



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE  
PPGSHMA

**Danielle Feijó de Moura**

**Avaliação da toxicidade e efeitos biológicos do  
látex extraído de *Himatanthus drasticus* (Mart.)**

**PLUMEL**

**Vitória de Santo Antão**

**2016**

**Danielle Feijó de Moura**

**Avaliação da toxicidade e efeitos biológicos do látex  
extraído de *Himatanthus drasticus* (Mart.) PLUMEL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Saúde Humana e Meio Ambiente

Orientador: Prof. Dr. René Duarte Martins

Co-Orientador: Prof. Dr. Alexandre Gomes da Silva

**Vitória de Santo Antão**

**2016**

Catálogo na Fonte  
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.  
Bibliotecária Jaciane Freire Santana, CRB4: 2018

M929a      Moura, Danielle Feijó de.  
Avaliação da toxicidade e efeitos biológicos do látex extraído de *Himatanthus  
drasticus* (Mart.) PLUMEL / Danielle Feijó de Moura. - 2016.  
54 folhas: il., tab.

Orientador: René Duarte Martins.  
Coorientador: Alexandre Gomes da Silva.  
Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Universidade  
Federal de Pernambuco, CAV, Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana  
e Meio Ambiente, 2016.  
Inclui bibliografia.

1. Fitoterapia. 2. Plantas medicinais. 3. Botânica. I. Martins, René Duarte  
(Orientador). II. Silva, Alexandre Gomes (Coorientador). III. Título.

615.537 CDD (23.ed.)

**BIBCAV/UFPE- 61/2016**



Dissertação de Mestrado apresentada por **Danielle Feijó de Moura** ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, sob o título "**Avaliação da toxicidade e efeitos biológicos do látex extraído de Himatanthus drasticus (MART) PLUMEL**", orientada pelo Prof. Dr. René Duarte Martins e coorientada pelo Prof. Dr. Alexandre Gomes da Silva, aprovada no dia 02 de fevereiro de 2016 pela Banca Examinadora composta pelos seguintes professores:

---

**Dr.<sup>a</sup> Idjane Santana de Oliveira**  
Núcleo de Enfermagem – CAV/UFPE

---

**Dr.<sup>a</sup> Vitorina Nerivania Covello Rehn**  
Núcleo de Enfermagem – CAV/UFPE

---

**Dr. Cristiano Aparecido Chagas**  
Núcleo de Biológicas – CAV/UFPE

Autora

---

**Danielle Feijó de Moura**

“Deem graças em todas as circunstâncias,  
pois esta é a vontade de Deus para vocês”

1 Tessalonicenses 5:18

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por está sempre cuidando e me dando forças para seguir, e por todas as bênçãos alcançada durante este trabalho, obrigada por ter me dado à chance de viver e aprender cada vez mais.

A família, minha mãe Edijane, irmã Dayane, Avó Carminha e esposo Clebson, que sempre estiveram presentes, nos momentos mais importantes, com carinho, amor e incentivo.

Aos meus professores orientadores, René Duarte e Alexandre Gomes que exerceram um inestimável zelo pelo meu desenvolvimento pessoal e profissional.

A minha professora e amiga Vitorina Rehn, pelo carinho, paciência, dedicada em toda minha formação acadêmica e por me ajudar sempre que eu precisei, com palavras de incentivo para o meu crescimento profissional e pessoal.

A Professora Idjane Oliveira por sua amizade, carinho, passando o seu conhecimento que foram de fundamental importância para a realização desse trabalho.

A professora Maria Carolina Accioly pela amizade e colaboração indispensável na realização deste trabalho.

A professora Marcia Vanusa pela valiosa ajuda nas coletas e por ter me acolhido no laboratório, com seu valioso conhecimento.

A professora Ivone Souza e todos seus alunos pela atenção, confiança e contribuições no estudo.

A professora Noêmia Pereira pelo apoio e colaboração para realização do estudo.

Ao Professor Cristiano Chagas pelo apoio e valiosa contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Francisco Amanajás, pela inestimável contribuição no estudo histopatológico.

Ao professor Sérgio Freitas, por sua valiosa contribuição em minha vida acadêmica, sempre disponível e atencioso.

Ao Veterinário Vinícius Vasconcelos, pela manutenção do biotério, e todo apoio, disponibilidade e confiança.

Ao técnico Renato pela amizade, atenção e ajudas nos experimentos direta e indiretamente.

Aos amigos, companheiros do mestrado e bancada Sarana Pereira e Diego Leandro, pelo carinho, dedicação e apoio, que nossa amizade engradeça cada vez mais.

Aos amigos e companheiros de laboratórios por onde passei Talita Giselly, Tamires Rocha, Marlllyn Marques, Bárbara Ramos e Meykson Alexandre pela ajuda nos experimentos e pelos momentos de descontração, vocês foram de fundamental importância para a concretização desse trabalho.

A todos os estudantes que constituem a equipe do Laboratório de Parasitologia, principais responsáveis pelo ambiente acolhedor e fraterno.

Ao Corpo docente e discente do Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente da UFPE- CAV, pelos ensinamentos ao longo do curso.

A secretaria do Programa de Pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da UFPE-CAV, pela paciência e ajuda.

A FACEPE pelo apoio financeiro durante toda a pesquisa.

Aos camundongos que doaram e doam as suas vidas para que nós, possamos caminhar em direção ao progresso.

Termino agradecendo a todos os amigos companheiros que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão de mais uma etapa da minha vida.

Meu muito obrigada!

## SUMÁRIO

<b>1.1 Introdução</b>	14
<b>1.2 Objetivos</b>	16
1.2.1 Objetivo Geral	16
1.2.2. Objetivos Específicos	16
<b>1.3 Revisão da Literatura</b>	17
<b>1.3.1 Plantas Medicinais Nativas da Flora Brasileira</b>	17
<b>1.3.2 Família Apocynaceae</b>	17
<b>1.3.3 Gênero <i>Himatanthus</i></b>	18
<b>1.3.4 <i>Himatanthus drasticus</i> (Mart.) PLUMEL</b>	19
1.3.4.1 Descrição Botânica	19
1.3.4.2 Manejo popular de <i>Himatantus drasticus</i>	21
1.3.4.3 Princípio Ativo x Ação Farmacológica	26
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>Avaliação da toxicidade e efeitos biológicos do látex extraído de <i>Himatanthus drasticus</i> (Mart.) PLUMEL</b>	28
2.1 Resumo	28
2.2 Introdução	30
2.3 Material e Métodos	32
2.5 Resultados	38
2.6 Discussão	43
2.7 Conclusões	45
2.8 Referências Bibliográficas	46
<b>CONCLUSÕES</b>	50
<b>REFERÊNCIAS</b>	51

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

- Figura 1 Distribuição geográfica de *Himatanthus drasticus* (Mart.) PLUMEL 23
- Figura 2 *Himatanthus drasticus* (Mart.) PLUMEL (A) e casca do caule (B) 24
- Figura 3 Folha (A), Flores (B) e Fruto (C) de *Himatanthus drasticus* (Mart.) PLUMEL 24
- Figura 4 Sementes de *Himatanthus drasticus* (Mart.) PLUMEL..... 25
- Figura 5 Látex e garrafada do látex Janaguba..... 25

### Capítulo 2

- Figura 1 Curva padrão do Ácido Gálico e Trolox comparadas com o látex de *H. drasticus*. 42

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 2

Tabela 1	Classes de metabólitos secundários presentes no látex de <i>Himatanthus drasticus</i> .	38
Tabela 2	Resultado da análise de células para o teste de micronúcleo. ....	39
Tabela 3	Resultados da análise de células para o ensaio cometa.....	39
Tabela 4	Ensaio citotóxico do látex de <i>H. drasticus</i> em células neoplásicas humana ...	40
Tabela 5	Concentração inibitória mínima do látex de <i>H. drasticus</i> .....	41
Tabela 6	Atividade antioxidante do látex de <i>H. drasticus</i> .....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
ATCC	American Type Culture collection
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	Dimetil-Sulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
e.g.	Exempli gratia
HdLP	Fração Proteica do Látex de <i>Himatanthus drasticus</i>
IPA	Instituto Agrônômico de Pernambuco
Kg	Quilograma
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami.
MHA	Agar Mueller-Hinton
MIC	Concentração Inibitória Mínima
MI	Miligrama
µL	Microlitros
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina
MTT	sal de tetrazólio
NRU	Neutral Red Uptake
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
TLC	Thin Layer Chromatography
TTC	2, 3, 5 cloreto de trifeniltetrazólio
PBS	Solução Salina com Tampão Fosfatos

## RESUMO

*Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel é uma espécie arbórea que pode chegar a sete metros de altura. Mais conhecida como janaguba é encontrada em áreas de cerrado, caatinga, campos rupestres e floresta tropical. Os usuários afirmam que a planta serve para o tratamento de tumores, hemorroidas, infecções do trato respiratório, aparelho digestivo e trato urogenital. Também relatam ação analgésica e antialérgica. Considerando as poucas publicações científicas sobre os efeitos farmacológicos da janaguba, o presente estudo avaliou os efeitos biológicos do látex em vários modelos experimentais. O látex dissolvido em água e liofilizado foi submetido à cromatografia em camada delgada, para a determinação das classes de metabólitos secundários, e empregado diretamente em ensaios de toxicidade aguda por gavagem (diretriz 425 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico), citotoxicidade (sarcoma 180 e carcinoma de Erlich), tripanocida (frente à cultura de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*), antibacteriano (microdiluição em caldo), antioxidante (método 2,2-difenil-1-picrilhidrazil), atividade antioxidante total e dosagem de fenóis, atividade genotóxica (ensaio cometa) e mutagênica (teste do micronúcleo). A cromatografia revelou a presença das seguintes classes: esteroides, saponinas, monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, além de e açúcares redutores. Não houve efeito tóxico e citotóxico nem dano histopatológico (fígado, baço, coração, rim, pulmão). O látex não teve ação tripanocida. O método de microdiluição em caldo revelou um efeito inibitório nas concentrações de 3,13 e 1,56 para *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 e *Escherichia coli* ATCC 25922 respectivamente. O látex não teve atividade antioxidante significativa possivelmente devido ao valor reduzido dos compostos fenólicos ( $24,52 \pm 0,21 \mu\text{g EAG/mg}$ ). O teste de micronúcleo mostrou que o látex da janaguba não é mutagênico, mas pelo teste de cometa é considerado genotóxico. Esses resultados sugerem que o látex de *H. drasticus* possui segurança para uso agudo e potencial farmacológico antibacteriano.

