida nem do mais humilde e pequenino de seus filhos. Nós é que nos esquecemos Dele, e de fazermos nossa parte...

Aos meus pais, Walmir Alencar Cunha e Maria Neuman Moreira de Alencar Cunha, e ao meu irmão, Jonas José Moreira de Alencar Cunha, porque as últimas três décadas para eles não têm sido fáceis não.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Vietla Satyanarayana Rao**, pela orientação científica, amizade, confiança, e extrema paciência em entender os descaminhos da minha mente. Seu incentivo nas horas mais decisivas foi peça fundamental na consecução desse projeto. Terminado tudo, não o quero fora da minha vida jamais.

Ao **professor Edilberto da Rocha Silveira**, pelo fornecimento do material estudado, fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao **professor Nilberto Robson Falcão do Nascimento**, disposição em ofertar seu exíguo tempo, seu laboratório e seu conhecimento para a realização dos experimentos cardiovasculares; mas principalmente, pelos mais de dez anos de amizade.

A **professora Adriana da Rocha Tomé**, pelo auxílio no feitiço das lâminas e atribuição dos laudos histológicos dos úteros dos experimentos com toxicidade reprodutiva.

A **professora Letícia Veras Costa Lotufo** pelo auxílio na realização dos experimentos de citotoxicidade *in vitro*.

Aos mais que colegas de pós-graduação, porque já há muito amigos, **Regilane Matos da Silva, Marjorie Moreira, Adriana Rolim, Francisco Romero Cabral, Flávio Damasceno, Francisco de Assis, Roberto César, Jéferson Falcão, Laura Andréa, Luilma Gurgel, Juliana Lemos, Lúcio Flávio**.

Carinhosamente o meu agradecimento aos bolsistas e ex-bolsistas que passaram pelo Laboratório de Produtos Naturais nesses anos de pós-graduação, em especial **Kelcyana, Rafaela, Fabrício, Wilcare, Simony, Apoliana, Ítalo e Cinthia**, pela amizade.

À **Karina Marques e Aline Bastos** pela colaboração técnica.

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

A todos os técnicos e funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, em especial a **Vilani**, a **Rose**, a **Íris**, ao **Chiquinho** e ao **Fernando**, por seus sorrisos, afabilidade e por sempre atenderem aos meus pedidos com presteza.

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

Ao **CNPq** pelo suporte financeiro.

***Para todas as grandes coisas exigem-se
lutas penosas e um preço muito alto. A
única derrota da vida é a fuga diante das
dificuldades. O homem que morre lutando
é um vencedor.***

Pe. Tiago Alberione (fundador das Irmãs Paulinas)

RESUMO

ESTUDO DE SEGURANÇA FARMACOLÓGICA DO ÁCIDO CAURENÓICO, UM DITERPENÓ BIOATIVO ISOLADO DO ÓLEO RESINA DE *Copaifera langsdorfii*.

Aluna: Karina Moreira de Alencar Cunha. Orientador: Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, 2006.

O óleo resina da *Copaifera langsdorfii* (ORCL), popularmente reputado como produto natural para o tratamento de afecções inflamatórias e para promover cicatrização de úlceras e de feridas é rico em ácido caurenóico, um diterpeno com diversas propriedades farmacológicas como antiinflamatória, antinociceptiva, diurética, vasodilatadora e hipoglicemiante. Além disso, apresentou genotoxicidade e, portanto os níveis do AK necessitam serem limitados em preparações comerciais do ORCL. O presente trabalho pretende avaliar a segurança do uso do AK utilizando testes de citotoxicidade *in vitro*, toxicidade aguda em camundongos, *screening* para ação no sistema nervoso central (SNC) *in vivo* e em eventos cardiovasculares, respiratórios e reprodutivos, *in vivo* e *in vitro*. Os testes de toxicidade foram realizados usando larvas de *Artemia sp.*, eritrócitos de ratos e humano, linhagens tumorais, gametas e embriões de ouriço (*L. variegatus*). Para o estudo cardiovascular foram utilizados ECG e pressão arterial em rato anestesiado, coração isolado perfundido (rato e cobaio), átrios, leito mesentérico perfundido e preparação de aorta de ratos *in vitro*. Os efeitos reprodutivos foram analisados na implantação e na organogênese de embriões de camundongos. AK não foi tóxico para o SNC de acordo com os parâmetros observados no teste do campo aberto e do *rota rod*. AK (até 1g/Kg) e não induziu toxicidade nem atingiu a DL_{50} em camundongos até 72h após a sua administração. AK é tóxico para *Artemia sp.* (CL_{50} $2,00 \pm 0,48 \mu\text{g/mL} = 6,6 \mu\text{M}$); hemolítico (CE_{50} $74 \mu\text{M}$ - rato e $56 \mu\text{M}$ - humano); manifesta ação antiproliferativa (AK $78 \mu\text{M}$) contra a MCF-7 (inibição de 95%) e a HCT-8 (inibição de 45%), embriotóxico para ouriços (*L. variegatus*), na fertilização e nos estágios de blastocisto e larval (CI_{50} $84,2 \mu\text{M}$, $44,7 \mu\text{M}$ e $<10 \mu\text{M}$, respectivamente). No ECG, não houve alteração no intervalo QT, porém induziu bradicardia com uma tendência para o prolongamento do intervalo PR, e promoveu hipotensão no rato normotenso anestesiado (10mg/Kg). No coração perfundido *in vitro*, AK promoveu inotropismo negativo (1000 μg ; 59%) parcialmente revertido pela adrenalina (300ng). Inotropismo negativo similar foi evidenciado em cobaio (AK 300 μg , 47 % e 1000 μg , 50%). Nos átrios isolados, AK (1 - 1000 $\mu\text{g/mL} = 3 \mu\text{M}$ - 3mM) não demonstrou uma mudança nem na frequência cardíaca nem na força da contração. Em anel de aorta pré-contraída por Phe (1-10 μM), AK (1 - 300 $\mu\text{g/mL} = 3 \mu\text{M}$ - 1mM) não mostrou efeito relaxante, mas quando pré-incubado (AK 50 $\mu\text{g/mL} = 160 \mu\text{M}$) causou inibição significativa da contração máxima na curva dose-resposta de Phe (10^{-12} a $3 \times 10^{-5} \text{M}$). AK (até 50mg/Kg) não apresentou atividade estrogênica ou antiestrogênica sobre ratas impúberes. Na embriogênese de camundongos, AK reduziu o ganho de peso das grávidas (AK 25mg/Kg) sem afetar sua *performance* reprodutiva, o que ocorreu com AK 50 mg/Kg (perdas embrionárias de 83%). Durante a organogênese houve redução do ganho de peso materno, do ganho de peso fetal e placentar e retardo na ossificação dos fetos (AK 25mg/Kg), que progrediu até a perda significativa das gestações (AK 50mg/Kg). Conclui-se que AK, nas doses testadas, mostrou-se seguro para animais com relação à toxicidade aguda e para os sistemas da Bateria Central de estudos de Segurança Farmacológica, porém apresentou toxicidade significativa nos eventos relacionados às células mitóticas ou à diferenciação celular e nos reprodutivos (estudos suplementares), provavelmente devido aos seus efeitos antiproliferativos e antiinflamatórios. Portanto, necessita-se cautela no uso do óleo-resina de copaíba durante a gestação.

Palavras-chave: ácido caurenóico, copaíba, Segurança Farmacológica.

ABSTRACT

SAFETY PHARMACOLOGICAL STUDIES OF KAURENOIC ACID, A BIOACTIVE DITERPENE ISOLATED FROM *Copaifera langsdorfii* OIL RESIN. Author: Karina Moreira de Alencar Cunha. Advisor: Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao. Doctoral Thesis. Postgraduation Program in Pharmacology. Departament of Physiology and Pharmacology. Federal University of Ceará, 2006.

Copaíba oil-resin from *Copaifera langsdorfii* is a popular natural health product used for the treatment of sore throat, urinary and pulmonary affections, and to promote healing of ulcers and wounds. The oil-resin contains various terpenoid components including kaurenoic acid (KA), a principal diterpenoid that manifests anti-inflammatory, antinociceptive, diuretic, vasodilator and hypoglycemic effects. Besides, KA at higher concentrations demonstrates genotoxicity in the tests of Comet and Micronucleus *in vitro*. Because of this genotoxic potential, it needs to be restrained the concentration of KA in commercial preparations of copaiba oil. The present work therefore aims to assess the safety of KA through cytotoxicity and acute toxicity tests, studying the effects on central nervous system (CNS), cardiovascular, respiratory and reproductive systems *in vivo* and *in vitro*. The toxicity tests were performed using Brine shrimp (*Artemia sp.*) larvae, rat and human erythrocytes, tumor cell lines, and sea urchin (*Lytechinus variegatus*) gametes and embryos. In the study of cardiovascular effects, KA was examined on rat ECG and blood pressure, rat or guinea pig isolated perfused heart, atria, aorta, and on rat mesenteric perfusion. The reproductive effects of KA were examined on implantation and organogenesis in mice. The results obtained from the open field and rota rod tests did not reveal any apparent toxicity of KA to the CNS. The KA up to an oral dose of 1g/kg in mice produced no measurable toxicity and the 50% lethal dose (LD₅₀) through a 72h oral toxicity study could not be established. On the other hand, KA showed a very high toxicity to *Artemia sp.* (LC₅₀ 2.00 ± 0.48µg/mL = 6,6µM); hemolytic activity (EC₅₀ of 74µM and 56µM on rat and human RBCs, respectively); manifested antiproliferative effects (78 µM) against MCF-7 (95% inhibition) and HCT-8 (45% inhibition); embryotoxicity to *L. variegates*, impaired the fertilization and development of blastula and larval stages with an IC₅₀ of 84.2 µM, 44.7µM and <10µM, respectively). On ECG, there was no significant alteration in the QT interval but did produce bradycardia and showed a tendency to prolong the PR interval. KA (10mg/Kg) induced a hypotensive response in anesthetized normotensive rats. On perfused rat heart, KA at 1000 µg showed a negative inotropic effect (59%) partially reverted by adrenaline (300ng). A similar negative inotropism was evidenced in guinea pig heart (KA 300µg, 47% and 1000µg, 50%). In isolated atrium, KA (1-1000µg/mL = 3µM – 3mM) demonstrated neither bradycardia nor a change in cardiac contractile force. In aortic rings pre-contracted by phenylephrine (1-10µM), KA (1-300µg/mL = 3µM - 1mM) failed to produce a relaxant effect but, however, pre-incubation with KA (50µg/mL = 160µM) significantly inhibited the maximal contraction induced by phenylephrine as evidenced by a rightward shift in the concentration-response curve. KA, at oral doses up to 50mg/Kg was found to be free from estrogenic or antiestrogenic effects in mice. Nevertheless, 50 mg/Kg treatment with KA promoted heavy embryonic loss, and at 25mg/Kg, although it caused no such impairment but significantly affected the maternal weight gain during pregnancy. During the organogenesis phase, a reduction in maternal, fetal and placental weight gains was observed. Besides, KA treatment groups showed markedly delayed fetal ossifications (25mg/Kg) and an adverse pregnancy outcome (50mg/Kg). In conclusion, the data obtained from *in vivo* experimentation suggest that KA, at the doses tested, is apparently safe and free from undesirable effects in all the studied organ systems (core battery of safety pharmacology studies) except the reproductive

one (supplemental studies), where in its antiproliferative and anti-inflammatory actions may possibly contribute to impaired pregnancy outcome. Therefore, a caution needs to be exercised in the use of copaiba oil resin during pregnancy.

Keywords: caurenoic acid, copaiba, Safety Pharmacology.

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4,6(NO ₂) ₃ C ₆ H ₂ OH	Ácido pícrico
5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)
ACh	Acetilcolina
ADR	Adrenalina
AK	Ácido cauranóico
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APD	Duração do potencial de ação (sigla inglesa)
ATP	Adenosina trifosfato
ATROP	Atropina
BaCl ₂	Cloreto de Bário
BK _{Ca} ²⁺	Canais de potássio ativados por cálcio
bpm	Batimentos por minuto
C ₂ H ₄ O ₂	Ácido acético
CaCl ₂ 6H ₂ O	Cloreto de cálcio hexahidratado
CE ₅₀	Concentração Eficaz 50: concentração de uma droga capaz de promover 50% de eficácia da mesma
CI ₅₀	Concentração Inibitória 50: concentração de uma droga capaz de promover 50% de inibição de uma atividade
CL	Corpos lúteos
CL ₅₀	Concentração Letal 50: concentração capaz de matar 50% dos animais testados
COX	Ciclooxigenase
DIG	Digoxina
DL ₅₀	Dose letal 50: dose capaz de matar 50% dos animais testados
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECG	Eletrocardiograma

EM	Espectrometria de massa
EPM	Erro padrão da média
Fc	Frequência cardíaca
FOB	Bateria de observações funcionais (sigla inglesa)
H ₂ CO	Formaldeído
hERG	Canal de potássio dependente de voltagem que gera correntes rápidas do íon
ICH	Sigla inglesa para a Conferência Internacional em Padronização de técnicas requeridas para registro de fármacos para uso humano
I _{KR}	Corrente rápida de potássio
I _{KS}	Corrente lenta de potássio
ILSI	Instituto Internacional de Ciências da Vida (sigla inglesa)
INDO	Indometacina
IV	Infravermelho
K ⁺ _{ATP}	Canais de potássio ativados por ATP
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄ H ₂ O	Fosfato de potássio monobásico
LPS	Lipopolissacarídeo
MgCl ₂ 6H ₂ O	Cloreto de magnésio hexahidratado
MgSO ₄ 7H ₂ O	Sulfato de magnésio heptahidratado
MTT	Sal tetrazolium
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NCE	Novas entidades químicas (sigla inglesa)
NO	Óxido nítrico
OCI	Ocitocina
OMS	Organização Mundial da Saúde

ORCL	Óleo resina da <i>Copaifera langsdorffii</i>
PAM	Pressão arterial média
PM	Peso molecular
PR	Intervalo entre as ondas P e R do ECG
QRS	Intervalo entre as ondas Q e S do eletrocardiograma (complexo QRS)
QT	Intervalo entre as ondas Q e T do ECG
QT _C	Correção matemática para o intervalo do ECG que vai desde a onda Q até a onda T do registro
RMN	Ressonância magnética nuclear
rpm	Rotações por minuto
RR	Intervalo entre duas ondas R do eletrocardiograma
s.c.	Subcutâneo
S7A e S7B	Classificação dada às duas principais diretrizes do ICH que delineiam os estudos de Segurança Farmacológica
SNC	Sistema Nervoso Central
TdP	<i>Torsades de pointes</i> (tipo de taquicardia ventricular)
TEA	Tetraetilamônio
UV	Ultravioleta
v.o.	Via oral
v.r.	Via retal

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Métodos para obtenção de substâncias ativas de plantas	27
FIGURA 2	Períodos de tratamento para testes de toxicidade reprodutiva em ratos e camundongos.	37
FIGURA 3	<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.	43
FIGURA 4	Sequência da extração do ácido caurenóico (AK)	67
FIGURA 5	Estrutura química do ácido caurenóico	68
FIGURA 6	Metodologia da toxicidade para <i>Artemia SP</i>	69
FIGURA 7	Teste da atividade hemolítica	70
FIGURA 8	Ensaio antiproliferativo para células tumorais.	71
FIGURA 9	Estudo da atividade antimitótica do AK sobre a embriogênese de ouriços (<i>L. variegatus</i>).	73
FIGURA 10	Teste de toxicidade aguda para camundongos	74
FIGURA 11	Teste da atividade exploratória de camundongos (Campo aberto)	75
FIGURA 12	Teste de coordenação motora (teste da barra giratória)	76
FIGURA 13	Metodologia de avaliação da ação do AK sobre o eletrocardiograma (ECG) e a pressão arterial de ratos normotensos	77
FIGURA 14	Estudo do AK sobre o coração inteiro isolado	79
FIGURA 15	Estudo do AK sobre o inotropismo e o cronotropismo cardíacos em átrios isolados de rato	81
FIGURA 16	Estudo do AK sobre o músculo liso vascular (anel de aorta)	83
FIGURA 17	Estudo do AK sobre o fluxo vascular mesentérico	84
FIGURA 18	Estudo do AK sobre a resistência traqueobrônquica de ratos	86
FIGURA 19	Estudo da atividade estrogênica do AK em ratas imaturas	88
FIGURA 20	Ensaio em camundongas prenhes	91
FIGURA 21	Metodologia de preparação dos fetos para avaliação do índice de desenvolvimento fetal de acordo com o método de Aliverti <i>et al</i> (1979)	92

FIGURA 22	Seqüência de cortes realizados para a observação interna dos fetos segundo o método de Barrow (1965)	93
FIGURA 23	Efeito do AK sobre o desenvolvimento das larvas de ouriço (<i>L. variegatus</i>).	97
FIGURA 24	Efeito do AK sobre a pressão arterial direta e freqüência cardíaca de ratos normotensos anestesiados	100
FIGURA 25	Registro fisiográfico representativo de experimento referente à medida direta da pressão arterial de rato normotenso tratado com AK	102
FIGURA 26	Registro eletrocardiográfico representativo de experimento realizado em rato normotenso tratado com AK	102
FIGURA 27	Efeito do AK sobre a força de contração cardíaca em coração isolado de rato e de cobaio.	104
FIGURA 28	Registros fisiográficos representativos do efeito do AK sobre a força de contração cardíaca em coração isolado de rato e de cobaio.	105
FIGURA 29	Efeito do AK sobre a pressão registrada em coração isolado de rato e de cobaio.	106
FIGURA 30	Registro fisiográfico representativo do efeito do AK sobre a pressão registrada em coração isolado de rato e de cobaio.	107
FIGURA 31	Ação do AK sobre o cronotropismo e sobre o inotropismo em átrio isolado de rato.	109
FIGURA 32	Registros fisiográficos representativos da ação do AK sobre o cronotropismo e sobre o inotropismo em átrio isolado de rato.	110
FIGURA 33	Efeito do AK sobre a contração tônica sustentada ou sobre a curva dose-resposta a fenilefrina em anel de aorta <i>in vitro</i> .	112
FIGURA 34	Registros fisiográficos representativos da ação do AK sobre a contração tônica de anel de aorta por fenilefrina e sobre a curva dose-resposta à fenilefrina.	113
FIGURA 35	Efeito do AK sobre a pressão registrada em leito vascular mesentérico isolado.	114
FIGURA 36	Registro fisiográfico representativo do efeito do AK sobre a pressão registrada em leito vascular mesentérico isolado	115
FIGURA 37	Efeito do AK sobre a pressão sistólica e diastólica, sobre a freqüência cardíaca e sobre o percentual de resistência traqueobrônquica em ratos anestesiados.	117

FIGURA 38	Registro fisiográfico representativo do efeito do AK sobre as pressões sistólica, diastólica, sobre a frequência cardíaca e sobre a resistência traqueobrônquica em ratos anestesiados.	118
FIGURA 39	Estudo da atividade estrogênica ou antiestrogênica do AK em ratas imaturas.	119
FIGURA 40	Estudo da atividade estrogênica ou antiestrogênica do AK em ratas imaturas. Cortes histológicos dos úteros (200x).	120
FIGURA 41	Efeito do AK administrado por gavagem, às fêmeas de camundongos grávidas, durante a embriogênese. Fotos dos úteros no 10 ^o dia após o acasalamento.	125
FIGURA 42	Efeito do AK administrado por gavagem, às fêmeas de camundongos grávidas, durante a embriogênese. Cortes histológicos dos úteros no 10 ^o dia após o acasalamento (200x)	129
FIGURA 43	Efeito do AK, administrado por gavagem do 8 ^o ao 15 ^o dia de gestação (período da organogênese), sobre o peso dos fetos e o peso dos anexos fetais.	133
FIGURA 44	Efeito do AK sobre os fetos das fêmeas de camundongos grávidas tratadas durante o período de organogênese, com sacrifício no 20 ^o dia de gestação.	137
FIGURA 45	Efeito do AK administrado por gavagem, às fêmeas de camundongos grávidas, durante o período de organogênese. Fotos dos cortes histológicos dos úteros no 20 ^o dia após o acasalamento.	138

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1:	Categorias de produtos botânicos terapêuticos	23
QUADRO 2:	Produtos farmacêuticos de importância econômica, ou seus precursores derivados de plantas, e suas projeções de vendas em torno do mundo no ano de 2002 de acordo com os grupos estruturais aos quais pertencem.	24
QUADRO 3	Espécies que apresentam ácido caurenóico como um dos principais constituintes de sua composição e as atividades populares atribuídas a elas.	54

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Exemplos de terpenos extraídos de vegetais superiores e seus usos tradicionais, comerciais e/ou atividades farmacológicas atribuídas.	44
TABELA 2	Classificação estrutural dos diterpenos segundo seus esqueletos de carbono e alguns exemplos conhecidos.	47
TABELA 3	Exemplos da diversidade de atividades biológicas atribuídas aos diterpenos	52
TABELA 4	Percentual de náuplios mortos durante a exposição às diferentes concentrações de AK, dicromato de potássio ou veículo.	96
TABELA 5	Intervalo das ondas do eletrocardiograma (ECG) de ratos normotensos anestesiados que receberam diferentes doses de ácido caurenóico (em <i>bolus</i>)	101
TABELA 6	Efeito do AK sobre a embriogênese e os parâmetros maternos quando administrado por gavagem as fêmeas de camundongo grávidas entre o 1º ao 7º dia de gestação, sacrificadas no 10º dia.	123
TABELA 7	Avaliação comparativa da menor dose de AK (50mg/Kg) que demonstrou efeito significativo sobre a embriogênese, administrada durante a pré-implantação (1º ao 3º dia de gestação) <i>versus</i> a pós-implantação (4º ao 8º dia de gestação).	124
TABELA 8	Efeito do AK, administrado por gavagem do 8º ao 15º dia de gestação (período da organogênese), sobre o ganho de peso materno.	134
TABELA 9	Efeito do AK, administrado por gavagem do 8º ao 15º dia de gestação (período da organogênese), sobre parâmetros maternos e fetais.	135
TABELA 10	Incidência do retardamento nos centros de ossificação em fetos de camundongos cujas mães foram tratadas com AK entre o 8º e o 15º dia de gestação (período da organogênese).	136

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	12
Lista de Figuras	15
Lista de Quadros	17
Lista de Tabelas	18
1. INTRODUÇÃO	21
1.1 GENERALIDADES	21
1.1.1 HISTÓRICO DA PESQUISA DE MEDICAMENTOS DERIVADOS DE PLANTAS E PERSPECTIVAS PARA O SÉCULO XXI.	21
1.1.2. PESQUISA DE NOVAS SUBSTÂNCIAS DERIVADAS DE PLANTAS: TOXICOLOGIA E SEGURANÇA FARMACOLÓGICA	26
1.1.3. TESTES COM PRODUTOS BOTÂNICOS E DERIVADOS (RENUNCIAR OU ADERIR ÀS DIRETRIZES DO ICH?)	28
1.1.4. NECESSIDADE DE INTEGRAÇÃO DOS PRINCÍPIOS DA SEGURANÇA FARMACOLÓGICA NOS ESTUDOS DE TOXICOLOGIA ANIMAL.	30
1.1.5. TOXICIDADE REPRODUTIVA	33
1.2. <i>Copaifera langsdorffii</i> DESF: DESCRIÇÃO BOTÂNICA, FITOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA.	38
1.3. TERPENOS	44
1.3.1. DITERPENOS	47
1.3.1.1. CAURANOS	50
1.3.1.1.1 ÁCIDO CAURENÓICO (AK)	54
2. OBJETIVOS	62
3. MATERIAIS	64
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	64
3.2. SOLUÇÕES NUTRITIVAS	65
3.3. SUBMISSÃO AO COMITÊ DE ÉTICA	65
4. METODOLOGIA	66
4.1. ISOLAMENTO DO ÁCIDO CAURENÓICO	66

4.2. TOXICIDADE <i>IN VITRO</i>	69
4.2.1. TOXICIDADE PARA <i>Artemia sp</i>	69
4.2.2. ATIVIDADE HEMOLÍTICA	70
4.2.3. ENSAIO ANTIPROLIFERATIVO PARA CÉLULAS TUMORAIS	71
4.2.4. TOXICIDADE PARA OURIÇOS (<i>Litechinus variegatus</i>)	72
4.3. TOXICIDADE AGUDA PARA CAMUNDONGOS	74
4.4. AÇÃO SOBRE O SNC	75
4.4.1. TESTE DA ATIVIDADE EXPLORATÓRIA	75
4.4.2. TESTE DE COORDENAÇÃO MOTORA	76
4.5. AÇÃO SOBRE O APARELHO CARDIOVASCULAR	77
4.5.1. ELETROCARDIOGRAMA (ECG) E PRESSÃO ARTERIAL	77
4.5.2. CORAÇÃO ISOLADO	78
4.5.3. ÁTRIO ISOLADO	80
4.5.4. ANEL DE AORTA ISOLADO	82
4.5.5. FLUXO VASCULAR MESENTÉRICO	84
4.6. AÇÃO SOBRE O APARELHO RESPIRATÓRIO	85
4.6.1. MEDIDA DA RESISTÊNCIA TRAQUEOBRÔNQUICA <i>IN VIVO</i>	85
4.7. AÇÃO SOBRE O SISTEMA REPRODUTOR FEMININO E SOBRE E SOBRE OS EVENTOS REPRODUTIVOS LIGADOS À MÃE E AO CONCEPTO	87
4.7.1. ATIVIDADE ESTROGÊNICA EM RATAS IMPÚBERES	87
4.7.2. ENSAIO EM CAMUNDONGAS PRENHES	89
4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	94
 5. RESULTADOS	 95
5.1. TOXICIDADE <i>IN VITRO</i>	95
5.1.1. TOXICIDADE PARA <i>Artemia sp</i>	95
5.1.2. ATIVIDADE HEMOLÍTICA	95
5.1.3. ENSAIO ANTIPROLIFERATIVO PARA CÉLULAS TUMORAIS	95
5.1.4. TOXICIDADE PARA OURIÇOS (<i>Litechinus variegatus</i>)	95
5.2. TOXICIDADE AGUDA PARA CAMUNDONGOS	98
5.3. AÇÃO SOBRE O SNC	98
5.3.1. TESTE DA ATIVIDADE EXPLORATÓRIA	98
5.3.2. TESTE DA COORDENAÇÃO MOTORA	98
5.4. AÇÃO SOBRE O APARELHO CARDIOVASCULAR	99
5.4.1. ELETROCARDIOGRAMA (ECG) E PRESSÃO ARTERIAL	99

5.4.2. CORAÇÃO ISOLADO	103
5.4.3. ÁTRIO ISOLADO	108
5.4.4. ANEL DE AORTA ISOLADO	111
5.4.5. FLUXO VASCULAR MESENTÉRICO	114
5.5. AÇÃO SOBRE O APARELHO RESPIRATÓRIO	116
5.5.1. MEDIDA DA RESISTÊNCIA TRAQUEOBRÔNQUICA <i>IN VIVO</i>	116
5.6. AÇÃO SOBRE O SISTEMA REPRODUTOR FEMININO E OS EVENTOS REPRODUTIVOS LIGADOS À MÃE E AO CONCEPTO	119
5.6.1. ATIVIDADE ESTROGÊNICA EM RATAS IMPÚBERES	119
5.6.2. ENSAIO EM CAMUNDONGAS PRENHES	121
6. DISCUSSÃO	139
6.1. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DO ÁCIDO CAURENÓICO SOBRE CÉLULAS NORMAIS E TUMORAIS, <i>IN VITRO</i> :	140
6.2. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÁCIDO CAURENÓICO NA TOXICIDADE AGUDA E SOBRE O SNC	145
6.3. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES DO ÁCIDO CAURENÓICO	146
6.4. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÁCIDO CAURENÓICO SOBRE O APARELHO RESPIRATÓRIO, <i>IN VIVO</i>	158
6.5. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÁCIDO CAURENÓICO SOBRE O SISTEMA REPRODUTOR FEMININO E SOBRE OS EVENTOS REPRODUTIVOS LIGADOS À MÃE E AO CONCEPTO	160
7. RESUMO DO PERFIL DE SEGURANÇA FARMACOLÓGICA DO ÁCIDO CAURENÓICO	173
8. CONCLUSÃO	175
9. REFERÊNCIAS	176

1. INTRODUÇÃO

1.1 GENERALIDADES

1.1.1 HISTÓRICO DA PESQUISA DE MEDICAMENTOS DERIVADOS DE PLANTAS E PERSPECTIVAS PARA O SÉCULO XXI

O uso de produtos extraídos de plantas para propósitos medicinais pode ser traçado desde o início da civilização e, até o fim do século XIX, os produtos naturais se constituíram como sua principal fonte de medicamentos (SEIDL, 2002). Até essa época, inúmeros autores compilaram tratados (como nas medicinas chinesa e ayurvédica) ou, simplesmente a informação foi passada oralmente, baseada em experiências, observações e valores de suas culturas (CORDELL, 2000).

Mesmo assim, passados séculos do uso de produtos naturais como medicamentos, foi somente em 1524 que Paracelsus escreveu sobre a necessidade de descobrir o componente ativo essencial, o “segredo” dos tratamentos. Ele dizia: *Não importa que Ruibarbo seja um purgante. A questão é: o quê purga? Nomes não são virtudes. Substâncias são.* (CORDELL, 2000).

A pesquisa dessas substâncias virtuosas iniciou-se em 1780 com o trabalho de Schele sobre ácidos orgânicos de plantas. No início do século XIX, a investigação de várias plantas medicinais renomadas levou à descoberta de significantes substâncias biologicamente ativas como a atropina, papaverina, codeína, estricnina, colchicina, cocaína, que se tornaram pedra angular de muitos aspectos da descoberta de novas drogas atualmente (CORDELL, 2000). A esta época, os expoentes maiores foram: aquele que pode ser considerado o primeiro produto natural puro comercial, a morfina, por E. Merck em 1826 e, a primeira droga semi-sintética pura baseada num produto natural, a aspirina, por Bayer em 1897. Esta, no mercado há mais de uma centena de anos (NEWMAN *et al*, 2000).

No século XX, o surgimento dos antibióticos produzidos por fermentação microbiana aliado ao desenvolvimento marcante dos fármacos sintéticos, a partir da Grande Guerra, foi a causa fundamental no declínio do uso de plantas medicinais e no investimento em fármacos de origem vegetal. Porém, nas últimas décadas, uma importante mudança no paradigma das

sociedades ocidentais fez com que os produtos de plantas passassem novamente a ocupar papel de destaque em grandes contingentes das populações de países desenvolvidos e em desenvolvimento (MONTANARI E BOLZANI, 2001).

Nesse contexto, a indústria farmacêutica motivada, em parte, pela descoberta de quimioterápicos eficazes como a vimblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®), podofilotoxina e os análogos do etoposídeo (VP-16-213, Vepeside®), e teniposídeo (VM-26, Vumon®), camptotecina e taxol (Paclitaxel, Taxol®), reativou o interesse pelos medicamentos de origem vegetal. Principalmente pela busca de substâncias com estruturas moleculares complexas (MONTANARI E BOLZANI, 2001).

Aliás, da perspectiva da descoberta de uma droga, dois fatores distinguem criticamente os produtos naturais dos produtos químicos sintéticos, a saber: a diversidade molecular e a funcionalidade biológica (NISBET E MOORE, 1997).

No tocante a estas características, a fantástica variedade e complexidade de metabólitos especiais de plantas teriam se formado e evoluído como um mecanismo de defesa dos vegetais às condições ambientais ricas em microorganismos, insetos, animais e também às condições de adaptação e regulação (REINBOTHE *et al*, 1990).

No contexto da evolução das plantas terrestres, estima-se que cerca de 500 mil espécies ocupam o planeta, sendo que 50% (250 mil) são constituídas por angiospermas (BRITO, 1986).

Importante ressaltar que, devido ao desenvolvimento de técnicas analíticas de separação e eluição estrutural, nas últimas três décadas, conhecem-se cerca de 50 mil metabólitos secundários. Muitos ainda sem qualquer avaliação do seu potencial farmacológico. Devido a tais constatações, os produtos naturais e derivados continuam sendo de importância crucial para o tratamento e prevenção de doenças na sociedade moderna, mesmo considerando-se o grande número de produtos produzidos por síntese química (NISBET E MOORE, 1997; MONTANARI E BOLZANI, 2001; RASKIN *et al*, 2002).

Os QUADROS 1 e 2 dispõem as categorias de produtos terapêuticos botânicos (1) e os mais importantes produtos farmacêuticos derivados de plantas (2) e suas projeções de vendas no ano de 2002.

Assim, mesmo no despontar do século XXI, das 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela Organização Mundial da Saúde (OMS), 11% são originadas exclusivamente de plantas superiores (RATES, 2001).

QUADRO 1: Categorias de produtos botânicos terapêuticos

Terapêutico	Descrição	Exemplos
Drogas (NCEs)	Principalmente princípios ativos originados de plantas	Vimblastina, taxol, aspirina
Drogas botânicas	Misturas fitoquímicas padronizadas e validadas clinicamente	Vários em processo de experimentação clínica
Suplementos dietéticos/nutracêuticos	Componente vegetal com benefícios à saúde	Alho ou extrato de <i>Echinaceae</i>
Alimentos funcionais/medicinais	Alimento modificado ou suplementado para fornecer benefícios à saúde	Óleo de canola saudável, arroz golden ou vacina oral
Proteínas recombinantes	Proteínas expressas e isoladas a partir de plantas	Nenhuma comercial, várias em processo de experimentação clínica

Fonte: RASKIN *et al*, 2002.

QUADRO 2: Produtos farmacêuticos de importância econômica, ou seus precursores derivados de plantas, e suas projeções de vendas em torno do mundo no ano de 2002 de acordo com os grupos estruturais aos quais pertencem.

Nome	Tipo	Fonte	Uso terapêutico
Alcalóides (US\$ 45 milhões)			
Atropina, hiosciamina, escopolamina	Alcalóide tropano	<i>Solanaceous sp</i>	anticolinérgico
Camptotecina	Alcalóide indólico	<i>Camptotheca acuminata</i>	antineoplásico
Capsaicina	fenilalquilamina	<i>Capsicum spp</i>	Analgésico tópico
Codeína, morfina	Opióide	<i>Papaver somniferum</i>	Analgésico
Cocaína	alcalóide	<i>Erythroxylum coca</i>	Anestésico local
colchicina	Isoquinolona	<i>Colchicum autumnale</i>	Terapia da gota
Emetina	Isoquinolona	<i>Cephaelis ipecacuanha</i>	Amebicida
galantamina	Isoquinolona	<i>Leucojum aestivum</i>	Inibidor da colinesterase
Nicotina	Pirrolidina	<i>Nicotiana spp</i>	Terapia antifumo
Fisostigmina	Alcalóide indólico	<i>Physostigma venenosum</i>	Colinérgico
Pilocarpina	Alcalóide imidazólico	<i>Pilocarpus jaborandi</i>	Colinérgico
Quinina	quinolona	<i>Cinchona spp</i>	Antimalárico
Quinidina	quinolona	<i>Cinchona spp</i>	Antiarrítmico
Reserpina	Alcalóide indólico	<i>Rauwolfia serpentina</i>	Antihipertensivo, psicotrópico
Tubocurarina	Bisbenzil isoquinolona	<i>Chondodendron tomentosum, Strychnos toxifera</i>	Relaxante muscular esquelético
Vimblastina, vincristina	Alcalóide biindólico	<i>Cantharantus roseus</i>	Antineoplásico
Ioimbina	Alcalóide indólico	<i>Pausinystalia yohimbe</i>	“Afrodisíaco”

(continuação do quadro 2)

Nome	Tipo	Fonte	Uso terapêutico
Terpenos e esteróis (US\$12.400 milhões)			
Artemisina	Lactona sesquiterpênica	<i>Artemisia annua</i>	Antimalárico
Diosgenin, Hecogenin, Estigmasterol	Esteróides	<i>Discorea spp.</i>	Contraceptivos orais e drogas hormonais
Taxol e outros taxóides	diterpenos	<i>Taxus brevifolia</i>	antineoplásico
Glicosídeos (US\$ 9.230 milhões)			
Digoxina, digitoxina	Glicosídeos esteroidais	<i>Digitalis sp.</i>	cardiotônicos
Senosídeos A e B	Glicosídeos hidroxi-antracenos	<i>Cássia angustifolia</i>	laxantes
Outros e misturas (US\$ 5.014 milhões)			
Ipeca	Mistura de alcalóides da ipeca e outros componentes	<i>Cephaelis ipecacuanha</i>	emético
Podofilotoxina	Lignan	<i>Podophyllum peltatum</i>	antineoplásico

Fonte: RASKIN *et al*, 2002.

No Brasil, neste início de novo século, as pesquisas com plantas ainda estão muito centradas no âmbito da Universidade e institutos de pesquisa. Apesar disso, a academia pode contribuir de forma decisiva para o descobrimento de novas substâncias. Talvez esse seja o seu papel; exatamente porque essa etapa da pesquisa demanda muito tempo, e pode envolver a qualificação de recursos humanos (MONTANARI E BOLZANI, 2001).

Como o programa de descoberta de novos fármacos é um processo longo, complexo e de alto custo e, considerando-se que o mesmo envolve duas etapas distintas: a fase de descoberta, e a fase do desenvolvimento e comercialização, não há dúvida que a competência científica nacional está qualificada para atuar na primeira fase do processo; e com sucesso.

Além disso, o Brasil sendo um país detentor de uma biodiversidade fantástica (como maior repositório de angiospermas do planeta), tem em princípio, as condições básicas para começar a estruturar um programa nacional de bioprospecção em busca de novas entidades químicas (NCEs) (MOINTANARI E BOLZANI, 2001). Este é um processo multidisciplinar e qualquer pesquisa com compostos naturais farmacologicamente ativos depende do envolvimento e integração de ciências básicas como Botânica, Química e Farmacologia, incluindo a Toxicologia (RATES, 2001). Neste último caso, de modo a determinar as bases da segurança de seu uso pelo homem.

1.1.2. PESQUISA DE NOVAS SUBSTÂNCIAS DERIVADAS DE PLANTAS: TOXICOLOGIA E SEGURANÇA FARMACOLÓGICA.

No que concerne às drogas originadas de plantas, é importante ter em mente certas distinções conceituais. Plantas podem ser usadas como fontes terapêuticas de várias formas. De acordo com a OMS elas podem ser usadas como chás ou outros remédios caseiros, quando são consideradas plantas medicinais. Elas podem ser usadas como extratos crus ou “frações enriquecidas” em preparações farmacêuticas, tais como tinturas, extratos fluidos, pós, pílulas e cápsulas, quando são consideradas preparações fitofarmacêuticas (fitoterápicos) ou medicina herbal. Assim, a diferença entre planta e fitoterápico reside na elaboração da planta para uma formulação específica, o que caracteriza um fitoterápico. E, finalmente, podem estar sujeitas a sucessivos processos de extração e purificação para isolar compostos de interesse, que podem eles próprios ser usados diretamente como uma droga (por exemplo, quinina, digoxina e ergotamina), ou eles podem ser usados como precursores (p.ex. diosgenin) em processos semi-sintéticos, ou como modelos para a síntese total com atividade farmacológica ou estudos da relação estrutura-atividade bem definidos, determinando uma droga-protótipo (RATES, 2001; VEIGA JR *et al*, 2005).

No caso da pesquisa de substâncias puras extraídas de plantas, uma vez identificadas botanicamente, o material bruto extraído e analisado por cromatografia, é (são) purificado(s) seu(s) composto(s) de interesse e determinada(s) sua(s) estrutura(s) por espectroscopia (UV, IR, espectro de massa ou RMN). Assim, após seu isolamento, estes estão sujeitos aos bioensaios e avaliação toxicológica em animais (FIGURA 1).

Os bioensaios podem ser realizados usando microorganismos, moluscos, insetos, sistemas celulares (enzimas, receptores), cultura de células (animais e humanas) e órgãos isolados ou *in vivo* (mamíferos, anfíbios, pássaros etc) (HAMBURGER *et al*, 1996).

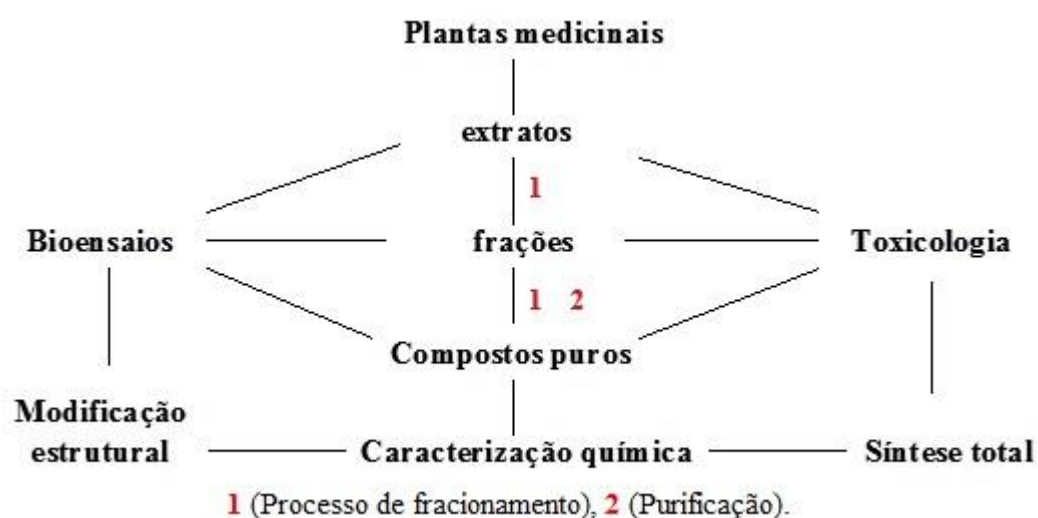


FIGURA 1: Métodos para obtenção de substâncias ativas de plantas (RATES, 2001).

1.1.3. TESTES COM PRODUTOS BOTÂNICOS E DERIVADOS (RENUNCIAR OU ADERIR ÀS DIRETRIZES DO ICH?):

Com relação aos aspectos toxicológicos não-clínicos de drogas derivadas de plantas, as agências reguladoras devem frequentemente fazer inquéritos sobre as questões relacionadas à necessidade de vários tipos de estudos de toxicidade em suporte do registro de um potencial Novo Fármaco.

A política com relação à experiência clínica de produtos botânicos é a única na qual frequentemente as exigências dos estudos toxicológicos animais são reduzidas antes de promover testes iniciais em humanos (WU *et al*, 2000). Porque os produtos derivados de plantas têm uso histórico ou estão disponíveis em suplementos alimentares comercializados, a “experiência humana prévia” no uso desses produtos possui uma importante função na oferta de evidência de segurança para a realização posterior dos experimentos clínicos iniciais (WU *et al*, 2000). Dessa forma, a divisão de medicina tradicional da OMS reconhece que o uso secular de certas plantas como fontes terapêuticas deve ser considerado como prova de sua eficácia (GILBERT *et al*, 1997).

Por outro lado, quando a formulação botânica é preparada através de modernos métodos de extração, é útil ter informação sobre a equivalência do produto proposto com relação àquele usado tradicional ou historicamente em termos de quantidade diária e dose recomendada (WU *et al*, 2004). Até porque, muitas vezes, ela é empregada para fins medicinais diferentes daqueles usados pelos silvícolas, por exemplo (VEIGA JR *et al*, 2005). Esta informação pode ajudar a atenuar os cuidados para a segurança de pacientes humanos com relação à relevância da “experiência humana prévia”. Importante também é notar que frases tais como “*o produto natural é (virtualmente) não-tóxico*” são frequentemente usadas na apresentação de um Novo Fármaco Experimental (NCE) (WU *et al*, 2004). Comparada com a dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade de plantas medicinais pode parecer trivial. Isto, entretanto, não é verdade. A toxicidade de plantas medicinais é um problema sério de saúde pública. Os efeitos adversos dos fitomedicamentos, possíveis adulterações e toxidez, bem como a ação sinérgica (interação com outras drogas) ocorre comumente (VEIGA JR *et al*, 2005). Admitindo que a toxicidade é só um termo relativo, doses suficientemente altas e uma longa duração de tratamento, sem dúvida produziriam efeitos colaterais ou tóxicos definitivos. Realisticamente, um claro perfil tóxico e

a identificação dos órgãos-alvo da toxicidade em animais são tão úteis para a avaliação do risco e predição dos eventos adversos do produto botânico, quanto o mesmo ser testado rigorosamente em humanos (WU *et al*, 2004).

Para que se chegue a excelência na qualidade desses produtos naturais, é necessário aos mesmos, dados de suporte às futuras experiências clínicas avançadas na submissão do que se chama de Novos Fármacos Experimentais ou de Novos Fármacos através da adesão às diretrizes das agências de controle e da Conferência Internacional em Padronização de Técnicas (ICH) requeridas para o registro de fármacos para uso humano, para cada estudo toxicológico (WU *et al*, 2004). Dessa forma, guiada por essas diretrizes, finalizadas em 2000, a avaliação de drogas experimentais em animais, para determinar seus efeitos em sistemas/órgãos críticos, permite a identificação de sinais funcionais de eficácia e segurança que podem ser posteriormente monitorados por ocasião dos testes em humanos (KINTER E VALENTIN, 2002). Portanto, a completa aceitação de drogas derivadas de plantas e fitoterápicos na medicina científica e sistemas de saúde ocidentais só pode realmente ocorrer se estes produtos satisfizerem os mesmos critérios de eficácia, segurança e controle de qualidade como os produtos sintéticos (CARCERES E GIRON, 1997; WAGNER, 1997).

Finalmente, os avanços em tecnologia e conhecimento de produtos naturais devem ser vistos não meramente da perspectiva do desenvolvimento de drogas, mas também como uma ferramenta especial para o conhecimento do fenômeno biológico, de modo a contribuir para o bem-estar da humanidade (RATES, 2001).

1.1.4. NECESSIDADE DE INTEGRAÇÃO DOS PRINCÍPIOS DA SEGURANÇA FARMACOLÓGICA NOS ESTUDOS DE TOXICOLOGIA ANIMAL.

Ao conjunto de estudos que investigam os efeitos farmacodinâmicos potencialmente indesejáveis de uma substância sobre as funções fisiológicas em relação à exposição em um limite terapêutico ou superior, chama-se Segurança Farmacológica (CLAUDE E CLAUDE, 2004).

A Segurança Farmacológica e a Toxicologia fornecem dados para a avaliação de risco dos efeitos adversos de novas drogas para o uso humano. Contudo, há poucas análises comparativas sobre as drogas em animais e humanos (BODE E LUFT, 2002).

No *workshop* (abril, 1999) do Instituto Internacional de Ciências da Vida (ILSI) foi apresentado um estudo realizado em conjunto com 12 indústrias farmacêuticas que forneceram seu *pool* de dados sobre toxicidade pré-clínica de drogas em desenvolvimento. O princípio desse projeto foi examinar os pontos fortes e as falhas dos estudos animais em prever a toxicidade humana. Os dados foram compilados a partir de 150 compostos com 221 eventos de toxicidade humana relatados, sendo múltiplos relatos em 47 casos. Os resultados mostraram uma correlação positiva para a toxicidade humana de 71% em roedores e não-roedores, com os não-roedores sendo preditivos em 63% e os roedores em 43% das toxicidades humanas (BODE E LUFT, 2002; OLSON *et al*, 2000; BRIMBLECOMBE, 1990).

Como os resultados indicaram que estudos de toxicidade em roedores e não-roedores, ainda que cobrindo uma grande proporção de acertos, foram falhos numa proporção significativa de toxicidades (BODE E LUFT, 2002), faz-se necessária uma abordagem multidisciplinar dos dados, de modo a ampliar/complementar esse estudo (LI, 2004).

De acordo com o conceito de pesquisa e desenvolvimento, a Farmacologia (devotada à descoberta das drogas) é a principal parte da pesquisa e, a Toxicologia (avaliação de segurança) é a parte do desenvolvimento de estratégia. Contudo, de acordo com o novo conceito de Desenvolvimento Integrado de Drogas (IDD), esta barreira artificial é agora obsoleta. As novas ferramentas de pesquisa de Novas Entidades Químicas (NCEs) aplicam ambas, Farmacologia e Toxicologia, com relação à eficácia e segurança. E é o novo conceito

de Segurança Farmacológica que vem integrar a avaliação não-clínica de novas substâncias aos seus estudos toxicológicos (CLAUDE E CLAUDE, 2004).

O ICH, nas suas diretrizes S7A e S7B, delinea as naturezas desses estudos, métodos pré-clínicos e condições experimentais sob as quais tais estudos devem ser conduzidos (PUGSLEY, 2004). De acordo com a diretriz S7A do ICH a Segurança Farmacológica pode ser aplicada nas seguintes situações ou níveis de investigação:

1) Como parte dos estudos da “Bateria Central” (*Core Battery*), núcleo da pesquisa que se dá sobre o sistema nervoso central (SNC), cardiovascular e respiratório, caracterizando a droga nos mesmos;

2) Na continuidade da pesquisa com os estudos suplementares (outros sistemas vitais como o sistema gastrointestinal e renal) e complementares (na investigação dos mecanismos ligados aos efeitos observados);

3) Como parte dos estudos de Toxicologia animal.

Estes são estudos necessários na seleção de candidatos a fármacos e na oferta de um perfil de segurança para os estudos clínicos posteriores (SPINDLER E SEILER, 2002; BASS *et al*, 2004).

O ICH S7A permite a utilização de ambas, técnicas *in vivo* e *in vitro*, sempre que apropriadas. A introdução das técnicas *in vitro* deve ser considerada nos estágios precoces de avaliação da Segurança Farmacológica. Entre os fatores que motivam seu uso estão: expandir a escala dos tipos de estudo e dos parâmetros que serão avaliados, fornecer dados prévios embasando a avaliação de risco para os estágios posteriores de testes e reduzir o tempo despendido com a pesquisa de um composto novo, com a predição crescente que têm obtido os testes *in vitro*, e a aplicação das três regras de bem-estar animal (redução, substituição e refinamento) (WAKEFIELD *et al*, 2002).

Dentro da Bateria Central de avaliação das funções dos órgãos vitais, para o SNC o ICH S7A recomenda que a *atividade motora, mudanças comportamentais, coordenação, respostas reflexas sensoriais/motoras e temperatura corporal devam ser avaliadas, e que testes como os*

da Bateria de Observações Funcionais (FOB), teste modificado de Irwin, ou outros testes apropriados podem ser usados. Observações comportamentais podem ser ferramentas úteis para avaliar a neurotoxicidade. A FOB, por exemplo, é uma avaliação sistemática da função do SNC que compreende mais de 30 parâmetros, cobrindo o domínio autonômico, neuromuscular, sensorimotor e comportamental, que podem ajudar a avaliar compostos os quais se intenciona uso terapêutico em afecções outras que não aquelas envolvendo o sistema nervoso (BODE E LUFT, 2002; REDFERN *et al*, 2005). Assim, os procedimentos da Bateria Central do SNC são tipicamente testes simples que se utilizam técnicas tradicionais, e que podem ser realizados de forma rápida e rotineira (PORSOLT *et al*, 2002).

Dessa forma, a diretriz S7A do ICH dá importância à integração dos princípios da Segurança Farmacológica nos estudos de Toxicologia pré-clínica e clínica, discute vantagens e desvantagens na integração dos procedimentos, e permite aos estudos de toxicidade animal aumentar sua preditividade para a toxicidade humana. As diretrizes do ICH intencionam também sugerir flexibilidade no que concerne à integração dos princípios da Segurança Farmacológica dentro dos estudos de Toxicologia (BODE E LUFT, 2002).

A complementação à diretriz S7A do ICH veio com a diretriz S7B, que descreve a necessidade dos estudos de avaliação do potencial pró-arrítmico das drogas através da observação do prolongamento do intervalo QT no eletrocardiograma (ECG). A explicação para essa necessidade é que, nas últimas décadas, vários medicamentos com indicação para outros sistemas que não necessariamente o cardiovascular têm produzido numerosos eventos adversos inesperados nesse sistema.

A inespecificidade farmacológica de muitas moléculas em induzir a forma de taquicardia ventricular conhecida como *Torsades de pointes* (TdP) tornou-se o principal foco na identificação e desenvolvimento de fármacos. Devido a potencial fatalidade da TdP, é claramente desejável identificar o risco de compostos associados com essa arritmia. E o prolongamento do intervalo QT do ECG parece ser preditivo do risco de TdP (WALKER, 2004). Assim, das inúmeras drogas que prolongam o intervalo QT (repolarização ventricular), algumas são retiradas do mercado, outras são usadas com restrições, ou a pesquisa e desenvolvimento acabam sendo abortados, devido a suspeita de cardiotoxicidade (DE PONTI *et al*, 2000).

O prolongamento do intervalo QT é causado pelo prolongamento da duração do potencial de ação (APD), dos miócitos ventriculares, originado pela redução da corrente iônica para fora e/ou aumento da corrente para dentro (BODE E LUFT, 2002). Evidências disponíveis indicam que o bloqueio dos canais de potássio tipo hERG é um fator de risco (provavelmente o principal) na indução de TdP por drogas. Estes canais hERG geram a chamada corrente rápida I_{Kr} (REDFERN *et al*, 2003; NETZER *et al*, 2001), que juntamente com a corrente lenta I_{Ks} (mediada pelos canais de potássio tipo MinK), são as duas correntes retificadoras tardias de potássio dependentes de voltagem responsáveis pela repolarização cardíaca que possuem função mais importante na regulação do intervalo QT (NETZER *et al*, 2001).

1.1.5. TOXICIDADE REPRODUTIVA

Embora a humanidade tenha sempre se preocupado com o nascimento de indivíduos malformados, esse fato veio sendo relatado através da história associado às lendas, às intervenções ora satânicas, ora divinas ou à hibridização das espécies. O conceito era considerado como um ser protegido pelo útero materno e a placenta, uma barreira inviolável aos agentes externos.

O primeiro relato experimental de caráter científico que correlacionou fatores externos às malformações se deu na metade do século XVIII, quando Etienne e Isidore Goeffroy St. Hylaire submeteram ovos de galinha embrionados a variações de temperatura e obtiveram diversos graus de malformações. Entretanto, foi nas décadas de 30 e 40, nas escolas de Giroud na França e Warkany nos EUA que, em experimentos realizados com embriões de mamíferos foi demonstrado que a administração de substâncias químicas exógenas às fêmeas durante a gestação podia levar a importantes alterações no desenvolvimento embrionário.

Contudo, o desenvolvimento da Teratologia como ramo da pesquisa científica se deu nos últimos 50-60 anos, estimulado por dois acontecimentos distintos:

- 1) Nos anos 40, uma epidemia de rubéola na Áustria tornou evidente a incidência de malformações em crianças cujas mães foram infectadas pelo vírus nos três primeiros meses de gestação e;

2) Nos anos 60, a tragédia da talidomida, introduzida no mercado como sedativa e hipnótica, e utilizada para diminuir a náusea e o vômito durante a gestação, levou ao nascimento de crianças malformadas principalmente na Alemanha e na Inglaterra, e impôs a Teratologia como uma ciência de fundamental importância diante da opinião pública.

Pela primeira vez foi possível associar de maneira inequívoca a malformação no homem com um fator exógeno determinante, pois as malformações produzidas pela talidomida eram severas e provocaram alterações bem características nos membros (focomelia), que puderam ser reconhecidas imediatamente (LEMONICA, 1996).

Portanto, a necessidade de testar agentes químicos para seu potencial em induzir efeitos teratogênicos levou ao estabelecimento de protocolos padronizados em Teratologia, que envolvem a exposição de fêmeas grávidas aos agentes exógenos durante o período embrionário da organogênese e o subsequente exame dos fetos para anomalias dos órgãos e esqueleto (CHERNOFF E KAVLOCK, 1982).

Ainda assim, acerca do uso de produtos naturais, pouco ou nenhum teste de segurança e teratogenicidade potencial tem sido realizado com preparações derivadas de plantas (LEPK, 1997) porque os fitoterápicos não costumam estar sujeitos às mesmas regulações.

Contudo, diversos estudos têm mostrado que o uso desses produtos tem se tornado cada vez mais prevalente entre as culturas ocidentais (ASTIN, 1998; EISENBERG *et al*, 1993; MacLENNAN *et al*, 1996). Estima-se que acima de 40% da população geral use terapias com produtos derivados de plantas, sendo que a grande maioria desses consumidores é mulher. Adicionalmente, 70% dos usuários da fitoterapia se autodiagnosticam e automedicam (MacLENNAN *et al*, 1996; ASTIN, 1998). O fato é de extrema importância, como já anteriormente dito, porque produtos derivados de plantas são freqüentemente percebidos como mais seguros que a medicina prescrita. Um exemplo disso é que, estudos recentes, realizados com ratas grávidas, apontaram o efeito colateral abortivo da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*), planta medicinal de comprovada baixa toxicidade (OLIVEIRA *et al*, 1991) e ação anti-ulcerogênica (SOUZA-FORMIGONI, *et al*, 1991; JORGE *et al*, 2004), antiinflamatória e antinociceptiva (JORGE *et al*, 2004). Extratos hidroalcólicos dessa planta mostraram-se abortivos por atuarem no período de pré-implantação dos embriões no útero (MONTANARI E BEVILÁQUA, 2002). Outro exemplo é o da mulher que, durante a

gestação, cessa o uso de antidepressivos sintéticos prescritos e passa a usar erva de são joão em vez disso, mas sem consulta médica (GRUSH *et al*, 1998).

Na verdade, pouco é conhecido acerca do potencial teratogênico da maioria das drogas. Assim, é mais difícil provar que uma droga não é teratogênica do que provar que ela é (LEMONICA, 1996; MILLS, 1995; SHEPARD, 1989).

Um aspecto muito importante a ser levado em conta é a existência de fatores não embrionários e outros fatores estritamente embrionários (WILSON, 1965), de modo que, durante o período de gestação, a exposição materna a um agente químico tóxico pode levar a respostas diversas e seu efeito final pode variar desde a morte até o nascimento de um indivíduo normal (LEMONICA, 1996).

Em linhas gerais, os fatores extraembrionários são:

1) Um dado agente e o seu grau de especificidade na produção das malformações que, não necessariamente, têm correlação com um mecanismo de ação conhecido, podendo estar relacionado a eventos metabólicos que se desenrolam durante o desenvolvimento de um dado órgão afetado;

2) A importância da dose onde, mesmo para uma droga reconhecidamente embriotóxica/teratogênica, há um limite abaixo do qual há desenvolvimento normal, e outro a partir do qual há morte embrionária e materna; a zona entre estas, considerada teratogênica, suficiente para interferir com eventos específicos do desenvolvimento sem destruir completamente o embrião. Vale ressaltar que a dose teratogênica está inseparavelmente correlacionada com a idade do embrião. Ou seja, uma dose X, dependendo do período gestacional, pode levar ao aparecimento de uma dada malformação ou nenhum efeito, ou mesmo a morte. Naturalmente, nem sempre se atinge o nível teratogênico de uma substância. Existem substâncias que podem levar à morte materna sem efeito para o conceito. Outras, altamente embriofetotóxicas, com mínima elevação da dose teratogênica levam à letalidade deste conceito.

3) Como nos mamíferos o organismo materno é o ambiente físico do embrião/feto e sua fonte de metabólitos para manutenção e desenvolvimento, o estado fisiológico da mãe é de

considerável importância para o mesmo; assim como, as trocas mãe/conceito através da placenta (LEMONICA, 1996; WILSON, 1965).

