



**UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI-URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR**

VIVIANNE CORTEZ SOMBRA VANDESMET

Estudo do efeito hepático e das atividades citoprotetora, leishmanicida e tripanocida do extrato hidroalcolólico da casca de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart.

CRATO – CE,
2014.

VIVIANNE CORTEZ SOMBRA VANDESMET

Estudo do efeito hepático e das atividades citoprotetora, leishmanicida e tripanocida do extrato hidroalcolico da casca de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular.

Orientador:
Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes

CRATO – CE,
2014.

VIVIANNE CORTEZ SOMBRA VANDESMET

Estudo do efeito hepático e das atividades citoprotetora, leishmanicida e tripanocida do extrato hidroalcolico da casca de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart.

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes – Orientador
Universidade Regional do Cariri – URCA

Prof. Dra. Marta Regina Kerntopf
Universidade Regional do Cariri – URCA

Prof. Dr. Cicero Francisco Bezerra Felipe
Universidade Federal da Paraíba – UFPB

Prof. Dr. Henrique Douglas de Melo Coutinho - Suplente
Universidade Regional do Cariri – URCA

CRATO – CE,
2013

Dedico este trabalho aos meus pais, avós,
irmãos e minha amada filha.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado força e determinação de seguir nessa jornada.

A minha mãe: Idamelia Vandesmet, pelo amor, carinho, paciência, pelos cuidados com minha saúde enquanto estava escrevendo, por se preocupar se eu comia, e pelas reclamações de noites em claro.

A meu pai Marcelo Vandesmet, que mesmo não estando fisicamente presente, sem ele nada seria possível, e tenho certeza que ele me protege de onde ele esta e me deu força para seguir esse caminho.

Aos meus irmãos: Lilian Vandesmet e Gustavo Vandesmet, por estarem sempre ao meu lado, em especial ao meu irmão que esta me dando o prazer de ser tia.

A minha cunhada, Erika Lima, que trouxe ao mundo meu sobrinho lindo, Gustavo, e me deu uma força nessa reta final.

A minha filha Victória Valentine que sempre esteve do meu lado, me ajudando, cuidando de mim, se preocupando e me dando o amor que jamais teria sem ela.

Aos meus avós, Jadey Cortez e José Sombra, que sem eles não teria chegado aqui, pelo incentivo, inspiração, ajuda, e principalmente amor para nunca permitir que eu desistisse.

Aos meus avós Lilian Pierrard e Gustavo Vandesmet, que me deram o prazer de participar de minha vida nesse momento tão difícil.

Ao meu namorado Raul Marreiro que entendeu todas as minhas ausências, irritações, falta de tempo, e sempre me olhava e dizia vai da tudo certo.

A Maria Tatiana Alves oliveira, a irmã que Deus me deu, jamais poderia ter chegado até aqui sem ela, obrigada pela paciência e pelo incentivo.

Aos meus amigos que tanto amo, Paulo Landim, Mariana Brigido, Ticila Alves, Nethyelle Amarante, Belarmino Coutinho, Raiat, Martins, Maycon Jardiel, por estarem ao meu lado sempre, mesmo quando estamos longe.

Aos meus amigos que trabalham comigo, Ihermes Augusto, Fabrina de Moura, Amanda Karine, Bruna Soares, Alexandra Laurindo, Amanda Gonçalves, Ana Ruth, por estarem do meu lado, me apoiando, me dando força e me mostrando sempre o caminho para chegar onde eu desejava.

Aos meus alunos, que nesses dois anos tanto me incentivaram e me elogiaram, me dando força e garra para seguir em frente.

Ao meu orientador professor Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes, que seria impossível estar aqui se não fosse por sua ajuda, atenção, ensinamentos, já se passam 4 anos que estamos nessa luta pelo conhecimento, me ensinando a ser uma profissional, e se hoje eu sei alguma coisa eu devo boa parte a ele e jamais terei como agradecer sua confiança e crédito em mim depositado. Obrigada do fundo do meu coração.

A Prof Dra. Marta Regina Kerntopf por toda atenção e cuidado que teve comigo nos momentos mais difíceis desta dissertação.

Ao Prof Dr. Henrique Douglas que tanto me incentivou e me ajudou a chegar até o mestrado e principalmente concluí-lo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular especialmente aos Drs.(a) Galberto Martins, Henrique Douglas Coutinho, Marta Kerntopf, Imeuda Peixoto, Roseli Barbosa e Alexandre Magno por cada ensinamento, cada tema dissertado, cada momento de descontração.

As Secretárias Anderciele Rolim e Lenira Pereira por sempre estarem a disposição e cuidando para que tudo desse certo durante esses dois anos.

Aos membros do Laboratório de Farmacologia e Química Molecular (LFQM) pelo acolhimento e apoio, em especial a Valter Santos e Gyllyandeson Delmondes, pela ajuda e carinho que tiveram durante o tempo de ensinamento.

Pelos colegas de mestrado Olga, Andreza, Larissa, Cinara, Elba, Tatiana, Sharlene, Karizia, Dara e todos os outros que de uma forma ou de outra sempre contribuíram para meu crescimento acadêmico, e pelas amizades formadas.

A parceria com a Faculdade Leão Sampaio, onde foram realizados todos os testes laboratoriais.

Ao apoio financeiro da CAPES, que sem ele o trabalho não teria como ser desenvolvido.

Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles.

(Augusto Cury)

RESUMO

Stryphnodendron rotundifolium Mart é uma árvore endêmica da Chapada do Araripe, onde é amplamente utilizada pela população local. Estes tratam algumas enfermidades como feridas e gastrites, tendo um efeito anti-inflamatório, utilizada para banhos de assento dentre outros. Barbatimão, como é conhecida popularmente, vem sendo alvo de estudos farmacológicos, onde já foi evidenciado sua capacidade de combater radicais livres, atividade antimicrobiana e moduladora. A região do Cariri, assim como todo o Brasil, sofre com doenças causadas por protozoários, como é o caso da Leishmaniose e Doença de Chagas, que são patologias sistêmicas, com tratamentos ineficazes ou muito tóxicos para o paciente. Diante do exposto, viu-se a necessidade de verificar o efeito hepático do uso desta espécie, bem como, avaliar a atividade antiparasitária (*in vitro*) contra os parasitas da classe Leishmania e Trypanosoma. Para isto foi realizado dois testes, um para avaliar a atividade hepática, onde foram administradas soluções do Extrato Hidroalcoólico da Casca de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart (EHCSR) e do paracetamol (agente agressor), durante 14 dias alternados e posteriormente houve a eutanásia dos animais por exsanguinação através de punção cardíaca sob anestesia, para colheita de sangue, afim de serem dosados os parâmetros bioquímicos: Aspartato Aminotransferase (AST/TGO), Alanina Aminotransferase (ALT/TGP), Albumina, Proteínas Totais, gama- glutamiltransferase (Gama – GT), fosfatase alcalina. Após realizada essas dosagens verificou-se que as transaminases ALT e AST, quando apenas utilizando administração do EHCSR 400mg/Kg encontrava-se alteradas em relação ao controle negativo, assim como a gama-GT e a fosfatase alcalina sendo evidenciando um dano hepático inicial. A Albumina e Proteínas totais não se mostraram alteradas em relação ao controle negativo. Nos testes antiparasitários, foram realizados *in vitro*, leishmanicida e tripanocida do EHCSR em quatro concentrações diferentes (1000, 500, 250, 125 µg/mL), a fim de verificar a quantidade de parasitas mortos. Foram utilizadas placas de 96 poços para realizar as diluições e posteriormente a motilidade dos parasitas. Realizou-se também a citotoxicidade do EHCSR frente a fibroblastos aderidos em placa. Obteve-se um resultado, diante da espécie *L. infantum*, em torno de 45% de mortalidade dos parasitas em todas as concentrações, frente a *L. brasiliensis* a concentração significativa foi de 1000µg/mL, com 56,38%. A atividade tripanocida obteve destaque na concentração de 1000µg/mL, com 82,31% de mortalidade das epimastigotas. A citotoxicidade nessas concentrações de destaque, 1000µg/mL e 500µg/mL, apresentou 94,14% e 75,12%. Neste sentido, esta pesquisa aponta que com a atividade antiparasitária significativa, e baixa toxicidade torna viável seu uso como alternativa terapêutica. Em conjunto com a análise hepática, *in vivo*, que demonstrou efeito tóxico sobre o fígado, quando comparado ao controle negativo, por conta disto o uso desta planta pode acarretar o agravamento de alguns sintomas ou o surgimento de outras patologias, pois foi evidenciado sistêmico, que provavelmente foi causado por algum metabolito gerado quando o mesmo foi biotransformado no organismo, por este motivo o dano celular *in vitro* não foi verificado. Com este fato demonstra a necessidade de se obter novos estudos a cerca desta para melhor elucidação de seus efeitos.

Palavra – Chave: *Stryphnodendron rotundifolium*, atividade hepática, antiparasitária.

ABSTRACT

Stryphnodendron rotundifolium Mart is an endemic Chapada the Araripe, which is widely used by the local population. These treated wounds and some diseases such as gastritis, having an anti-inflammatory effect, used for bathing and others seat. Barbatimão, as it is popularly known, has been the target of pharmacological studies, where it has been demonstrated its ability to fight free radicals, antimicrobial activity and modulating. The Cariri, as well as throughout Brazil, suffers from diseases caused by protozoa, such as Leishmaniasis and Chagas disease, which are systemic diseases with treatments ineffective or too toxic for the patient. In this light, he saw the need to check the liver effect of the use of this species as well as to evaluate the antiparasitic activity (in vitro) against the parasites Leishmania and Trypanosoma class. For this two tests, one to evaluate the hepatic activity, where solutions were administered the hydroalcoholic extract of the bark *Stryphnodendron rotundifolium* Mart (EHCSR) and paracetamol (offending agent) for 14 days and then there was the alternate Euthanasia was performed by exsanguination by cardiac puncture under anesthesia, blood collection, in order to be measured biochemical parameters: aspartate aminotransferase (AST / TGO), alanine aminotransferase (ALT / TGP), albumin, total protein, gamma-glutamyltransferase (Gamma - GT) , alkaline phosphatase. After making these measurements it was found that the transaminases ALT and AST, when only using EHCSR 400mg/Kg administration was found to be altered compared to the negative control, as well as gamma-GT and alkaline phosphatase and showing an initial hepatic damage. The albumin and total protein were not changed compared to the negative control. In antiparasitic tests were performed in vitro antileishmanial and trypanocidal the EHCSR at four different concentrations (1000, 500, 250, 125 mg / ml) in order to check the amount of dead parasites. 96-well plates for dilutions and subsequently performing the motility of the parasites were used. We have also performed the cytotoxicity of EHCSR fibroblasts adhered to the front plate. The result was obtained, before the species *L. infantum*, around 45% mortality of the parasites in all concentrations, compared to *L. brasiliensis* significant concentration was 1000µg/mL, with 56.38%. The trypanocidal activity was highlighted in the concentration of 1000µg/mL with 82.31% mortality of epimastigotes. Cytotoxicity measured concentrations of prominence, and 1000µg/mL 500µg/mL, showed 94.14% and 75.12%. In this sense, this research shows that with the anti-parasitic significant activity and low toxicity makes possible its use as a therapeutic alternative. In conjunction with the liver test, in vivo, which demonstrated toxic effect on the liver when compared to the negative control, because of this the use of this plant can cause worsening of some symptoms or the appearance of other pathologies, as evidenced systemic which was probably caused by some metabolite generated when it was metabolized in the body, therefore the cellular damage in vitro has not been verified. With this fact demonstrates the need to obtain new studies about this for better understanding of its effects.

Keywords: *Stryphnodendron rotundifolium*, hepatic activity, antiparasitic

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Metabolização do paracetamol. A: Metabolização normal (paracetamol sendo conjugado com glicuronídeo e excretado na urina). Grande parte do remanescente é conjugado com glutathione. B: Casos de superdosagens, conjugação ocorre prejudicada e diminuição de glutathione ocorrendo acúmulo do metabólito hepatotóxico N-acetil-p-benzoquinoneimina. (LUBEL et al., 2007). 18
- Figura 2: A) Forma Promastigota de *Leishmania sp*; B) Forma Amastigota de *Leishmania sp*. 19
- Figura 3: A: Forma amastigota do *T. cruzi*.; B: Forma tripomastigota do *T. cruzi*; C: Forma epimastigota do *T. cruzi*. 20
- Figura 4: Extração da casca de *Stryphnodendron rotundifolium*, para obtenção do extrato hidroalcoólico da casca de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart. (EHCSR)..... 26
- Figura 5: Prospecção Fitoquímica qualitativa do Extrato Hidroalcoólico da casca de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart. – EHCSR. (OLIVEIRA et al 2011) 26
- Figura 6: Distribuição dos grupos de animais utilizado no ensaio de hepatoproteção..... 28

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS ARTIGO 1

Tabela 1: Divisão dos grupos quanto a solução administrada.....	34
---	----

LISTA DE TABELAS ARTIGO 2

Tabela 1: Resultado do Pentamidina, frente a <i>Leishmania infantum</i> na forma parasitária promastigota. (IC ₅₀ = 5.69 µg/mL).....	49
Tabela 2: Resultado do EHCSR, frente a <i>Leishmania infantum</i> na forma parasitária promastigota. (IC ₅₀ = 1338.76 µg/mL).....	49
Tabela 3: Resultado do EHCSR, frente a <i>Leishmania brasiliensis</i> na forma parasitária promastigota. (IC ₅₀ = 987.35µg/mL).....	49
Tabela 4: Resultado do Nifurtimox, frente a <i>Trypanosoma cruzi</i> na forma parasitária epimastigota. (IC ₅₀ = 20.02 µg/mL)	50
Tabela 5: Resultado do EHCSR, frente a <i>Trypanosoma cruzi</i> na forma parasitária epimastigota. (IC ₅₀ = 748.97µg/mL)	51
Tabela 6: Atividade citotóxica do EHCSR frente a fibroblastos. (IC ₅₀ = 190.24µg/mL)	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A) Resultado da dosagem Aspartato Aminotransferase (TGO/AST) e B) Alanina Aminotransferase (ALT/TGP). Amostra de soro de ratos, onde foram administrados paracetamol e EHCSR em duas dosagens, onde a significância entre os grupos é vista com $p < 0.05$. A coluna A encontra-se significativa frente a todas as colunas, assim como a coluna B. Demonstrando que entre os grupos existiu uma significância mutua em relação a todos eles. 36

Figura 2: A) Resultado da dosagem Gama glutamiltransferase (Gama – GT), em amostra de soro de ratos, onde foram administrados paracetamol e EHCSR em duas dosagens, onde a significância entre os grupos é vista com $p < 0.05$. As colunas A e B foram significantes em relação a todas as outras analisadas. Nas análises entre grupos, as colunas C em relação a D, C em relação a E, D em relação a E e E em relação a F, não tiveram significância. e B) Resultado da dosagem Fosfatase alcalina, em amostra de soro de ratos, onde foram administrados paracetamol e EHCSR em duas dosagens, onde a significância entre os grupos é vista com $p < 0.05$. Todas as relações entre colunas foram significantes com exceção de E em relação a F, onde não houve significado..... 38

Figura 3: A) Resultado da dosagem Proteínas Totais, em amostra de soro de ratos, onde foram administrados paracetamol e EHCSR em duas dosagens, onde a significância entre os grupos é vista com $p < 0.05$. Todas as relações entre colunas foram significantes com exceção de A em relação a E, onde não houve significado e B) Resultado da dosagem Albumina, em amostra de soro de ratos, onde foram administrados paracetamol e EHCSR em duas dosagens, onde a significância entre os grupos é vista com $p < 0.05$. Todas as relações entre colunas foram significantes com exceção de C em relação a D, E em relação a F onde não houve significado. 39

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ALT/TGP: alanina aminotransferase ou alanine aminotransferase

AST/TGO: aspartato aminotransferase ou aspartate aminotransferase

Gama-GT: gama glutamiltransferase

CCl₄ : Tetra Cloreto de Carbono

LV: Leishmaniose visceral

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenil tetrazolium bromide

PBS: Tampão salina fosfato

pH: Potencial hidrogeniônico

rpm: Rotação por minuto

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana

SBF: Soro bovino fetal inativado a 56° C

LIT: Liver Infusion Tryptose

URCA: Universidade Regional do Cariri

EHCSR – Extrato hidroalcolico da casca de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.2 Anatomia e fisiologia hepática	16
1.3 Danos hepáticos: Agentes agressores	16
1.3.1 Paracetamol ou Acetaminofeno	17
1.3.2 Parasitas sanguíneos	18
1.3.2.1 <i>Leishmania sp.</i>	18
1.3.2.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
1.5 Plantas com atividade hepatoprotetora	21
1.6 Gênero <i>Stryphnodendron</i>	22
2. OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.2 Extração	26
3.3 Atividade Hepatoprotetora	27
3.3.1 Preparo do extrato e do paracetamol para administração dos animais.....	27
3.3.2 Animais.....	27
3.3.3 Grupos de administração do extrato <i>S. rotundifolium</i> Mart e paracetamol 750mg/Kg.....	27
3.3.4 Preparo da amostra sanguínea	28
3.3.5 Testes Bioquímicos.....	28
3.4 Avaliação da atividade leishmanicida e tripanocida do extrato <i>Stryphnodendron rotundifolium</i> Mart.	28
3.4.1 Obtenção de parasitas e células	28
3.4.2 Avaliação leishmanicida <i>in vitro</i>	29
3.4.3 Avaliação tripanocida <i>in vitro</i>	29
3.4.4 Avaliação de citotoxicidade	30
3.4.5 Análise estatística.....	30
4. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	31
4.1 Artigo 1: Avaliação da atividade hepática (<i>in vivo</i>) do extrato hidroalcoólico da casca de <i>Stryphnodendron rotundifolium</i> Mart frente a intoxicação por paracetamol	32
RESUMO	32
Introdução.....	32
Materiais e Métodos	33
Material botânico.....	33
Preparação do extrato hidroalcoólico da casca de <i>Stryphnodendron rotundifolium</i> Mart.(EHCSR).....	33
Preparo da solução do EHCSR.....	33
Preparo da solução de Paracetamol	34
Animais.....	34
Administração do EHCSR e Paracetamol.....	34
Preparo da amostra sanguínea	34
Testes Bioquímicos	35
Análise estatística.....	35
Resultados e Discussão	35
Considerações Finais	40
Referências	41
4.2 ARTIGO 2: Avaliação da atividade leishmanicida e tripanocida (<i>in vitro</i>) do extrato hidroalcoólico da casca de <i>Stryphnodendron rotundifolium</i> Mart.....	44
RESUMO	44
Introdução.....	44
Materiais e Métodos	46

Material botânico.....	46
Preparação do extrato hidroalcolico da casca de <i>Stryphnodendron rotundifolium</i>	
Mart.(EHCSR).....	46
Preparo da solução do EHCSR.....	46
Obtenção de parasitas e células	47
Avaliação leishmanicida <i>in vitro</i>	47
Avaliação tripanocida <i>in vitro</i>	48
Avaliação de citotoxicidade.....	48
Análise estatística.....	48
Resultados e discussão	48
Considerações Finais	52
Referências	52
7. CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.....	58

1.INTRODUÇÃO

1.2 Anatomia e fisiologia hepática

O fígado representa entre 2% a 5% do peso corporal de um adulto, isto mostra que este é um dos maiores órgãos do corpo, situando-se lateralmente a direita na cavidade abdominal, abaixo do diafragma. Este é dividido em dois lobos, separado por um ligamento falciforme e coberto por uma camada delicada de tecido fibro-conjuntivo, cápsula de Glisson. O apoio sanguíneo é efetuado pelas artérias e veias hepáticas, realizando assim o suporte nutritivo para o órgão, como também promovendo a excreção do mesmo (SHERLOCK; DOOLEY, 2002; DESMET, 2001; ARIAS, 2001).