**Palavras-chave:** Janaguba. Fitoterapia. Apocynaceae. Perfil Fitoquímico

## ABSTRACT

*Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel is an arboreal species which can reach seven meters tall. More commonly known as janaguba is encountered in areas of cerrado, caatinga, rock fields and rainforest. The users claim that the plant serves for the treatment of tumors, hemorrhoids, respiratory tract infection, digestive and urogenital tract. They also report analgesic and antiallergic action. Considering the few scientific publications on the pharmacological effects of janaguba, the present study evaluated the biological effects of latex in various experimental models. The latex dissolved in water and lyophilized was subjected to thin layer chromatography, for the determination of classes of secondary metabolites, and directly employed in acute toxicity tests by gavage (guideline 425 of the Organization for Economic Cooperation and Development), cytotoxicity (sarcoma 180 and Ehrlich carcinoma), trypanocidal (front culture *Trypanosoma cruzi*), antibacterial (microdilution), antioxidant (using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), total antioxidant activity and dosing phenols, genotoxic activity (comet assay) and mutagenic (micronucleus test). The chromatography revealed the presence of the following classes: steroids, saponins, monoterpenes, sesquiterpenes, triterpenes, and addition of reducing sugars. There was no toxic or cytotoxic effect and histopathologic injury (liver, spleen, heart, kidney, and lung). The latex had no trypanocidal action. The microdilution broth method has revealed an inhibitory effect at concentrations of 3.13 and 1.56 for *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 and *Escherichia coli* ATCC 25922 respectively. The latex had no significant antioxidant activity possibly due to the reduced amount of phenolic compounds ( $24.52 \pm 0.21$  ug EAG / mg). The micronucleus test showed that the latex janaguba is not mutagenic, but the comet test is considered genotoxic. These results suggest that the latex *H. drasticus* has security for acute use and antibacterial pharmacological potential.

**Keywords:** janaguba. Phytotherapy. Apocynaceae. profile Phytochemical

# CAPÍTULO 1

## 1.1 Introdução

As plantas constituem uma fonte de compostos químicos ativos que podem ser utilizados no tratamento de diversas doenças (ROCHA e ROCHA , 2006). Entre as espécies botânicas, destacam-se as nativas do Brasil. A flora brasileira é abundante não só em termos de biodiversidade mais também em compostos bioativos com potencial terapêutico. Entretanto, esse conhecimento ainda se difunde oralmente entre comunidades com baixo poder aquisitivo. A maioria desses princípios ativos, inclusive oriundos de plantas laticíferas, utilizados para o tratamento de doenças, ainda não foram confirmados cientificamente (CONSERVATION INTERNATIONAL, 2010).

O látex geralmente apresenta uma coloração branca de aspecto leitoso que é utilizado pela planta como mecanismo de defesa. Está presente em aproximadamente 12.500 espécies, distribuídas em 22 famílias. A família Apocynaceae detém o maior número de plantas laticíferas que contribuem com compostos terapêuticos (LORENZI e MATOS, 2002).

Entre as plantas nativas brasileiras pertencentes a essa família está a *Himatanthus drasticus* (Mart.) PLUMEL, espécie arbórea, que pode atingir até sete metros de altura, com folhagem densa nas extremidades dos ramos (PLUMEL, 1991; SOUSA, 2009; LUCETTI *et al.*, 2010).

Essa árvore está distribuída entre os estados do Rio Grande do Norte, Piauí, Amazônia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Maranhão, Pará, Roraima, Minas Gerais, Bahia e no Ceará, onde a planta é encontrada com frequência na Chapada do Araripe e é conhecida popularmente por janaguba (SPINA, 2004). Nesse estado predomina o uso anti-inflamatório (KAPLAN, 1967).

Embora a literatura científica seja escassa sobre a natureza fitoquímica de *H. drasticus*, alguns pesquisadores atestaram, na casca, a presença de triterpenos, moléculas com propriedades anti-inflamatória, bactericida, fungicida, antiviral, analgésica, antialérgica e anticarcinogênica (PATOCKA, 2003), alcaloides e taninos, que podem ser potencialmente ativos, cumarinas com potencial antimicrobiano, anti-inflamatório, antiviral e antioxidante, e saponinas, com ação antifúngica e hipocolesterolemiantes (LUZ *et al.*, 2014).

O extrato das folhas, constituído por proantocianidinas, leucoantocianidinas, terpenos e, em maior concentração os flavonoides quercetina e rutina, promoveu uma significativa inibição do carcinoma de Ehrlich em camundongos (SOUSA, 2009). Estudo anterior atribuiu aos flavonoides a atividade antitumoral (YANG *et al.*, 2001).

Do látex foram isolados terpenos com ação gastroprotetora (antiulcerogênica) (COLARES *et al.*, 2008) e com atividade antitumoral (SOUSA, 2009).

Embora a casca, as folhas e o látex tenham indicação de uso, apenas o látex tem ampla distribuição no Brasil sendo comercializado na forma de garrafada (MODESTO, 1997) para tratar e prevenir diferentes doenças inflamatórias, tumores, verminose, gastrite e artrite (KAPLAN, 1967; AMARO *et al.*, 2006; LUZ *et al.*, 2014).

O “leite da janaguba” é comercializado no estado do Ceará e em outros estados da federação desde 1997 (MODESTO, 1997), mas faltam estudos científicos que esclareçam seu perfil fitoq

uímico, toxicidade aguda, citotoxicidade, efeito tripanocida, antimicrobiano, atividade antioxidante, atividade genotóxica e mutagênica. O presente estudo verificou a toxicidade e os efeitos biológicos do látex em modelos experimentais.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do látex extraído de *Himatanthus drasticus* (Mart.) PLUMEL, em modelos experimentais diversos.

### 1.2.2. Objetivos específicos

- Verificar a “*in vivo*” toxicidade do látex de *Himatanthus drasticus* (Mart.) PLUMEL .
- Analisar citotoxicidade contra células tumorais “*in vitro*” do látex de *Himatanthus drasticus* (Mart.) PLUMEL.
- Avaliar os efeitos tripanocida frente à cultura do *Trypanosoma cruzi* “*in vitro*” do látex de *Himatanthus drasticus* (Mart.) PLUMEL.
- Analisar a atividade antimicrobiana “*in vitro*” do látex de *Himatanthus drasticus* (Mart.) PLUMEL.
- Avaliar a capacidade antioxidante “*in vitro*” do látex de *Himatanthus drasticus* (Mart.) PLUMEL.
- Verificar a genotoxicidade e mutagenicidade “*in vitro*” do látex de *Himatanthus drasticus* (Mart.) PLUMEL.

## **1.3 Revisão da Literatura**

### **1.3.1 Plantas Medicinais Nativas da Flora Brasileira**

O Brasil é considerado o território com maior diversidade de substâncias bioativas provenientes de espécies endêmicas. No que diz respeito a dimensão da diversidade biológica, esta, é fortemente significativa, tanto em relação ao número de espécies que compõem os ecossistemas (CONSERVATION INTERNATIONAL, 2010), quanto às reais potencialidades genéticas (BRASIL, 1998).

Considerando a diversidade biológica dos vegetais, a floresta amazônica possui o maior acervo de plantas medicinais. As ervas medicinais são utilizadas para a produção de fármacos, poucos efeitos colaterais e custo inferior quando comparados com os medicamentos sintéticos (FÚZER; SOUZA, 2003).

A indústria farmacêutica brasileira tem investido em pesquisas com a finalidade de descobrir novas moléculas com atividade terapêutica que são patenteadas e utilizadas na produção de novas gerações de medicamentos (GUERRA; NODARI, 2003).

Nogueira e colaboradores (2010) consideram essa ação da indústria farmacêutica insipiente uma vez que cerca de 85% das espécies botânicas ainda não foram cientificamente investigadas, e a organização não governamental Conservation International (2010) ainda alerta para o manejo incorreto das plantas que contribui sobremaneira para a sua extinção.

### **1.3.2 Família Apocynaceae**

A família Apocynaceae é composta por cerca de 200 gêneros e 2000 mil espécies distribuídas em áreas tropicais e subtropicais (JOLY, 2002).

Esta família é formada por árvores, arbustos, ervas ou lianas (trepadeiras) latentes (JUDD *et al.*, 1999). As tipificações de frutos presentes nesta família são: folículo, drupa, cápsula, porém o folículo é considerado o mais presente, as sementes podem ser ou não comosas e também aladas ou ariladas (BARROSO *et al.*, 1999; ENDRESS; BRUNYS, 2000; SIMÕES; KINOSHITA, 2002).

Os frutículos pertencentes à família Apocynaceae podem ser ocasionalmente solitários por causa do aborto de um dos ovários, mas, normalmente são gêmeos (TORRES e GALETTO, 1999; SIMÕES e KISHONITA, 2002).

Os componentes químicos presentes na família são: glicosídeos cianogénicos e cardioativos, taninos, saponinas, ácidos fenólicos, ciclitóis, triterpenóides e cumarinas (EVANS, 2002).

Na família Apocynaceae, há a presença de tecidos laticíferos não articulados, ramificados ou não ramificados. A maioria produz látex, que contém diversos tipos de alcaloides, estes por sua vez, estão associados com a defesa da planta contra organismos herbívoros (VICENTINI e OLIVEIRA, 2002) e, nas espécies do gênero *Himatanthus*, apresentam atividade medicinal (SPINA, 2004).

### 1.3.3 Gênero *Himatanthus*

No final da década de 30, Woodson (1938), asseverou a ideia de autoria do pesquisador Willdenow, que predizia a divisão dos gêneros *Himatanthus* e *Plumeria*.

Woodson (1938) reclassificou por sinonímia 13 espécies, anteriormente descritas pelo pesquisador Mueller, sendo elas: *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson, *Himatanthus attenuatus* (Benth) Woodson, *Himatanthus bracteatus* (A. DC.) Woodson, *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel, *Himatanthus fallax* (Mull, Arg.) Plumel, *Himatanthus lancifolius* (Mull, Arg.) Woodson, *Himatanthus Obovatus* (Mull, Arg.) Woodson, *Himatanthus phagedaenicus* (Mart.) Woodson, *Himatanthus semilunatus* Markgr., *Himatanthus speciosus* (Mull. Arg.) Plumel, *Himatanthus*

*stenophyllus* Plumel, *Himatanthus succuba* ( Spruce) Woodson e *Himatanthus tarapotensis* ( K. Schum.) Plumel.

Plumel (1991), ao analisar as espécies e os dados bibliográficos, confirmou a separação dos gêneros mencionados e adicionou dois subgêneros ao gênero *Himathantus*: *Obovatae* e *Lanceolatae*, com base na morfologia das folhas. Essa proposta não foi aceita pelos pesquisadores. Spina (2004) esclarece a recusa afirmando que os subgrupos não são monofiléticos e na pouca consistência dos caracteres morfológicos selecionados por Plumel.

A última revisão para o gênero reconheceu apenas nove espécies de *Himathantus*: *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson, *Himatanthus attenuatus* (Benth) Woodson, *Himatanthus bracteatus* (A. DC.) Woodson, *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel, *Himatanthus revolutus* (Huber) Spina & Kinoshita, *Himatanthus Obovatus* (Mull, Arg.) Woodson, *Himatanthus phagedaenicus* (Mart.) Woodson, *Himatanthus semilunatus* Markgr., e *Himatanthus tarapotensis* (Schum. ex Markgr.) Plumel (SPINA 2004).

O gênero é encontrado na zona neotropical até o trópico de Capricórnio (SPINA, 2004). A maior parte das espécies de *Himatanthus* está presente na região da Amazônia. As espécies que habitam no cerrado e caatinga (savanas neotropicais – PINHEIRO, 2010), campo rupestre e mata atlântica e são restritas ao Brasil são: *Himatanthus bracteatus* e *Himatanthus drasticus* (FIGURA 1) (SPINA, 2004).

### **1.3.4 *Himatanthus drasticus* (Mart.) PLUMEL**

#### **1.3.4.1 Descrição Botânica**

A *Himathantus drasticus* (FIGURA 2A) consiste em uma espécie arbórea, que pode atingir cerca de sete metros de altura e desenvolve folhagem densa na extremidade dos ramos. A casca tem um aspecto rugoso (FIGURA 2B) e libera espontaneamente um látex de coloração branca (PLUMEL, 1991; MODESTO, 1997; LORENZI e MATOS, 2002).