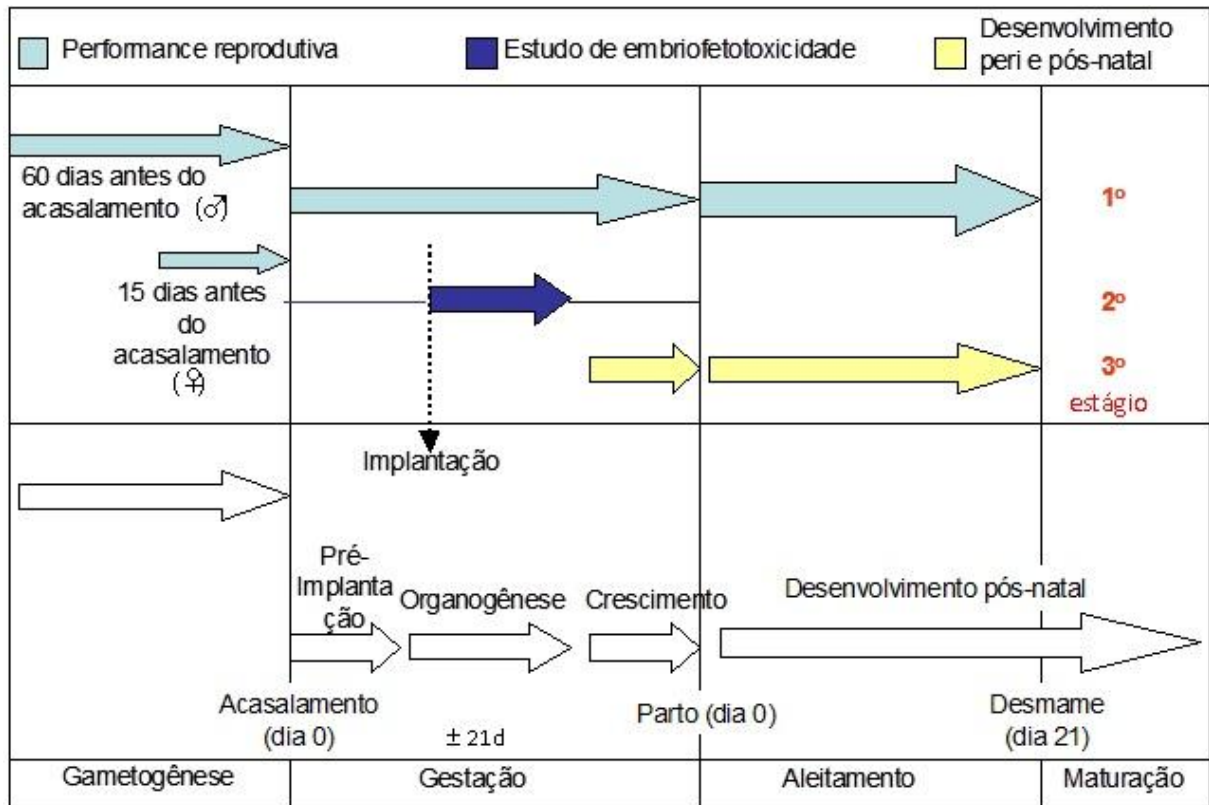
Com relação às considerações estritamente embrionárias, estas são:

1) O genótipo, que determina a susceptibilidade inerente do embrião a um dado agente em um determinado estágio de desenvolvimento e;

2) O estágio de desenvolvimento do embrião; o período sobre o qual um agente está incidindo determina quais tecidos são susceptíveis a teratogênese. E esta susceptibilidade varia grandemente durante o curso da gestação (LEMONICA, 1996; WILSON, 1965).

Atualmente, as diretrizes publicadas pelas agências regulatórias para os testes em toxicidade reprodutiva intencionam a detecção primária dessas influências tóxicas sobre a reprodução. Portanto, todas as avaliações regulatórias de drogas na toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento são agora realizadas de acordo com a diretriz S5A do ICH, de 1994, intitulada “Detecção de toxicidade dos produtos medicinais para reprodução” (BARROW, 2000; HENK *et al*, 1996).

Assim, as agências normativas dividem os protocolos para a pesquisa em toxicologia reprodutiva em três segmentos ou etapas de desenvolvimento. O primeiro estágio compreende a produção dos gametas paternos (os animais são expostos às drogas antes do acasalamento), o segundo estágio engloba o período de embriogênese e fetogênese (é onde há o teste de teratogenicidade propriamente dito), oferecendo a idéia da embriofetotoxicidade da droga em estudo e, o terceiro estágio é o do desenvolvimento pós-natal (exposição durante o período fetal e de aleitamento), e objetiva avaliar as crias buscando possíveis lesões funcionais (LEMONICA, 1996) (FIGURA 2).



Fonte: LEMONICA, 1996

FIGURA 2: Períodos de tratamento para testes de toxicidade reprodutiva em ratos e camundongos.

1.2. *Copaifera langsdorffii* DESF: DESCRIÇÃO BOTÂNICA, FITOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA.

A Copaibeira (nome genérico dado às várias espécies da *Copaifera* Linn, família Leguminosae, espalhadas por todas as regiões tropicais do planeta) possui como espécies principais a *C. reticulata* Ducke, a *C. officinalis* L., e a *C. langsdorffii* Desf, e fornece um óleo-resina conhecido como bálsamo ou óleo de copaíba, que tem sido utilizado há vários séculos pelos índios brasileiros com inúmeras propriedades a ele atribuídas (DEL NUNZIO, 1995). Este óleo é o resultado da decomposição celular no interior do tronco da árvore, onde o mesmo se acumula.

No Brasil, a espécie *C. langsdorffii* Desf é particularmente importante por estar distribuída por todo o território nacional e por possuir quatro variedades: grandifolia, grandiflora, laxa e glabra (LEITE, 1993).

A *C. langsdorffii* Desf. (FIGURA 3) é uma árvore frondosa, que atinge entre 2 e 13 metros de altura, de casca vermelho–escura e profundamente sulcada, folhas pinatífidas, com folíolos alternados ou opostos, ovado– lanceolados ou elípticos, obtusos, de 5cm de comprimento e 3cm de largura, pelúcido–puntuados, glabros; flores brancas, às vezes rosáceas, em ramos de 5 a 16 dispostos em panículas terminais; frutos vagem–drupácea, pedunculados e ovóides, com uma semente (PIO CORREA, 1984).

O óleo–resina de Copaíba, líquido viscoso e transparente, possui uma variação de cores que vai do amarelo–pálido ao castanho–claro dourado, podendo ser incolor. Seu cheiro é forte e penetrante, e seu sabor acre e um pouco amargo (PIO CORREA, 1984). Ele é constituído por uma parte sólida (55 – 60% de seu peso) composta por terpenos, diferentes ésteres e resinóides, e uma parte volátil (40 – 50%) composta por uma mistura de óleos essenciais (DEL NUNZIO, 1995).

As utilizações da medicina popular para o óleo de copaíba são inúmeras. Em relatos portugueses sobre o Brasil, datados do século XVI, o povo indígena já utilizava o óleo de copaíba para untar os corpos dos guerreiros feridos e como base para suas pinturas corporais, e sua introdução na Europa como uma droga para o tratamento da blenorreia foi mencionada no século seguinte (OSOL E FARRAR, 1955).

Ainda, a população usa o óleo de copaíba como agente anti-séptico e antiinflamatório para a cicatrização de feridas e úlceras, especialmente no tratamento de infecções das vias urinárias (que causem cistites, incontinência urinária), no tratamento da sífilis e da gonorréia (BRUNETON, 1987; CRUZ, 1965; FONSECA, 1939; LEWIS, 1977), doenças pulmonares (contra asma, bronquite e sinusite), como expectorante, nas inflamações da garganta (BARROS, 1982; BRUNETON, 1993; VIEIRA, 1992; FERREIRA, 1980) e diurético (DEL NUNZIO, 1995; VEIGA JR ET AL, 1997; CASCON E GILBERT, 2000). Outros usos populares citados são: como afrodisíaco (RIBEIRO, 1971), Antitetânico (VIEIRA, 1992), anti-reumático (MATOS, 1997) e antiherpético (VIEIRA, 1992).

A indústria de cosméticos também tem feito uso do óleo de copaíba como base para produtos de higiene (sabonetes, espumas para banho, xampus), na cosmética ativa (cremes e loções), além do seu óleo essencial ser um excelente fixador para a perfumaria (DEL NÚNZIO, 1995; DEL CASTILHO, 1993).

Estudos realizados com óleos de copaíba obtidos de todo o Brasil mostraram que esses óleos são misturas de sesquiterpenos e diterpenos. As concentrações e a natureza dos sesquiterpenos e diterpenos podem variar, mas estas duas classes de produtos naturais, e mais nenhuma outra, devem estar sempre presentes nos óleos de copaíba (VEIGA JR, 2004).

Com relação às diferenças na composição dos óleos de copaíba nas diferentes espécies encontradas, um estudo comparativo entre os óleos-resinas das espécies *C. guianensis* Desf., *C. duckei* Dwyer e *C. multijuga* Haine detectou a presença de β -cariofileno e α -bergamoteno. No óleo da *C. multijuga* está presente α -copaeno e δ -cardineno. Na *C. duckei* foi encontrado predominantemente ácido poliáltico e β -selineno, além de α -selineno e β -bisaboleno, e a *C. guianensis* mostrou a presença dos ácidos caur-16-en-19-oico, cauran-19-oico e poliáltico (CASCON E GILBERT, 2000).

O estudo fitoquímico do óleo da *C. langsdorffii* e *C. multijuga* por Veiga Jr et al (1997) detectou a presença de 56 ácidos carboxílicos diterpenos sendo que 15 destes, à época, eram estruturalmente novos. Um estudo realizado por Monti et al (1999) identificou um potente diterpeno nor-clerodano com atividade antitumoral, o colavenol, além da presença de 9,10-anti-copalol e um novo diterpeno, (-)-15,16-dinorlabd-8(17)-en-3 β ,13-diol. No óleo da *C.*

cearensis (muito semelhante à *C. langsdorffii*), foram identificados delta-copaeno, β -cariofileno, α -humuleno, β -bisaboleno, β -farnaseno, delta-cardileno e o ácido copálico (FERNANDES *et al*, 1992). No estudo realizado por Gramosa *et al* (1996) no óleo-resina da *C. langsdorffii* foi revelada a presença de 8% na forma de óleos essenciais (β -cariofileno, β -elemeno, α -cis-bergamoteno) e uma mistura de 70% de diterpenos (principalmente ácidos caur-16-en-19-oico e poliáltico).

Seguindo com os estudos a respeito das atividades atribuídas ao óleo de copaíba, e cujas principais pesquisas recaem sobre sua atividade antiinflamatória, pode ser citado: para o óleo da *C. langsdorffii*, atividade bactericida (MARUZELLA E SICURELLA, 1960), antihelmíntica (PELLEGRINO, 1967; GILBERT *et al*, 1972), tripanocida (CASCON *et al*, 1998), analgésica (FERNANDES E PEREIRA, 1989), antitumoral, contra carcinoma IMC *in vitro* (OHSAKI *et al*, 1994), melanoma B16F10 e sua metástase pulmonar, *in vivo*, em camundongos e, *in vitro*, demonstrado pelos ensaios com azul de trypan e MTT (LIMA *et al*, 2003).

Em modelos de lesão gástrica induzida por etanol, indometacina e estresse por restrição e frio, mostrou atividade gastroprotetora, com aumento da produção de muco e propriedades anti-secretórias ácidas (PAIVA *et al*, 1998). Além disso, foi capaz de prevenir as lesões teciduais associadas à isquemia-reperfusão intestinal em ratos, o que foi observado pela redução da atividade da enzima mieloperoxidase (marcador da infiltração neutrofílica), do malonaldeído (produto final indicador da peroxidação lipídica) e da quantidade de nitrito formado (marcador da produção de óxido nítrico), e aumento dos níveis de catalase e glutatona (antioxidantes) (PAIVA *et al*, 2004a).

Da mesma forma, esse óleo-resina teve efeito protetor no modelo animal de colite aguda, possivelmente através de uma atividade antioxidante e/ou mecanismo antilipoperoxidativo (PAIVA *et al*, 2004b). Ele também apresentou efeito cicatrizante quando aplicado sobre ferida induzida no dorso de ratos, sendo capaz de aumentar a contração da ferida e a resistência à tensão, indicativo de ação na formação de fibras colágenas e aceleração do reparo, respectivamente (PAIVA *et al*, 2002).

O óleo de *C. duckei* mostrou atividade antiproliferativa celular dos hepatócitos, quando realizada hepatectomia em ratos, por reduzir o controle sobre a cadeia respiratória, o que é indicado pela capacidade do óleo de desacoplar a fosforilação oxidativa na mitocôndria (CASTRO-E-SILVA *et al*, 2004).

No caso de algumas amostras comerciais de óleo de copaíba, as que não apresentaram adulteração quando avaliadas mostraram atividade antiedematogênica em edema induzido por bradicinina ou carragenina na pata de rato (VEIGA JR *et al*, 2001).

No controle de qualidade que detecta adulterações, um aspecto importante no estudo de plantas medicinais e seus produtos, que são comercializados como fitoterápicos, é a identificação dos princípios ativos responsáveis por sua ação biológica (MACIEL *et al*, 2002). A identificação do(s) princípio(s) fornece o conhecimento básico da eficácia da planta e, em alguns casos a toxicidade, de um medicamento fitoterápico tradicional (FENNEL *et al*, 2004). Contudo, os inúmeros estudos, relatados na literatura convencional ou científica, ainda resultam em conclusões incompletas e comumente contraditórias quanto à determinação do agente terapêutico no óleo de copaíba. Porém, motivados pela pressão regulatória para se desenvolver produtos dentro de estritos padrões sanitários, alguns esforços têm sido despendidos na tentativa de relacionar as diversas atividades farmacológicas do óleo de copaíba com sua constituição química. (TAPPIN *et al*, 2004).

E comumente os óleos comerciais de copaíba têm sido sujeitos a adulterações na própria origem, pela mistura com outros óleos. Um produto para o mercado de fitomedicamentos, com base no óleo de copaíba, portanto, deve garantir a reprodutibilidade da eficácia dentro do lote utilizado industrialmente. Como os testes de eficácia implicam em um inexequível controle biológico torna-se, portanto, necessário que a este lote seja anexado um laudo sobre a composição química mínima para que o efeito desejado seja mantido. Nesta relação entre perfil químico e ensaios farmacológicos repousa a confiança do consumidor na eficácia do produto. Em todo esse contexto, a caracterização qualitativa e quantitativa dos componentes do óleo de copaíba seria uma ferramenta apropriada à identificação e origem das diferentes espécies botânicas de copaibeiras, podendo ser também modelada para aplicar-se ao controle de qualidade dos óleos ainda no estágio inicial de comercialização (TAPPIN *et al*, 2004).

No Brasil, resoluções recentes da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), de 16 de março de 2004 visam a normatização do registro de medicamentos fitoterápicos. A resolução-RDC número 48 determina exatamente essas necessidades supracitadas, para todos os testes referentes ao controle de qualidade de fitoterápicos. A base principal da legislação é a garantia da qualidade do medicamento para o consumidor. Para tanto, o regulamento exige a reprodutibilidade dos fitoterápicos fabricados. Isso significa que todos os lotes desses medicamentos deverão ser produzidos com a mesma quantidade de um conjunto de moléculas denominado marcador (biomarcador). As exigências também incluem perfis cromatográficos e resultados de prospecção fitoquímica, além de comprovação de segurança de uso, incluindo estudos de toxicidade pré-clínica. Outras resoluções da mesma data fornecem as referências bibliográficas para a avaliação de segurança e eficácia dos fitoterápicos (número 88) e tratam de detalhes para a realização de estudos de toxicidade (número 90) (ANVISA, 2004; VEIGA JR E PINTO, 2005).



FIGURA 3: *Copaifera langsdorffii* Desf. (foto: professor Edilberto da Rocha Silveira)

1.3. TERPENOS

Os terpenos (ou terpenóides) constituem a maior família de produtos naturais derivados de plantas com mais de 30 mil membros (SACCHETTINI E POULTER, 1997; DEWICK, 2002). Eles podem ser de cadeias cíclicas ou acíclicas, e são classificados por suas séries homólogas de unidades isoprênicas de cinco carbonos na sua estrutura em: hemiterpenos (C_5 ; 1 unidade isoprênica), monoterpenos (C_{10} ; 2 unidades), sesquiterpenos (C_{15} ; 3 unidades), diterpenos (C_{20} ; 4 unidades), sesterpenos (C_{25} ; 5 unidades), triterpenos (C_{30} ; 6 unidades), tetraterpenos (C_{40} ; 8 unidades), politerpenos ($(C_5)_n$, onde n pode ser de 9 a 30 mil (McGARVEY E CROTEAU, 1995; DUBEY *et al*, 2003; WATKINS *et al*, 2006)

Eles são encontrados na natureza e ocorrem em quase todas as plantas, como metabólitos secundários e são essenciais ao seu crescimento, desenvolvimento e sobrevivência. Estes metabólitos desempenham suas atividades biológicas específicas como toxinas de defesa, sinais defensivos voláteis, atrativos polinizantes e fotoprotetores, e têm sido explorados desde a antiguidade como constituintes de perfumes, agentes flavorizantes, materiais impermeabilizantes, repelentes de insetos, fungicidas e produtos medicinais, devido à descoberta de suas atividades farmacológicas. Alguns exemplos se encontram na TABELA 1.

TABELA 1: Exemplos de terpenos extraídos de vegetais superiores e seus usos tradicionais, comerciais e/ou atividades farmacológicas atribuídas.

Classe	nome	Uso tradicional e/ou atividade farmacológica	Autor/ano
Monoterpenos	Citronelol, geraniol, neurol, linalol	Base componente de perfumes	DEV, 1989 DI STASI, 1995
	Citronelal	Repelente de insetos	DEV, 1989

(...continuação da tabela 1)

Classe	nome	Uso tradicional e/ou atividade farmacológica	Autor/ano
Monoterpenos	carvacrol	Antisséptico, antifúngico, antiespasmódico, essência artificial.	DI STASI, 1995
	4-terpineol	antiinflamatório	HART <i>et al</i> , 2000
		antimicrobiano	BAREL <i>et al</i> , 1991; CARSON E RILEY, 1995; RAMAN <i>et al</i> , 1995
		acaricida	WALTON <i>et al</i> , 2004
		antihipertensivo	LAHLOU <i>et al</i> , 2002, 2003
		Antiespasmódico e relaxante intestinal	MAGALHÃES <i>et al</i> , 1998; BEZERRA <i>et al</i> , 2000; NASCIMENTO <i>et al</i> , 2005
Sesquiterpenos	Tricotecinol A	Citotóxico contra linhagens cancerígenas, in vitro, de células KB, SK-MEL30, A549, MCF7	LOUKACI <i>et al</i> , 2000
	himalacol	antisséptico	DI STASI, 1995
	costunolídeo	Antiulcerogênico, colerético, citotóxico, inibe a síntese de DNA	DI STASI, 1995
	tapsigargina	Inibe a enzima Ca^{2+} ATPase no retículo sarcoplasmático	THASTRUP <i>et al</i> , 1987
	Vernolepina, fenolina, elefantina	antitumorais	SRINIVASAN <i>et al</i> , 1992
	x-santalol	Formulação de perfumes	SRINIVASAN <i>et al</i> , 1992
Diterpenos	Forscolina	Ativa a enzima adenilato ciclase	SEAMON <i>et al</i> , 1981
	Ésters de forbol	Ativadores da PKC, utilizados em estudos das funções biológicas e propriedades dessa enzima e na carcinogênese química	NISHIZUKA, 1986; BERRIDGE, 1987; CHUANG, 1989

(...continuação da tabela 1)

Classe	nome	Uso tradicional e/ou atividade farmacológica	Autor/ano
Diterpenos	Paclitaxel	Promissor agente antineoplásico; inibidor da função dos microtúbulos	LEGHA <i>et al</i> , 1986; HOLMES <i>et al</i> , 1991
Triterpenos	Ginsenosídeo RC	Antiespasmódico, analgésico, antiestresse	DI STASI, 1995
	Bruceatina, glaucarubolone, bruceínas A, B, C; chaparrinona, quassina	antiprotzoários	DI STASI, 1995
	ácido oleanólico	Antioxidante, hepatoprotetor, antiinflamatório, antihipercolesterolêmico	DI STASI, 1995
	α,β -amirinas	Analgésico em modelos animais	OLIVEIRA <i>et al</i> , 2005
		Antipruriginoso (inibe degranulação de mastócitos em camundongos)	OLIVEIRA <i>et al</i> , 2004
Tetraterpenos	Carotenóides (ex. β -caroteno)	Pigmento de alimentos, síntese de vitaminas; usado em cosméticos.	DI STASI, 1995

Quanto às classes ausentes na TABELA 1, os hemiterpenos, tais como isopreno e prenol e isopreno-alcóois, estes não são explorados. Os sesterpenos são incomuns, foram primeiro isolados de ceras de insetos e como metabólitos de fungos, e raramente ocorrem em vegetais superiores, sendo menos importantes do ponto de vista comercial e farmacológico (DI STASI, 1995). Enquanto os politerpenos são os que conferem propriedades elásticas (estrutura cis-) ou rigidez (estrutura trans-) às plantas (BARLOW *et al*, 1989).

1.3.1. DITERPENOS

Os diterpenos (C_{20}) são compostos terpenóides particularmente abundantes nas famílias *Lamiaceae* e *Asteraceae*, com mais de 1200 compostos, constituídos de 100 diferentes esqueletos encontrados somente nas *Asteraceae* (BRUNETON, 1999).

As estruturas dos diterpenos são altamente variáveis e são classificadas de acordo com sua origem biogenética. Há dois grupos básicos, acíclicos (raros) e cíclicos. Os diterpenos acíclicos são lineares, mas podem apresentar partes cíclicas ou lactonas. Os diterpenos cíclicos são classificados de acordo com o número de anéis (p.ex., bi-, tri-, tetracíclicos) (BRUNETON, 1999). (TABELAS 2 E 3).

TABELA 2: Classificação estrutural dos diterpenos segundo seus esqueletos de carbono e alguns exemplos conhecidos.

Diterpenos	Subclasses	Esqueletos	Exemplos
ACÍCLICOS		-	Plaunotol
		Fitanos	Fitol
CÍCLICOS	Bicíclicos	Labdanos	Ácido pinusolídeo, viteosídeo, andrografolídeo, espanolona, esterebina J, manool, esclareol, forscolina
		Clerodanos	Sacacarina, velamolona, bacariol, teuctosina, cornutinas, nacamurol
	Tricíclicos	Pimaranos	Flavidusin A, trinervinol, parguerano
		eritroxano	fagoneno
		Abietanos	Taxamairina D, cesalpinina, netidiol, sanigenona, yukonin
		cassanos	Ácido dipterixico, pulcherrimina E

(...continuação da tabela 2)

Diterpenos	Subclasses	Esqueletos	Exemplos
CÍCLICOS	Tetracíclicos	cauranos	Anoglabasina, ac. caurenóico enanderianina, canadiol, ceriopsina F, melissoidesina, isodulcinol, ácido escopadúlcicos
		Giberelinas	GA ₁₁₇ , GA ₁₁₀
		Grayanotoxinas	Pieriformosin B
		Beiranos	-
		Atiseranos	-
		Traquilobanos	-
		Afidicolanos	-
	Macrocíclicos	Taxanos	Paclitaxel, taxezopidinas B – H, taxuchina B, canataxapropelano
		Gersolanos	Pinatins A – E
		Casbanos	-
		Tigilanos	Forbol
		Jatrofanos	Jatrowediona, eufodendroidina D
		Pepluanos	-
		Paralianos	-
	Mistos	Briaranos	Briarelina, juncelolídeo H, Escavatulídeos A – E
		Valparanos	Azorelanol
		Espongianos	Tirinal
		Vibsanos	Vibsanina G, vibsanina O
		Serrulatanos	Pseudopteroxazol, elisabethadiona
		Dolabenos	-
		Ciatanos	Escabroninas A - F

Fonte: HANSON, 2000, 2004

Os diterpenos são os terpenos mais abundantes na natureza e, diterpenos de várias espécies de plantas são bem conhecidos por suas atividades biológicas. Alguns particularmente os ésteres de forbol das *Euphorbiaceae*, *Thymeleaceae* e *Ericaceae* são potentes venenos e co-carcinógenos (DEWICK, 2002; FATOPE *et al*, 1996). Outros têm propriedades citotóxicas (NIU *et al*, 2002). Certos diterpenos têm potencial terapêutico como antihipertensivos, anti-retrovirais, antiinflamatórios, analgésicos e antibacterianos (NIU *et al*, 2002; KAPIL *et al*, 1993). Adicionalmente a estas atividades, eles podem atuar como antioxidantes, alucinógenos, adoçantes, estimular a contração uterina (BRUNETON, 1999), ou seu relaxamento (DE ALENCAR CUNHA *et al*, 2003), e podem ter funções nas interações planta-animal (KRISHNA KUMARI *et al*, 2003).

Como exemplo das várias atividades ora terapêuticas, ora tóxicas exercidas por diterpenos, pode-se citar o observado com o consumo de café feito em grãos não filtrado (~2g/dia). Esta quantidade de consumo diário pode levar ao aumento dos níveis de colesterol no homem acima de 28%, e isto foi atribuído ao diterpeno cafestol (TERPSTRA E KATRAN, 2000). Por outro lado, este diterpeno é encontrado junto com kahweol na fração lipídica do café e os mesmos têm mostrado um potencial anticarcinogênico, junto com a cafeína e constituintes polifenólicos. Os estudos mostram que a função quimioprotetora desses diterpenos reside na sua capacidade em prevenir o dano por carcinógenos na formação das fitas de DNA e em alterar o metabolismo de xenobióticos. Isto leva à redução na ativação mutagênica pela inibição das enzimas do citocromo P450 e aumento na produção de enzimas de detoxificação (CAVIN *et al*, 2000; HUBER *et al*, 2003)

Os diterpenos poncidina e oridonina, isolados da *Rabdosia rubescens*, usada popularmente no tratamento de câncer de próstata, exibem uma atividade antiangiogênica, mostrando-se realmente capazes de inibir a proliferação de células cancerígenas e metástase (MEADE-TOLLIN *et al*, 2004).

Os diterpenos também possuem propriedades antifúngicas e antibacterianas. Os pimaranos 7 β -hidroxiisopimara-8,15-dien-14-ona e 14 α -hidroxiisopimara-7,15-dien-1-ona isolados da *Hypoestes serpens* exibiram atividade antifúngica contra *Cladosporium cucumerinum* e *Cândida albicans*. Esta planta é usada na medicina popular no tratamento da hipertensão e vaginites. Estes compostos também exibem atividade inibitória da

acetilcolinesterase, o que indica um potencial terapêutico no Mal de Alzheimer (RASOAMIARANJANA HARY *et al*, 2003).

Outros pimaranos têm atividade antiinflamatória, como o ácido antanóico, um inibidor seletivo da enzima COX-2, que também suprime a atividade da interleucina-1 e TNF- α . A modificação do grupo carboxila desse diterpeno aumentou sua atividade (SUH *et al*, 2001).

Várias espécies de *Salvia* que possuem atividade antituberculose, são amplamente usadas na medicina popular, e apresentaram abietanos com significativa atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* (ULUBELEN *et al*, 1997). Outros diterpenos são agentes modificadores da resistência bacteriana e, apesar deles próprios não exibirem atividade antibacteriana, aumentam a atividade de drogas bactericidas e reduzem a resistência a essas drogas (GIBBONS *et al*, 2003).

1.3.1.1. CAURANOS

Mais recentemente, a atenção tem se voltado para o estudo dos efeitos biológicos dos cauranos, porque o número dessas moléculas isoladas e caracterizadas tem crescido (TUDZYNSKI, 1999; YAMAGUCHI E KAMIYA, 2000). Os cauranos são os principais intermediários envolvidos na biossíntese das giberelinas, difundida família de hormônios vegetais com estrutura isoprenóide que controla várias funções fisiológicas nas plantas tais como crescimento, germinação e florescimento (MALININ *et al*, 1997). Certos diterpenos cauranos exercem efeitos inibitórios sobre a contração do músculo liso vascular e não-vascular (AMBRÓSIO *et al*, 2003).

O caurano neotripterifordin, isolado da planta venenosa chinesa *Tripterygium wilfordii*, conhecida como *Lai Gong Teng*, foi capaz de inibir a replicação de linfócitos H9 (CHEN *et al*, 1995; CHEN *et al*, 1992).

O caurano esteviosídeo (do qual ácido caurenóico é um dos precursores), principal constituinte presente nas folhas da planta *Stevia rebaudiana*, usadas como adoçante de baixas calorias (GEUNS, 2003), mostrou-se seguro em testes de toxicidade oral aguda em

camundongos, ratos e hamsters (DL₅₀ entre 8,2 e 17g/Kg de peso vivo), e toxicidade crônica para ratos e hamsters (GEUNS, 2003).

Esteviosídeo não afetou a espermatogênese em ratos (YAMADA *et al*, 1995), não afetou a fertilidade, *performance* ao acasalamento, número de fetos, nem seu desenvolvimento posterior (YODYINGYUAD E BUNYAWONG, 1991; MORI *et al*, 1981; OLIVEIRA-FILHO *et al*, 1989). Contudo, esteviol (a aglicona do esteviosídeo) foi tóxico para hamsters grávidas, mostrando redução do número de fetos/ninhada e menor peso médio fetal (WASUNTARAWAT *et al*, 1998). Esse caurano também apresentou efeito antihipertensivo em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), sem efeitos adversos sobre a frequência cardíaca ou níveis séricos das catecolaminas, assim como, decresceu a pressão sistólica e diastólica em voluntários hipertensos em um ano de administração do mesmo (CHAN *et al*, 2000). E seu mecanismo relaciona-se à inibição do influxo de cálcio do meio extracelular (LIU *et al*, 2003).

Em outro estudo, os cauranos esteviosídeo, rebaudiosídeos A e C e dulcosídeo A apresentaram atividade antiinflamatória e antitumorogênica induzida por TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato) na orelha de camundongo (YASUKAWA *et al*, 2002).

Alguns cauranos exibem atividade citotóxica contra diferentes linhagens de células cancerígenas tais como HL-60, K562 e MKN-28 (HOU *et al*, 2000; JIANG *et al*, 1999), enquanto outros exercem atividade tripanocida (BATISTA *et al*, 1999) e inibem a replicação do HIV *in vitro* (CHEN *et al*, 1995).

Por fim, quatro cauranos isolados das folhas da espécie *Cróton tonkinensis* (ent-7 α -14 β -diidroxicaur-16-em-15-ona) foram capazes de inibir a ativação do fator de transcrição nuclear NF κ B induzido por LPS em macrófagos RAW 264,7 murinos, assim como, reduziram a produção de óxido nítrico (NO) induzida pelo mesmo LPS nestas células de forma concentração-dependente (GIANE *et al*, 2003).

Na TABELA 3, estão dispostos outros diterpenos, inclusive cauranos, além dos dispostos anteriormente, que já foram pesquisados e sua diversidade de atividades farmacológicas e/ou tóxicas e mecanismos já descobertos.

TABELA 3: Exemplos da diversidade de atividades biológicas atribuídas aos diterpenos.

Composto	Atividade	Autor/ano
Clerodanos		
t-DCTN	Antiproliferativa contra carcinoma de Erhlich (DE ₅₀ 16µM)	GRYNBERG <i>et al</i> , 1999
	Citotóxica, redução do conteúdo protéico e atividade fosfatase em células HL60 leucêmicas	FREIRE <i>et al</i> , 2003
	Antimutagênica quando administrada junto à ciclofosfamida; ou nem genotóxica, nem citotóxica para células de medula óssea de camundongos, quando sozinha.	AGNER <i>et al</i> , 2001 AGNER <i>et al</i> , 1999
	Redução dos níveis de colesterol e triglicérides em camundongos.	SILVA <i>et al</i> , 2001(a,b)
	Antiestrogênica.	LUNA-COSTA <i>et al</i> , 1999
	Hipoglicêmica e antihiperglicêmica em ratos normais e diabéticos.	FARIAS <i>et al</i> , 1997
	Antiinflamatória e antinociceptiva.	CARVALHO <i>et al</i> , 1996
	Vasorrelaxante	GUERREIRO <i>et al</i> , 2004
Abietanos		
-(+)-8,11,13-abietatrien-12-ol	Antiplasmodial, contra formas sensíveis e resistentes à cloroquinona. Não é citotóxica para o eritrócito.	CLARKSON <i>et al</i> , 2003
7α-acicloxi-6β-hidroxiroyleanona; grandinona A; 7α-acetoxi-6β-hidroxiroyleanona; coleon U	Antiproliferativa para linfócitos T e B humanos inducidos por mitógeno PHA (fitohemaglutinina); Potente inibição da proliferação de esplenócitos murinos induzidos por ConA e LPS.	CERQUEIRA <i>et al</i> , 2004
Labdanos		
Ferruginol, sugiol, ácido isocuprêssico, ácido sandaracopimarico	Efeito inibitório sobre a ativação do antígeno do vírus epstein-barr induzido por TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato)	IWAMOTO <i>et al</i> , 2003

(...continuação da tabela 3)

Composto	Atividade	Autor/ano
Labdanos		
Labdano F2	Efeitos mutuamente opostos no sistema eicosanóide: aumenta a liberação de substrato após ativação celular (macrófagos J774) e inibe a conversão deste substrato ao produto. Reduz a expressão das isoformas indutíveis de COX e NOS em macrófagos tratados com LPS.	PANG <i>et al</i> , 1996
Marrubin	Antinociceptivo (nas duas fases do teste da formalina), vasorrelaxante	DE JESUS <i>et al</i> , 1999; BARDAL <i>et al</i> , 2003 MEYRE <i>et al</i> , 2005
Cauranos		
Ent-1 β -hidroxi-9(11),16-cauradien-15-ona; 9(11),16-cauradien-12,15-diona; Jungermannenona A; Ent-11 α -hidroxi-16-cauren-15-ona	Citotóxicos de forma dose-dependente para células leucêmicas HL-60. Todos os compostos causam proteólise da poli (ADP-ribose) polimerase. Os 2 primeiros compostos induzem necrose, os outros 2 induzem apoptose.	NAGASHIMA <i>et al</i> , 2003a
Ent-16 β -17 α -dihidroxicaurano (DHK)	Citotóxico para células MCF-7 de tumor mamário. Promove apoptose. Diferente de outros cauranos, não afeta o fator de transcrição NF κ B.	MORALES <i>et al</i> , 2005
Ácido 16-kauren-19-óico	Efeitos antimicrobianos, anti-inflamatórios, cardiovasculares, diuréticos, anti-HIV, citotóxicos	SOMOVA <i>et al</i> , 2001; WU <i>et al</i> , 1996; FUJITA E NODE, 1984

1.3.1.1.1. ÁCIDO CAURENÓICO (AK)

Da classe dos diterpenos cauranos o ácido caurenóico se destaca como um dos mais importantes membros dessa família, exibindo várias dessas propriedades biológicas interessantes (BRESCIANI *et al*, 2004) e, realmente, este caurano encontra-se distribuído como principal (ou um dos principais) constituinte de diversas plantas largamente utilizadas pela medicina popular de seus países de origem para o tratamento de inúmeras afecções (QUADRO 3).

QUADRO 3: Espécies que apresentam ácido caurenóico como um dos principais constituintes de sua composição e as atividades populares atribuídas a elas.

Espécie	Usos	Autor/ano
<i>Copaifera spp</i>	Seu óleo-resina é usado como antiinflamatório, contra infecções do trato respiratório e urinário. Cicatrização de úlceras e ferimentos	DEL NUNZIO, 1995 VEIGA JR <i>et al.</i> , 1997 CASCON E GILBERT, 2000 PAIVA <i>et al</i> , 2003 PIO CORREA, 1984
<i>Xilopia frutescens</i> <i>X. aethiopica</i>	Sementes: atividade antimicrobiana e anti-reumática. Antitosse, carminativo, tônico pós-parto, contra bronquite, desinteria, dor de estômago	MELO <i>et al.</i> , 2001 IWU, 1993

(...continuação do quadro 3)

Espécie	Usos	Autor/ano
<i>Mikania spp.</i>	Partes aéreas: antiinflamatório, expectorante, antisséptico e contra frieiras, tumores, eczemas.	DAVINO <i>et al.</i> , 1989 TESKE E TRENTINI, 1985 YATSUDA, 2005
<i>Aspilia mossambicensis</i>	Mulheres africanas usam como galactagogo, para alívio das cólicas menstruais e no tratamento da eclampsia. As fêmeas de chimpanzé comem suas folhas em muito maior quantidade que os machos.	PAGE <i>et al.</i> , 1992
<i>Montonoa spp.</i>	Folhas: como agente contraceptivo e no estímulo da menstruação. Uterotônico e luteolítico (extrato).	VALENCIA <i>et al.</i> , 1986 CAMPOS-BEDOLLA <i>et al.</i> , 1997 LEVINE <i>et al.</i> , 1981
<i>Wedelia paludosa</i>	Contra dor de cabeça, febre, infecções do trato respiratório.	BLOCK <i>et al.</i> , 1998 BATISTA <i>et al.</i> , 1999
<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	O própolis, produzido por estas abelhas, é usado como antisséptico, antiinflamatório e no tratamento de queimaduras.	VELIKOVA <i>et al.</i> , 2000
<i>Alepidea spp.</i>	Raízes: AK é marcadamente o principal constituinte. O extrato para tratamento de resfriado revelou também atividade anti-hipertensiva e diurética. Para calafrios e contra a tosse.	HOLZAPFEL <i>et al.</i> , 1995 DE CASTRO E VAN WYK, 1994

(...continuação do quadro 3)

Espécie	Usos	Autor/ano
<i>Annona squamosa</i>	Sementes: inseticida	YANG <i>et al</i> , 2002
	Folhas: tratamento de úlceras e ferimentos	YANG <i>et al</i> , 2004
	Casca do tronco: tônico contra a diarreia	
<i>Aralia cordata</i>	Usada na medicina oriental como analgésica. Raízes: tratamento de reumatismo	OKUYAMA <i>et al</i> , 1991
<i>Acanthopanax spp.</i>	(<i>A. trifoliatum</i>) tratamento da tuberculose, hemorragias no fígado, tônico para fraqueza geral, para úlceras e contusões.	KIEM <i>et al</i> , 2004
	(<i>A. koreanum</i>) raízes e cascas do caule: tônico, sedativo, tratamento de reumatismo e diabetes.	PERRY E METZGER, 2003
<i>Croton</i>	Folhas: purgativo	
<i>oblongifolius</i>	Flores: tenicida Cascas: tratamento da dismenorréia, dispepsia. Raízes: tratamento de desinteria	BLATTER <i>et al</i> , 1975

Diante deste fato (ou seja, indicação terapêutica das plantas que apresentam esse caurano como constituinte), o ácido caurenóico tem sido objeto de vários estudos farmacológicos na busca de comprovar suas propriedades e elucidar seu(s) mecanismo(s) de ação.

Inicialmente, o que mais chamou atenção acerca das atividades atribuídas às plantas do gênero *Montanoa*, consumidas por mulheres no vale do México desde os tempos pré-colombianos. Seus extratos têm sido usados como agentes contraceptivos com efeitos uterotônicos, como estimulante da menstruação e para cessar o início da gestação.

Na verdade, o que pôde ser observado experimentalmente é que o extrato aquoso da espécie *M. tomentosa* promove o decréscimo da atividade espontânea de segmentos uterinos de rata, *in vitro*, enquanto o extrato proveniente da *M. frutescens* incrementa essa atividade (GALLEGOS, 1983; PERÚSQUIA *et al*, 1985).

Do ponto de vista histológico, pode ser acrescentado que, o extrato da *M. frutescens* promoveu mudanças nas estruturas uterinas, tais como perda focal do revestimento epitelial, espessamento dos vasos e alterações no estroma das células endometriais em ratos (GONZÁLEZ *et al*, 1985), enquanto que a administração intra-uterina do extrato da *M. tomentosa*, no 4º dia de gestação, não causou mudanças na morfologia uterina (PEDRON *et al*, 1985).

Partindo desses resultados, alguns estudos foram realizados com cauranos extraídos de *Montanoa sp* que, igualmente, mostraram efeitos controversos. Enquanto promoveram um aumento das contrações miométriais em cobaios, levaram ao relaxamento em ratas, *in vitro*. O caurano ácido caurandienólico, *in vivo*, promoveu contrações uterinas em cobaios, sem alteração na pressão arterial, atividade cardíaca ou peristaltismo intestinal (LOZOYA *et al*, 1983). Igual ao obtido por Lozoya *et al* (1983) com o ácido caurandienólico, Page *et al* (1992), observaram que AK (50 µg/mL = 160µM), extraído da *Aspilia mossambicensis*, exibiu atividade útero-estimulatória em útero de cobaio estrogenizado.

Já o ácido 16α-hidroxi-ent-cauran-19-oico, isolado da *M. hibiscifolia*, e seu metil éster, inibiram a atividade espontânea de segmentos uterinos isolados tanto de ratas quanto de cobaios, assim como a contração destes induzida por ocitocina (PONCE-MONTER *et al*, 1988).

Campos-Bedolla *et al* (1997), estudaram, então, quatro cauranos extraídos das espécies *M. frutescens* (AK), *M. tomentosa* (ac. caurandienólico), e *M. hibiscifolia* (ac. 16α-hidroxi-ent-cauran-19-oico e seu metil éster), sobre as contrações de úteros de ratas estrogenizadas, *in vitro*, estimulados por acetilcolina (ACh), ocitocina (OCI), ou serotonina (5-HT). Os quatro cauranos inibiram a contração do miométrio induzida pelos agonistas. Esse bloqueio não foi revertido nem por propranolol (antagonista do receptor β₂-adrenérgico), nem por cimetidina (antagonista H₂).

Partindo dessas informações da literatura, Cunha (2001), avaliou a atividade do ácido caurenóico em útero isolado de ratas e sob estímulo de agonistas e na presença ou não de bloqueadores. O que pôde ser concluído foi que AK bloqueia as contrações induzidas na forma de curva dose-resposta a OCI ou ACh de forma dose-dependente. Assim como na concentração de 160 μM (50 $\mu\text{g/ml}$), inibe a contração miometrial estimulada por cálcio adicionado em um meio despolarizante (K^+ 60mM) ausente do mesmo. Com a adição de tetraetilamônio (TEA, bloqueador de canais de potássio ativados por cálcio, $\text{BK}_{\text{Ca}}^{2+}$) ou glibenclamida (bloqueador de canais de potássio ativados por ATP, K_{ATP}^+), há reversão parcial da ação relaxante do AK apenas pela glibenclamida. Ácido caurenóico também bloqueia a contração tônica miometrial induzida por OCI, ACh ou BaCl_2 , mas o faz fracamente quando esta contração se dá por KCl. E esse relaxamento foi maior (35,4%) quando os segmentos uterinos utilizados provinham de fêmeas na fase progesterônica (ou seja, grávidas) do que na fase estrogênica (18,5%). Esse estudo dos efeitos do AK sobre o miométrio acabou por indicar uma possibilidade terapêutica como droga tocolítica.

O potencial antiinflamatório do AK também foi estudado em modelos de colite ulcerativa por ácido acético. AK 100 mg/Kg, via oral (v.o.) e via retal (v.r.), reduziu o escore da lesão (42% v.o. e 52% v.r.) e o peso úmido do intestino (39% v.r.) de forma significativa. Assim como houve redução significativa nas dosagens das enzimas mieloperoxidase e malonaldeído (indicadores de infiltração neutrofílica e da peroxidação lipídica, respectivamente), nas duas doses testadas (50 e 100mg/Kg) e em ambas as vias. A observação histológica do cólon dos ratos tratados com AK 100mg/Kg mostrou atenuação da desordem morfológica, do edema e do infiltrado de células inflamatórias (PAIVA *et al*, 2003).

Posteriormente, Paiva (2004) observou que os níveis de mieloperoxidase e a concentração de nitrito no intestino também foram reduzidos significativamente por AK 100mg/Kg quando induzida toxicidade intestinal por indometacina em ratos, e na lesão intestinal decorrente de isquemia-reperfusão, onde a observação histológica do cólon mostrou a população caliciforme preservada, um moderado infiltrado inflamatório e discreta destruição epitelial quando comparada ao controle não tratado.

Por sua vez, Cai *et al* (2003) encontraram uma atividade inibitória (CI_{50} 85,8 μ M) sobre a secreção de TNF- α por células HMC-1 estimuladas por tripsina (proteínase com importante função na inflamação).

Noutros experimentos relacionados à inflamação, AK apresentou uma atividade inibidora da COX-1 bem superior à aspirina (acima de 10 vezes), mas cerca de uma vez e meia menos potente que a indometacina na inibição da COX-2 (KIEM *et al*, 2004; DANG *et al*, 2005).

O AK ($\geq$ 300mg/Kg, v.o.) foi capaz de induzir hipotermia (-1,6° C), analgesia nas contorções abdominais por ácido acético e sedação (OKUYAMA *et al*, 1991).

Contudo, de forma contrária a outros cauranos testados quanto à geração de ânion superóxido por neutrófilos, enquanto esses cauranos inibiram a geração de O_2^- em resposta ao fMLP, mas não ao PMA (ativador da PKC), o ácido caurenóico revelou um efeito oposto, aumentando a formação do ânion. Ainda na mesma pesquisa, AK mostrou efeito inibitório médio sobre a geração de NO por macrófagos NR8383 em resposta ao LPS, e foi citotóxico para essas células (YANG *et al*, 2004).

Ácido caurenóico tem apresentado atividade antiagregação plaquetária (200 μ M) induzida por ácido araquidônico e colágeno (YANG *et al*, 2002), como inibidor da enzima Na^+K^+ ATPase de cérebro de ratos (IC_{50} 2,2 x 10⁻⁵M) (NGAMROJNAVANICH *et al*, 2003), tripanocida (ALVES *et al*, 1995; BATISTA *et al*, 1999; DA COSTA *et al*, 1996), larvicida contra *Aedes aegypti* (SLIMESTAD *et al*, 1995), e contra culturas de *Bacillus subtilis* (SLIMESTAD *et al*, 1995), de *Staphilococcus aureus* (VELIKOVA *et al*, 2000) e atividade antifúngica (SARTORI *et al*, 2003).

Além disso, AK inibe a motilidade espermática (160 μ g/mL = 530 μ M) de espermatozóides humanos incubados por 60 segundos de maneira similar ao controle verapamil, sem contudo matá-los (VALENCIA *et al*, 1986).

Quando AK foi administrado a ratos diabéticos (10mg/Kg), estes tiveram uma significativa redução em seus níveis glicêmicos comparado ao controle não tratado. E esta

redução se deu em um espaço de tempo inferior ao da glibenclamida (controle positivo) (BRESCIANI *et al*, 2004).

Em estudos realizados por Somova *et al* (2001) com extratos das espécies *Alepidea amatymbica* e *Xylopiia aethiopica* e seus constituintes cauranos isolados, o que inclui o ácido caurenóico, os autores relataram que o mesmo, *in vivo* (10mg/Kg, i.v.), possui efeito hipotensor sistêmico e, *in vitro* (10mg/ml = 33mM), promove vasodilatação e bradicardia, atribuindo estes a um bloqueio dos canais de cálcio dependentes de voltagem, e independência do óxido nítrico. Em adição aos efeitos cardiovasculares, os autores encontraram efeitos diuréticos e natriuréticos para o AK (50mg/Kg, v.o.), comparáveis aos efeitos da hidroclorotiazida, sugerindo inibição da reabsorção de Na⁺ e K⁺ na porção inicial do túbulo distal.

O AK (20μg/mL = 66μM) reduziu a contração do músculo liso vascular, estimulado por fenilefrina (PHE) na forma de curva dose-resposta, quando anéis de carótida foram pré-incubados com o caurano por 15 minutos (TIRAPELLI *et al*, 2002).

Numa continuidade de seus estudos, Tirapelli *et al* (2004 e 2005) indicaram que: AK inibe a contração induzida por PHE e KCl em anéis de aorta com endotélio intacto, ou desnudo deste, inibe a contração induzida por Ca²⁺ adicionado a uma solução sem o mesmo e com alto potássio (30mM). Indicaram também que não há interferência na liberação dos estoques intracelulares de cálcio e que AK é capaz de relaxar os anéis de aorta (com ou sem endotélio) pré-contraídos por KCl. Por fim, afirmam que no músculo liso vascular, o relaxamento promovido por AK se dá, além do bloqueio no influxo de Ca²⁺, parcialmente pela via do NO (NOSe e NOSn) e abertura de canais de potássio ativados por cálcio sensíveis a caribdotoxina e a 4-aminopiridina.

Noutro estudo, Ambrósio *et al* (2004) concluem que o grupo carboxila em C19 é um dos principais sítios responsáveis pela ação antiespasmódica do AK. Posteriormente, num estudo comparativo entre o caurano ácido caurenóico e o pimarano ácido pimaradienoico Tirapelli *et al* (2005) indicaram que diferenças estruturais entre os diterpenos influenciam seletivamente sua ação vasodilatadora, através dos canais de cálcio operados por voltagem em anéis de aorta, independente do grupo carboxila em C19 e que a estrutura química do anel C possui uma importante função nessa atividade antiespasmódica.

Com tudo o que pôde ser observado com os dados encontrados na literatura a respeito da diversidade de plantas medicinais (e suas inúmeras indicações terapêuticas) que apresentam AK como constituinte principal; assim como, a diversidade de ações (inclusive citotóxicas) observadas para esse caurano chega-se a um ponto chave: lançar questionamentos acerca da necessidade do aprofundamento sobre sua segurança farmacológica e, a partir daí, poder oferecer indicações mais adequadas do uso do mesmo. Ou seja, seu uso como substância isolada (mesmo sujeito à melhoria por modificações semissintéticas), ou como biomarcador para os fitoterápicos que possuem AK como constituinte preponderante, em especial o óleo da copaíba. Ressaltando que ainda pouco é conhecido sobre a relação entre estruturas e atividades dos componentes do óleo-resina da copaíba.

2. OBJETIVOS

O **objetivo geral** desse trabalho foi **estudar os possíveis efeitos tóxicos do ácido caurenóico (AK)**, de modo a tentar **determinar níveis para sua segurança farmacológica**, apontando-o assim, como um futuro biomarcador para o óleo de copaíba.

Partindo daí, através da associação de estudos do perfil farmacológico e do perfil de segurança da substância, os **objetivos específicos** desenvolvidos neste projeto foram:

1) Verificar, *in vitro*, o grau de atividade (ou potência) tóxica do AK sobre:

1.1) Larvas de *Artemia sp* (CL₅₀);

1.2) Eritrócitos humanos e de rato, *in vitro* (atividade hemolítica);

1.3) Linhagens de células tumorais (atividade antitumoral);

1.4) Gametas e embriões de ouriço (*L. variegatus*);

2) Avaliar o grau de toxicidade aguda do AK em camundongos (DL₅₀ e observação de alteração de parâmetros fisiológicos);

3) Avaliar a ocorrência de efeitos sobre o sistema nervoso central através do uso do campo aberto (e parâmetros comportamentais associados a essa observação), e comprometimento motor, pelo uso da barra giratória (*rota-rod*).

4) Analisar a ação do AK sobre o sistema cardiovascular através:

4.1) da investigação de seu potencial cardiotoxico no eletrocardiograma (ECG) e sobre a pressão arterial de ratos normotensos anestesiados;

4.2) do estudo de seus efeitos sobre o coração inteiro isolado de rato e de cobaio;

4.3) da verificação de seu efeito no cronotropismo e inotropismo em átrios isolados de rato;

4.4) da observação de seus efeitos sobre o músculo liso vascular em modelos de anel de aorta e leito mesentérico isolados de rato;

5) Analisar os efeitos do AK sobre o músculo liso do aparelho respiratório através do estudo de sua ação sobre a resistência traqueobrônquica;

6) Estudar a ação do AK sobre os eventos reprodutivos ligados à mãe e ao conceito, embriogênese e organogênese em mamíferos, determinando seus possíveis efeitos embriotóxicos e teratogênicos e seus mecanismos;

3. MATERIAIS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Camarões de salmoura (*Artemia sp.*)

Os cistos de camarão de salmoura (*Artemia sp.*) adquiridos com a professora Teresa Cristina do Laboratório de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará. Estes permaneceram acondicionados em frasco fosco e dentro de um dessecador até o momento de seu uso.

Ouriços (*Lytechinus variegatus*)

Os ouriços adultos (*Lytechinus variegatus*) foram coletados na praia do Pecém, litoral do estado do Ceará, pela professora Letícia V. Costa Lotufo do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

Ratos, camundongos e cobaias

Os animais de laboratório utilizados nos experimentos foram provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), mantidos em caixas de propileno a $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, em ciclos de claro/escuro de 12h, com livre acesso à água e alimento.

→ Ratos albinos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, fêmeas impúberes com 19 a 21 dias de idade, e machos adultos pesando entre 250 e 300g.

→ Camundongos albinos (*Mus musculus*), variedade Swiss-Webster, adultos, de ambos os sexos, pesando entre 20 e 30g.

→ Cobaias (*Cavia porcelus*), machos adultos, pesando cerca de 400g.

3.2. SOLUÇÕES

Água marinha artificial (1L):

NaCl (23g), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (11g), Na_2SO_4 (4g), $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1,3 g), KCl (0,7g).

Krebs- Henseleit para coração (1L):

NaCl (6,7g), KCl (0,37g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,144g), $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,17g), NaHCO_3 (2,1g), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,1542g), Glicose (0,65g)

Krebs- Henseleit para vaso (1L):

NaCl (6,7g), KCl (0,37g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,144g), $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,17g), NaHCO_3 (2,1g), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,3085g), Glicose (0,65g)

Líquido de Bouin (100 mL):

Solução saturada de ácido pícrico, 2,4,6 $(\text{NO}_2)_3\text{C}_6\text{H}_2\text{OH}$ (75mL), solução de formaldeído 40%, H_2CO (25mL), ácido acético glacial, $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ (5mL)

3.3. SUBMISSÃO AO COMITÊ DE ÉTICA

O projeto de pesquisa para o uso dos animais para experimentação, contendo os protocolos experimentais realizados com os mesmos, foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará, estando em conformidade com as normas éticas internacionais.

4. METODOLOGIA

4.1. ISOLAMENTO DO ÁCIDO CAURENÓICO

O isolamento do ácido caurenóico (AK) foi realizado pela equipe do professor Edilberto da Rocha Silveira do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

O ácido caurenóico utilizado nos experimentos foi isolado por fracionamento cromatográfico do óleo de Copaíba, proveniente da exsudação do tronco do espécime *Copaifera langsdorffii* Desf, coletado na localidade de Barreiro Grande – Crato – Ceará e identificado botanicamente pelo professor Afrânio G. Fernandes do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. Amostras testemunhas da planta estão depositadas no Herbário Prisco Bezerra da mesma Universidade, com exsicata registrada sob os números 24.461 e 24.489.

O ácido caurenóico foi obtido de 103,8g do óleo de Copaíba submetidos à extração da fração volátil, fornecendo 17,4 g, (10,2%) de óleo essencial e 88,4 g (85,2%) de resina. A resina resultante foi dividida em fração ácida e fração neutra a partir de reação ácido-base com hidróxido de amônio, obtendo-se 19,2g (21,8%) de fração neutra e 66,8 g (75%) de fração ácida.

Tratamentos cromatográficos sucessivos da fração ácida em sílica gel e eluição com aumento gradual de polaridade da fase móvel permitiram o isolamento de 1,5 g (4,4%) de um sólido incolor, de ponto de fusão 176,1-176,2°C, solúvel em clorofórmio, cuja análise efetuada a partir de métodos espectrométricos: infravermelho (IV), espectrometria de massa (EM) e ressonância magnética nuclear (RMN) possibilitou a identificação do composto ácido caur-16-en-19-óico, PM = 302 (FIGURAS 4 e 5).

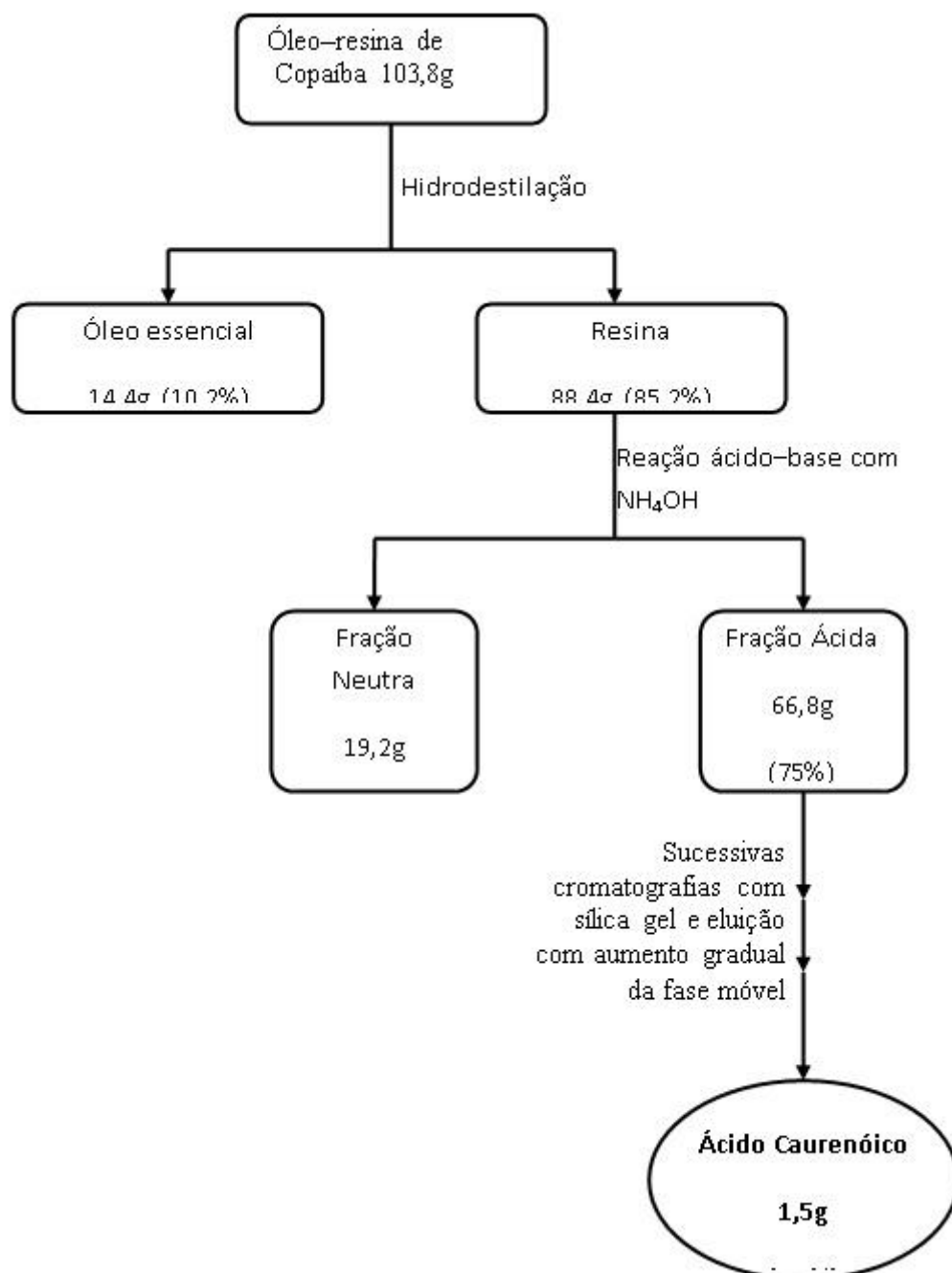


FIGURA 4: Sequência da extração do ácido caurenóico (AK)

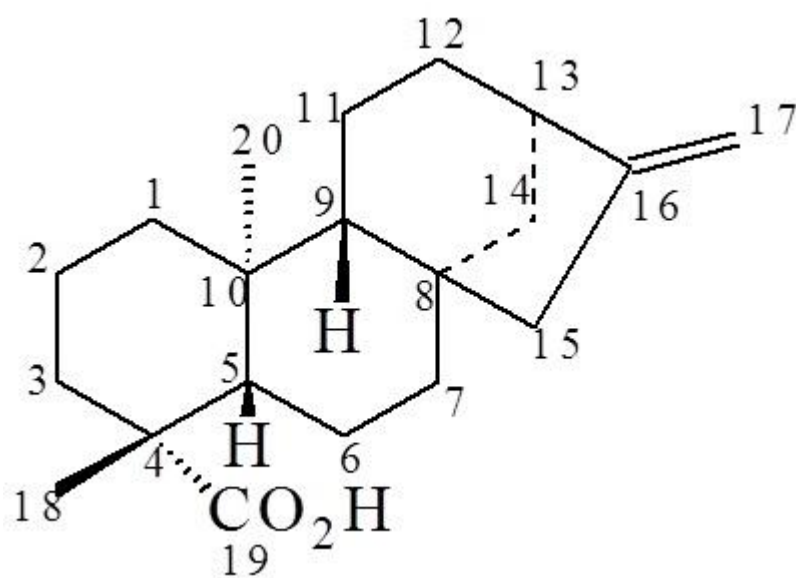


FIGURA 5: Estrutura química do ácido caurenóico

4.2. TOXICIDADE *IN VITRO*

4.2.1. TOXICIDADE PARA *Artemia sp*

Os cistos de *Artemia sp* (50mg) foram colocados em 1L de água marinha artificial (LEWAN *et al.*, 1992), para obtenção da eclosão dos mesmos, com aeração contínua durante 48 horas. Após as primeiras 24h, uma fonte luminosa foi acesa sobre o recipiente onde os cistos se encontram. Às 48h, os náuplios são coletados usando-se pipeta Pasteur e transferidos, ao número de 10 por tubo, para tubos de 5mL (volume final) onde se encontravam as várias concentrações do ácido caurenóico, PM 302 (AK: 1, 3, 10, 30 e 300 $\mu\text{g/mL}$ = 3, 10, 30, 100 μM e 1mM), os controles normal (água marinha) e veículo (DMSO 5%) e o controle positivo, Dicromato de Potássio, PM 294,18 ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$: 10, 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$ = 34, 102 e 340 μM) (MEYER *et al*, 1982). Vale salientar que todas as concentrações testadas são feitas em triplicata. A determinação da CL_{50} foi feita pelo método dos probitos de Miller e Tainter (1944).