O fornecimento de sangue para o fígado é feito quase que totalmente pela veia porta, que é responsável por 80%, e também pela artéria hepática, o sangue proveniente deste tem oxigênio, assim este nutre os componentes dos lóbulos hepáticos, já a veia porta, realiza a função de coletar o sangue e redistribuir para o parênquima hepático, este sangue também possui substâncias que derivam da absorção feita pelo sistema digestivo, sendo utilizadas, metabolizadas ou filtradas. A captação venosa é mediada pela veia hepática, que desaguam na veia cava inferior, para posteriormente ser levado ao coração (ARE, et al., 2002; TAKASAKI; HANO, 2001; DESMET, 2001).

Existem algumas descrições importantes quanto a estrutura e função hepática, o lóbulo hepático é uma organização das estruturas vasculares do interior do fígado, tendo uma forma cilíndrica, composto por tratos portais, e arranjado em redor de uma vênula hepática, onde chegam os sinusóides hepáticos. O ácino hepático fundamenta-se no fluxo sanguíneo, este fica localizado entre os lóbulos hepáticos adjacentes, a zona acinar 1 é composta por hepatócitos que localizam-se ao redor dos vasos terminais aferentes, acompanhados dos hepatócitos intermediários, zona acinar 2, e os que estiverem mais distantes dos vasos e mais próximo da veia central são a zona acinar 3, desta maneira se demonstra a multifuncionalidade do fígado já que cada zona realiza funções diferentes (SHERLOCK & DOOLEY, 2002; DESMET, 2001).

1.3 Danos hepáticos: Agentes agressores

O fígado pode sofrer ao longo do tempo lesões repetitivas, de característica crônica, isto pode resultar em deposição de matriz extra celular por conta do desequilíbrio dos componentes, ocasionando uma fibrose hepática, podendo posteriormente tornar-se uma cirrose hepática (ROJKIND & GREENWEL, 2001).

Diversos componentes são capazes de causar lesão ao fígado, como o paracetamol, que quando ingerido de forma excessiva pode causar uma intoxicação levando até a morte, devido a saturação das enzimas (GAYOTTO & ALVES 2001). O etanol é outro causador de lesões, isto acontece devido a indução de formação de radicais livres, que é o principal responsável pelas lesões hepáticas (PONNAPPA & RUBIN, 2000).

1.3.1 Paracetamol ou Acetaminofeno

O paracetamol é um dos agentes analgésicos e antipiréticos dos mais utilizados, possui atividade anti-inflamatória pouco eficiente. Este é administrado por via oral e é bem absorvido, possui uma meia vida, em doses terapêuticas, de 2 a 4 horas, é excretado pela urina, um dia após sua administração, isto ocorre depois do medicamento ser sulfatado e glicuronizado no fígado, tendo como dose tóxica 4000mg/dia. Quando ocorre o consumo exagerado deste medicamento, ele pode causar danos ao organismo humano, como náuseas, vômitos, em fase inicial, e posteriormente lesão hepática, que pode ser letal (KUGA, 2004).

A intoxicação acontece pois uma pequena quantidade do fármaco sofre N-hidroxilação, formando um composto tóxico, N-acetil-benzoquinoneimina, este liga-se a glutatona e posteriormente é excretado, porém quando as doses são acima do limite, as quantidades de N-acetil-benzoquinoneimina são aumentadas, por conta disto as vias normais de metabolização do paracetamol ficam saturadas, assim o organismo envia mais medicamento para a via alternativa, onde é convertido o composto tóxico, formando mais moléculas deste, de modo que tornam-se prejudicial ao organismo (Figura 1) (LUBEL et al., 2007).

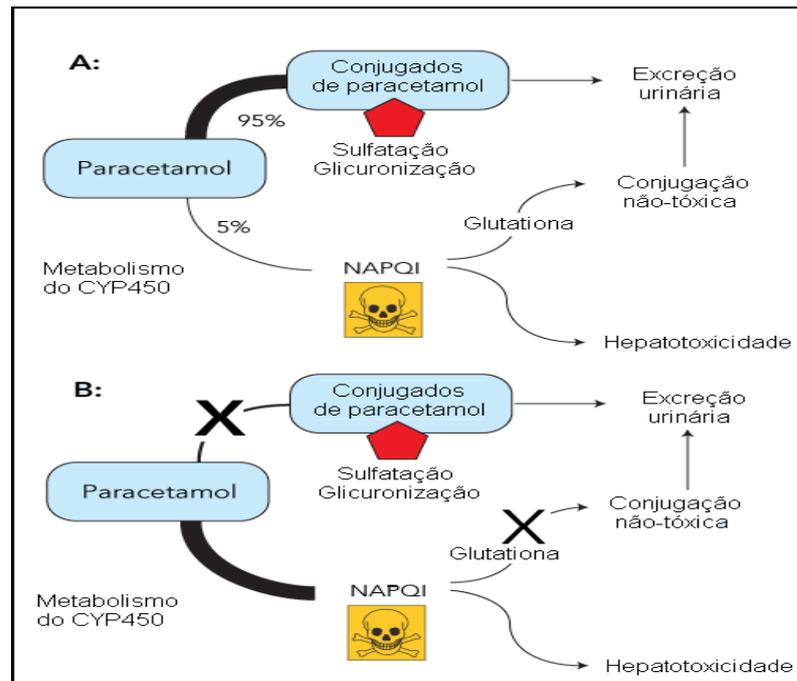


Figura 1: Metabolização do paracetamol. A: Metabolização normal (paracetamol sendo conjugado com glicuronídeo e excretado na urina). Grande parte do remanescente é conjugado com glutatona. B: Casos de superdosagens, conjugação ocorre prejudicada e diminuição de glutatona ocorrendo acúmulo do metabólito hepatotóxico N-acetil-p-benzoquinoneimina. (LUBEL et al., 2007).

A intoxicação começa a se instalar no organismo, a glutatona hepática se esgota, as proteínas aumentam impedindo o fluxo de cálcio mitocondrial, causando danos aos hepatócitos, com a produção de citocinas e radicais livres, todo sistema é prejudicado, intensificando a intoxicação, causando apoptose e necrose (HEUBI et al., 1998; RAHMAN ; HODGSON, 2000; LUBEL et al., 2007). Em virtude destes danos observados, as doses tóxicas de paracetamol tem sido usado amplamente como modelo experimental para avaliar a hepatoproteção com outras plantas medicinais. (KUGA, 2004).

1.3.2 Parasitas sanguíneos

1.3.2.1 *Leishmania sp.*

As leishmanioses pertencem a um conjunto de doenças tropicais provocadas por mais de vinte diferentes espécies de protozoários intracelulares correspondente ao gênero *Leishmania*, e atualmente destaca-se por estar entre a sexta endemia prioritária no mundo (MARCHESE, 2009).

Os reservatórios essenciais para os parasitas são animais domésticos e selvagens, vale destacar o cão como um dos principais reservatórios, o que aumenta ainda mais a problemática devido este ser um animal de estimação, assim facilitando a contaminação do

mosquito e posteriormente o homem. A doença é transmitida pela picada de mosquitos, infectados, flebotomíneos do gênero *Lutzomya* durante seu repasto sanguíneo, quando os parasitas são inoculados na epiderme e derme dos seus hospedeiros vertebrados, inclusive o homem (MARCHESE, 2009; BRASIL, 2010).

Os agentes causadores dessa enfermidade são parasitas unicelulares heteroxênicos que apresentam duas formas conformacionais no seu ciclo de vida: promastigota e amastigota (Figura 2) (MICHALICK et al., 2005). As formas promastigotas correspondem-se por serem fusiformes e com flagelo alongado, são estruturas extracelulares e habitam o trato digestivo do inseto vetor. As formas amastigotas têm aparência arredondada e com flagelo curto que não se exterioriza, são estruturas intracelulares obrigatórias e parasitam principalmente macrófagos do hospedeiro vertebrado (NAKAMURA *et al.*, 2006).

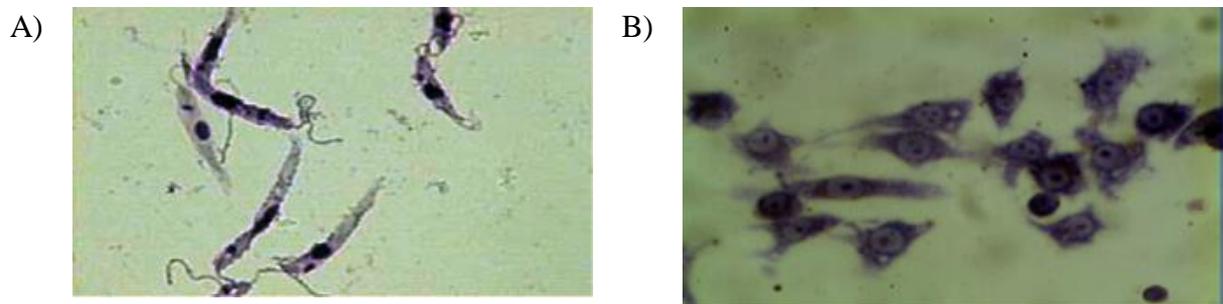


Figura 2: A) Forma Promastigota de *Leishmania sp*; B) Forma Amastigota de *Leishmania sp*.

A Leishmaniose Tegumentar Americana encontra-se quase que na totalidade do Brasil, e esta possui 3 formas clínicas, cutânea, mucocutânea e cutânea difusa. A forma cutânea difusa é uma diferenciação da cutânea, onde ocorre o aparecimento de lesão não ulcerativa e encontra-se presente mais facilmente em pacientes imunocomprometidos, a mucocutânea caracteriza-se por lesões que destroem as cartilagem e mucosas. A leishmaniose visceral é considerada a mais grave e tem como sintomatologia hepatoesplenomegalia, pancitopenia, e dependendo da evolução da doença pode levar a morte. A Leishmaniose mucocutânea é causada principalmente por *L. brasiliensis*, enquanto que a Leishmaniose visceral, o Calazar, é causado por *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi* (GENARO e REIS, 2005; SIMÕES- MATTOS et al., 2002; ALEIXO et al., 2006).

As características do fígado acometido pelas formas amastigotas desta patologia são geralmente à formação de granulomas nos sinusóides, intravasculares e centrolobular do parênquima hepático (GIUNCHETTI et al., 2008). Há também infiltrado portal, na cápsula hepática. Os fagócitos podem exibir parasitas no seu interior. Fibrose hepática pode ocorrer

em hospedeiros definitivos, como cães e humanos (TAFURI et al., 2004, RALLIS et al., 2005, GIUNCHETTI et al., 2008, MELO et al., 2008).

Não há vacinas disponíveis no mercado para a doença e os fármacos de primeira escolha, os antimoniais pentavalentes, produzidos por volta da década de 60, são tóxicos e administrados exclusivamente por via parenteral além de possuírem diversos efeitos (ROCHA et al., 2005). Atualmente novos fármacos foram desenvolvidos para o tratamento, porém estes possuem alta toxicidade assim como os anteriores, causando possíveis efeitos tóxicos em todo organismo. Não existe também tratamento eficaz para o cão assim impedindo um controle rigoroso da patologia, já que este é o principal responsável pela contaminação dos mosquitos. Com isso percebe-se que há uma urgência em encontrar novas alternativas ao tratamento, como o uso de fitoterápicos (PAULA et al., 2003, SIDERMAN et al., 2004; NAKAMURA et al., 2006).

1.3.2.2 *Trypanosoma cruzi*

A doença de chagas é assim descrita pois esta foi a observada primariamente por Carlos Chagas, é causada por um protozoário hemoflagelado, *Trypanosoma cruzi*. Assim como a leishmania, esta representa um problema de saúde pública, por causar a morte de milhares de pessoas por ano (TEMPONE et al., 2007; WHO, 2002).

O ciclo biológico do parasita é complexo, possui três formas, tripomastigota, epimastigota e amastigota (Figura 3), tendo como vetores os triatomíneos e como reservatórios os mamíferos, sejam silvestres ou domésticos. A transmissão ocorre durante a hematofagia, quando o triatomíneo infectado, realiza a penetração da pele, com intuito de alimentar-se, e durante esse ato, o mesmo deixa urina ou fezes, que estão contaminadas com tripomastigotas metacíclicas e infectam o hospedeiro. Estes infectam as células do organismo, onde ocorre a multiplicação intracelular na forma amastigota (BRENER, 2000).

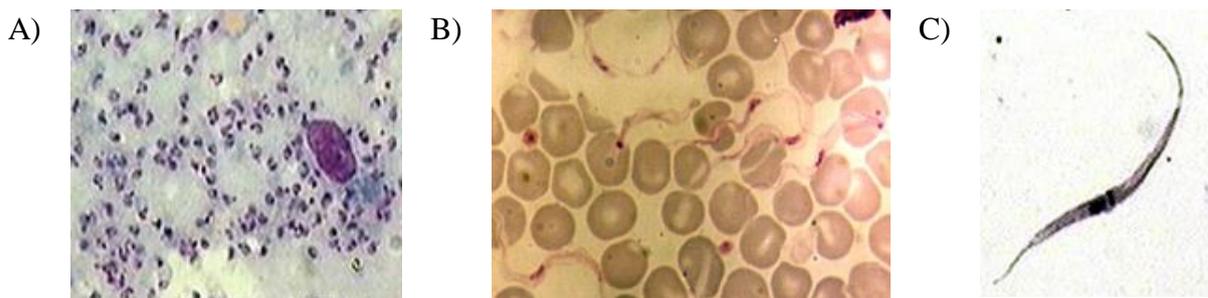


Figura 3: A: Forma amastigota do *T. cruzi*.; B: Forma tripomastigota do *T. cruzi*; C: Forma epimastigota do *T. cruzi*.

Na fase aguda da doença as manifestações clínicas são variadas, dentre elas febre, dor muscular, irritabilidade, conjuntivite, anorexia, vômitos, diarreia, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, miocardite, anemia, trombocitopenia, leucocitose com predominância de linfócitos, funcionamento anormal do fígado e níveis elevados de enzimas cardíacas. Quando a doença se torna crônica os sintomas tornam-se mais específicos, mostrando problemas cardíacos graves, como arritmias, fibrose, aumento do órgão, esses danos são irreversíveis (BRASIL, 2005).

Os fármacos utilizados na doença de chagas possuem efeitos colaterais bem significativos, além disto estes possuem uma eficiência maior na fase aguda da doença, dificilmente conseguindo tratar com eficácia pacientes crônicos (SANTORO et al., 2007). Por conta destes fatores verifica-se a importância de se desenvolverem novos fármacos, principalmente os derivados de plantas medicinais, por conta da ampla variedade destas e pelo acesso facilitado a pessoas de poder aquisitivo menor (CARVALHO ; RODRIGUES, 2001).

1.5 Plantas com atividade hepatoprotetora

Várias plantas são usadas na medicina popular como hepatoprotetoras devido às desordens hepáticas representarem um importante problema na saúde mundial. O fígado possui um papel essencial para a manutenção do equilíbrio biológico dos vertebrados, daí ser considerado um órgão essencial. Das funções as quais ele executa destaca-se: metabolismo dos lipídeos, o metabolismo de produtos químicos (xenobióticos) ao qual o órgão é exposto direta ou indiretamente; coagulação sanguínea e imunomodulação, além do metabolismo dos carboidratos e das proteínas (RAJESH & LATHA, 2004).