As folhas (FIGURA 3A) são curtas, pecioladas e coriáceas. As flores (FIGURA 3B) são pequenas, brancas e odoríferas, com os lobos mais compridos do que o tubo da corola (proporção de 4:3), possuem dois apêndices apicais longos e folículos pequenos, a cabeça do estilete é obcônico e faltam ornamentos e tricomas (SPINA, 2004).

A *H. drasticus* apresenta um fruto (FIGURA 3C) do tipo folículo, cilíndrico, levemente arqueado, com formato de chifre, polispérmico. O fruto é constituído por 42 sementes em média. É seco, deiscente, aberto por uma fenda única localizada na sutura ventral ao longo da linha de ligação dos bordos do carpelo, revelando a deiscência septícida (BARROSO *et al.*, 1999).

A floração ocorre do início de novembro até o final de maio e a frutificação de fevereiro a outubro (MORANGAS, 2006).

As sementes são pequenas e aladas (FIGURA 4) com 3,3 - 5,0 cm de comprimento por 2,5 - 4,7 cm de largura. Essas estruturas geralmente estão associadas com anemocoria, favorecendo a dispersão (BARROSO *et al.*, 1997).

O tipo de germinação é faneroépigea cotiledonar, havendo emissão da raiz a partir do quinto dia de sementeira, levando então, ao rompimento tegumentar na base do dorso da semente, o que resulta na exposição do hipocótilo. O hipocótilo caracteriza-se por sua forma cilíndrica, glabro, verde intenso, longo, curvado, constituindo um joelho na parte inicial da emergência da plântula, se torna ereto e realiza o erguimento dos cotilédones (AMARO *et al.*, 2006).

A raiz dessa planta é de pigmentação branca, cilíndrica e sua base é pontiaguda, com o decorrer do desenvolvimento, a raiz vai demonstrando uma camada de pelos simples, finos, brancos translúcidos que se entrelaçam e tornam-se consideravelmente densos (AMARO *et al.*, 2006).

As primeiras raízes secundárias originam-se abaixo do coleto. O coleto possui como característica um maior diâmetro em relação ao hipocótilo além do mais é

delimitado pela camada pelúcida densa. A constituição dessa planta também apresenta coifa fina, branco gelo, glabra e com base pontiaguda (AMARO *et al.*, 2006).

#### **1.3.4.2 Manejo popular de *Himatantus drasticus***

É conhecida como tiborna, raivosa e jasmim-manga em Minas Gerais e na Bahia, janaguba no Rio Grande do Norte e Ceará, sucuuba na Amazônia, pau-de-leite no Piauí (PLUMEL, 1991) e janaúba vermelha no Maranhão (LINHARES e PINHEIRO, 2011).

Nas comunidades maranhenses o látex de *H. drasticus* é utilizado para fins terapêuticos na medicina humana (*e.g.* inflamações uterinas, gastrite, anemia, câncer) e na alimentação como fortificante (LINHARES e PINHEIRO, 2011). A casca é utilizada na medicina veterinária para o controle de verminoses em caprinos (LUZ *et al.*, 2014). Na Chapada do Araripe, estado do Ceará, o látex é utilizado para combater o câncer, verminoses, gastrites e artrites (AMARO *et al.*, 2006).

A literatura científica apresenta pequenas variações quanto a coleta e beneficiamento do látex (FIGURA 5A). No Maranhão após o corte da casca o látex é coletado usando uma esponja embebida em água, na sequência a esponja é comprimida em um recipiente com água. Após a decantação do látex, a fração superior é descartada e o decantado é filtrado utilizando tecido de algodão e envazado para comercialização (LINHARES; PINHEIRO, 2011).

Em outras regiões do Nordeste brasileiro o “leite” da janaguba vem sendo comercializado na forma de garrafadas (FIGURA 5B) que podem ser preparadas: (1) diluindo o látex em água na proporção de 1:10. A mistura é armazenada em recipientes de vidro (MODESTO, 1997), (2) diluindo na proporção de 1:4 em água. Na sequência uma colher de sopa dessa mistura deverá ser adicionada a um copo com água. O doente poderá ingerir no máximo dois copos ao dia (SOUSA, 2009) e (3) removendo 10 x 30 cm da casca do tronco, seguido da coleta do látex em colher (BALDAUF e SANTOS, 2013) contendo água. Posteriormente essa mistura será

diluída em um litro de água. Após a sedimentação do látex surgirá um sobrenadante róseo. Essa mistura deverá ser mantida resfriada (FONSECA, 2011). Comparando os métodos de coleta do látex, Linhares e Pinheiro (2011) concluem que o método da colher diminui as chances de contaminação com microrganismos.

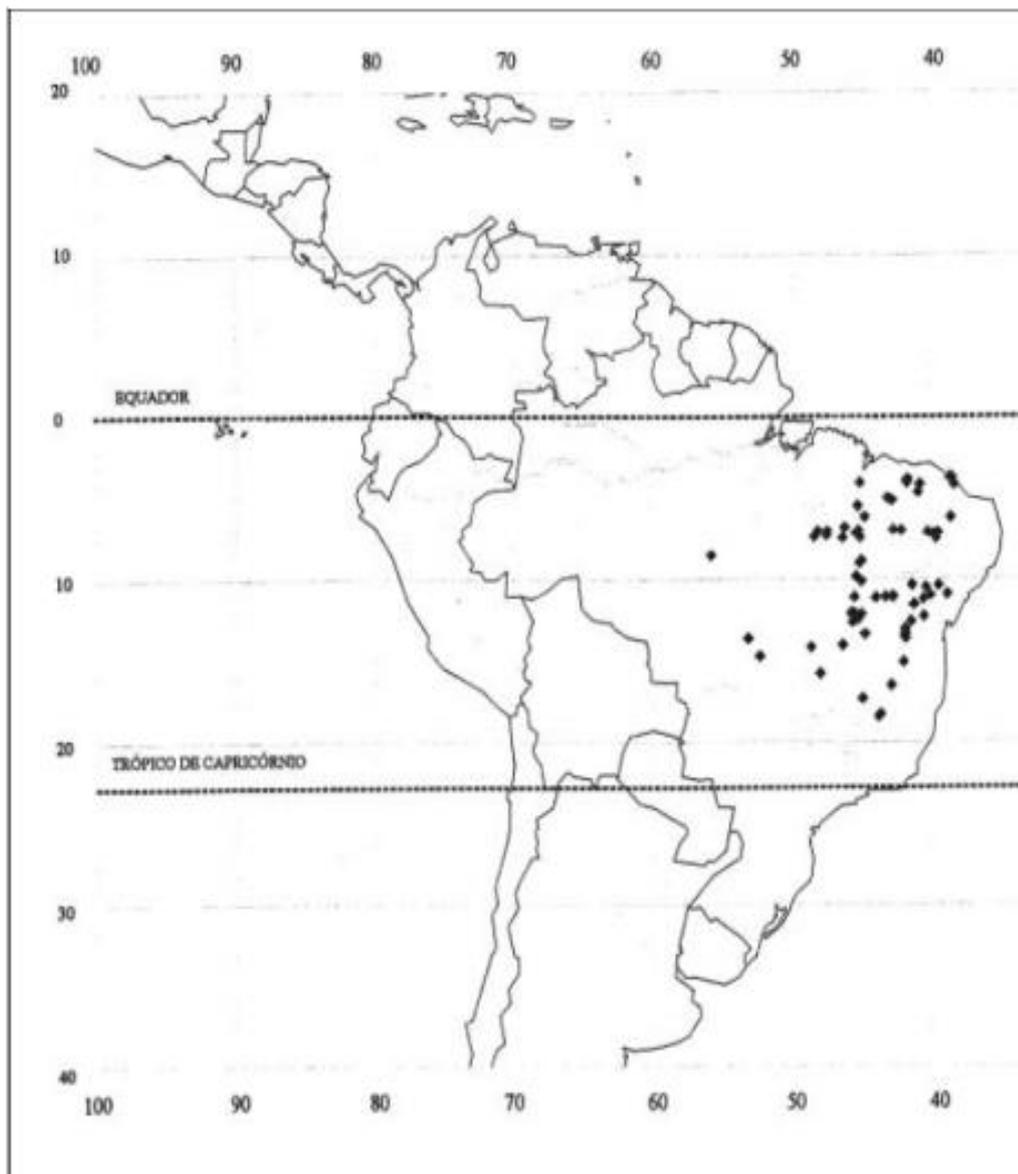
Linhares e Pinheiro (2011), considerando as condições maranhenses, também observaram que as plantas mais altas geram mais látex e a produção aumenta no período chuvoso, embora a melhor qualidade ocorra no período de estiagem.

A comercialização do látex representa uma importante fonte de renda para parte da população rural de Alcântara, no Maranhão, mas a extração desordenada e a falta de mão de obra especializada tem reduzido o número de espécimes em fase de produção (LINHARES e PINHEIRO, 2011). Observando o manejo popular da planta na região da Chapada do Araripe, Baldauf e Santos (2013) concluíram que a extração demasiada do látex pode comprometer o desenvolvimento e/ou sobrevivência da planta e ainda interferir na qualidade dos princípios ativos.

Outra questão importante é o mau uso do látex, que é tóxico quando ingerido em grandes quantidades (Menezes, 1949), e o risco de consumir o “leite” da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) comercializado no lugar do látex da janaguba (MENEZES, 1949; LORENZI; MATOS, 2008). O “leite” da mangabeira é utilizado no tratamento da tuberculose (LORENZI; MATOS, 2008; SANTOS *et al.*, 2013).

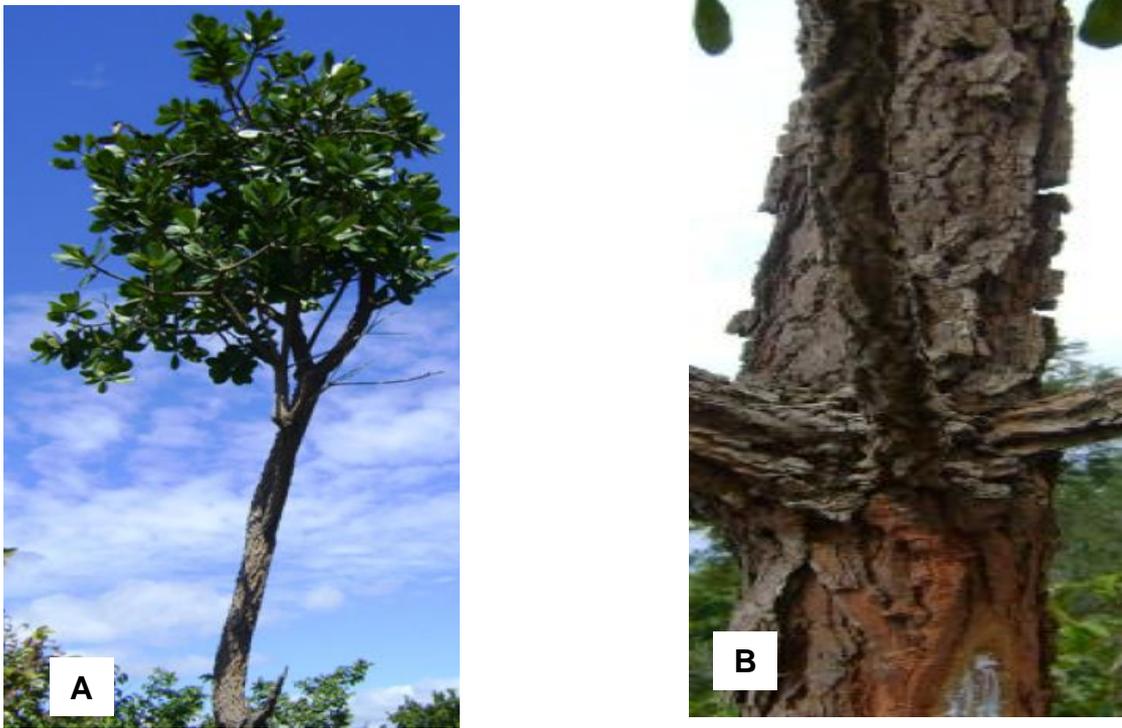
Outras partes da planta também tem efeito terapêutico. A casca, na forma de infusão, age sobre as patologias supracitadas e hemorroidas exceto no combate às verminoses. As compressas de folhas frescas servem para o tratamento do herpes, impinges e verrugas. A infusão das folhas é utilizada nas inflamações da uretra e do útero (KAPLAN, 1967).