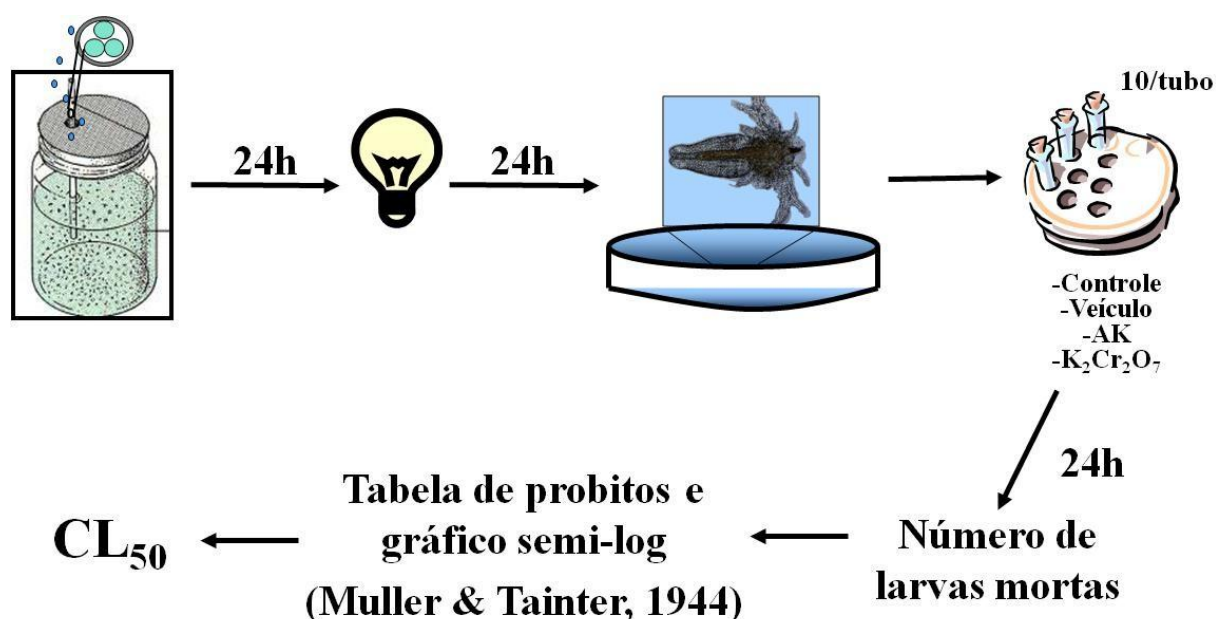


FIGURA 6: Metodologia da toxicidade para *Artemia sp*.

4.2.2. ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Para esse teste (BERLINCK *et al*, 1996) foram usadas placas com 96 poços. Cada poço recebe 50 μ L de uma solução 0,85% de NaCl contendo 10mM de CaCl₂. O primeiro poço é o controle negativo. O AK foi colocado em concentrações crescentes (3 – 800 μ M) em cada poço. O último poço recebeu 10 μ L de triton X-100, 0,2%, para obter 100% de hemólise. Então, foi colocado em cada poço, 50 μ L de uma suspensão de 2% de eritrócitos de camundongo ou humano diluído em 0,85% de salina contendo 10mM de CaCl₂. Após permanecer à temperatura ambiente por 30min, a placa foi centrifugada e a hemólise medida por absorbância do sobrenadante em 540nm.

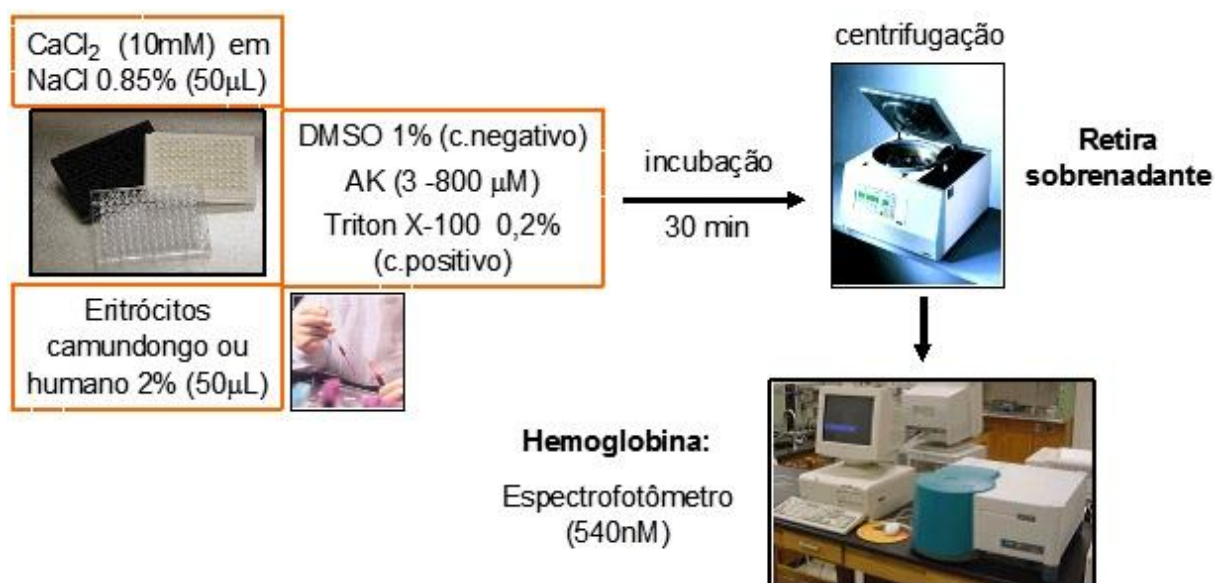


FIGURA 7: Teste da atividade hemolítica.

4.2.3. ENSAIO ANTIPROLIFERATIVO PARA CÉLULAS TUMORAIS

Células derivadas de tumor mamário, de cólon e leucêmico foram distribuídas numa placa de 24 poços numa densidade de $0,5 \times 10^5$ células/poço, para investigar a atividade citotóxica do AK (1,3 - 83 μ M) através da contagem das células tumorais viáveis após um dia de incubação. Esse método é baseado na redução da cor amarela do sal tetrazolium (MTT), pela desidrogenase mitocondrial das células metabolicamente ativas, em uma cor azulada por formação de cristais violeta dentro das células (MOSMANN, 1983). A leitura foi feita em espectrofotômetro (570nm).

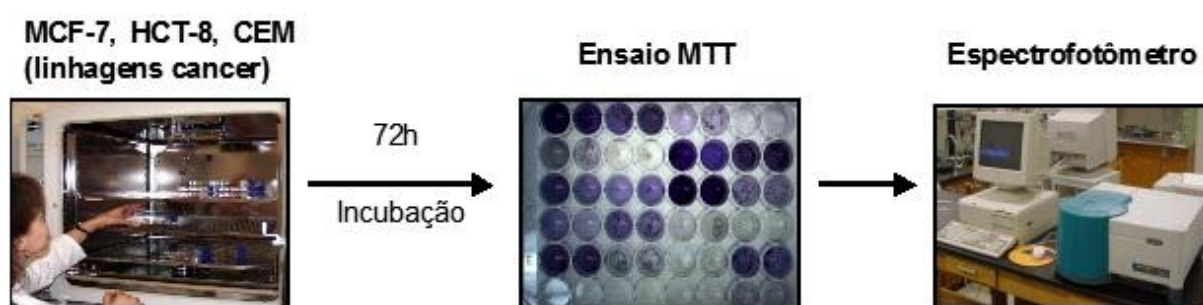


FIGURA 8: Ensaio antiproliferativo para células tumorais.

4.2.4. TOXICIDADE PARA OURIÇOS (*Lytechinus variegatus*)

A escolha do modelo de toxicidade para ouriços se deve a vários méritos: um grande número de gametas pode ser obtido de um único indivíduo, a embriogênese se processa com alta viabilidade, os ovos fertilizados se desenvolvem em larvas em pequeno espaço de tempo (2-3 dias), e o desenvolvimento embrionário pode ser observado ao microscópio sem interrupção do seu desenvolvimento. O protocolo utilizado visou **avaliar a atividade antimitótica** do ácido caurenóico sobre a embriogênese de ouriço.

Para realização do estudo a eliminação dos gametas foi induzida por injeção de KCl (0,5M) na cavidade perivisceral de ouriços comprovadamente férteis. Os ovos foram lavados para remoção do revestimento gelatinoso que os envolve e então foram distribuídos de acordo com os grupos de tratamento dentro de placas de 24 poços (Corning™). Dois minutos após a fertilização adicionou-se AK, diluído em água do mar, nas concentrações requeridas (10 - 300µM), e as placas foram agitadas a uma taxa constante e temperatura de $26 \pm 2^{\circ}$ C. A avaliação da atividade antimitótica foi feita pela observação da capacidade do AK em inibir as clivagens dos ovos de ouriço adicionado após a fertilização. Assim, em intervalos apropriados relativos às fases embrionárias onde se estudou a ação do AK, alíquotas de 10µL foram coletadas dos grupos tratados com as diferentes concentrações do AK e foram fixadas em mesmo volume de formaldeído (10%) para obter os embriões nas fases de 1ª clivagem (aos 50 minutos), blástula (às 3:30h) e larva (às 30h). Cem embriões foram contados para cada grupo de modo a determinar o número de ouriços com desenvolvimento normal (MALPEZZI *et al*, 1994).

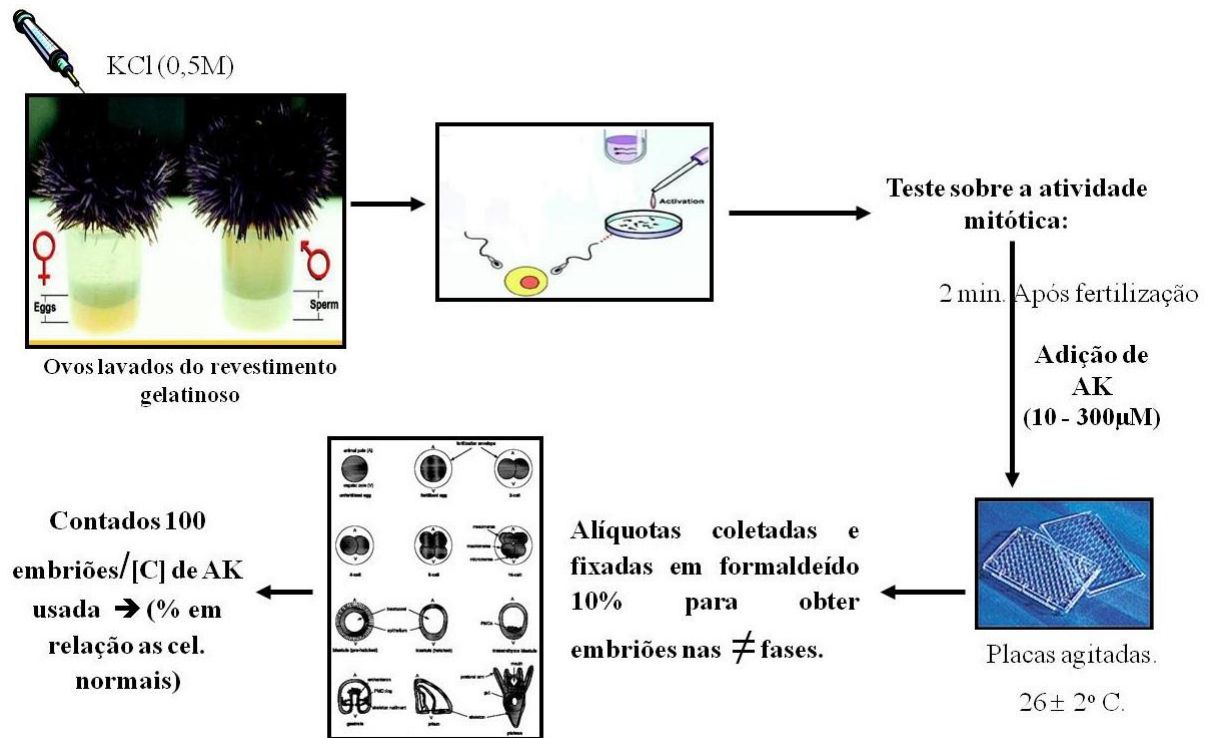


FIGURA 9: Estudo da atividade antimitótica do AK sobre a embriogênese de ouriços (*L. variegatus*).

4.3. TOXICIDADE AGUDA PARA CAMUNDONGOS

Para a determinação da toxicidade aguda (LITCHFIELD E WILCOXON, 1949), camundongos Swiss, (25-30g) foram divididos em grupos de 2 machos e 2 fêmeas, para cada dose a ser administrada, colocados em jejum de sólidos de 18h, e tratados com veículo (DMSO 5%, 10ml/kg), ou AK (100, 200 ou 500mg/Kg e 1g/Kg), via oral ou via intraperitoneal para todas as concentrações. Durante o período de 72h após a administração das drogas (nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 24, 48 e 72h) os animais foram observados quanto aos parâmetros: estado de alerta, sedação, ptose, dispnéia, micção, diarreia, convulsão, atividade motora espontânea, reflexo postural, piloereção, nocicepção e morte, buscando assim detectar evidências de sinais clínicos de toxicidade induzidos por AK.

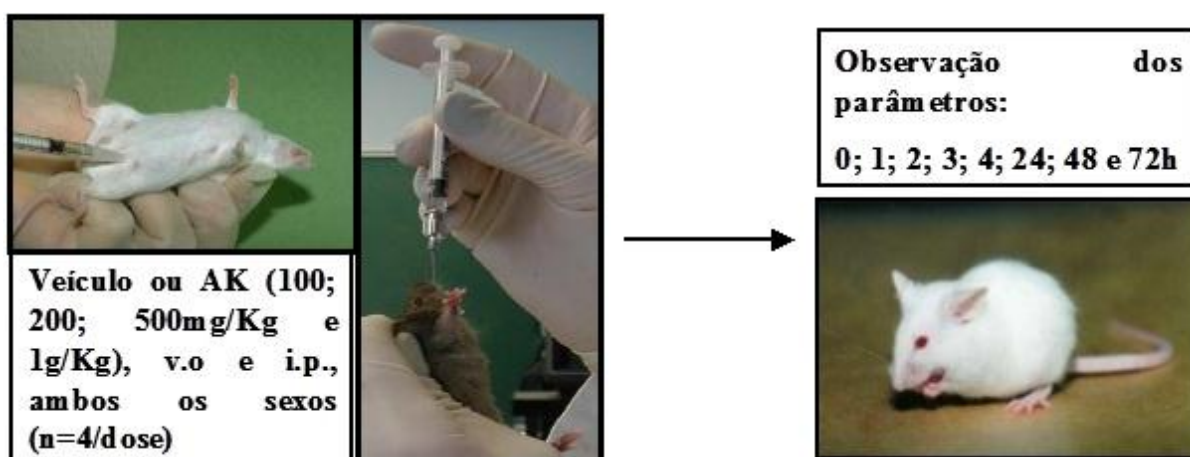


FIGURA 10: Teste de toxicidade aguda para camundongos.

4.4. AÇÃO SOBRE O SNC

4.4.1. TESTE DA ATIVIDADE EXPLORATÓRIA

Teste do campo aberto (ARCHER, 1973)

A tendência natural do animal em um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do conflito com o medo provocado pelo ambiente (MONTGOMERY, 1955). O objetivo deste teste foi avaliar a atividade estimulante ou depressora de AK, podendo ainda indicar atividades mais específicas como ansiolítica/ansio gênica. Um campo aberto, confeccionado em acrílico (paredes transparentes e chão preto, 30 x 30 x 15cm) foi empregado para avaliar a atividade exploratória dos animais: sua movimentação espontânea (número de cruzamentos, com as quatro patas, entre as divisões do campo), o número de comportamentos de autolimpeza (*grooming*) e de levantar (*rearing*), foram registrados após os tratamentos. Os camundongos foram divididos em grupos ($n = 8$) e tratados, por via oral, com AK 25 ou 50mg/Kg ou veículo (DMSO 5%) e 30min após foram colocados no centro do campo. Houve um período de 1 min de ambientação ao local e os registros feitos nos 3 minutos posteriores à ambientação.

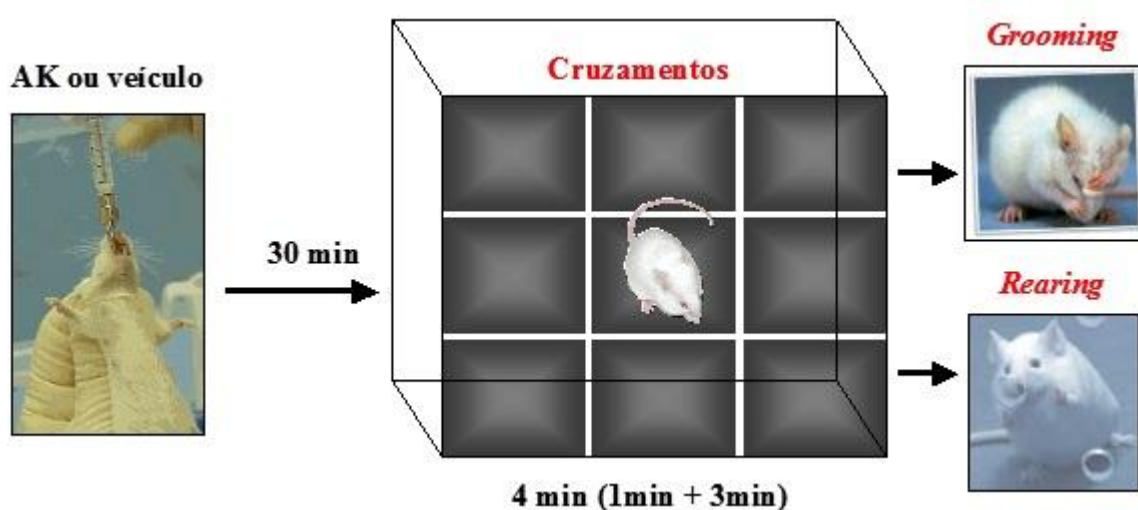


FIGURA 11: Teste da atividade exploratória de camundongos (Campo aberto).

4.4.2. TESTE DE COORDENAÇÃO MOTORA

Teste da barra giratória (DUNHAM E MYIA, 1957)

Este teste permite avaliar se AK promove incoordenação motora nos animais por sedação e/ou relaxamento muscular. O aparelho é constituído de uma barra de 2,5cm de diâmetro subdividida em seis compartimentos, colocada a 25cm de altura e girando a 12r.p.m. Os camundongos foram selecionados 24h do teste, em sessões de 2min de duração, antes da administração de AK, sendo escolhidos aqueles que permaneceram na barra giratória por este período. No dia do teste, os animais selecionados foram divididos em grupos ($n = 8$) e tratados, por via oral. Os animais foram tratados com AK 25 ou 50mg/Kg, ou veículo (DMSO 5%) e 30min após os tratamentos foram recolocados na barra. O tempo de permanência na barra (em segundos) foi registrado, com no máximo três reconduções à mesma.

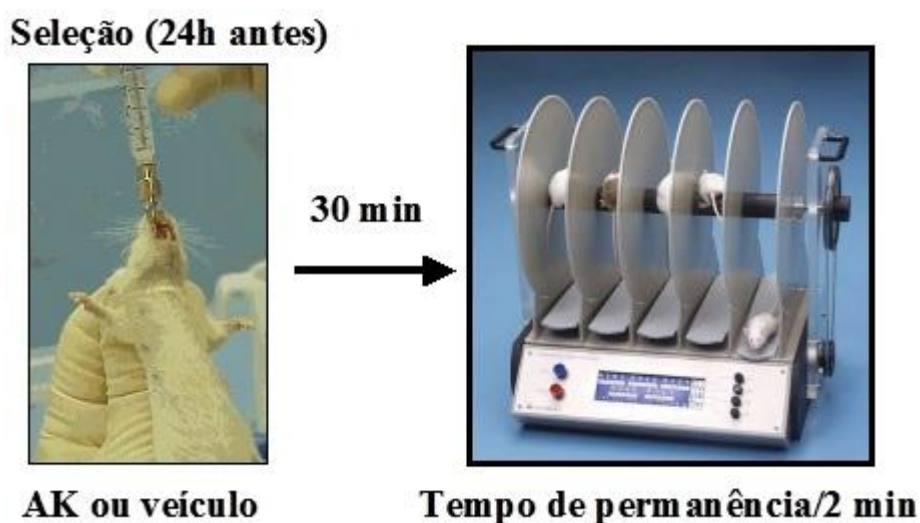


FIGURA 12: Teste de coordenação motora (teste da barra giratória).

4.5. AÇÃO SOBRE O APARELHO CARDIOVASCULAR

4.5.1. ELETROCARDIOGRAMA (ECG) E PRESSÃO ARTERIAL

Ratos Wistar normotensos (300-350g), foram anestesiados com pentobarbital sódico (50mg/Kg, i.p.), e tiveram a artéria carótida comum esquerda e a veia jugular canuladas para registro direto da pressão arterial média (PAM) e para injeção do AK em *bolus* (200µl) endovenoso, respectivamente, após um período de 30 minutos de equilíbrio. Passado o equilíbrio, o AK (5; 7,5 e 10mg/Kg) foi injetado, via endovenosa, e comparado com a injeção isovolumétrica de DMSO 5% (veículo). O registro eletrocardiográfico bipolar convencional (DII) foi obtido com uso de eletrodos de platina, implantados subcutaneamente e, acoplados a um sistema de aquisição de dados (Digidata 1321) com monitoração contínua em PC (Pentium III 1GHz). Para o registro da PAM, a artéria carótida canulada (tubo de polietileno PE50) foi ligada a um transdutor de pressão (P23 Gold Statham, Oxnard, CA, USA) conectado a um polígrafo (DMP-4B, Narco Biosystems, Houston, Texas, USA) (VALE *et al*, 2001).

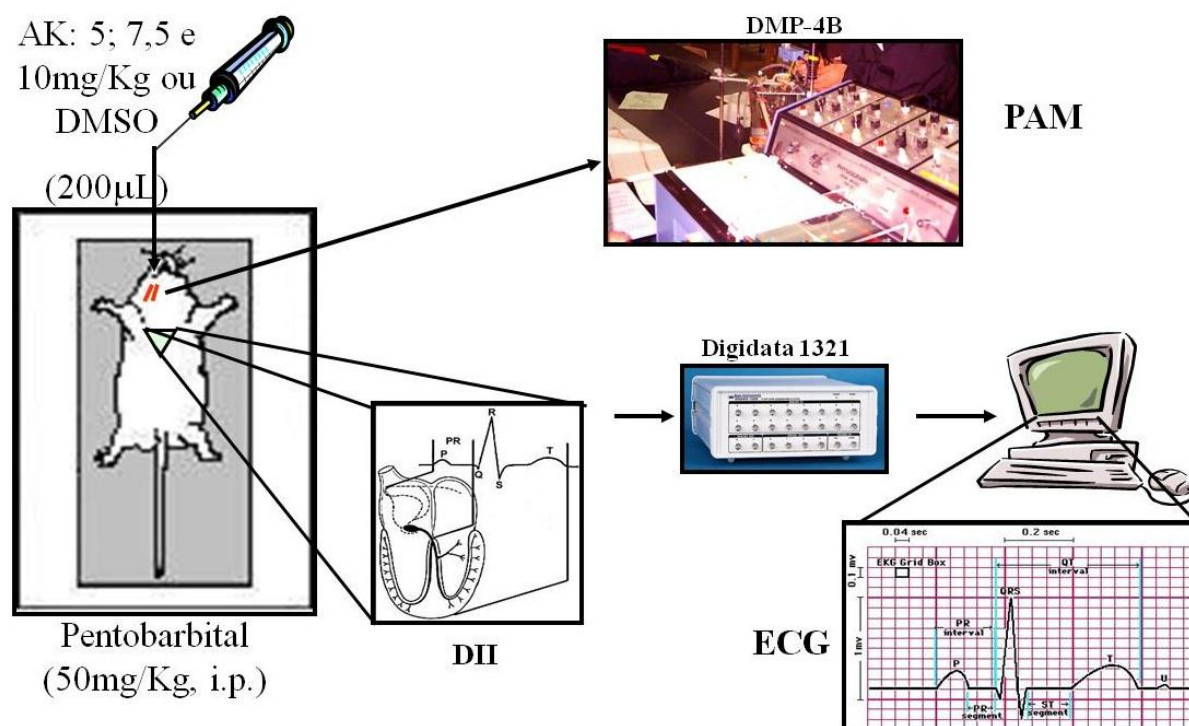


FIGURA 13: Metodologia da avaliação da ação do AK sobre o eletrocardiograma (ECG) e a pressão arterial de ratos normotensos.

4.5.2. CORAÇÃO ISOLADO

O animal (rato ou cobaio) foi anestesiado com pentobarbital sódico (50mg/Kg, ip) e colocado em decúbito dorsal. A traquéia foi dissecada e canulada para manutenção do mesmo com respiração artificial e, então, a cavidade torácica foi aberta e a veia cava e pulmonar e os ramos que partem da aorta foram ligados para efetuar a retirada do coração. Pouco antes desse procedimento injetou-se heparina pela veia femoral ou peniana e seccionou-se a aorta abdominal para que não houvesse formação de coágulos dentro do órgão quando da sua retirada. O órgão retirado foi imediatamente colocado dentro da solução fisiológica aquecida a 37°C (Krebs Henseleit para coração) e levado para o sistema de perfusão onde a aorta foi canulada. Por esta cânula passava a solução fisiológica aerada (95%O₂ e 5%CO₂), a fluxo constante (10mL/min) mantido por uma bomba. O fluxo da solução se dava de maneira retrógrada, de modo que as válvulas aórticas eram forçadas e o fluido dirigido da aorta para as coronárias. O coração permaneceu envolto por uma câmara térmica que mantinha a temperatura entre 35 e 37°C. Ligada à cânula encontrava-se uma válvula com duas saídas, uma por onde a droga a ser testada era injetada em forma de *bolus* (0,3mL) nas várias concentrações requeridas, e outra ligada a um transdutor de pressão. O registro do efeito das drogas sobre a força e frequência cardíaca foi feito pela ligação do ápice do coração através de um gancho a um transdutor de força com ajuste da tensão (2,5g), e este, assim como o transdutor de pressão, ligado a um polígrafo (DMP-4B, narcobiosystems). A observação da ação das drogas sobre o coração foi feita por um período de 3 minutos, com lavagem do sistema com salina (0,3mL) após a adição de cada concentração. A média das contrações controle foi considerada como contração máxima (100%), a partir da qual foram expressos os percentuais de aumento ou redução na contração do coração na presença das drogas usadas.

Coração de rato

Após 10 – 20 minutos de estabilização, foi feito um registro controle e, a partir daí, as drogas foram adicionadas ao sistema. Primeiro, salina, para assegurar que o volume utilizado era adequado, depois AK (100; 300µg e 1mg), digoxina (75µg), atropina (150µg) e adrenalina (30 e 300ng), em *bolus*.

Coração de cobaio

Após estabilização, foi registrado o controle normal, controle salina e as drogas, digoxina (0,75; 7,5 e 75 μ g) e AK (100; 300 μ g e 1mg), em *bolus*. Após o efeito máximo obtido com digoxina (75 μ g) um período de 20 minutos para o retorno dos batimentos cardíacos à linha de base foi registrado e, só então, as doses de AK foram adicionadas.

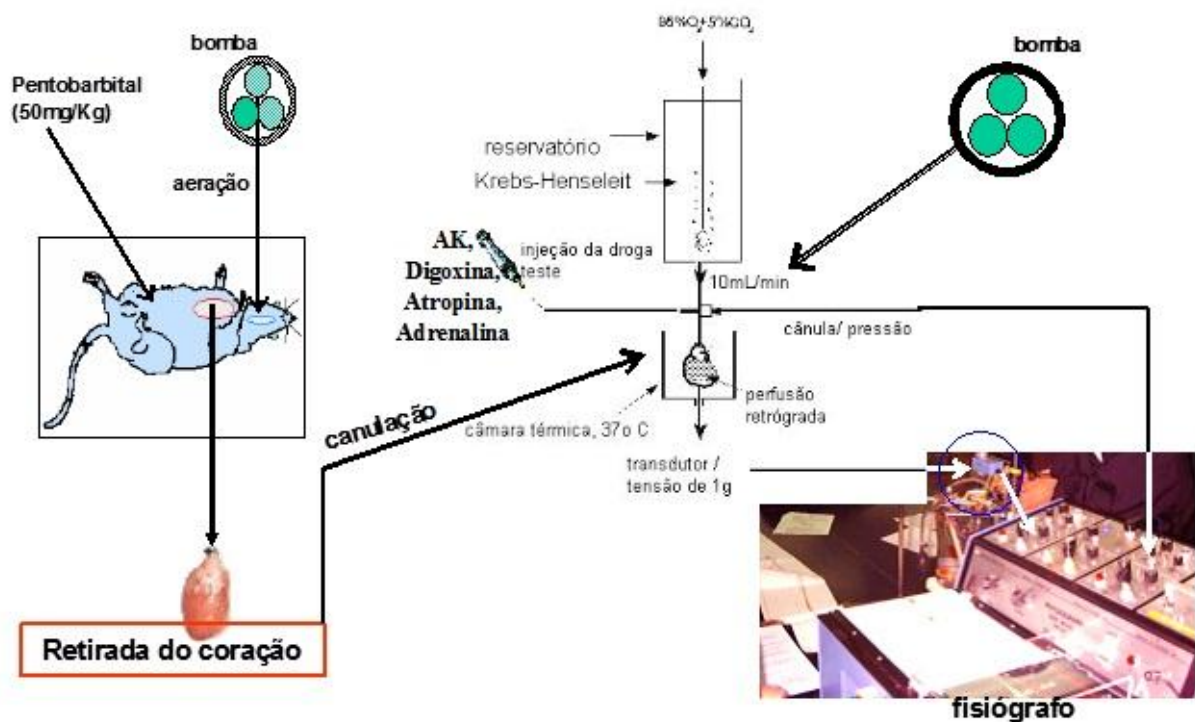


FIGURA 14: Estudo do AK sobre o coração inteiro isolado.

4.5.3. ÁTRIO ISOLADO

Ratos Wistar machos (250-300g) foram sacrificados por deslocamento cervical seguido de sangria. O átrio esquerdo e o direito foram dissecados dos ventrículos e, separadamente, montados em banhos de 10mL contendo solução de Krebs-Henseleit aerada (95% O₂ e 5% CO₂, pH 7,4) e aquecida (37°C). Uma tensão de 1g foi aplicada aos átrios e o sistema foi equilibrado por 1h. O registro da frequência cardíaca (número de batimentos por minuto, bpm, átrio direito) ou da força de contração (átrio esquerdo) foi feito pelo uso de um transdutor (F60) acoplado a um polígrafo (DMP-4B Narco Biosystems).

Após o período de estabilização, curvas dose-resposta foram feitas para veículo (DMSO, isovolumetricamente) ou AK (1; 3; 10; 30; 100; 300µg/mL e 1mg/mL: concentrações finais dentro dos banhos, o que corresponde a 3; 10; 30; 100µM; 1 e 3mM). As drogas são adicionadas em intervalos de 3 a 4 minutos. Ao final, isoproterenol, PM 211,25 (1µg/mL, equivalente a 5µM) foi adicionado aos 2 sistemas para a observação da ação do mesmo sobre os átrios na presença do AK.

Átrio Direito

O efeito da droga no cronotropismo foi avaliado sobre a atividade mecânica espontânea do marcapasso, registrada pelo polígrafo (DMP-4B, Narco Biosystems), e depois calculado o número de batimentos por minuto (bpm).

Átrio Esquerdo

Os batimentos foram estimulados por um eletrodo bipolar ligado a um estimulador Grass S6 (Grass, Quincy, MA, USA). O estímulo tem duração de 5ms numa voltagem de 8V (10% acima do limiar). O efeito inotrópico foi obtido pelo registro da amplitude máxima da força isométrica desenvolvida durante o estímulo elétrico numa frequência fixa de 150bpm, antes e após o uso da droga. Os dados foram expressos como percentual do controle (100%).

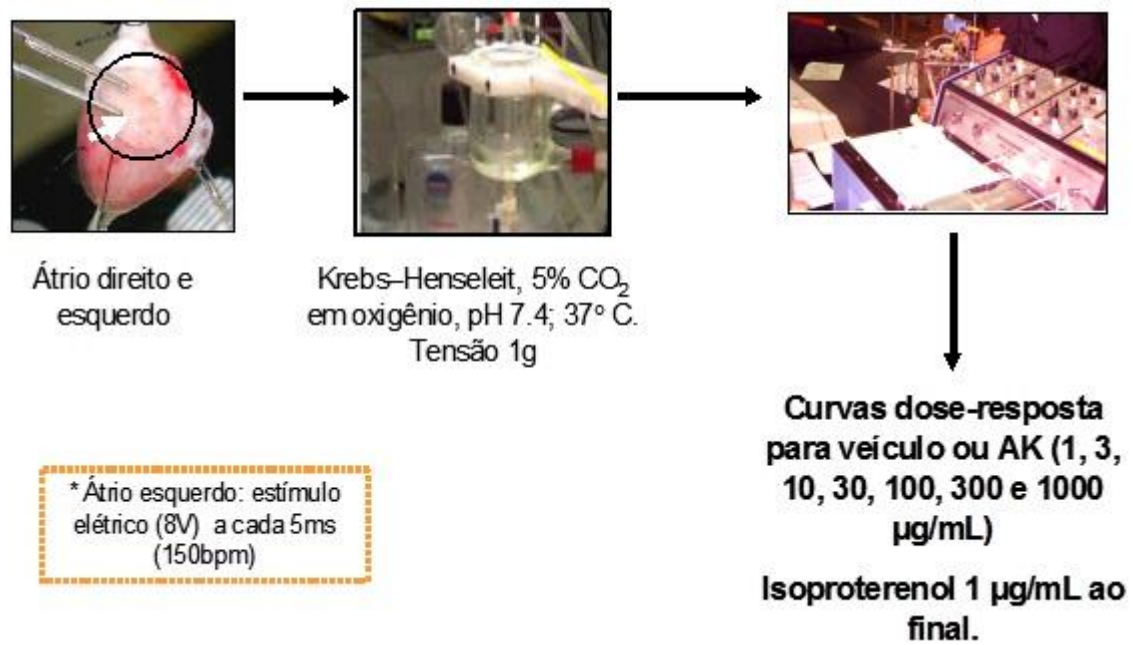


FIGURA 15: Estudo do AK sobre o inotropismo e o cronotropismo cardíacos em átrios isolados de rato.

4.5.4. ANEL DE AORTA ISOLADO

Ratos foram sacrificados por deslocamento cervical e, imediatamente após sacrifício, um anel proveniente da aorta torácica do rato sem dano ao endotélio foi montado em banho de 10mL contendo solução de Krebs-Henseleit, aerado (95% O₂ e 5% CO₂) e aquecido (37°C), ligado a um polígrafo (DMP-4B, Narco Biosystems) por meio de um transdutor de deslocamento de força, sob uma tensão de 1g. Após 1h de estabilização do sistema, o experimento foi iniciado.

Efeito do AK sobre o anel de aorta pré-contráido com fenilefrina

O anel de aorta foi pré-contráido com fenilefrina, PM 203,67 (entre 1 – 10µg/mL, equivalente a 5 - 50µM) e o platô contrátil obtido foi considerado como controle. Duas curvas cumulativas, para o veículo (DMSO, isovolumetricamente ao usado na curva de AK) ou para o AK (1; 3; 10; 30; 100; 300µg/mL, o mesmo que 3; 10; 30; 100; 300µM e 1mM) foram feitas, com as doses adicionadas em intervalos de 3 minutos sobre o platô da contração tônica (sustentada). Ao final da curva de AK, e sem lavar o tecido, adicionou-se ACh 1mM (concentração final no banho).

Efeito do AK sobre a curva dose-resposta de fenilefrina em anel de aorta

Após a montagem e estabilização do anel de aorta, uma curva contrátil cumulativa de fenilefrina (10⁻¹²M a 10⁻⁵M) foi feita como controle. Após lavagem e nova estabilização, o anel de aorta foi pré-incubado com AK (12,5; 25 e 50µg/mL = 40; 80 e 160µM) por 10 minutos e novas curvas de fenilefrina refeitas na presença da droga nas várias concentrações a serem testadas.

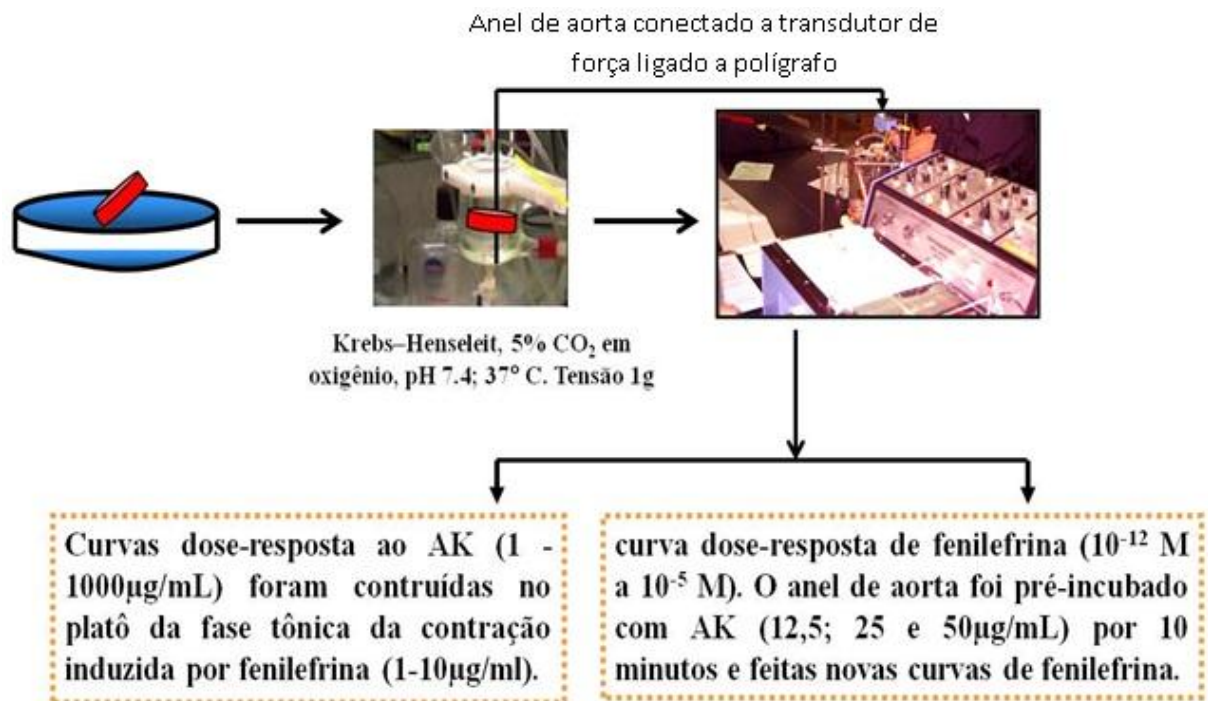


FIGURA 16: Estudo do AK sobre o músculo liso vascular (anel de aorta).

4.5.5. FLUXO VASCULAR MESENTÉRICO

Ratos machos (peso entre 250 e 300g, n=6) foram sacrificados por deslocamento cervical e feita excisão da cavidade abdominal com posterior dissecação e exposição da artéria mesentérica superior. Esta foi canulada e perfundida com uma solução de Krebs-Henseleit a 37°C. A ligação entre o leito arterial mesentérico e a parede intestinal foi delicadamente rompida e o leito canulado transferido para um sistema de perfusão a fluxo constante (3,5mL/min) de uma solução aerada (5%CO₂) de Krebs-Henseleit a 37°C. Um transdutor de pressão foi conectado a uma entrada da cânula do leito e as mudanças na pressão de perfusão registradas em polígrafo. O leito mesentérico foi perfundido com a solução fisiológica para efeito de estabilização por 1h antes do início do experimento. Após este período, foi feito o registro da pressão basal e, então, perfundida fenilefrina 1μM. Sobre o platô da contração sustentada de fenilefrina foi perfundido ácido caurenóico (12,5; 25; 50; 100 e 200μg/mL = 40; 80; 160; 320 e 640μM), em intervalos de 3 minutos, e registrados seus efeitos.

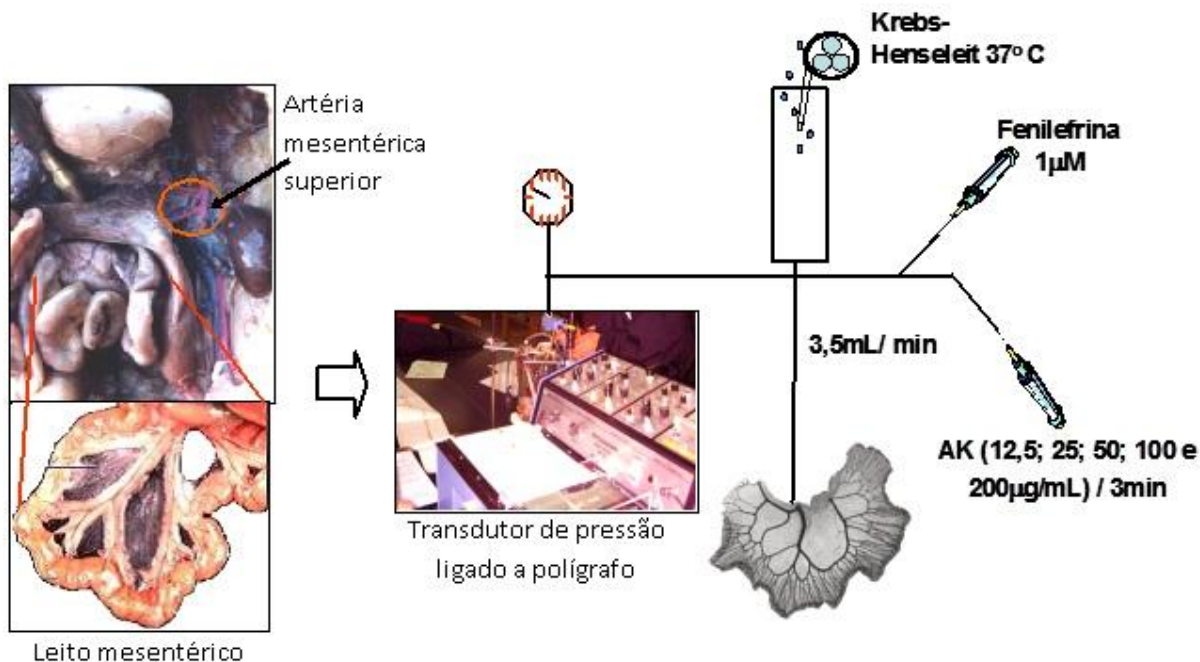


FIGURA 17: Estudo do AK sobre o fluxo vascular mesentérico.

4.6. AÇÃO SOBRE O APARELHO RESPIRATÓRIO

4.6.1. MEDIDA DA RESISTÊNCIA TRAQUEOBRÔNQUICA *IN VIVO*

Ratos machos foram anestesiados com pentobarbital sódico (50mg/Kg; i.p) e mantidos em mesa cirúrgica apropriada. A artéria carótida e veia femoral foram canuladas para registro direto da pressão e injeção da droga, respectivamente. A pressão arterial média foi monitorada utilizando-se um transdutor de pressão Staham P23 (Gould, Oxnard, CA, USA) acoplado a um fisiógrafo (Narco Biosystems, Houston, TX, USA). A seguir, após traqueostomia, uma cânula endotraqueal de aço inoxidável foi implantada e acoplada a um ventilador artificial (Ugo Basile, Comerio, Va, IT, rodent ventilator 7025) calibrado para 40 incursões por minuto (volume de ar de 3mL). Um ramo da cânula conectado a um transdutor de broncoespasmo (Ugo Basile, Comerio, Va, IT, modelo 7020), encontrava-se acoplado a um pré-amplificador multifuncional (Ugo Basile, modelo 7082) e a um registrador de dois canais Gemini (Ugo Basile, modelo 7070). O arranjo desta preparação seguiu o método original de KONZETT E ROESSLER (1940). Após estabelecimento de uma resistência basal, a resposta individual à injeção endovenosa de AK (10 a 1000µg/Kg), foi estudada. O registro do efeito de cada dose foi feito por um período de 5 minutos. Como a potência do AK para atividade não é conhecida, apenas a observação de alterações na frequência respiratória e a comparação de eficácia broncodilatadora foram realizadas.

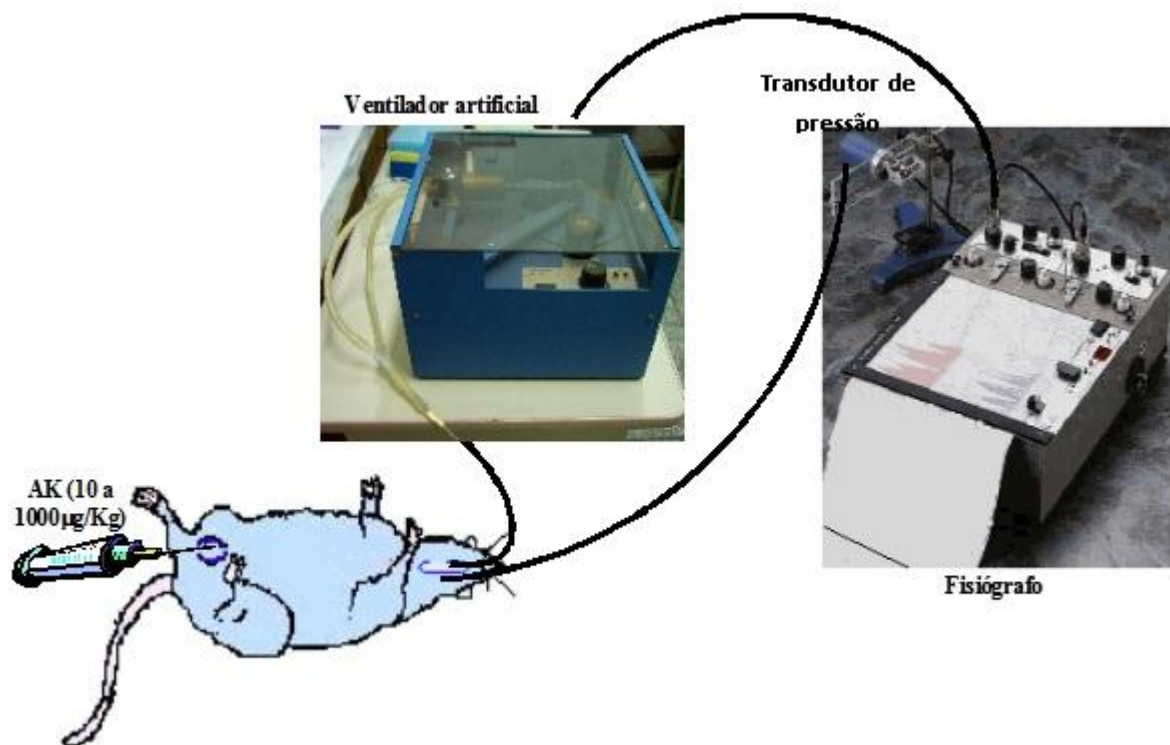


FIGURA 18: Estudo do AK sobre a resistência traqueobrônquica de ratos.

4.7. AÇÃO SOBRE O SISTEMA REPRODUTOR FEMININO E SOBRE E SOBRE OS EVENTOS REPRODUTIVOS LIGADOS À MÃE E AO CONCEPTO

4.7.1. ATIVIDADE ESTROGÊNICA EM RATAS IMPÚBERES

Fêmeas de rato com idade entre 19 e 21 dias de nascidas (antes da puberdade), foram pesadas, divididas em grupos e tratadas com a droga teste (AK 25 ou 50mg/Kg), ou somente seu veículo (DMSO 5%, 0,3mL), por gavagem. O tratamento com AK foi associado ou não com uma injeção subcutânea de estrógeno (dietilestilbestrol, 300µg, padronizado para todas as fêmeas tratadas com o mesmo), ou seu diluente (óleo de girassol), por um período de 3 dias. Durante o tratamento, essas fêmeas foram observadas para a ocorrência de abertura vaginal. No 4º dia, após esta observação, os animais foram novamente pesados, sacrificados por deslocamento cervical e seus úteros retirados, pesados e fixados para histologia. O peso dos úteros foi padronizado de acordo com o peso médio dos animais. A observação de uma atividade estrogênica ou antiestrogênica da droga foi feita pela análise dos resultados obtidos pela presença ou não de abertura vaginal, peso dos úteros e alterações histológicas dos mesmos, comparando-a aos grupos controle, normal e controle positivo (estrógeno).

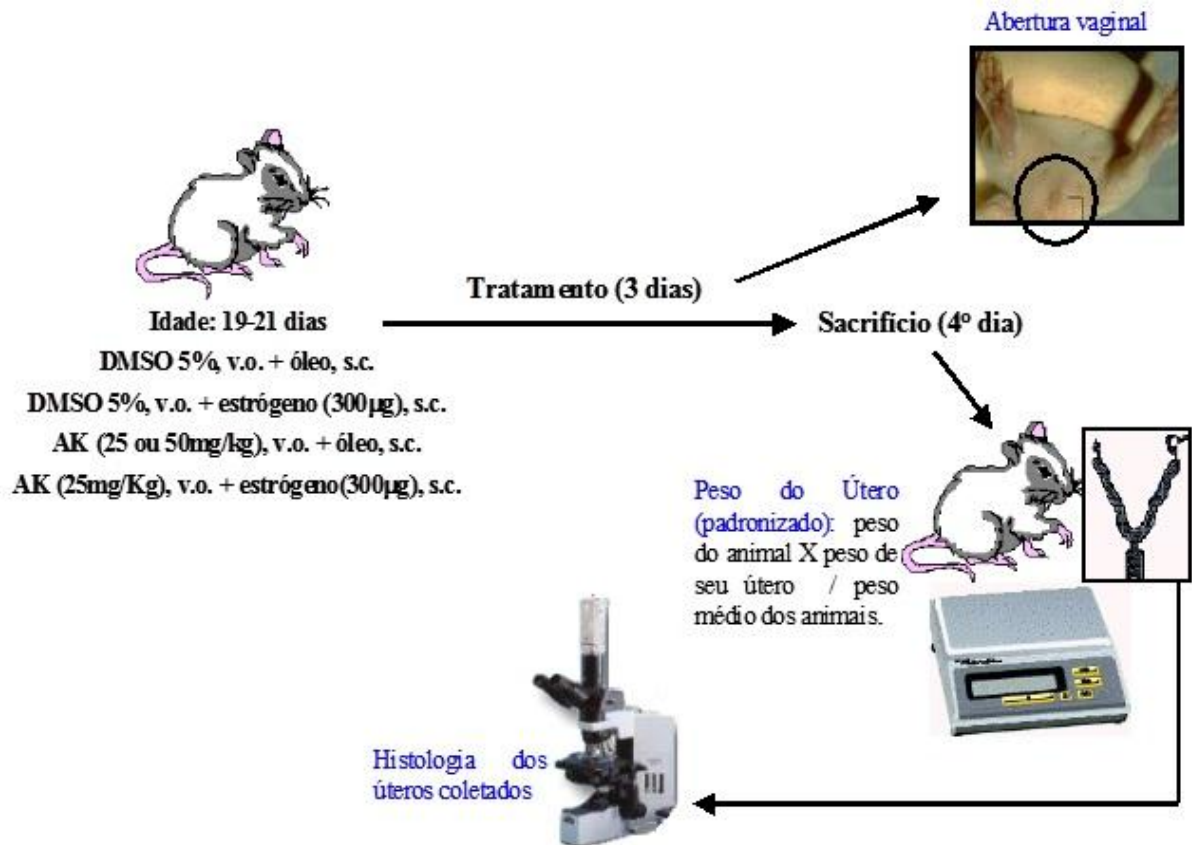


FIGURA 19: Estudo da atividade estrogênica do AK em ratas imaturas.

4.7.2. ENSAIO EM CAMUNDONGAS PRENHES

Geral

Todas as fêmeas utilizadas foram colocadas junto a machos para o acasalamento na proporção de 2/1, por volta das 6h da noite. Cerca de 18h mais tarde, na manhã do dia seguinte, os machos foram retirados e aquelas fêmeas em cujo canal vaginal se observou um tampão (*plug*) de esperma foram consideradas no 1º dia de gestação e utilizadas para os protocolos experimentais. Todas estas foram pesadas no início e ao final dos tratamentos e no dia de seus sacrifícios, e estes tratamentos se deram por via oral.

Efeito na implantação do ovo e embriogênese

As fêmeas prenhes foram tratadas com AK (25 e 50mg/Kg), água ou veículo (DMSO 5%), do 1º ao 7º dia de gravidez e sacrificadas no 10º dia de gestação. Após o sacrifício foram realizadas as quantificações dos sítios de implantação embrionários, dos corpos lúteos (CL) e a perda embrionária durante o tratamento, com coleta de material para histologia. Noutro protocolo, para determinar se o possível efeito da droga se dá sobre a fase de pré-implantação ou na pós-implantação, as fêmeas foram tratadas ou do 1º ao 3º dia (pré-implantação), ou do 4º ao 8º dia (pós-implantação) de gestação, com aquela dose que causou efeito significativo de perda embrionária no protocolo anterior. Esses dois grupos também foram sacrificados no 10º dia de gestação e houve coleta de material para avaliação histológica. (FIGURA 20)

Efeito na organogênese fetal

Performance reprodutiva: as fêmeas foram tratadas com AK (25 e 50mg/Kg), água, veículo (DMSO 5%) ou indometacina (INDO, 2 e 4mg/Kg) do 8º ao 15º dia de gravidez e sacrificadas no 20º dia para a observação e contagem de corpos lúteos, presença de reabsorções e fetos mortos e número de fetos vivos. (FIGURA 20)

Avaliação fetal: Os fetos vivos foram pesados com e sem seus anexos fetais. Posteriormente, foram avaliados quanto à presença de alterações morfológicas externas visíveis (contorno do crânio, face/focinho, olhos, orelhas, mandíbula, tronco, extremidades, cauda e ânus). Após a avaliação externa, metade dos fetos foi fixada com líquido de Bouin

(25mL/feto) por um período de 10 dias a duas semanas, Após esse período eles foram removidos e imersos em água por 10 minutos para a posterior análise da presença, formato e disposição dos principais órgãos internos de acordo com o método de Barrow (1965) que determina os cortes (FIGURA 22) e quais os órgãos a serem observados (palato, bulbo olfatório e cérebro – ventrículos laterais e terceiro ventrículo; entradas da traquéia, do esôfago e coluna vertebral; coração, pulmões e timo; estômago, pâncreas, baço, fígado, adrenais e rins; bexiga e aparelho reprodutor). A outra metade dos fetos foi preparada para coloração com vermelho de alizarina (Sigma Co) que colore as regiões do esqueleto onde já houve substituição de cartilagem por tecido ósseo (STAPLES E SCHENELL, 1964) (FIGURA 21). Os pontos de ossificação (metacarpos e metatarsos, falanges proximais anteriores e posteriores, esternobras, vértebras cervicais e caudais) foram contados para determinar o desenvolvimento fetal segundo método proposto por ALIVERTI *et al* (1979) (FIGURA 21). Os úteros das fêmeas que perderam a gestação foram processados para exame histológico.

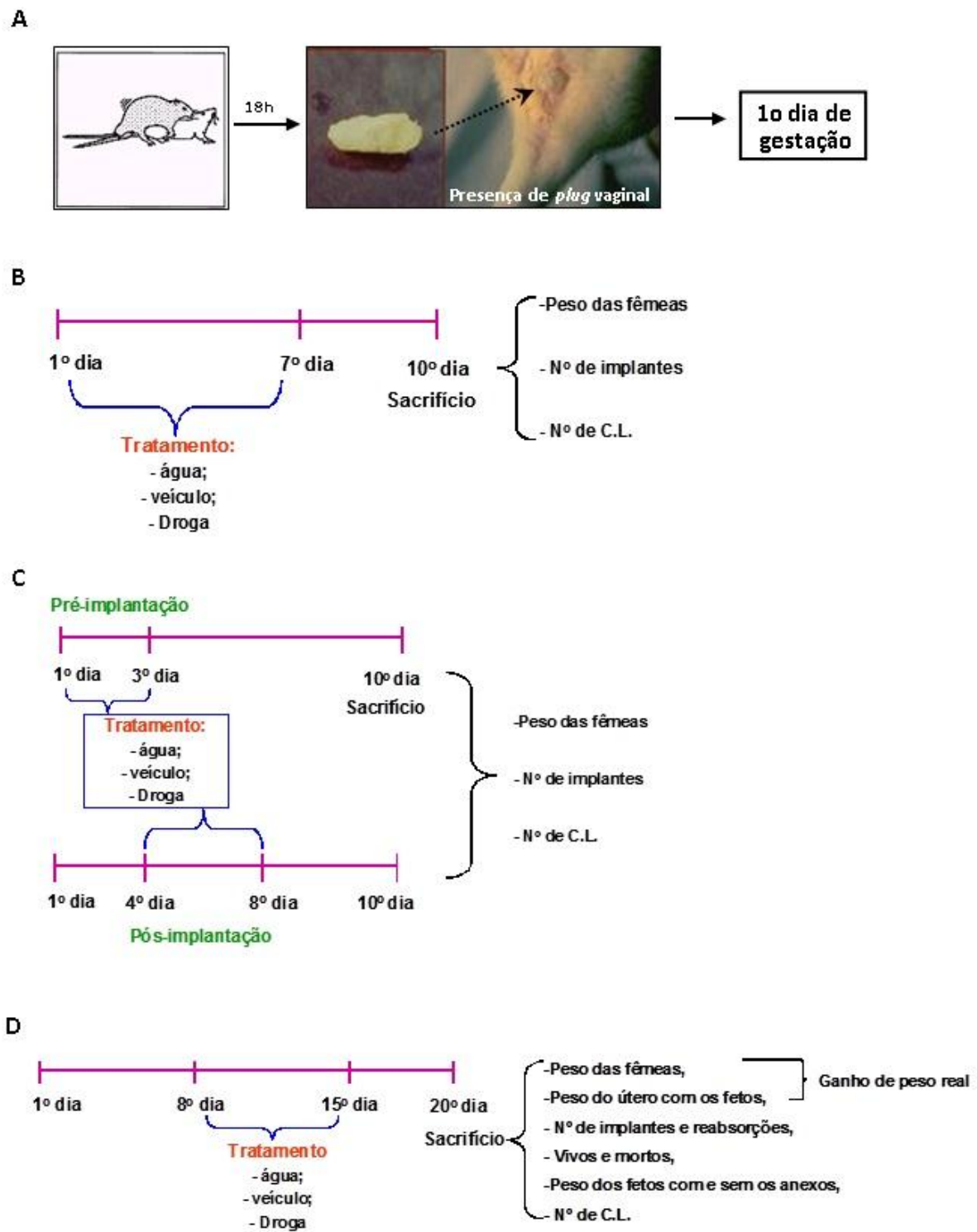


FIGURA 20: Ensaios em camundongas prenhes. (A) Acasalamento e determinação da gravidez; (B) Tratamento durante o período de implantação e embriogênese; (C) Tratamento na pré-implantação ou na pós-implantação; e (D) Tratamento durante o período de organogênese.