Para o tratamento das hepatopatias utilizam-se drogas sintéticas, ou seja, convencionais, no entanto essas drogas podem trazer efeitos adversos, por exemplo, a hepatotoxicidade aguda. Assim, medicamentos de origem vegetal e animal têm sido usados no tratamento de doenças hepatobiliares, e os estudos recentes, provam ser benéficos (AKTAY et al., 2000; RAJESH & LATHA, 2004).

Neste sentido, o uso de plantas medicinais com efeito hepatoprotetor, pode ser uma alternativa com menos efeitos colaterais. Diversos estudos mostram que extratos de plantas ou suas frações podem desempenhar uma significativa proteção da função hepática. O extrato hexânico das folhas de *Momordica charantia* L. demonstrou um melhor desempenho protetor no modelo in vivo de lesão hepática quando comparado ao extrato etanólico (PEREIRA, 2006). Este desempenho protetor foi possivelmente associado ao seu potencial antioxidante

(PEREIRA et al., 2010). O extrato bruto de *Bignomia taira* apresentou efeito protetor em lesões hepáticas induzida por CCl₄ que pode ser comprovado por em estudos histopatológico do fígado (FIGUEIREDO et al., 1997).

Outras plantas também já tiveram seu efeito hepatoprotetor descrito, animais pré-tratamento durante quatro dias com o extrato da *Curcuma Zedoaria* diminuíram os danos hepáticos quando submetidos à lesão hepática com doses tóxicas de paracetamol (KUGA, 2004). Estudos relataram que os metabólitos secundários podem ser relacionado com atividade hepatoprotetora, como, por exemplo a silmarina um flavonoides (PRADHAN & GIRISH, 2013), terpenos (MUKAZAYIRE et al., 2011), alcaloides (SHUKLA & BIGONIYA, 2013). Plantas, como *Amaranthus spinosus*, já tiveram atividades antiprotozoárias e hepatoprotetoras descritas (JHADE et al., 2009). Porém outras, possuem atividade antiparasitária bem evidente (SULSEN et al., 2007). Estudos destacam o uso da quercetina como potencial antimicrobiano e agente anti-inflamatório para o tratamento da Tripanossomíase (MATSUDA et al., 2004).

1.6 Gênero *Stryphnodendron*

A família botânica Leguminosae é uma das mais amplas, e apresenta-se dividida em 3 subfamília: Faboideae, Caesalpinioideae e Mimosoideae (WATSON ; DALLWITZ, 1992). O gênero *Stryphnodendron*, pertence à família Leguminosae e subfamília Mimosoideae, que possui aproximadamente 64 gêneros, este é conhecido popularmente como barbatimão, barba-de-timão, charãozinho-roxo, casca-da-virgindade, casca-da-mocidade, barbatimão-vermelho, uabatimô, paricarana, abaramotemo e ibatimô (LORENZI, 2000; DI STASI ; HIRUMA-LIMA., 2002).

O barbatimão é uma árvore, de copa alongada, de 4 a 5 m de altura, de flores pequenas, amareladas, e frutos de vagens cilíndricas, de 6-9 cm de comprimento, com muitas sementes de cor parda, suas cascas possuem aberturas, e estas são uma fonte rica de taninos, composto majoritário nesse gênero, devido a isto a mesma é amplamente utilizada na medicina popular (LORENZI, 2000; LORENZI ; MATOS, 2002; ALMEIDA et al., 1998; CRUZ, 1985; NUNES et al., 2003).

Muitas espécies de *Stryphnodendron* já foram avaliadas, dentre seus componentes foram analisados cascas, folhas e sementes e verificou-se a presença de vários compostos dentre eles flavonóides (PEREIRA, ANDRADE; PILÓ-VELOSO, 2002), galactomananas (REICHER *et al.*, 1992) e principalmente os taninos, que é o composto majoritário desta. Seu

uso terapêutico é amplo e diversificado, dentre eles atividade antiinflamatória, anti-séptica, adstringente, anti-hipertensiva, antidiabética, contra hemorragias vaginais, cicatrizante, bactericida, usado no tratamento de infecções da pele, gonorreia, leucorreia, hérnia, feridas hemorrágicas, diarreias, gastrite, dores de garganta, hemorroidas, conjuntivite, demonstrando assim que em sua maioria a atividade cicatrizante e antiinflamatória que encontra-se presente (COUTINHO et al., 2004; CAMARGO,1985; SANCHES et al., 2005; LOPES et al., 2008).

Os estudos com a casca do barbatimão, vem demonstrando várias atividades como cicatrizante, antioxidante (LOPES et al., 2005), antiinflamatória (LIMA, MARTINS; SOUZA,1998) e anti-microbiana (BERSANI-AMADO et al., 1996; LOPES et al., 2003; SANCHES et al., 2005), cicatrizante de feridas cutâneas (COELHO et al, 2010), bactericida, especificamente frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (FERREIRA et al, 2010), tripanocida (HERZOG-SOARES et al., 2006).

Em estudos mais recentes, realizados na Universidade Regional do Cariri (URCA), verificou-se através da prospecção fitoquímica do extrato da casca de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart. a presença de taninos pirogálicos, flavonas, flavonóis, flavononóis, xantonas, chalconas, flavononas e esteróides (OLIVEIRA, 2010).

Neste mesmo estudo observou-se que o uso popular desta espécie na região do Cariri é bem amplo, por ser endêmica da Chapada do Araripe. A população local faz uso corriqueiro da casca desta planta para as mais diversas enfermidades como para ferimentos, inflamações, gastrite, inflamação vaginal e infecções (OLIVEIRA, 2010).

Relacionado especificamente com esta espécie foram encontrados raros estudos, onde foi verificado atividade antibacteriana e antifúngica (RODRIGUES et al, 2008), antioxidante (COSTA et al, 2012) e efeito antibiótico sinérgico (OLIVEIRA et al, 2011).

A grande utilização da população em conjunto com o conhecimento científico sobre este gênero *Stryphnodendron*, mostra o quão importante é realizar testes adicionais sobre esta espécie, *Stryphnodendron rotundifolium* Mart., tão pouco estudada até o momento.

A realização dos testes para verificar a atividade hepática de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart. é de suma importância, pois a população ingere chás feito da casca desta árvore, e ainda não foi esclarecido se este ato realmente auxilia o paciente contra alguma patologia ou não, de tal forma que os teste *in vivo* se tornam indispensáveis para análise dessa questão.

A procura por novos medicamentos é incansável, sempre tentando auxiliar no tratamento ou minimizar efeitos adversos dos fármacos já existentes, afim de buscar outra alternativa para doenças como leishmaniose e doença de chagas, a espécie *Stryphnodendron*

rotundifolium Mart. foi escolhida por conta de seus metabólitos secundários. As patologias referidas tem como uma das suas sintomatologias clínicas o dano hepático, então com a realização destes testes será permitido verificar como a planta se comporta *in vitro* contra os parasitas, e ainda demonstrar se *in vivo* a utilização da mesma auxiliará ou não o dano no fígado causado pelos parasitas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar a efeito hepático e das atividades citoprotetora, leishmanicida e tripanocida do extrato hidroalcólico da casca de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a influência do extrato sobre a função hepática através de parâmetros bioquímicos;
- Verificar a influência do extrato frente a uma intoxicação hepática por paracetamol através de parâmetros bioquímicos;
- Verificar a atividade anti- leishmania *in vitro*, determinando o percentual de parasitas mortos frente a diferentes concentrações do extrato;
- Verificar a atividade tripanocida *in vitro*, determinando o percentual de parasitas mortos frente a diferentes concentrações do extrato;
- Verificar a citotoxicidade *in vitro*, frente a diferentes concentrações do extrato;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O material vegetal de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart. foi coletado no município de Crato-Ceará-Brasil, em março de 2011. A exsicata da espécie encontra-se depositada no Herbário Dárdaro de Andrade Lima-URCA sob número 4661.

3.2 Extração

O material vegetal (cascas secas de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart.) foi submetido à extração a frio com água e etanol a 99,99% na proporção de 1:1, sendo que o solvente etanólico foi removido através do evaporizador rotatório, obtendo-se um extrato bruto a partir da utilização do liofilizador (Figura 4). Extrato fornecido por Oliveira (2010), onde o mesmo realizou a prospecção fitoquímica (Tabela 1) e identificação botânica.

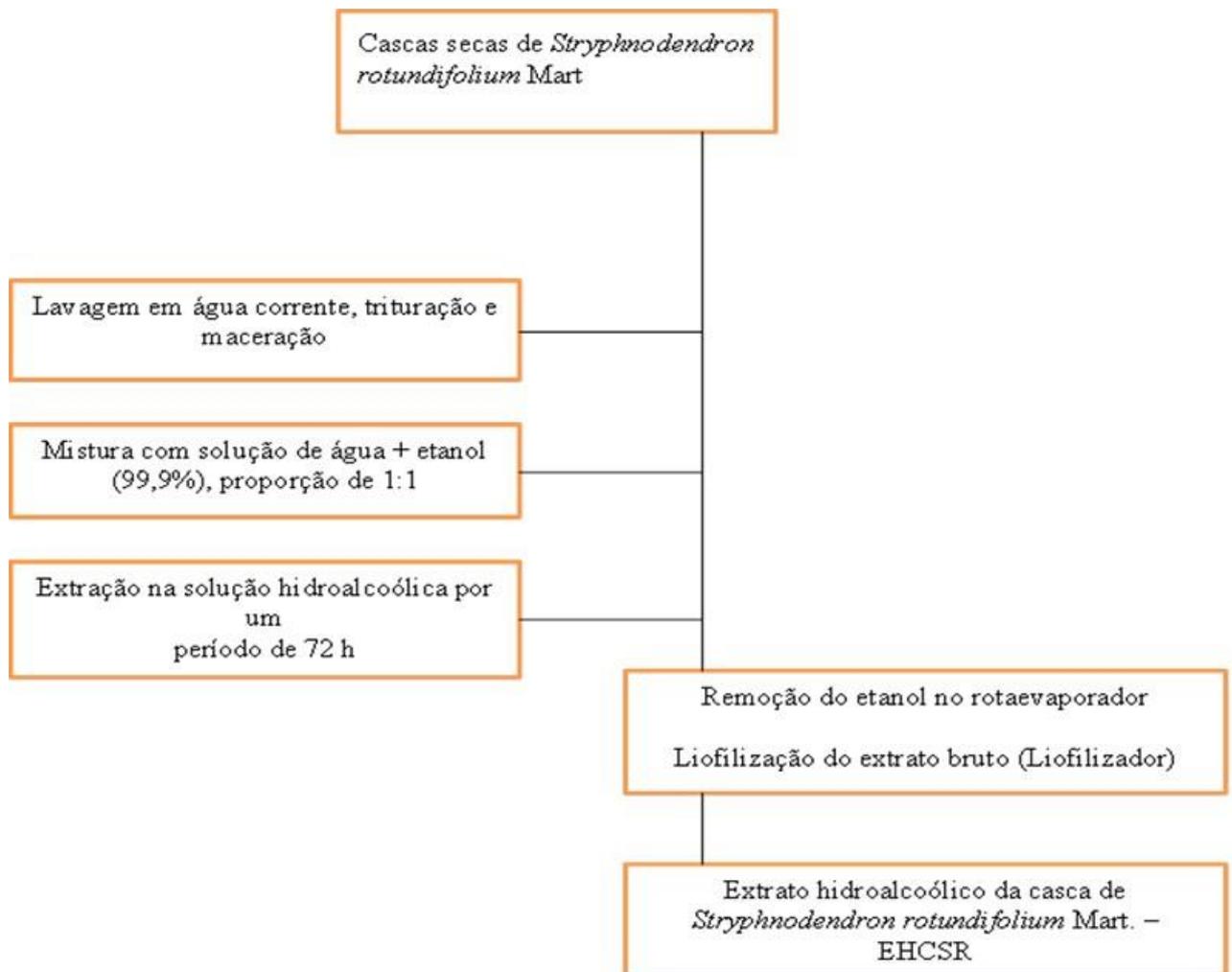


Figura 4: Extração da casca de *Stryphnodendron rotundifolium*, para obtenção do extrato hidroalcoólico da casca de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart. (EHCSR)

Tabela 1: Prospecção Fitoquímica qualitativa do Extrato Hidroalcoólico da casca de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart. – EHCSR. (OLIVEIRA et al 2011)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
EHCSR	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+

1 – Fenóis; 2 – Taninos Pirogálicos; 3 – Taninos Flobatênicos; 4 – Antocianinas; 5 – Antocianidinas; 6 – Flavonas; 7 – Flavonóis; 8 – Xantonas; 9 – Chauconas; 10 – Auronas; 11 – Flavononóis; 12 – Leucoantocianidinas; 13 – Catequinas; 14 – Flavononas; 15 – Alcalóides; 16 – Terpenos; 17 – Esteróides; (+) presença; (-) ausência.

3.3 Atividade Hepatoprotetora

3.3.1 Preparo do extrato e do paracetamol para administração dos animais

Amostras do extrato de *S. rotundifolium* Mart. foram diluídas em água destilada para atingirem a dose de 200mg/Kg e 400mg/Kg, administrado via oral. O paracetamol foi diluído em água destilada para uma dose de 750mg/Kg e administrado via oral.

3.3.2 Animais

Os animais utilizados nos testes foram fêmeas de ratos da raça wister pesando - 200g (+/- 50g) cada animal, acondicionados no biotério da URCA, em ciclos de claro e escuro a cada 12hrs, com água e comida liberadas. Foram utilizados 36 animais, divididos em 6 grupos. Quatro horas antes da administração do extrato e do paracetamol eram retiradas as rações, e 12 horas antes do sacrificio.

3.3.3 Grupos de administração do extrato *S. rotundifolium* Mart e paracetamol 750mg/Kg.

Foram realizadas as administrações durante 14 dias alternados, O extrato de *S. rotundifolium* Mart foi administrado via oral nas doses de 200mg/Kg e 400mg/Kg nos grupos 2,3,4 e 5. O paracetamol previamente diluído em água destilada (750mg/Kg) foi administrado via oral nos grupos 4,5 e 6 conforme observado na Tabela 2. Ao final dos 14 dias os animais foram eutanasiados para a retirada do sangue, através de uma punção na artéria aorta, para posterior análise dos parâmetros bioquímicos. Foi utilizado Quetamina e xilasina, para anestésiar os animais antes da abertura frontal, através de um corte torácico, onde através deste vou puncionada a artéria aorta e coletado o sangue para análise.

Tabela 2: Distribuição dos grupos de animais utilizado no ensaio de hepatoproteção

Grupos	Administração por via oral
Grupo 1	Controle Negativo
Grupo 2	Extrato 200mg/Kg
Grupo 3	Extrato 400mg/Kg
Grupo 4	Extrato 200mg/Kg + paracetamol 750mg/Kg
Grupo 5	Extrato 400mg/Kg + paracetamol 750mg/Kg
Grupo 6	Paracetamol 750mg/Kg

3.3.4 Preparo da amostra sanguínea

Após a retirada do sangue dos animais o mesmo foi dividido em tubo de ensaio contendo gel separador para obtenção do soro. As amostras foram levadas a centrifugação de 3500 rpm por 15 min, para obtenção da amostra. Posteriormente estas foram acondicionadas em caixas térmicas, onde foram levadas ao Laboratório Escola de Análises Clínicas da Faculdade Leão Sampaio para realização dos testes bioquímicos.

3.3.5 Testes Bioquímicos

Foram realizados os seguintes testes bioquímicos: Aspartato Aminotransferase (AST), Alanina Aminotransferase (ALT), Albumina, Proteínas Totais, gama- glutamiltransferase (Gama-GT), fosfatase alcalina. Estes foram realizados segundo a descrição do fabricante dos testes, seguindo rigorosamente cada instrução dada, após o preparo das amostras estes foram lidos no Bioplus 200, a fim de obter os resultados. Todos os reagentes utilizados foram do fornecedor LabTest. Todos os testes foram realizados em triplicata, a fim de minimizar os possíveis interferentes no momento da execução dos procedimentos.

3.4 Avaliação da atividade leishmanicida e tripanocida do extrato *Stryphnodendron rotundifolium* Mart.

3.4.1 Obtenção de parasitas e células

Neste estudo, foram utilizadas formas epimastigotas de cultura sanguíneas de *T. cruzi* e promastigotas de *L. brasiliensis* e *L. infantum*. As Epimastigotas foram obtidas na fase exponencial de crescimento em meio Liver Infusion Tryptose (LIT) foram lavados 2 vezes em PBS estéril pH 7,2 a 1500rpm por 10 minutos a 4°C, e o número de parasitos foi determinado em câmara de Neubauer. A seguir, os parasitos foram suspensos em meio LIT acrescido de

10% de Soro Bovino Fetal (SBF) (inativado a 56°C), e a concentração ajustada para 5×10^6 epimastigotas/mL, sendo mantidos a 4°C até o uso.

As Promastigotas de *L. brasiliensis* e *L. infantum*, foram obtidos na fase exponencial de crescimento em meio Schneider suplementado com 5% de SBF e 2% de urina, foram lavados 2 vezes em PBS estéril pH 7,2 a 1500rpm por 10 minutos a 4°C, e o número de parasitas foi determinado em câmara de Neubauer. A seguir, os parasitas foram suspensos em meio Schneider acrescido de 5% de SBF e 2% de urina, e a concentração ajustada para 5×10^6 promastigotas/mL, sendo mantidos a 4°C até o uso.