Figura 1. Distribuição geográfica de *Himatanthus drasticus* (Mart.) PLUMEL



Fonte: Spina, 2004.

Figura 2. *Himatanthus drasticus* (Mart.) PLUMEL (A) e casca do caule (B).



Fonte: Chapada do Araripe (SOUZA, 2009).

Figura 3. Folha (A), Flores (B) e Fruto (C) de *Himatanthus drasticus* (Mart.) PLUMEL



Fonte: Chapada do Araripe (SOUZA, 2009).

<https://www.flickr.com/photos/costapppr/5564676806>

Figura 4. Sementes de *Himatanthus drasticus* (Mart.) PLUMEL



Fonte: Chapada do Araripe (SOUZA, 2009).

Figura 5. Látex e garrafada do látex Janaguba



Fonte: [http://tenhaumavidalongaesaudavel.blogspot.com.br/2014/05/leite-de-janaguba-planta-que-tem\\_27.html](http://tenhaumavidalongaesaudavel.blogspot.com.br/2014/05/leite-de-janaguba-planta-que-tem_27.html)

#### **1.3.4.3 Princípio Ativo x Ação Farmacológica dos metabólitos secundários de *H. drasticus***

Estudos químicos realizados com o látex de *H. drasticus* revelaram a presença do triterpenos (metabólitos secundários não - esteroidais, resultantes da junção de duas moléculas de C15). Sob o ponto de vista farmacológico existe um crescente interesse nesse composto, pois apresenta atividade anti-inflamatória, bactericida, fungicida, antiviral, analgésica, antialérgica e anticarcinogênica (PATOCKA, 2003).

Leite e colaboradores (2009) testaram o látex e comprovaram o efeito gastroprotetor no modelo de úlceras induzidas por etanol em animais. Lucetti e colaboradores (2010) fizeram a purificação do látex do qual isolaram o composto acetato de lupeol que, nos em ensaios *in vivo*, se mostrou eficiente no controle de processos inflamatórios. Entretanto esse composto foi ineficiente no combate aos radicais livres.

Sousa e Colaboradores (2010) submeteram as folhas à extração alcoólica (metanol) e secagem a vácuo. O extrato bruto foi administrado durante sete dias nas concentrações de 200, 300 e 400 mg/kg de camundongo com sarcoma 180. Em todas as doses houve significativa redução do sarcoma. O desempenho da janaguba ainda foi superior ao da ciclofosfamida, droga sintética utilizada nos protocolos de quimioterapia.

Mousinho e colaboradores (2011), dialisaram o látex e obtiveram a proteína HdLP que foi testada *in vivo* frente ao sarcoma 180 e carcinosarcoma 256. Em todos os experimentos os pesquisadores observaram que a proteína potencializou a ação do sistema imune, induzindo a formação de um número maior de anticorpos.

Lima (2011) atestou a atividade anti-helmíntica em pequenos ruminantes utilizando o extrato hidroalcoólico, onde foi observada a redução de ovos e larvas de nematoides gastrintestinais em ovinos.

No estudo de Marques (2012) foi demonstrada a atividade gastroprotetora de uma fração proteica do látex, reduzindo significativamente as lesões gástricas causadas pela ingestão de etanol.

No trabalho de Matos (2013) ficaram evidentes os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório do látex, administrados em diferentes modelos de inflamação, e a ausência de toxicidade. Carmo (2015) também registrou o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório, mas proveniente de uma fração proteica testada no modelo de artrite induzida por zymosan em camundongos.

## CAPÍTULO 2

### Artigo

#### **Avaliação da toxicidade e efeitos biológicos do látex extraído de *Himatanthus drasticus* (Mart.) PLUMEL**

Danielle Feijó de Moura<sup>1</sup>, Vitorina Nerivania Covello Rehn<sup>1</sup>, Idjane Santana de Oliveira<sup>1</sup>, Cristiano Aparecido Chagas<sup>1</sup>, Noêmia Pereira da Silva Santos<sup>1</sup>, Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior<sup>1</sup>, Alexandre Gomes da Silva<sup>2</sup>, Márcia Vanusa da Silva<sup>3</sup>, Rafael Matos Ximenes<sup>4</sup>, Ivone Antônia de Souza<sup>4</sup>, René Duarte Martins<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil

<sup>2</sup> Núcleo de Bioprospecção e Conservação da Caatinga/Núcleo de Ecologia e Biodiversidade, Instituto Nacional do Semiárido, Campina Grande, Paraíba, Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>4</sup> Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

### Resumo

**Relevância Etnofarmacológico:** O *Himatanthus drasticus* é uma planta arbórea que pode chegar a sete metros de altura, popularmente conhecido como janaguba, geralmente encontrada em áreas de cerrado, campos rupestres, caatinga e floresta tropical. É utilizada na medicina popular com a atividade antineoplásica, infecções do trato respiratório, do aparelho digestivo, do trato urogenital e hemorroidas, analgésica e antialérgica. No entanto são raras as publicações científicas sobre seus efeitos farmacológicos.

**Objetivo do estudo:** Este estudo teve como objetivo avaliar a segurança e os efeitos biológicos do látex extraído *H. drasticus* em vários modelos experimentais.

**Materiais e Métodos:** O látex foi extraído de espécimes *H. drasticus*, removendo uma pequena área da casca (5x30cm). O látex dissolvido em água e liofilizado foi submetido à cromatografia em camada delgada, para determinar as classes de metabólitos secundários, e sujeito a testes de segurança (toxicidade aguda pela diretriz 425 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico, genotoxicidade pelo ensaio cometa e mutagenicidade pelo micronúcleo) e testes de atividade biológica (citotoxicidade frente ao sarcoma 180 e o carcinoma de Erlich, efeito antimicrobiano por microdiluição em caldo e cultura de epimastigota de *Trypanosoma cruzi* e antioxidante (método 2,2-difenil-1-picrilhidrazil), atividade antioxidante total e dosagem de fenóis (método Folin-Ciocalteu).

**RESULTADOS:** A cromatografia revelou a presença de esteroides, saponinas, monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, além de açúcares redutores. A ausência de efeito tóxico de *H. drasticus* foi confirmado pela histopatologia. O látex também não teve efeito mutagênico, porém apresentou genotoxicidade. A utilização da concentração máxima do látex (200µg/mL) inibiu o sarcoma 180 em 46,21% e o carcinoma de Erlich em 41,79%. A microdiluição do látex em caldo inibiu todas as espécies bacterianas testadas, sendo as concentrações inibitórias mínimas de 3,13 e 1,56 eficientes frente *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 e *Escherichia coli* ATCC 25922 respectivamente. O látex (100 - 0,19µg / mL) não apresentou atividade tripanocida. A atividade antioxidante do látex foi insatisfatória sendo necessária uma maior concentração (1000 µg / mL) para reduzir 90,25% de radicais livres.

**CONCLUSÃO:** O látex de *H. drasticus* tem segurança para uso agudo e potencial farmacológico antibacteriano.

**Palavras-chave:** janaguba, fitoterapia, *Himatanthus drasticus*, Apocynaceae, atividades biológicas.

## 1 Introdução

No Brasil, o uso de plantas medicinais desempenha um papel importante nos cuidados da saúde primária, principalmente nas comunidades sem acesso aos medicamentos. De acordo com os dados do Ministério da Saúde (2015), as plantas são consideradas como fontes de compostos biologicamente ativos, utilizados por cerca de 80% da população do mundo, tanto *in natura*, como na forma de chás e na fabricação de medicamentos fitoterápicos (Horn e Vargas, 2008). No entanto, na maioria dos casos não há nenhuma comprovação científica da eficácia do tratamento e dos possíveis efeitos adversos das plantas (Silveira e Sá et al., 2003).

A relevância histórica das propriedades medicinais do gênero *Himatanthus*, família Apocynaceae, pode ser verificada pela citação de *H. lancifolius* na primeira Farmacopeia Brasileira (Silva, 1929) seguida da espécie *H. sucuuba*, citada por diferentes comunidades localizadas na região amazônica, no Peru e na Colômbia (Perdue e Blomster, 1978).

No Brasil, essas espécies eram obtidas diretamente das florestas tropicais e utilizadas por comunidades carentes. Em 2007, Amaral e colaboradores relataram a eficácia da espécie *H. sucuuba* por pacientes com tumores em diferentes fases de evolução, usando ou não quimioterapia convencional, inclusive nos casos de câncer terminal. Essa propriedade antitumoral do gênero *Himatanthus* é antiga na medicina popular sul-americana envolvendo as espécies *H. sucuuba* (Perdue e Blomster, 1978; Graham et al., 2000; Wood et al., 2001; Leão et al., 2007), *H. obovatus* (Mesquita et al., 2005), *H. bracteatus*, *H. articulatus* (Agra et al., 2007) e *H. drasticus* (Amaro et al., 2006).

*Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel é uma árvore de porte médio que cresce em terra firme na América do Sul. É popularmente conhecida como janaguba, tiboma, jasmim-manga, raivosa, joanaguba pau-de-leite, e sucuuba (Plumel, 1991). Sua casca e látex são anti-inflamatórias e estimuladoras do sistema imunológico, mas preferencialmente são utilizadas para o tratamento do câncer (Colares et al., 2008; Mousinho et al., 2011).

O extrato das folhas, constituído por proantocianidinas, leucoantocianidinas, terpenos e, em maior concentração os flavonoides quercetina e rutina, promoveu uma significativa inibição do carcinoma de Ehrlich em camundongos (SOUSA, 2009). Estudo anterior atribuiu atividade antitumoral aos flavonoides (YANG *et al.*, 2001).

Embora a literatura científica seja escassa sobre a natureza fitoquímica de *H. drasticus*, alguns pesquisadores atestaram, na casca, a presença de triterpenos, moléculas com propriedades anti-inflamatória, bactericida, fungicida, antiviral, analgésica, antialérgica e anticarcinogênica (PATOCKA, 2003), alcaloides e taninos, que podem ser potencialmente ativos, cumarinas com potencial antimicrobiano, anti-inflamatório, antiviral e antioxidante, e saponinas, com ação antifúngica e hipocolesterolemiantes (LUZ *et al.*, 2014).

Do látex foram isolados terpenos com ação gastroprotetora (antiulcerogênica) (COLARES *et al.*, 2008) e com atividade antitumoral (SOUSA, 2009).