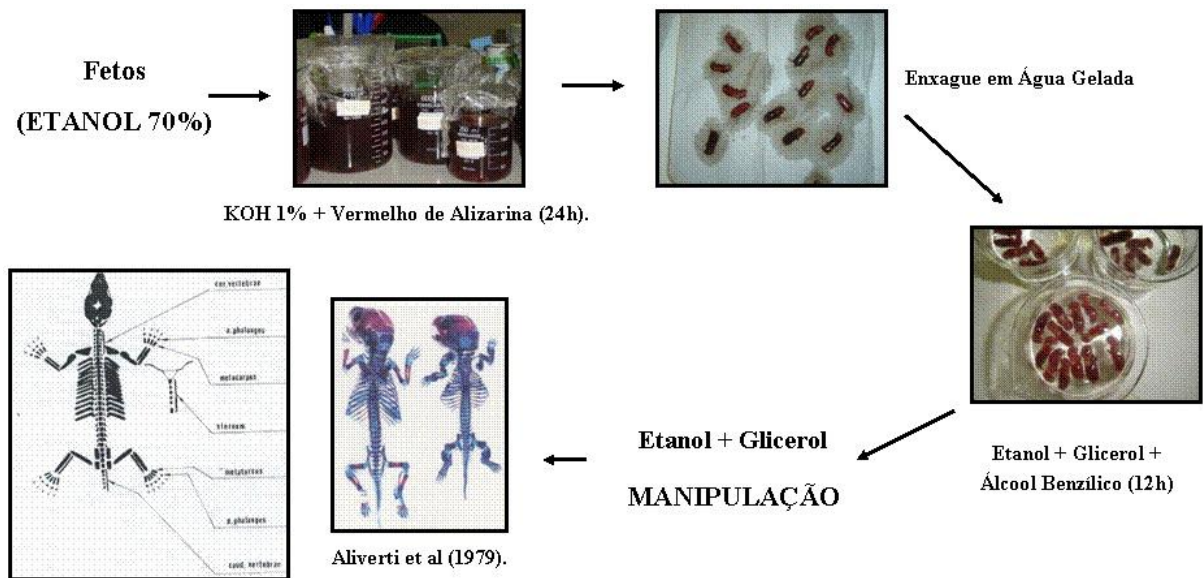


FIGURA 21: Metodologia de preparação dos fetos (Staples e Schenell, 1964) para avaliação do índice de desenvolvimento ósseo fetal de acordo com Aliverti *et al* (1979)

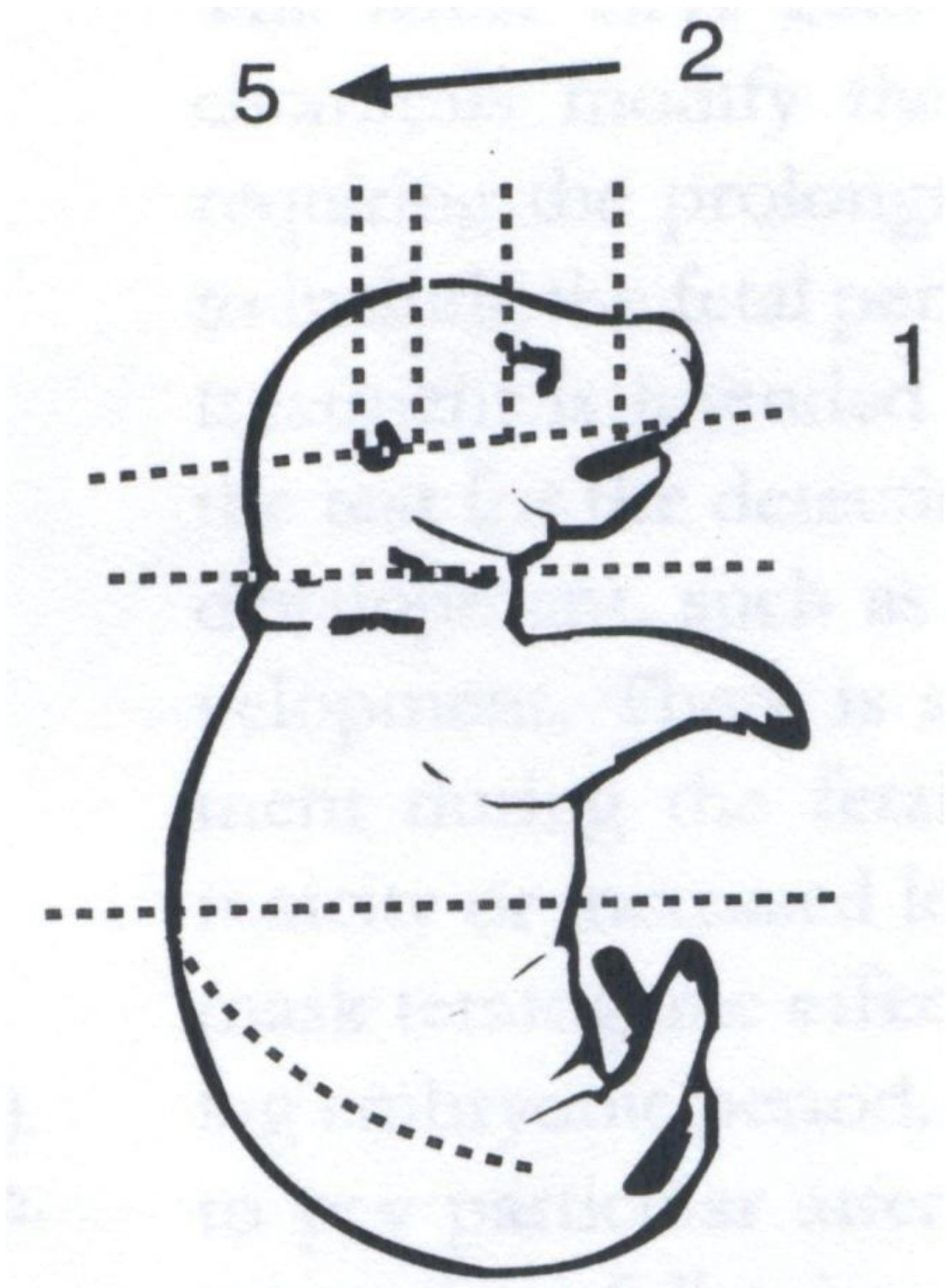


FIGURA 22: Seqüência de cortes a serem realizados para a observação interna dos fetos segundo o método de Barrow (1965).

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média, com exceção da análise do índice de ossificação fetal onde foram utilizadas as medianas para expressão dos valores obtidos.

Na análise dos dados no ensaio para *Artemia sp* (n=30) a CL₅₀ foi determinada de acordo com o método descrito por Litchfield & Wilcoxon (1949). Já para o cálculo da CI₅₀ dos ensaios de toxicidade para ouriços e células tumorais, e da CE₅₀ do ensaio hemolítico foram obtidos a partir da regressão não linear (n=5). Os intervalos de confiança das análises foram de 95%.

As médias dos dados de toxicidade sobre o aparelho cardiovascular (n=3 a 9), respiratório (n=4), sistema nervoso central (n=8), e de toxicidade materna e *performance* reprodutiva (n=6 a 16) (considerando-se que os dados sobre a reprodução apresentaram distribuição normal) foram analisados por análise de variância (ANOVA), e seguidos do de Student-Newman Keul ou do teste de Dunett.

Na análise relacionada à presença de malformações ou variações fetais (n=25 a 106) foi de realizado o teste ANOVA, seguido de Student-Newman-Keul quando relacionado à média dos centros de ossificação do feto, e o teste de McNemar quando foram consideradas as medianas das regiões do esqueleto escolhidas para avaliação do índice de ossificação fetal.

Para todos os ensaios foram considerados significativos os resultados que apresentaram a probabilidade de ocorrência de hipótese nula menor que 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. TOXICIDADE *IN VITRO*

5.1.1. TOXICIDADE PARA *Artemia sp*

AK (1 – 300µg/mL = 3µM – 1mM) apresentou **CL₅₀** de **2 ± 0,48µg/mL** (6 ± 1,44µM), mostrando ser cerca de dez vezes mais tóxico que o controle positivo dicromato de potássio de **CL₅₀** **20 ± 1,83µg/mL** (67 ± 6,1µM).

O percentual de mortos para as diversas concentrações das drogas pode ser observado na TABELA 4.

5.1.2. ATIVIDADE HEMOLÍTICA

AK (3 - 800 µM) induziu hemólise dose-dependente dos eritrócitos de camundongos e humanos, com **CE₅₀** **de 74µM** (58.0 – 94.3) e **56,4µM** (46.5 – 68.5), respectivamente.

5.1.3. ENSAIO ANTIPROLIFERATIVO PARA CÉLULAS TUMORAIS

AK (1,3 – 83µM) na concentração de **78µM** produziu **inibição de 95%** do crescimento de células leucêmicas **CEM**, e de **45%** em células tumorais mamárias **MCF-7** e de câncer de cólon **HCT-8**.

5.1.4. TOXICIDADE PARA OURIÇOS (*Litechinus variegatus*)

AK (10 - 300µM) inibiu a primeira clivagem após a fertilização com **CI₅₀** **84,2 µM** (73.7 – 96.3), assim como inibiu o desenvolvimento dos embriões com **CI₅₀**: **44,7µM** (40.9 – 48.7) e **<10µM** (este último sem cálculo para dispersão porque a CI₅₀ foi inferior à menor concentração testada), para os estágios de blástula e larval (FIGURA 23), respectivamente.

TABELA 4: Percentual de náuplios mortos durante a exposição às diferentes concentrações de AK, dicromato de potássio ou veículo.

Droga	mortos	%mortos	%corrigido (para 0 e 100%)	Probito
água marinha (controle)	0	0	0,83	2,674
DMSO 5% (veículo)	0	0	0,83	2,674
AK (µg/mL)*				
1	12	40		4,747
3	19	63,33		5,3455
10	24	80		5,842
30	25	83,33		5,954
300	30	100	99,17	7,326
Dicromato de potássio (µg/mL)*				
10	2	6,67		3,4845
30	18	60		5,253
100	30	100	99,17	7,326

*Valores correspondentes em molar:

AK = 3, 10, 30, 100µM e 1mM, e Dicromato de Potássio ($K_2Cr_2O_7$) = 34, 102 e 340µM

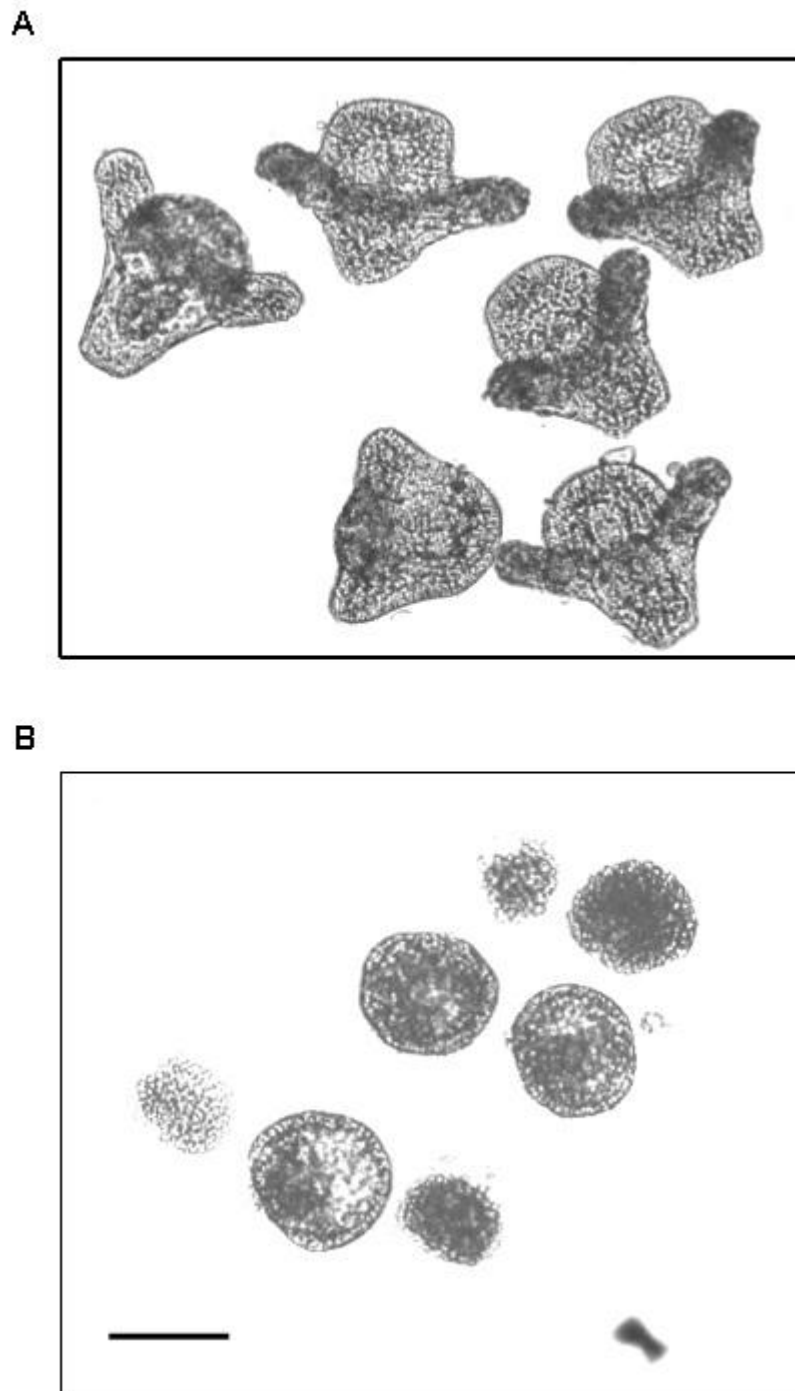


FIGURA 23: Efeito do AK sobre o desenvolvimento das larvas de ouriço (*L. variegatus*). (A) Larvas do grupo controle, e (B) larvas do grupo tratado com AK 30μM. Barra horizontal = 100μm.

5.2. TOXICIDADE AGUDA PARA CAMUNDONGOS

Os animais não apresentaram nenhuma alteração dos parâmetros observados que indicasse toxicidade para o AK durante os tempos relacionados (0, 1, 2, 3, 4, 24, 48 e 72h), nem tão pouco, vieram a óbito dentro deste período, para ambos os sexos e vias de administração, nas doses administradas (100, 200 ou 500mg/Kg e 1g/Kg).

5.3. AÇÃO SOBRE O SNC

5.3.1. TESTE DA ATIVIDADE EXPLORATÓRIA

Teste do campo aberto

AK (25 e 50mg/Kg) não alterou a movimentação espontânea ou número de cruzamentos ($57,2 \pm 7,4$ e $40,8 \pm 4,4$), não alterou o comportamento de autolimpeza, *grooming* ($1,33 \pm 0,42$ e $1,67 \pm 0,5$) e nem o comportamento de levantar, *rearing* ($32,7 \pm 3$ e $32,2 \pm 2,4$), observados quando comparados aos controles ($43,3 \pm 6,3$; $1,33 \pm 0,6$ e $38,8 \pm 2$) nos três parâmetros analisados, respectivamente.

5.3.2. TESTE DA COORDENAÇÃO MOTORA

Teste da barra giratória

No que diz-respeito aos tempo de permanência dos animais na barra giratória ($t_{\max} = 120$ segundos), AK nas doses de 25mg/Kg ($113,4 \pm 6,63$ segundos), 50 mg/Kg (115 ± 5 segundos) e 100mg/Kg ($105,6 \pm 11,14$ segundos) não promoveu incoordenação motora nos animais, seja por sedação, seja por relaxamento muscular, quando comparado ao controle ($118,6 \pm 1,44$ segundo).

5.4. AÇÃO SOBRE O APARELHO CARDIOVASCULAR

5.4.1. ELETROCARDIOGRAMA (ECG) E PRESSÃO ARTERIAL

O Ácido caurenóico (AK) induz bradicardia dose-dependente. Os valores da frequência cardíaca, Fc (bpm), observada foram: controle normal ($380 \pm 0,3$), controle veículo ($375 \pm 0,7$), AK 5mg (AK5 = $375 \pm 0,75$), AK 7,5mg (AK7,5 = $362 \pm 2,2$, $p < 0,01$ vs controles, e $p < 0,05$ vs AK5), AK 10mg (AK10 = $331,5 \pm 2,4$, $p < 0,001$ vs controles, AK5 e AK7,5). Contudo, AK induziu hipotensão apenas na maior dose utilizada, 10mg (AK10, com $82,6 \pm 17,9$ mmHg, $p < 0,05$ vs controle, $126,7 \pm 5,9$ mmHg). Os outros parâmetros eletrocardiográficos analisados não foram alterados pelo AK. No entanto, houve uma tendência geral a aumento do intervalo P-R. (FIGURA 24, FIGURA 25, FIGURA 26, TABELA 5).

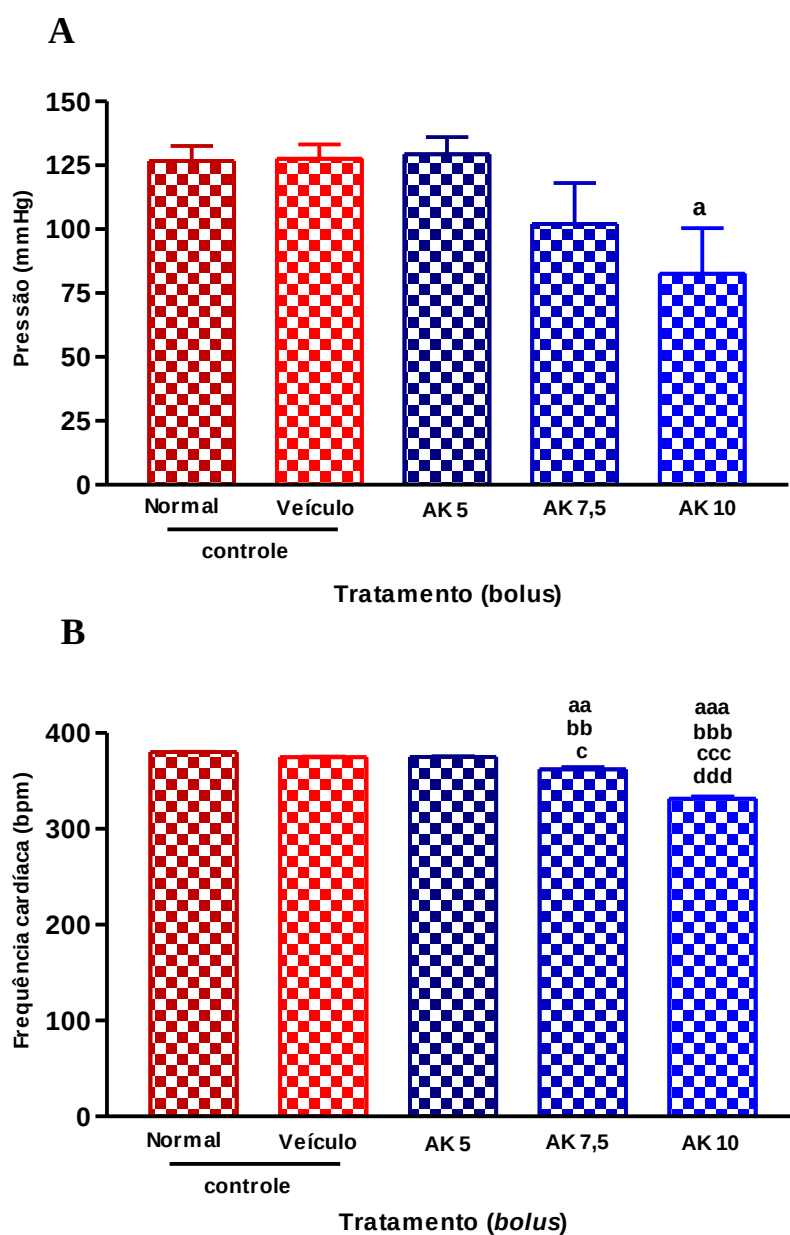


FIGURA 24: Efeito do AK sobre a pressão arterial direta (**A**) e frequência cardíaca (**B**) de ratos normotensos anestesiados. Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM (n=9). ^ap<0,05 e ^{aa}p<0,01 vs controle normal, ^{bb}p<0,01 vs controle veículo, ^cp<0,05 e ^{ccc}p<0,001 vs AK5, ^{ddd}p<0,001 vs AK7,5. (ANOVA, Student-Newman-Keul).

TABELA 5: Intervalo das ondas do eletrocardiograma (ECG) de ratos normotensos anestesiados que receberam diferentes doses de ácido caurenóico (em *bolus*).

Intervalo (ms)	Controle	Veículo (DMSO 5%)	AK (mg)		
			5	7,5	10
P-R	55,721 ± 4,3	59,2646 ± 4,83	60 ± 5,5	63,1917 ± 2,57	71,0125 ± 11,32
R-R (Fc)	380,1384 ± 10	374,909 ± 9,52	375 ± 10	362,1872 ± 3,92 ^{aa,bb,c}	329,6696 ± 46,51 ^{aaa,bbb,ccc,ddd}
QRS	90,130 ± 8,05	91,11 ± 9,06	89,7 ± 9,4	57,93 ± 29,63	81,663 ± 23,24
Q-T	90,02 ± 2,65	113,31 ± 3,9	98,4 ± 0,5	95,27 ± 0,17	104,28 ± 1,62
Q-T_c	4,62 ± 0,84	5,84 ± 12,66	5,08 ± 0,05	5 ± 8,6	5,74 ± 0,24

Os dados foram expressos como média ± EPM (n=9), onde ^{aa}p<0,01 vs controle normal, ^{bb}p<0,01 vs controle veículo, ^cp<0,05 e ^{ccc}p<0,001 vs AK5, ^{ddd}p<0,001 vs AK7,5. (ANOVA, Student-Newman-Keul).

QT_c=QT/√RR

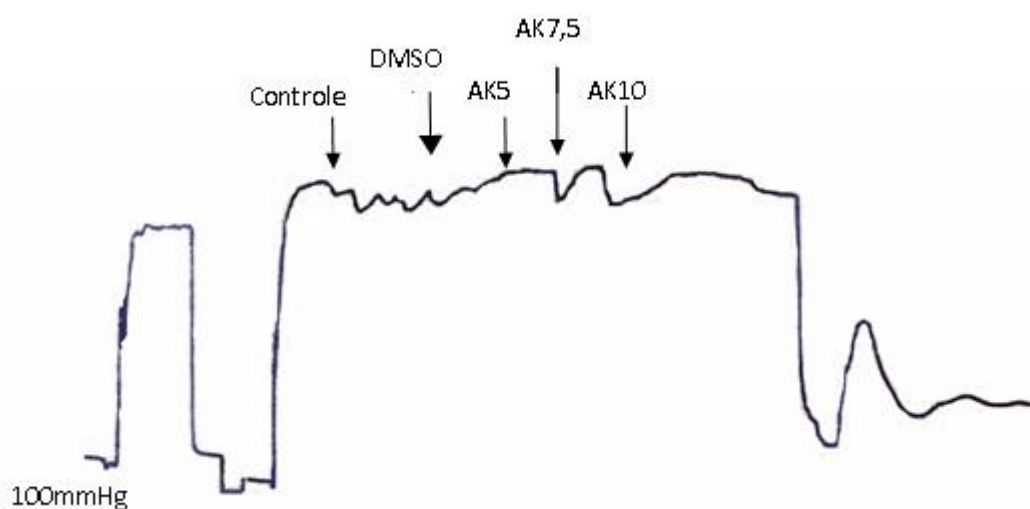


FIGURA 25: Registro fisiográfico representativo de experimento referente à medida direta da pressão arterial de rato normotenso tratado com AK.

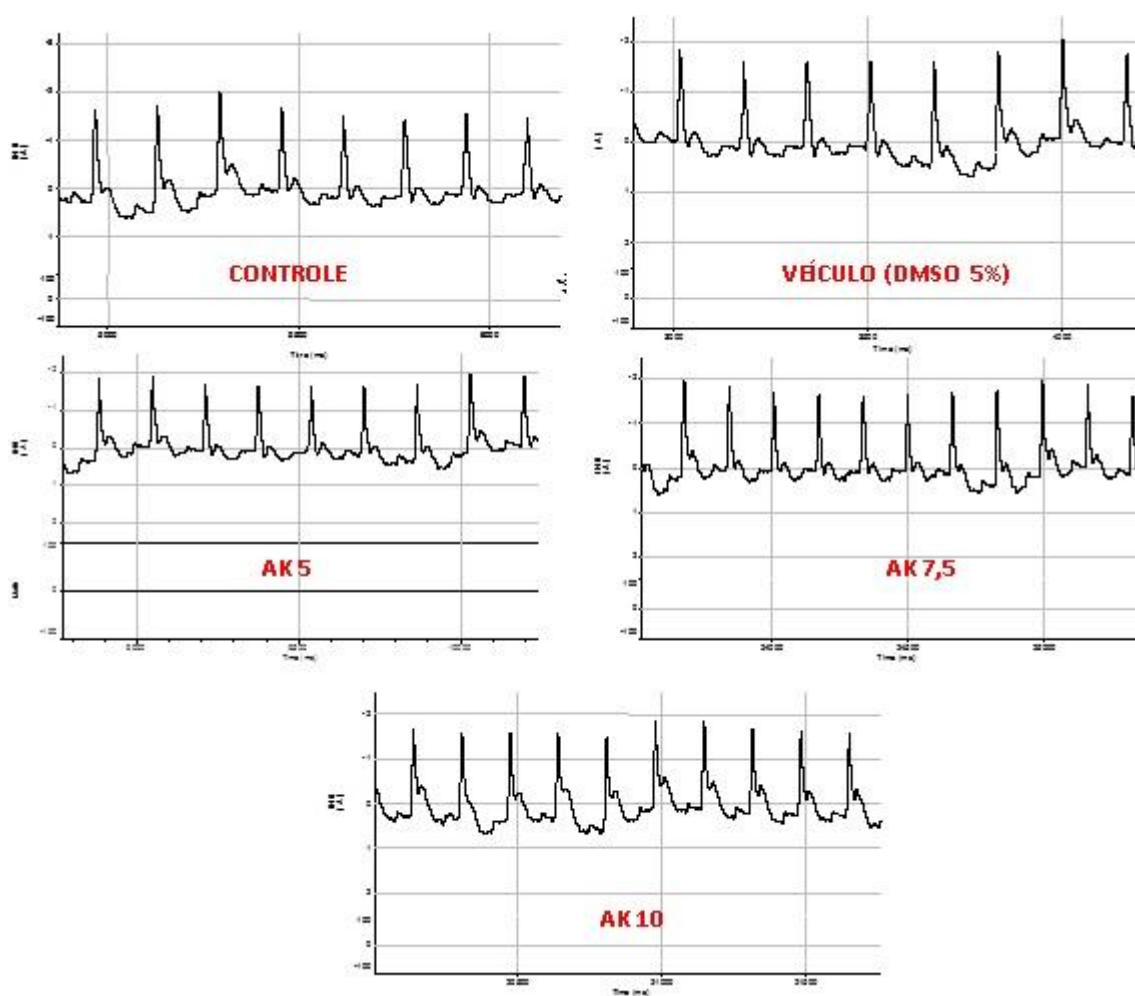


FIGURA 26: Registro eletrocardiográfico representativo de experimento realizado em rato normotenso tratado com AK.

5.4.2. CORAÇÃO ISOLADO

A média das contrações chamadas de controle (registro feito após o período de estabilização e antes da aplicação das drogas) foi considerada como contração máxima, equivalente a 100%, a partir da qual os percentuais de aumento ou redução na contração do coração, na presença das drogas usadas, foram expressos.

Efeito sobre coração isolado de rato

No coração perfundido de rato, AK produziu efeito inotrópico negativo na maior dose (1mg), com uma redução de $59\% \pm 5,5\%$ ($p < 0,01$), mas não nas doses de 100 e 300 μ g, em *bolus*. O efeito depressor foi parcialmente antagonizado apenas por adrenalina 300ng em *bolus*, com um aumento de $32\% \pm 5\%$. Não houve alteração nas pressões sistólica e diastólica. (FIGURA 27A, FIGURA 28A, FIGURA 29A, FIGURA 30A)

Efeito sobre coração isolado de cobaio

Em coração de cobaio, AK produziu efeito inotrópico negativo significativo, quando comparado aos controles (normal e salina) nas doses de 300 μ g (redução de $47\% \pm 16\%$, $p < 0,01$) e 1mg (redução de $50\% \pm 0$ com $p < 0,05$), em *bolus*. AK não demonstrou efeito inotrópico positivo como o da digoxina 75 μ g (aumento de $100\% \pm 32\%$, $p < 0,001$), em *bolus*. (FIGURA 27B, FIGURA 28B, FIGURA 29B, FIGURA 30B)

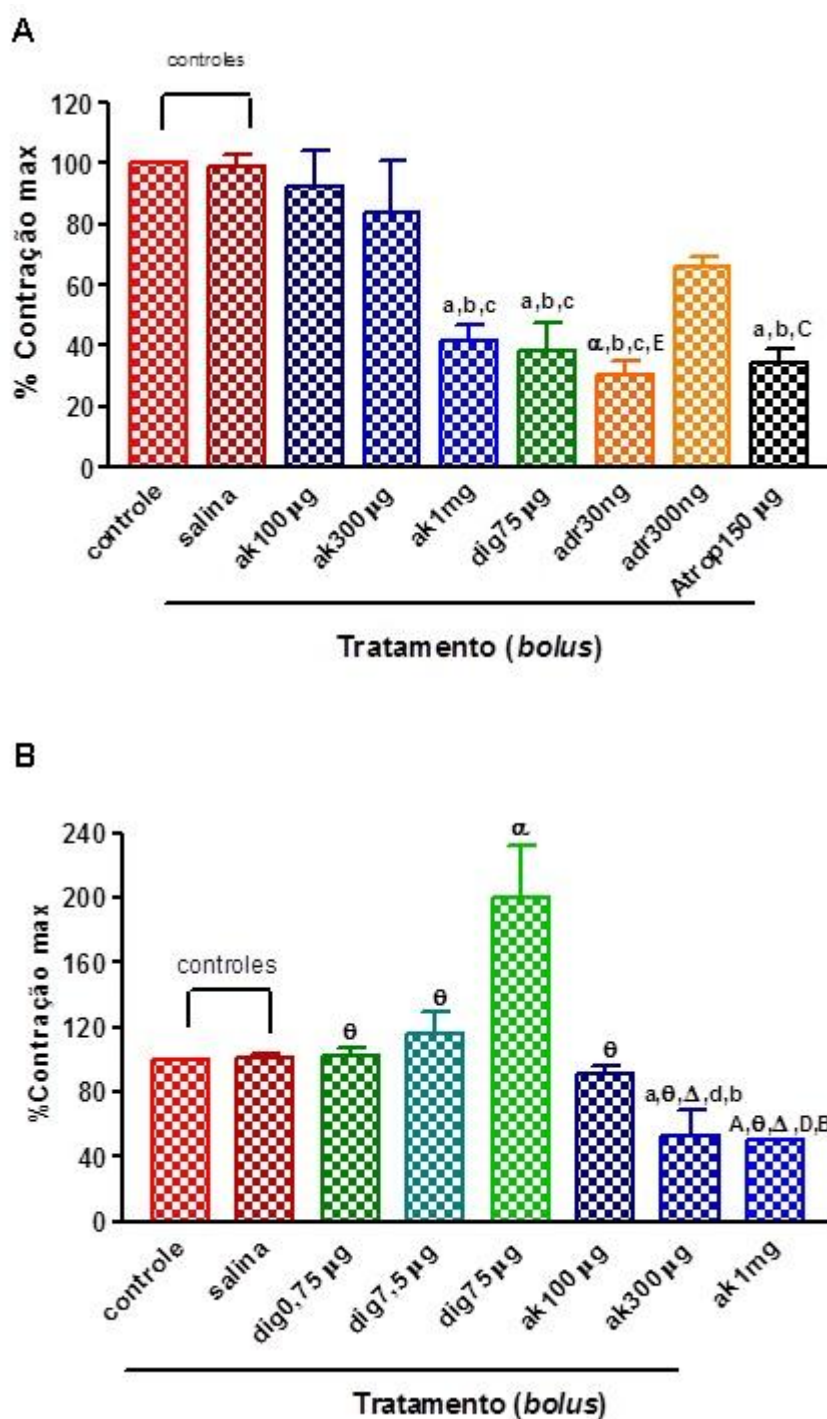


FIGURA 27: Efeito do AK (100 e 300µg e 1mg, em *bolus*) sobre a força de contração cardíaca em coração isolado (**A**) de rato e (**B**) de cobaio.

Os dados foram expressos como média ± EPM (n= 3 e 4). Os grupos foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$ ou menos (Student Newman Keul).

^A $p < 0,05$ vs controles, ^a $p < 0,01$ vs controles, ^α $p < 0,001$ vs controles, ^B $p < 0,05$ vs AK 100 µg, ^b $p < 0,01$ vs AK 100 µg, ^C $p < 0,05$ vs AK 300 µg, ^c $p < 0,01$ vs AK 300 µg, ^D $p < 0,05$ vs DIG 0,75 µg, ^d $p < 0,01$ vs DIG 0,75 µg, ^Δ $p < 0,01$ vs DIG 7,5 µg, ^θ $p < 0,001$ vs DIG 75µg, ^E $p < 0,05$ vs adr 300 ng .

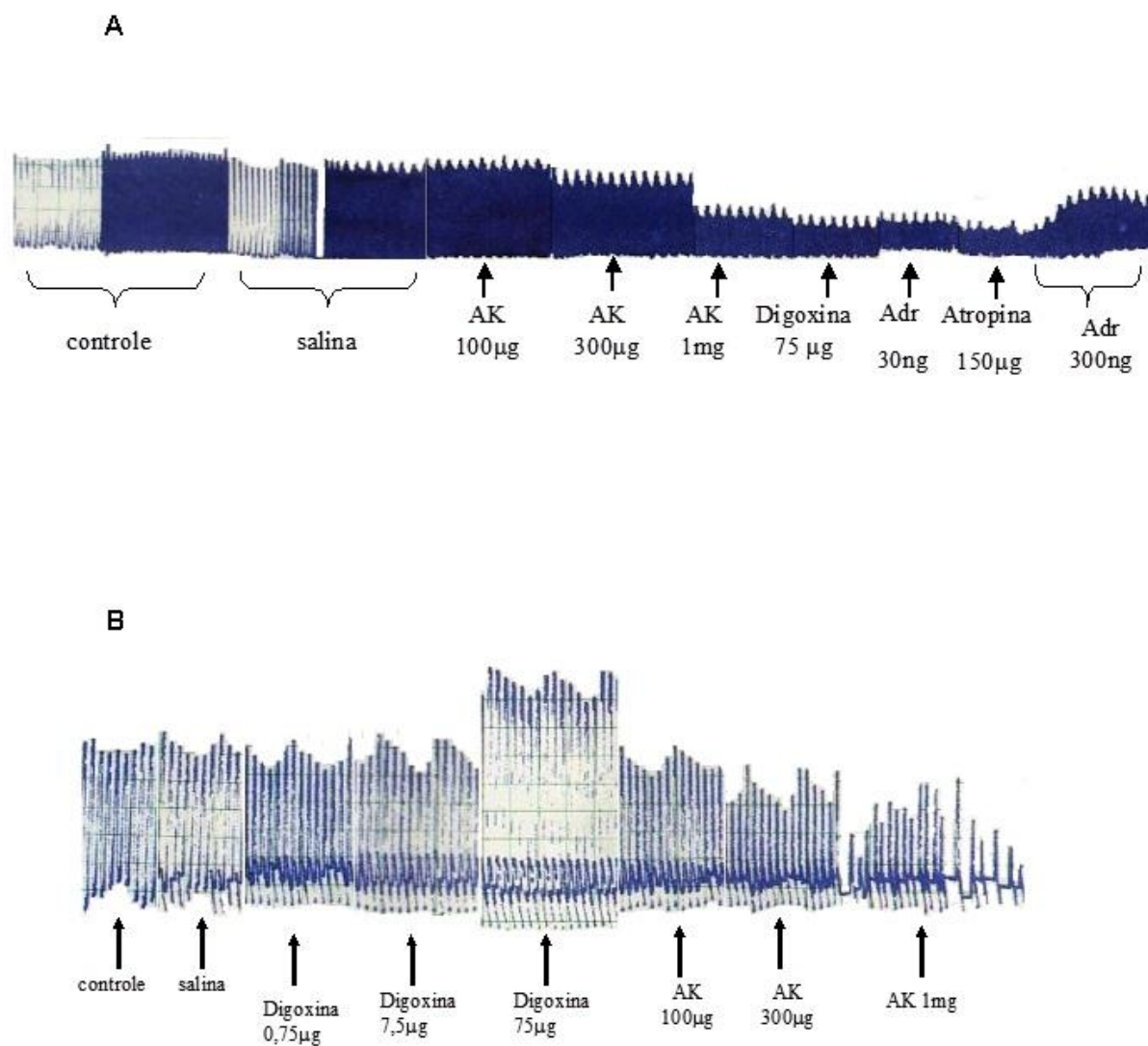


FIGURA 28: Registros fisiográficos representativos do efeito do AK (100 e 300µg e 1mg, em *bolus*) sobre a força de contração cardíaca em coração isolado: (A) de rato e, (B) de cobaio.

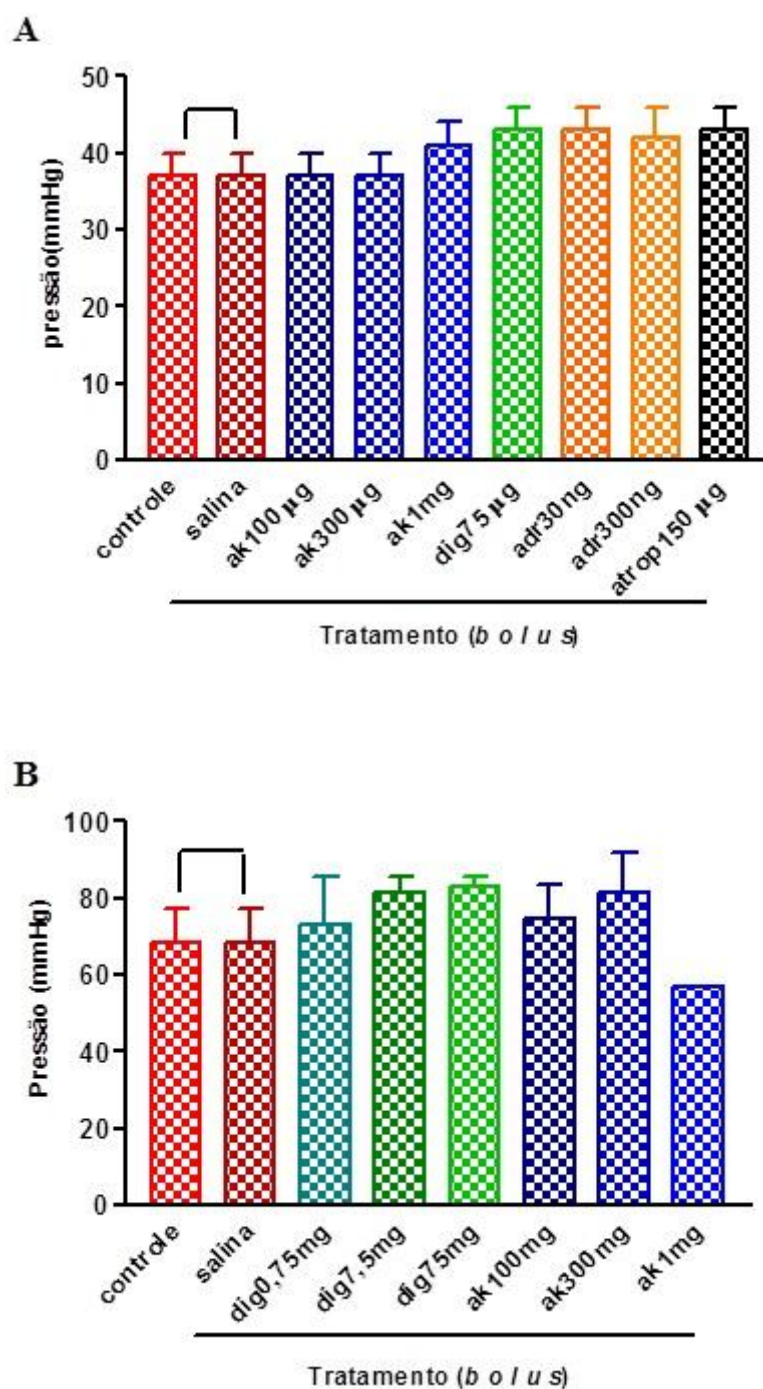


FIGURA 29: Efeito do AK sobre a pressão registrada em coração isolado **(A)** de rato e **(B)** de cobaio. Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM (n= 3 e 4). Os grupos foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$ ou menos (Student Newman Keul).

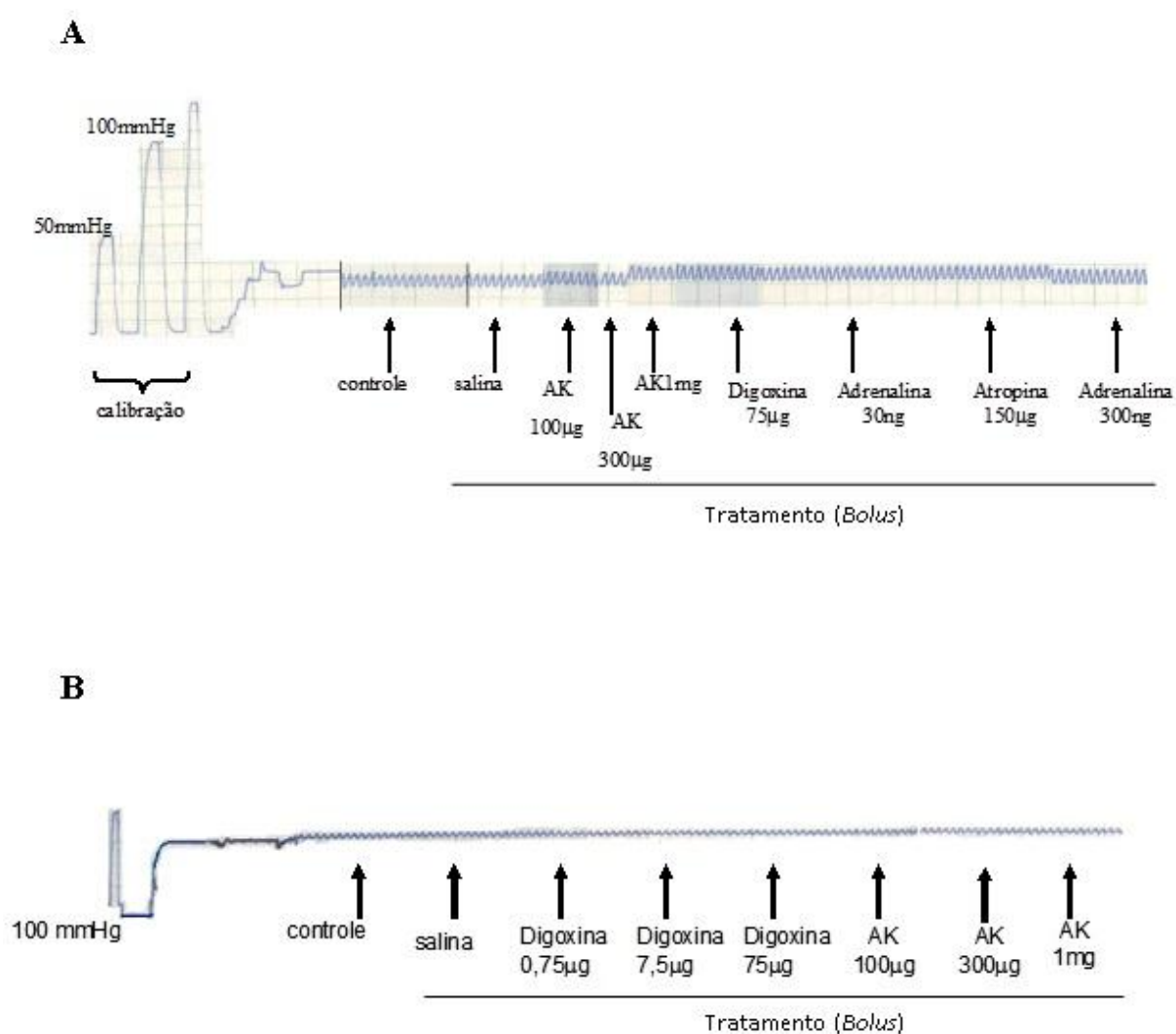


FIGURA 30: Registro fisiográfico representativo do efeito do AK sobre a pressão registrada em coração isolado (**A**) de rato e (**B**) de cobaio.

5.4.3. ÁTRIO ISOLADO

Efeito do AK sobre o cronotropismo (bpm)

Nem o veículo, nem AK (1; 3; 10; 30; 100; 300; 1000 μ g/mL = 3 μ M a 3mM), adicionados cumulativamente ao banho que continha o átrio direito isolado, promoveram qualquer mudança na frequência cardíaca quando comparados ao controle. Isoproterenol (1 μ g/mL = 5 μ M), um agonista adrenérgico, aumentou significativamente a frequência cardíaca, quando comparado ao controle (FIGURA 31A, FIGURA 32A).

Efeito do AK sobre o inotropismo

Nem o veículo, nem AK (1; 3; 10; 30; 100; 300; 1000 μ g/mL = 3 μ M a 3mM), adicionados cumulativamente ao banho que continha o átrio esquerdo isolado e sob estímulo elétrico, promoveram qualquer mudança na força de contração quando comparados ao controle. Isoproterenol (1 μ g/mL = 5 μ M), um agonista adrenérgico, aumentou significativamente a força de contração, quando comparado ao controle. (FIGURA 31B, FIGURA 32B)

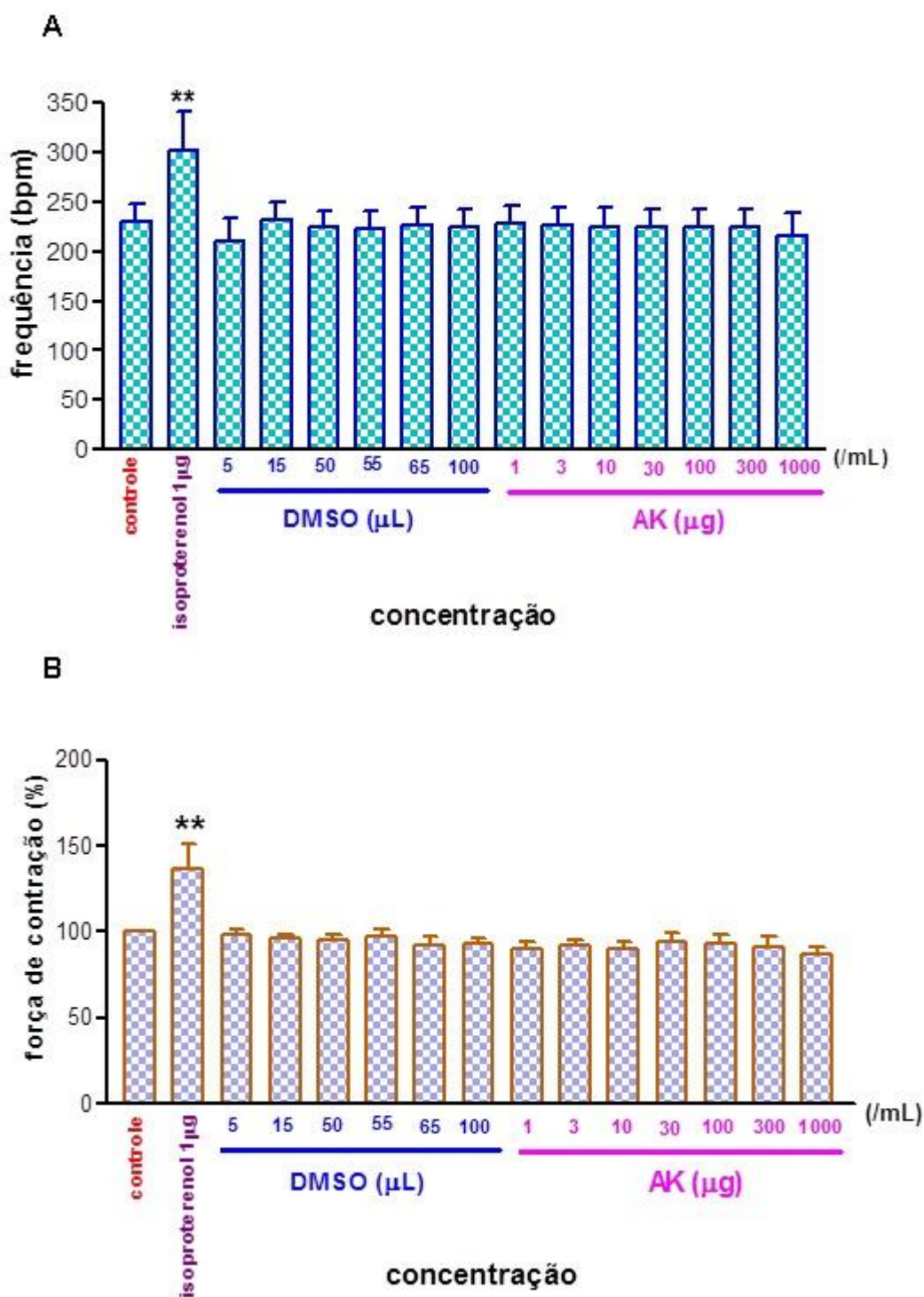


FIGURA 31: Ação do AK sobre o cronotropismo (A) e sobre o inotropismo (B) em átrio isolado de rato. Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM ($n = 5$ a 6). ** $p < 0,01$ vs controle (Student Newman Keul). AK 1-1000 $\mu\text{g/mL}$ = $3\mu\text{M}$ a 3mM . Isoproterenol $1\mu\text{g/mL}$ = $5\mu\text{M}$

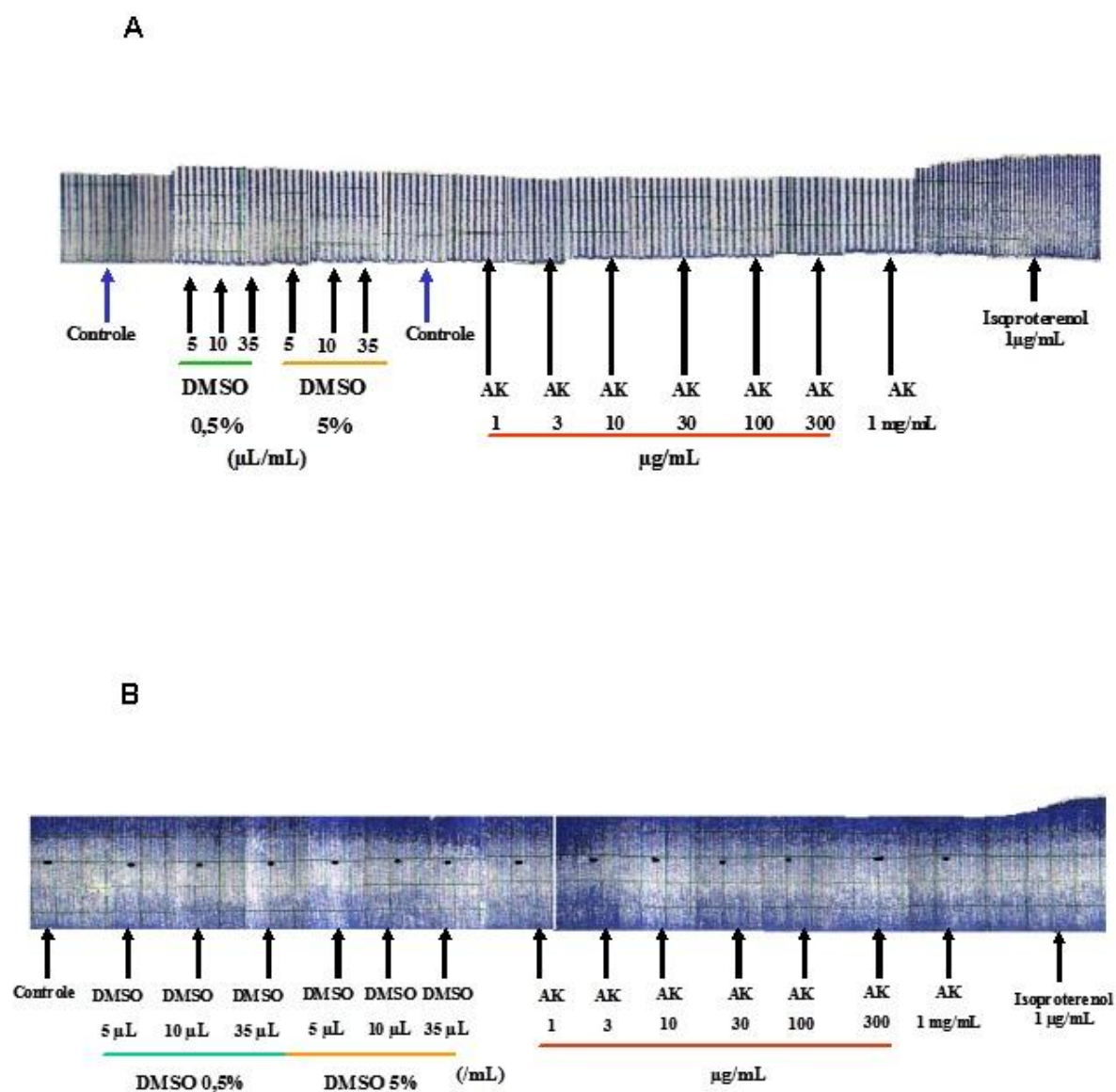


FIGURA 32: Registros fisiográficos representativos da ação do AK sobre o cronotropismo (A, átrio direito) e sobre o inotropismo (B, átrio esquerdo) em átrios isolados de rato. AK 1-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ = 3 μM a 3 mM . Isoproterenol 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ = 5 μM

5.4.4. ANEL DE AORTA ISOLADO

Efeito do AK sobre o anel de aorta pré-contráído com fenilefrina

AK (1 - 300 μ g/mL = 3 μ M – 1mM), adicionado cumulativamente sobre o platô da contração tônica promovida por fenilefrina, não foi capaz de promover relaxamento. ACh (1 μ M) adicionada ao final do experimento, sem que o tecido fosse lavado, relaxou significativamente a contração tônica do anel de aorta pela fenilefrina. (FIGURA 33A, FIGURA 34A)

Efeito do AK sobre a curva dose-resposta de fenilefrina em anel de aorta

O anel de aorta pré-incubado com AK (12,5; 25 e 50 μ g/mL = 40; 80 e 160 μ M) por 10 minutos reduziu a resposta contrátil obtida pela adição cumulativa de fenilefrina (10⁻¹²M a 3x10⁻⁵M) de forma significativa (p<0,001) apenas na maior concentração de AK.(FIGURA 33B, FIGURA 34B)

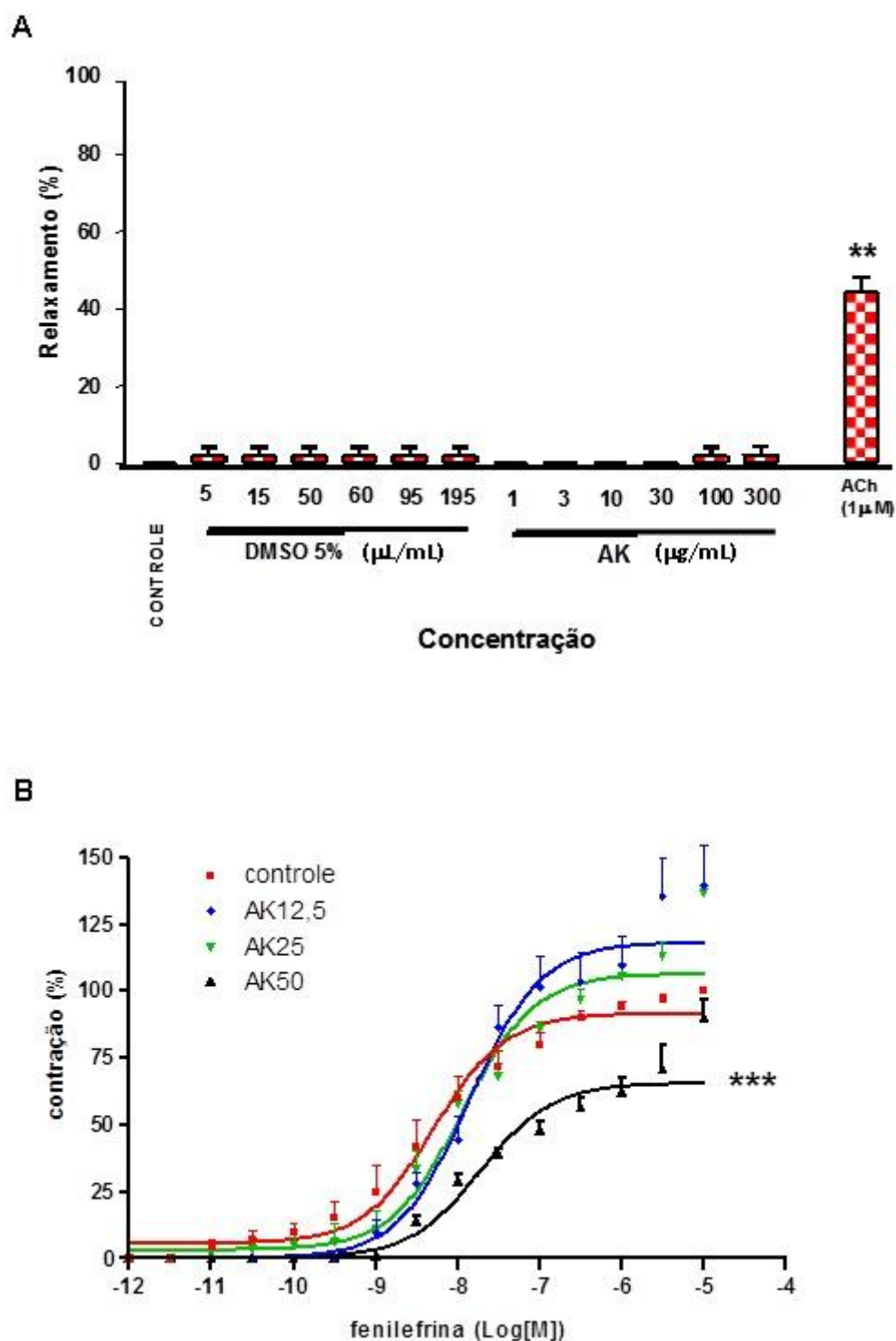


FIGURA 33: Efeito do (A) AK (1 a $300\mu\text{g/mL}$ = $3\mu\text{M}$ a 1mM) sobre a contração tônica sustentada (Phe, $1\text{-}10\mu\text{M}$) ou, (B) AK (12,5; 25 e $50\mu\text{g/mL}$ = 40; 80 e $160\mu\text{M}$) sobre a curva dose-resposta à fenilefrina (10^{-12} a 10^{-5}M) em anel de aorta *in vitro*. Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM ($n = 5$ a 6). ** $p < 0,01$ vs controle ou *** $p < 0,001$ vs controle (Student Newman Keul).

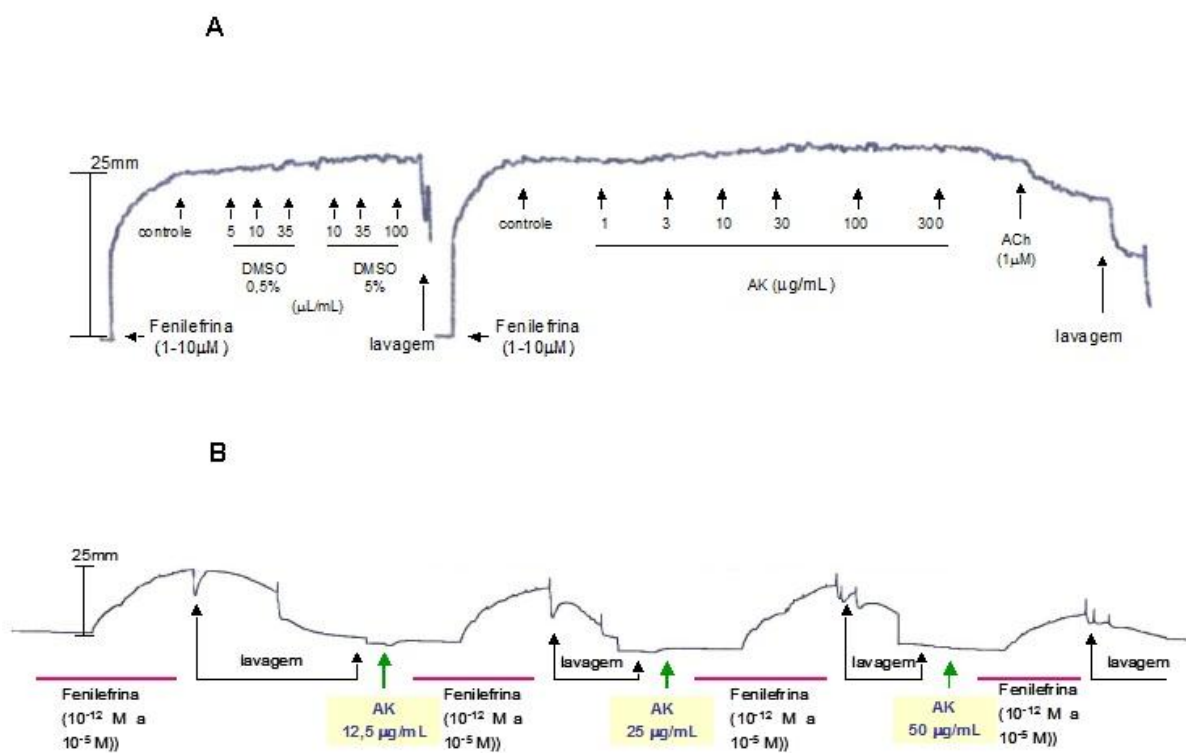


FIGURA 34: Registros fisiográficos representativos de (A) ação do AK (1 a 300 μg/mL = 3 μM a 1 mM) sobre a contração tônica de anel de aorta por fenilefrina (1 - 10 μM) e, (B) efeito do AK (12,5; 25 e 50 μg/mL = 40; 80 e 160 μM) sobre a curva dose-resposta à fenilefrina (10⁻¹² a 10⁻⁵ M).