Os fibroblastos foram cultivados em Minimal Essential Medium (MEM). Este foi suplementado com 10% de SFB inativada por calor, penicilina G (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL). As culturas foram mantidas a 37° C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ até uso.

3.4.2 Avaliação leishmanicida *in vitro*

Para a avaliação da atividade leishmanicida contra forma promastigotas do extrato, foram realizados ensaios em triplicatas em placas de culturas de 96 poços, contendo 20µl do EHCSR em concentrações em ordem decrescente, diluídas em PBS estéril pH 7,2, acrescido de 180 µl da suspensão de promastigotas. Como controle, os parasitas foram incubados na ausência de compostos, e na presença de 100µg/ml de Pentamidina. Após adição dos produtos naturais, as amostras foram homogeneizadas e incubadas à 24°C por 72 horas e, a seguir, as placas avaliadas visualmente em microscópio para verificação da motilidade dos parasitos. Os resultados foram expressos em %. Os ensaios foram repetidos 3 vezes com o objetivo de de avaliar a manutenção da atividade do EHCSR e a reprodutibilidade dos resultados. Como droga de referência foi utilizada a Pentamidina.

3.4.3 Avaliação tripanocida *in vitro*

No teste tripanocida, contra formas epimastigotas, foram realizados em triplicatas em placas de culturas de 96, contendo 20µl do EHCSR em concentrações em ordem decrescente, diluídas em PBS estéril pH 7,2, acrescido de 180 µl da suspensão de epimastigotas. Como controle, os parasitos foram incubados na ausência de compostos, e na presença de 100µg/ml de Nifurtimox. Após adição do EHCSR, as amostras foram homogeneizadas e incubadas à 24°C por 72 horas e, a seguir, as placas foram avaliadas visualmente em microscópio para verificação da motilidade dos parasitas. A atividade foi determinada por contagem em câmara de Neubauer e posterior avaliação estatística. Os resultados foram expressos em %. Os

ensaios foram repetidos 3 vezes com o objetivo de avaliar a manutenção da atividade dos produtos naturais e a reprodutibilidade dos resultados.

3.4.4 Avaliação de citotoxicidade

Fibroblastos foram aderidos em placas de microdiluição de 96 poços a uma concentração final de 3×10^4 células/cavidade. Estas foram incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO_2 . Posteriormente, o meio MEM foi removido e o EHCSR foi adicionado a $200\mu\text{L}$, incubado por mais 24h. Após esta incubação, $20\mu\text{L}$ de uma solução de Resazurina 2mM foi adicionada em cada cavidade. As placas foram incubadas por 3h e a redução da resazurina foi determinada através de dupla absorbância nos comprimentos de onda de 490 e 595 nm. O valor do controle (branco) foi subtraído. Cada concentração foi testada em triplicata.

3.4.5 Análise estatística

Os resultados dos testes foram feitos em triplicata e expressos como média geométrica. A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância de uma via (ANOVA). Os resultados foram analisados pelo programa *GraphPad Prism* versão 6.0, submetido a ANOVA de uma via e posteriormente a *tukey* de múltipla comparação entre os testes. Com significância de $P < 0,05$. Os resultados foram expressos como concentração inibitória do crescimento parasitário (CI_{50}), calculados por regressão linear.

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

Diante dos objetivos propostos, os resultados e discussão desta dissertação foram compilados no formato de dois artigos originais. Através deste estudo procurou-se demonstrar a influência do EHCSR sobre a função hepática e sua capacidade de proteção em modelos de injúrias hepáticas. Também procurou avaliar o potencial antiparasitário do EHCSR contra leishmaniose e doença de chagas, bem como, determinar seu potencial citotóxico.

A ampla utilização oral desta planta, *Stryphnodendron rotundifolium* Mart., por parte de moradores da região do Cariri, deve ser levada em conta como relevância para esta pesquisa, ao invés destes estarem tratando alguma doença podem estar agravando o quadro clínico ou desenvolvendo outra patologia, por este motivo o estudo é um alerta para utilização de plantas medicinais sem estudos comprovados a seu respeito.

4.1 Artigo 1: Avaliação da atividade hepática (*in vivo*) do extrato hidroalcoólico da casca de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart frente a intoxicação por paracetamol

RESUMO

Stryphnodendron rotundifolium Mart é uma planta endêmica da Chapada do Araripe e vem sendo utilizada pela população da região para tratar diversas patologias, como ferimentos e inflamações. Seu potencial terapêutico é alvo de pesquisadores da região, onde já se verificou atividade antimicrobiana, moduladora e antioxidante. Como doenças hepáticas causam problemas graves no organismo e é uma problemática de saúde pública viu-se a necessidade de verificar a atividade hepática do extrato hidroalcoólico da casca de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart (EHCSR) frente a intoxicação por paracetamol. Utilizou-se 36 animais da raça wister divididos em 6 grupos onde foi administrado, durante 14 dias alternados, paracetamol (750mg/Kg), isolado ou associado ao EHCSR nas doses de 200 e 400 mg/Kg, e um grupo que foi administrado solução salina (controle negativo). Posteriormente houve a eutanásia dos animais, por exsanguinação, através de punção cardíaca sob anestesia, para colheita de sangue, afim de serem determinados os parâmetros bioquímicos: Aspartato Aminotransferase (AST/TGO), Alanina Aminotransferase (ALT/TGP), Albumina, Proteínas Totais, gama- glutamiltransferase (Gama – GT), fosfatase alcalina. Após realizada essas dosagens verificou-se que as transaminases ALT e AST, quando apenas utilizando administração do EHCSR 400mg/Kg encontrava-se alteradas em relação ao controle negativo, assim como a gama-GT e a fosfatase alcalina sendo evidenciando um dano hepático inicial, pois estes marcadores são utilizados para verificar danos no fígado. Albumina e Proteínas Totais, apresentaram dosagens aumentadas, porem para se verificar lesão hepática estas deveriam estar diminuídas assim como foi verificado na dosagem do controle positivo (Paracetamol). Com os achados pode-se verificar o início de uma lesão já que o processo foi realizado de forma aguda, durante 14 dias, é de suma importância esse achado pois alerta a população da região do Cariri ao uso desta planta, quando ingerida, podendo esta não ser útil em tratamentos sistêmicos, devido a toxicidade hepática em potencial.

Palavras- chave: *Stryphnodendron rotundifolium* Mart, toxicidade, hepática, paracetamol

Introdução

Stryphnodendron rotundifolium Mart. é uma árvore endêmica da Chapada do Araripe, amplamente utilizada pela população dessa região para combater as mais diversas enfermidades, dentre elas ferimentos, inflamações e gastrite (OLIVEIRA et al, 2010). O gênero *Stryphnodendron* vem sendo estudado devido as atividades atribuídas a estes, como: cicatrizante, antioxidante (LOPES et al., 2005), antiinflamatória (LIMA, MARTINS & SOUZA,1998) e anti-microbiana (BERSANI-AMADO et al., 1996; LOPES et al., 2003; SANCHES et al., 2005). Por conta disto a espécie citada tornou-se alvo de estudos na região do cariri, com isso algumas atividades e compostos metabólicos desta planta já foram verificados, como atividade antibacteriana e antifúngica (RODRIGUES et al, 2008), antioxidante (COSTA et al, 2012) e efeito antibiótico sinérgico (OLIVEIRA et al, 2011), e seus metabólitos secundários, taninos pirogálicos, flavonas, flavonóis, flavononóis, xantonas,

chalconas, flavononas e esteroides, que encontram-se presente no extrato bruto da casca de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart.(OLIVEIRA, 2010).

As doenças hepáticas são uma problemática de saúde, pois que o fígado é um dos maiores órgãos do corpo e responsável por diversas atividades metabólicas do organismo (SRISVASTAVA & SHIVANANDAPPA, 2006), existem vários agressores do sistema hepático, dentre eles medicamentos, álcool, microrganismos, agentes tóxicos como Tetracloreto de carbono dentre outros.

Devido a isto viu-se a necessidade de verificar a atividade hepática (*in vivo*) do extrato hidroalcolólico da casca de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart, frente a intoxicação por paracetamol e tetracloreto de carbono, afim de demonstrar a capacidade do extrato em proteger o fígado desses agentes.

Materiais e Métodos

Material botânico

O material vegetal de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart. foi coletado no município de Crato-Ceará-Brasil, em março de 2011. A exsicata da espécie encontra-se depositada no Herbário Dárdaro de Andrade Lima-URCA sob número 4661.

Preparação do extrato hidroalcolólico da casca de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart.(EHCSR)

O material vegetal (cascas secas de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart.) foi submetido à extração a frio com água e etanol a 99,99% na proporção de 1:1, sendo que o solvente etanólico foi removido através do evaporizador rotatório, obtendo-se um extrato bruto a partir da utilização do liofilizador.

Preparo da solução do EHCSR

Foram preparadas duas soluções diferentes do EHCSR, uma dose de 200mg/Kg e outra de 400mg/Kg, onde foram diluídas com água destilada ate atingirem essa concentração. Posteriormente foram administradas via oral nos animais dos grupos respectivos.

Preparo da solução de Paracetamol

O paracetamol foi diluído em água destilada para uma dose de 750mg/Kg e administrado via oral.

Animais

Os animais utilizados nos testes foram fêmeas de ratos da raça wister pesando - 200g \pm 50g cada animal, acondicionados no biotério da URCA, em ciclos de claro e escuro a cada 12hrs, com água e comida liberadas. Foram utilizados 36 animas, divididos em 6 grupos, como mostra a tabela 1. Quatro horas antes da administração do EHCSR e do paracetamol eram retiradas as rações, e 12 horas antes do sacrificio.

Administração do EHCSR e Paracetamol

Foram realizadas as administrações da seguinte forma, durante 14 dias alternados, O extrato de *S. rotundifolium* Mart foi administrado via oral nas doses de 200mg/Kg e 400mg/Kg nos grupos 2,3,4 e 5. O paracetamol previamente diluído em água destilada (750mg/Kg) foi administrado via oral nos grupos 4,5 e 6 conforme observado na Tabela 1. Ao final dos 14 dias os animais foram eutanasiados para a retirada do sangue, através de uma punção na artéria aorta, para posterior análise dos parâmetros bioquímicos. Foi utilizado Quetamina e xilasina, para anestésiar os animais antes da abertura frontal, através de um corte torácico, onde através deste vou puncionada a artéria aorta e coletado o sangue para análise.

Tabela 1: Divisão dos grupos quanto a solução administrada.

Grupos	Administração por via oral
Grupo 1	Controle Negativo
Grupo 2	Extrato 200mg/Kg
Grupo 3	Extrato 400mg/Kg
Grupo 4	Extrato 200mg/Kg + paracetamol 750mg/Kg
Grupo 5	Extrato 400mg/Kg + paracetamol 750mg/Kg
Grupo 6	Paracetamol 750mg/Kg

Preparo da amostra sanguínea

Após a retirada do sangue dos animais o mesmo foi colocado em tubo de ensaio, contendo gel separador para obtenção do soro. As amostras foram levadas a centrifugação de 3500 rpm por 15 min, para obtenção da amostra necessária para realização dos testes bioquímicos. Posteriormente as amostras foram acondicionadas em caixas térmicas, e levadas

ao Laboratório Escola de Análises Clínicas da Faculdade Leão Sampaio para realização dos teste bioquímicos.

Testes Bioquímicos

Foram realizados os seguintes testes bioquímicos: Aspartato Aminotransferase (AST/TGO), Alanina Aminotransferase (ALT/TGP), Albumina, Proteínas Totais, gama-glutamiltransferase (Gama – GT), fosfatase alcalina. Estes foram realizados segundo a descrição do fabricante dos testes, seguindo rigorosamente cada instrução dada, após o preparo das amostras estes foram lidos no Bioplus 200, a fim de obter os resultados. Todos os reagentes utilizados foram do fornecedor LabTest. Todos os demais ensaios foram realizados em triplicata.

Análise estatística

Os resultados dos testes foram feitos em triplicata e expressos como média geométrica. A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância de uma via (ANOVA). Os resultados foram analisados pelo programa *GraphPad Prism* versão 6.0, submetido a ANOVA de uma via e posteriormente a *tukey* de múltipla comparação entre os testes. Com significância de $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Na figura 1 estão representadas as enzimas hepáticas AST e ALT, respectivamente, obteve-se como valor de referência o grupo controle negativo, onde foi administrado apenas solução salina, para comparativo entre os outros grupos. Os valores dosados para AST foram: Controle negativo (Salina), 74,50 ($\pm 1,24$), controle positivo (Paracetamol), 110,20 ($\pm 2,15$), EHCSR 200mg/Kg, 147,70 ($\pm 1,41$), EHCSR 400mg/Kg, 132,60 ($\pm 1,11$), EHCSR 200mg/Kg + paracetamol, 101,20 ($\pm 1,22$), EHCSR 400mg/Kg + paracetamol, 119,20 ($\pm 0,60$). Já para ALT foram: Controle negativo (Salina), 35,85 ($\pm 1,24$), controle positivo (Paracetamol), 47,37 ($\pm 0,39$), EHCSR 200mg/Kg, 38,00 ($\pm 0,40$), EHCSR 400mg/Kg, 39,82 ($\pm 0,44$), EHCSR 200mg/Kg + paracetamol, 41,51 ($\pm 0,64$), EHCSR 400mg/Kg + paracetamol, 50,70 ($\pm 0,54$).

O controle positivo, onde foi administrado paracetamol encontra-se significativamente aumentando, o que demonstra um aumento destas enzimas. Nos grupos com administração somente do EHCSR é visto que as dosagens de AST está aumentada nas duas doses, 200 e 400mg/Kg, já as dosagens de ALT, a concentração de EHCSR 200mg/Kg não obteve um

aumento significativo. Quando associados o agente agressor (Paracetamol) e o EHCSR, as transaminases tiveram aumento significativos nos dois grupos veja a Figura 1.

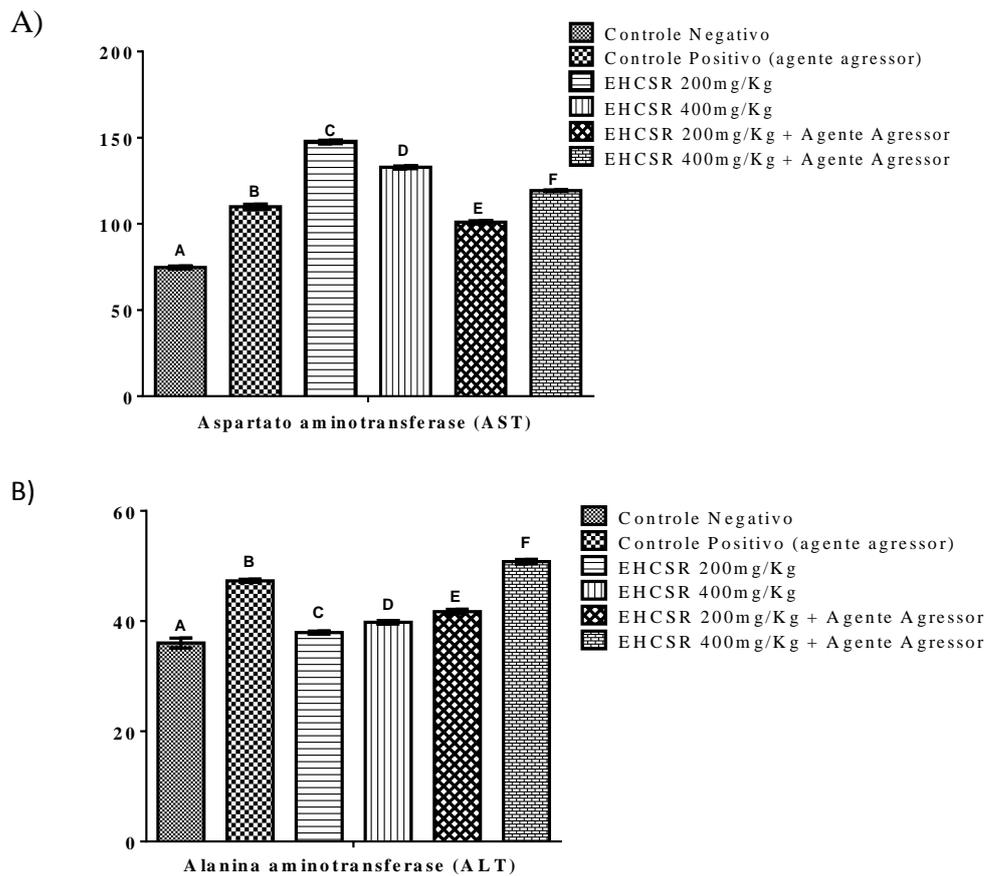


Figura 1: A) Resultado da dosagem Aspartato Aminotransferase (TGO/AST) e B) Alanina Aminotransferase (ALT/TGP). Amostra de soro de ratos, onde foram administrados paracetamol e EHCSR em duas dosagens, onde a significância entre os grupos é vista com $p < 0.05$. A coluna A encontra-se significante frente a todas as colunas, assim como a coluna B. Demonstrando que entre os grupos existiu uma significância mutua em relação a todos eles.