Embora a casca, as folhas e o látex tenham indicação de uso, apenas o látex tem ampla distribuição no Brasil sendo comercializado na forma de garrafada (MODESTO, 1997) para tratar e prevenir diferentes doenças inflamatórias, tumores, verminose, gastrite e artrite (KAPLAN, 1967; AMARO *et al.*, 2006; LUZ, 2014).

O “leite da janaguba” é comercializado no estado do Ceará e em outros estados da federação desde 1997 (MODESTO, 1997), mas faltam estudos científicos que esclareçam seu perfil fitoquímico, toxicidade aguda, citotoxicidade, efeito tripanocida, antibacteriano, atividade antioxidante, atividade genotóxica e mutagênica. O presente estudo verificou a toxicidade e os efeitos biológicos do látex em modelos experimentais.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Material botânico**

Foi extraído o látex de espécimes de *H. drasticus*, retirando-se uma pequena área (5x30cm) de casca do tronco da planta (LUCETTI, 2010). Uma exsicata da planta foi encaminhada ao Herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) onde recebeu o código 92.408.

### **2.2 Análise fitoquímica**

O perfil fitoquímico do látex da planta foi realizado por cromatografia em camada delgada (TLC) de acordo com Roberts e colaboradores (1957) e Harborne (1998). Alíquotas de 10µL do látex foram aplicadas em placas de cromatografia em gel de sílica, usando sistemas de eluição e padrões adequados para investigar a presença de flavonoides, derivados cinâmicos, fenilpropanoides, triterpenos, esteroides, saponinas, monoterpenos e sesquiterpenos, alcaloides, curaminas, quinonas, proantocianidinas e leucoantocianidinas, taninos hidrolisáveis e açúcares redutores.

### **2.3 Animais**

Foram utilizados camundongos albinos *Swiss* machos, adultos, procedentes do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco. Os procedimentos com animais foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Pernambuco (processo nº 23076.008387/2015-59).

### **2.4 Toxicidade Aguda**

A avaliação da toxicidade aguda foi realizada de acordo com a diretriz 425 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2001). Três animais receberam a dose de 2000mg/kg do látex por gavagem e foram observados

durante uma hora. Nos demais 13 dias foram observados os seguintes parâmetros: alimentação, ingestão de água, peso do animal e aspecto e quantidade das fezes. No último dia os animais foram eutanasiados e necropsiados. Os órgãos foram preservados em solução de formaldeído para processamento e análise histopatológica.

## **2.5 Atividade genotóxica e mutagênica**

Os camundongos foram distribuídos em três grupos contendo cinco animais. O grupo teste recebeu uma dose de 2000 mg/kg do látex extraído de *H. drasticus* por gavagem. O grupo controle negativo recebeu o veículo no qual o látex foi dissolvido (DMSO a 20% em PBS) e o grupo controle positivo recebeu o agente mutagênico ciclofosfamida por via intraperitoneal.

Quarenta e oito horas após o tratamento, uma amostra de sangue periférico de cada animal foi coletada para o teste do micronúcleo e para o ensaio cometa. A coleta foi realizada por punção retro orbital com auxílio de um capilar de vidro.

O teste do micronúcleo seguiu o protocolo descrito por Hayashi e colaboradores (1990). Cinco microlitros do sangue foram dispensados no centro de uma lâmina de vidro preparada com laranja de acridina. Foram confeccionadas quatro lâminas de cada animal. Com o auxílio do microscópio de fluorescência Zeiss-imager M2 e filtro Alexa-flour- 488nm, 2000 eritrócitos policromáticos foram analisados quanto à presença de micronúcleos (OCDE, 2009). As médias do total de micronúcleos de cada grupo foram comparadas pelo teste de Wilcoxon considerando  $\alpha = 0,05$ .

O ensaio cometa foi realizado de acordo com Tice e colaboradores (2000). Uma amostra de 15  $\mu$ l do sangue coletado de cada animal foi homogeneizada com 100  $\mu$ l de agarose de baixo ponto de fusão em um eppendoff. Em seguida, essa mistura foi colocada em uma lâmina previamente revestida com agarose padrão. Após a adição da lamínula a lâmina foi acondicionada na geladeira por 10 min para

gelificação da agarose. Na sequência as lâminas foram imersas em uma solução de lise (3mL de TRITON X-100 + 20 mL de DMSO + 178 mL de solução de lise estoque (890 mL de água destilada + 146,1g de NaCl + 37,2 de EDTA + 1,2g de TRIS + 8g de NaOH) por no mínimo 1h. Após a lise, as lâminas foram incubadas por 10 minutos em solução tampão (1200 mL de água destilada + 6 mL de EDTA + 64 mL de NaOH) e submetidas à eletroforese por 20 minutos. Na sequência foram neutralizadas (500mL de água destilada + 24,25g TRIS + HCl, pH 7,5) por 15 minutos e desidratadas em álcool absoluto por 5 minutos. A coloração foi feita com brometo de etídio (20 $\mu$ L em 950  $\mu$ L de água destilada) e as análises foram realizadas em microscópio de fluorescência Zeiss-imager M2 com o filtro Alexo flour-512nm.

A análise dos cometas foi feita visualmente com a determinação do índice de dano (ID) e do fator de dano (FD) de acordo com Collins e colaboradores (2008). Para a análise estatística, os grupos controle negativo e tratado foram comparados pelo teste de Wilcoxon, considerando significativos os resultados com intervalo fixado em  $p < 0,05$ . O programa R foi usado para as análises.

## **2.6 Citotoxicidade**

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados pelo método de cultura de tecidos utilizando linhagens em fase exponencial de crescimento de células cancerígenas indiferenciadas, Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina) em incubadora (Ultrasafe HF 212 UV) a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

Para os ensaios com látex, 5x10<sup>5</sup>células/mL foram cultivadas em placas de microtitulação de 96 poços. Após 24 horas cada poço recebeu diferentes concentrações (200, 100, 50, 25 e 12,5  $\mu$ g/mL) do látex misturado no meio DMEM sem suplementação e incubados durante 72 h.

A avaliação da citotoxicidade foi realizada por meio da redução com sal tetrazólio (MTT; 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico)) e captação com vermelho neutro (NRU) de acordo com Santos e colaboradores (2005).

## 2.7 Atividade Antimicrobiana

### 2.7.1 Concentração inibitória mínima

Para os testes antibacterianos foram preparadas suspenções na concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL em salina a 0,9% (turbidez de 0,5 na escala de McFarland) das cepas de: *Acinetobacter baumannii* - ATCC 19606, *Enterobacter cloacae* - ATCC 13047, *Escherichia coli* - ATCC 25922, *Kocuria rhizophila* - ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA) proveniente de feridas, *Pseudomonas aeruginosa* - ATCC 27853, *Salmonella* - ATCC 14028, *Shigella* - ATCC 12022, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Streptococcus pyogenes* - cepa clínica, a partir de uma cultura recente (24h ou 48h).

O ensaio para determinar a Concentração Inibitória Mínima (MIC) do látex de *H. drasticus* foi realizado em triplicata por meio do método de microdiluição em caldo Mueller-Hinton. As placas de 96 poços contendo 80µL do meio por poço + látex nas concentrações de 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13 e 1,56 mg/mL e a suspensão bacteriana na concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL foram incubadas a 35°C por 24 horas. Os controles estiveram constituídos por meio + bactéria (negativo) e meio + bactéria + clorafenicol (positivo). Ao termino da incubação, foi adicionada a solução reveladora de 2, 3, 5 cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) por duas horas. A diluição onde não houver crescimento bacteriano será considerada como a Concentração Inibitória Mínima (CLSI, 2010).

### 2.7.2 Avaliação da atividade do látex de *H. drasticus* contra *Trypanosoma cruzi*

Para a avaliação da atividade tripanocida foram utilizadas as formas evolutivas epimastigota ( $10^6$ /mL), proveniente de cultura axênica a 26°C, e tripomastigotas cepa Y ( $4 \times 10^6$ /mL) provenientes da infecção *in vitro* da linhagem de células LLC-MK2. Cada placa de microtitulação (96 poços) recebeu uma única forma evolutiva. Foram distribuídos 100µL do parasito por poço e acrescentou-se o látex de *H. drasticus* nas concentrações de 100 a 0,19 µg/mL. Como controles foram utilizados o benzonidazol (50 µg/mL) e culturas de parasitos sem tratamento. Concluído o período da incubação (26°C), 5 dias para os epimastigotas e 24 horas para os tripomastigotas, foi avaliada por meio de regressão linear simples (software Prisma 5.0 Graphpad), a concentração inibidora de 50% do crescimento dos parasitas ( $IC_{50\%}$ ).

## 2. 8 Atividades Antioxidantes

### 2.8.1 Sequestro de radicais livres (SRL) pelo método do DPPH

A atividade sequestradora de radical livre do extrato foi medida em termos de doação de hidrogênio usando o radical estável 2,2-difenil1-picrilhidrazil (DPPH) (BLOIS, 1958).

Foi misturado 250 µL da solução de DPPH em 40 µL de diferentes concentrações do látex (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63 e 7,81 µg/mL). Após 25 minutos foi medida a absorbância a 517nm. Trolox (análogo da vitamina E, solúvel em água), Ácido Gálico e Hidroxitolueno de butila (BHT) foram usados como compostos de referência e o controle foi o DPPH adicionado a 40 µL de DMSO a 20% (solvente utilizado para diluir as amostras). A eliminação de radicais de DPPH foi calculada pela fórmula:

$$\text{Eliminação [DPPH] (\%)} = \frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs controle})}{\text{Abs controle}} \times 100$$

Onde: Abs = Absorbância.

### 2.8.2 Atividade Antioxidante Total

O látex foi diluído para concentração de 1 mg/mL em DMSO à 20%. 0,1 mL de cada amostra foi misturado a 1 mL da solução de fosfomolibdênio (600 mM de ácido sulfúrico, 28 mM de fosfato de sódio e 4 mM de molibdato de amônio), e posteriormente incubados em água a 95°C por 90 minutos. As absorvâncias das amostras foram medidas a 695 nm contra um branco (1 mL de solução e 0,1 mL do DMSO à 20%) quando atingiram a temperatura ambiente (PRIETRO, *et al.*, 1999). A atividade antioxidante total foi expressa em relação ao ácido ascórbico, calculada pela fórmula abaixo e comparada com a atividade do BHT e Ácido Gálico.

$$ATT (\%) = \frac{(Aa - Ac)}{(Aaa - Ac)} \times 100$$

Onde: Ac = Absorvância do controle, Aa = Absorvância da amostra e Aaa = Absorvância do ácido ascórbico.

### 2.8.3 Dosagem de Fenóis Totais

O conteúdo fenólico total foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu segundo Hua-Bin Li e colaboradores (2008) com algumas modificações. Diferentes concentrações de ácido gálico foram dissolvidas em metanol. Para cada tubo amostra foram adicionados 1 mL da solução de Folin diluída de 1:10 (v/v) e 0,2 mL das amostras diluídas a 1 mg/mL em DMSO à 20 %. Após 3 minutos no escuro, 0,8 mL de carbonato de sódio a 7,5% foi adicionado e seguido de novo período de incubação (120 minutos no escuro a temperatura ambiente). Após esse período as absorvâncias das amostras foram lidas a 765 nm contra um branco (reagentes adicionados ao DMSO a 20% ao invés da amostra). Uma curva de calibração foi preparada através da representação gráfica da absorvância em função da concentração e foi encontrada a equação linear ( $y = 0,0121x - 0,032$ ,  $R^2 = 0,9967$ ). A concentração de fenol total na amostra foi determinada a partir da curva de calibração. O teor total de fenol no extrato foi expresso em termos de equivalente de ácido gálico ( $\mu\text{g EAG} / \text{mg de extrato}$ ).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Análise fitoquímica

A análise fitoquímica do látex *H. drasticus* (Tabela 1) revelou a presença de níveis elevados de saponinas, além da presença de esteroides, monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos e açúcares redutores.