5.4.5. FLUXO VASCULAR MESENTÉRICO

O AK, nas várias concentrações usadas (12,5 a 200 μ g/mL = 40 a 640 μ M), não aumentou nem reduziu a pressão do leito vascular mesentérico quando este se encontrava sob estímulo sustentado por fenilefrina 1 μ M. (FIGURA 35, FIGURA 36)

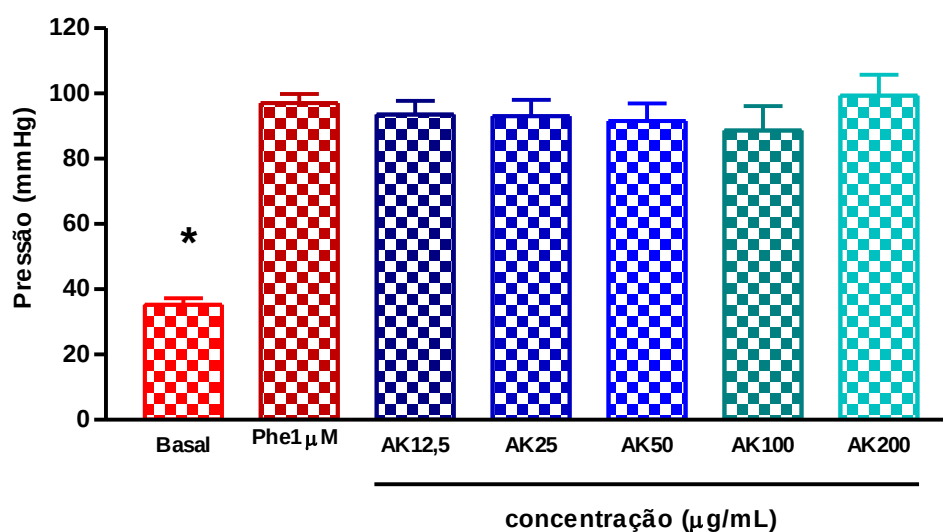


FIGURA 35: Efeito do AK sobre a pressão registrada em leito vascular mesentérico isolado. Os dados foram expressos como média $\pm$ SEM (n=6). Os grupos são considerados significativamente diferentes quando * $p < 0,05$ vs tecido estimulado por fenilefrina (ANOVA, Student Newman Keul).

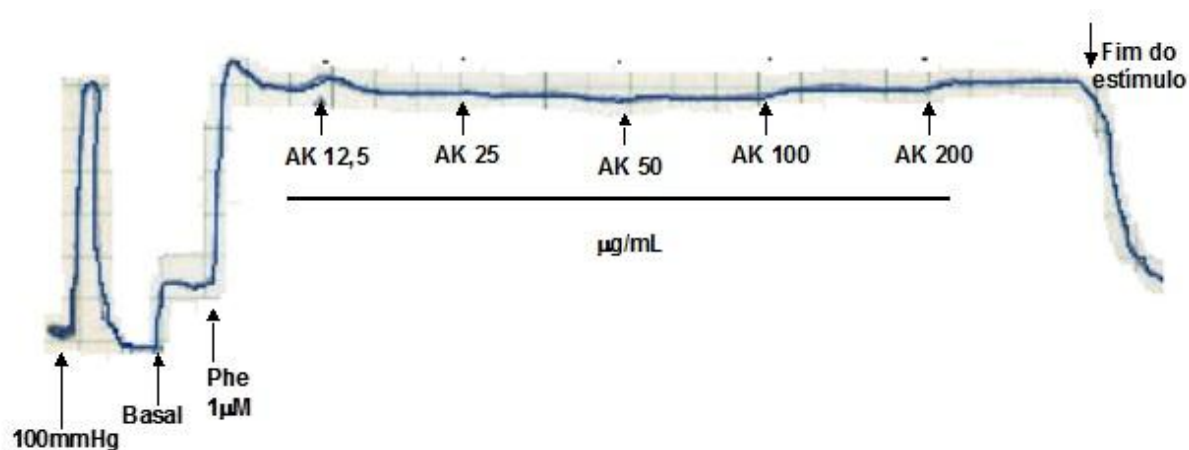


FIGURA 36: Registro fisiográfico representativo do efeito do AK sobre a pressão registrada em leito vascular mesentérico isolado.

5.5. AÇÃO SOBRE O APARELHO RESPIRATÓRIO:

5.5.1. MEDIDA DA RESISTÊNCIA TRAQUEOBRÔNQUICA *IN VIVO*

O ácido caurenóico (AK), nas doses testadas (10 a 1000 μ g/Kg), aplicadas por via endovenosa, não possui atividade broncodilatadora quando comparado à resistência basal, nem promoveu nenhuma outra alteração observável na atividade respiratória (FIGURA 37D, FIGURA 38B), ou seja, não reduziu a resistência. AK (10 a 1000 μ g/Kg), bem como não alterou as pressões sistólica nem diastólica (FIGURA 37A E B, FIGURA 38A). A frequência cardíaca também permaneceu inalterada após a aplicação de AK (10 a 1000 μ g/Kg) (FIGURA 37C, FIGURA 38A).

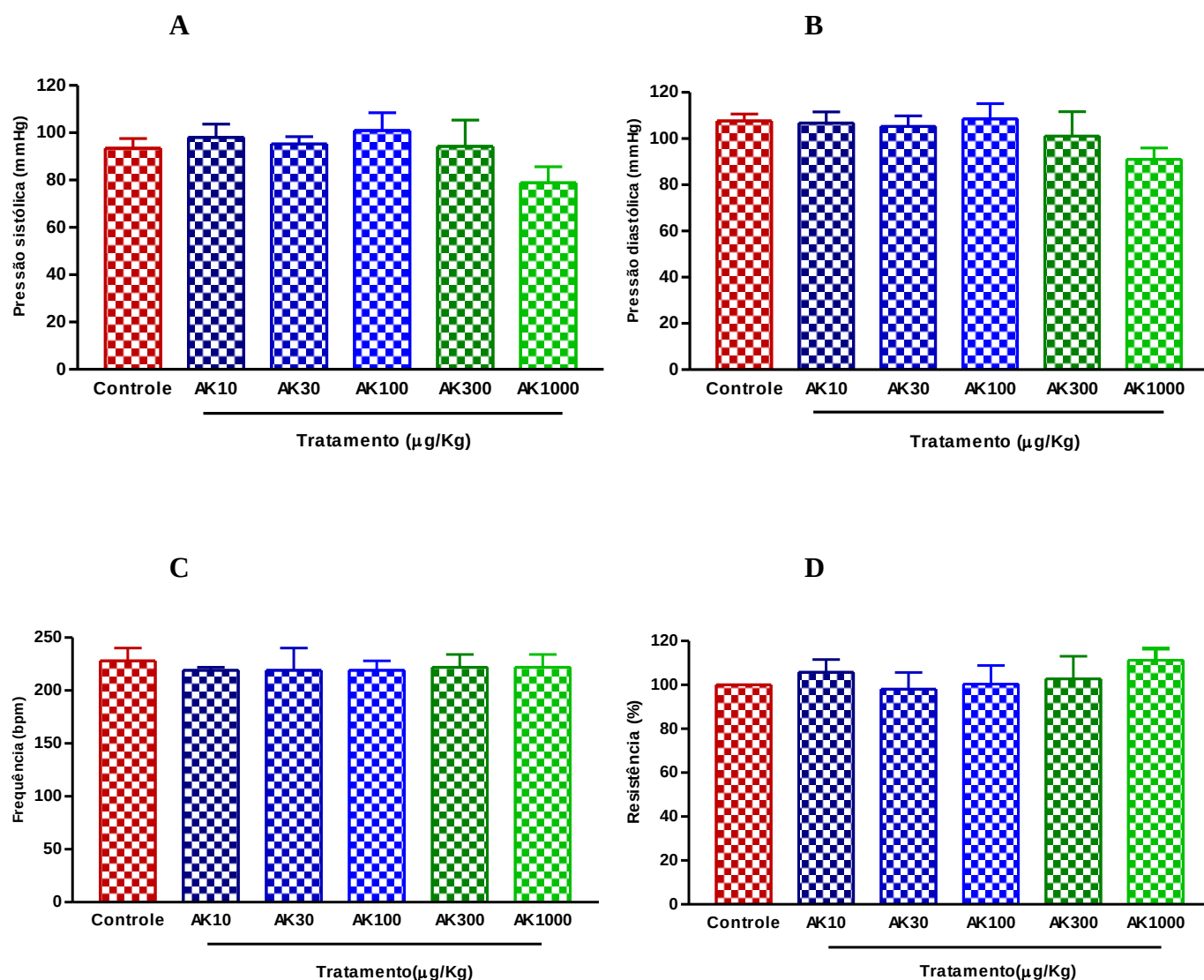


FIGURA 37: Efeito do AK sobre a pressão sistólica (**A**) e diastólica (**B**), sobre a frequência cardíaca (**C**) e sobre o percentual de resistência traqueobrônquica (**D**) em ratos anestesiados. Os dados foram expressos como média $\pm$ SEM (n=4). Os grupos são considerados significativamente diferentes quando $*p < 0,05$ vs o registro basal (controle) para as diferentes medidas realizadas. (ANOVA, Student Newman Keul).

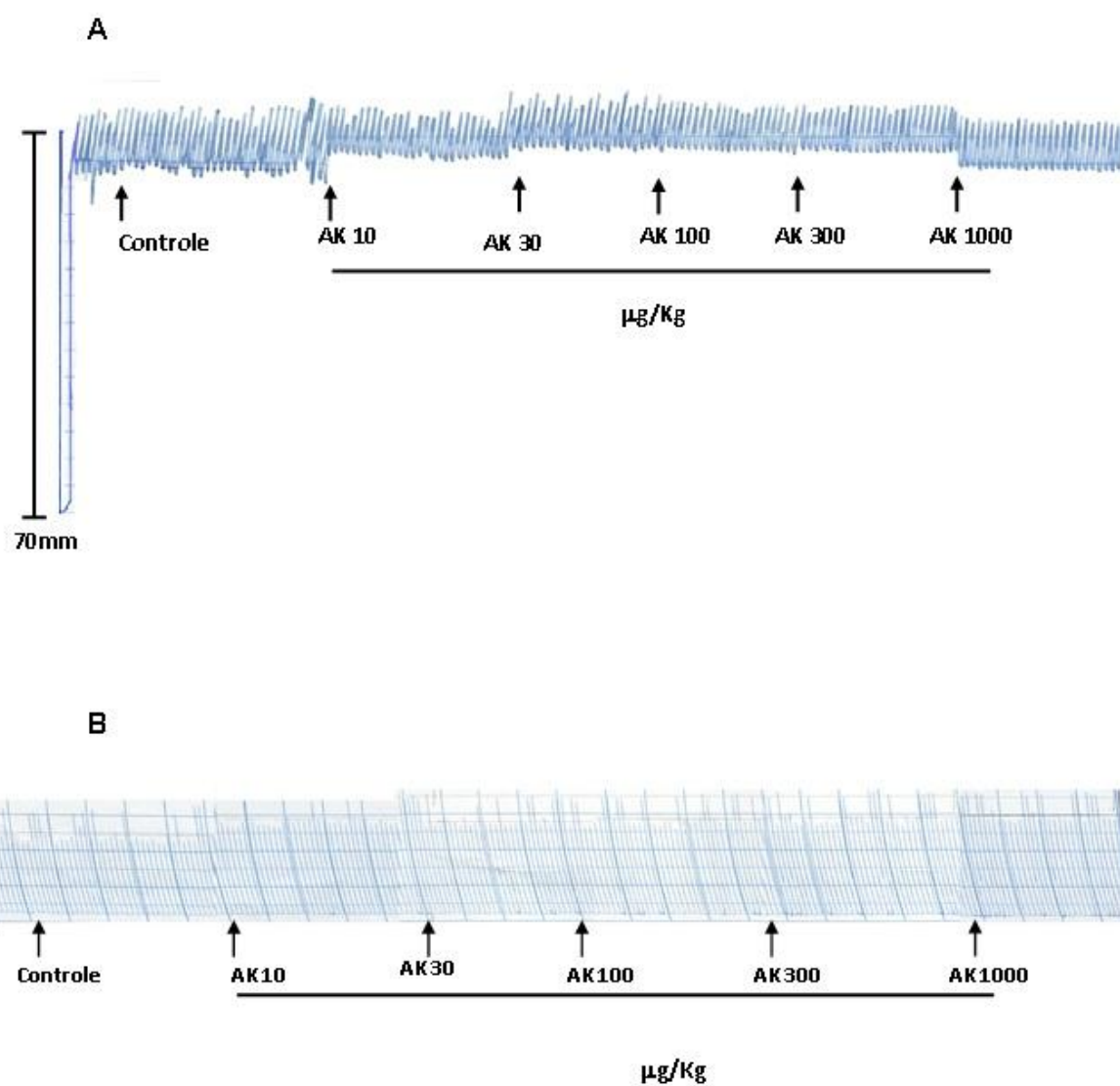


FIGURA 38: Registro fisiográfico representativo do efeito do AK sobre as pressões sistólica, diastólica e sobre a frequência cardíaca (**A**) e sobre a resistência traqueobrônquica (**B**) em ratos anestesiados.

5.6. AÇÃO SOBRE O SISTEMA REPRODUTOR FEMININO E OS EVENTOS REPRODUTIVOS LIGADOS À MÃE E AO CONCEPTO:

5.6.1. ATIVIDADE ESTROGÊNICA EM RATAS IMPÚBERES

AK (25 e 50mg/Kg de peso) não demonstrou atividade estrogênica para os animais tratados durante 3 dias somente com este diterpeno, nem atividade antiestrogênica quando os animais foram tratados com AK (v.o.) associado ao estrógeno (s.c.), pois não apresentaram nem prematuridade nem retardo na abertura do canal vaginal em relação ao controle. Assim como não houve nem aumento nem redução do peso dos úteros (FIGURA 39). O grupo tratado com AK também não demonstrou alterações histológicas quando comparado ao controle, com exceção do grupo que recebeu estrógeno (dietilestilbestrol, 300µg - controle positivo), onde foi evidenciada moderada presença de eosinófilos presença de eosinófilos e edema do endométrio. Já quando AK50 foi administrado junto com estrógeno houve uma leve redução no edema do endométrio e na presença de eosinófilos em relação ao estrógeno sozinho (FIGURA 40).

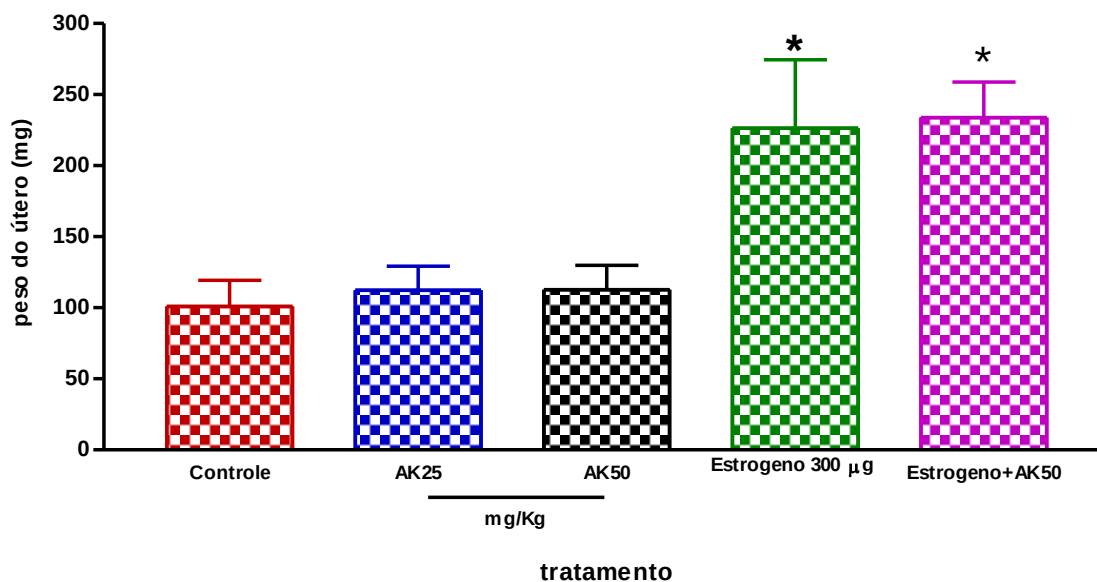


FIGURA 39: Estudo da atividade estrogênica ou antiestrogênica do AK em ratas imaturas. Os dados foram expressos como média $\pm$ SEM (n=6) de acordo com o peso dos úteros padronizado. Os grupos foram considerados significativamente diferentes quando $*p < 0,05$ vs controle (Student Newman Keul).

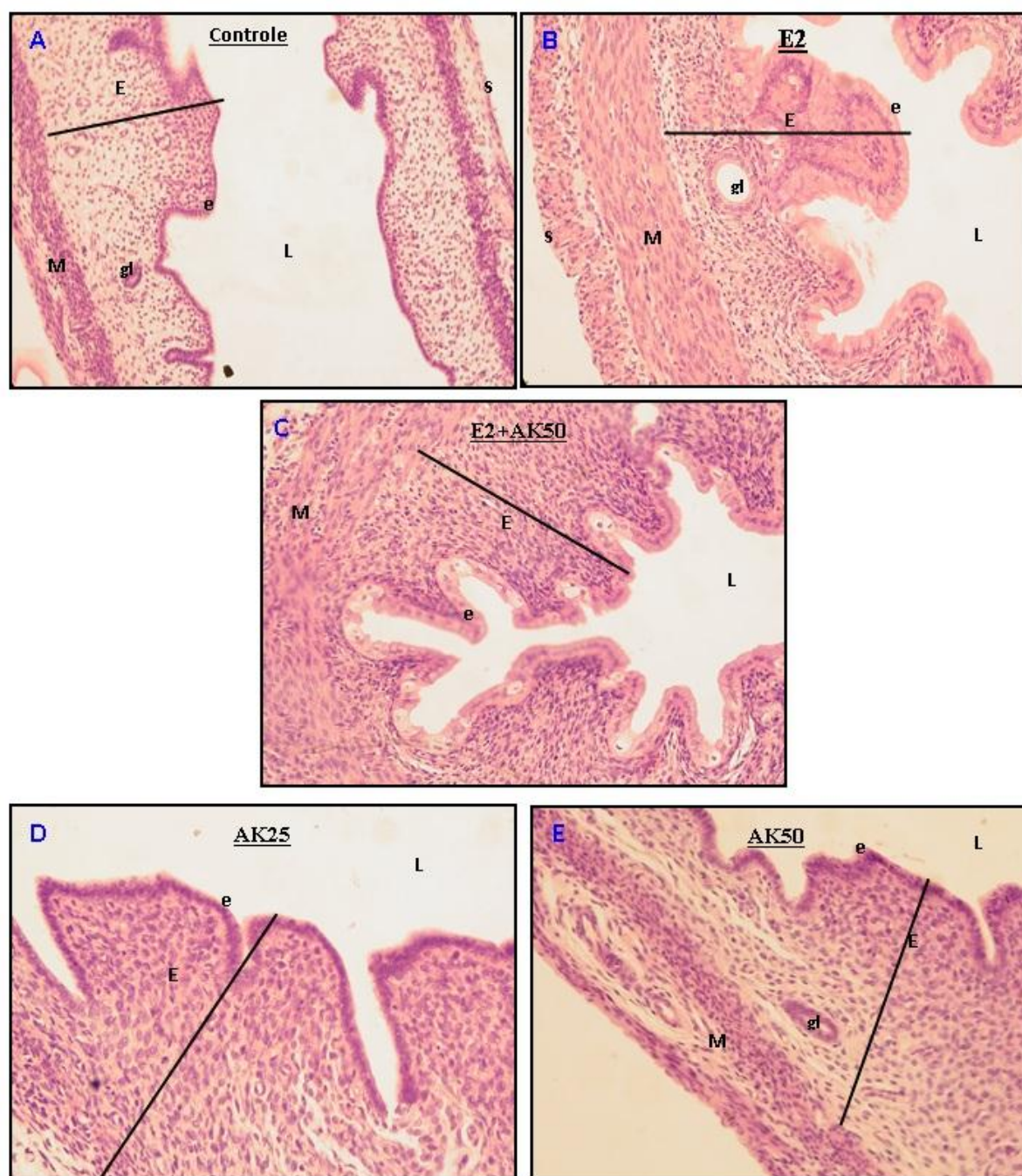


FIGURA 40: Estudo da atividade estrogênica ou antiestrogênica do AK em ratas imaturas. Cortes histológicos dos úteros (200x): **(A)** controle; **(B)** controle positivo (E2); **(C)** estrógeno + AK 50 mg/Kg (E2+AK50); **(D)** AK 25 mg/Kg (AK25); **(E)** AK 50 mg/Kg (AK50). E: endométrio; e: epitélio; gl: glândula endometrial; L: luz uterina; M: miométrio; S: serosa.

5.6.2. ENSAIO EM CAMUNDONGAS PRENHES

Efeito na implantação do ovo e embriogênese:

Fêmeas grávidas tratadas do 1º ao 7º dia e sacrificadas no 10º dia de gestação:

O ácido caurenóico na dose de 50mg/Kg (AK50) reduziu significativamente o ganho de peso total das fêmeas e o ganho de peso durante o período de tratamento, em relação ao controle normal (menos 45% e menos 47%) e controle veículo (menos 43% e menos 40%), respectivamente. AK50 também reduziu significativamente o número de corpos lúteos (em 84%, 83% e 78%) e de implantes (em 83%, 80% e 75%) comparado aos controles (normal e veículo) e ao grupo tratado AK25, respectivamente. Isto resultou em uma perda embrionária de 83,3% nas fêmeas gestantes e que foram tratadas com essa dose (50mg/Kg). Este percentual de perdas embrionárias no grupo AK50 mostrou-se significativo quando comparado ao percentual de perdas do grupo controle normal (pois AK 50 perdeu 77% mais embriões que o controle), ao veículo (82% a mais), e ao grupo tratado com AK 25mg/Kg (67% de perdas embrionárias superiores a esta dose menor). Já quando os resultados de AK50 foram comparados aos resultados observados para o controle positivo indometacina (INDO, antiinflamatório inibidor da COX), foi possível observar que, quanto à perda embrionária, AK50 foi mais tóxico que INDO 2mg/Kg ($p < 0,01$) e, neste parâmetro, tal perda teve proporções similares à induzida por INDO 4mg/Kg. Contudo, AK50 não foi tão tóxico de forma direta para as fêmeas grávidas como o foi INDO 4 mg/Kg, que levou à morte 67% das fêmeas tratadas com esta dose, pois nenhuma morte materna foi relatada para o diterpeno (TABELA 6, FIGURA 41).

Laudo histológico dos úteros (FIGURA 42):

Controle, DMSO 5% → úteros normais, condizentes com as características histológicas de útero no 10º dia de gestação. Desenvolvimento do sincício e trofoblasto.

AK 25mg/Kg → os úteros que não possuíam implantes, mas apresentaram aumento no número de glândulas endometriais.

AK 50mg/Kg → os úteros sem implantes apresentaram proliferação de glândulas endometriais e aumento do parênquima do endométrio com moderado edema do mesmo. Seu epitélio é pseudo-estratificado cilíndrico. Além destes achados, observou-se discreto infiltrado linfocítico no conjuntivo. Pode ter havido reabsorção.

INDO 2mg/Kg → Endométrio ainda um pouco edemaciado, presença de algumas glândulas endometriais.

INDO 4mg/Kg → Redução mais clara do edema do endométrio.

Tratadas do 1º ao 3º dia (pré-implantação) ou do 4º ao 8º dia (pós-implantação) e sacrificadas no 10º dia de gestação:

Quando testada a dose de AK que reduziu significativamente o número de fêmeas grávidas e implantes por fêmea (AK50), para observação se seu efeito seria impedindo a fecundação e nidação (tratamento do 1º ao 3º dia pós-acasalamento constatado) ou impedindo a implantação e desenvolvimento embrionário (tratamento do 4º ao 8º dia de gestação), o que pôde ser constatado foi que não há diferença nas perdas embrionárias no período anterior (pré-implantação) comparado às perdas no período de implantação. O que se pôde observar foi apenas uma tendência à maior perda no período de implantação. Assim como, à visualização, os implantes desse grupo parecem ser menores em diâmetro. (FIGURA 41, TABELA 7)

Laudo histológico dos úteros (FIGURA 42):

AK 50mg/Kg (pré-implantação) → discreto edema endometrial, acompanhado de discreta exocitose de polimorfonucleares.

AK 50mg/Kg (pós-implantação) → moderado processo inflamatório endometrial e exocitose moderada de polimorfonucleares.

TABELA 6: Efeito do AK sobre a embriogênese e os parâmetros maternos quando administrado por gavagem as fêmeas de camundongo grávidas entre o 1º ao 7º dia de gestação, sacrificadas no 10º dia.

	Controle				AK	
	Normal (água)	Veículo (DMSO 5%)	Positivo (indometacina)			
			2mg/Kg	4mg/Kg	25mg/Kg	50mg/Kg
Número de fêmeas						
Acasaladas	16	10	7	6	12	12
Vazias*	1	0	2	2	2	10
Mortas durante o tratamento	0	0	0	4	0	0
Ganho de peso materno (g)						
Total (final-inicial)	5±0,58	5,2±0,6	3,6± 0,75	0 ^{aa,bb,c}	3,67±0,5 ^d	2,25±0,43 ^{aa,bb}
Durante o período de tratamento	3±0,3	4± 0,6	2,6± 0,7	1± 1 ^b	2±0,28 ^b	1,6±0,26 ^{a,bb}
Nº corpos lúteos	10,4±,9	9,8± 0,5	5,3± 1,8 ^{a,b}	0 ^{aa,bb}	7,8±1,17 ^d	1,7±1,13 ^{aa,bb,ee}
Nº implantações	9,8±0,9	8,4± 0,85	5,14 ± 1,8 ^{aa}	0 ^{aa,b}	6,9±1,3	1,7±1,13 ^{aa,bb,e}
Perda embrionária (%)	6,2± 6,2	1,4± 1,4	28,6 ± 1,8	100 ^{aa,bb,c}	16,7±11,2 ^{dd}	83,3±11,2 ^{aa,bbb,cc,ee}

* vazias = fêmeas acasaladas que apresentaram *plug* vaginal (o que significa gestação), mas que não possuíam nenhum conceito ao final do tratamento.

Os grupos foram considerados significativamente diferentes quando:

^ap<0,05 e ^{aa}p<0,01 vs. Controle;

^bp<0,05, ^{bb}p<0,01 e ^{bbb}p<0,001 vs. Veículo;

^cp<0,05 e ^{cc}p<0,01 vs. INDO 2;

^dp<0,05 vs. INDO 4;

^ep<0,05 e ^{ee}p<0,01 vs. AK25

(ANOVA, seguido de teste de Dunnet).

TABELA 7: Avaliação comparativa da menor dose de AK (50mg/Kg) que demonstrou efeito significativo sobre a embriogênese, administrada durante a pré-implantação (1º ao 3º dia de gestação) *versus* a pós-implantação (4º ao 8º dia de gestação).

	AK 50mg/Kg	
	pré-implantação	pós-implantação
Número de fêmeas		
Acasaladas	14	12
Vazias	12	11
Perda embrionária (%)	85,7±9,7	91,7±8,3
Implantações	1±0,75	0,34±0,34
Corpos lúteos	1,21±0,84	0,67±0,67

Dados são expressos como média ± erro padrão da média ($\bar{x} \pm \text{EPM}$) (t de Student).

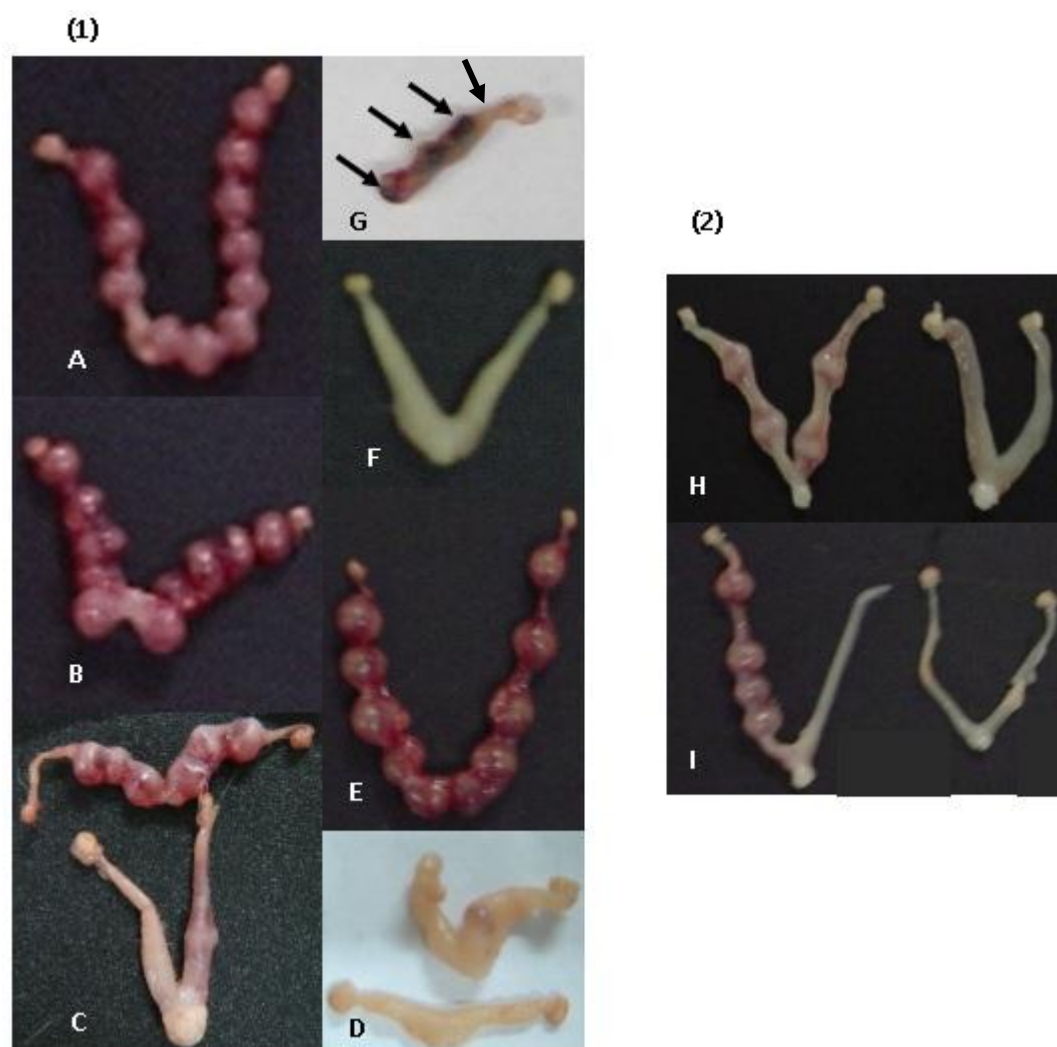
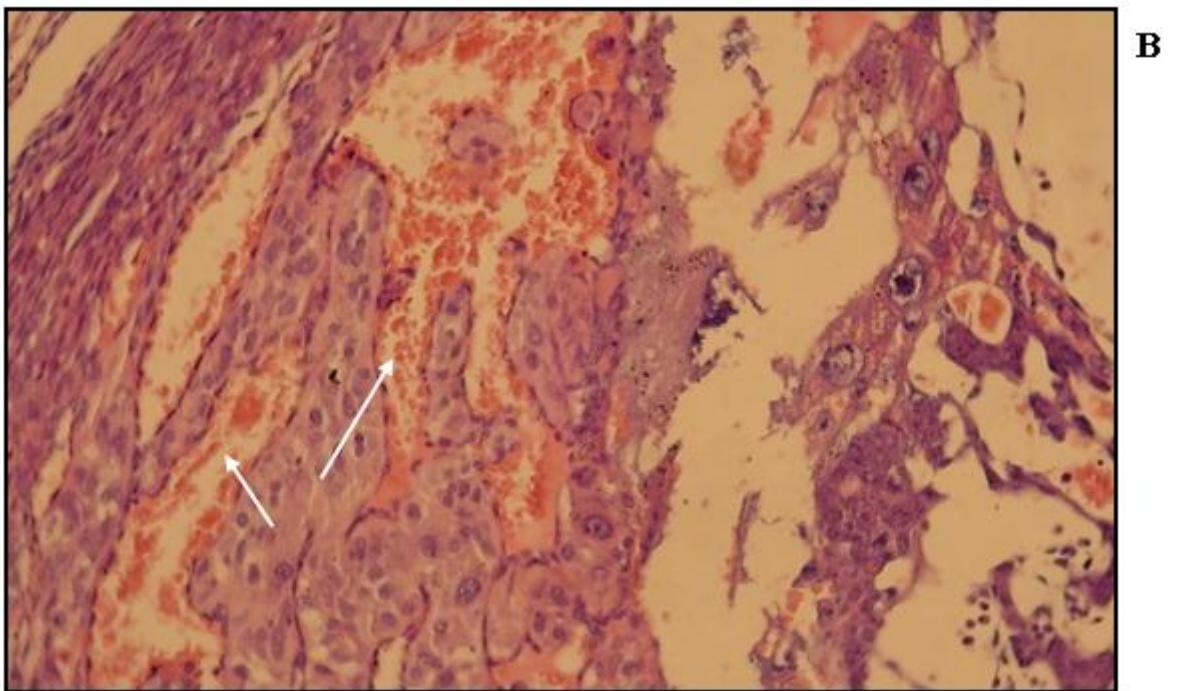
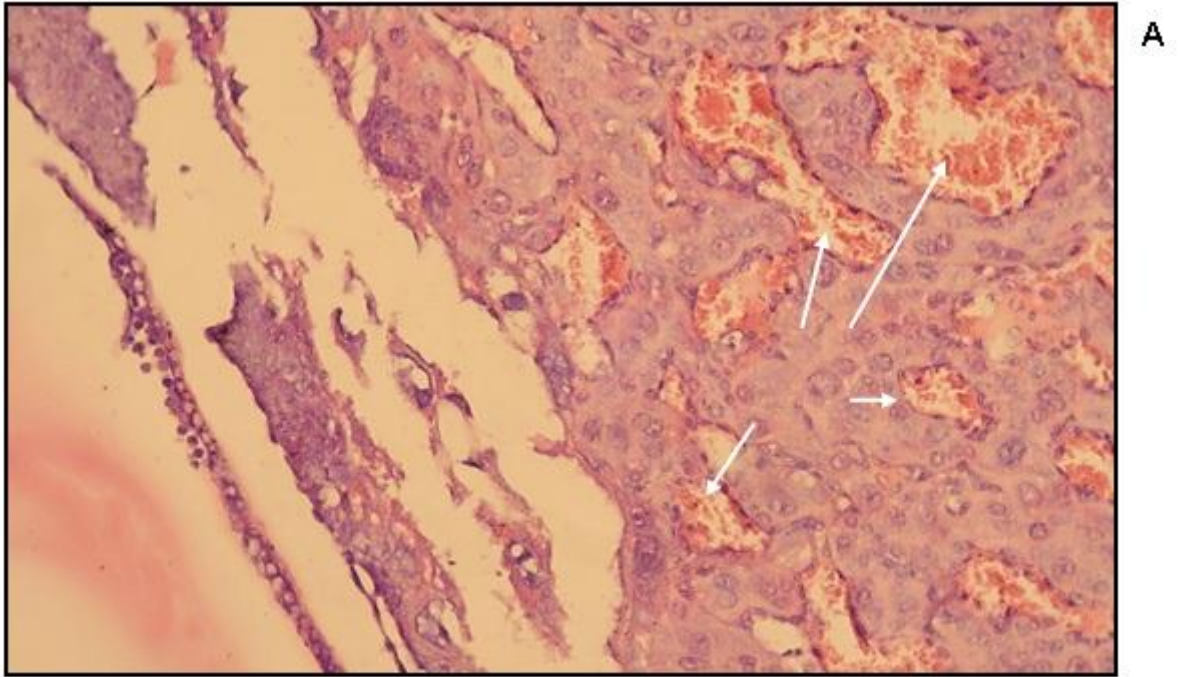
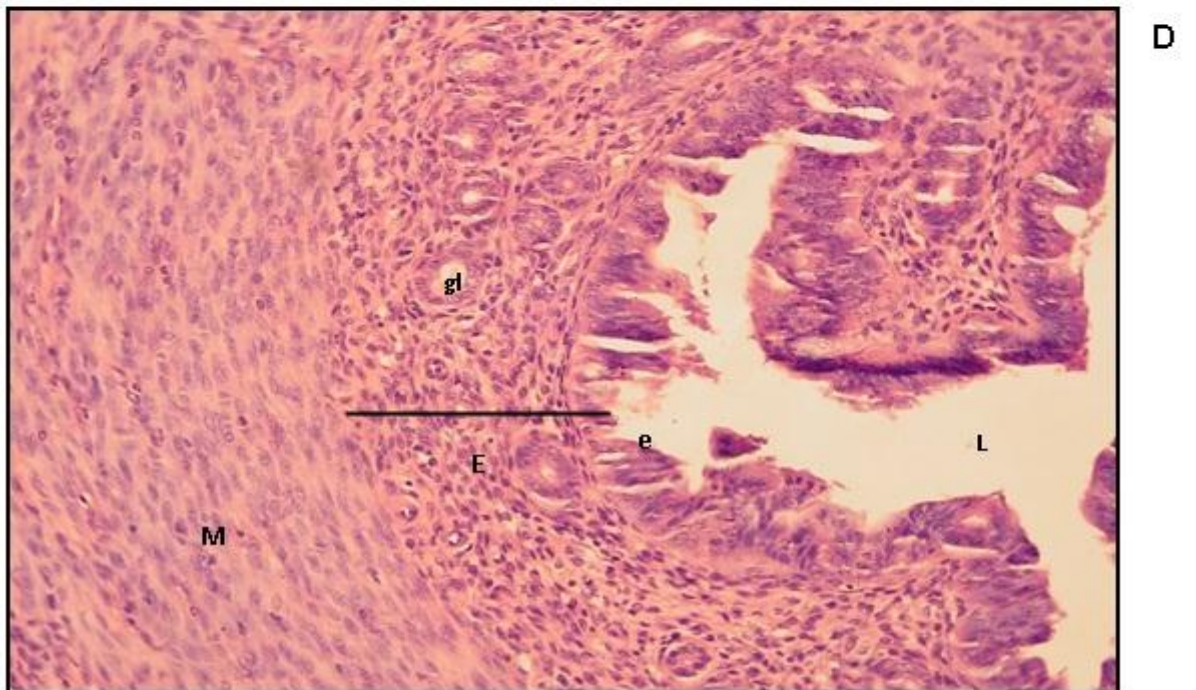
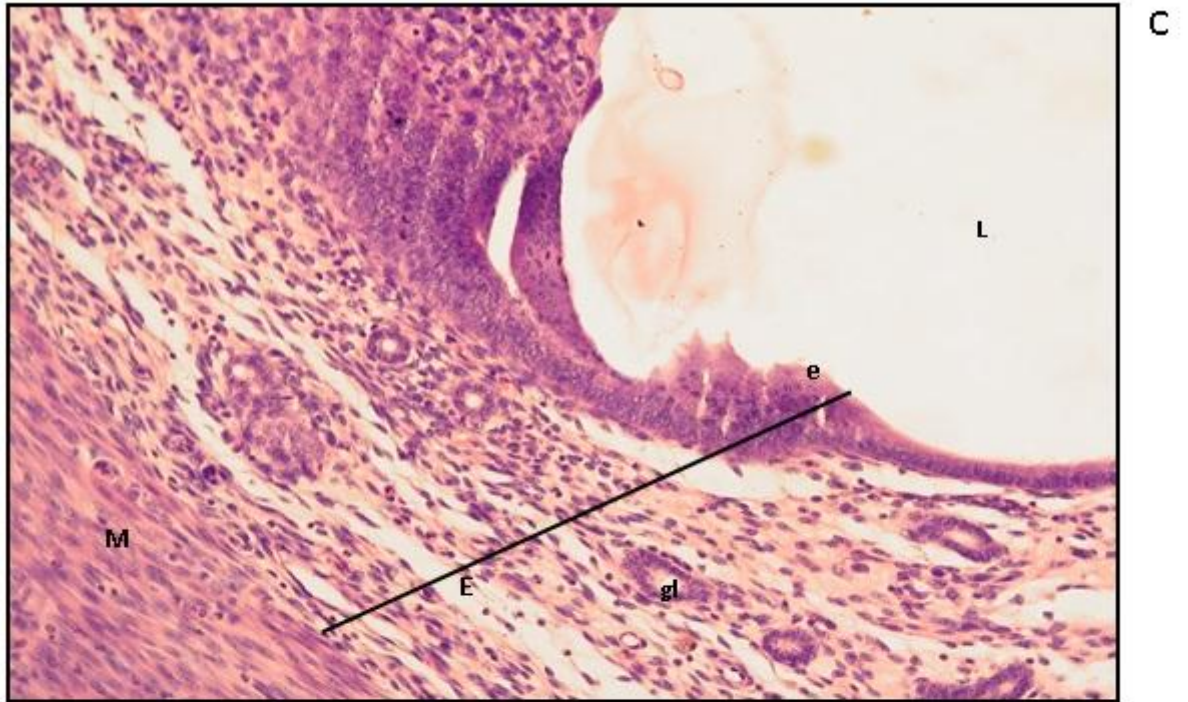
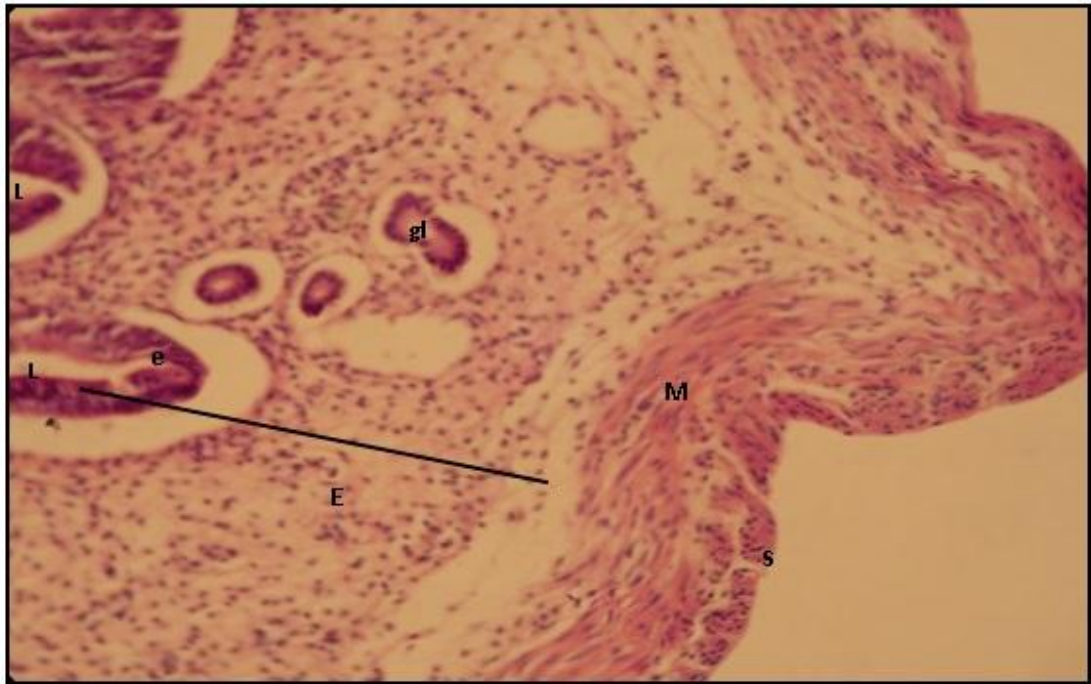


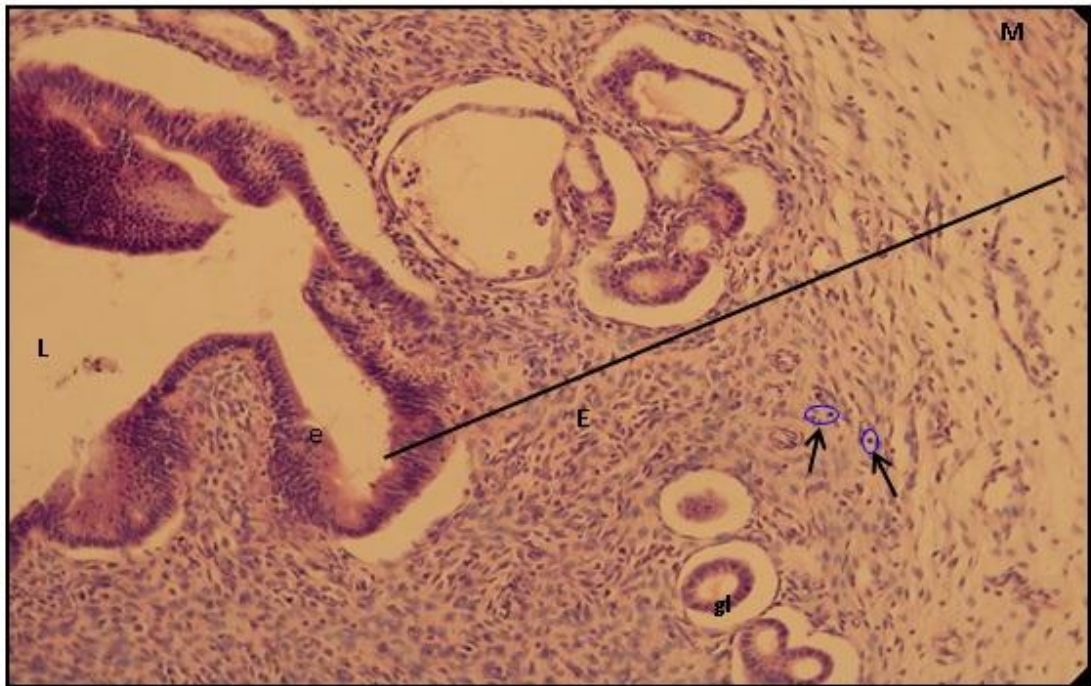
FIGURA 41: Efeito do AK administrado por gavagem, às fêmeas de camundongos grávidas, durante a embriogênese. Fotos dos úteros no 10^o dia após o acasalamento: (1) → (A) Controle normal; (B) Veículo (DMSO 5%); (C) INDO 2mg/Kg; (D) INDO 4mg/Kg; (E) AK 25mg/Kg; (F) AK 50mg/Kg; (G) Exemplo de corno uterino com 3 reabsorções, e (2) → (H) Período da pré-implantação (AK50) e, (I) Período da pós-implantação (AK50). As setas indicam os sítios de reabsorção observados.







E



F

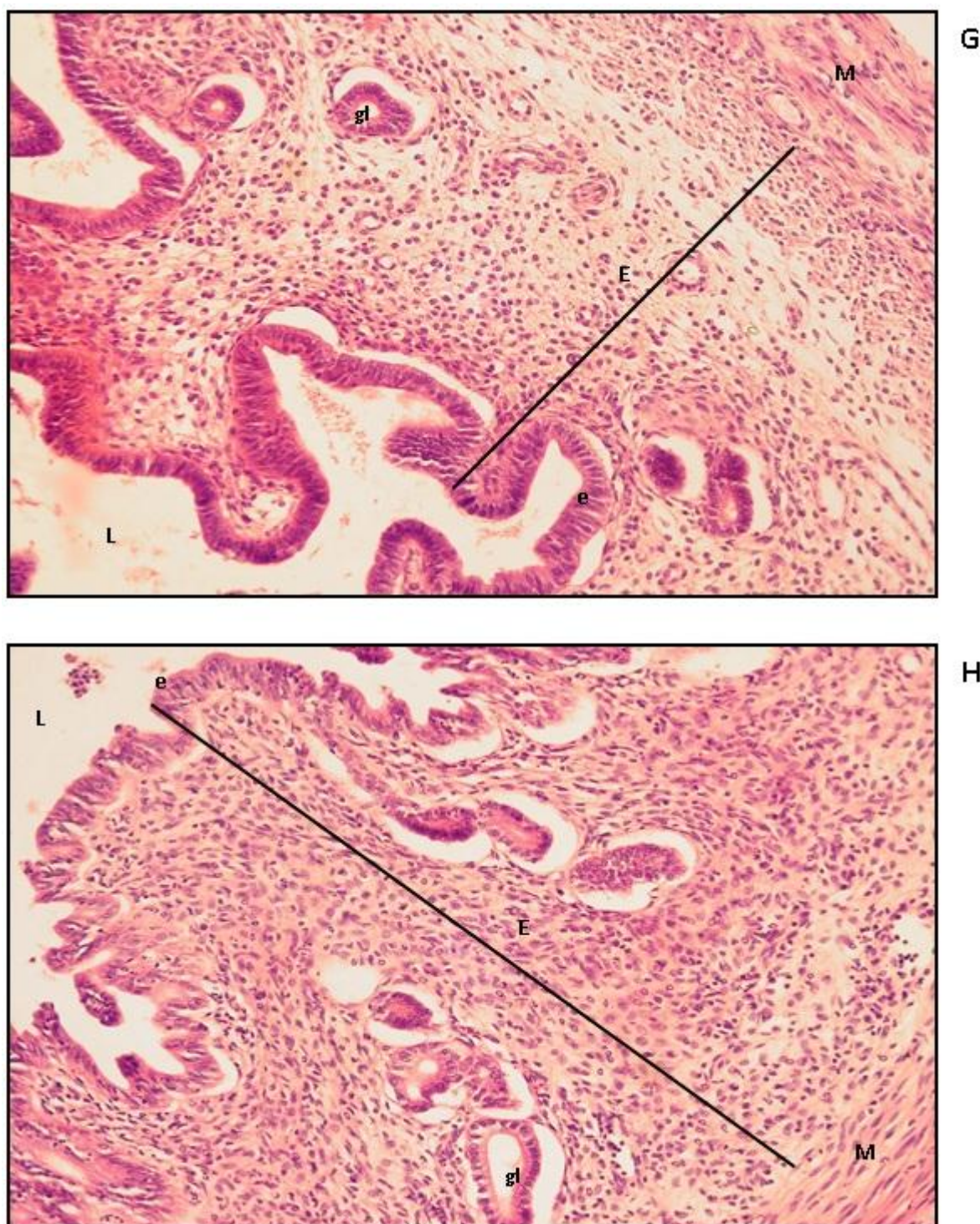


FIGURA 42: Efeito do AK administrado por gavagem, às fêmeas de camundongos grávidas, durante a embriogênese. Cortes histológicos dos úteros no 10º dia após o acasalamento (200x): (A) Controle normal; (B) Veículo (DMSO 5%); (C) INDO 2mg/Kg; (D) INDO 4mg/Kg; (E) AK 25mg/Kg; (F) AK 50mg/Kg, referentes aos tratamentos realizados do 1º ao 7º dia de gestação, (G) AK 50mg/Kg referente ao tratamento no período de pré-implantação e (H) AK 50mg/Kg, no período de pós-implantação. L: luz uterina; E: endométrio; e: epitélio; gl: glândula endometrial; M: miométrio; S: serosa; setas brancas: angiogênese; setas negras apontando para cículos azuis: linfócitos.

Efeito na organogênese

Quando as fêmeas foram tratadas entre o 8º e o 15º dia de gestação com AK 25mg/Kg e 50mg/Kg (AK25 e AK50), o que pôde ser observado ao sacrifício das mesmas no 20º dia de gestação foi o seguinte:

No grupo AK25, das 13 fêmeas grávidas no início do protocolo experimental (presença de plug vaginal espermático), 23% (3 fêmeas) apresentavam-se completamente vazias no dia do sacrifício (20º dia). Para as que permaneceram gestantes até o 20º dia, houve uma redução significativa ($p < 0,01$) do ganho de peso das fêmeas no período de tratamento em 31,4% (apenas $5,9 \pm 1,1$ g de ganho) quando comparado ao ganho de peso do grupo controle veículo (ganho de $8,6 \pm 0,9$ g) no mesmo período. Porém, não houve diferença significativa em relação aos controles quando comparados o ganho de peso total (referente à diferença entre o peso da fêmea no dia do sacrifício menos o seu peso no início do tratamento), nem o ganho de peso corrigido (peso da fêmea ao sacrifício menos o peso do útero com os conceitos) (TABELA 8). Nesse grupo (AK25), também houve redução significativa no peso da placenta (em 10,3% vs o controle veículo, $p < 0,05$) e redução do peso fetal (em 8,7% vs controle normal, $p < 0,01$) (FIGURA 43).

No grupo AK50, das 17 fêmeas grávidas no início do tratamento (determinado pela presença do *plug* vaginal e considerado como 1º dia de gestação), 82,4% ($n=14$) estavam completamente vazias no dia do sacrifício (20º dia) (TABELA 9), mostrando que o ácido caurenóico 50mg/Kg leva a uma extensa e significativa perda gestacional quando comparado aos controles e ao AK25. Essa perda foi acompanhada de redução significativa do número de corpos lúteos e implantes fetais (tamanho médio da ninhada) também quando comparados aos controles e ao AK25 (TABELA 9). Ou seja, com o aumento da dose houve um aumento da ação deletéria de AK sobre a *performance* reprodutiva das fêmeas que culminou com a extensa perda gestacional.

Ainda no grupo AK50, do total inicial de 17 fêmeas, apenas 3 fêmeas permaneceram gestantes até o 20º dia. Assim, para essas 3 fêmeas que possuíam conceitos, o que pôde ser constatado foi um aumento significativo do peso fetal em relação aos controles normal e veículo de 2,7% e 11,6%, respectivamente, e de 12,4% em relação a AK25 ($p < 0,01$). O nascimento dessas 3 ninhadas um pouco antes da hora determinada e padronizada para o

sacrifício das fêmeas impossibilitou a pesagem de seus anexos fetais (FIGURA 43 TABELA 9).

Quanto à avaliação externa de todos os fetos, para todas as ninhadas dos grupos controles (normal e veículo) e grupos tratados (AK25 e AK50), os mesmos se encontravam normais, sem quaisquer alterações físicas visíveis (FIGURA 44). Após a avaliação externa, todas as ninhadas dos grupos controles (normal e veículo) e tratados (AK25 e AK50) foram divididas em duas. Na metade dos fetos que foi usada para avaliação dos órgãos internos também não foram observadas alterações em nenhum dos grupos controles (normal e veículo) ou tratados (AK25 e AK50 – neste último grupo, avaliados os fetos das únicas 3 fêmeas que permaneceram gestantes ao fim do tratamento). Assim, nem a avaliação externa para as malformações, nem a avaliação interna dos principais órgãos apresentou qualquer alteração macroscópica significativa que pudesse indicar ação do ácido caurenóico, nas doses testadas. Ou seja, não houve malformações, nem variações.

Para a outra metade das ninhadas, utilizada para a avaliação do desenvolvimento ósseo fetal, observou-se que os fetos do grupo AK25 foram significativamente diferentes dos controles (normal e veículo) quando avaliados os pontos de ossificação nas falanges proximais anteriores e posteriores (TABELA 10, $p < 0,01$). Contudo, não houve malformações ou variações esqueléticas, tendo ocorrido o que se chama de retardamento (passível de ocorrer mesmo nos controles) para esses fetos do grupo AK25. Já na avaliação óssea dos fetos das 3 únicas fêmeas que chegaram ao termo no grupo AK50 não houve quaisquer alterações comparados aos controles (FIGURA 44).

Vale salientar que no grupo AK50, o importante resultado observado foi o de extensa perda fetal (82,4%). Aquelas 3 fêmeas que vieram a termo, assim como seus conceitos, foram considerados como pertencentes a um subgrupo mais resistente ao tratamento, e que se encontrariam na ponta direita de um gráfico de distribuição gaussiana e, por isso, nem o peso fetal nem os resultados dos pontos de ossificação dos fetos desse subgrupo não foram mostrados na FIGURA 43 e na TABELA 10, respectivamente.

Infelizmente, também quanto à avaliação óssea, os tecidos fetais não clarificaram o suficiente e não foi possível a correta visualização nem das vértebras cervicais nem das esternbras em todos os conceitos avaliados. Mas todos os demais pontos foram contados.

Lauda histológico dos úteros.(FIGURA 45):

Controle, DMSO 5% → Condizentes com úteros grávidos no 20º dia de gestação. Úteros grávidos nessa fase não apresentam mais glândulas endometriais nas regiões interconceptos (STUART E PEEL, 1981).

AK 25mg/Kg → os úteros vazios apresentavam dilatação da cavidade uterina e hipotrofia do endométrio.

AK 50mg/Kg → É possível que tenha havido um processo de implantação sem que tenha ocorrido o desenvolvimento da gestação. Não há presença de macrófagos. Há presença de algumas glândulas endometriais.

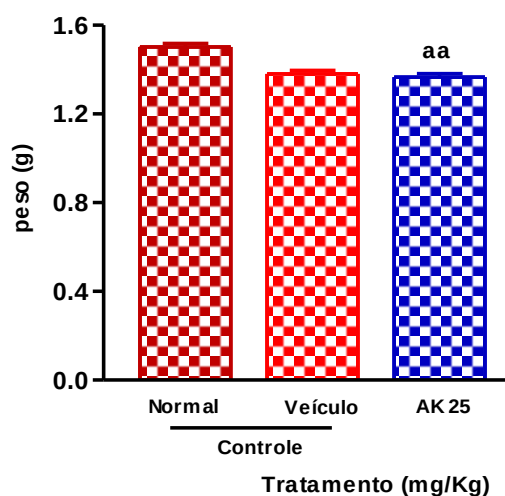
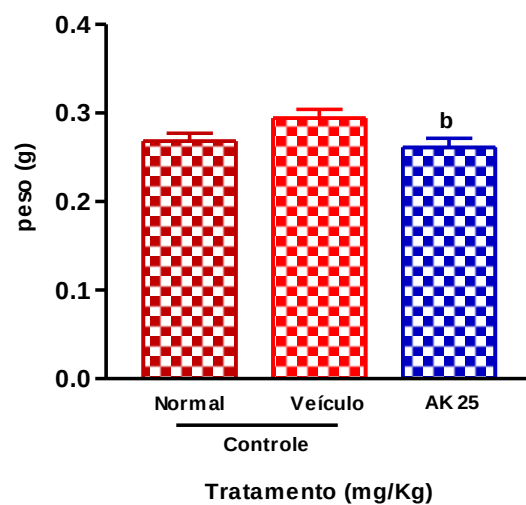
A**B**

FIGURA 43 Efeito do AK, administrado por gavagem do 8º ao 15º dia de gestação (período da organogênese), sobre o peso dos fetos e o peso dos anexos fetais. **(A)** Peso médio dos fetos no 20º dia de gestação.e **(B)** peso dos anexos fetais. Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM (n =25 a 106 fetos), onde ^{aa}p<0,01 vs controle normal, bp<0,05; (ANOVA seguido de teste de Dunnet).

TABELA 8: Efeito do AK, administrado por gavagem do 8º ao 15º dia de gestação (período da organogênese), sobre o ganho de peso materno.

	Controle		AK 25mg/Kg	AK 50mg/Kg
	Normal (água)	Veículo (DMSO 5%)		
Ganho de peso materno (g)				
Total (final-inicial)	16,75±1,14	19,9±2,44	14,62±1,9	8,24±1,6 ^{aa, bbb, c}
Período de tratamento	7,25±0,54	8,6±0,9	5,9±1,1 ^{bb}	2,8±0,8 ^{aa,bb, c}
Corrigido*	31,9±0,93	32,12±0,83	34,9±0,9	28,9±0,8 ^{a,b,cc}

*Peso corrigido = peso final da fêmea – peso do útero com os conceitos.

Dados são expressos como média ± erro padrão da média (x±EPM)

^ap<0,05 e ^{aa}p<0,01 vs controle, ^bp<0,05, ^{bb}p<0,01 e ^{bbb}p<0,001 vs veículo, ^cp<0,05 e ^{cc}p<0,001 vs AK25 (ANOVA, teste de Dunnett)

TABELA 9: Efeito do AK, administrado por gavagem do 8º ao 15º dia de gestação (período da organogênese), sobre parâmetros maternos e fetais.