A enzima aminotransferases (AST) são divididas em dois grupos Aspartato Aminotransferase (TGO/AST) e B) Alanina Aminotransferase (ALT/TGP), estão presentes em vários tecidos como fígado, rins, coração entre outros. AST está distribuída no organismo, em contrapartida a ALT é mais encontrada no fígado do que em outros tecidos por este motivo é mais específico para lesão hepática (ZAKHARI; LI, 2007; LUCEY et al., 2008). Estas são as primeiras a serem elevadas a níveis séricos, quando ocorre lesão hepática, pois a AST encontra-se no citoplasma e nas mitocôndrias e ALT apenas no citoplasma. Devido a isto inicialmente a AST é mais elevada, pois a meia vida da de origem mitocondrial é maior que as outras, com o dano persistindo a ALT ficará mais elevada e quando ocorre a cronicidade a AST volta a se elevar (GREEN; FLAMM, 2002; GAYOTO; ALVES, 2001).

A lesão induzida apresentou característica de fase aguda e demonstra uma presença maior de AST em todos os grupos. A ALT também encontra-se aumentada mas em menores proporções, o que pode-se demonstrar um início de lesão hepática, pois a ALT é mais específica e não encontrasse tão elevada. Este aumento das transaminases pode indicar uma hepatotoxicidade do EHCSR, pois o mesmo causou aumento destas quando utilizados sozinho, sem o agente agressor, o que pode ser um indicio de uma lesão hepática.

Na Figura 2 mostra a variação dos níveis de Gama-GT e Fosfatase Alcalina, respectivamente, nos grupos administrados com EHCSR e paracetamol, onde vê-se um aumento significativo, em relação ao grupo controle negativo, usado como valor de referência, em relação aos outros grupos. Valores dosados de Gama-GT: Controle negativo (Salina), 1,78 ($\pm 0,09$), controle positivo (Paracetamol), 9,60 ($\pm 0,22$), EHCSR 200mg/Kg, 4,09 ($\pm 0,20$), EHCSR 400mg/Kg, 3,70 ($\pm 0,12$), EHCSR 200mg/Kg + paracetamol, 3,52 ($\pm 0,18$), EHCSR 400mg/Kg + paracetamol, 3,10 ($\pm 0,15$). Valores dosados de Fosfatase alcalina: Controle negativo (Salina), 144,80 ($\pm 3,03$), controle positivo (Paracetamol), 369,70 ($\pm 5,00$), EHCSR 200mg/Kg, 311,00 ($\pm 2,07$), EHCSR 400mg/Kg, 396,90 ($\pm 2,22$), EHCSR 200mg/Kg + paracetamol, 259,70 ($\pm 2,03$), EHCSR 400mg/Kg + paracetamol, 252,30 ($\pm 2,35$).

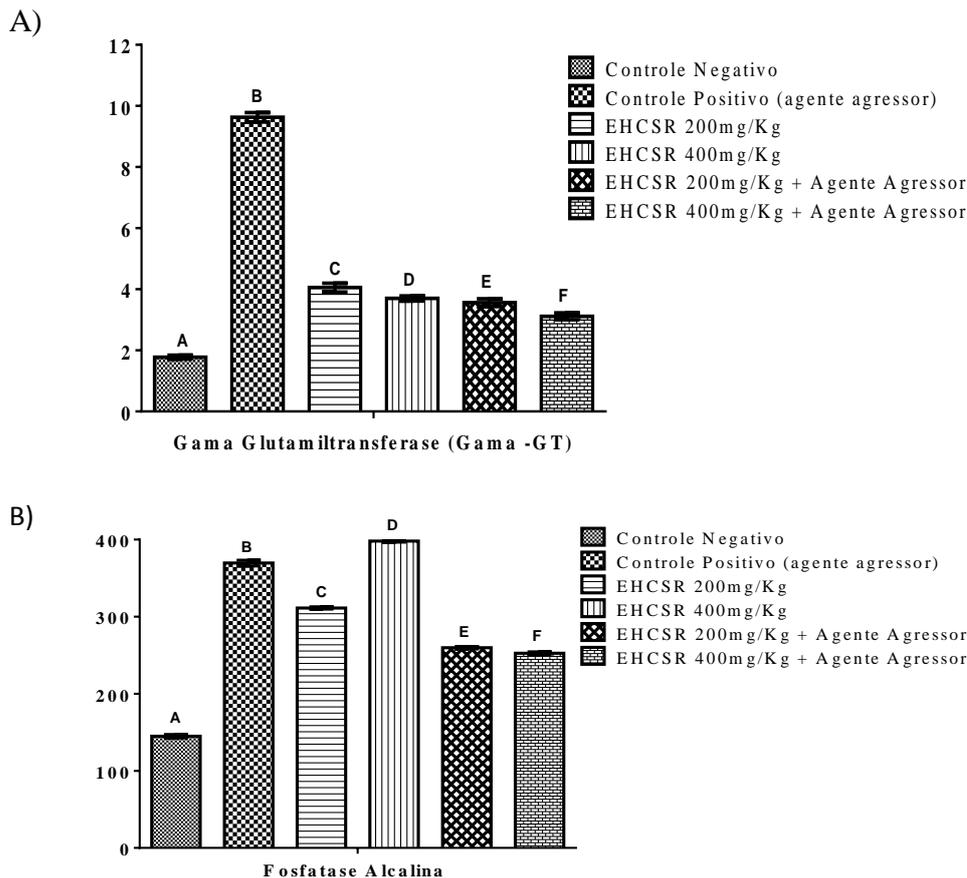


Figura 2: A) Resultado da dosagem Gama glutamiltransferase (Gama – GT), em amostra de soro de ratos, onde foram administrados paracetamol e EHCSR em duas dosagens, onde a significância entre os grupos é vista com $p < 0.05$. As colunas A e B foram significantes em relação a todas as outras analisadas. Nas análises entre grupos, as colunas C em relação a D, C em relação a E, D em relação a E e E em relação a F, não tiveram significância. e B) Resultado da dosagem Fosfatase alcalina, em amostra de soro de ratos, onde foram administrados paracetamol e EHCSR em duas dosagens, onde a significância entre os grupos é vista com $p < 0.05$. Todas as relações entre colunas foram significantes com exceção de E em relação a F, onde não houve significado

Gama-GT e Fosfatase alcalina estão geralmente aumentadas em colestase e danos hepáticos celulares, encontram-se em vários órgãos, dentre eles o fígado, que possui maiores concentrações destes (GREEN; FLAMM, 2002; DAVIS et al., 2003). A Gama-GT está presente no retículo endoplasmático liso, e encontra-se aumentado na presença de agressores hepáticos (CONIGRAVE et al., 2002, LUCEY et al., 2008). Diante disto os resultados mostram que os grupos administrados somente com o EHCSR possuem aumentos destes, assim como quando administrado o paracetamol, que é um agressor hepático.

Na Figura 3 mostra as dosagens de Proteínas Totais e Albumina, nos grupos administrados o EHCSR e o paracetamol, sendo que as dosagens foram significativas em

todos os grupos, quando levado em consideração o grupo controle negativo como valor de referência, com exceção do EHCSR 200mg/Kg associado ao agente agressor (Paracetamol), quando dosado Proteínas Totais. Valores dosados de Proteínas totais: Controle negativo (Salina), 10,81 ($\pm 0,46$), controle positivo (Paracetamol), 6,83 ($\pm 0,29$), EHCSR 200mg/Kg, 14,14 ($\pm 0,33$), EHCSR 400mg/Kg, 12,90 ($\pm 0,45$), EHCSR 200mg/Kg + paracetamol, 9,43 ($\pm 0,30$), EHCSR 400mg/Kg + paracetamol, 8,76 ($\pm 0,20$). Valores dosados de Albumina: Controle negativo (Salina), 8,71 ($\pm 0,35$), controle positivo (Paracetamol), 4,11 ($\pm 0,28$), EHCSR 200mg/Kg, 12,29 ($\pm 0,40$), EHCSR 400mg/Kg, 11,15 ($\pm 0,62$), EHCSR 200mg/Kg + paracetamol, 7,33 ($\pm 0,26$), EHCSR 400mg/Kg + paracetamol, 7,17 ($\pm 0,22$).

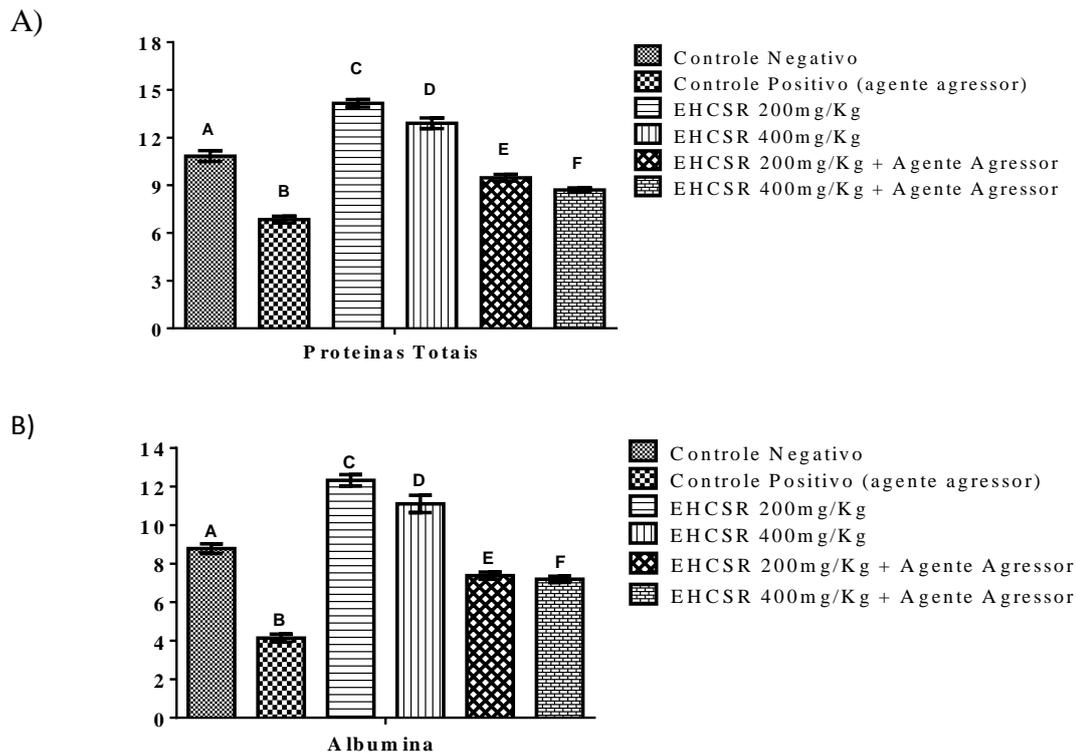


Figura 3: A) Resultado da dosagem Proteínas Totais, em amostra de soro de ratos, onde foram administrados paracetamol e EHCSR em duas dosagens, onde a significância entre os grupos é vista com $p < 0.05$. Todas as relações entre colunas foram significantes com exceção de A em relação a E, onde não houve significado e B) Resultado da dosagem Albumina, em amostra de soro de ratos, onde foram administrados paracetamol e EHCSR em duas dosagens, onde a significância entre os grupos é vista com $p < 0.05$. Todas as relações entre colunas foram significantes com exceção de C em relação a D, E em relação a F onde não houve significado.

Porém existe uma diferença nesses grupos, nas dosagens dos agentes agressores, os valores de Proteínas Totais e Albuminas encontram-se diminuídos, tanto com o paracetamol utilizado sozinho ou associado ao EHCSR nas dosagens de 200 e 400 mg/Kg. Quando o

EHCSR administrado sozinho não houve diminuição e sim aumento das dosagens. Os níveis de albumina e Proteínas Totais encontram-se geralmente diminuídos em cirrose aguda (GAYOTO; ALVES, 2001), porém com a administração do EHCSR não foi visto essa diminuição e sim aumento destas.

Estes achados são de suma importância, pois demonstra que o EHCSR pode causar dano hepático, já que AST está aumentada só com a utilização do EHCSR, principalmente na dose de 400mg/Kg e sem acréscimo de nenhum agressor. Segundo Luo e colaboradores (2004), um dano hepático só será relevante com o aumento de AST e ALT, e diminuição de albumina, mas o aumento da AST pode demonstrar início de uma lesão hepática ou em outros órgãos, já que esta não é específica do fígado. Visto que não ocorreu uma diminuição da albumina em conjunto com o aumento das transaminases, leva-se a crê que um início de lesão hepática está ocorrendo, pois de todas as dosagens realizadas apenas a Albumina e Proteínas Totais que não corroboraram com esta possível lesão.

Alguns estudos sobre o gênero *Stryphnodendron*, ressaltaram efeitos tóxicos significativos, com diversas partes da planta, como folhas, favas e cascas, como foi visto nesse estudo. Vilar et al.(2010) verificou que o extrato da casca de *Stryphnodendron adstringens* apresentou efeito citotóxico, Almeida et al.(2009) verificou que o extrato das folhas desta mesma espécie causaram toxicidade em camundongos quando administrados via intra peritoneal.

Segundo Mendonça et al.(2010), as favas de *Stryphnodendron fissuratum*, do mesmo gênero da espécie estudada neste trabalho, foi tóxica em caprinos, onde apresentou diversas desordens como problemas digestivos, neurais, musculares e morte. As alterações hepáticas quanto as dosagens bioquímicas foram discretas. Segundo Brito et al.(2001), as favas de *Stryphnodendron obovatum*, apresentaram toxicidades em bovinos, estas desordens foram semelhantes a vista por Mendonça et al.(2010), demonstrando mais uma vez a toxicidade desta parte das plantas desse gênero. Tokarnia et al.(1998) demonstrou que estas favas causaram abortos em bovinos nas diversas fazes gestacionais.

Considerações Finais

Através deste estudo pode-se evidenciar que o extrato hidroalcolico da casca de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart pode causar um quadro de lesão hepática, frente aos parâmetros analisados. As dosagens bioquímicas AST, ALT, Fosfatase Alcalina e Gama-GT, mostraram-se elevadas quando foram submetidas a doses do EHCSR (200 e 400 mg/Kg), demonstrando início de uma lesão hepática, as dosagens de Albumina e Proteínas Totais, não

mostraram-se diminuídas o que indica que a lesão não é elevada, ou por conta do período de tratamento, que foi agudo. Diante de todos esses aspectos mostra-se a relevância deste estudo, pois uma grande parte da população da Chapada do Araripe, faz uso contínuo ou periódico desta planta, o que pode agravar alguma patologia já existente ou desenvolver um problema hepático, nessas pessoas, com isso é de suma importância a divulgação e esclarecimento desta população quanto ao que foi visto neste estudo.

Referências

ALMEIDA, A. C.; SOBRINHO, E.M.; PINHO, L.; SOUZA, P. N. S.; MARTINS, E. R.; DUARTE, E. R. SANTOS, H. O.; BRANDI, I. V.; CANGUSSU, A. S.; COSTA, J. P. R. Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi administrados por via intraperitoneal Cienc. Rural [online], v.40, n.1, p.200-203, 2010.

BERSANI-AMADO, C. A.; NAKAMURA, C. V.; NAKAMURA, T. U.; MARTINEZ, M.; MELLO, J. C. P. Avaliação das atividades antiinflamatória e antibacteriana do extrato bruto do *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, F006, 1996, Florianópolis. Resumos. Florianópolis: Univer. Fed. de Santa Catarina, 1996.

BRITO, M. F.; TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P. V.; SILVA, H. K.; NOGUEIRA, M. Intoxicação experimental pelas favas de *Stryphnodendron obovatum* (Leg. Mimosoideae) em bovinos. Caracterização do quadro clínico. Pesq. Vet. Bras. v.21, n.1, p. 9-17, 2001.

CONIGRAVE, K. M.; DEGENHARDT, L. J.; WHITFIELD, J. B.; SAUNDERS, J. B.; HELANDER, A.; TABAKOFF, B. CDT, GGT, and AST as markers of alcohol use: the WHO/ISBRA collaborative project. Alcohol Clin Exp Res. v.26, n.3, p.332-339, 2002.

COSTA, J. G. M.; LEITE, G.O.; DUBOIS, A. F.; SEEGER, R. L.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; CAMPOS, A. R.; ROCHA, J. B. T. Antioxidant Effect of *Stryphnodendron rotundifolium* Martius Extracts from Cariri-Ceará State (Brazil): Potential Involvement in Its Therapeutic Use. Molecules, v.17, n.1, p.934-950, 2012.

DAVIS, G.L.; ALBRIGHT, J.E.; COOK, S.F.; ROSENBERG, D.M. Projecting future complications of chronic hepatitis C in the United States. Liver Transpl.v.9, n.4, p.331-8, 2003.

GAYOTTO, L.C.C.; ALVES, V.F. Doenças do Fígado e Vias Biliares. São Paulo: Atheneu, 2001.

GREEN, R. M.; FLAMM, S. A. G. A technical review on the evaluation of liver chemistry tests. Gastroentero., v.123, n.4, p.1367-1384, 2002.

LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O.; DE SOUZA, P. T. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for antiinflammatory activity. *Phyto. Resear.*, v. 12, n. 3, p. 218-220, 1998.

LOPES, G.C.; SANCHES, A.C.C.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; HERNANDES, L.; MELLO, J.C.P. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. And *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrisation of cutaneous wounds in rats. *J. of Ethnopharmacol.*, v.99,n.2, p.264-272, 2005.

LUCEY, M. R.; CONNOR, J. T.; BOYER, T. D.; HENDERSON, J. M.; RIKKERS, L. F. Divert study group. Alcohol consumption by cirrhotic subjects: patterns of use and effects on liver function. *Am J Gastroenterol.* v.103, n.7, p.1698-1706, 2008.