Tabela 1 - Classes de metabólitos secundários presentes no látex *H. drasticus*.

Classe de metabólitos secundários	Látex de <i>Himatanthus drasticus</i>
Flavonoides	-
Derivados cinâmicos	-
Fenilpropanoides	-
Triterpenos	+
Esteroides	+
Saponinas	+++
Monoterpenos e Sesquiterpenos	++
Alcaloides	-
Curaminas	-
Quinonas	-
Proantocianidinas e leucoantocianidinas	-
Taninos hidrolisáveis	-
Açúcares redutores	++

Legenda: (-) ausente; (+) fraco; (++) médio; (+++) forte

#### 3.2 Toxicidade Aguda

Ao final dos 14 dias todos os animais aprestaram ganho de peso durante o experimento e não foi observada nenhuma mudança comportamental.

Análises histopatológicas para a toxicidade aguda com dose única do látex (2000mg/kg), revelaram no fígado focos inflamatórios, no baço hiperplasia da polpa branca quando comparada a vermelha e nos pulmões focos hemorrágicos ocasionais. Essas alterações, quando comparados ao grupo controle negativo, não foram relevantes. Os tecidos dos rins e coração se mantiveram preservados.

### 3.3 Atividade genotóxica e mutagênica

O teste do micronúcleo foi analisado comparando-se a frequência de MNs encontrados após 48h de exposição ao látex na concentração de 2000mg/kg em relação ao controle negativo. Na tabela 2 são apresentadas as médias e desvios padrão da frequência de MNs em relação aos controles. Considerando que não houve diferença estatística entre o grupo tratado com *H. drasticus* e o grupo controle negativo, o látex não é considerado mutagênico pelo teste do micronúcleo.

Tabela 2- Resultado da análise de células para o teste de micronúcleo.

Amostra	HPCM N
Controle negativo	1,0 ± 0,71
Controle positivo	33,4 ± 13,9
<i>H. drasticus</i>	3,2 ± 2,29

HPCM N: Hemácias policromática com micronúcleo; média ± desvio padrão (n=5)

O ensaio cometa foi analisou o índice de dano e a frequência de danos encontrados após 48h de exposição ao látex na concentração de 2000mg/kg em relação ao controle negativo. Na tabela 3 são apresentadas as médias e desvios padrão dos resultados obtidos no teste. Considerando a diferença significativa entre o grupo tratado com *H. drasticus* e o grupo controle negativo, o látex é considerado genotóxico pelo teste cometa.

Tabela 3- Resultado da análise de células para o ensaio do cometa.

Amostra	ID	FD
Controle negativo	53,4 ± 33,53	28,4 ± 15,21
Controle positivo	351,0 ± 31,31	100,0 ± 0
<i>H. drasticus</i>	129,8 ± 33,42	71,2 ± 6,8

ID: índice de dano; FD: frequência de dano; média ± desvio padrão (n=5)

### 3.4 Citotoxicidade

Nos testes das concentrações látex de *H. drasticus* pelo método de cultura de célula, observou-se que o látex apresentou 46,21% de citotoxicidade sobre as células de Sarcoma 180 e 41,79% nas células de Ehrlich na concentração de 200 µg/mL (tabela 4).

Tabela 4- Ensaio citotóxico do látex de *H. drasticus* em células neoplásicas humanas.

Concentração	% de Inibição ± SEM	
	Sarcoma 180	Ehrlich
12,5	0 ± 0	0
25	0,66 ± 0,09	0
50	5,51 ± 1,53	0,87
100	8,78 ± 8,09	9,74
200	46,21 ± 14,71	41,79

\* concentração é expressa em µg/mL; SEM= standard erro médium.

### 3.4 Atividade Antimicrobiana

#### 3.4.1 Concentração inibitória mínima

Os valores de CMI do látex de *H. drasticus* frente bactérias Gram negativas e Gram positivas estão exibidos na Tabela 5. O látex apresentou efeito inibitório em todas as bactérias testadas, mas os valores de CMI foram menores nas Gram negativas (Tabela 05).

Tabela 5- Concentração inibitória mínima do látex extraído de *H. drasticus*

Bactéria	Gram	CMI
<i>Acinetobacter baumannii</i> - ATCC 19606	-	3,13
<i>Enterobacter cloacae</i> - ATCC 13047	-	12,5
<i>Escherichia coli</i> - ATCC 25922	-	1,56
<i>Kocuria rhizophila</i> - ATCC 9341	+	12,5
MRSA feridas	+	12,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> - ATCC 27853	-	12,5
<i>Salmonella</i> - ATCC 14028	-	12,5
<i>Shigella</i> - ATCC 12022	-	12,5
<i>Staphylococcus aureus</i> - ATCC 29213	+	25
<i>Streptococcus pyogenes</i> - Cepa clínica	+	12,5

\* CIM é expressa em mg/mL,

DMSO: Dimetilsulfóxido, CMI: Concentração Mínima Inibitória;

ATCC: AMERICAN TYPE CULTURECOLLECTION

### 3.4.2 Efeito tripanocida

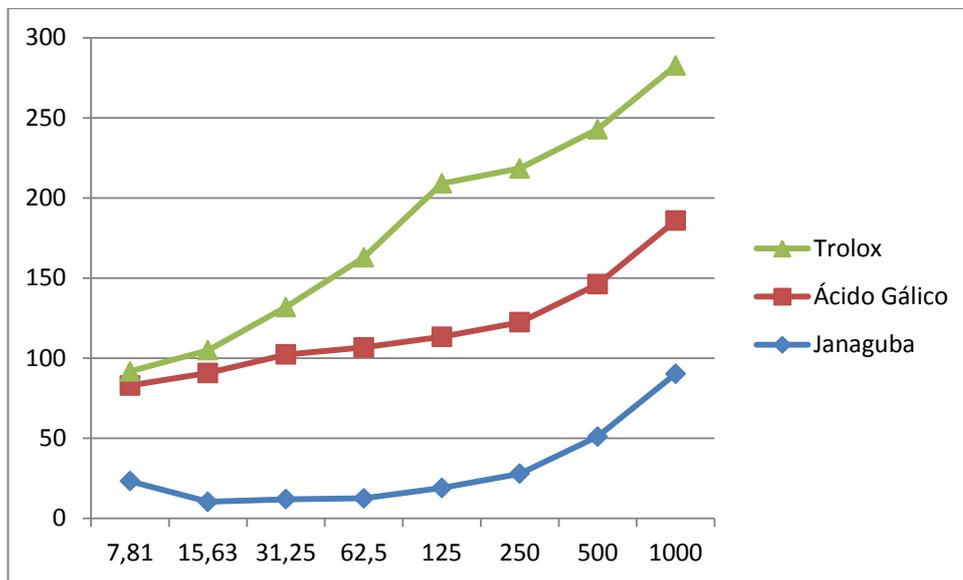
Não houve efeito tripanocida nas concentrações testadas (100-0,19 $\mu$ g/mL).

### 3.5 Atividades Antioxidantes

O gráfico (Figura 1) refere-se à curva padrão do Ácido Gálico e Trolox empregada para o experimento de DPPH comparado com o látex.

Constatou-se que a amostra obteve 90,25 % de atividade antioxidante na concentração de 1000  $\mu$ g/mL. Todas as amostras apresentaram capacidade de consumo de DPPH, visto que as absorbâncias após reação de DPPH com as diferentes concentrações das amostras testadas foram significativamente menores quando comparadas com as absorbâncias obtidas para o controle negativo (DPPH + DMSO 20%), Porém quando comparados com a atividade do padrão de Ácido Gálico os resultados não foram satisfatórios.

Figura 1- Curva padrão do Ácido Gálico e Trolox comparadas com o látex de *H. drasticus*.



O resultado da IC<sub>50</sub> (Tabela 6), que representa a quantidade de antioxidante responsável por reduzir em 50% da concentração inicial de DPPH, não foi promissor quando comparado aos padrões estabelecidos.

Tabela 6. Atividade antioxidante do látex *H. drasticus*.

Amostra	DPPH (IC <sub>50</sub> -µG/mL)	ATT (% ± DP)	Fenol (µg EAG/mg extrato)
Ácido Gálico	1,69	34,27 ± 2,74	-----
Trolox	4,86	-----	-----
BHT	4,37	10,90 ± 0,73	-----
<i>H. drasticus</i>	155,79	8,79 ± 0,30	24,52 ± 0,21

BHT: hidroxitolueno de butila; DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazila; ATT: antioxidante total  
DP: desvio padrão (n=3); EAG: equivalentes de ácido gálico

A dosagem de fenol confirmou as metodologias de DPPH e ATT uma vez que atividade antioxidante foi baixa. Esse resultado está relacionado ao baixo percentual de fenol na amostra, que é um dos indicativos de atividade antioxidante.

## 4 Discussão

O látex é o nome comum para suspensões leitosas quimicamente indefinidas ou emulsões de partículas num fluido aquoso, geralmente realizada sob pressão em células de plantas referidas como laticíferos (Agrawal & Konno 2009). Latéx vegetais contêm vários metabólitos secundários e proteínas, muitas vezes em concentrações mais elevadas do que nas folhas (Agrawal & Konno 2009; Mithöfer & Boland 2012).

As saponinas estão presentes em várias famílias botânicas (Manoorkar & Gachande, 2015), apresentam diversas propriedades biológicas (Cheok et al., 2014) e são encontradas em diferentes partes das plantas (Sparg et al., 2004), inclusive no látex. O presente estudo revelou uma elevada quantidade de saponinas no látex de *H. drasticus*. Carmo e colaboradores (2015) trabalharam com uma fração protéica do látex da mesma espécie botânica contendo saponinas e constataram ação antinoceptiva e anti-inflamatória.

O presente estudo também revelou a presença de terpenos (monoterpenos, triterpenos e sesquiterpenos) no látex. Esse grupo de moléculas já havia sido relatado no látex de outras espécies do gênero *Himatanthus* (Rebouças et al., 2011; Ramos et al., 2015). Sousa (2009) encontrou os triterpenos  $\beta$ - sitosterol e  $\beta$ - amirina em *H. drasticus* por meio de cromatografia de camada delgada. O  $\beta$ - sitosterol tem ação moduladora do sistema imune, previne o câncer e tem atividade tripanocida, entre outras (Saeidnia et al., 2014). Lucetti e colaboradores (2010) isolaram do látex de *H. drasticus* o triterpeno pentacíclico acetato de lupeol e atestaram um efeito anti-inflamatório em camundongos.

Ao final do teste de toxicidade aguda com o látex de *H. drasticus*, observou-se um crescente ganho de peso e nenhuma alteração comportamental nos camundongos. Sousa e colaboradores (2009) obtiveram resultados semelhantes, mas registraram uma perda de peso nos cinco primeiros dias da administração do látex e um aumento na produção de fezes com aspecto pastoso. Os achados histopatológicos do fígado, baço, pulmão e rins também foram mais acentuados na pesquisa de Sousa e colaboradores (2009).