	Controle		AK 25mg/Kg	AK 50mg/Kg
	Normal (água)	Veículo (DMSO 5%)		
Número de fêmeas				
Acasaladas (com <i>plug</i> no 1º dia)	12	10	13	17
Vazias (20º dia)	0	0	3	14
Nº fetos vivos (20º dia)	106	79	81	25
Nº corpos lúteos*	9,17±0,67	9,9±0,55	7±1,15	1,53±0,84 ^{aa,bb,cc}
Nº implantações*	8,83±0,72	8,1±1	6,39±1,12	1,53±0,84 ^{aa,bb,cc}
Perda fetal* (%)	4,17±3,4	17,85±8,2	29,4±11,5	82,4±8,05 ^{aa,bb,cc}
Peso fetal* (g)	1,5±0,016	1,38±0,015	1,37±0,016 ^{aa}	1,54±0,02 ^{aa,bb,cc}
Peso placentar* (g)	0,27±0,009	0,29±0,01	0,26±0,01 ^b	-
Machos/Fêmeas (%)	44,76 / 55,24	44,4 / 55,6	47,16 / 52,84	53,8 / 46,2

*Os dados são expressos como média ± erro padrão da média (x ± EPM).

^{aa}p<0,01 vs controle, ^bp<0,05 vs DMSO, ^{bb}p<0,01 vs DMSO, ^{cc}p<0,001 vs AK25 (ANOVA, teste de Dunnett)

TABELA 10: Incidência do retardamento nos centros de ossificação em fetos de camundongos cujas mães foram tratadas com AK entre o 8º e o 15º dia de gestação (período da organogênese).

	Controle		AK 25mg/Kg
	Normal (água)	Veículo (DMSO 5%)	
Centros de ossificação			
X ± EPM (n)	8,72 ± 0,15	8,4 ± 0,13	4,1 ± 0,3**
Ossificado / não ossificado (mediana):	0	0	0
Vértebras caudais	9/6	6/5	3/12
Metacarpos	8/0	8/0	8/0
Falanges proximais anteriores	8/0	8/0	0/8**
Metatarsos	10/0	10/0	8/2
Falanges proximais posteriores	10/0	10/0	0/10**

Os dados são considerados como significativos em relação ao grupo controle, quando **p<0,01. Foi realizado o teste ANOVA, seguido de Student-Newman-Keul quando relacionado à média dos centros de ossificação e o teste de McNemar quando consideradas as medianas.



FIGURA 44: Efeito do AK sobre os fetos das fêmeas de camundongos grávidas tratadas durante o período de organogênese, com sacrifício no 20º dia de gestação. As fotos superiores são representativas dos fetos avaliados para detecção de malformações, variações ou retardamentos externos ((**A**) Controle normal, (**B**) Veículo, (**C**) AK25, (**D**) AK50), e as fotos inferiores são representativas dos fetos avaliados na contagem dos centros de ossificação, onde (**E**) Controle normal, (**F**) Detalhe do controle normal e (**G**)AK25.

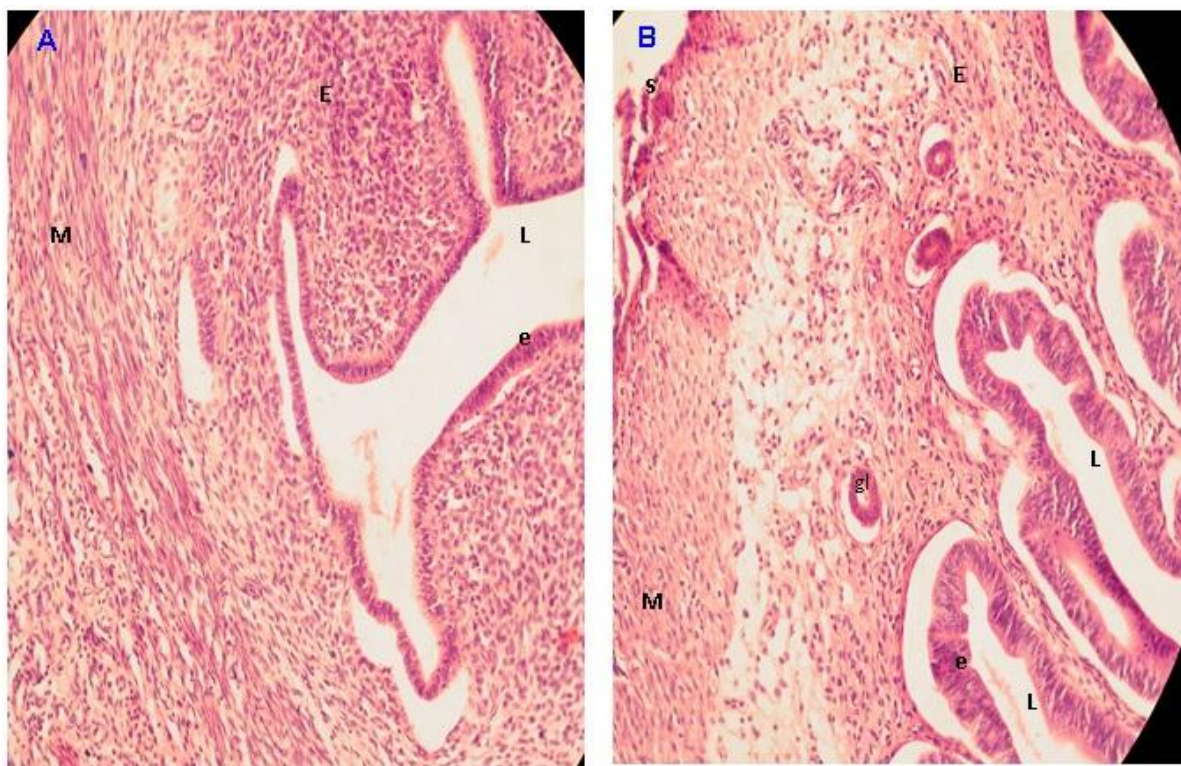


FIGURA 45: Efeito do AK administrado por gavagem, às fêmeas de camundongos grávidas, durante o período de organogênese. Fotos dos cortes histológicos dos úteros no 20º dia após o acasalamento. (A) AK25 e (B) AK50.

6. DISCUSSÃO

As plantas medicinais, como as plantas em geral, sintetizam substâncias tóxicas, que na natureza agem como defesa natural contra infecções, contra insetos e contra herbívoros, mas que também podem afetar os organismos que se alimentam delas. Assim, uma avaliação de seu potencial tóxico é necessária para assegurar o uso dos medicamentos derivados de plantas.

Estudos realizados com óleos de copaíba, contendo diferenças no teor de seus constituintes, apresentaram atividade antiinflamatória diferenciada em modelos animais. Estes mesmos estudos, entretanto, mostraram também que óleos de copaíba adulterados potencializaram a inflamação, ao invés de atuarem como agente antiinflamatório (VEIGA JR *et al.*, 2001).

De todos os óleos de copaíba obtidos de todo Brasil, o que pôde ser observado foi que eles são misturas de sesquiterpenos e diterpenos cujas concentrações variam. Mas essas duas classes, e mais nenhuma outra, devem estar sempre presentes nos óleos de copaíba (VEIGA JR *et al.*, 2004).

No óleo-resina de *Copaifera langsdorffii* Desf 70% do mesmo se compõe de uma mistura de diterpenos, principalmente, ácido caurenóico e ácido poliáltico. O ácido caurenóico (AK) tem corroborado com muitos dos efeitos atribuídos (estudados) ao óleo de copaíba e, assim, sobressai-se como forte candidato a: 1) ser seu biomarcador e, 2) principal responsável por seus efeitos.

De fato, não existem ainda estudos publicados em segurança para o óleo de copaíba, nem havia, até agora, para nenhum de seus constituintes bioativos como o AK, a despeito desse ser bactericida, fungicida, larvicida e antiinflamatório. Para o AK o que há na literatura são alguns estudos mostrando suas ações muito mais que uma avaliação abrangente de uma variedade de questões de segurança.

6.1. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DO ÁCIDO CAURENÓICO SOBRE CÉLULAS NORMAIS E TUMORAIS, *IN VITRO*:

O ácido caurenóico já mostrou atividade larvicida contra *Aedes aegypti* (SLIMESTAD *et al*, 1995), antifúngica (SARTORI *et al*, 2003), tripanocida para a forma tripomastigota com CL_{50} entre 0,5µg/ml (ALVES *et al*, 1995) e 0,68µg/mL (BATISTA *et al*, 1999), equivalentes a 1,5µM e 2,04µM, respectivamente, e antibacteriana (BOAKYE-YIADOM *et al*, 1977; DAVINO *et al*, 1989; SLIMESTAD *et al*, 1995; BATISTA *et al*, 1999; DE MELO *et al*, 2001; WILKENS *et al*, 2002; COTORAS *et al*, 2004), considerada esta última, uma atividade moderada quando comparada a canamicina (MOTTAKIN *et al*, 2004) e à estreptomicina (VELIKOVA *et al*, 2000). Segundo Wilkens *et al* (2002), derivados naturais ou sintéticos do AK que protegem o grupo carboxila em C-19 não possuem essa atividade antibacteriana, e tem-se postulado como seu possível mecanismo de ação, nesse caso, uma alteração do transporte de elétrons e, subseqüentemente, da fosforilação oxidativa.

Há 30 anos, náuplios de *Artemia sp* são usados para detectar toxicidade geral (PERSOONE E WELLS, 1987), em *screens* teratológicos (SLEET E BRENDDEL, 1983, 1985; ACEY E TOMLISON, 1988; KERSETTER E SCHAFFER, 1983) e em ecotoxicologia (SORGELOOS *et al*, 1978; PERSOONE E WELLS, 1987).

De fato, este teste tem sido usado particularmente em países em desenvolvimento onde 85% da população usa as plantas medicinais como terapia tradicional. Alguns autores afirmam que não há correlação entre o bioensaio e o animal inteiro (SANCHEZ *et al*, 1993). Contudo, vinte (20) extratos de plantas foram toxicologicamente testados num estudo *in vivo* (DL_{50} para camundongos) e *in vitro* (CL_{50} para *Artemia sp*), e os resultados apresentaram uma boa correlação ($r=0,85$, $p<0,05$) (LAGARTO-PARRA *et al*, 2001).

Do ponto de vista farmacológico, uma boa relação tem sido encontrada para o camarão de salmoura e a detecção de compostos antitumorais de extratos de plantas terrestres (SOLIS *et al*, 1993; MACKEEN *et al*, 2000), sendo os valores de CL_{50} inferiores a 1000µg/mL apontados como biologicamente ativos quando considerados os extratos como um todo (MEYER *et al*, 1982).

No presente estudo, a CL_{50} do ácido caurenóico para larvas de *Artemia sp* foi de $2 \pm 0,48 \mu\text{g/mL}$ ($\sim 7 \mu\text{M}$) foi comparável com o grau de toxicidade para outros produtos naturais já reconhecidamente tóxicos e com atividade antitumoral, ainda que este bioensaio não seja específico para a atividade antitumoral ou qualquer outra atividade. Isto pôde ser observado ao comparar este resultado com os resultados obtidos por Meyer *et al* (1982) nesse ensaio sobre *Artemia sp* para conhecidos compostos naturais bioativos como a podofilotoxina ($2,4 \mu\text{g/mL}$), cloreto de berberina ($22,5 \mu\text{g/mL}$), sulfato de estricnina ($77,2 \mu\text{g/mL}$), digitalina ($151 \mu\text{g/mL}$), cafeína ($306 \mu\text{g/mL}$) entre outros.

Dando continuidade aos estudos de citotoxicidade, AK apresentou uma atividade hemolítica relacionada à dose, para eritrócitos de camundongo ($CE_{50} 74 \mu\text{M} = 22,35 \mu\text{g/mL}$) e humano ($CE_{50} 56,4 \mu\text{M} = 17 \mu\text{g/mL}$). A membrana do eritrócito é uma estrutura dinâmica que pode sofrer mudanças significantes na sua interação com drogas (AKI *et al*, 1991). Algumas substâncias derivadas de plantas tais como polifenóis, epicatequinas, estéril-glicosídeos, saponinas triterpênicas etc, podem causar lesão à membrana dos eritrócitos e produzir hemólise (NG *et al*, 1986; BADER *et al*, 1996; GRINBERG *et al*, 1997; ZHANG *et al*, 1997). Assim, o diterpeno ácido caurenóico pode produzir instabilidade na membrana, eventualmente causando hemólise com o aumento na dose.

O que também tem sido postulado é que a peroxidação de lipídios e proteínas da membrana dos eritrócitos por radicais livres e mudanças nas proteínas do citoesqueleto podem eventualmente levar à hemólise (MIKI *et al*, 1987; CRUZ SILVA *et al*, 2000). Nesse tocante, a literatura aponta que AK tem efeito no aumento da geração de ânion superóxido por neutrófilos em resposta ao fMLP, contrariamente a outros cauranos (YANG *et al*, 2004), o que poderia ser um dos mecanismos possíveis responsável por esta atividade hemolítica do AK.

No teste de toxicidade para embriões de ouriço (*L. variegatus*), a contínua exposição dos embriões a diferentes concentrações de ácido caurenóico, iniciada após a fertilização, por um período de até 30 horas, mostrou um número significativamente maior de embriões não desenvolvidos ou anormais do que o controle. Os embriões expostos a $10 \mu\text{M}$ ($3,02 \mu\text{g/mL}$) de AK, em geral apresentaram retardo no desenvolvimento, enquanto concentrações superiores ($30 - 300 \mu\text{M}$) os mataram. Na concentração de $30 \mu\text{M}$ os embriões apresentavam formatos

arredondados, diferente da forma triangular das larvas do controle (equivalentes à fase *pluteus*) (FIGURA 23). Além disso, estes embriões tratados não mostraram órgãos diferenciados, enquanto as larvas normais (controle) apresentaram um tubo digestivo primitivo e endoesqueleto (FIGURA 23). Isto indica que a exposição ao AK pode induzir efeitos nocivos que influenciam as divisões celulares e o desenvolvimento dos órgãos nos embriões de ouriço. A inibição da 1ª clivagem e da fase de blastocisto teve como CI_{50} , 84,2 e 44,7 μ M (= 28 e 15 μ g/mL), respectivamente. A inibição da 1ª clivagem nestas células está relacionada com a replicação do DNA e/ou síntese protéica ou concentração dos microtúbulos (GROSS E COUSINEAU, 1964; YAMADA, 1998) e é possível que o ácido caurenóico possa estar afetando algum destes processos. De fato, Jacobs *et al* (1981), ao observarem a ação de certos de compostos ativos no ensaio com ouriços, decidiram testar certas classes de conhecidos antineoplásicos nesta preparação. Os autores demonstraram que na concentração testada que foi padronizada em 16 μ g/mL, de acordo com outros estudos de drogas realizados em equinodermas por Young *at al*, 1970, somente aquelas drogas tais como podofilotoxina, vimblastina, vincristina e daunomicina que atuam sobre a 1ª clivagem impediram o desenvolvimento do embrião de ouriço, em detrimento de outras, como agentes alquilantes (mostardas nitrogenadas), antimetabólitos (análogos purínicos e pirimidínicos), entre outras classes também testadas no ensaio. Os autores sugerem assim que há certa seletividade desse ensaio para as classes de compostos que agem na 1ª clivagem quando o bloqueio observado se dá em concentrações inferiores àquela concentração limite padronizada.

Quanto às concentrações relativas à inibição por AK nas diferentes fases embrionárias, estas são consideradas como promotoras de inibição moderada para os estágios de 1ª clivagem e de blastocisto, mas potentes sobre a fase larval, como pode ser observado pelos valores de CI_{50} (84,2 μ M; 44 μ M e <10 μ M, equivalente a 28, 15 e <3,3 μ g/mL, respectivamente).

Estudos *in vivo* e *in vitro* com o óleo resina da *C. multijuga* Hayne sobre a metástase hepática e o crescimento tumoral mostraram que o óleo, na dose de 2g/Kg (administrado durante 6 dias alternados), foi capaz de reduzir o crescimento tumoral e o peso deste em 58 e 76%, respectivamente. Nesta mesma dose o óleo resina da *C. multijuga* reduziu o número de nódulos hepáticos em 47,1% dos experimentos *in vivo*. E em experimentos *in vitro* o óleo-

resina reduziu a viabilidade celular de forma concentração e tempo dependente (LIMA *et al*, 2003).

O AK (78 μ M) inibiu o crescimento das linhagens leucêmicas e de câncer de mama em 95% e em linhagem de câncer de cólon em 45,7%. Contudo, conhecidos compostos antitumorais como paclitaxel, vimblastina e criptoficina 52 apresentam valores de CI_{50} para a atividade antiproliferativa em linhagens de tumores sólidos e hematológicos (MCF7 mamário e HL60 leucêmico, entre outros) numa escala de doses picomolares, ou seja, doses efetivas mil vezes menores que a do AK. A CI_{50} para HL60 foi 0,018pM, 2,3pM e 2,9pM, e para MCF7 foi de 0,037pM, 2pM e 4pM, para criptoficina 52, paclitaxel e vimblastina, respectivamente (WAGNER *et al*, 1999). Estes dados da ação do AK sobre as linhagens cancerígenas, somado ao que se obteve sobre as células normais (ouriço, *Artemia sp*, hemácias) mostram que houve correlação entre os resultados dos mesmos, e que AK é eficaz no bloqueio da divisão celular. Porém, comparado aos antineoplásicos conhecidos e sua ação anticancerígena, menos potente que estes.

Recentemente, Cavalcanti *et al* (2005) realizaram um estudo para a avaliação do potencial genotóxico do ácido caurenóico com fibroblastos de fígado de hamster chinês V79, *in vitro*, usando o ensaio cometa (SINGH *et al*, 1988), que detecta fitas separadas ou duplas de DNA quebradas e sítios álcali-lábeis, e o teste dos micronúcleos, que detecta lesões no DNA após sua fixação e mutações cromossômicas. Esses testes foram realizados após a observação da atividade hemolítica do AK (COSTA-LOTUFO *et al*, 2002), já que compostos que promovem hemólise também podem causar lesão do DNA (NARAYANAN *et al*, 2001). Os resultados indicaram que AK não induziu lesão nas menores concentrações (2,5; 5 e 10 μ g/mL = 7,5; 15 e 30 μ M) mas causou significativo aumento no índice e frequência de lesão celular nas concentrações mais altas (30 e 60 μ g/mL = 90 e 180 μ M) (CAVALCANTI *et al*, 2005).

O ácido caurenóico é precursor comum das giberelinas (hormônios de crescimento das plantas) e da síntese do esteviosídeo e de sua aglicona, o esteviol, chamados de componentes “doces” da espécie *Stevia rebaudiana*, cujos extratos refinados das folhas e o esteviosídeo, são usados e comercializados como adoçantes de baixas calorias, em substituição a sacarose (MIZUTANI E TANAKA, 2002; KIM *et al*, 2002). Assim como o AK, estes compostos

doces já demonstraram uma atividade antitumoral sobre as linhagens cancerígenas (MCF-7 e HL-60), além de uma atividade antitumoral contra tumor de pele, induzido em orelha de camundongo por TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato) nas doses de 0,1 e 1mg/camundongo, com 73 e 96% de redução do número de tumores/camundongo em 20 semanas de tratamento (YASUKAWA *et al*, 2002). Por outro lado, para esses mesmos compostos (esteviosídeo e esteviol) também foram relatados efeitos mutagênicos no ensaio com *Samonella thyphimurium* TM677 (PEZZUTO *et al*, 1985; TERAII *et al*, 2002), assim como o esteviol promoveu o aparecimento de mutações gênicas e aberrações cromossômicas nos fibroblastos hepáticos de hamster chinês (MATSUI *et al*, 1996). No caso do AK, com relação a esse seu possível potencial genotóxico descrito pela literatura, deve-se levar em conta numa avaliação de segurança é que eles são advindos de experimentações *in vitro*. Estes sistemas são mais sensíveis que a indução *in vivo* (PARRA *et al*, 1997). Ademais, há também a própria capacidade do organismo em lançar mão de seus processos de reparo das fitas de DNA ou descarte de células anormais formadas, como consequência às atividades comuns de detoxificação e de apoptose realizadas pelo organismo, o que é uma possibilidade a ser investigada posteriormente em experimentos *in vivo* usando o AK. Uma prova disso foi dada pelos posteriores estudos de segurança do já citado esteviosídeo quanto à sua possível atividade carcinogênica. Estes estudos realizados por Xili *et al* (1992) e Toyoda *et al* (1997) levaram a OMS (WHO, 1999) a declarar, com base em vasta fundamentação, não haver potencial carcinogênico para o mesmo.

Além disso, certas substâncias genotóxicas podem também ser antigenotóxicas ou potencialmente reparadoras do DNA. Essas substâncias são chamadas de carcinógenos *Janus*. Estes, sob diferentes condições, como o tipo celular ou a dose utilizada, podem agir como agentes anticarcinógenos (VON BORSTEL E HIGGINS, 1998). Como no caso do estudo do extrato de *Toxicodendrum quercifolium* que em altas doses apresentou um aumento na frequência de micronúcleos, enquanto em baixas doses mostrou efeito quimiopreventivo em relação à lesão do DNA induzida por benzopireno (MERSCH-SUNDERMANN *et al*, 2004). Esse estudo mostrou que as concentrações de *T. quercifolium* usadas em fitomedicina para várias doenças e distúrbios inflamatórios, infecções, doenças dermatológicas e dor (CHARETTE, 1985) possuem uma atividade quimioprotetora maior que genotóxica. O que aponta a necessidade de posteriores estudos de Segurança Farmacológica com as menores doses não-genotóxicas do AK.

Estudos posteriores (com células de hepatoma humano Hep G2, por exemplo) que possam definir outras possíveis potencialidades tóxicas de AK, são indicados para se buscar identificar mecanismos não detectados em ensaios convencionais, tais como sua ação junto às enzimas de detoxificação (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, sulfotransferases 1A1 e 1A3, n-acetiltransferase 1, citocromo P450 1A1, etc) (KASNAMÜLLER *et al*, 2004). Nesse sentido, sabe-se que o óleo de copaíba já mostrou ser capaz de aumentar a produção de algumas destas enzimas como a catalase e a glutathione, num modelo de isquemia-reperfusão intestinal em ratos (PAIVA *et al*, 2004a).

Portanto, todas essas outras investigações devem passos posteriores a ser realizados não somente com o AK, mas também com o óleo de copaíba, em função do qual se pretende determinar as concentrações seguras desse AK que deverão figurar no fitoterápico. Isto porque ainda que o AK possa apresentar alguma citotoxicidade (como mostrado nesse estudo em células normais e tumorais e também pela literatura aqui citada), ao serem determinadas as suas concentrações seguras no óleo de copaíba (ou os níveis de consumo seguro do mesmo), este último, ele próprio, também apresenta outras substâncias em sua composição que podem possuir várias outras atividades. Algumas destas com possíveis atividades como as do AK, anti-inflamatórias ou com atividade tóxica para linhagens cancerígenas. Por outro lado, outras que se contraponham às várias atividades já mostradas do AK, até mesmo que possam ser antimutagênicas e que inibam ou debilizem a ação direta de genotoxinas através de enzimas de detoxificação, como sugerem Vinitketkumnuem *et al* (1994) e Parra *et al* (1997) em seus estudos investigativos em medicamentos de origem vegetal.

6.2. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÁCIDO CAURENÓICO NA TOXICIDADE AGUDA E SOBRE O SNC:

Na intenção de avaliar o risco de efeitos adversos de novas substâncias sobre o SNC, realizam-se ensaios rotineiros em roedores (na forma de um *screening* neurocomportamental) e que estão de acordo com o que é requerido pelos testes da Bateria Central para Segurança Farmacológica adotada pela diretriz S7A do ICH. Estes estudos para o SNC devem incluir: atividade motora, mudanças de comportamento, coordenação, resposta reflexa sensorial/motora e temperatura corporal (LUFT E BODE, 2002).

Nesse estudo foram realizados a observação comportamental (incluindo a observação da mortalidade animal em até 72h após a aplicação do AK – toxicidade aguda), um teste de atividade locomotora (teste do campo aberto juntamente com observação dos padrões comportamentais de *rearing* e *grooming*) e um teste de coordenação motora na barra giratória. Nenhum dos parâmetros foi alterado significativamente em nenhum dos testes realizados. Assim, não houve alterações autonômicas, neuromusculares, sensorimotoras e comportamentais observáveis pelos testes aplicados, e nem mesmo houve alguma morte num período de 72h.

A avaliação de efeitos agudos de compostos, na prática da Segurança Farmacológica, intenciona observar efeitos outros que envolvam o SNC, que não os terapêuticos para os quais a droga é indicada. Assim, a expectativa de encontrar esses efeitos adversos é relativamente baixa, comparada com outros compostos que têm como alvo principal o SNC (REDFERN *et al*, 2005).

Como anteriormente abordado, o AK nos experimentos com embriões de ouriço foi moderadamente tóxico sobre a 1ª clivagem e fase blastocisto, e nos experimentos sobre células tumorais, foi eficaz, porém muito menos potente (na ordem de 10^3) que conhecidas drogas antineoplásicas. Observa-se também que, apesar de ter havido correlação entre os testes realizados *in vitro*, aqui neste não houve a correlação entre a toxicidade para *Artemia sp* e a toxicidade *in vivo* em camundongos descrita por Lagarto-Parra (2001). Mas os resultados encontrados que indicam baixa neurotoxicidade e toxicidade aguda para o ácido caurenóico (dose de até 1g/Kg de peso vivo) estão de acordo com aqueles obtidos para o esteviosídeo, do qual AK é precursor, que apesar de ter mostrado ser citotóxico *in vitro* para células tumorais, teve uma baixa toxicidade aguda oral em camundongos, ratos e hamsters, com DL₅₀ entre 8,2 e 17g/Kg de peso vivo (MITSUHASHI, 1976; MEDON *et al*, 1982; TOSKULKAO *et al*, 1997). Assim, parece que em relação aos testes realizados, AK mostra-se relativamente seguro até aqui.

6.3. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES DO ÁCIDO CAURENÓICO:

Admitindo que a toxicidade seja apenas um termo relativo, a utilização de doses suficientemente altas e/ou uma longa duração para um determinado tratamento podem, sem

dúvida, produzir efeitos colaterais ou tóxicos definitivos. Assim, um amplo e claro perfil tóxico e a identificação dos órgãos-alvo da toxicidade em animais são tão úteis para a avaliação do risco e a predição dos efeitos adversos do produto botânico quanto o mesmo ser testado rigorosamente em humanos (WU *et al*, 2004).

A necessidade desta avaliação ganha importância quando se observa que, ao longo dos anos, inúmeros produtos extraídos de plantas têm sido usados como suplementos dietéticos por um número crescente de pessoas. Estes suplementos são usados com o propósito de saúde, mas uma informação mais acurada sobre a segurança e eficácia dos suplementos é ausente; inclusive acerca de sua influência sobre a função cardíaca (KUBOTA *et al*, 2002).

Assim, como parte da avaliação de segurança do ácido caurenóico foram realizados estudos destinados a examinar os potenciais efeitos desse caurano sobre os parâmetros hemodinâmicos que incluem: (1) efeitos sobre os parâmetros eletrocardiográficos e pressão arterial de rato, *in vivo*; (2) efeito sobre o coração inteiro isolado de rato e cobaio; (3) medida do inotropismo e cronotropismo em átrios esquerdo e direito isolados de rato, respectivamente e, (4) efeitos vasculares *in vitro* nos anéis de aorta e leito vascular mesentérico.

Com relação à avaliação pré-clínica do risco arritmogênico (pro-arrítmico) de uma droga, esta avaliação sempre deve incluir um ensaio *in vivo*, que fornece uma melhor evidência a favor ou contra esta, caso haja um efeito relevante sobre a repolarização ventricular através da detecção do prolongamento do intervalo QT do eletrocardiograma (GUTH *et al*, 2004).

Na pesquisa dos parâmetros eletrocardiográficos e pressão arterial de rato realizada para o ácido caurenóico (AK) os animais utilizados foram anestesiados com pentobarbital. É bem verdade que há uma clara preferência pela realização desses estudos em animais conscientes, já que se sabe que agentes anestésicos podem ter efeito na repolarização ventricular (BACHMANN *et al*, 2002). Todavia, se em um animal anestesiado a expectativa é que este seja mais sensível à droga possível indutora do prolongamento do intervalo QT (assumindo que o anestésico, ele próprio, prolongue a duração do intervalo QT), do que um animal consciente seria; a não observação desse aumento do intervalo no anestesiado só favorece a idéia de que AK, nas doses utilizadas, seja seguro do ponto de vista da indução de arritmias ventriculares do tipo *Torsades des Pointes*.

Outro argumento que costuma ser usado contra o uso de animais anestesiados é o de que, pela administração do anestésico, haveria uma grande elevação da frequência cardíaca. Porém, isso é contornável através de uma adequada e otimizada administração do mesmo. Na verdade, antes de ser uma desvantagem, um leve aumento na frequência cardíaca acima do nível basal, torna-se uma vantagem prática por evitar confundir os efeitos sobre a duração do intervalo QT observados após drogas que, do contrário, levariam a uma grande redução da frequência cardíaca. Assim, é possível observar os efeitos da droga sobre o intervalo QT sem a interferência das mudanças na frequência cardíaca (BATEY E DOE, 2002).

De modo a corroborar e validar o uso e a importância do uso de animais anestesiados contra o uso do animal consciente, outra desvantagem para este segundo é que ele é hemodinamicamente mais variável, com mudanças espontâneas na frequência cardíaca dependentes da postura, atividade ou nível de excitação do mesmo. Assim, no animal consciente a medida do intervalo QT está sujeita a uma substancialmente maior variabilidade, tornando-o inerentemente menos sensível às sutis mudanças induzidas pelas drogas do que se a frequência cardíaca permanecer constante (GUTH *et al*, 2004).

Outrossim, na FIGURA 24B pode-se observar pela frequência cardíaca estável dos controles que, tanto a conduta anestésica foi adequada quanto, a partir daí, a dose-dependência obtida após a adição de concentrações crescentes de AK, é realmente fruto da ação da droga e não das possíveis variações pressóricas passíveis de ocorrer num animal consciente.

Dessa forma, por ocasião da realização dos experimentos da medida dos parâmetros eletrocardiográficos e da pressão arterial de ratos anestesiados que receberam doses crescentes de AK (5; 7,5 e 10mg/Kg), os resultados indicaram uma **bradicardia** dose-dependente, **tendência geral ao aumento do intervalo PR e hipotensão** na maior dose. Além destes, do ponto de vista da avaliação de segurança da droga, como já anteriormente citado, o resultado mais relevante desse estudo foi a **ausência de alterações** (prolongamento) **do intervalo QT** do ECG (TABELA 5 e FIGURA 26).

O ECG é um candidato a biomarcador do risco de arritmias, o que é facilmente mensurável nos estudos de Segurança Farmacológica e clínica. Ele é bem aceito na detecção/monitoramento da interação das drogas que, iniciando seus efeitos sobre canais

iônicos cardíacos específicos, podem finalizar com arritmias ventriculares e morte. As arritmias ventriculares induzidas por drogas são eventos potencialmente fatais que, devido à sua incidência relativamente baixa, podem ser identificadas somente após a exposição de um grande número de sujeitos. (KINTER E VALENTIN, 2002).

Drogas, tanto antiarrítmicas quanto aquelas utilizadas para outros fins que não uma ação primária sobre o sistema cardiovascular, assim como combinações de drogas, podem induzir prolongamento do potencial de ação e do intervalo QT, que podem resultar nas arritmias ventriculares chamadas *Torsades de pointes* (TdP), mais provavelmente como consequência de um bloqueio farmacológico da corrente de potássio I_{Kr} de recondução do potencial à linha de base. (KINTER E VALENTIN, 2002). As arritmias do tipo *Torsades de pointes* tornaram-se o principal foco na identificação e desenvolvimento de fármacos. Devido a potencial fatalidade da TdP, é claramente desejável identificar o risco de compostos associados com essa arritmia. E o prolongamento do intervalo QT do ECG parece ser preditivo disso (WALKER, 2004).

Vale salientar que o ECG é o registro clínico das atividades elétricas de despolarização atrial, despolarização ventricular e repolarização durante o batimento cardíaco. Com relação aos canais e correntes iônicas responsáveis pela formação e duração do potencial de ação, as correntes de despolarização primárias de Na^+ e Ca^{2+} são responsáveis pelo potencial de ação. Na repolarização, primariamente, correntes de K^+ , em combinação com as correntes de despolarização, são responsáveis pela restauração da negatividade intracelular da célula muscular cardíaca no repouso. Os canais de potássio operados por voltagem (K_v) determinam as correntes que repolarizam as células cardíacas. Os canais K_v expressos no homem são divididos em 5 tipos. Destes, os canais $K_vLQT-Mink$ e $hERG-MIRP$ parecem possuir uma função maior na regulação do intervalo QT, sendo os canais $hERG$ são aqueles que provém a principal corrente de repolarização na fase 3 do potencial de ação cardíaco (NETZER *et al*, 2001). O platô do potencial de ação é um momento de resistência da membrana muito alta e/ou baixo fluxo de corrente. Dessa forma, qualquer perturbação do balanço entre a corrente despolarizante e repolarizante pode dramaticamente mudar a duração do platô e, por conseguinte, a duração do potencial de ação. Os aumentos nas correntes de despolarização e/ou acréscimo nas de repolarização prolongam aspectos específicos da condução e duração do potencial de ação, e que são refletidos no ECG como mudanças nos intervalos PR (por exemplo, certos bloqueadores dos canais de cálcio) ou QT (como os agentes antiarrítmicos

classe III) (TOMASELLI *et al*, 1994). Este último, quando prolongado, está associado com as taquiarritmias ventriculares polimórficas potencialmente letais (THOMAS, 1994; DE PONTI *et al*, 2001).

No entanto, o ECG deve ser usado com cautela, pois uma droga com efeito sobre a duração do potencial de ação (APD) e do intervalo QT não precisa necessariamente promover TdP. Da mesma maneira, ausência de efeito sobre a APD e o intervalo QT nos estudos animais não prediz de todo que um composto será livre de tais efeitos em humanos. Ainda assim, o prolongamento de QT é o melhor sinal conhecido nos estudos de Segurança Farmacológica hoje. De fato, esse *status* do intervalo QT para o que se chama de risco de avaliação permite a tomada de decisão, onde uma droga ideal provavelmente não influenciaria os canais de potássio dependentes de voltagem do tipo hERG (que conduzem as correntes rápidas I_{Kr}) e, conseqüentemente a duração do potencial de ação (APD) e o intervalo QT. Mas, por vezes há exceções como, por exemplo, a classe III de antiarrítmicos, onde o risco-benefício deve ser pesado cuidadosamente quanto ao bloqueio dos canais hERG ou a prevenção de outras arritmias cardíacas (HAMMOND *et al*, 2001).

Ainda com relação à utilização dos roedores para a avaliação de segurança do AK por meio do registro do ECG, o ICH S7B não recomenda o uso de ratos e camundongos por indicar que a corrente I_{Kr} não possui função importante na determinação da repolarização ventricular como nos humanos. Contudo, autores como Satoh (1999), Shinagawa *et al* (2000), Ono *et al* (2000) e Matsuura *et al* (2002) afirmam que, não só ambas as correntes I_{Kr} e I_{Ks} estão presentes nas células nodais dos roedores, como a frequência sinusal mais rápida encontrada em pequenos animais pode ser dirigida pela I_{Kr} , enquanto a frequência sinusal mais lenta encontrada nos animais maiores pode ser dirigida por I_{Ks} (SATO, 2003).

Por outro lado, autores como Vital *et al* (2002) apontam que outras correntes iônicas/combinções de correntes além da I_{Kr} podem também produzir TdP, sugerindo uma função importante para a avaliação de risco feita em roedores.

De fato, isto (estudo do envolvimento de outros íons) torna-se importante porque as drogas torsadogênicas dividem-se em várias categorias, de modo que, apesar de haver consenso sobre a importância de interações com os canais de K^+ hERG, a avaliação de risco

(e determinação das margens de segurança) é complicada quando as drogas agem sobre outros canais iônicos cardíacos em adição a estes canais (REDFERN *et al*, 2003).

Além da desejável ausência de prolongamento do intervalo QT do ECG, os resultados apresentados na TABELA 5 e na FIGURA 24B apontam a presença de uma bradicardia dose-dependente e uma tendência de aumento do intervalo PR pela ação do AK. O que se sabe é que este caurano mostrou ação antagonista do cálcio impedindo a entrada desse íon por canais tipo L em preparações *in vitro* de miométrio de rata (DE ALENCAR CUNHA, 2003). Com relação a essas correntes I_{CaL} , em determinadas partes do coração, a saber, nos nodos sino-atrial (SA) e atrioventricular (AV), a corrente de Na^+ é fraca ou inexistente e a corrente lenta de Ca^{2+} orientada para dentro da célula é, em grande parte, a responsável pelo desencadeamento e pela propagação do potencial de ação (RITTER *et al*, 1997). Dessa forma, essas correntes I_{CaL} são as correntes mais importantes do marcapasso porque o potencial gerado pelo marcapasso das células nodais sinoatriais é quase o mesmo potencial que o limiar para a corrente de cálcio pelos canais tipo L (SATO E TSUCHIDA, 1993). Ora, os principais efeitos eletrofisiológicos que resultam do bloqueio cardíaco dos canais de cálcio ocorrem nesses tecidos de resposta lenta (SA e AV) (RODEN, 2003). Antagonistas do cálcio facilmente param os potenciais de ação espontâneos. Em concentrações mais baixas, estes antagonistas suprimem e lentificam apenas a última parte da despolarização do marcapasso (SATO E TSUCHIDA, 1993). Assim, drogas que impedem a entrada do cálcio por seus canais nas células cardíacas em geral retardam a frequência cardíaca, a velocidade de condução nodal AV diminui e, então, o intervalo PR aumenta (RODEN, 2003). Como resultado de uma condução diminuída pode haver o bloqueio nodal AV de 1º grau. (HAMPTON, 1994).

O coração isolado pode se tornar um importante elo de ligação metodológica entre os efeitos da droga, observados nos métodos de tecidos isolados *in vitro* e os métodos de telemetria no animal inteiro, *in vivo*. O coração Langendorff pode melhor prever efeitos observados *in vivo* porquanto ele provê um meio de avaliar o perfil de segurança de novas drogas sobre as propriedades elétricas, mecânicas (contrátil), vasculatura (fluxo coronário) e mesmo bioquímica do coração. Estas medidas podem ser realizadas na ausência de efeitos outros que causem confusão por interferência de outros órgãos, circulação sistêmica e uma variedade de complicações periféricas tais como circulação de fatores neurohormonais. (PUGSLEY, 2004).

Com relação aos experimentos com coração isolado de rato e de cobaio aqui realizados, alguns pontos foram elucidados.

No coração isolado de rato apenas a maior dose (1mg) produziu inotropismo negativo. Este efeito não foi antagonizado por atropina, sugerindo que o mesmo não envolve ação sobre os receptores muscarínicos e nem estimulação das fibras colinérgicas intrínsecas.

Adrenalina na dose de 30ng não foi capaz de reverter a cardiodepressão induzida por AK 1mg em *bolus*, o qual reduziu em 59% na força de contração. No entanto, uma injeção de adrenalina 300ng foi capaz de reverter parcialmente a ação inotrópica negativa de AK, que posteriormente, voltou a se estabelecer. Esse dado talvez se deva à ocupação de uma proporção maior de receptores pela alta dose de adrenalina, posto que átrio e ventrículo esquerdos são ricos em receptores β_1 -adrenérgicos de reserva, atingindo, por exemplo, suas CE_{50} para isoprenalina com ocupação de 3-4% e 1%, respectivamente (DOGGREL, 1990; DOGGREL *et al*, 1997 e 1998), de modo a promover uma entrada maior de cálcio por canais ligados ao receptor e aumentar o inotropismo. Somado a isto, os receptores β podem ativar canais de cálcio tipo L, sensíveis à voltagem, no coração através de uma aumento mediado pela proteína Gs independente de alterações na concentração de AMPc (HOFFMAN, 2003), o que pode reverter/deslocar o antagonismo à entrada de cálcio por esses canais promovido pelo diterpeno.

Ademais, Campos-Bedolla *et al* (1997) já demonstraram que AK não parece agir sobre os receptores β_2 -adrenérgicos, pois a presença de propranolol (antagonista do receptor β_2 -adrenérgico) não foi capaz de reverter o efeito relaxante promovido pelo caurano em miométrio de rata *in vitro*.

Ngamrojnavanich *et al* (2003) indicaram para o AK uma atividade inibidora da enzima Na^+K^+ ATPase extraída de cérebro de rato, *in vitro*. Como o coração isolado de cobaio é mais rico em Na^+K^+ ATPase, este foi utilizado para testar a ação de AK sobre essa enzima. Contudo, AK em nenhuma das doses testadas foi capaz de aumentar a força de contração cardíaca (inotropismo positivo), inclusive tendo, na verdade, um efeito inotrópico negativo a partir da dose de 300 μ g, com uma redução de 47% e 50% na força de contração cardíaca para as doses de 300 μ g e 1mg de AK, respectivamente.

A divergência entre os efeitos do AK no bloqueio da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ expressa no cérebro e no coração pode ser explicada pelas diferenças entre isoformas da enzima. A enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ é uma enzima de membrana plasmática que usa a energia da hidrólise do ATP para manter o gradiente eletroquímico de sódio e potássio transmembrana. Esta enzima é um heterodímero composto de duas proteínas não-covalentemente ligadas, em quantidades equimolares, denominadas α e β (GLYNN, 1993). As subunidades α (α_1 , α_2 , α_3) contêm sítios de ligação para ATP, para cátions e para o inibidor específico ouabaína, e diferem na sua sensibilidade para os mesmos (DECOLLOGNE *et al*, 1993); e, as subunidades β (β_1 e β_2), cuja exata função no ciclo de reação da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ não é clara, mas seu domínio extracelular parece participar dos processos de ligação da enzima ao K^+ (LUTSENKO E KAPLAN, 1993).

Assim, a expressão funcional dessa enzima difere quanto aos órgãos que se encontram (rins, coração, cérebro), para as várias espécies e durante a ontogênese; além de reagir diferentemente de acordo com a regulação hormonal e alterações fisiopatológicas (DECOGLLOGNE *et al*, 1993). Essa pode ser uma explicação razoável para a ausência de efeito inotrópico positivo do AK sobre o coração, que seria fruto de uma possível inibição da enzima cardíaca.

Nos experimentos realizados com AK em coração isolado de rato e de cobaio, optou-se pelo uso de um sistema com fluxo constante e fizeram-se as medidas das alterações sobre a pressão. O que pôde ser observado é que, no coração de rato, AK em concentrações até 1mg, em *bolus*, não foi capaz de alterar a pressão. Da mesma forma, no coração de cobaio, houve tendência (porém não significativa) à redução na pressão apenas na dose de 1mg de AK. Somova *et al* (2001) quando testaram a ação do AK sobre o coração inteiro isolado de rato, usando uma pressão de perfusão constante e medindo as alterações sobre o fluxo coronário, observaram que na maior dose utilizada (10mg) houve um aumento crescente no fluxo de forma tempo-dependente havendo um acréscimo de 10% ao fluxo inicial aos 15 minutos.

Um ponto deve ser considerado nos resultados obtidos por Somova *et al* (2001) utilizando AK 10mg em coração de rato, em relação a estes com coração isolado de rato e de cobaio. Doses a partir de 1mg ou superiores usadas em sistemas de órgãos ou tecidos devem ser consideradas dissonantes da realidade de uma exposição do organismo inteiro e, por isso,

refutadas. Isto porque a exposição direta da droga nesses sistemas isolados pode aproximar-se da solubilidade das substâncias testadas e ser muitas vezes maior do que as exposições terapêuticas (REDFERN *et al*, 2003).

Assim, Somova *et al* (2001), usando uma dose muito alta, puderam mostrar uma ação do AK no aumento temporal do fluxo coronário, devido à atividade dilatadora coronária do mesmo, e comparável ao seu controle positivo, verapamil. Eles apontam que o efeito sobre o fluxo sanguíneo coronário pode contribuir para o efeito hipotensivo total que observaram durante a realização da medida da pressão arterial em ratos após a aplicação endovenosa de 10mg/Kg.

No que diz-respeito a essa vasodilatação coronária não demonstrada no sistema a fluxo constante aqui usado, mas apresentado no sistema à pressão constante de Somova *et al* (2001), esta pode ser fruto, em menor grau, da possível ação abridora de canais K_{ATP} do AK. Afinal, este efeito para o caurano também já foi demonstrado *in vitro* em miométrio de rata, quando a presença de glibenclamida no sistema foi capaz de reduzir parcialmente o relaxamento promovido por AK 50µg/ml (=160µM) sobre a curva dose-resposta para ocitocina (DE ALENCAR CUNHA *et al*, 2003).

O fluxo coronário, assim como ocorre em outros leitos vasculares, é controlado por vários fatores, mas seu principal mecanismo regulatório é metabólico, onde os canais de K^+ ativados por ATP têm importância fundamental na sua homeostase (DE FILY, 1998).

Os canais de K_{ATP} estão presentes no tecido pancreático e extrapancreático, tais como coração e músculo liso, e apresentam diversas composições moleculares nos tecidos de acordo com as combinações das suas duas subunidades Kir6.x (um canal retificador de potássio) e SURx (um receptor pra sulfoniluréia) (SEINO, 2003; SEINO E MIKI, 2003; YOKOSHIKI *et al*, 1998).

Estes canais, que habitualmente são abertos (desinibidos) apenas quando os níveis de ATP encontram-se baixos nos tecidos onde eles se apresentam, permanecem fechados (inibidos) com a presença de níveis altos de ATP intracelular. Porém, a aplicação de glibenclamida (bloqueador de canais K_{ATP}) em artéria coronária de cães anestesiados, levou à redução do fluxo coronário (IMAMURA *et al*, 1992; SAMAHA *et al*, 1992), sugerindo que

canais de K_{ATP} funcionais estão presentes no leito coronário sob condições fisiológicas (DAUT *et al*, 1994; DELLSPERGER, 1996). Isto sugere que, em alguns músculos lisos vasculares, canais de K_{ATP} podem agir como importante *background* da condutância ao K^+ , que ajuda a regular o tônus vascular (YOKOSHIKI *et al*, 1998).

Além disso, a abertura (ainda que talvez parcial) dos canais K_{ATP} presentes no músculo cardíaco e vasos coronários pode contribuir para os efeitos negativos cronotrópico (observado no ECG) e inotrópico (observado no coração isolado), juntamente com o já observado antagonismo ao cálcio.

Na pesquisa dos efeitos do AK sobre o cronotropismo e o inotropismo nos átrios direito e esquerdo, respectivamente, não resultou nos mesmos efeitos cronotrópicos e inotrópicos negativos observados quando realizados experimentos com ECG de ratos normotensos anestesiados ou com coração isolado de rato e de cobaio.

Esses dados podem indicar que talvez os efeitos observados *in vivo* e no coração inteiro perfundido se devam não a uma ação sobre os átrios, mas a um bloqueio na condução átrio-ventricular, já que as drogas que bloqueiam os canais de cálcio tipo L podem preferencialmente prolongar a condução e refratariedade das fibras de resposta lenta (HARRISON, 1985; FOZZARD, 1990) promovendo uma depressão no tempo de condução nodal AV.

Estes achados de inibição de correntes I_{Ca} podem contribuir para uma atividade antiarrítmica. Contudo, drogas que bloqueiam canais de cálcio também podem resultar num efeito inotrópico negativo que é perigoso em algumas situações (RAVID *et al*, 1989; SCHLEPPER, 1989). Um exemplo é o alcalóide quinidina, ao qual se registrou causar um efeito inotrópico negativo e este efeito reside em seu significativo decréscimo da I_{Ca} (NAWRATH, 1981).

Outra possibilidade para a não observação de efeitos do AK sobre os átrios isolados pode se dever a uma diferença de susceptibilidade entre átrios e ventrículos aos efeitos desse diterpeno. Segundo Pan e Combs (1995), exemplo dessa diferença de susceptibilidade pôde ser visto quando a perfusão do alcalóide emetina, ingrediente ativo do xarope de Ipeca (*Cephaelis ipecacuanha*), num sistema de coração isolado promoveu decréscimo na

contratilidade cardíaca com aumento do intervalo PR e do fluxo coronário, porém os átrios foram mais resistentes aos efeitos inibitórios do alcalóide. Dessa forma, porque há diferenças entre os efeitos da droga nos átrios e ventrículos, o coração inteiro perfundido parece ser um modelo *in vitro* mais relevante do que modelos de átrios isolados (DE HEMPTINNE, 1965; DUROTOYE E SALAKO, 1972).

Com relação aos experimentos realizados com anéis de aorta isolados, o anel pré-incubado com AK (12,5; 25 e 50µg/mL = 40; 80 e 160µM), por 10 minutos, teve sua curva dose-resposta para fenilefrina (10^{-12} a 3×10^{-5} M) reduzida significativamente em 10% apenas na maior concentração do caurano (FIGURA 33B e 34B). Quando os experimentos foram relacionados à contração tônica do anel de aorta pela fenilefrina, não houve relaxamento por AK quando este foi adicionado ao sistema em doses crescentes a cada 3 minutos (1; 3; 10; 30; 100; 300µg/mL = 3; 10; 30; 100µM e 1mM)) (FIGURA 33A e 34A).

Estes resultados em músculo liso vascular contrastam com os resultados encontrados por Cunha (2001) em miométrio de rata. Na comparação entre os dois tipos de músculos lisos, uterino e vascular, AK tem demonstrado uma clara afinidade pelo miométrio posto que neste, nas curvas doses-resposta para ocitocina (OCI) e para acetilcolina (ACh), seus efeitos relaxantes se iniciam já na concentração de 25µg/mL (80µM) e seu relaxamento final máximo na concentração de 50µg/mL (160µM) chega a $91 \pm 3\%$ e $83 \pm 6\%$, nas curvas para estes agonistas, respectivamente. Igualmente contrastando com o que foi observado em anel de aorta onde não houve relaxamento da contração tônica, Cunha (2001), obteve relaxamento de $90 \pm 10\%$, $87 \pm 5,5\%$, $83 \pm 7\%$ e $19 \pm 4\%$ para uma concentração final de AK de 1,2mM (=362,4µg/mL) quando o estímulo foi por OCI, ACh, BaCl₂ e KCl, respectivamente, sobre a contração miometrial sustentada.

No que diz-respeito à ação do AK, ou quando pré-incubado para posterior realização de uma curva cumulativa dose-resposta para a fenilefrina ou em por ocasião de sua adição cumulativa sobre a contração sustentada pelo mesmo agonista, o efeito relaxante do diterpeno é maior no primeiro caso. Da mesma maneira que observado para o anel de aorta em contração sustentada, houve uma ausência de relaxamento pela adição cumulativa de AK sobre o leito vascular mesentérico (vasos de resistência) que se encontrava sob o estímulo sustentado por fenilefrina 1µM (FIGURAS 35 e 36).

As observações anteriores parecem confirmar as diferenças na ação do AK sobre os diferentes mecanismos envolvidos na contração fásica ou na tônica, e nos diferentes tipos de músculos lisos. Segundo Varagic *et al* (1984), enquanto o componente fásico depende da entrada de cálcio externo, o componente tônico reflete predominantemente mudanças intracelulares no cálcio. Assim, essa diferença na importância do mecanismo envolvido justificaria a ausência de efeito relaxante do AK sobre o músculo liso vascular quando em contração sustentada por fenilefrina 1 μ M. Assim como se observou que, quanto à ação do AK sobre músculo liso vascular e músculo liso uterino, diferente do observado em anel de aorta, Cunha (2001) mostrou claramente que AK parece possuir ação sobre os eventos contráteis intracelulares relacionados à presença do cálcio no miométrio.

Já nos experimentos realizados por Tirapelli *et al* (2004), estes conseguiram um relaxamento significativo por AK numa dose de 50 μ M (15,1 μ g/mL) em anéis de aorta com e sem endotélio nas curvas doses-resposta para fenilefrina ou para KCl. Contudo, para tanto, o tecido foi incubado com AK por um período de 60 minutos. Esse extenso período de incubação para atingir a resposta relaxante do AK inclusive justificaria a ausência em nosso estudo de algumas das respostas obtidas por Tirapelli *et al* (2004).

Ainda dando continuidade aos seus experimentos Tirapelli *et al* (2004) também obtiveram relaxamento concentração-dependente (AK 1 - 450 μ M = 0,302 - 135 μ g/ml) em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina 1 μ M, tanto com endotélio intacto (72%) quanto desnudo (78%). Do mesmo grupo, Ambrósio *et al* (2004) afirmam que para essas mesmas concentrações de AK, no anel sem endotélio, houve um relaxamento máximo de 83% e 73% para as curvas de KCl e fenilefrina, respectivamente, num tempo de aproximadamente 50 minutos. Noutro trabalho de Tirapelli *et al* (2005) o relaxamento para anel de aorta, sem endotélio e pré-contraído por KCl, foi de 82%. Em todos esses trabalhos o tempo total para se atingir o relaxamento do anel vascular pelo AK (50 minutos) foi superior ao tempo utilizado em nossos experimentos (18 minutos). Já Somova *et al* (2001) obtiveram um relaxamento do anel de aorta endotelizado pré-contraído por KCl ou por fenilefrina de 14 e 40%, respectivamente; porém a concentração final para isso foi de 10mg/mL (30mM). Como já fora anteriormente relatado, uma concentração final excessiva para sistemas *in vitro*.

Assim, os resultados aqui apresentados oferecem dados que AK possui menor capacidade relaxante do músculo liso vascular do que do músculo liso uterino, quando comparados os mesmo níveis das concentrações usadas e tempo de incubação na realização dos experimentos *in vitro*. Este fato pode ser fruto da já relatada diferença inerente aos dois tipos de musculatura lisa, talvez relacionada às diferenças nos potenciais de repouso e de ação desses tecidos, diferenças de isoformas e densidade de canais e receptores, na mobilização do cálcio de seus estoques ou na sua interação com proteínas regulatórias como a calmodulina, quinases e fosfatases, entre outros fatores.

Da mesma maneira que parece existir essa clara diferença entre os dois tipos de músculo liso e na ação do AK sobre os mesmos, principalmente no tocante ao seu antagonismo ao cálcio, por outro lado a resposta hipotensora observada *in vivo* no rato, mas sem a observação de relaxamento vascular *in vitro*, também pode estar associada à ação de AK sobre outros fatores regulatórios da pressão arterial, quer centrais ou sistêmicos, e atividade em órgãos que possam interferir com essa regulação. Como afirmam Pan e Combs (1995), há sempre a possibilidade que os efeitos *in vivo* se devam à ativação ou inativação de sistemas não presentes nos modelos *in vitro*. Essa interferência ou ação regulatória de outros fatores nos modelos *in vivo* poderia ser exemplificada pela observação da ocorrência de hipotensão nos experimentos com animais normotensos anestesiados. Neles, esse efeito hipotensor de AK inclusive foi transitório, ao que parece ter sido revertido pelos mecanismos reflexos simpáticos (vide retorno do efeito na FIGURA 25).

6.4. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÁCIDO CAURENÓICO SOBRE O APARELHO RESPIRATÓRIO, *IN VIVO*:

A importância da investigação dos efeitos de AK sobre o sistema respiratório reside no fato do mesmo fazer parte da bateria central (*Core battery*) de sistemas a serem investigados pela Segurança Farmacológica.

Mudanças na função respiratória podem resultar ou de alterações no aparato de bombeamento que controla o padrão de ventilação pulmonar ou de mudanças nas propriedades mecânicas do pulmão que determinam a pressão transpulmonar requerida para inflação e deflação do mesmo. Efeitos não-respiratórios podem também resultar em

consequências respiratórias a partir de efeitos nervosos centrais, metabólicos (alterações do balanço ácido-base) ou vasculares (LUFT & BODE, 2002).

Quando testada a atividade do AK sobre ensaio de resistência traqueobrônquica, num regime de doses i.v. de até 1mg/Kg em rato anestesiado, o mesmo não mostrou mudanças na atividade respiratória, nem alterou as pressões sistólica, diastólica ou a frequência cardíaca também medidas conjuntamente (FIGURAS 37 e 38). Aliás, no caso do experimento da medida do ECG, estes efeitos sobre a pressão arterial e frequência cardíaca só vieram a ocorrer em doses superiores a 7,5mg/Kg.

Quanto à ausência de alterações respiratórias no que diz-respeito à possível ação relaxante das vias aéreas, a ausência de relaxamento parece estar em conformidade com o observado nos experimentos de Cunha (2001) com miométrio, com os experimentos com anéis de aorta pré-incubados com AK deste estudo, e com os experimentos com intestino (dados não publicados), todos *in vitro*, onde ácido caurenóico não promoveu relaxamento do tônus basal.

É provável que nas doses de AK que poderiam levar ao aparecimento de efeitos relaxantes sobre as vias aéreas (efeito este que seria até desejável e potencialmente benéfico do ponto de vista de uma futura investigação na terapia da asma), as mesmas também levem ao surgimento de efeitos cardiovasculares, como observado nos experimentos com ECG de ratos.

Portanto, faz-se necessário delimitar os níveis desejáveis de AK e adequá-los àqueles que se fazem seguros na constituição de seu produto de origem (óleo de copaíba), para que com o mesmo, sejam atingidos seus propósitos terapêuticos. Afinal, uma avaliação de risco não deve se basear apenas na ausência ou na presença de efeitos, mas nas margens de segurança entre o efeito terapêutico desejado e o colateral indesejado (GUTH *et al*, 2004).

6.5. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÁCIDO CAURENÓICO SOBRE O SISTEMA REPRODUTOR FEMININO E SOBRE OS EVENTOS REPRODUTIVOS LIGADOS À MÃE E AO CONCEITO:

Atualmente, o uso de produtos naturais derivados de plantas, com objetivos medicinais, tem aumentado no mundo ocidental (ROUSSEAU E SCHACHER, 2003; ASTIN, 1998) chegando a atingir 40% da população geral. Destes, 70% se autodiagnosticam e automedicam (MacLENNAN *et al*, 1996; ASTIN, 1998; BARNES *et al*, 1998), sendo que a grande maioria desses consumidores é mulher em idade reprodutiva.

Como já foi dito, o uso desses produtos tem sido associado com sérios eventos adversos devido à qualidade do material utilizado, às interações com drogas sintéticas ou ao seu uso em condições particulares tais como a gestação e amamentação (MENNITI-IPPOLITO *et al*, 2005). Exemplo disto é que num estudo realizado na Noruega com 400 mulheres entrevistadas após o parto, 36% destas relataram ter usado produtos medicinais derivados de plantas durante a gestação com uma média de 1,7 produto/mulher, e que seu uso foi mais comumente recomendado por familiares ou amigos. Ainda nesse estudo, 39% das drogas utilizadas foram consideradas prejudiciais ou ausentes de informação acerca de seu uso na gravidez (NORDENG E HAVNEN, 2004).

Outro exemplo da toxicidade de produtos naturais durante o período gestacional é que em estudos com ratas grávidas, a Espinheira-Santa (*M. ilicifolia*), usada como antiulcerogênica e considerada de baixa toxicidade, mostrou-se abortiva (OLIVEIRA *et al*, 1991), e a Erva-de-São-João (*H. perforatum*), usada como antidepressivo e cuja utilização por mulheres gestantes ou na fase de amamentação tem sido emergente (GRUSH *et al*, 1998), mostrou-se hepatotóxica e nefrotóxica para ninhadas de ratos cujas fêmeas foram tratada nesses dois períodos (GREGORETTI *et al*, 2004).

De fato, mulheres grávidas e em lactação tendem a usar produtos derivados de plantas exatamente porque eles são percebidos freqüentemente como “naturais e, assim, seguros” (EINARSON *et al*, 2000), o que indica uma crescente necessidade de conhecimento e documentação acerca da segurança das drogas fitoterápicas durante a gestação.

A partir dessas considerações, o passo seguinte foi a avaliação dos efeitos do ácido caurenóico sobre os aspectos reprodutivos ligados às fêmeas de camundongo gestantes, à manutenção de gestação e ao desenvolvimento dos embriões e dos fetos, de modo a fornecer mais substrato para a formação do perfil de segurança do óleo de copaíba e sua utilização pela população, em especial, mulheres em idade reprodutiva.

A escolha das doses utilizadas baseou-se na menor dose de AK que apresentou efeitos antiinflamatórios (antioxidantes e antilipoperoxidativos). Efeitos estes que correspondiam aos observados para o óleo de copaíba, obtidos nos experimentos realizados por Paiva *et al* (2003). Assim, a dose escolhida inicialmente foi a de 50mg/Kg; e uma dose inferior a esta, não indicada como antiinflamatória naqueles experimentos, 25mg/Kg.