LUO, Y.J.; YU, J.P.; SHI, Z.H. Ginkgo biloba extract reverses CCl₄- induced liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol.*, v.10, n.7, p.1037-1042, 2004.

MENDONÇA, F. S.; EVENCIO-NETO, J.; ESTEVÃO, L.R.M.; MELO, L. E.H.; FREITAS, S.H.; ARRUDA, L. P.; BOABAID, F. M.; COLEDEL, E. M. Aspectos clínicos da intoxicação experimental pelas favas de *Stryphnodendron fissuratum* (Leg. Mimosoideae) em caprinos. *Pesq. Vet. Bras.* v.30, n.3, p.203-210, 2010.

MUKAZAYIRE, M.-J.; TOMANI, J.C.; STÉVIGNY, C.; CHALCHAT, J.C.; CONFORTI, F.; MENICHINI, F.; DUEZ, P. Essential oils of four Rwandese hepatoprotective herbs: Gas chromatography–mass spectrometry analysis and antioxidant activities. *Food chemi.* v.129, n.3, p.753-760, 2011.

OLIVEIRA, D. R. Contribuição ao estudo da bioprospecção farmacológica de plantas medicinais do nordeste brasileiro: barbatimão (*Stryphnodendron rotundifolium* Mart.). Dissertação de mestrado, 2010.

OLIVEIRA, D. R.; BRITO-JUNIOR, F.E.; BENTO, E. B.; MATIAS, E.F.F.; SOUSA, C. A.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; KERNTOPF, M. R.; MENEZES, I. R. A. Antibacterial and modulatory effect of *Stryphnodendron rotundifolium*. *Pharm. Biol.*, v. 49, n.12, p.1265-1260, 2011.

PRADHAN, S.; GIRISH, C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *Indian J Med Res.* v.124, n.5, p.491-504, 2013.

RODRIGUES, F.F.G.; CABRAL, B.S.; COUTINHO, H.D.M.; CARDOSO, A.L.H.; CAMPOS, A. R.; COSTA, J. G. M. Antiulcer and antimicrobial activities of *Stryphnodendron rotundifolium* Mart. *Phcog Mag.* v.4, n.15, p.193-196, 2008.

SANCHES, A. C. C.; LOPES, G. C.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P. Antioxidant and antifungal activities of extracts and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v.4, n.1, p.101-107, 2005.

SRISVASTAVA, A.; SHIVANANDAPPA, T. Hepatoprotective effect of the aqueous extract of the roots of *Decalepis hamiltonii* against ethanol-induced oxidative stress in rats. *Hepatol Res.*, v.35, n.4, p.267-275, 2006.

SHUKLA, A.; BIGONIYA, P. Hepatoprotective Effect of *Lepidium Sativum* Linn (Cruciferae) Total Alkaloid Fraction against CCl₄ Induced Hepatotoxicity on Rats. *Research J Pharmaco Phytoc.* v.5, n.2, p.94-99, 2013.

TOKARNIA, C. H.; BRITO, M. F.; DRIEMEIER, D.; COSTA, J. B. D; CAMARGO A. J. B. Aborto em vacas na intoxicação experimental por pelas favas de *Stryphnodendron obovatum* (Leg. Mimosoideae) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* v.18, n.1, p.35-38, 1998.

VILAR, J. B.; D'OLIVEIRA, M. I. P.; SANTOS, S.C.; CHEN, L.C. Cytotoxic and genotoxic investigation on barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, 1910] extract. *Brazilian J Pharmac Scien.*, v.46, n.4, p.687-694, 2010.

ZAKHARI, S.; LI, T. K. Determinants of alcohol use and abuse: Impact of quantity and frequency patterns on liver disease. *Hepatology*, v. 46, n.6, p.2032-2037 2007.

4.2 ARTIGO 2: Avaliação da atividade leishmanicida e tripanocida (*in vitro*) do extrato hidroalcolóico da casca de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart.

RESUMO

A leishmaniose e doença de chagas, são conhecidas como patologias negligenciadas, estas são causadas por parasitas sanguíneos, que causam diversas desordens sistêmicas ao homem. A leishmaniose mais grave é a visceral, conhecida como calazar, esta compromete principalmente fígado, baço, e podendo ser letal ao homem. Assim como a patologia anterior, a Doença de Chagas, causa diversos sintomas, sendo dividida em duas fases, aguda e crônica, comprometendo na fase crônica principalmente fígado e coração. O tratamento destas é complexo, pois os medicamentos utilizados são geralmente tóxicos e agravam os sintomas da doença, diante disto vê-se a necessidade de alternativas terapêuticas, principalmente utilizando-se plantas medicinais, como o *Stryphnodendron rotundifolium* Mart., barbatimão. Esta árvore é endêmica da Chapada do Araripe e amplamente utilizada pela população para tratar ferimentos, inflamações diversas, dentre outros. Diante disto viu-se a importância de avaliar a atividade leishmanicida e tripanocida do extrato hidroalcolóico da casca de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart (EHCSR), afim de se encontrar uma alternativa terapêutica para as ditas patologias. Foi feito um extrato bruto hidroalcolóico da casca de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart., posteriormente utilizou-se quatro concentrações diferentes (1000, 500, 250, 125 µg/mL) para realização dos testes, *in vitro*, anti- leishmania, utilizando promastigotas das espécies *L. brasiliensis* e *L. infantum* e tripanocida, utilizando epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Verificou-se também a citotoxicidade do EHCSR, frente a fibroblastos aderidos em placa. Os testes foram realizados em triplicata e calculados os percentuais de mortalidade dos parasitas, IC₅₀ e percentual de toxicidade. Obteve-se como resultado da atividade anti-leishmania, frente a *L. infantum*, um percentual médio de 45% de mortalidade dos parasitas em todas as concentrações, frente a *L. brasiliensis* a concentração que foi significativa foi de 1000 µg/mL, com 56, 38%, estas possuindo IC₅₀ de 1338,76µg/mL e 987,35µg/mL, respectivamente. A atividade tripanocida obteve destaque na concentração de 1000µg/mL, com 82,31% de mortalidade das epimastigotas. A citotoxicidade nessas concentrações de destaque, 1000µg/mL e 500µg/mL, apresentou 94,14% e 75,12% e com uma IC₅₀ = 190.24µg/mL. Devido a isto viu-se que mesmo com a atividade anti-parasitária presente no extrato, a sua baixa citotoxicidade torna viável seu uso sistêmico, como alternativa terapêutica.

Palavras – Chave: *Stryphnodendron rotundifolium* Mart, tripanocida, leishmanicida, citotoxicidade.

Introdução

A Leishmaniose e a Doença de Chagas, são ditas como problemas graves de saúde pública, devido seu alto índice de mortalidade em países como o Brasil, pois estão diretamente ligadas a fatores sócio-econômicos (MARCHESE, 2009; WHO, 2002).

A Leishmaniose é causada por um parasita sanguíneo, onde seu modo de transmissão é através da picada do mosquito flebotomíneo, quando este encontra-se infectado, isto ocorre no repasto sanguíneo onde os parasitas são inoculados na derme do hospedeiro, que tem como reservatório os animais domésticos, principalmente o cachorro, e os selvagem, porém o

homem veio a se tornar um possível reservatório devido a mudança organizacional das cidades, deixando assim de ser uma patologia apenas rural (MONTEIRO et al., 2005; MARCHESE, 2009; BRASIL, 2010). A Leishmaniose Tegumentar Americana possui 3 formas clínicas, cutânea, mucocutânea e cutânea difusa. A mucocutânea caracteriza-se por lesões que destroem as cartilagem e mucosas. A leishmaniose visceral, conhecida como calazar, é considerada a mais grave e tem como sintomatologia hepatoesplenomegalia, pancitopenia, e dependendo da evolução da doença pode levar a morte. Estas são causadas respectivamente por *L. brasiliensis*, e por *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi* (GENARO e REIS, 2005; SIMÕES- MATTOS et al., 2002; ALEIXO et al., 2006).

Uma grande problemática desta patologia é a falta de vacinas, e medicamentos eficazes e seguros, principalmente para o cão, que tornou-se o principal hospedeiro e causador das maiores dificuldades de controle da doença, pois o mesmo encontra-se nos domicílios e caracterizam um grau de afetividade com o homem (PAULA et al., 2003, SIDERMAN et al., 2004; NAKAMURA et al, 2006).

A Doença de chagas, *Trypanosoma cruzi*. é transmitida pelo triatomíneo, conhecido como barbeiro, ocorre durante a hematofagia, quando o mesmo, realiza a penetração da pele deixando urina ou fezes contaminadas com tripomastigotas metacíclicas, que infectam o hospedeiro, normalmente mamíferos, porém esta não é a única forma de transmissão, já foi verificado contaminação por transfusão sanguínea, transplantes de órgãos e por via oral, através da ingestão do vetor, isto acontece quando este é triturado durante o preparo de algum alimento (SCHMUÑIS, 2000; BRENER, 2000). A sintomatologia é diversa, apresentando problemas mais graves na fase crônica, onde ocorre comprometimento cardíaco, hepático, dentre outros. O tratamento desta possui várias restrições, dentre eles, é mais eficaz na fase aguda da doença, além de causar efeitos colaterais diversos (SANTORO et al., 2007; BRASIL, 2005).

Por conta destes fatores verifica-se a importância de se desenvolverem novos fármacos, principalmente os derivados de plantas medicinais, por conta da ampla variedade destas e pelo acesso facilitado a pessoas de poder aquisitivo menor (CARVALHO & RODRIGUES, 2001).

Em função da tradição do uso de plantas medicinais no Brasil, atualmente o interesse pelas propriedades farmacológicas destas vem sendo explorado arduamente pelos pesquisadores brasileiros e mais recentemente pela indústria farmacêutica, por conta da necessidade de desenvolver novos fármacos (CALIXTO & SIQUEIRA Jr, 2008).

O gênero *Stryphnodendron*, pertence à família Leguminosae e subfamília Mimosoideae, que possui aproximadamente 64 gêneros, este é conhecido popularmente como

barbatimão, barba-de-timão, charãozinho-roxo, casca-da-virgindade, casca-da-mocidade, barbatimão-vermelho (LORENZI, 2000; DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002). A espécie *Stryphnodendron rotundifolium* Mart endêmica da Chapada do Araripe, é utilizada por grande parte da população da região do Cariri, onde utilizam-se da casca desta árvore para tratar ferimentos, inflamações, gastrite, inflamação vaginal e infecções (OLIVEIRA, 2010).

A prospecção fitoquímica do extrato da casca de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart. foi realizada e verificou-se a presença de taninos pirogálicos, flavonas, flavonóis, flavononóis, xantonas, chalconas, flavononas e esteróides como metabólitos secundários presentes nessa espécie (OLIVEIRA, 2010), bem como atividade antibacteriana e antifúngica (RODRIGUES et al, 2008), antioxidante (COSTA et al, 2012) e efeito antibiótico sinérgico (OLIVEIRA et al, 2011).

Diante disto objetivou-se avaliar a atividade tripanocida e leishmanicida do extrato hidroalcolico da casca de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart., a fim de verificar seu potencial terapêutico diante destas patologias, para propiciar uma possível alternativa de tratamento para os pacientes..

Materiais e Métodos

Material botânico

O material vegetal de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart. foi coletado no município de Crato-Ceará-Brasil, em março de 2011. A exsicata da espécie encontra-se depositada no Herbário Dárdaro de Andrade Lima-URCA sob número 4661.

Preparação do extrato hidroalcolico da casca de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart.(EHCSR)

O material vegetal (cascas secas de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart.) foi submetido à extração a frio com água e etanol a 99,99% na proporção de 1:1, sendo que o solvente etanólico foi removido através do evaporizador rotatório, obtendo-se um extrato bruto a partir da utilização do liofilizador.

Preparo da solução do EHCSR

O EHCSR foi diluído em solução tamponada de fosfato (PBS pH 7,2) a uma concentração final de 1mg/mL, obtendo-se posteriormente concentrações de 500, 250, 125µg/mL, respectivamente. Os testes foram efetuados em triplicata.

Obtenção de parasitas e células

Neste estudo, foram utilizadas formas epimastigotas de cultura sanguíneas de *T. cruzi* e promastigotas de *L. brasiliensis* e *L. infantum*.

As Epimastigotas foram obtidas na fase exponencial de crescimento em meio Liver Infusion Tryptose (LIT) foram lavados 2 vezes em PBS estéril pH 7,2 a 1500rpm por 10 minutos a 4°C, e o número de parasitos foi determinado em câmara de Neubauer. A seguir, os parasitos foram suspensos em meio LIT acrescido de 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) (inativado a 56°C), e a concentração ajustada para 5×10^6 epimastigotas/mL, sendo mantidos a 4°C até o uso.

As Promastigotas de *L. brasiliensis* e *L. infantum*, foram obtidos na fase exponencial de crescimento em meio Schneider suplementado com 5% de SBF e 2% de urina, foram lavados 2 vezes em PBS estéril pH 7,2 a 1500rpm por 10 minutos a 4°C, e o número de parasitas foi determinado em câmara de Neubauer. A seguir, os parasitas foram suspensos em meio Schneider acrescido de 5% de SBF e 2% de urina, e a concentração ajustada para 5×10^6 promastigotas/mL, sendo mantidos a 4°C até o uso.

Os fibroblastos foram cultivados em Minimal Essential Medium (MEM). Este foi suplementado com 10% de SFB inativada por calor, penicilina G (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL). As culturas foram mantidas a 37° C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ até uso.

Avaliação leishmanicida *in vitro*

Para a avaliação da atividade leishmanicida contra forma promastigotas do extrato, foram realizados ensaios em triplicatas em placas de culturas de 96 poços, contendo 20µl do EHCSR em concentrações em ordem decrescente, diluídas em PBS estéril pH 7,2, acrescido de 180 µl da suspensão de promastigotas. Como controle, os parasitas foram incubados na ausência de compostos, e na presença de 100µg/ml de Pentamidina. Após adição dos produtos naturais, as amostras foram homogeneizadas e incubadas à 24°C por 72 horas e, a seguir, as placas avaliadas visualmente em microscópio para verificação da motilidade dos parasitos. Os resultados foram expressos em %. Os ensaios foram repetidos 3 vezes com o objetivo de avaliar a manutenção da atividade do EHCSR e a reprodutibilidade dos resultados. Como droga de referência foi utilizada a Pentamidina.

Avaliação tripanocida *in vitro*

No teste tripanocida, contra formas epimastigotas, foram realizados em triplicatas em placas de culturas de 96, contendo 20µl do EHCSR em concentrações em ordem decrescente, diluídas em PBS estéril pH 7,2, acrescido de 180 µl da suspensão de epimastigotas. Como controle, os parasitos foram incubados na ausência de compostos, e na presença de 100µg/ml de Nifurtimox. Após adição do EHCSR, as amostras foram homogeneizadas e incubadas à 24°C por 72 horas e, a seguir, as placas foram avaliadas visualmente em microscópio para verificação da motilidade dos parasitas. A atividade foi determinada por contagem em câmara de Neubauer e posterior avaliação estatística. Os resultados foram expressos em %. Os ensaios foram repetidos 3 vezes com o objetivo de avaliar a manutenção da atividade dos produtos naturais e a reprodutibilidade dos resultados.

Avaliação de citotoxicidade

Fibroblastos foram aderidos em placas de microdiluição de 96 poços a uma concentração final de 3×10^4 células/cavidade. Estas foram incubadas a 37° C em atmosfera com 5% de CO₂. Posteriormente, o meio MEM foi removido e o EHCSR foi adicionado a 200µL, incubado por mais 24h. Após esta incubação, 20µL de uma solução de Resazurina 2mM foi adicionada em cada cavidade. As placas foram incubadas por 3h e a redução da resazurina foi determinada através de dupla absorbância nos comprimentos de onda de 490 e 595 nm. O valor do controle (branco) foi subtraído. Cada concentração foi testada em triplicata.

Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos uma vez. Os resultados foram expressos como concentração inibitória do crescimento parasitário (CI₅₀), calculados por regressão linear.

Resultados e discussão

Os resultados da Tabela 1 mostram o efeito do medicamento de escolha, pentamidina, frente o gênero *Leishmania sp.*, onde obteve-se uma IC₅₀ = 5.69 µg/mL. Os resultados obtidos na Tabela 2 e 3 são correspondentes a atividade anti-promastigota do gênero *Leishmania sp.*, onde foi verificado que na espécie *L. infantum* (Tabela 2), nas quatro concentrações do EHCSR testadas, o percentual de inibição parasitário foi semelhante, em torno de 45%, e com uma IC₅₀ = 1338.76 µg/mL, já na espécie *L. brasiliensis* (Tabela 3) houve destaque na

concentração inicial, de 1000 μ g/mL, onde o percentual de inibição foi de 56,38%, nas demais concentrações a inibição foi insatisfatória e obtendo uma $IC_{50} = 987.35\mu$ g/mL.