No presente estudo o látex não foi considerado mutagênico na dose de 2000 mg/kg, mas foi genotóxico. Estudo realizado por Rebolças e colaboradores (2013), analisou *in vivo* os efeitos genotóxico e mutagênico, induzidos pelo extrato aquoso e etanólico da casca de *Himatanthus articulatus*, planta utilizada como medicamento fitoterápico na Amazônia, e atestou que os extratos não causavam danos no DNA. Porém a formação de micronúcleos foi induzida na dose mais elevada (2000 mg/kg). Os extratos ainda foram capazes de reduzir eventos clastogênicos e atuaram na proteção do DNA contra danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio.

A maior concentração do látex de *H. drasticus* (200µg/mL) também não teve efeito citotóxico sobre as células do Sarcoma 180 e carcinoma de Ehrlich. Mousinho e colaboradores (2011) testaram diferentes concentrações de uma fração proteica do látex da espécie botânica em questão e não encontraram atividade citotóxica em diferentes linhagens celulares (HL-60 Leucemia; HCT-8 Cólon; SF295 Cérebro; MDA-MB-435 Melanoma; PBMC Linfócitos).

Com relação ao efeito antimicrobiano, o látex de *H. drasticus* foi eficiente contra bactérias Gram positivas e Gram negativas provenientes do banco ATCC e de lesões (Tabela 5). Sequeira e colaboradores (2009), trabalhando com o látex de *H. articulatus*, obtiveram resultados negativos para cepas ATCC e clínicas. Esses pesquisadores só encontraram resultados favoráveis para os extratos metanólicos das folhas e cascas.

A atividade tripanocida tem sido correlacionada com a presença de triterpenos (Kayser *et al.*, 2003; Tolstikova *et al.*, 2006), entre eles o  $\beta$ - sitosterol (Saeidnia *et al.*, 2014). Embora o  $\beta$ - sitosterol constitua o látex de *H. drasticus* (Sousa, 2009) o presente estudo não confirmou essa atividade nas concentrações testadas (100 – 0,19µg/mL).

Considerando a atividade antioxidante do látex, o presente estudo constatou uma baixa atividade nas concentrações de 7,81 – 1000µg/mL (Figura 1). Lucetti e colaboradores (2010) utilizando menores concentrações do látex de *H. drasticus* registraram a ausência de atividade captadora de radicais livres. Segundo Podsedek

(2007) essa evidência pode ser explicada pelo baixo percentual de fenol no látex (Tabela 6).

## **5 Conclusões**

O presente estudo revelou que o látex de *H. drasticus* não é tóxico na fase aguda e tem potencial farmacológico antibacteriano. No entanto, mais estudos devem ser realizados para avaliar outros aspectos da toxicidade aguda, investigar a toxicidade crônica e os mecanismos de ação envolvidos nas atividades biológicas.

## Referências

- Agra, M.F., Silva, K.N., Basílio, I.J.L.D., Freitas, P.F., Barbosa-Filho, J.M., 2008. Survey of medicinal plants used in the region. Northeast of Brazil Revista Brasileira de Farmacognosia 18, 472–508.
- Agrawal AA, Konno K. 2009. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 40, 311–31.
- Amaral ACF, Ferreira JLP, Pinheiro MLB, Silva JRA 2007. Monograph of *Himatanthus sucuuba*, a plant of Amazonian folk medicine. Pharmacognosy Reviews 1, 305-313
- Amaro, M.S. et al. 2006. Morfologia de frutos, sementes e de plântulas de janaguba (*Himatanthus drasticus* (mart.) Plumel. – apocynaceae). Revista Brasileira de Sementes. 28, 63-71.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, Nature, 181: 1199- 1200.
- Brasil. Ministério da Saúde. 2015. Política nacional de práticas integrativas e complementares no SUS, atitude de ampliação de acesso. Departamento de Atenção Básica. – 2. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, p. 96.
- Carmo, L. D. Proteínas isoladas do látex de *Himatanthus drasticus* (MART.) Plumel apocynaceae reduzem a resposta inflamatória e nociceptiva na artrite induzida por zymosan em camundongos. Dissertação (mestrado)- Departamento de fisiologia e farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 2015.
- Cheok, C. Y.; Karim, H. A.; Sulaiman, R. 2014. Extration and quantification of saponins: A Review. Food Research International, 59, 16-40.
- Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). 2010. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 20th Informational Supplement. CLSI document M100-S20. CLSI, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute.
- Colares, A.V. et al. 2008. Phytochemical and biological preliminar study of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel(Janaguba). Pharmacogn Mag. 4, 73–77.
- COLLINS, A., OSCOZ, A., BRUNBORG, G., GAIVÃO, I., GIOVANNELLI, L., KRUSZEWSKI, M., SMITH, C. & STETINA, R. 2008. The Comet assay: topical issues. Mutagenesis, 30(3): 143-151.
- Graham, J.G.; Quinn, M.L.; Fabricant, N.R.; Farnsworth. 2000. Plants used against cancer – an extension of the work of Jonathan Hartwell. Journal of Ethnopharmacology.73, 347-377.
- Harbone, J.B. 1998. Phytochemical methods. 3.ed. London: Chapman & Hall.
- Hayashi, Makoto et al. 1990. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. Mutation Research. 245, 245-249.
- Horn, R.C., Vargas, V.M.F., 2008. Mutagenicity and antimutagenicity of teas used in

popular medicine in the Salmonella/microsome assay. *Toxicology In Vitro* 22, 1043–1049.

Kaplan, M. A. C. 1967. Estudos fitoquímicos: baru, janaguba e 'tabernaemontana'. Dissertação. (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Kaiser O, Kiderlen AF, Croft SL. 2003. Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitol Res.* 90:55 – 62.

Leão, R.B.A. et al. 2007. Study of therapeutical use plants in municipality of Santa Bárbara do Pará, State of Pará, Brazil. *Rev Bras Farm.* 88, 21–25.

Li, H.B.; Wong, C.C.; Cheng, K.W.; Chen, F. 2008. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT-Food Sci. Tech* 41, 385-390.

Lucetti, D. L. 2010. Avaliação das atividades antiinflamatória e antinociceptiva do acetato de lupeol isolado de *Himatanthus drasticus*(MART) PLUMEL- Apocynaceae(Janaguba). Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Ceará.

Luz, H.S. Santos, A.C.G.; Lima; F.C.; Machado; K.R.G. 2014. Prospecção fitoquímica de *Himatanthus drasticus* Plumel (Apocynaceae), da mesorregião leste maranhense. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 16, n.3, p. 657-662.

Manoorkar, V.B e Gachande, B.D. 2015. Phytochemical analysis of some plant latex, *Int. J. of Life Sciences*, 3,1: 108- 110.

Mesquita, M.L.; Desrivot, J.;Bories, C.; Fournet, A.; Paula, J.E.; Grellier, P.; Espindola, L.S. 2005. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Mem I Oswaldo Cruz* 100: 783-787.

Mithöfer A, Boland W. 2012. Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annu Rev Plant Biol.* 63, 431-450.

Modesto, M. M. L. S. 1997. Aspectos ecológicos e sócio- econômicos de *Himatanthus articulata* (Wahl.) Woodson. janaguba da Chapadado Araripe. Monografia (Especialização em Botânica) - Universidade Regional do Cariri, Crato, p. 55.

Mousinho, K.C. et al. 2011. Antitumor effect of laticifer proteins of *Himatanthus drasticus* (mart.) Plumel – Apocynaceae. *J Ethnopharmacol.* 137, 421– 426.

OECD/OCDE 425. 2001. Guideline for Testing of Chemicals Acute Oral Toxicity–Up-and-Down Procedure. Disponível em: <<http://www.epa.gov/oppfead1/harmonization/>> Acesso em 05 de maio de 2014.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects: Test No. 474:Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, França, 2009. Acessado em 06 de agosto de 2014.

Patocka, J. 2003. Biologically active pencyclic triterpenes and their current medicine signification. *J. Appl. Biomed*,v.1, p. 7-12.

- Perdue, G.P e Blomster, R.N. 1978. South American Plants III: Isolation of fulvoplumierin from *Himatanthus sucuuba* (M. Arg.) Woodson (Apocynaceae). J. Pharm. Sci. 67: 1322-1323.
- Plumel, M. M. 1991. Le genre *Himatanthus* (Apocinaceae) revisión taxonomique: bradea. Boletim do Herbarium Bradeanu, Rio de Janeiro 5, 1-20.
- Podsdek, A. 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of brassica vegetables: A review. LWT-Food Sci. Technol. 40, 1-11.
- Prieto P, Pineda M, Aguilar M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E. Anal Biochem. 269, 337-341.
- Ramos, A. S.; Silva, J. R. A.; Oliveira, A. A.; Mpalantinos, M. A. ; Basso, S. L. ; Ferreira, J. L. P.; Amaral, A. C. F. 2015. Fingerprint by Gas Chromatography-Mass Spectrometry of Two *Himatanthus* Species of Brazilian North Region. Chemistry of Natural Compounds, 51,1149-1151.
- Rebouças, S.O.; Grivicich, J.; Santos, M.S.; Rodriguez, P.; Gomes, M.D. Oliveira, S.Q.; Silva, J.; Ferraz, A.B.F. 2011. Antiproliferative effect of a traditional remedy *Himatanthus articulatus* bark on human cancer cell lines. Journal of Ethnopharmacology. 137: 926-929.
- Roberts, E.A.H.; Cartwright, R. A.; Oldschool, M. 1957. Phenolic substances of manufactured tea. I. Fractionation and paper chromatography of water-soluble substances. J Sci Food Agr. 8, 72-80.
- Saeidnia, S.; Manayi , A.; Gohari, A. R.; Abdollahi, M. 2014. The Story of Beta-sitosterol- A Review. European Journal of Medicinal Plants. 4(5): 590-609.
- Santos, N. P.; Nascimento, S. C.; Silva, J. F.; Pereira, E. C. G.; Silva, N. H.; Honda, N. K.; Santos-Magalhães, N. S. J. 2005. Drug Deliv. Sc. Tech. 15, 355-361.
- Sequeira, B.j.; Vital, M.J.; Pohlit, A.M.; Pararols, I.C.; Caúper, G.S.; 2009. Antibacterial and antifungal activity of extracts and exudates of the Amazonian medicinal tree *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson (common name: sucuba). Mem Inst Oswaldo Cruz. 104, 659–661.
- Silva, R. 1929. Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil, São Paulo: Companhia Editora Nacional. pp. 56-57.
- Silveira e Sá, R. C.; Leite, M. N.; Reporedo, M. M.; Almeida, R. N. 2003. Evaluation of long-term exposure to *Mikania glomerata* (Sprengel) extract on male Wistar rats' reproductive organs, sperm production and testosterone level. Contraception. 67, 327 –331.
- Sousa, E. L. 2009. Avaliação da atividade antitumoral de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel – APOCYNACEAE (JANAGUBA). Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Sparg, S.G.; Light, M.E.; van- Staden, J. 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. J Ethnopharmacol 94:219–243.

Tice, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. 2000. Environmental And Molecular Mutagenesis, 35, 206-221.

Tolstikova, T.G., Sorokina, I.V., Tolstikov, G.A., Tolstikov, A.G., Flekhter, O.B. 2006. Biological activity and pharmacological prospects of lupane terpenoids: I. Natural lupane derivatives. Russ. J. Bioorg. Chem. 32, 37–49.