Nas últimas décadas foram identificadas inúmeras plantas com atividade estrogênica. Até 1998, chegavam a mais de 300 diferentes espécies estudadas, que possuíam substâncias com capacidade de se ligar ao receptor do estrógeno e de induzir a atividade estrogênica (DIEL *et al*, 1999). Assim, há a possibilidade que esses compostos possam afetar o sistema endócrino e causar distúrbios do desenvolvimento (SETCHELL *et al*, 1984) e reprodutivos (McLACHLAN E NEWBOLD, 1987; SETCHELL *et al*, 1987). Por esta razão, há necessidade de se caracterizar a potência hormonal de produtos naturais que possam vir a se ligar ao receptor estrogênico (DIEL *et al*, 1999).

A pesquisa da atividade hormonal para AK foi realizada com fêmeas de rato impúberes com idade entre 18 e 21 dias de nascidas. Ácido caurenóico não apresentou nem atividade estrogênica, nem antiestrogênica sobre os parâmetros observados de tempo de abertura do canal vaginal e dos pesos dos úteros; assim como estes não mostraram alterações histológicas (FIGURAS 39 E 40).

Em geral, as agências reguladoras tendem a classificar os produtos naturais como suplementos dietéticos, permitindo uma lacuna se estes produtos são mesmo produtos alimentícios ou se são drogas. Para adicionar complexidade a essa questão, a maioria dos potenciais efeitos deletérios dos produtos naturais sobre os conceitos pode estar relacionada a efeitos hormonais (por exemplo, os fitoestrógenos) e interações nutracêuticas (por exemplo, erva-de-São-João e antidepressivos), em vez de uma embriofetotoxicidade direta *per se*. Nesse tocante, AK não apresentou atividade hormonal, ao contrário de alguns diterpenos

cauranos pesquisados por MORIWAKI *et al* (1986) que tanto apresentaram efeitos esteroidogênicos sobre células adrenais isoladas de rato, quanto também foram estimulantes da produção de progesterona em ratos (ASEM E TSANG, 1988), e aves (HERTELENDY E ASEM, 1989) em preparações de células da granulosa isoladas; mas atenuaram a produção de progesterona quando estas foram estimuladas pelos hormônios luteinizante e folículo estimulante.

A ausência de mudanças histológicas nos úteros das fêmeas tratadas com AK (FIGURA 40) também foi diferente do observado para útero isolado de rata, incubado com outro caurano, o ácido cauredienóico, cuja exposição levou-o a apresentar pregas luminais irregulares em forma e tamanho; as células epiteliais de colunares tornaram-se mais planas e eventualmente descamadas. Nestes úteros ainda, as glândulas, normalmente cúbicas, tornaram-se irregulares e reduzidas, o lúmen dos vasos mostrou-se mais distendido e houve sinal de edema do tecido conectivo (CAMPOS-BEDOLLA, *et al*, 1997). Mas não foi o que ocorreu com os úteros tratados por AK.

Em vista da necessidade de evidenciar os possíveis riscos da utilização de substâncias químicas (aqui, derivados de produtos naturais) sobre os processos reprodutivos, as agências normativas agrupam as diferentes fases da reprodução para avaliação dos compostos mais freqüentemente em três tipos de estudos ou segmentos: 1) Fertilidade; 2) Embriofetotoxicidade (aonde vão se encontrar também os testes de teratogenicidade propriamente ditos) e, 3) Desenvolvimento peri e pós-natal (LEMONICA, 1996; BARROW, 2003). Nesse estudo, a avaliação do AK incide sobre o segundo segmento.

Quando foram realizados ensaios para avaliação dos efeitos do AK sobre a embriogênese (da fecundação até o 7º dia de gestação), o que pôde ser observado quanto à toxicidade do AK foi que, na dose de 25mg/Kg (AK25), este reduziu o ganho de peso materno durante o período de tratamento, mas não foi significativo para a *performance* reprodutiva. Enquanto no grupo AK 50mg/Kg (AK50), houve um menor ganho de peso durante a gestação, sem sinais clínicos de intoxicação da mãe, mas com um aumento significativo de perdas embrionárias, redução no número de corpos lúteos e implantações. Ou seja, reduziu a *performance* reprodutiva. O controle positivo indometacina, na dose de 2mg/Kg (INDO2), promoveu redução significativa no número de corpos lúteos e implantações comparadas ao controle não tratado, e não mostrou nenhuma alteração materna.

Já na dose de 4mg/Kg (INDO4), similar à máxima dose diária humana segundo o fabricante Merck Company (LIONE E SCIALLI, 1994), INDO4 levou à morte 60% das fêmeas tratadas. As fêmeas remanescentes (duas) não obtiveram ganho de peso e apresentaram piloereção, pouca atividade locomotora, tremores, sangramento vaginal e estado geral fraco. Além disso, estas tiveram 100% de perda embrionária e os ovários não apresentavam corpos lúteos. (TABELA 6)

Um aspecto muito importante com relação aos testes de toxicidade reprodutiva é que, quando se testam os possíveis efeitos tóxicos de uma substância, faz-se necessário estabelecer se eles se devem a uma ação direta sobre o feto ou a uma ação indireta resultante da toxicidade sobre a mãe, o que interferiria no desenvolvimento do conceito.

Em animais se aceita que qualquer teste químico dado em doses que causem alteração na homeostase materna afeta adversamente o desenvolvimento fetal. Se a dose excede a habilidade da mãe para detoxificar e eliminar o agente testado, o mesmo pode passar para o conceito e causar um efeito direto juntamente com os efeitos secundários resultantes da fisiologia materna alterada (KHERA, 1984). Parece ser isso o que ocorreu com INDO2, que reduziu a *performance* reprodutiva sem afetar adversamente a mãe, enquanto INDO4, foi tóxica para todas as fêmeas que apresentaram sinais clínicos claros de debilidade, com perda de peso, piloereção, ataxia e sangramento vaginal, e posterior morte de quatro das seis fêmeas do grupo (60%), enquanto as duas que restaram vivas não possuíam implantações. No primeiro grupo, INDO mostrou um efeito antiimplantacional devido aos seus efeitos antiinflamatórios pela inibição da enzima ciclooxigenase (COX), visto que o uso de inibidores da COX impede a implantação em ratos e camundongos (LAU *et al*, 1973). Enquanto no segundo grupo (4mg/Kg), INDO foi também claramente tóxica para a mãe. Ao passo que AK50 reduziu a *performance* reprodutiva sem mostrar toxicidade para as fêmeas, parecendo ser mais um efeito sobre o conceito. Com relação às atividades já estudadas do AK, este caurano, em ensaios *in vitro*, mostrou atividade inibidora sobre as duas isoformas da enzima ciclooxigenase, COX-1 e COX-2. Para sua atividade inibidora da COX-1, esta foi bem superior à aspirina (acima de 10 vezes), e para inibição da COX-2 apenas cerca de 1,5 vez menos potente que a indometacina (KIEM *et al*, 2004; DANG *et al*, 2005).

A ingestão de drogas antiinflamatórias não esteróides (DAINES), em altas doses, pode causar envenenamento. Mas em geral, esses efeitos deletérios ficam confinados aos efeitos

sobre o trato gastrointestinal e no sistema nervoso central, sem significativa morbidade ou mortalidade, mas que podem ser complicados por falência renal, disfunção hepática, depressão respiratória, convulsões, colapso cardiovascular e parada cardíaca (VALE E MEREDITH, 1986). E nenhum desses efeitos foi encontrado na observação das fêmeas tratadas com AK durante o período de tratamento.

Durante a gestação, deve ser levado em consideração que as mudanças fisiológicas que ocorrem podem potencialmente influenciar as propriedades toxicocinéticas e farmacodinâmicas das drogas testadas (BARROW, 2000). O organismo materno tem a volemia aumentada, o que modifica a distribuição das substâncias. A absorção oral também sofre modificações pela diminuição da motilidade do trato gastrointestinal. Essas alterações de distribuição e absorção acabam por levar a um padrão diferente de eliminação. Ademais, o estado progestagênico da fêmea leva a mudanças na metabolização hepática das drogas, alterando sua toxicidade dependendo do metabólito que é formado (LEMONICA, 1996).

Barrow (2000) afirma que, quando considerado apenas o menor ganho de peso materno (salientando que nenhum outro sinal de toxicidade foi observado), os guias das agências regulatórias indicam que esta análise é pouco apropriada para estudos de embriotoxicidade onde os animais não são tratados durante o período fetal. Além disso, nesse caso, torna-se difícil determinar se a toxicidade para os embriões foi unicamente secundária ao efeito materno.

Segundo Collins *et al* (1999), quando não há suficiente evidência que dê suporte à premissa que a toxicidade sobre o desenvolvimento do conceito seja sempre um efeito secundário à toxicidade materna, os efeitos que ocorrem na presença de mínima toxicidade materna (como o que se observou com AK nesse período da embriogênese) são assim considerados evidência de toxicidade sobre o desenvolvimento, a menos que possa ser estabelecido que estes efeitos sejam inquestionavelmente secundários aos efeitos maternos, como pôde ser observado no controle indometacina, e que já estão bem descritos na literatura.

Ainda em continuidade à busca dos possíveis mecanismos toxicológicos do AK, quando são considerados os processos gerais de implantação nos mamíferos, estes envolvem uma série de eventos inter-relacionados, todos os quais devem ser completados para que uma gestação normal ocorra. Estes eventos incluem a preparação uterina, o transporte sincronizado

do embrião, a adesão embrionária, a transformação uterina, o desenvolvimento placentário e o meio hormonal necessário para sustentar cada etapa (CUMMINGS, 1990).

A preparação do endométrio, durante o qual o útero desenvolve a capacidade para a implantação ou “receptividade”, em roedores não é bem definida no nível molecular, mas é estreitamente regulada no nível fisiológico pelos hormônios esteróides ovarianos (progesterona seguida por um pico de estrógeno), de tal modo que um limitado período de receptividade é produzido (KIMBER E SPANSWICK, 2000; YOCHIM E FEO, 1963). Esta janela de receptividade ocorre num período inferior a 24 horas (PSYCHOYOS, 1976), com a implantação se processando por volta da meia noite do 4º dia de gestação no camundongo (KIMBER E SPANSWICK, 2000). Após esse período, o útero torna-se refratário. Nesse tocante, AK já mostrou em experimento prévio que não possui atividade nem estrogênica nem antiestrogênica que pudesse interferir na implantação.

A aplicação do protocolo de tratamento do 1º ao 7º dia de gestação das fêmeas permitiu avaliar as questões relativas à *performance* reprodutiva dessas fêmeas num dado regime de doses que inclui o período a fertilização e implantação, circundando o período pós-implantacional de desenvolvimento decidual (CUMMINGS, 1990) que se inicia por volta do 8º dia (LJUNGKVIST, 1972; RASHEED *et al*, 1997). Mas esses dados não mostraram se a ação do AK para reduzir a fertilidade foi primariamente exercida durante a pré-implantação ou na pós-implantação, nem se pode haver diferença na sensibilidade à dose durante cada período. Por isso, como se considerou anteriormente que os efeitos de AK50 incidiram primariamente sobre os conceitos, o próximo passo foi avaliar se estes efeitos se dão sobre o desenvolvimento pré-implantação da receptividade uterina (1º ao 3º dia de gestação), ou sobre a pós-implantação e manutenção da gestação (4º ao 8º dia de gestação).

Nesse protocolo o que pôde ser observado foi que não houve diferença entre os períodos de pré-implantação e pós-implantação quanto à perda embrionária (TABELA 7), mostrando que a ação de AK50 incide sobre todo o período embrionário, a implantação e o início da decidualização. Ainda assim, somando estes aos achados do protocolo anterior, algumas considerações podem ser feitas sobre a ação do AK durante essa fase.

Ocorrendo simultaneamente com a diferenciação embrionária no período da pré-implantação uterina estão o transporte e o desenvolvimento do embrião no oviduto. O *timing*

destes fenômenos deve ser sincronizado de tal modo que os embriões no estágio apropriado de desenvolvimento cheguem ao útero coincidente com a máxima sensibilidade uterina para implantação (HODGEN E ITSKOVITZ, 1988).

Sabe-se que o ácido caurenóico já mostrou uma clara ação relaxante uterina em experimentos realizados com miométrio de rata, *in vitro* (DE ALENCAR CUNHA *et al*, 2003). Considerado este fato, pode-se pressupor que talvez a ação espasmolítica de AK sobre a motilidade do oviduto promova um retardo no transporte embrionário até o sítio de implantação, perdendo assim a janela de implantação para um esperado estágio de desenvolvimento desse embrião. A mesma hipótese foi sugerida por Almeida e Lemonica (2000) com relação ao extrato da espécie *Coleus barbatus*, que apresenta ação espasmolítica do músculo liso e levou a um aumento na taxa de perdas embrionárias na pré-implantação em ratos, e pode ser devido à presença de seus constituintes diterpênicos com atividade relaxante do músculo liso.

Outro aspecto a ser considerado é a receptividade uterina à implantação e os mecanismos envolvidos no processo de nidação e início da decidualização.

Após a fecundação, há um significativo aumento identificado na linhagem branca sangüínea no endométrio e correspondente à janela de implantação. Esta migração é promovida pelas quimiocinas presentes no endométrio. A concomitante reação local que ocorre nos sítios de adesão do blastocisto é comparável a uma reação inflamatória e há uma significativa similaridade entre os dois processos, com envolvimento de fibroblastos residentes, infiltrados de eosinófilos, neutrófilos e mastócitos e mudanças nas reações vasculares locais (KIMBER E SPANSWICK, 2000; BRANDON, 1993).

Resultados de experimentos com várias espécies animais têm sugerido que as prostaglandinas possuem uma função crítica no desenvolvimento da permeabilidade vascular, implantação e decidualização. Em vários modelos foi mostrado que os inibidores da síntese de prostaglandinas previnem ou retardam a implantação. Este efeito foi mostrado ser dependente da inibição da produção de prostaglandinas derivadas do útero e não um efeito das prostaglandinas do ovário ou do embrião (MARIONS E DANIELSSON, 1999).

Como já foi dito anteriormente, a atividade antiinflamatória do AK já foi estudada e este caurano apresentou tanto uma atividade inibidora da COX-1 (CI_{50} acima de 10 vezes mais potente que a aspirina) quanto um efeito sobre a COX-2 (apenas 1,5 vez menos potente que a indometacina) em experimentos *in vitro* (DANG *et al*, 2005). Isto leva à pressuposição de uma ação antiimplantacional do AK, já que a enzima responsável pela síntese de prostaglandinas envolvida nos processos inflamatórios, a ciclooxigenase (COX) encontra-se expressa nas suas duas formas, COX-1 e COX-2, no útero na fase de periimplantação (MARIONS E DANIELSSON, 1999).

De fato, no útero de camundongos, o gene da COX-1 é expresso no epitélio uterino por ocasião do surgimento do edema generalizado requerido para o fechamento luminal. Enquanto o gene da COX-2 é expresso no epitélio luminal e células estromais subepiteliais e no pólo antimesometrial exclusivamente em torno do blastocisto no momento da reação de adesão, sugerindo que as prostaglandinas geradas pela COX-1 estão envolvidas na decidualização e aquelas geradas pela COX-2 estão envolvidas na angiogênese para o desenvolvimento e estabelecimento da placenta e são reguladas pela implantação do blastocisto. Em experimentos realizados com anticorpos policlonais contra COX-1 e COX-2, em útero de mulheres saudáveis, foi mostrado que COX-1 é encontrada principalmente no epitélio luminal e glandular e COX-2 é encontrada principalmente no epitélio luminal e células perivasculares (MARIONS E DANIELSSON, 1999).

Adicionalmente, deve ser salientado que dentre as tantas citocinas envolvidas na implantação, proliferação e diferenciação do trofoblasto, angiogênese e adesão celular, a $TNF-\alpha$ é a responsável (juntamente com a IL-1) pela indução da expressão da COX-2 (SAITO, 2001). E AK também apresentou uma atividade inibidora da secreção de $TNF-\alpha$ em mastócitos HMC-1 estimulados por tripsina *in vitro* (CAI *et al*, 2003)

Porém, os efeitos antiimplantacionais podem ser devido a vários outros fatores, tais como alterações morfológicas no epitélio uterino. Assim, também foi analisada a estrutura morfológica do endométrio das fêmeas tratadas com AK. Do ponto de vista da integridade das células epiteliais em associação à presença das glândulas endometriais, os úteros encontravam-se receptivos. Contudo, do ponto de vista do processo inflamatório necessário à implantação, houve uma progressiva redução do infiltrado neutrofílico e do edema dos grupos tratados, o que pode ser indicativo da atividade antiinflamatória da droga. De modo que isso possa estar

interferindo com os processos de implantação, decidualização, permeabilidade vascular etc (FIGURAS 41 e 42)

Ao passar à abordagem dos aspectos que se relacionam apenas ao desenvolvimento do embrião vale salientar que esse é um período de intensa divisão celular. Portanto, a abordagem deve considerar os estágios de desenvolvimento do conceito e as possíveis respostas à ação da droga em cada fase. Estes estágios são: o período peri-implantacional de divisões mitóticas da embriogênese (de que se está tratando até o momento), o período da organogênese (onde se encontram as possibilidades de uma substância gerar uma malformação; é o período teratogênico propriamente dito), e o período fetal, onde ocorre o crescimento e maturação funcional (este é um período refratário, não teratogênico no sentido estrito da palavra. Neste, as substâncias químicas não levam às malformações, mas podem levar a alterações no SNC, sistema imunológico ou endócrino e retardo geral no desenvolvimento) (LEMONICA, 1996; JOHNSON *et al*, 1993; WILSON, 1965).

Nesse mesmo projeto já foi discutido anteriormente que AK mostrou atividade tóxica para as células tumorais, para embriões de ouriço (*L. variegatus*) nas fases de 1ª clivagem, blastocisto e, principalmente na fase larval, indicando que o caurano pôde induzir efeitos letais que influenciaram as divisões celulares e o desenvolvimento dos órgãos nessa espécie. Além disso, a literatura indica que AK também apresenta potencial genotóxico que, não necessariamente, pode mesmo levar a uma atividade carcinogênica. Esses aspectos citotóxicos do AK também devem ser considerados tanto no período da embriogênese como no período da organogênese.

Outrossim, quanto àquele primeiro estágio de intensas divisões celulares mitóticas da embriogênese, este é chamado de período de “tudo ou nada”. Neste período o embrião é formado de células totipotentes, em divisão sem que haja acréscimo citoplasmático. Assim, dependendo do número de células atingidas pelo tóxico, ocorre ou a reposição das mesmas por células normais ou, se atingido um grande número de células, a embrioletalidade (LEMONICA, 1996; WILSON, 1977; BARROW, 2000). Essa fase da gestação onde há intensa divisão celular do embrião encontra-se em conformidade com aqueles efeitos anteriores observados sobre embriões de ouriço e células tumorais no estudo da ação do AK. Assim, dados os já observados efeitos citotóxicos de AK, talvez AK50 possa também estar

agindo de modo a atingir um número de células embrionárias superior à capacidade do embrião em substituí-las.

Quando realizado o estudo dos efeitos tóxicos de AK sobre o período crítico da organogênese (8º ao 15º dia de gestação) tem-se que, do ponto de vista da toxicidade materna, há muitas formas de avaliá-la; entre elas, o aparecimento de pelo menos uma das observações: redução do peso corporal materno, aparecimento de sinais clínicos de toxicidade (como piloereção, alterações na atividade locomotora, diarreia, sangramento vaginal etc), redução no consumo de água e alimentos ou morte (KHERA, 1984; COLLINS *et al*, 1999; BARROW, 2000). Já quando se avalia a presença de anormalidades fetais, estas se dividem em duas categorias: malformações e variações. Por malformação entende-se a mudança estrutural permanente que provavelmente afeta adversamente a sobrevivência ou saúde das espécies sob investigação. E variação é a mudança que ocorre dentro da população normal sob investigação, sendo pouco provável que afete a sobrevivência ou saúde. Esta pode incluir retardo/atraso no crescimento ou morfogênese que, de outra forma seguiria um padrão normal de desenvolvimento (CHAHOUUD *et al*, 1999).

Como para essa fase da gestação passa a ganhar importância o parâmetro de peso materno, o menor ganho de peso materno durante o período de tratamento (8º a 15º dia) no grupo AK25 parece indicar toxicidade materna para o diterpeno, e foi acompanhada da redução do peso fetal e placentar. Além disso, esses fetos apresentaram retardo na ossificação (TABELA 10). Estes efeitos tóxicos parecem ter progredido no grupo AK50 para uma toxicidade de tal ordem que, além da redução no ganho de peso materno (metade do ganho dos controles), houve reabsorção de todos os conceptos (perda total da gestação) em quase todas as ninhadas. Ou seja, 82,4% das fêmeas detectadas grávidas após o acasalamento (1º dia) nesse grupo encontravam-se completamente vazias no dia do sacrifício (20º dia) – 14 das 17 fêmeas grávidas do grupo AK50 (TABELAS 8 e 9).

Segundo Khera (1984), é possível que estes achados possam ser secundários a uma ação maternotóxica, ou à incapacidade das mães em detoxificar altas doses do agente, como anteriormente citado. Este autor indica que ao realizar estudos com diferentes agentes químicos de estruturas diversas que foram maternotóxicos, estes também invariavelmente causaram redução no peso fetal, aumento das reabsorções e algumas mortes fetais.

Ao se considerar a possibilidade do efeito tóxico ser secundário a uma ação primária sobre a mãe, uma das possíveis explicações para os resultados crescentes de menor peso fetal, retardo no desenvolvimento (menor número de centros de ossificação) e reabsorções que foram observados (TABELAS 9 e 10), pode ser dada por dois já estudados efeitos desse caurano: o primeiro relaciona-se à sua ação espasmolítica sobre a musculatura lisa (DE ALENCAR CUNHA *et al*, 2003), que pode ser responsável por uma maior redução na motilidade do trato gastrointestinal da mãe, podendo assim inibir uma boa absorção de nutrientes para a corrente sanguínea materna, e reduzindo a disponibilidade dos mesmos para a transferência para o conceito. Mecanismo similar foi sugerido por Boswell-Ruys *et al* (2003) num estudo das ações dos extratos da espécie *Achillea millefolium* (Yarrow) que possui ações antimicrobianas, hipotensora, diurética e antiinflamatória atribuídas a seus constituintes sesquiterpênicos, quando realizaram estudos dos efeitos reprodutivos da planta. Aliás, quanto à redução na motilidade do trato gastrointestinal, estudos utilizando jejuno de rato *in vitro*, realizados no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, mostraram que AK (20µg/mL = 60µM) promoveu uma redução de cerca de 80% nas contrações concentração-resposta para 5-HT e ACh (dados não publicados).

O segundo efeito que pode estar promovendo essas ações tóxicas supracitadas talvez se relacione à ação hipoglicemiante de AK que se apresenta já numa dose de 10mg/Kg, como foi observado em experimentos com ratos diabéticos que ingeriram glicose (BRESCIANI *et al*, 2004). Isto porque esse efeito de AK também pode estar também impedindo um fornecimento nutricional adequado para o perfeito desenvolvimento do conceito. Sabe-se que a glicose para o metabolismo fetal chega a este através da placenta, sendo ele extremamente dependente desta fonte de glicose, pois as enzimas necessárias à neoglicogênese encontram-se presentes em baixas concentrações no feto (CAMPBELL, 1976).

Ainda em relação ao fornecimento nutricional para o conceito, outro aspecto é que a placenta tem só 2 a 3% de glicogênio, o que a torna dependente do suprimento de nutrientes para seu desenvolvimento e manutenção (CATALANO *et al*, 1995). Assim, o menor peso da placenta do grupo AK25 (TABELA 9) também pode ser resultado desta redução de nutrientes devido à possível redução dos níveis séricos de glicose materna. Estas considerações também têm sido observadas por CHANG *et al* (2002), quando trataram ratas grávidas com a espécie Lobeira (*Solanum lycocarpum*), usada como diurética, antiespasmódica (CRUZ, 1982), hipoglicemiante e hipocolesterolêmica (DALL'AGNOL E POSER, 2000), e que levou à

redução do peso placentar em seus experimentos, assim como nos experimentos de GUERRA *et al* (1997), que obtiveram redução do peso fetal.

Por outro lado, não se pode descartar um possível efeito tóxico direto de AK sobre a ninhada. Principalmente na maior dose que, como já foi explicado, pode ter excedido a capacidade de detoxificação da mãe. E, segundo LEMONICA (1996), substâncias com um peso molecular até 600 podem ultrapassar a barreira placentária com facilidade – o ácido caurenóico tem peso molecular 302. Afinal, também se deve lembrar que AK possui aqueles já explanados efeitos antiinflamatórios, citotóxicos e genotóxicos, que podem levar a alterações incompatíveis com a vida e, portanto, às reabsorções como observado em AK50.

Vale salientar um aspecto muito importante, AK de acordo com os parâmetros avaliados, não produziu malformações. Naturalmente, nem sempre se atinge o nível teratogênico de uma substância. Existem substâncias dotadas de baixo poder embriofetotóxico que podem afetar a mãe causando-lhe a morte, sem qualquer efeito direto no conceito; como há substâncias altamente embriofetotóxicas que, com mínima elevação da dose teratogênica, levam à letalidade do conceito (LEMONICA, 1996). Nesse estudo, AK não foi teratogênico, mas foi letal para os conceitos (TABELA 9).

Exemplo dessa possibilidade de ação letal para os conceitos sem que se atinja o potencial teratogênico já foi dada para outras substâncias químicas administradas durante a organogênese, como por exemplo, o arsênico que em doses maternotóxicas leva à redução do peso fetal, atraso na ossificação das esternebras e aumento das reabsorções sem, contudo, produzir malformações (HOLSON *et al*, 2000), ou a indometacina que, em experimentos com coelhos, aumentou o número de reabsorções, mas os fetos remanescentes desenvolveram-se normalmente (O'GRADY *et al*, 1972).

Aliás, com relação aos efeitos observados sobre os fetos, o estágio de desenvolvimento esquelético pode fornecer um índice adicional na avaliação dos mesmos, já que um baixo peso fetal nem sempre pode ser um índice fidedigno (ALIVERTI *et al*, 1979). Esse retardo na ossificação associado ao baixo peso fetal foi observado nos fetos do grupo AK25, e culminou em extensa perda gestacional com o aumento da dose administrada no caso do grupo AK50, onde 82,4% das fêmeas gestantes encontravam-se vazias ao final do tratamento, no dia do sacrifício. Nesse grupo (AK50) apenas 3 fêmeas encontravam-se gestantes no dia do

sacrifício, e seus fetos apresentavam desenvolvimento normal semelhante aos controles (TABELA 10). Além do que já se comentou no parágrafo anterior, algumas outras considerações podem ser feitas a esse respeito.

O motivo para a presença de 3 ninhadas remanescentes ao fim do tratamento no grupo AK50, e estes fetos serem mais pesados e sem presença de retardos ósseos ao contrário da resposta observada para os fetos do grupo AK25 (TABELA 9, TABELA 10) é que é provável ter havido uma maior resistência desses animais ao tratamento com AK, já que a cepa de camundongos utilizada nos experimentos foi do tipo *random bred*. As cepas *random bred* são preferencialmente usadas quando a substância testada em provas de teratogenicidade é um produto desconhecido, em detrimento de cepas *inbred*, que são preferidas quando se deseja estudar um tipo particular de malformação observado com alta frequência naquela cepa escolhida (LEMONICA, 1996; HARTSFIELD *et al*, 1995). Isto significa dizer que essas 3 fêmeas e suas ninhadas parecem pertencer a o que se chamaria de um sub-grupo que foi mais resistente ao tratamento, e que – para melhor exemplificar – se encontraria na ponta direita num gráfico de distribuição gaussiano. Aliás, este deve ser o mesmo motivo (uso de uma cepa *random bred*) que levou ao tratamento com a dose de 25mg/Kg não apresentar significância estatística quando considerado o percentual de perdas fetais (TABELA 9). O tratamento aumentou a perda já nessa dose, porém esta perda não foi igual entre as ninhadas (o que pode ser mostrado pelo alto erro padrão da média). O mesmo tipo de observação feita por Almeida e Lemonica (2000) quando realizaram estudo sobre os efeitos do falso boldo (*Coleus barbatus*) sobre a gestação de ratos.

Assim, AK se mostrou embriotóxico e fetotóxico, porém não levou ao aparecimento de malformações, apenas de variações na forma de retardos. A embriofetotoxicidade gerada e que levou à perda da gestação pode ser atribuída tanto a fatores maternos como uma ação direta sobre os embriões e fetos.

7. RESUMO DO PERFIL DE SEGURANÇA FARMACOLÓGICA DO ÁCIDO CAURENÓICO

A avaliação de risco do constituinte bioativo do óleo de copaíba, ácido caurenóico, permitiu traçar o seguinte perfil de Segurança Farmacológica:

1) Nos testes de citotoxicidade *in vitro*, ácido caurenóico:

- Foi hemolítico para eritrócitos de camundongo e humanos;

- Foi tóxico para larvas de *Artemia sp.* e para embriões de ouriço (*L. variegatus*), principalmente na organogênese destes últimos, com uma potência similar a de drogas antineoplásicas derivadas de produtos naturais testadas nesses modelos experimentais;

- Manifestou ação antiproliferativa contra linhagens de células tumorais mamas e de câncer de cólon e leucêmicas;

2) No teste de toxicidade aguda, o ácido caurenóico em doses de até 1g/Kg de peso vivo, não promove efeitos tóxicos observáveis, nem morte em camundongos até 72 horas após sua administração;

3) Na Bateria Central de testes em Segurança Farmacológica:

- Ácido caurenóico não apresentou toxicidade para o SNC baseado em testes de *screening* neurocomportamental e de coordenação motora, realizados com camundongos;

- Ácido caurenóico, nas concentrações usadas, não aumentou o intervalo QT do ECG, parecendo não ser promotor de arritmias fatais do tipo *Torsades des Pointes*, mas induziu bradicardia e hipotensão na maior dose.

- Ácido caurenóico não relaxou o músculo liso vascular em contração sustentada de fenilefrina, mas reduziu a resposta contrátil máxima na curva dose-resposta para o mesmo agonista na sua maior dose (50µg/mL = 160µM).

- No sistema respiratório, o ácido caurenóico não afetou a função respiratória, o que foi observado através do estudo de sua ação sobre a resistência traqueobrônquica de ratos;

4) Nos estudos suplementares de Segurança Farmacológica para o ácido caurenóico sobre os eventos reprodutivos ligados às fêmeas e aos seus conceitos tem-se que:

- Ácido caurenóico não apresenta atividade hormonal, nem estrogênica nem antiestrogênica em ratas;

- Ácido caurenóico possui baixa toxicidade sobre as fêmeas de camundongo, apenas com redução de seu ganho de peso na gestação, porém foi embriofetotóxico com efeitos que levaram à perda da gestação nos períodos pré-implantacional, implantacional e organogênico. O potencial teratogênico não foi atingido (tratamento das fêmeas grávidas do 8º ao 15º dia de gestação com sacrifício no 20º dia). Estes conceitos não apresentaram malformações externas nem dos órgãos internos, mas apresentaram retardos na ossificação na menor dose, e houve perda total da gestação na maior dose administrada.

8. CONCLUSÃO

Considerando todos os pontos do perfil de Segurança Farmacológica delineados, conclui-se que:

1º) De acordo com a diretriz S7A do ICH, a atividade letal para larvas de *Artemia sp*, hemolítica, de destruição de embriões de ouriço e anticancerígenas *in vitro* indicam o potencial citotóxico de AK;

2º) AK mostrou-se seguro nas doses utilizadas sobre os parâmetros de avaliação de toxicidade aguda e neurotoxicidade de acordo com a bateria central de testes indicados pela diretriz S7A do ICH;

3º) Pelas diretrizes S7A e S7B do ICH, AK mostrou-se seguro nas doses utilizadas quanto a seus efeitos cardiovasculares. Principalmente, AK não demonstrou potencial arritmogênico por avaliação do intervalo QT do ECG.

4º) AK mostrou-se seguro nas doses utilizadas sobre a necessidade de avaliação de drogas sobre o sistema respiratório exigidos pela bateria central de testes, segundo a diretriz S7A do ICH;

5º) As exigências da diretriz S5A do ICH para testes sobre a reprodução, somadas aos já observados efeitos citotóxicos *in vitro* do AK, levam à indicação de não consumo de produtos que possuam o ácido caurenóico como predominante na sua composição por gestantes, principalmente no primeiro trimestre da gestação.

9. REFERÊNCIAS

- ACEY, R.A; TOMLISON, D.W. *Artemia salina* as a model system for assessing the effects of xenobiotics on embryonic development. **FASEB J.** v. 2, n. 6, p. 8463, 1988
- 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.** v. 19, n. 6, p. 377-84, 1999
- AGNER, A.R; MACIEL, M.A.M; PINTO, A.C; CÓLUS, I.M.S. Antigenotoxicity of trans-dehydrocrotonin, a clerodane diterpene from *Croton cajucara*. **Planta Med.** v. 67, p. 815-819, 2001
- AKI H, YAMAMOTO M. Drug binding to human erythrocytes in the process of ionic drug-induced hemolysis. Flow microcalorimetric approaches. **Biochem Pharmacol.** v.41, n. 1, p.133-138, Jan. 1991
- ALIVERTI, V.; BONANOMI, L.; GIAVINI, E. The extent of fetal ossification as an index of delayed development in teratogenic study on rat. **Teratology.** v.20, n. 3, p. 237-242, 1979
- ALMEIDA F.C., LEMONICA I.P. The toxic effects of *Coleus barbatu* B. on the different periods of pregnancy in rats. **J Ethnopharmacol.** v. 73, n.1-2, p. 53-60, nov. 2000
- ALVES, T. M. A.; CHAVES, P. P. G.; SANTOS, L. M. S. T.; NAGEM, T. J.; MURTA, S. M. F.; CERAVOLO, I. P.; ROMANHA, A. J.; ZANI, C. L. A diterpene from *Mikania obtusata* active on *Trypanosoma cruzi*. **Planta Méd.**, v. 61, n. 1, p. 85- 86, 1995.
- ALVES, T. M. A.; CHAVES, P. P. G.; SANTOS, L. M. S. T.; NAGEM, T. J.; MURTA, S. M. F.; CERAVOLO, I. P.; ROMANHA, A. J.; ZANI, C. L. A diterpene from *Mikania obtusata* active on *Trypanosoma cruzi*. **Planta Méd.**, v. 61, n. 1, p. 85- 86, 1995.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA.. Novas regras padronizam produção de fitoterápicos. **Notícias da ANVISA**, Brasília, 18 mar. 2004. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2004/180304.htm>> Acesso em jan. 2006.
- AMBROSIO SR, TIRAPELLI CR, COUTINHO ST, DE OLIVEIRA DC, DE OLIVEIRA AM, DA COSTA FB. Role of the carboxylic group in the antispasmodic and vasorelaxant action displayed by kaurenoic acid. **J Pharm Pharmacol.** v. 56, n. 11, p. 1407-13, nov, 2004
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Anim Behav** v. 21, n. 2, p. 205-235, 1973.

ASEM EK, TSANG BK. The effect of kaurenol on steroidogenesis and cyclic adenosine monophosphate production in rat granulosa cells. **Mol Cell Endocrinol.** v. 57, n. 1-2, p. 149-56, May, 1988

ASTIN, J.A. Why patients use alternative medicine. Results of a national study. **JAMA.** v. 279, p. 1548-1553, 1998

BACHMANN A, MUELLER S, KOPP K, BRUEGGEMANN A, SUESSBRICH H, GERLACH U, BUSCH AE. Inhibition of cardiac potassium currents by pentobarbital. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.** v. 365, n. 1, p. 29-37, jan 2002

BADER G, PLOHMANN B, HILLER K, FRANZ G. Cytotoxicity of triterpenoid saponins. Part 1: Activities against tumor cells in vitro and hemolytical index. **Pharmazie.** v. 51, n. 6, p. 414-7, jun, 1996

BAREL S, SEGAL R, YASHPHE J. The antimicrobial activity of the essential oil from *Achillea fragrantissima*. **J Ethnopharmacol.** v. 33, n. 1-2, p. 187-91, May-Jun, 1991

BARLOW, F.W. Rubber, gutta and chicle. In: ROWE, J.W. (ed). **Natural products of woody plants II.** Berlin: Springer-Verlag, 1989, p. 155-178

BARNES, J. et al. Different standards for reporting ADRs to herbal remedies and conventional OTC medicines: face-to-face interviews with 515 users of herbal remedies. **Br. J. Clin. Pharmacol.** v. 45, p. 496-500, 1998

BARROS, M.A.G Flora medicinal do Distrito Federal **Revista Brasil Florestal.** v. 12, p. 35-45, 1982

BARROW PC. Reproductive toxicology studies and immunotherapeutics. **Toxicology.** v. 185, n. 3, p. 205-12, apr, 2003

BARROW, P. Reproductive and developmental Toxicology safety studies. In: KRINKE, G.J. (ed). **The Laboratory Rat.** London, Academic Press, 2000, p. 199-225

BARROW, VM; TAYLOR, WJ. A rapid method for detecting malformations in fetuses. **J. Morphol.** v.127, p. 291-306, 1967.

BASS, A; KINTER, A; WILLIAM, P. Origins, practices and future of Safety Pharmacology. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods.** v. 49, p. 145-151, 2004

BATEY, AJ; DOE, CP. A method for QT correction based on beat-to-beat analysis of the QT/RR interval relationship in conscious telemetred beagle dogs. **J Pharmacol Toxicol Methods.** v. 48, n. 1, p. 11-9, Jul-Aug, 2002

BATISTA, R.; CHIARI, E.; OLIVEIRA, A. B. Trypanosomicidal kaurane diterpenes from *Wedelia paludosa*. **Planta Méd.** v. 65, n. 3, p. 283-284, 1999.

BERLINCK, R.G.S., OGAWA, C.A., ALMEIDA, A.M.P., ANDRADE, M.A.S., MALPEZZI, E.L.A., COSTA, L.V., HAJDU, E.M., FREITAS, J.C. Chemical and pharmacological characterization of halitoxin from *Amphimedon viridis* (Porifera) from the southeastern brazilian coast. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 115, n. 2, p. 155–163, oct, 1996.

BERRIDGE MJ. Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. **Annu Rev Biochem.** v. 56, p. 159-93, 1987

BEZERRA MA, LEAL-CARDOSO JH, COELHO-DE-SOUZA AN, CRIDDLE DN, FONTELES MC. Myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Alpinia speciosa* on rat ileum. **Phytother Res.**v. 14, n. 7, p. 549-51, nov, 2000

BLATTER, E; CAIUS, J.F; MHASSKAR, K.S. **Indian medicinal plants**, 2 ed. Delhi: Jayyed Press, 1975, v. 3, p.120-121

BLOCK, L. C.; SANTOS, A. R. S.; SOUZA, M. M.; SCHEIDT, C.; YUNES, R. A.; SANTOS, M. A.; DELLE MONACHE, F.; CECHINEL FILHO, V. Chemical and farmacological examination of antinociceptive constituents of *Wedelia paludosa*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 61, p. 85-89, 1998.

BOAKYE-YIADOM K, FIAGBE NI, AYIM JS. Antimicrobial properties of some West African medicinal plants iv. Antimicrobial activity of xylopic acid and other constituyente of the fruits of *Xylopia aethiopica* (Annonaceae). **Lloydia.** v. 40, n. 6, p. 543-5, nov-dec, 1977

BODE, G; LUFT, J. Integration of Safety Pharmacology endpoints into toxicology studies. **Fundamental & Clinical Pharmacology.** v. 16, p. 91-103, 2002

BOSWELL-RUYS, C; RITCHIE, H. E; BROWN-WOODMAN, P. D. Study of reproductive outcomes after exposure to yarrow in the pregnant rat. **Birth Defects Research** (part B). v. 68, p. 416-420, 2003.

BRANDON JM. Leucocyte distribution in the uterus during the preimplantation period of pregnancy and phagocyte recruitment to sites of blastocyst attachment in mice. **J Reprod Fertil.** v. 98, n. 2, p. 567-576, jul, 1993

BRESCIANI LF, YUNES RA, BURGER C, DE OLIVEIRA LE, BOF KL, CECHINEL-FILHO V. Seasonal variation of kaurenoic acid, a hypoglycemic diterpene present in *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae). **Z Naturforsch [C].** v. 59, n. 3-4, p. 229-232, Mar-Apr, 2004

BRIMBLECOMBE, R. The importance of retrospective comparisons. In: LUMLEY, C.E; WALKER, S.W. (eds). **CMR Workshop animal toxicology studies**: their relevance for man. Lancaster, UK : Quay Publishing, 1990. p.15-19

BRITO, N.R.S. **Perfil Químico de famílias Angiosperma**. 859 p. Tese (Doutorado em Química Orgânica). USP, São Paulo, 1986.

BRUNETON J. **Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales**. 2^e éd. Paris: Lavoisier, 1993, 916p.

CAI XF, SHEN G, DAT NT, KANG OH, LEE YM, LEE JJ, KIM YH. Inhibitory effect of kaurane type diterpenoids from *Acanthopanax koreanum* on TNF-alpha secretion from trypsin-stimulated HMC-1 cells. **Arch Pharm Res**. v. 26, n. 9, p. 731-4, sep, 2003

CAMPBELL, S. **Fetal physiology and medicine**. London: WB Sanders Company Ltd., 1976, p. 271-301.

CAMPOS-BEDOLLA, P.; CAMPOS, M. G.; VALENCIA-SANCHEZ, A.; PONCE-MONTER, H. Effect of kauranes from *Montonoa* spp. on rat uterus. **Phytoter. Res.**, v. 11, p. 11-16, 1997.

CARCERES, A; GIRON, L. Multidisciplinary needs for quality control and regulation of phytotherapy. In: World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare, 2. **Abstracts**. Mendoza: ICMIPA/ISHS/SAIPOA. p. L-4, 1997

CARSON CF, RILEY TV. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **J Appl Bacteriol**. v. 78, n. 3, p. 264-9, mar, 1995

CARVALHO JC, SILVA MF, MACIEL MA, PINTO AC, NUNES DS, LIMA RM, BASTOS JK, SARTI SJ. Investigation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of trans-dehydrocrotonin, a 19-nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara*. Part 1. **Planta Med**. v. 62, n. 5 p. 402-4, oct, 1996

CASCON, V.; FERNANDEZ-FERREIRA, E.; SOARES, R. O. A.; GIBALDI, D.; GILBERT, B.; SANTOS, R. R. Avaliação da composição química e da atividade tripanocida in vitro de óleo-resina de *Copaifera* spp. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15, Águas de Lindóia, 1998. **Resumos...** p.199.

CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 773-778, 2000.

CASTRO-E-SILVA, O. JR; ZUCOLOTO, S; RAMALHO, F.S; RAMALHO, L.N; REIS, J.M; BASTOS, A.A; BRITO, M.V. Antiproliferative activity of *Copaifera duckei* oleoresin on liver regeneration in rats. **Phytoter Res**. v. 18, n. 1, p. 92-94, jan, 2004

CATALANO, P.M; DRAGO, N.M; AMINI, S.B. Maternal carbohydrate metabolism and its relationship to fetal growth and body composition. **Am J Obstet Gynecol.** v. 172, n. 5, p. 1464-70, may, 1995

CAVALCANTI, B.C; COSTA-LOTUFO, L.V; MORAES, M.O; BURBANO, R.R; SILVEIRA, E.R; CUNHA, K.M; RAO, V.S; MOURA, D.J; ROSA, R.M; HENRIQUES, J.A; PESSOA, C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food Chem Toxicol.** v. 44, n. 3, p. 388-392, mar. 2006

CAVIN, C; HOLZHAUSER, D; SCHARF, G; CONSTABLE, A; HUBER, W.W; SCHILTER, B. Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. **Food Chem Toxicol.** v. 40, n. 8, p. 1155-1163, aug. 2002

CERQUEIRA, F; CORDEIRO-DA-SILVA, A; GASPARD-MARQUES, C; SIMOES, F; PINTO, M.M; NASCIMENTO, M.S. Effect of abietane diterpenes from *Plectranthus grandidentatus* on T- and B-lymphocyte proliferation. **Bioorg Med Chem.** v. 12, n. 1, p. 217-223, jan. 2004.

CHAHOU, I; LIGENSA, A; DIETZEL, L; FAQI, A.S. Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. **Reprod Toxicol.** v. 13, n. 5, p. 375-381, sep./oct. 1999

CHAN, P; TOMLINSON, B; CHEN, Y.J; LIU, J.C; HSIEH, M.H; CHENG, J.T. A double-blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension. **Br J Clin Pharmacol.** v. 50, n. 3, p. 215-220, sep. 2000

CHAN, P; XU, D.Y; LIU, J.C; CHEN, Y.J; TOMLINSON, B; HUANG, W.P; CHENG, J.T. The effect of stevioside on blood pressure and plasma catecholamines in spontaneously hypertensive rats. **Life Sci;** v. 63, n. 19, p. 1679-1684, 1998

CHANG, C.V; FELÍCIO, A. C; REIS, J. E. P; GUERRA, M. O; PETERS, V. M. Fetal toxicity of *Solanum lycocarpum* (*Solanaceae*) in rats. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 81, p. 265-269, 2002.

CHANG, G.J; SU, M.J; HUNG, L. M; LEE, S. S. Cardiac electrophysiologic and antiarrhythmic actions of pavine alkaloid derivative, O-metil-neocaryachine, in rat heart. **British Journal of Pharmacology.** v. 136, p. 459-471, 2002

CHARETTE, G. **Homöopathische arzneimittellehre für die práxis.** Hippokrates Verlag, Stuttgart. . 1985, p.401-416

CHEN, K; SHI, Q; FUJIOKA, T; NAKANO, T; HU, C.Q; JIN, J.Q; KILKUSKIE, R.E; LEE, K.H. Anti-AIDS agents--XIX. Neotripterifordin, a novel anti-HIV principle from *Tripterygium wilfordii*: isolation and structural elucidation. **Bioorg Med Chem.** v. 3, n. 10, p. 1345-1348, oct. 1995.

CHEN, K; SHI, Q.A; FUJIOKA, T; ZHANG, D.C; HU, C.Q; JIN, J.Q; KILKUSKIE, R.E; LEE, K.H. Anti-AIDS agents, 4. Tripterifordin, a novel anti-HIV principle from *Tripterygium wilfordii*: isolation and structural elucidation. **J Nat Prod.** v. 55, n. 1, p. 88-92, jan. 1992.

CHERNOFF, N; KAVLOCK, R.J. An in vivo teratology screen utilizing pregnant mice. **J. Toxicol. Environ. Health.** v. 10, n. 4-5, p. 541-550, 1982

CHLOPKIEWICZ, B; GRUBER, B. The *in vitro* study on genotoxic activity of adriamycin and bleomycin in cells of mice with different catalase and superoxide dismutase activity. **Acta Pol Pharm.** v. 54, n. 6, p. 437-441, nov./dec. 1997.

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

CLARKSON, C; CAMPBELL, W.E.; SMITH, P. In vitro antiplasmodial activity of abietane and totarane diterpenes isolated from *Harpagophytum procumbens* (devil's claw). **Planta Med.** v. 69, n. 8, p. 720-724, aug. 2003

CLAUDE, J. R.; CLAUDE, N. Safety Pharmacology: an essential interface of Pharmacology and Toxicology in the non-clinical assessment of new pharmaceuticals. **Toxicology Letters.** v. 151, p. 25-28, 2004

COLLINS, T.F; SPRANDO, R.L; SHACKELFORD, M.E; HANSEN, D.K; WELSH, J.J. Food and Drug Administration proposed testing guidelines for developmental toxicity studies. Revision Committee. FDA Guidelines for Developmental Toxicity and Reproduction, Food and Drug Administration. **Regul Toxicol Pharmacol.** v. 30, n. 1, p. 39-44, aug. 1999

CORDELL, G.A. Biodiversity and drug discovery: a symbiotic relationship. **Phytochemistry,** v. 55, p. 463-480, 2000

COSTA-LOTUFO, L.V; CUNHA, G.M; FARIAS, P.A; VIANA, G.S; CUNHA, K.M.A; PESSOA, C; MORAES, M.O; SILVEIRA, E.R; GRAMOSA, N.V; RAO, V.S. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon.** v. 40, n. 8, p. 1231-1234, aug. 2002

COTORAS, M; FOLCH, C; MENDOZA, L. Characterization of the antifungal activity on *Botrytis cinerea* of the natural diterpenoids kaurenoic acid and 3beta-hydroxy-kaurenoic acid. **J Agric Food Chem.** v. 52, n. 10, p. 2821-2826, may 2004

CRUZ SILVA, M.M; MADEIRA, V.M; ALMEIDA, L.M; CUSTODIO, J.B. Hemolysis of human erythrocytes induced by tamoxifen is related to disruption of membrane structure. **Biochim Biophys Acta.** v. 15, n. 1, p. 49-61, mar 2000

CRUZ, G.L. **Dicionário de plantas úteis do Brasil.** São Paulo: Civilização Brasileira, 1982, p. 599

CRUZ, G.L. **Livro verde das plantas medicinais e industriais do Brasil**. 2v., Veloso: Belo Horizonte, 1965, p.394

CUMMINGS, AM. Toxicological mechanisms of implantation failure. **Fundam Appl Toxicol**. v. 15, n. 3, p. 571-579, oct. 1990

CUNHA, K.M.A. Estudos dos efeitos relaxantes uterinos do ácido kaurenóico, um diterpeno isolado da *Copaifera langsdorffii* Desf. 96 f. **Dissertação** (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Ceará, 2001.

DALL'AGNOL, R; POSER, G.L. The use of complex polysaccharides in the management of metabolic diseases: the case of *Solanum lycocarpum* fruits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 337-341, 2000.

DANG, N.H.; ZHANG X; ZHENG M; SON, K.H; CHANG, H.W; KIM, H.P; BAE, K; KANG, S.S. Inhibitory constituents against cyclooxygenases from *Aralia cordata* Thunb. **Arch Pharm Res**. v. 28, n. 1, p. 28-33, jan. 2005

DAUT, J; KLIEBER, H.G; CYRYS, S; NOACK, T. K_{ATP} channels and basal coronary vascular tone. **Cardiovasc Res**. v. 28, n. 6, p. 811-817, jun. 1994.

DAVINO, S.C; GIESBRECHT, A.M; ROQUE, N.F. Antimicrobial activity of kaurenoic acid derivatives substituted on carbon-15. **Braz J Med Biol Res.**; v. 22, n. 9, p. 1127-1129, 1989.

DE ALENCAR CUNHA, K.M; PAIVA, L.A; SANTOS, F.A; GRAMOSA, N.V; SILVEIRA, E.R; RAO, V.S. Smooth muscle relaxant effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on rat uterus in vitro. **Phytother Res**. v. 17, n. 4, p. 320-324, apr. 2003.

DE CASTRO, A; VAN WYK, B. E. Diagnostic characters and geographic distribution of *Alepidea* species used in traditional medicine. **South African Journal of Botany**. v. 60, p. 345-350, 1994.

DE HEMPTINNE A. Influence of emetine on the isolated rabbit atria. **Arch Int Pharmacodyn Ther**. v. 158, n. 1, p. 239-248, nov. 1965

DE JESUS, R.A.P; CECHINEL-FILHO, V; OLIVEIRA, A.E; SCHLEMPER, V. Analysis of the antinociceptive properties of marrubiin isolated from *Marrubium vulgare*. **Phytomedicine**. v. 7, p. 111-115, 1999

DE MELO, A.C; COTA, B.B; DE OLIVEIRA, A.B; BRAGA, F.C. HPLC quantitation of kaurane diterpenes in *Xylopi*a species. **Fitoterapia**. v. 72, n. 1, p. 40-45, jan. 2001

DE PONTI, F; POLUZZI, E; MONTANARO, N. Organising evidence on QT prolongation and occurrence of Torsades de Pointes with non-antiarrhythmic drugs: a call for consensus. **Eur J Clin Pharmacol**. v. 57, n. 3, p. 185-209, june 2001

DE ROSA, S; DE GIULIO, A; IODICE, C. Biological effects of prenylated hydroquinones: structure-activity relationship studies in antimicrobial, brine shrimp, and fish lethality assays. **J Nat Prod.** v. 57, n. 12, p. 1711-1716, dec. 1994

DECOLLOGNE, S; BERTRAND, I.B; ASCENSIO, M; DRUBAIX, I; LELIEVRE, L.G. Na^+/K^+ -ATPase and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange isoforms: physiological and physiopathological relevance. **J Cardiovasc Pharmacol.** v. 22, Suppl 2, p. S96-98, 1993.

DEFILY, D.V. Control of microvascular resistance in physiological conditions and reperfusion. **J Mol Cell Cardiol.** v. 30, n. 12, p. 2547-2554, dec. 1998

DEL CASTILHO, M.I.C._____. Brás. PI BR 93 02/002, 1993

DEL NUNZIO, M. J. Óleo de Copaíba e seu emprego cosmético. **Aerosol Cosmet.**, v. 77, p. 7-9, 1995.

DELCLOS, K.B.; BUCCI, T.J.; LOMAX, L.G.; LATENDRESSE, J.R.; WARBRITTON, A.; WEISS, C.C.; NEWBOLD, R.R. Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague Dawley) rats. **Reproductive Toxicology.** v. 15, p. 647-663, 2001.

DELLSPERGER K.C. Potassium channels and the coronary circulation. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** v. 23, n. 12, p. 1096-1101, dec. 1996

DEV, S. Terpenoids. In: ROWE, J.W. **Natural products of wood plant II.** Berlin: Spriger-Verlag, 1989, p. 691-807

DEWICK, P.M. **Medicinal natural products, a biosynthetic approach**, 2nd edition, New York: John Wiley and Sons, 2002

DI STASI, L.C. **Plantas Medicinais:** Arte e ciência. São Paulo: UNESP, 1995, p.120-124

DIEL, P; SMOLNIKAR, K; MICHNA, H. *In vitro* test systems for the evaluation of the estrogenic activity of natural products. **Planta Med.** v. 65, n. 3, p. 197-203, apr. 1999

DOGGRELL, S.A. Effects of bromoacetylalprenololmethane (BAAM), an irreversible beta-adrenoceptor antagonist, on the rat isolated left atria and portal vein. **J.Auton. Pharmacol.** v. 10, n. 6, p. 333-344, dec. 1990

DOGGRELL, S.A.; MISTRY, D.N; HENDERSON, C.J. The effects of bromoacetylalprenololmethane on the responses to isoprenaline of the left ventricle from normo-, prehyper- and hypertensive rats. **J.Auton. Pharmacol.** v. 17, n. 3, p. 183-90, june 1997

DOGGRELL, S.A. PATCH, E.B.; BARNETT, C.W. Affinity constants and beta-adrenoceptor reserves for isoprenaline on cardiac tissue from normotensive and hypertensive rats. **J.Auton. Pharmacol.** v. 50, n. 2, p. 215-223, feb. 1998.

DUBEY, V.S; BHALLA, R; LUTHRA, R. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. **J Biosci.** . 28, n. 5, p. 637-646, sep. 2003

DUNHAM, N.W; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J Amer Pharm Assoc** , v. 46, p. 208-210, 1957

DUROTOYE, A.O; SALAKO, L.A. The effect of dehydroemetine on isolated guinea-pig atria. **Br J Pharmacol.** v. 44, n. 4, p. 723-731, apr. 1972

EINARSON, A; LAWRIEMORE, T; BRAND, P; GALLO, M; ROTATONE, C; KOREN, G. Attitudes and practices of physicians and naturopaths toward herbal products, including use during pregnancy and lactation. **Can J Clin Pharmacol.** v. 7, n. 1, p. 45-49, 2000.

EISENBERG, D.M; KESSLER, R.C; FOSTER, C; NORLOCK, F.E; CALKINS, D.R; DELBANCO, T.L. Unconventional medicine in the United States: prevalence, costs, and patterns of use. **N. Engl. J. Med.** v. 328, p. 246-252, 1993

EL BARDAI, S; MOREL, N; WIBO, M; FABRE, N; LLABRES, G; LYOUSSE, B; QUETIN-LECLERCQ, J. The vasorelaxant activity of marrubenol and marrubiin from *Marrubium vulgare*. **Planta Med.** v. 69, n. 1, p. 75-77, jan. 2003

FARIAS, R.A; RAO, V.S; VIANA, G.S; SILVEIRA, E.R; MACIEL, M.A; PINTO, A.C. Hypoglycemic effect of trans-dehydrocrotonin, a nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara*. **Planta Med.** v. 63, n. 6, p. 558-560, dec. 1997.

FATOPE, M.O; ZENG, L; OHAYAGHA, J.E; MCLAUGHLIN, J.L. New 19-acetoxyingol diterpenes from the latex of *Euphorbia poissonii* (Euphorbiaceae). **Bioorg Med Chem.** v. 4, n. 10, p. 1679-1683, oct. 1996

FENNEL, C.W.; LINDSAY,K. L.; McGAW, L.J.; SPARG, S.G.; STAFFORD, G.I.; ELGORASHI, E.E.; GRACE, O.M.; VAN STADEN, J. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology. **J. Ethnopharmacol.** v. 94, p. 205-217, 2004.

FERNANDES, R.M.; PEREIRA, N.A. Copalic acid analgesic activity in mice. In: SIMPÓSIO BRASIL-CHINA DE QUÍMICA E FARMACOLOGIA DE PRODUTOS NATURAIS, Rio de Janeiro, 1989. **Abstracts...** Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1989. p. 248.

FERNANDES, R. M.; PEREIRA, N. A; PAULO, L.G. Antiinflammatory activity of Copaíba balsam (*Copaifera cearensis* Huber). **Revista Brasileira de Farmácia.** v. 73, n. 3, p. 53-56, 1992.

FERREIRA, M.B. O cerrado em Minas Gerais gradações e composição florística. **Informe Agropecuário** v. 61, p. 19, 1980

FLEURY, M. On medicinal role of copahu balsam. **Acta Botânica Gallica**. v. 144, p. 473-479, 1997.

FONSECA, E.T._____. **Revista da Flora Medicinal**. v. 6, p.161, 1939

FOZZARD, H.A. The roles of membrane potential and inward Na⁺ and Ca⁺ currents in determinine conduction. In: ROSEN, M.R; JANSEN, M.J; WIT, A. L. (eds) **Cardiac Electrophysiology: a textbook**. New York: Futura Publishing, 1990, p.415-425

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**. v. 27, n. 9, p. 823-829, sep. 2003

FUJITA, E; NODE, M. Diterpenoids of *Rabdosia* species. **Fortschr Chem Org Naturst**. v.46, p. 77-157, 1984

GALLEGOS, A.J. The zoapatle I - a traditional remedy from Mexico emerges to modern times. **Contraception**. v. 27, n. 3, p. 211-25, mar. 1983

GEUNS, J.M.C. Stevioside. **Phytochemistry**. v. 64, p. 913-921, 2003

GIANE, P.M; JIN, H.Z; SON, P.T; LEE, J.H; HONG, Y.S; LEE, J.J. ent-Kaurane diterpenoids from croton tonkinensis inhibit LPS-induced NF-kappaB activation and NO production. **J Nat Prod**. v. 66, n. 9, p. 1217-1220, sep. 2003

GIBBONS, S; OLUWATUYI, M; VEITCH, N.C; GRAY, A.I. Bacterial resistance modifying agents from *Lycopus europaeus*. **Phytochemistry**. v. 62, n. 1, p. 83-87, jan. 2003.

GILBERT, B.; MORS, W. B.; BAKER, P. M.; TOMASSINI, T. C. B.; GOULART, E. G.; TURCO, A. M.; VICHNEWSKI, W.; LOPES, J. L. C.; THAMES, A. W.; PELLEGRINO, J.; KATZ, N. A atividade antihelmíntica dos óleos essenciais e de seus componentes químicos. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, suppl 44, p. 423-428, 1972.

GILBERT, B; FERREIRA, J.L.P; ALMEIDA, M.B.S; CARVALHO, E.S; CASCON, V; ROCHA, L.M. The official use of medicinal plants in public health. **Ciência e Cultura**. v. 49, n. 5-6, p. 339-344, 1997

GLYNN, I.M. Annual review prize lecture: 'All hands to the sodium pump'. **J Physiol**. v. 462, p. 1-30, mar. 1993.

GONZALEZ ÂNGULO, A; RUIZ DE CHAVEZ, I; ESTRADA, A.V; PEDRON, N; GALLEGOS, A.J. The zoapatle. VIII. Ultrastructural changes in endometrium of rats. **Contraception**. v. 31, n. 5, p. 509-521, may 1985

GRAMOSA, N.V.; BRIGIDO, C.L.; SILVEIRA, E.R. Contribuição ao conhecimento químico do óleo de Copaíba do Ceará. In: ENCONTRO DE QUÍMICOS E FARMACÊUTICOS INDUSTRIAIS DO NORTE-NORDESTE, 7, Fortaleza, 1996. **Anais...**

GREGORETTI, B; STEBEL, M; CANDUSSIO, L; CRIVELATTO, E; BARTOLI, F; DECORTI, G. Toxicity of *Hypericum perforatum* (St. John's wort) administered during pregnancy and lactation in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 200, p. 201-205, 2004.