Tabela 1: Resultado do Pentamidina, frente a *Leishmania infantum* na forma parasitária promastigota. ($IC_{50} = 5.69\mu$ g/mL)

Concentração em μ g/mL	% de anti-promastigota (<i>L. infantum</i>)	\pm % Desvio padrão
100	93.9	0.3
50	93.9	0.1
25	89.2	0.6
12.5	80.6	0.2
6.25	54.2	0.3
3.125	15.5	1.1

Tabela 2: Resultado do EHCSR, frente a *Leishmania infantum* na forma parasitária promastigota. ($IC_{50} = 1338.76\mu$ g/mL)

Concentração do EHCSR em μ g/mL	% de anti-promastigota (<i>L. infantum</i>)	\pm % Desvio padrão
1000	47.14	0.69
500	45.63	2.52
250	40.67	1.12
150	43.47	2.72

Tabela 3: Resultado do EHCSR, frente a *Leishmania brasiliensis* na forma parasitária promastigota. ($IC_{50} = 987.35\mu$ g/mL)

Concentração do EHCSR em μ g/mL	% de anti-promastigota (<i>L. brasiliensis</i>)	\pm % Desvio padrão
1000	56.38	5.49
500	4.68	2.06
250	2.85	1.79
150	2.85	1.07

Segundo Rosas et al (2007) um percentual acima de 50% de inibição parasitária, quando a concentração de extrato utilizada é de 500 μ g/mL, considera-se que este é um bom inibidor dos parasitas estudados, porém mesmo o EHCSR não estando nesse percentual, não é descartada sua atividade, pois este ainda possui dados próximos aos 50%, este fato pode ser explicado pelos componentes presente no EHCSR, como os taninos, flavonoides e compostos fenólicos, que foram descritos como os principais metabólitos secundários presente nessa espécie (OLIVEIRA, 2010).

O efeito anti- leishmania foi alvo de estudos Kolodziej e Kiderlen (2005) onde foram comprovadas que taninos, polifenóis, fenóis simples e taninos condensados possuem esta atividade. Em estudos anteriores foram avaliados a atividade leishmanicida de extratos ricos

em polifenóis, dos frutos de *Cocos nucifera* L., onde este apresentou efeito satisfatório tendo uma concentração inibitória mínima de 10 µg/mL (MENDONÇA-FILHO et al., 2004).

Segundo Paula-Junior et al (2006) o extrato hidroetanólico das folhas de *Coryocar brasiliense* possui atividade leishmanicida frente as formas promastigotas, este demonstrou uma forte atividade antioxidante, corroborando com este estudo, pois o gênero *Stryphnodendron* possui atividade antioxidante já relatada (LOPES et al., 2005) e a presente espécie também como foi demonstrado por Costa et al (2012). Williams et al. (2003) demonstra que compostos antioxidantes, como flavonóides, podem ter efeito em formas promastigotas de *Leishmania sp.*, isso baseado na redução de sal tetrazolium.

De acordo com Bezzera et al. (2006) extratos brutos de plantas possuem efeito leishmanicida, sobre formas promastigotas, mais eficiente, assim como Reis et al. (2012) demonstra que extrato hidroalcolólico de *Chenopodium ambrosioides* acarreta em uma diminuição da carga parasitaria em infecção por *L. amazonenses in vivo*, isto demonstra que o extrato utilizado neste estudo, possivelmente possui essas características leishmanicida devido a esses fatores, por este ser hidroalcolólico e um extrato bruto, como os vistos anteriormente.

A Tabela 4 mostra o efeito da droga de escolha, Nifurtimox, para tratamento da patologia frente a *T. cruzi*. observando uma $IC_{50} = 20.02$ µg/mL. A atividade tripanocida frente a epimastigotas se mostra relevante em concentração de 1000µg/mL, onde foi verificado a morte de 82,31% das formas parasitárias, nas outras concentrações, 250 µg/mL e 500 µg/mL, obtiveram uma pequena inibição, respectivamente 2,31% e 7,07%, já na menor concentração de 150 µg/mL não houve inibição alguma (Tabela 5) e este apresentou uma $IC_{50} = 748.97$ µg/mL.

Tabela 4: Resultado do Nifurtimox, frente a *Trypanosoma cruzi* na forma parasitária epimastigota. ($IC_{50} = 20.02$ µg/mL)

Concentração em µg/mL	% de anti-epimastigota (<i>T. cruzi</i>)	± % Desvio padrão
100	100	0.46
50	93	0.66
10	84	0.62
1	43	0.93
0.5	13	2.50
0.1	0	1.54

Tabela 5: Resultado do EHCSR, frente a *Trypanosoma cruzi* na forma parasitária epimastigota. ($IC_{50} = 748.97\mu\text{g/mL}$)

Concentração do EHCSR em $\mu\text{g/mL}$	% de anti-epimastigota (<i>T. cruzi</i>)	\pm % Desvio padrão
1000	82.31	0.57
500	7.07	0.55
250	2.13	1.21
150	0	0.35

Em estudos realizados por Herzog-Soares et al. (2002), utilizando o extrato bruto da casca da espécie *Stryphnodendron adstringens*, que pertence ao mesmo gênero do extrato utilizado neste estudo, mostrou-se eficiente contra o parasita *T. Cruzi*, in vivo, eliminando quase que na totalidade todos os parasitas encontrados no sangue dos animais, demonstrando sua efetividade contra o mesmo.

Ribeiro et al. (1997) isolou flavanonas de *Trixis vauthieri* L., com este eliminaram cerca de 99% dos parasitas no sangue infectado, Graef et al. (2005) isolou diversas substâncias de *Lychnophora pohlii*, onde os flavonóides apresentaram atividade tripanocida considerável, Takeara et al. (2003) demonstrou que os flavonóides presente em outra espécie de *Lychnophora* foram eficientes contra *T. cruzi* de sangues contaminados em bancos de sangue. Schinor et al. (2004) verificou a mesma atividade porém esta foi realizada em vivo. Este dado é de suma importância para o presente estudo pois o mesmo possui em sua composição flavonoides, o que demonstra um dos prováveis motivos para o efeito tripanocida demonstrado. Abe et al. (2004) demonstrou que após isolado uma xantona, de *Garcinia subelíptica*, foram ativas contra a forma epimastigota e tripomastigota do protozoário *T cruzi*, no EHCSR este metabólito secundário também encontra-se presente.

Mesmo diante do exposto, que existe uma possível atividade anti- parasitária, não se pode descartar a importância de verificar a citotoxicidade deste EHCSR, como mostra a Tabela 6. Demonstrando que nas doses de $1000\mu\text{g/mL}$ e $500\mu\text{g/mL}$, que foram as mais representativas no estudo, a toxicidade é muito alta, 94,14% e 75,12% respectivamente e tendo uma $IC_{50} = 190.24\mu\text{g/mL}$.

Tabela 6: Atividade citotóxica do EHCSR frente a fibroblastos. ($IC_{50} = 190.24\mu\text{g/mL}$)

Concentração do EHCSR em $\mu\text{g/mL}$	% Citotoxicidade	\pm % Desvio padrão
1000	94.14	1.04
500	75.12	1.63
250	62.42	1.01
150	43.39	2.03

Santos e colaboradores (2012) demonstrou que o uso de produtos naturais podem proporcionar altos percentuais de mortalidades dos parasitas apresentando baixos percentuais de citotoxicidade. Este resultado pode demonstrar uma viabilidade de uso do EHCSR por via sistêmico.

Considerações Finais

Através destes estudos pode-se verificar que o extrato hidroalcoólico da casca de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart. (EHCSR), apresentou melhor atividade frente as cepas de *L. brasiliensis*. Porém, apresentou uma atividade antiparasitária mais significativa para formas epimastigotas da espécie *T. cruzi*. O extrato EHCSR demonstrou baixo efeito citotóxico que demonstrar uma viabilidade de uso por via sistêmica.

Referências

- ABE, F.; NAGAFUJI, S.; OKABE, H.; AKAHANE, H.; ESTRADA-MUÑIZ, E.; HUERTA-REYES, M.; REYES-CHILPA, R. Trypanocidal constituents in plants 3. Leaves of *Garcinia intermedia* and heartwood of *Calophyllum brasiliense*. *Biol Pharm Bull* v.27, n.1, p.141-143, 2004.
- ALEIXO, J.A.; NASCIMENTO, E.T.; MONTEIRO, G.R.; FERNANDEZ, M.Z.; RAMOS, A.M.O.; WILSON, ME.; PEARSON, R.D.; JERONIMO, S.M.B. Atypical American visceral leishmaniasis caused by disseminated *Leishmania amazonensis* infection presenting with hepatitis adenopathy. *Trans Royal Soc of Trop. Med. And Hyg.*, v.100, n.1, p.79-82, 2006.
- BEZERRA, J.L.; COSTA, G.C.; LOPES, T.C.; CARVALHO, I.C.D.S.; PATRICIO, F.J.; SOUSA, S.M.; AMARAL, F.M.M.; REBELO, J.M.M; GUERRA, R.M.; RIBEIRO, M.N.S.; NASCIMENTO, F.R.F.. Avaliação da atividade leishmanicida in vitro de plantas medicinais. *Rev Bras Farmacogn*,v.16, n.1, p.631-7, 2006.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Doenças negligenciadas. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 2010.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.38(Supl. III):12-14, 2005.
- BRENER, Z. Terapêutica Experimental na Doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETO (eds). *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 379-388, 2000.
- CALIXTO, J.B; SIQUEIRA JR, J.M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: Desafios. *Gazeta Médica da Bahia*; v. 78, p.98-106, 2008.
- CARVALHO, D.A.; RODRIGUES, V,E,G, Plantas medicinais do domínio dos serrados, Lavras. Universidade Federal de Lavras, p.180, 2001.

COSTA, J. G. M.; LEITE, G. O.; DUBOIS, A. F.; SEEGER, R. L.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; CAMPOS, A. R.; ROCHA, J. B. T. Antioxidant Effect of *Stryphnodendron rotundifolium* Martius Extracts from Cariri-Ceará State (Brazil): Potential Involvement in Its Therapeutic Use. *Molecules*, v.17, n.1, p.934-950, 2012.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2. ed. São Paulo: Editora Universidade Estadual Paulista, p. 276-320, 2002.

GENARO, O.; REIS, A.B. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: NEVES, D.P. et al. *Parasitologia Humana*. São Paulo: Atheneu, . p. 47-66, 2005

GRAEL, C.F.F.; ALBUQUERQUE, S.; LOPES, J.L. Chemical constituents of *Lychnophora pohlii* and trypanocidal activity of crude plant extracts and of isolated compounds. *Fitoter.* v.76, n.1, p.73-82, 2005.

HERZOG-SOARES, J.D.; ALVES, R.K.; ISALC, E.; BEZERRA, J.C.B.; GOMES, M.; SANTOS, S.C.; FERRI, P.H. Atividade tripanocida in vivo de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi) *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 12, n.1, p.1-2 , 2002.

KOŁODZIEJ, H.; KIDERLEN, A.F. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on *Leishmania* parasited RAW 264.7 cells. *Phytochem.*, v. 66, n.17 p. 2056-2071. 2005.

LOPES, G.C.; SANCHES, A.C.C.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; HERNANDES, L.; MELLO, J.C.P. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. And *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrisation of cutaneous wounds in rats. *J of Ethnopharmacol.* , v.99, n.2, p.264-272, 2005.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 3 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, v.1, 2000.

MARCHESE, R.M. Atividade de constituintes micromoleculares de *Renealmia alpinia* (Rottb) Maas (Zingiberaceae) sobre *Leishmania* (*Leishmania*) chagas. Brasília, 167 p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2009.

MENDONÇA-FILHO, R.R.; RODRIGUES, I.A.; ALVIANO D.S.; SANTOS, A.L.S.; SOARES R.M.; ALVIANO, C. S.; LOPES A.H.C.S.; ROSA M.S.S. Leishmanicidal activity of polyphenolic rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae). *Rese in Microb.*, v.155, n.3, p.136–143, 2004.

MONTEIRO, E.M.; SILVA, J.C.F.; COSTA, R.T.; COSTA, D.C.; BARATA, R.A.; PAULA, E.V.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; ROCHA, M.F.; FORTES-DIAS, C.L.; DIAS, E.S. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Rev da Soc Bras de Meda Trop*, v. 38, n.2, p. 147-152, 2005.

NAKAMURA, C.V.; SANTOS, A.O.; VENDRAMETTO, M.C.; LUIZE, P.S.; DIAS FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; UEDA-NAKAMURA, T. Atividade antileishmania do

extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. *Farmacognosia*, v. 16, n.1, p.61-66, 2006.

OLIVEIRA, D. R. Contribuição ao estudo da bioprospecção farmacológica de plantas medicinais do nordeste brasileiro: barbatimão (*Stryphnodendron rotundifolium* Mart.). Dissertação de mestrado, 2010.

OLIVEIRA, D. R.; BRITO-JUNIOR, F.E.; BENTO, E. B.; MATIAS, E.F.F.; SOUSA, C. A.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; KERNTOPF, M. R.; MENEZES, I. R. A. Antibacterial and modulatory effect of *Stryphnodendron rotundifolium*. *Pharm Biol.*, v. 49, n.12, p.1265-1270, 2011.

PATRÍCIO, F.J.; COSTA, G.C.; PEREIRA, P.V.; ARAGÃO-FILHO, W.C.; SOUSA, S.M.; FRAZÃO, J.B.; PEREIRA, W.S.; MACIEL, M.C.; SILVA, L.A.; AMARAL, F.M.; REBÊLO, J.M.; GUERRA, R.N.; RIBEIRO, M.N.; NASCIMENTO, F.R. Efficiency of the intralesional treatment with *Chenopodium ambrosioides* in the murine infection by *Leishmania amazonensis*. *J Ethnopharmacol* v.115, n.2, p.313-319, 2008.

PAULA, C. D. R.; SAMPAIO, J. H. D.; CARDOSO, D. R. C.; SAMPAIO, R. N. R. Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrado em três doses durante uma semana e de N- metil- glucamina 20mgSbV/Kg/dia durante 20 dias para tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Soc. Brasil Med, Trop.*, v.36, n.3, p.365-371, 2003.

PAULA-JUNIOR, W.; ROCHA, F.H.; DONATTI, L.; FADEL-PICHETH, C.M.T.; WEFORT-SANTOS, A.M. Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliensis* leaves hydroethanolic extract. *Rev Bras Farmacogn*, v.16, n.1, p.625-630, 2006.

REIS, A. S.; RIOS, C. E. P.; MELO, L. P.; COSTA, G. C.; SILVA, L. A.; PATRICIO, F. J. B.; AMARAL, F. M. M. Atividade leishmanicida in vitro de frações do extrato hidroalcoólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides* L., *Rev. Ciênc. Saúde*, v.14, n.2, p.119-126, 2012.

RIBEIRO, A.; SANTOS, L.M.S.T.; ROMANHA, A.J.; VELOSO, D.P.; ZANI, C.L. Trypanocidal flavonoids from *Trixis vauthieri*. *J Nat Prod*, v.60, n.1, p.836-838, 1997.

RODRIGUES, F.F.G.; CABRAL, B.S.; COUTINHO, H.D.M.; CARDOSO, A.L.H.; CAMPOS, A. R.; COSTA, J. G. M. Antiulcer and antimicrobial activities of *Stryphnodendron rotundifolium* Mart. *Phcog Mag.* v.4, n.15, 2008

ROSAS, L. V.; CORDEIRO, M. S. C.; CAMPOS, F. R.; NASCIMENTO, S. K. R.; JANUÁRIO, A. H.; FRANÇA, S.C.; NOMIZOS, A., TOLDOS, M. P. A.; ALBUQUERQUE, S.; PEREIRA, P.S In vitro evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). *Brazi J of Med and Biol Rese*, v.40, n.5, p.673-670, 2007.

SANTORO, G.F.; CARDOSO, M.G.; GUIMARÃES, L.G.; MENDONÇA, L.Z.; SOARES, M.J. Trypanosoma cruzi: activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium*

aromaticum L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Exp Parasitol.*, v. 116, n.3 p. 283-290, 2007.

SANTOS, K.K.A; MATIAS, E.F.F; SOBRAL-SOUZA, C.E; TINTINO, S.R; MORAIS-BRAGA, M.F.B; GUEDES, G.M.M; ROLÓN, M; VEJA, C; ARAIAS, A.R; COSTA, J.G.M; MENEZES, I.R.A; COUTINHO, H.D.M. Anti-Trypanosoma cruzi and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. *Exp Parasitol.*, v. 131, n.1, p.130–132, 2012.

SCHINOR, E.C.; SALVADOR, M.J.; ITO, I.Y.; ALBUQUERQUE, S.; DIAS, D.A. Trypanocidal and antimicrobial activities of *Moquinia kingii*. *Phytomed.*, v.11, n.2, p.224-229, 2004.

SCHMUÑIS, G. A. A tripanosomíase americana e seu impacto na saúde pública das Américas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETO (eds). *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000.

SIMÕES-MATTOS, L.; TEIXEIRA, M.J.; COSTA, D.C.; PRATA JR., J.R.C.; BEVILAQUA, C.M.L.; SIDRIM J.J.C.; ROCHA M.F.G. Evaluation of terbinafine treatment in *Leishmania chagasi*-infected hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Veter Parasitol.*, v.103, n.1, p.207–216, 2002.

SINDERMANN, H.; CROFT, S. L.; ANGEL, K. R.; BOMMER, W.; EIBL, H. J.; UNGER, C.; ANGEL, J. Miltefosine (impavido): the first oral treatment against leishmaniasis. *Med. Microbiol Immunol, Berlin.* v. 193, n.1, p.173-180, 2004.

TAKEARA, R.; ALBUQUERQUE, S.; LOPES, N.P.; LOPES, J.L.C. Trypanocidal activity of *Lychnophora staavioides* Mart.(Vernonieae, Asteraceae). *Phytomed.*, v.10, n.1, p.490-493, 2003.