Wood, C. A.; Lee, K.; Vaisberg, A.J.; Kingston, D.G.; Neto, C.C.; Hammond, G.B. 2001. A bioactive spiro lactone iridoid and triterpenoids from *Himatanthus sucuuba*. Chem Pharm Bull 49, 1477-1478.

Yang, C.S.; Landau, J.M.; Huang, M.T.; Newmark, H. L. 2001. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. Annu. Rev. Nutr, 21: 381-406.

## **Conclusões**

Os resultados desse estudo demonstraram que o látex não apresenta toxicidade aguda e citotoxicidade contra as linhagens tumorais testadas, ao passo que não apresenta atividade tripanocida e baixa atividade antioxidante. O látex não foi considerado mutagênico, mas apresentou genotoxicidade, que possivelmente é reparado pelo organismo, porém estudos mais aprofundados são necessários para uma melhor elucidação o grau do dano no DNA e os possíveis mecanismos de reparo. Apresenta potencial frente às bactérias Gram positiva e negativa, fato que pode estar relacionado a presença de triterpenos nesta espécie, no entanto fazem-se necessários mais estudos para compreender melhor o mecanismo de ação envolvido nesta atividade.

## Referências

- AMARO, M. S.; MEDEIROS FILHO, S.; GUIMARÃES, R. M.; TEOFILLO, E. M. Morfologia de frutos, sementes e de plantulas de janaguba (*Himatanthus drasticus*) (MART.) PLUMEL. – APOCYNACEAE. Revista Brasileira de Sementes, v. 28, n. 1, p. 63-71, 2006.
- AMARO, M. S.; MEDEIROS FILHO, S.; GUIMARAES, R. M. e TEOFILLO, E. M. Influência da temperatura e regime de luz na germinação de sementes de janaguba (*Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel.). Ciências e Agrotecnologia. [online]. vol. 30, n.3, p. 450-457, 2006.
- BARROSO, G.M.; MORIN, M.P.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F. Frutos e sementes morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. Viçosa: UFV, 443p, 1999.
- BALDAUF, C. E SANTOS, F.A.M. Ethnobotany, traditional knowledge and diachronic changes in non-timber forest products management: the case study of *Himatanthus drasticus* in Brazilian savanna. Economic Botany. V. 67, n.2, p.110-120, 2013.
- BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Primeiro relatório nacional para a Convenção sobre Diversidade Biológica. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 1998.
- CARMO, L. D. Proteínas isoladas do látex de *Himatanthus drasticus* (MART.) Plumel apocynaceae reduzem a resposta inflamatória e nociceptiva na artrite induzida por zymosan em camundongos. Dissertação (mestrado)- Departamento de fisiologia e farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 2015.
- COLARES, A.V.; MARTINS, J. G. COSTA.; CARDOSO, A. H.; CAMPOS, A. R. Efeito gastroprotetor do látex de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Janaguba). Infarma, v. 20, n. 11/12, p. 34-36, 2008.
- CONSERVATION INTERNATIONAL. Biodiversity Hotspots. <http://www.biodiversityhotspots.org/xp/hotspots/Pages/default.aspx>. Acessado em 21/12/2015.
- ENDRESS, M.E. & BRUYNS, P.V. A revised classification of the Apocynaceae s.l. Botanical Review v.66, p.1-56, 2000.
- EVANS, W. C. Trease and Evans' Pharmacognosy. 15. ed. Londres: Saunders, p. 585, 2002.
- FONSECA, Z. Plantas & ervas, espécies: JANAUBA, SUCUUBA, *Himatanthus drasticus*. Plantamed, 2011.
- FUZÉR, L.; SOUZA, I. IBAMA. dá início a núcleo de plantas medicinais. Bionotícias, v. 57, p. 6-7. 2003.
- JOLY, A.B. Botânica: introdução à taxonomia vegetal. 13 .ed. São Paulo: Imprensa Nacional, p. 560, 2002.
- JUDD, W.S.; STEVENS, P.F.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A. Plant systematics. Sunderland: Sinauer, 1999.

- GUERRA, P. M.; NODARI, O. R. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões C.M.O. (Org.) Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: UFRGS; p. 14-28. 2003.
- KAPLAN, M. A. C. Estudos fitoquímicos: baru, janaguba e 'tabernaemontana'. Dissertação. (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1967.
- LEITE, G. O.; PENHA, A. R. S.; SILVA, G. Q.; COLARES, A. V.; RODRIGUES, F. F. G.; COSTA, J. G. M.; CARDOSO, A. L. H.; CAMPOS, A. R. Gastroprotective Effect of Medicinal Plants from Chapada do Araripe, Brazil. *Journal of Young Pharmacists*, v. 1, n. 1, p.54-56, 2009.
- LIMA, F. C.; Janaúba (*Himatanthus* WILLD. Ex. SCHULT.) - APOCYNACEAE no controle de nematódeos gastrintestinais em ovinos. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Paulista Júlio de Mesquita, São Paulo, 2011.
- LINHARES, J. F. P.; PINHEIRO, C. U. B. Caracterização do sistema de extração de látex de janaúba (*Himatanthus* Willd. ex Schult. - Apocynaceae), no Município de Alcântara, Estado do Maranhão, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde (Online)*, v. 2, n.4, p. 23-31, 2013.
- LORENZI, H. E.; MATOS, F.J. DE A. Plantas medicinais no Brasil/ Nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum. p. 512, 2002
- LORENZI, Harri; MATOS, F.J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.
- LUCETTI, D. L. Avaliação das atividades antiinflamatória e antinociceptiva do acetato de lupeol isolado de *Himatanthus drasticus* (MART.) PLUMEL – APOCYNACEAE (JANAGUBA). Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.
- LUCETTI, D. L.; LUCETTI, E. CP.; BANDEIRA, M. A. M.; VERAS, H. NH.; SILVA, A. H.; LEAL, L. K. AM.; LOPES, A. A.; ALVES, V. CC.; SILVA, G. S.; BRITO, G. A.; VIANA, G. B. Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. *Journal of Inflammation*, v. 7, n. 60, p. 1-11, 2010.
- LUZ, H.S. SANTOS, A.C.G.; LIMA; F.C.; MACHADO; K.R.G. Prospecção fitoquímica de *Himatanthus drasticus* Plumel (Apocynaceae), da mesorregião leste maranhense. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 16, n.3, p. 657-662, 2014.
- MARQUES, L. M. Proteínas isoladas do látex de *Himatanthus drasticus* (MART.) PLUMEL APOCYNACEAE protegem a mucosa gástrica de camundongos contra lesões induzidas por etanol: envolvimento da via NO/GMPc/ KATP e da glutatona. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.
- MATOS, M. P. V.; OLIVEIRA, R. S. B.; ALENCAR, N. M. N.; FIGUEIREDO, I. S. T.; OLIVEIRA, J. S.; AMARAL, J. S.; NISHI, B. C.; RAMOS, M. V. Ethnopharmacological Use and Pharmacological Activity of Latex from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. *International Journal of Indigenous Medicinal Plants*, v. 29, p. 1122- 1131, 2013.

MENESES, I. A flora da Bahia (Brasiliana). Melhoramentos, 1949.

MODESTO, M. M. L. S. Aspectos ecológicos e sócio- econômicos de *Himatanthus articulata* (Wahl.) Woodson. Janaguba da Chapadado Araripe. Monografia (Especialização em Botânica) - Universidade Regional do Cariri, Crato, p. 55, 1997.

MORAGAS, C.J. Estudo do gênero *Himatanthus*: anatomia vegetal, fitoquímica, farmacologia e biotransformação. Tese do doutorado. Núcleo de Pesquisa de Plantas Mediciniais, Universidade Federal do Rio de Janeiro: UFRJ/NPPN, p. 271, 2006.

MOUSINHO, K.; OLIVEIRA, C. C.; FERREIRA, J. R. O.; CARVALHO, A. A.; MAGALHÃES, H. I. F.; BEZERRA, D. P.; ALVES, A. P. N.N.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PESSOA, C.; MATOS, M. P. V.; RAMOS, M.V.; MORAES, M.O. Antitumor effect of laticifer proteins of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel - Apocynaceae. Journal of Ethnopharmacology, Lausanne, v. 137, n. 1, p. 421-426, set. 2011.

NOGUEIRA RC, CERQUEIRA HF, SOARES MBP. Patenting bioactive molecules from biodiversity: the Brazilian experience. Expert Opinion Ther. Patents 20(2): 1-13, 2010.

PATOCKA, J. Biologically active pencyclic triterpenes and their current medicine signification. J. Appl. Biomed, v.1, p. 7-12, 2003.

PINHEIRO, M.H. O. Formações savânicas mundiais: uma breve descrição Fitogeográfica. Brazilian Geographical Journal: Geosciences and Humanities research medium, Uberlândia, v. 1, n. 2, p. 306-313, 2010.

PLUMEL, M. M. Le genre *Himatanthus* (Apocinaceae) révision taxonomique: bradea. Boletim do Herbarium Bradeanu, Rio de Janeiro, v. 5, p. 1-20, 1991.

ROCHA, G. M.; ROCHA, M. E. do N. Uso popular de plantas medicinais. Saúde & Ambiente em Revista, Duque de Caxias, v.1, n.2, p.76-85, 2006.

SANTOS, A.C.B.; SILVA, M.A.P.; SANTOS, M.A.F.; LEITE, T.R. Levantamento etnobotânico, químico e farmacológico de espécies de Apocynaceae Juss. ocorrentes no Brasil. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Campinas, v.15, n.3, p.442-458, 2013.

SIMÕES, A.O. e KINOSHITA, L.S. The Apocynaceae s.st of the Carrancas region, Minas Gerais, Brazil. Darwiniana, v.40, p.127-169, 2002.

SOUSA, E. L. Avaliação da atividade antitumoral de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel – APOCYNACEAE (JANAGUBA). Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

SOUSA, E. L.; GRANGEIRO, A. R. S.; BASTOS, I. V. G. A.; RODRIGUES, G. C. R.; SILVA, M. J.; ANJOS, F. B. R.; SOUZA, I. A.; SOUSA, C. E. L. Antitumor activity of leaves of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel-Apocynaceae (Janaguba) in the treatment of Sarcoma 180 tumor. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 46, n. 2, 2010.

SPINA AP. Estudos taxonômico, micro-morfológico e filogenético do gênero *Himatanthus* Willd. ex Schult (Apocynaceae: Rauvolfioideae - Plumerieae) [tese].

Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas, p. 191, 2004.

TORRES, C. & GALETTO, L. Factors constraining fruit set in *Mandevilla pentlandiana* (Apocynaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 129, p.187-205, 1999.

VICENTINI, A.; OLIVEIRA, A.A. Apocynaceae e Asclepiadaceae. In: Ribeiro, J.E.L.; Hopkins, M.J.G.; Vicentini, A.; Sothers, C. A, Costa, M.A.S.; Brito, J. M. Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central [Internet].Manaus: INPA/DFID; 2002. p.568-81 [citado 2009 jun 23]. Disponível em: <http://peld.inpa.gov.br/publicacoes/guias/>.

WOODSON, R.E. 1936. Studies in the Apocynaceae. VII. An Evaluation of the Genera *Plumeria* L. and *Himatanthus* Willd. *Annals of the Missouri Botanical Garden* v. 25. N. 1, p. 190-224, 1938.

YANG, Chung S.; LANDAU, Janelle M.; HUANG, Mou-Tuan; NEWMARK, Harold L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr*, 21: 381-406, 2001.