GRINBERG, L.N; NEWMARK, H; KITROSSKY, N; RAHAMIM, E; CHEVION, M; RACHMILEWITZ, E.A. Protective effects of tea polyphenols against oxidative damage to red blood cells. **Biochem Pharmacol**. v. 54, n. 9, p. 973-978, nov. 1997

GROSS, P.R; COUSINEAU, G.H. Macromolecule synthesis and the influence of actinomycin on early development . **Exp. Cell Res** . v. 33, p. 368, 1964.

GRUSH, L.R; NIERENBERG, A; KEEFE, B; COHEN, L.S. St John's wort during pregnancy. **JAMA**. v. 280, n. 18, p. 1566, nov. 1998

GRYNBERG, N.F; ECHEVARRIA, A; LIMA, J.E; PAMPLONA, S.S; PINTO, A.C; MACIEL, M.A. Anti-tumour activity of two 19-nor-clerodane diterpenes, trans-dehydrocrotonin and trans-crotonin, from *Croton cajucara*. **Planta Med**. v. 65, n. 8, p. 687-689, dec. 1999.

GUERRA, M.O; REIS, J. E. P; OLIVEIRA, L.E.G; PETERS, V.M. Avaliação do potencial teratogênico do fruto da Lobeira (*Solanum grandiflorum*) administrado no período de organogênese do rato. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**. v. 16, p. 52-56, 1997.

GUERRERO, M.F; PUEBLA, P; CARRÓN, R; MARTIN, M.L; ROMÁN, L.S. Vasorelaxant effect of new nwo-clerodane diterpenoids isolated from *Croton schiedeana*. **J. Ethnopharmacology**. v. 94, p. 185-189, 2004

GUTH, B.D; GERMEYER, S; KOLB, W; MARKERT, M. Developing a strategy for the nonclinical assessment of proarrhythmic risk of pharmaceuticals due to prolonged ventricular repolarization. **J Pharmacol Toxicol Methods**. v. 49, n. 3, p. 159-169, may/jun. 2004

HAMBURGUER, M; HOSTETTMAN, K. Bioactivity in plants: the link between **phytochemistry**. v. 30, n. 12, p. 3864-3874, 1991.

HAMMOND, T.G; CARLSSON, L; DAVIS, A.S; LYNCH, W.G; MACKENZIE, I; REDFERN, W.S; SULLIVAN, A.T; CAMM, A.J. Methods of collecting and evaluating non-clinical cardiac electrophysiology data in the pharmaceutical industry: results of an international survey. **Cardiovasc Res.** . 49, n. 4, p. 741-750, mar. 2001

HAMPTON, J.R. **Descomplicando o eletrocardiograma: o ECG fácil.** 4 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1994, p.26-47

HANSON, H. Diterpenoids. **Nat. Prod. Rep.**, v. 17, n. 2, p. 165-174, 2000.

HANSON, J.R. Diterpenoids. **Nat. Prod. Rep.** v. 21, n. 6, p. 785-793, 2004.

HARRISON, D.C. Antiarrhythmic drug classification: new science and practical applications. **Am J Cardiol.** v. 56, n. 1, p. 185-187, july 1985

HART, P.H; BRAND, C; CARSON, C.F; RILEY, T.V; PRAGER, R.H; FINLAY-JONES, J.J. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. **Inflamm Res.** v. 49, n. 11, p. 619-626, nov. 2000

HARTSFIELD, J.K. JR; HOLMES, L.B; MOREL, J.G. Phenytoin embryopathy: effect of epoxide hydrolase inhibitor on phenytoin exposure in utero in C57BL/6J mice. **Biochem Mol Med.** v. 56, n. 2, p. 131-143, dec. 1995

HENK, J.W; HILBISH, K.G; SERABIAN, M.A; CAVAGNARO, J.A; HENDRICKX, A.G; AGNISH, N.D; KUNG, A.H; MORDENTI, J. Reproductive toxicity testing of therapeutic biotechnology agents. **Teratology.** v. 53, n. 3, p. 185-195, 1996

HERTELENDY, F; ASEM, E.K. Influence of kaurenol on basal, LH- and forskolin-stimulated progesterone and cAMP production in avian granulosa cells. **J Steroid Biochem.** v. 33, n. 1, p. 53-57, july 1989

HODGEN, G. D; ITSKOVITZ, J. Recognition and maintenance of pregnancy. In: KNOBIL, E; NEILL, J. (eds). **The Physiology of reproduction.** New York: Raven Press, 1988. p.1995-2021

HOFFMAN, B.B. Drogas ativadoras dos receptores adrenérgicos e outras drogas simpaticomiméticas.p.109. In: Katzung, B.G. (ed). **Farmacologia Básica e Clínica.** 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 1054 p.

HOLMES, F.A; WALTERS, R.S; THERIAULT, R.L; FORMAN, A.D; NEWTON, L.K; RABER, M.N; BUZDAR, A.U; FRYE, D.K; HORTOBAGYI, G.N. Phase II trial of taxol, an active drug in the treatment of metastatic breast cancer. **J Natl Cancer Inst.** v. 83, n. 24, p. 1797-1805, dec. 1991.

HOLSON, J.F; STUMP, D.G; CLEVIDENCE, K.J; KNAPP, J.F; FARR, C.H. Evaluation of the prenatal developmental toxicity of orally administered arsenic trioxide in rats. **Food Chem Toxicol.** v. 38, n. 5, p. 459-466, may 2000

HOLZAPFEL, C. W.; VAN WIK, B. E.; CASTRO, A.; MARAIS, W.; HERBST, M. A chemotaxonomic survey of kaurene derivatives in the genus *Alepidea* (Apiacea). **Biochem. System. Ecol.**, v. 23, n. 7-8, p. 799-803, 1995.

HOU, A.J; LI, M.L; JIANG, B; LIN, Z.W; JI, S.Y; ZHOU, Y.P; SUN, H.D. New 7,20:14,20-diepoxy ent-kauranoids from *Isodon xerophilus*. **J Nat Prod.** v. 63, n. 5, p. 599-601, may 2000.

HUBER, W.W; SCHARF, G; NAGEL, G; PRUSTOMERSKY, S; SCHULTE-HERMANN, R; KAINA, B. Coffee and its chemopreventive components Kahweol and Cafestol increase the activity of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in rat liver-comparison with phase II xenobiotic metabolism. **Mutat Res.** v. 522, n. 1-2, p. 57-68, jan. 2003.

IMAMURA, Y; TOMOIKE, H; NARISHIGE, T; TAKAHASHI, T; KASUYA, H; TAKESHITA, A. Glibenclamide decreases basal coronary blood flow in anesthetized dogs. **Am J Physiol.** v. 263, p. 399-404, aug. 1992

IWAMOTO, M; MINAMI, T; TOKUDA, H; OHTSU, H; TANAKA, R. Potential antitumor promoting diterpenoids from the stem bark of *Thuja standishii*. **Planta Med.** v. 69, n. 1, p. 69-72, jan. 2003.

IWU, M. **Handbook of African Medicinal plants.** Boca Raton, FL: CRC Press, 1993

KIM, J; CHOI, Y.H.; CHOI, Y.-H. Use of stevioside and cultivation of *Stevia rebaudiana* in Korea. In: A.D. Kinghorn, (Ed). **Stevia, the Genus Stevia. Medicinal and Aromatic Plants—Industrial Profiles**, London and NY: Taylor and Francis, 2002, v. 19, p. 196–202.

JACOBS, R.S; WHITE, S; WILSON, L. Selective compounds derived from marine organisms: effects on cell division in fertilized sea urchin eggs. **Fed Proc.** v. 40, n. 1, p. 26-29, jan. 1981.

JIANG, B; LU, Z.Q; HOU, A.J; ZHAO, Q.S; SUN, H.D. ent-kaurane diterpenoids from *Isodon lungshengensis*. **J Nat Prod.** v. 62, n. 7, p. 941-945, jul. 1999

JOHNSON, P.D; DAWSON, B.V; GOLDBERG, S.J. Spontaneous congenital heart malformations in Sprague Dawley rats. **Lab Anim Sci.** v. 43, n. 2, p. 183-188, apr. 1993

JORGE, R..M.; LEITE, J.P.V.; OLIVEIRA, A.B.; TAGLIATI, C.A. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 94, p. 93-100, 2004

KAPIL, A; KOUL, I.B; BANERJEE, S.K; GUPTA, B.D. Antihepatotoxic effects of major diterpenoid constituents of *Andrographis paniculata*. **Biochem Pharmacol.** v. 46, n. 1, p. 182-185, july 1993.

KERSETTER, H.W; SCHAEFFER, D.J. Brine shrimp (*Artemia salina*) nauplii as a teratogen test system. **Ecotoxicol Environ Saf.** v. 7, n. 3, p. 342-349, june 1983

KHERA, K.S. Maternal toxicity-a possible factor in fetal malformations in mice. **Teratology.** v. 29, n. 3, p. 411-416, jun. 1984

KIEM, P.V; CAI, X.F; MINH, C.V; LEE, J.J; KIM, Y.H. Kaurane-type diterpene glycoside from the stem bark of *Acanthopanax trifoliatum*. **Planta Med.** v. 70, n. 3, p. 282-284, mar. 2004.

KIMBER, S.J; SPANSWICK, C. Blastocyst implantation: the adhesion cascade. **Semin Cell Dev Biol.** v. 11, n. 2, p. 77-92, apr. 2000.

KINTER, L.B; VALENTIN, J.P. Safety pharmacology and risk assessment. **Fundam Clin Pharmacol.** v. 16, n. 3, p. 175-182, jun. 2002

KNASMULLER, S; PARZEFALL, W; SANYAL, R; ECKER, S; SCHWAB, C; UHL, M; MERSCH-SUNDERMANN, V; WILLIAMSON, G; HIETSCH, G; LANGER, T; DARROUDI, F; NATARAJAN, A.T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutat Res.** v. 402, n. 1-2, p. 185-202, june 1998.

KONZETT, H; ROESSLER, R. Versuchsanordnung zu Untersuchungen an der Bronchialmuskulatur. **Arch. Exp. Path. Pharmacol.** v. 195, p. 71-74, 1940.

KRISHNA KUMARI, G.N; ARAVIND, S; BALACHANDRAN, J; GANESH, M.R; SOUNDARYA DEVI, S; RAJAN, S.S; MALATHI, R; RAVIKUMAR, K. Antifeedant neoclerodanes from *Teucrium tomentosum* Heyne. (Labiatae). **Phytochemistry.** v. 64, n. 6, p. 1119-1123, nov. 2003.

KUBOTA, Y; UMEGAKI, K; TANAKA, N; MIZUNO, H; NAKAMURA, K; KUNITOMO, M; SHINOZUKA, K. Safety of dietary supplements: chronotropic and inotropic effects on isolated rat atria. **Biol Pharm Bull.** v. 25, n. 2, p. 197-200, feb. 2002

LAGARTO-PARRA, A; YHEBRA, R. S; SARDIÑAS, I. G; AND 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,** v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001.

LAHLOU, S; GALINDO, C.A; LEAL-CARDOSO, J.H; FONTELES, M.C; DUARTE, G.P. Cardiovascular effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* leaves and its main constituent,

Terpinen-4-ol, in rats: role of the autonomic nervous system. **Planta Med.** v. 68, n. 12, p. 1097-1102, dec. 2002.

LAHLOU, S; INTERAMINENSE, L.F; LEAL-CARDOSO, J.H; DUARTE, G.P. Antihypertensive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* and its main constituent, terpinen-4-ol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats. **Fundam Clin Pharmacol.** v. 17, n. 3, p. 323-330, june 2003.

LAU, I.F; SAKAKURA, S. K; CHANG, M. C. Pregnancy blockade by indomethacin , an inhibitor of prostaglandin synthesis: it's reversal by prostaglandins and progesterone in mice. **Prostaglandins.** v. 4, p. 795-803, 1973.

LEGHA, S.S; TENNEY, D.M; KRAKOFF, I.R. Phase I study of taxol using a 5-day intermittent schedule. **J Clin Oncol.** v. 4, n. 5, p. 762-766, may 1986.

LEITE, A.M.C; LLERAS, E. Áreas prioritárias na Amazônia para conservação dos recursos genéticos de espécies florestais nativas: fase preliminar. **Acta Botanica Brasilica**, v. 7, n. 1, p. 61-94, 1993.

LEMONICA, I.P. Embriofetotoxicidade. In: OGA,S. **Fundamentos de toxicologia.** São Paulo: Atheneu, 1996. p.85-94

LEPK, K. Safety of herbal medicines in pregnancy. **Can. Pharmacol. J.** v. 130, p. 29-33, 1997.

LEVINE, S.D.; HAHN, D. W.; COTTER, M. L.; GREENSLADE, F. C.; KANOJIA, R. M.; PASQUALE, S. A.; WACHTER, M.; MCGUIRE, J. L. The mexican plant Zoapatle (*Montonoa tomentosa*) in reproductive medicine: past, present and future. **J. Reprod. Med.** v. 26, n. 10, p. 524-528, 1981

LEWAN, L; ANDERSSON, M; MORALES-GOMEZ, P. The use of *Artemia salina* in toxicity testing. **Alternatives To Laboratory Animals.** v. 20, p. 297-301, 1992.

LEWIS, W.H. **Medical Botany:** Plants Affecting Human Health, 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 2003. 812 p

LI, J; CORREA, A.M. Kinetic modulation of HERG potassium channels by the volatile anesthetic halothane. **Anesthesiology.** v. 97, n. 4, p. 921-930, oct. 2002

LI, A.P. A comprehensive approach for drug safety assessment. **Chemico-Biological Interactions.** v. 150, p. 27-33, 2004.

LIMA, S.R; JUNIOR, V.F; CHRISTO, H.B; PINTO, A.C.; FERNANDES, P.D. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* hayne and its fractions. **Phytother Res.** v. 17, n. 9, p. 1048-1053, nov. 2003

LIONE, A; SCIALLI, A.R. The developmental toxicity of indomethacin and sulindac. **Reprod Toxicol.** v. 9, n. 1, p. 7-20, jan./feb. 1995

LIU, J.C; KAO, P.K; CHAN, P; HSU, Y.H; HOU, C.C; LIEN, G.S; HSIEH, M.H; CHEN, Y.J; CHENG, J.T. Mechanism of the antihypertensive effect of stevioside in anesthetized dogs. **Pharmacology.** v. 67, n. 1, p. 14-20, jan. 2003

LJUNGKVIST, I. Attachment reaction of rat uterine luminal epithelium. IV. The cellular changes in the attachment reaction and its hormonal regulation. **Fertil Steril.** v. 23, n. 11, p. 847-865, nov. 1972.

LOUKACI, A; KAYSER, O; BINDSEIL, K; SIEMS, K; FREVERT, J; ABREU, P.M. New trichothecenes isolated from *Holarrhena floribunda*. **J Nat Prod.** v. 63, n. 1, p. 52-56, jan. 2000.

LOZOYA, X; ENRIQUEZ, R.G; BEJAR, E; ESTRADA, A.V; GIRON, H; PONCE-MONTER, H; GALLEGOS, A.J. The zoapatle V--the effect of kauradienoic acid upon uterine contractility. **Contraception.** v. 27, n. 3, p. 267-279, mar. 1983

LU, M; NICOLETTI, M; BATTINELLI, L; MAZZANTI, G. Isolation of praeruptorins A and B from *Peucedanum praeruptorum* Dunn. and their general pharmacological evaluation in comparison with extracts of the drug. **Farmaco.** v. 56, n. 5-7, p. 417-420, may/june 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, n. 8, p. 689-691, dec. 1999

LUTSENKO, S; KAPLAN, J.H. An essential role for the extracellular domain of the Na,K-ATPase beta-subunit in cation occlusion. **Biochemistry.** v. 32, n. 26, p. 6737-6743, July 1993.

MACIEL, M.A.M.; ECHEVARRIA, A.; VEIGA JR, V.F; PINTO, A.C. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova.**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MACKEEN, M.M; ALI, A.M; LAJIS, N.H; KAWAZU, K; HASSAN, Z; AMRAN, M; HABSAH, M; MOOI, L.Y; MOHAMED, S.M. Antimicrobial, antioxidant, antitumour-promoting and cytotoxic activities of different plant part extracts of *Garcinia atroviridis* griff. ex T. anders. **J Ethnopharmacol.** v. 72, n. 3, p. 395-402, oct. 2000

MacLENNAN, A.H; WILKINSON, D.H; TAYLOR, A.W. Prevalence and costs of alternative medicine in Australia. **Lancet.** v. 347, p. 569-573, 1996.

MAGALHÃES, P.J; CRIDDLE, D.N; TAVARES, R.A; MELO, E.M; MOTA, T.L; LEAL-CARDOSO, J.H. Intestinal myorrelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of

Croton nepetaefolius and his constituents cineole. Metyl-eugenol aand terpineol. **Phytother. Res.** v. 12, p. 172-177, 1998

MAJER, B.J; HOFER, E; CAVIN, C; LHOSTE, E; UHL, M; GLATT, H.R; MEINL, W; KNASMULLER, S. Coffee diterpenes prevent the genotoxic effects of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and N-nitrosodimethylamine in a human derived liver cell line (HepG2). **Food Chem Toxicol.** v. 43, n. 3, p. 433-441, mar. 2005.

MALININ, N.I; BOLDIN, M.P; KOVALENKO, A.V; WALLACH, D. MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. **Nature.** v. 385, p. 540-544, feb. 1997.

MALPEZZI, E.L.A; DAVINO, S.C.; COSTA, L.V; FREITAS, J.C.; GIESBRECHT, A.M.; ROQUE, N.R. Antimitotic action of extracts of *Pettiveria alliacea* on sea urchin egg development. **Braz J Med Biol Res.** v. 27, p. 749-754, 1994

MARIONS, L; DANIELSSON, K.G. Expression of cyclo-oxygenase in human endometrium during the implantation period. **Mol Hum Reprod.** v. 5, n. 10, p. 961-965, oct. 1999.

MARUZZELLA, J. C.; SICURELLA, N.A. Antibacterial activity of essencial oils vapors. **J. Am. Pharm. Assoc.**, v. 49, n. 11, p. 692-694, 1960

MATSUI, M; MATSUI, K; KAWASAKI, Y; ODA, Y; NOGUCHI, T; KITAGAWA, Y; SAWADA, M; HAYASHI, M; NOHMI, T; YOSHIHIRA, K; ISHIDATE, M.JR; SOFUNI, T. Evaluation of the genotoxicity of stevioside and steviol using six *in vitro* and one *in vivo* mutagenicity assays. **Mutagenesis.** v. 11, n. 6, p. 573-579, nov. 1996

MATOS, F. J. A. **O formulário fitoterápico do professor Dias da Rocha.** 2 ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997, p.113

MATSUURA, H; EHARA, T; DING, W.G; OMATSU-KANBE, M; ISONO, T. Rapidly and slowly activating components of delayed rectifier K(+) current in guinea-pig sino-atrial node pacemaker cells. **J Physiol.** v. 540, pt. 3, p. 815-830, may 2002

MCGARVEY, D.J; CROTEAU, R. Terpenoid metabolism. **Plant Cell.** v. 7, n. 7, p. 1015-1026, july 1995.

MCLACHLAN, J.A; NEWBOLD, R.R. Estrogens and development. **Environ Health Perspect.** v. 75, p. 25-27, nov. 1987

MEADE-TOLLIN, L.C; WIJERATNE, E.M; COOPER, D; GUILD, M; JON, E; FRITZ, A; ZHOU, G.X; WHITESELL, L; LIANG, J.Y; GUNATILAKA, A.A. Ponicidin and oridonin are responsible for the antiangiogenic activity of *Rabdosia rubescens*, a constituent of the herbal supplement PC SPES. **J Nat Prod.** v. 67, n. 1, p. 2-4, jan. 2004.

MEDON, P.J; PEZZUTO, J.M; HOVANEC-BROWN, J.M; NANAYAKKARA, N.P; SOERJATO, D.D; KAMATH, S.K; KINGHORN, A.D. Safety assessment of some *Stevia rebaudiana* sweet principles. **Fed. Proc.** v. 41, p. 1568-1982, 1982.

MELO, A. C.; COTA, B. B.; OLIVEIRA, A. B.; BRAGA, F. C. HPLC quantitation of kaurane diterpenes in *Xilopia* species. **Fitoterapia**, v. 72, n. 1, p. 40-45, 2001.

MENNITI-IPPOLITO, F; MAZZANTI, G; BIANCHI, A; RASCHETTI, R. Progetto pilota sulla sorveglianza delle reazioni avverse a prodotti a base di piante officinali e integratori alimentari. **Ann. Ist. Super Sanità**. v. 41, n. 1, p. 39-42, 2005

MERSCH-SUNDERMANN, V; KNASMULLER, S; WU, X.J; DARROUDI, F; KASSIE, F. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. **Toxicology**. v. 198, n. 1-3, p. 329-340, may 2004

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E. Brine shrimp: a conveniently general bioassay for active plant constituents. **Plant. Med.** v. 45, p. 31-34, 1982.

MEYRE-SILVA, C; YUNES, R.A; SCHLEMPER, V; CAMPOS-BUZZI, F; CECHINEL-FILHO, V. Analgesic potential of marrubiin derivatives, a bioactive diterpene present in *Marrubium vulgare* (Lamiaceae). **Farmaco**. v. 60, n. 4, p. 321-326, apr. 2005.

MIKI, M; TAMAI, H; MINO, M; YAMAMOTO, Y; NIKI, E. Free-radical chain oxidation of rat red blood cells by molecular oxygen and its inhibition by alpha-tocopherol. **Arch Biochem Biophys**. v. 258, n. 2, p. 373-380, nov. 1987

MILLER, L. C; TAINTER, M.L. Estimation of ED50 and its error by means of logarithmic-probit graph paper. **Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.** v. 57, p. 261, 1944.

MILLS, J.L. Protecting the embryo from X-rated drugs. **N Engl J Med**. v. 333, n. 2, p. 124-125, jul. 1995.

MITSUHASHI, H. Safety of Stevioside. In: Tamam Biochemical Co. Ltd. **Report on Safety of Stevia**, p.1-20, 1976

MIZUTANI, K; TANAKA, O. Use of *Stevia rebaudiana* sweeteners in Japan. In: Kinghorn, A.D.(ed). **Stevia, the Genus Stevia. Medicinal and aromatic plants-industrial profiles**. London and New York: Taylor and Francis, 2002. v. 19, p. 178-195

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseados em produtos naturais. **Quim. Nova**. v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MONTANARI, T.; BEVILÁQUA, E. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. on pregnant mice. **Contraception**. v. 65, p. 171-175, 2002.

MONTGOMERY KC. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **J Comp Physiol Psychol** v. 48, p. 254-260, 1955

MONTI, H.; TILIACOS, N.; FAURE, R. Copaiba oil: isolation and characterization of a new diterpenoid with the dinorlabdane skeleton. **Phytochemistry**, v. 51, n. 8, p. 1013-1015, 1999

MORALES, A; PÉREZ, P; MENDOZA, R; COMPAGNONE, R; SUAREZ, A.I; ARVELO, F; RAMIREZ, J.L; GARLINDO-CASTRO, I. Cytotoxic and proapoptotic activity of ent-16 β -17 α -dihydroxykaurane on human mammary carcinoma cell line MCF-7. **Cancer Letters**. v. 218, n. 1, p. 109-116, 2005

MORI, N; SAKANOUÉ, M; TAKCUCHI, M; SHIMPO, K; TANABE, T. Effect of stevioside on fertility in rats. *J. Food. Hyg. Soc. Jpn.* v. 22, p. 409-414, 1981

MORIWAKI, K; GOMI, M; ITOH, Y; IIDA, S; TSUGAWA, M; TARUI, S; FUJI, K; NODE M; KAJIMOTO, T. Steroidogenic effect of ent-kaur-16-en-15 beta-ol (kaurenol) on isolated rat adrenal cells. **Life Sci**. v. 38, n. 5, p. 453-458, feb. 1986

MOSMAN, T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Meth.**, v. 5, p. 55-63, 1983

MOTTAKIN, A.K; CHOWDHURY, R; HAIDER, M.S, RAHMAN, K.M; HASAN, C.M; RASHID, M.A. Cytotoxicity and antibacterial activity of extractives from *Wedelia calendulacea*. **Fitoterapia**. v. 75, n. 3-4, p. 355-359, jun. 2004

MULLER, S; TIRAPELLI, C.R; DE OLIVEIRA, A.M; MURILLO, R; CASTRO, V; MERFORT, I. Studies of ent-kaurane diterpenes from *Oyedaea verbesinoides* for their inhibitory activity on vascular smooth muscle contraction. **Phytochemistry**. v. 63, n. 4, p. 391-396, jun. 2003.

NAGASHIMA, F; KONDOH, M; KAWASE, M; SIMIZU, S; OSADA, H; FUJII, M; WATANABE Y, SATO M, ASAKAWA Y. Apoptosis-inducing properties of ent-kaurene-type diterpenoids from the liverwort *Jungermannia truncate*. **Planta Med**. v. 69, n. 4, p.377-379, apr. 2003.

NARAYANAN, S; O'DONOVAN, M;R; DUTHIE, S.J. Lysis of whole blood *in vitro* causes DNA strand breaks in human lymphocytes. **Mutagenesis**. v. 16, n. 6, p. 455-459, nov. 2001.

NASCIMENTO, N.R; LEAL-CARDOSO, J.H; LESSA, L.M; RORIZ-FILHO, J.S; CUNHA, K.M; FONTELES, M.C. Terpinen-4-ol: mechanisms of relaxation on rabbit duodenum. **J Pharm Pharmacol**. v. 57, n. 4, p. 467-474, apr. 2005

NAWRATH, H. Action potential, membrane currents and force of contraction in mammalian heart muscle fibers treated with quinidine. **J Pharmacol Exp Ther**. v. 216, n. 1, p. 176-182, jan. 1981.

NETZER, R; EBNETH, A; BISCHOFF, U; PONGS, O. Screening lead compounds for QT interval prolongation. **Drug Discov Today**. v. 6, n. 2, p. 78-84, jan. 2001

NEWMAN, D.J; CRAGG, G.M; SNADER, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. **Nat. Prod. Rep.** v. 18, n. 1, p. 55-61, oct. 1986.

NG, T.B; LI, W.W; YEUNG, H.W. A steryl glycoside fraction with hemolytic activity from tubers of *Momordica cochinchinensis*. **J Ethnopharmacol.** v. 18, n. 1, p. 55-61, oct. 1986.

NGAMROJNAVANICH, N; SIRIMONGKON, S; ROENGSUMRAN, S; PETSOM, A; KAMIMURA, H. Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity by (-)-ent-Kaur-16-en-19-oic acid and its derivatives. **Planta Med.** v. 69, n. 6, p. 555-556, june 2003

NIU, X; LI, S.H; LI, M.L; ZHAO, Q.S; MEI, S.X; NA, Z; WANG, S.J; LIN, Z.W; SUN, H.D. Cytotoxic ent-kaurane diterpenoids from *Isodon eriocalyx* var. *laxiflora*. **Planta Med.** v. 68, n. 6, p. 528-533, june 2002

NISBET, L.J; MOORE, M. Will natural products remain an important source of drug research for the future? **Curr. Opin. Biotechnol.** v. 8, n. 6, p. 708-712, 1997

NISHIZUKA, Y. Studies and perspectives of protein kinase C. **Science**. v.233, n. 4761, p. 305-312, july 1986.

NORDENG, H; HAVNEN, G.C. Use of herbal drugs in pregnancy: a survey among 400 norwegian women. **Pharmacoepidemiol. Drug Saf.** v. 13, n. 6, p. 371-380, june 2004.

O'GRADY, J.P; CALDWELL, B.V; AULETTA, F.J; SPEROFF, L. The effects of an inhibitor of prostaglandin synthesis (indomethacin) on ovulation, pregnancy, and pseudopregnancy in the rabbit. **Prostaglandins**. v. 1, n. 2, p. 97-106, feb. 1972

OHSAKI, A.; YAN, L.T.; ITO, S.; EDATSUGI, H.; IWATA, D.; KOMODA, Y. The isolation and in vivo potent antitumor-activity of clerodane diterpenoid from the oleoresin of the brazilian medicinal plant, *Copaifera langsdorffii* Desfon. **Biorg. Med. Chem. Lett.**, v. 4, n. 24, p. 2889-2892, 1994.

OKUYAMA, E; NISHIMURA, S; YAMAZAKI, M. Analgesic principles from *Aralia cordata* Thunb. **Chem Pharm Bull** (Tokyo). v. 39, n. 2, p. 405-407, feb. 1991.

OLIVEIRA, F.A; COSTA, C.L; CHAVES, M.H; ALMEIDA, F.R; CAVALCANTE, I.J; LIMA, A.F; LIMA, R.C. JR; SILVA, R.M; CAMPOS, A.R; SANTOS, F.A; RAO, V.S. Attenuation of capsaicin-induced acute and visceral nociceptive pain by alpha- and beta-amyrin, a triterpene mixture isolated from *Protium heptaphyllum* resin in mice. **Life Sci.** v. 77, n. 23, p. 2942-2952, oct. 2005.

OLIVEIRA, M.G.M.; MONTEIRO, M.G.; MACAÚBAS, C.; BARBOSA, V.P.; CARLINI, E.A. Pharmacologic and toxicologic effects of two Maytenus species in laboratory animals. **J.Ethnopharmacol.**, v. 34, p. 29-41, 1991

OLIVEIRA-FILHO, R.M; UEHARA, O.A; MINETTI, C.A; VALLE, L.B. Chronic administration of aqueous extract of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertonii in rats: endocrine effects. **Gen Pharmacol.** v. 20, n. 2, p. 187-191, 1989

OLSON, H; BETTON, G; ROBINSON, D; THOMAS, K; MONRO, A; KOLAJA, G; LILLY, P; SANDERS, J; SIPES, G; BRACKEN, W; DORATO, M; VAN DEUN, K; SMITH, P; BERGER, B; HELLER, A. Concordance of toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology.** v. 32, p. 56-67, 2000

ONO, K; SHIBATA, S; IJIMA, T. Properties of the delayed rectifier potassium current in porcine sino-atrial node cells. **J Physiol.** v. 524, pt. 1, p. 51-62, apr. 2000

OSOL, A.; FARRAR, E. **The dispensatory of the United States of America.** 25.ed. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1955. p.1646-1647.

PAGE, J.E.; BALZA, F.; NISHIDA, T.; TOWERS, G. H. Biologically diterpenes from *Aspilia mossambicensis*, a chimpanzee medicinal plant. **Phytochemistry**, v. 31, n. 10, p. 3437-3439, 1992.

PAIVA, L.A; GURGEL, L.A; CAMPOS, A.R; SILVEIRA, E.R; RAO, V.S. Attenuation of ischemia/reperfusion-induced intestinal injury by oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Life Sci.** v. 75, n. 16, p. 1979-87, sep. 2004a

PAIVA, L.A; GURGEL, L.A; DE SOUSA, E.T; SILVEIRA, E.R; SILVA, R.M; SANTOS, F.A; RAO, V.S. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. **J Ethnopharmacol.** v. 93, n. 1, p. 51-56, july 2004b

PAIVA, L.A; GURGEL, L.A; SILVA, R.M; TOME, A.R; GRAMOSA, N.V; SILVEIRA, E.R; SANTOS, F.A; RAO, V.S. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascul Pharmacol.** v. 39, n. 6, p. 303-307, dec. 2002

PAIVA, L.A; RAO, V.S; GRAMOSA, N.V; SILVEIRA, E.R. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. **J Ethnopharmacol.** v. 62, n. 1, p. 73-78, aug. 1998

PAN, S.J; COMBS, A.B. Emetine-induced lactate dehydrogenase release, functional changes and electrocardiographic changes in the rat heart *in vitro*. **Toxic. In vitro.** v. 9, n. 3, p. 219-229, 1995.

PANG, L; DE LAS HERAS, B; HOULT, J.R. A novel diterpenoid labdane from *Sideritis javalambrensis* inhibits eicosanoid generation from stimulated macrophages but enhances arachidonate release. **Biochem Pharmacol.** v. 51, n. 6, p. 863-868, mar. 1996

PARRA, A.V; RUIZ, A.R; GONZÁLEZ, A.V; MICHELENA, M.D; BADELL, J.B. Estudio genotóxico in vitro e in vivo em tinturas de *Melissa officinalis* L (Toronjil) y *Mentha piperita* L (Toranjim de menta). **Ver. Cubana de Plant. Méd.** v. 2, n. 1, p. 6-11, 1997

PEDRON, N; ESTRADA, A.V; PONCE-MONTER, H; VALENCIA, A; GUZMAN, A; GALLEGOS, A.J. The zoapatle. VII. Antiimplantation effect in the rat of zoapatle aqueous crude extract (ZACE) from *Montanoa tomentosa* and *Montanoa frutescens*. **Contraception.** v. 31, n. 5, p. 499-507, may 1985

PELLEGRINO, A. C. Protection against human *Schistosoma cercariae*. **J. Exp. Parasitol.**, v. 21, n. 12, 1967.

PERRY, L.M; METZGER, J. **Medicinal plants of east and southeast Asia**. Cambridge: MIT Press, 1980, 620p.

PERSOONE, G.; WELLS, P.G. *Artemia* in aquatic toxicology: a review. **Artemia Research and its Applications** v. 1, p. 259-275, 1987

PERUSQUIA, M; SANCHEZ, E; PONCE-MONTER, H; ESTRADA, A.V; PEDRON, N; VALENCIA, A; GUZMAN, A; GALLEGOS, A.J. The zoapatle. XI. Effects elicited by *Montanoa tomentosa* and *Montanoa frutescens* on rat uterine strips. **Contraception.** v. 31, n. 5, p. 543-551, may 1985.

PEZZUTO, J.M; COMPADRE, C.M; SWANSON, S.M; NANAYAKKARA, D; KINGHORN, A.D. Metabolically activated steviol, the aglycone of stevioside, is mutagenic. : **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 82, n. 8, p. 2478-2482, apr. 1985

PIO CORRÊA, M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das terras exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984, v. 2, p. 370-375

PONCE-MONTER, H; CAMPOS-LARA, G; PEDRON, N; DE LA TORRE, L; VILLANEUVA, T; GALLEGOS, A; ROMO DE VIVAR, A; AZPEITIA, E; PEREZ, A. The zoapatle. XV. Activity of 16 alpha-hydroxy-ent-kauran-19-oic acid isolated from *Montanoa hibiscifolia*, and its methyl ester on rat and guinea pig uterus. **J Ethnopharmacol.** v. 24, n. 2-3, p. 127-134, dec. 1988

PORSOLT, R.D; LEMAIRE DÜRKMÜLLER, N; ROUX, S. New perspectives in CNS safety pharmacology. **Fundamental and Clinical Pharmacology.** v. 16, p. 197-207, 2002

PSYCHOYOS, A. Hormonal control of uterine receptivity for nidation. **J Reprod Fertil Suppl.** v. 25, p. 17-28, oct. 1976.

PUGSLEY, M.K. Safety Pharmacology matures into a unique pharmacological discipline (editorial). **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**. v. 49, p. 137-139, 2004.

RAMAN, A; WEIR, U; BLOOMFIELD, S.F. Antimicrobial effects of tea-tree oil and its major components on *Staphylococcus aureus*, *Staph. epidermidis* and *Propionibacterium acnes*. **Lett Appl Microbiol**. v. 21, n. 4, p. 242-245, oct. 1995

RASHEED, R.A; BASHIR, A.K; ALI, B.H; PADMANABHAN, R. Effect of *Rhazya stricta* on the developing rat fetus. **Reprod Toxicol**. v. 11, n. 2-3, p. 191-199, mar./june, 1997.

RASOAMIARANJANAHAARY, L; GUILLET, D; MARSTON, A; RANDIMBIVOLOLONA, F; HOSTETTMANN, K. Antifungal isopimaranes from *Hypoestes serpens*. **Phytochemistry**. v. 64, n. 2, p. 543-548, sep. 2003

RASKIN, I; RIBNICKY, D.M; KOMARNYTSKY, S; ILIC, N; POULEV, A; BORISJUK, N; BRINKER, A; MORENO, D.A; RIPOLL, C; YAKOBY, N; O'NEAL, J.M; CORNWELL, T; PASTOR, I; FRIDLENDER, B. Plants and human health in the twenty-first century. **Trends Biotechnol**. v. 20, n. 12, p. 522-531, dec. 2002.

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

RAVID, S; PODRID, P.J; LAMPERT, S; LOWN, B. Congestive heart failure induced by six of the newer antiarrhythmic drugs. **J Am Coll Cardiol**. v. 14, n. 5, p. 1326-1330, nov. 1989.

REDFERN, W.S; CARLSSON, L; DAVIS, A.S; LYNCH, W.G; MACKENZIE, I; PALETHORPE, S; SIEGL, P.K; STRANG, I; SULLIVAN, A.T; WALLIS, R; CAMM, A.J; HAMMOND, T.G. Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development. **Cardiovasc Res**. v. 58, n. 1, p. 32-45, apr. 2003.

REDFERN, W.; STRANG, I.; STOREY, S.; HEYS, C.; BARNARD, C.; LAWTON, K.; HAMMOND, T.G.; VALENTIN, J.P. Spectrum of effects detected in rat functional observational battery following oral administration of non-CNS target compounds. **Journal of Pharmacological and Toxicological methods**. v. 52, p. 77-82, 2005.

REINBOTHE, C.; DIETRICH, B.; LUCKNER, M.J. Regeneration of plants from somatic embryos of *Digitalis-lanata* **Plant Physiol**. v. 137, p. 224-228, 1990.

RODEN, D.M. Fármacos Antiarrítmicos. In: Goodman, L.S. & Gilman, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**, 10 ed.. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003, cap. 35, p. 703 - 729.

ROUSSEAU, C.G; SCHACHTER, H. Regulatory issues concerning the safety, efficacy and quality of herbal remedies. **Birth Defects Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.** v. 68, n. 6, p. 505-510, dec. 2003.

SACCHETTINI, J.C; POULTER, C.D. Creating isoprenoid diversity. **Science.** v. 277, n. 5333, p. 1788-1789, sep. 1997.

SAITO, S. Cytokine cross-talk between mother and the embryo/placenta. **J Reprod Immunol.** v. 52, n. 1-2, p. 15-33, oct./nov. 2001

SALAKO, L.A. The actions of dehydroemetine on isolated guinea-pig atria. Influence of ouabain and calcium. **Br J Pharmacol.** v. 46, n. 4, p. 725-735, dec. 1972

SAMAH, F.F; HEINEMAN, F.W; INCE, C; FLEMING, J; BALABAN, R.S. ATP-sensitive potassium channel is essential to maintain basal coronary vascular tone *in vivo*. **Am J Physiol.** 262 (5 Pt 1), p. C1220-1227, may 1992

SANCHEZ, C; GUPTA, M; VASQUEZ, M; NORIEGA, Y; MONTENEGRO, G. Bioensayo com Artemia salina para predecir la actividad antibacteriana y farmacológica. **Revista Médica de Panamá.** v. 18, p. 62-69, 1993

SARTORI, M.R; PRETTO, J.B; CRUZ, A.B; BRESCIANI, L.F; YUNES, R.A; SORTINO, M; ZACCHINO, S.A; CECHINEL, V.F. Antifungal activity of fractions and two pure compounds of flowers from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (*Asteraceae*). **Pharmazie.** v. 58, n. 8, p. 567-569, aug. 2003

SATOH, H; TSUCHIDA, K. Comparison of a calcium antagonist, CD-349, with nifedipine, diltiazem, and verapamil in rabbit spontaneously beating sinoatrial node cells. **J Cardiovasc Pharmacol.** . 21, n. 5, p. 685-692, may 1993

SATOH, H. Sino-atrial nodal cells of mammalian hearts: ionic currents and gene expression of pacemaker ionic channels. **J Smooth Muscle Res.** v. 39, n. 5, p. 175-193, oct. 2003.

SATOH, H. Taurine modulates I(Kr) but I(Ks) in guinea-pig ventricular cardiomyocytes. **Br J Pharmacol.** v. 126, n. 1, p. 87-92, jan. 1999

SATOH, K; NAGAI, F; USHIYAMA, K; KANO, I. Specific inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity by atractylon, a major component of byaku-jutsu, by interaction with enzyme in the E2 state. **Biochem Pharmacol.** v. 51, n. 3, p. 339-343, feb. 1996

SATOH, K; NAGAI, F; USHIYAMA, K; YASUDA, I; AKIYAMA, K; KANO, I. Inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase activity by beta-eudesmol, a major component of *Atractylodis lanceae* rhizoma, due to the interaction with enzyme in the Na.E1 state. **Biochem Pharmacol.** v. 44, n. 2, p. 373-378, july 1992

SATOH, K; NAGAI, F; USHIYAMA, K; YASUDA, I; SETO, T; KANO, I. Inhibition of Na^+/K^+ -ATPase by 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucose, a major constituent of both moutan cortex and *Paeoniae radix*. **Biochem Pharmacol.** v. 53, n. 4, p. 611-614, feb. 1997

SATOH, K.; YASUDA, I; NAGAI, F; USHIYAMA, K; AKIYAMA, K; KANO, I. The effects of crude drugs using diuretic on horse kidney ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-adenosine triphosphatase **Yakugaku Zasshi.** v. 111, n. 2, p. 138-145, feb. 1991

SCHLEPPER, M. Cardiodepressive effects of antiarrhythmic drugs. **Eur Heart J.** v. 10, suppl. E, p. 73-80, sep. 1989.

SEIDL, P.R. Pharmaceuticals from natural products: current trends. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 74, n. 1, p. 145-150, 2002

SEINO, S; MIKI, T. Gene targeting approach to clarification of ion channel function: studies of Kir6.x null mice. **J Physiol.** v. 554, pt. 2, p. 295-300, jan. 2004

SEINO, S. Physiology and pathophysiology of K(ATP) channels in the pancreas and cardiovascular system: a review. **J Diabetes Complications.**; v. 17, Suppl 2, p. 2-5, Mar/Apr 2003

SETCHELL, K.D; BORRIELLO, S.P; HULME, P; KIRK, D.N; AXELSON, M. Nonsteroidal estrogens of dietary origin: possible roles in hormone-dependent disease. **Am J Clin Nutr.** v. 40, n. 3, p. 569-578, sep. 1984

SETCHELL, K.D; GOSSELIN, S.J; WELSH, M.B; JOHNSTON, J.O; BALISTRERI, W.F; KRAMER, L.W; DRESSER, B.L; TARR, M.J. Dietary estrogens-a probable cause of infertility and liver disease in captive cheetahs. **Gastroenterology.** v. 93, n. 2, p. 225-233, aug. 1987.

SHEPARD, T. H. **Catalog of teratogenic agents.** 6 ed. Baltimore: John's Hopkins University Press, 1989

SHINAGAWA, Y; SATOH, H; NOMA, A. The sustained inward current and inward rectifier K^+ current in pacemaker cells dissociated from rat sinoatrial node. **J Physiol.** v. 523, pt. 3, p. 593-605, mar. 2000.

SILVA, R.M; SANTOS, F.A; MACIEL, M.A; PINTO, A.C; RAO, V.S. 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.** v. 67, n. 8, p. 763-765, nov. 2001b

SILVA, R.M; SANTOS, F.A; RAO, V.S; MACIEL, M.A; PINTO, A.C. Blood glucose- and triglyceride-lowering effect of trans-dehydrocrotonin, a diterpene from *Croton cajucara* Benth., in rats. **Diabetes Obes Metab.** v. 3, n. 6, p. 452-456, dec. 2001a

SINGH, N.P; MCCOY, M.T; TICE, R.R; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res.** v. 175, n. 1, p. 184-191, mar. 1988.

SLEET, R.B; BRENDDEL, K. Improved methods for harvesting and counting synchronous populations of *Artemia nauplii* for use in developmental toxicology. **Ecotoxicol Environ Saf.** v. 7, n. 5, p. 435-46, oct. 1983.

SLIMESTAD, R.; MARSTON, A.; MAVI, S.; HOSTETTMANN, K. Larvicidal constituents of *Melantheria albinervia*. **Planta Méd.** v. 61, p. 562-563, 1995.

SOLIS, P.N; WRIGHT, C.W; ANDERSON, M.M; GUPTA, M.P; PHILLIPSON, J.D. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). **Planta Med.** v. 59, n. 3, p. 250 - 252, jun. 1993.

SOMOVA, L. I; SHODE, F.O; MOODLEY, K; GOVENDER, Y. Cardiovascular and diuretic activity of kaurene derivatives of *Xylopi aethiopica* and *Alepidea amatymbica*. **J Ethnopharmacol.** v. 77, n. 2-3, p. 165-74, oct. 2001

SORGELOOS, P; REMICHE-VAN DER WIELEN, C; PERSOONE, G. The use of *Artemia nauplii* for toxicity tests-a critical analysis. **Ecotoxicol Environ Saf.** v. 2, n. 3-4, p. 249-255, dec. 1978.

SOUZA-FORMIGONI, M.L.O.; OLIVEIRA, M.G.M.; MONTEIRO, M.G.; SILVEIRA-FILHO, N.G.; BRAZ, S.; CARLINI, E.A. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **J. Ethnopharmacol.** v. 34, p. 21-27, 1991

SPINDLER, P; SEILER, J.P. Quality management of Pharmacology and Safety Pharmacology studies. **Fundamental and clinical Pharmacology.** v. 16, p. 83-90, 2002

SRINIVASAN, V.V; SIVARAMAKRISHNAN, V.R; RANGASWAMY, C.R; ANANTHPADMANABHA, H.S; SHANKARANARAYANA, K.H. **Sandal (Santalum album L)**. Dehra Dun: Indian Concil of Forestry Research and Education, 1992

STAPLES, R.E.; SCHNELL, V.L. Refinements in rapid clearing technic in the KOH Alizarin red S method for fetal bone. **Stain. Tech.** v. 39, p. 61-63, 1964.

STINE, K.C; SAYLORS, R.L; SAWYER, J.R; BECTON, D.L. Secondary acute myelogenous leukemia following safe exposure to etoposide. **J Clin Oncol.** v. 15, n. 4, p. 1583-1586, apr. 1997.

SUH, Y.G; KIM, Y.H; PARK, M.H; CHOI, Y.H; LEE, H.K; MOON, J.Y; MIN, K.H; SHIN, D.Y; JUNG, J.K; PARK, O.H; JEON, R.O; PARK, H.S; KANG, S.A. Pimarane cyclooxygenase 2 (COX-2) inhibitor and its structure-activity relationship. **Bioorg Med Chem Lett.** v. 11, n. 4, p. 559-562, feb. 2001

SUTHERLAND, F.J; HEARSE, D.J. The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. **Pharmacol Res.** v. 41, n. 6, p. 613-627, june 2000

TAPPIN, M.R.R; PEREIRA, J.F.G; LIMA, L.A; SIANI, A.C; MAZZEI, J.L; RAMOS, M.F.S. Análise química quantitativa para padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. **Quim. Nova.** v. 27, n. 2, p. 236-240, 2004

TERAI, T; REN, H; MORI, G; YAMAGUCHI, Y; HAYASHI, T. Mutagenicity of steviol and its oxidative derivatives in *Salmonella typhimurium* TM677. **Chem Pharm Bull**, Tokyo, v. 50, n. 7, p. 1007-1010, july 2002

TERPSTRA, A.H; KATAN, M.B; WEUSTEN-VAN DER WOUW, M.P; DE ROOS, B; BEYNEN, A.C. The hypercholesterolemic effect of cafestol in coffee oil in gerbils and rats. **J Nutr Biochem.** v. 11, n. 6, p. 311-317, june 2000

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. **Herbarium:** compêndio de fitoterapia. 2.ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 1995.

THASTRUP, O; FODER, B; SCHARFF, O. The calcium mobilizing tumor promoting agent, thapsigargin elevates the platelet cytoplasmic free calcium concentration to a higher steady state level. A possible mechanism of action for the tumor promotion. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 142, n. 3, p. 654-660, feb. 1987

THOMAS, S.H. Drugs, QT interval abnormalities and ventricular arrhythmias. **Adverse Drug React Toxicol Rev.** v. 13, n. 2, p. 77-102, 1994.

TIRAPELLI, C.R; AMBROSIO, S.R; COUTINHO, S.T; DE OLIVEIRA, D.C; DA COSTA, F.B; DE OLIVEIRA, A.M. Pharmacological comparison of the vasorelaxant action displayed by kaurenoic acid and pimaradienoic acid. **J Pharm Pharmacol.** v. 57, n. 8, p. 997-1004, aug. 2005.

TIRAPELLI, C.R; AMBROSIO, S.R; DA COSTA, F.B; COUTINHO, S.T; DE OLIVEIRA, D.C; DE OLIVEIRA, A.M. Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acid in the isolated rat aorta. **Eur J Pharmacol.** v. 492, n. 2-3, p. 233-241, may 2004.

TIRAPELLI, C.R; AMBROSIO, S.R; DA COSTA, F.B; DE OLIVEIRA, A.M. Inhibitory action of kaurenoic acid from *Viguiera robusta* (Asteraceae) on phenylephrine-induced rat carotid contraction. **Fitoterapia.** v. 73, n. 1, p. 56-62, feb. 2002

TOMASELLI, G.F; BEUCKELMANN, D.J; CALKINS, H.G; BERGER, R.D; KESSLER, P.D; LAWRENCE, J.H; KASS, D; FELDMAN, A.M; MARBAN, E. Sudden cardiac death in heart failure. The role of abnormal repolarization. **Circulation.** v. 90, n. 5, p. 2534-2539, nov. 1994.

TOSKULKAO, C; CHATURAT, L; TEMCHAROEN, P; GLINSUKON, T. Acute toxicity of stevioside, a natural sweetener, and its metabolite, steviol, in several animal species. **Drug Chem Toxicol.** v. 20, n. 1-2, p. 31-44, feb./may 1997.

TOWLEY, R.G; CHENG, J; BEWTRA, A.K; NAIR, N; HOPP, R; AGRAWAL, D.K. The role of calcium channel blockers in reactive airway disease. **Ann. NY Acad. Sci.** v. 522, p. 732-746, 1988.

TOYODA, K; MATSUI, H; SHODA, T; UNEYAMA, C; TAKADA, K; TAKAHASHI, M. Assessment of the carcinogenicity of stevioside in F344 rats. **Food Chem Toxicol.** v. 35, n. 6, p. 597-603, june. 1997.

TUDZYNSKI, B. Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*: biomolecular aspects. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 52, n. 3, p. 298-310, sep. 1999

ULUBELEN, A; TOPCU, G; JOHANSSON, C.B. Norditerpenoids and diterpenoids from *Salvia multicaulis* with antituberculous activity. **J Nat Prod.** v. 60, n. 12, p. 1275-1280, dec. 1997

VALE, J.A; MEREDITH, T.J. Acute poisoning due to non-steroidal anti-inflammatory drugs. Clinical features and management. **Med Toxicol.** v. 1, n. 1, p. 12-31, jan./feb. 1986

VALE, O.C.; FONTELES, D. S. R.; CABRAL, F. R.; TEIXEIRA, M. D. A.; FONTELES, M. C.; Electrophysiological effects of glutathione na animal model of cerebral ischemia. **Research Communication in Biological Psychology and Psychiatry.** v.26, p. 35-47, 2001.

VALENCIA, A; WENS, A; PONCE-MONTER, H; PEDRON, N; GALLEGOS, A; QUIJANO, L; CALDERON, J; GOMEZ, F; RIOS, T. Zoapatle. XII. In vitro effect of kaurenoic acid isolated from *Montanoa frutescens* and two derivatives upon human spermatozoa. **J Ethnopharmacol.** v. 18, n. 1, p. 89-94, oct. 1986

VARAGIC, V.M; MILOVANOVIC, S.R; SRKALOVIC, G. The effect of calcium-channel-blocking agents on the various types of smooth muscle activation of the isolated rat uterus. **Arch Int Pharmacodyn Ther.** v. 270, n. 1, p. 79-87, july 1984

VEIGA JR, V.F. O Gênero *Copaifera*: Estudos fitoquímicos de 8 espécies classificadas e 127 óleos de copaíba. 2004. 400 f. **Tese (Doutorado em Química)**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

VEIGA JR, V.F.; PINTO, A.C. Plantas medicinais: Cura segura? **Quim. Nova.** v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VEIGA JR, VF; ZUNINO L, CALIXTO JB, PATITUCCI ML, PINTO AC. Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaiba oils available in Brazil. **Phytother Res.** v. 15, n. 6, p. 476-480, sep. 2001

VEIGA JR., V.F., CALIXTO, J.B.; PINTO, A. C. Phytochemical study and antiinflammatory activity of the Copaiba oils from *Copaifera* species. In: Chemistry, Biological and Pharmacological properties of medical plants from the Americas (IOCD/CYTED). Panamá, 1997. **Abstracts...** Panamá, 1997.

VELIKOVA, M.; BANKOVA, V.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M. C. Antibacterial ent-kaurane from brasilian propolis of native stingless bees. **Fitoterapia**, v. 71, p. 693-696, 2000.

VIEIRA, L.S. **Fitoterapia da Amazônia - Manual das Plantas Medicinais**, 2 ed. São Paulo: Agronomica Ceres, 1992, p. 347

VINITKETKUMNUEN U, PUATANACHOKCHAI R, KONGTAWELERT P, LERTPRASERTSUKE N, MATSUSHIMA T. Antimutagenicity of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) to various known mutagens in *Salmonella* mutation assay. **Mutat Res.** v. 341, n. 1, p. 71-75, nov. 1994

VITAL BO, FONTANA MD, DI A, HELUANY NF, LEITE GB. Actions of *Androctonus australis* and *Leiurus quinquestriatus* venoms in the rat isolated atria and anesthetized rats; effect of magnesium and lidocaine. **J Nat Toxins.** v. 11, n. 1, p. 1-13, feb. 2002.

VON BORSTEL RC, HIGGINS JA. Janus carcinogens and mutagens. **Mutat Res.** v. 402, n. 1-2, p. 321-329, june 1998.

WAGNER, H. Guidelines for quality control of phytomedicines. In: world congress on medicinal and aromatic plants for human welfare, 2..., 1997, Mendoza. **Abstracts...** Mendoza: ICMIPA/ISHS/SAIPOA, 1997, p. L-4.

WAGNER, M. M; PAUL, D. C; SHIH, C; JORDAN, M. A; WILSON, L; WILLIAMS, D. C. *In vitro* pharmacology of cryptophycin 52 (LY355703) in human tumor cell lines. **Cancer Chemother. Pharmacol.** v. 43, p. 115-125, 1999.

WAKEFIELD, I.D; POLLARD, C; REDFERN, W.S; HAMMOND, T.G; VALENTIN, J.P. The application of *in vitro* methods to Safety Pharmacology. **Fundamental & Clinical Pharmacology.** v. 16, n. 3, p. 209, 2002.

WALKER, D.K. The use of pharmacokinetic and pharmacodynamic data in the assessment of drug safety in early drug development. **British Journal of Clinical Pharmacology.** v. 58, n. 6, p. 601-608, 2004.

WALTER H. LEWIS AND P.F. ELVIN-LEWIS. **Medical Botany: Plants Affecting Human Health**, 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 2003, p.293

WATKINS, R; TURLEY, D; CHAUDHRY, Q; CSL. Secondary (special) metabolites from trees. **Useful Chemicals from Main Commercial Tree Species in the UK**. Disponível em: <<http://tree-chemicals.csl.gov.uk/review/metabolites.cfm>> Acesso em: jan. 2006.

WALTON, S.F; MCKINNON, M; PIZZUTTO, S; DOUGALL, A; WILLIAMS, E; CURRIE, B.J. Acaricidal activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: *in vitro* sensitivity of *Sarcoptes scabiei* var *hominis* to terpinen-4-ol. **Arch Dermatol**. v. 140, n. 5, p. 563-566, may 2004

WASUNTARAWAT C, TEMCHAROEN P, TOSKULKAO C, MUNGKORNKARN P, SUTTAJIT M, GLINSUKON T. Developmental toxicity of steviol, a metabolite of stevioside, in the hamster. **Drug Chem Toxicol**. v. 21, n. 2, p. 207-222, may 1998.

WHO Expert Committee On Food Additives. Safety evaluation of certain food additives. In: **WHO Food Additives Series**. Geneve: World Health Organization, 1999. n. 42, p. 119-143

WILKENS M, ALARCON C, URZUA A, MENDOZA L. Characterization of the bactericidal activity of the natural diterpene kaurenoic acid. **Planta Med**. v. 68, n. 5, p. 452-454, may 2002.

WILLIANSON, E; OKPAKO, D.T; EVANS, F.J. **Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material**. West Sussex: John Wiley & Sons, 1996. 228p.

WILSON, J.G. Embryological considerations in teratology. In: Wilson, J. G; Warkany, J. **Teratology: principles and techniques**. Chicago: University of Chigago Press, 1965. p.251-277.

WU, Y.C; HUNG, Y.C; CHANG, F.R; COSENTINO, M; WANG, H.K; LEE, K.H;. Identification of ent-16 beta, 17-dihydroxykauran-19-oic acid as an anti-HIV principle and isolation of the new diterpenoids annosquamosins A and B from *Annona squamosa*. **J Nat Prod**. v. 59, n. 6, p. 635-637, june 1996.

WU, K.M; DEGEORGE, J; ATRAKCHI, A; A special update from the United States Food and Drug Administration: preclinical issues and status of investigation of botanical drug products in the United States. **Toxicol Lett**. v. 111, p. 199-202, 2000

WU, K.M; FARRELY, J; BIRNKRANT, D; CHEN, Z; FREED, L; GHANTOUS, H; GOHEER, A; HAUSNER, E; OSTERBERG, R; RHEE, H; ZHANG,K.E. Regulatory toxicology perspectives on the development of botanical drug products in the United States. **Am. J. of Therapeutics**. v. 11, p. 213-217, 2004.

XILI, L; CHENGJIANY, B; ERYI, X; REIMING, S; YUENGMING, W; HAODONG, S; ZHIYIAN, H. Chronic oral toxicity and carcinogenicity study of stevioside in rats. **Food Chem Toxicol**. v. 30, n. 11, p. 957-965, nov. 1992

YAMADA, A; OHGAKI, S; NODA, T; SHIMIZU, M. Chronic toxicity of dietary *Stevia* extracts. **J. Food, Hyg. Soc. Jpn.** v. 26, p. 169-183, 1995

YAMAGUCHI S, KAMIYA Y. Gibberellin biosynthesis: its regulation by endogenous and environmental signals. **Plant Cell Physiol.** v.41, n.3, p. 251-7, mar 2000

YANG, Y.L; CHANG, F.R; HWANG, T.L; CHANG, W.T; WU, Y.C. Inhibitory effects of ent-kauranes from the stems of *Annona squamosa* on superoxide anion generation by human neutrophils. **Planta Med.** v. 70, n. 3, p. 256-258, mar. 2004.

YANG YL, CHANG FR, WU CC, WANG WY, WU YC. New ent-kaurane diterpenoids with anti-platelet aggregation activity from *Annona squamosa*. **J Nat Prod.** v. 65, n. 10, p. 1462-1467, oct. 2002.

YASUKAWA K, KITANAKA S, SEO S. Inhibitory effect of stevioside on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. **Biol Pharm Bull.** v. 25, n. 11, p. 1488-1490, nov. 2002.

YOCHIM, J. M; DE FEO, V. J. Hormonal control of the onset, magnitude and duration of uterine sensitivity in rat by steroid hormones of the ovary. **Endocrinology.** v. 72, p. 317-326, 1963.

YODYINGYUAD, V; BUNYAWONG, S. Effect of stevioside on growth and reproduction. **Hum Reprod.** v. 6, n. 1, p. 158-165, jan. 1991

YOKOSHIKI, H; SUNAGAWA, M; SEKI, T; SPERELAKIS, N. ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. **Am J Physiol.** v. 274, p. C25-37, jan. 1998.

YOUNG, C.W; HENDLER, F.J; SAME, E; KARNOFSKY, D.A. Studies on 2-piperidino-8-mercaptoadenine, a potent inhibitor of cleavage in echinoderm embryos. **Exp Cell Res.** v. 60, n. 1, p. 45-53, apr. 1970

ZHANG A, ZHU QY, LUK YS, HO KY, FUNG KP, CHEN ZY. Inhibitory effects of jasmine green tea epicatechin isomers on free radical-induced lysis of red blood cells. **Life Sci.** v. 61, n. 4, p. 383-394, 1997.