WILLIAMS, C.; ESPINOSA, O.A.; MONTENEGRO, H.; CUBILLA, L.; CAPSON, T.L.; ORTEGA-BARRÍA, E.; ROMERO, L.I. Hydrosoluble formazan xtt: its application to natural products drug discovery for *Leishmania*. *J Microbiol Methods*, v.55, n.1, p.813-6, 2003

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Chagas Disease*. 2002.

7. CONCLUSÃO

Verificou-se que a utilização do extrato hidroalcolico da casca de *Stryphnodendron rotundifolium* em ratos do durante 14 dias alternados, causou uma toxicidade hepática quando comparado ao grupo controle negativo, que utilizou apenas solução salina, se comportando semelhante com o grupo de animais tratados com o agente agressor paracetamol.

As transaminases e as dosagens bioquímicas, gama-gt e fosfatase alcalina, apresentaram-se aumentadas em relação ao grupo controle negativo, principalmente quando levada em conta a administração isolada do EHCSR na dosagem de 400mg/Kg, e quando estes encontravam-se associados ao Paracetamol, o aumento também era evidente. A Albumina e as Proteínas totais, não mostraram diminuição em relação ao grupo controle.

Estas dosagens bioquímicas são utilizadas para verificar as funções do fígado, diante disto pode-se verificar que o EHCSR está causando um dano hepático, frente ao grupo controle negativo, e quando comparados com outros grupos não apresenta uma diferença significativa, devido a isto precisa-se elucidar tal fato com estudos complementares, como em administrações de uso crônico que podem trazer mais informações sobre o extrato.

A atividade antiparasitária é relevante, tendo um percentual de morte dos parasitas alto, porém as dosagens capazes de eliminar os parasitas foram doses com citotoxicidade muito elevada.

Alguns estudos já foram feitos quanto a toxicidade do gênero *Stryphnodendron*, porém este é o primeiro a evidenciar uma toxicidade hepática da casca de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart, demonstrando a importância de verificar esta problemática, pois o uso desta planta, da casca, pela população, pode está agravando alguma patologia já existente no individuo ou desenvolvendo alguma lesão hepática que anteriormente não existia.

O presente estudo verificou que o EHCSR causa dano sistêmico, como foi evidenciado nos animais, através do dano hepático, porém, apresenta baixo dano celular, visto através da citotoxicidade do mesmo frente aos fibroblastos, isto pode ser explicado, pois o que provavelmente causa a toxicidade sistêmica seja um metabolito gerado através da biotransformação do EHCSR, assim como no caso do dano causado pelo paracetamol.

Importante relatar que esta possível toxicidade foi verificada com a ingestão do EHCSR, não podendo ter certeza se o uso tópico deste também causará algum dano, sendo necessário outros estudos a respeito.

REFERÊNCIAS

- AKTAY, G.; DELIORMAN, D.; ERGUN, E.; ERGUN, F.; YESILADA, E.; CEVIK, C. Hepatoprotective effects of Turkish folk remedies on experimental liver injury. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 73, n.1, p. 121–129, 2000.
- ALEIXO, J.A.; NASCIMENTO, E.T.; MONTEIRO, G.R.; FERNANDEZ, M.Z.; RAMOS, A.M.O.; WILSON, ME.; PEARSON, R.D.; JERONIMO, S.M.B. Atypical American visceral leishmaniasis caused by disseminated *Leishmania amazonenses* infection presenting with hepatitis adenopathy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.100, n.1, p.79-82, 2006
- ARIAS, I.M. The Organ: Hepatic Microvascular System. In: _____. ed.chefe, BOYER, J.L. et al. ed.assoc. *The Liver: Biology and Pathology*. 3a. ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2001
- ARE, C.; TALAMINI, M.A.; MURATA, K.; DE MAIO, A. Carbon dioxide pneumoperitoneum alters acute-phase response induced by lipopolysaccharide. *Surg Endosc.*, v.16, n.10, p.1464-1467, 2002.
- BERSANI-AMADO, C. A.; NAKAMURA, C. V.; NAKAMURA, T. U.; MARTINEZ, M.; MELLO, J. C. P. Avaliação das atividades antiinflamatória e antibacteriana do extrato bruto do *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, F006, 1996, Florianópolis. Resumos. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 1996.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Doenças negligenciadas. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 2010.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.38(Supl. III):12-14, 2005.
- BRENER, Z. Terapêutica Experimental na Doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETO (eds). *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 379-388, 2000.
- CAMARGO, M.T.L.A. *Medicina popular*. São Paulo: Almed, 1985
- CARVALHO, D.A.; RODRIGUES, V.E.G. *Plantas medicinais do domínio dos serrados, Lavras*. Universidade Federal de Lavras, p.180, 2001.
- COELHO, J. M.; ANTONIOLLI, A. B.; SILVA, D. N.; CARVALHO, T. M. M. B.; PONTES, E. R. J. C.; ODASHIRO, A. N.. O efeito da sulfadiazina de prata, extrato de ipê-roxo e extrato de barbatimão na cicatrização de feridas cutâneas em ratos . *Rev do Col Bras de Cirur*. v.37, n.1, p.45-51, 2010.
- COSTA, J. G. M.; LEITE, G. O.; DUBOIS, A. F.; SEEGER, R. L.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; CAMPOS, A. R.; ROCHA, J. B. T. Antioxidant Effect of *Stryphnodendron rotundifolium* Martius Extracts from Cariri-Ceará State (Brazil): Potential Involvement in Its Therapeutic Use. *Molecul.*, v.17, n.1, p.934-950, 2012.

COUTINHO, H.; PINTO, D. S.; RIBEIRO, J. E. G.; FRIEDMAN, H. – Ação antiedematosa do *Stryphnodendron barbadetiman* (Barbatimão) a 1 por cento em comparação com a clorhexidina a 0, 12 por cento. *Rev Odonto Ciên. (J of Dent Scien)*.,v.19, n.45, p.201-206, 2004.

DESMET, V.J. Organizational Principles. In: ARIAS, I.M. ed.chefe, BOYER, J.L. et al. ed.assoc. *The Liver: Biology and Pathology*. 4a. ed. Lippincott Williams & Wilkins, Cap. 1, p. 3-15, 2001

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2. ed. São Paulo: Editora Universidade Estadual Paulista, p. 276-320, 2002. .

FERREIRA, S. B.; PALMEIRA, J. D.; SOUZA, J. H.; ALMEIDA, J. M.; FIGUEIREDO, M. C. P.; PEQUENO, A. S.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P.; CATÃO, R. M. R. Avaliação da Atividade Antimicrobiana in vitro do extrato hidroalcoólico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. *RevBra de Análi Clíni.*, v.42, n.1,p.27-31, 2010.

FIGUEIREDO, E.G.; RAO, V. S.; CIPRIANO T.C. Efeito Hepatoprotetor do extrato de *Bignonia Tura*. *Jo of Biomolec Med e Free Radic.*, v.3, n.4, p.148-149, 1997.

GAYOTTO, L.C.C.; ALVES, V.F. Doenças do Fígado e Vias Biliares. São Paulo: Atheneu, 2001.

GENARO, O.; REIS, A.B. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: NEVES, D.P. et al. *Parasitologia Humana*. São Paulo: Atheneu, . p. 47-66, 2005

GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; CARNEIRO, C.M.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A.; MARQUES, M.J.; TAFURI, W.L.; REIS, A.B. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis, *Resear in Veter Scien.*, v.84,n.1 p.269-277, 2008.

HEUBI, J.; BARBACCI, M.; ZIMMERMAN, H. Therapeutic misadventures with acetaminophen: Hepatotoxicity after multiple doses in children. *J Pediatr.*, v.132, 1998

HERZOG-SOARES, J.D.; ALVES, R.K.; ISALC, E.; BEZERRA, J.C.B.; GOMES, M.; SANTOS, S.C.; FERRI, P.H. Atividade tripanocida in vivo de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi) *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 12, n.1, p. 01-02, 2006

KUGA, M.T. Efeito Hepatoprotetor da *Curcuma Zedoaria* induzida pelo paracetamol em ratos machos tipo wistar. São José dos Campos:UNIVAP, 2004.

LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O.; DE SOUZA JR., P.T. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for antiinflammatory activity. *Phyther. Res.*, Reading, v.12, n.1, p.218-220, 1998.

LOPES, G. C.; MACHADO, F. A. V.; TOLEDO, C. E. M.; SAKURAGUI, C. M.; MELLO, J. C. P. Chemotaxonomic significance of 5-deoxyproanthocyanidins in *Stryphnodendron* species. *Biochem. Syst. Ecol.*, London, v.36, n.12, p.925-931, 2008.

LOPES, G. C.; NAKAMURA, C. V.; DIAS-FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P. Estudos físico-químico, químico e biológico de cascas e extratos de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. (Leguminosae). *Rev. Bras. Farmacogn.*, Maringá, v.13, n.1, p.24-27, 2003.

LOPES, G.C.; SANCHES, A.C.C.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; HERNANDES, L. & MELLO, J.C.P. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. And *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrisation of cutaneous wounds in rats. *J of Ethnopharmacol.* , v.99, p.264-272, 2005.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 3 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, v.1, 2000.

LORENZI, H; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Instituto Plantarum. São Paulo: Nova Odessa, 2002.

LUBEL, J. S.; ANGUS, P. W.; GOW, P. Accidental paracetamol poisoning. *MJA.* v.186, 2007.

MARCHESE, R.M. Atividade de constituintes micromoleculares de *Renealmia alpina* (Rottb) Maas (Zingiberaceae) sobre *Leishmania* (*Leishmania*) chagas. Brasília, 167 p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2009.

MATSUDA, M.M.; RAMBERT, J.; MALVY, D.; BOISSEAU, H.L.; DAULOUÉDE, S.; THIOLAT, D.; COVES, S.; COURTOIS, P.; VINCENDEAU, P.; MOSSALAYI, D. Quercetin Induces Apoptosis of *Trypanosoma brucei gambiense* and Decreases the Proinflammatory Response of Human Macrophages. *Antimicrob Agents and Chemother.*, v.48, n.3, p.924 – 929, 2004

MELO, F; AMARAL, M.; OLIVEIRA, P.; LIMA, W.; ANDRADE, M.; MICHALICK, M.; RASO, F.; TAFURI, W.; TAFURI, W. Diffuse intralobular liver fibrosis in dogs naturally infected with *Leishmania* (*Leishmania*) chagasi. *Amer J of Trop Med and Hyg.* v.79, n.2, p.198-204, 2008.

MICHALICK, M.S.M.; NEVES, D.P.; MELO, A.; LINARD, P.M.; VITOR, R.W.A. O Gênero *Leishmania*. In : *Parasitologia humana*. 11º ed. São Paulo: Atheneu, p. 41-46, 2005.

NAKAMURA, C.V.; SANTOS, A.O.; VENDRAMETTO, M.C.; LUIZE, P.S.; DIAS FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; UEDA-NAKAMURA, T. Atividade antileishmaniana do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. *Farmacog.*, v. 16, n.1, p. 61-66, 2006.

OLIVEIRA, D. R. Contribuição ao estudo da bioprospecção farmacológica de plantas medicinais do nordeste brasileiro: barbatimão (*Stryphnodendron rotundifolium* Mart.). Dissertação de mestrado, 2010.

OLIVEIRA, D. R.; BRITO-JUNIOR, F.E.; BENTO, E. B.; MATIAS, E.F.F.; SOUSA, C. A.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; KERNTOPF, M. R.; MENEZES, I. R. A. Antibacterial and modulatory effect of *Stryphnodendron rotundifolium* Pharmaceutical Biology, v. 49, n.12, p.1265-1270, 2011.

PAULA, C. D. R.; SAMPAIO, J. H. D.; CARDOSO, D. R. C.; SAMPAIO, R. N. R. Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrado em três doses durante uma semana e de N- metil- glucamina 20mgSbV/Kg/dia durante 20 dias para tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana. Rev. Soc. Brasil Med, Trop., v.36, n.1, p.365-371, 2003.

PEREIRA, B. S.: Avaliação das atividades gastroprotetora e hepatoprotetora dos extratos hexânico e etanólico das folhas de *Momordica charantia* L. em modelo experimental in vivo. UECE, 2006.

PEREIRA, B. S.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S; VASCONCELOS , A. K. P.; PINHEIRO, A. D. N. RODRIGUES, P.A. Atividade hepatoprotetora dos extratos etanólico e hexânico das folhas de *Momordica charantia* L. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.12, n.3, p.311-316, 2010.

PEREIRA, M. N. S.; ANDRADE, A. C. U.; PILÓ-VELOSO, D. Isolamento e identificação de metabólitos secundários das folhas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17. Cuiabá. Resumos. Cuiabá: UFMT, 2002.

PONNAPPA, B.C.; RUBIN, E. Modeling alcohol's effects on organs in animal models. Alcohol Res Health. v.24, n.2, p.93-104, 2000.

RAJESH, M.G.; LATHA, M.S. Preliminary evaluation of the antihepatotoxic activity of Kamilari, a polyherbal formulation. Jo of Ethnopharmac. v. 91, n.1, p. 99–104, 2004.

RAHMAN, T. M.; HODGSON, H. J.. Animal models of acute hepatic failure. Int J Exp Pathol. v.81, n.2, 2000

RALLIS, T.; DAY, M.J.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; ADAMAMA-MORAITOU, K. K.; PAPAZOGLU, L.; FYTIANOU, A.; KOUTINAS, A. F. Chronic hepatitis associated with canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 cases. J of Comp Pathol., v.132, n. 2, p.145-152, 2005.

REICHER, F.; LEITNER, S. C. S.; SIERAKOWSKI, M. R.; FONTANA, J. D.; CORREA, J. B. C. Properties of the seed gum of *Stryphnodendron barbatiman* (barbatimão). Appl. Biochem. Biotechnol., Clifton, v.34/35, n.1, p.349, 1992.

ROCHA, L.G.; ALMEIDA, J.R.G.S.; MACÊDO, R.O.; BARBOSA-FILHO, J.M. A review of natural products with antileishmanial activity. Phytomedicine, v.12, n.1, p.514-535, 2005.

RODRIGUES, F.F.G.; CABRAL, B.S.; COUTINHO, H.D.M.; CARDOSO, A.L.H.; CAMPOS, A. R.; COSTA, J. G. M. Antiulcer and antimicrobial activities of *Stryphnodendron rotundifolium* Mart. Phcog Mag. v.4, n.15, 2008

ROJKIND, M.; GREENWEL, P. Pathophysiology of Liver Fibrosis. In: ARIAS, I.M. ed.chefe, BOYER, J.L. et al. ed.assoc. The Liver: Biology and Pathology. 4a. ed. Lippincott Williams & Wilkins. Cap. 49, p. 721-738, 2001.

SANCHES, A. C. C.; LOPES, G. C.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P. Antioxidant and antifungal activities of extracts and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth. Rev. Bras. Cienc. Farm., v.41, p.101-107, 2005.

SANTORO, G.F.; CARDOSO, M.G.; GUIMARÃES, L.G.; MENDONÇA, L.Z.; SOARES, M.J. Trypanosoma cruzi: activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. Exper Parasitol., v. 116, n.1, p. 283-290, 2007.

SEN, G.; MUCKHOPADHYAY, S.; RAY; BISWAS, T. Quercetin interferes with iron metabolism in *Leishmania donovani* and targets ribonucleotide reductase to exert leishmanicidal activity. J of Antimicrob Chemot, v.61, n.1, p.1066-1075, 2008.

SHERLOCK, S.; DOOLEY, J. Anatomy and Function. In: _____. Diseases of The Liver and Biliary System. Blackwell Publishing Ltd, 11a. ed., Cap.1, p. 1-17, 2002.

SIMÕES-MATTOS, L.; TEIXEIRA, M.J.; COSTA, D.C.; PRATA JR., J.R.C.; BEVILAQUA, C.M.L.; SIDRIM J.J.C.; ROCHA M.F.G. Evaluation of terbinafine treatment in *Leishmania chagasi*-infected hamsters (*Mesocricetus auratus*). Veteri Parasitol., v.103, p.207-216, 2002.

SINDERMANN, H.; CROFT, S. L.; ANGEL, K. R; BOMMER, W.; EIBL, H. J.; UNGER, C.; ANGEL, J. Miltefosine (impavido): the first oral treatment against leishmaniasis. Med. Microbiol Immunol, Berlin. v. 193, p.173-180, 2004.

SULSEN, V.P.; CAZORLA, S.I.; FRANK, F.M.; REDKO, F.C.; ANESINI, C.A.; COUSSIO, J.D.; MALDCHIODI, E.L.; MARTINO, V.S.; MUSCHIETTI L.V. Trypanocidal and Leishmanicidal Activities of Flavonoids from Argentine Medicinal Plants. Amer Soci of Trop Med and Hyg., v.77, n. 4, p.654-659, 2007

TAKASAKI, S.; HANO, H. Three-dimensional observations of the human hepatic artery (Arterial system in the liver). J Hepatol., v.34: p.455- 466, 2001.

TAFURI, W.L.; SANTOS, R.L.; ARANTES, R.M.E.; GONÇALVES, R.; MELO, M.N.; MICHALICK, M.S.M.; TAFURI, W.L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. J of Immunol Meth., v.292, n. 1/2, p.17-23, 2004.

TEMPONE, A.G.; SARTORELLI, P.; MADY, C.; FERNADES, F. Natural products to anti-trypanosomal drugs: an overview of new drug prototypes for american trypanosomiasis. Cardiovas & Hematol agents in Med Chem, n. 5, p. 222-235, 2007

WATSON, L.; DALLWITZ, M. J. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, information retrieval. 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chagas Disease. 2002.