



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

MARIA ISABEL DE ASSIS LIMA

**ESTUDO DA TOXICIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DA IANGAMBINA  
ISOLADA DA *Ocotea duckei* VATTIMO-GIL (LAURACEAE)**

RECIFE

2019

MARIA ISABEL DE ASSIS LIMA

**ESTUDO DA TOXICIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DA IANGAMBINA ISOLADA DA  
*Ocotea duckei* VATTIMO-GIL (LAURACEAE)**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

**Área de concentração:** Métodos clássicos e avançados

**ORIENTADORA:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Eliete Cavalcanti da Silva

**COORIENTADORA:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marta Gerusa Soares de Lucena

RECIFE

2019

Catálogo na fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Lima, Maria Isabel de Assis

Estudo da toxicidade in vitro e in vivo da iangambina isolada da *Ocotea duckei* Vattimo-Gil (Lauraceae) / Maria Isabel de Assis. – 2019.

65 f. : il.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliete Cavalcanti da Silva.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta Gerusa Soares de Lucena.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia, 2019.

Inclui referências e anexos.

1. Plantas medicinais. 2. Toxicologia. 3. Histopatologia. I. Silva, Eliete Cavalcanti (orientadora). II. Lucena, Marta Gerusa Soares de (coorientadora) III. Título.

581.634

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2019 - 182

MARIA ISABEL DE ASSIS LIMA

**ESTUDO DA TOXICIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DA IANGAMBINA ISOLADA DA  
*Ocotea duckei* VATTIMO-GIL (LAURACEAE)**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Aprovada em: 28/02/2019

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Eliete Cavalcante da Silva (Orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Juliana Pinto de Medeiros (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Cláudia Sampaio de Andrade Lima (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

---

Dr<sup>ª</sup> Camilla Vila Nova Soares Silva (Examinador Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

“Porque dele, e por Ele, e para Ele *são* todas *as coisas*; glória, *pois*, a Ele eternamente.  
Amém!” Romanos 11:36

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, por me dar sabedoria para fazer as melhores escolhas, por ter me dado oportunidade de prosseguir na vida acadêmica e me fortalecer nos momentos de dificuldades.

Ao meu esposo e melhor amigo, Carlos André, por sempre acreditar e me incentivar, além de renunciar tanto da própria vida e atrasar projetos por essa causa.

Ao meu pai Edinaldo Andrade e minha mãe Maria José, por não terem poupado esforços em investir na minha educação, por terem aceitado meus sonhos e minhas vontades, por tudo que fizeram na minha vida para que eu chegasse até aqui.

Aos meus familiares, especialmente minha tia, Verônica Figueiredo, e ao seu esposo, Antônio Isaías, que me acolheram em sua casa durante um grande período de meus estudos, colaborando para realização desse sonho. E aos familiares do meu esposo que indiretamente também sempre me apoiaram.

À minha orientadora, Eliete Cavalcanti da Silva, por ter acompanhado e acrescentado em minha formação desde a graduação. À minha coorientadora, Marta Gerusa Soares de Lucena por acreditar e contribuir sempre para o meu crescimento acadêmico. E pela demonstração de caráter que as duas sempre apresentaram, me fazendo sentir prazer em praticar o que é certo, além de toda demonstração de carinho.

Ao Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba-UFPB que esteve de portas abertas para me receber e fornecer o objeto de estudo para que esta pesquisa pudesse acontecer. Ao Prof. Dr. José Maria Barbosa-Filho e à técnica Madalena Teles que me esclareceram diversas dúvidas em uma área diferente da qual tenho domínio e por sempre se mostrarem prestativos em ajudar.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivone Antônia de Souza, por sua colaboração e apoio para realização desta pesquisa. A todos os alunos do Laboratório de Farmacologia e Cancerologia experimental, pela ajuda fundamental nas práticas com os animais, em especial, Yasmínie Silva, por sua dedicação.

Aos professores, Mário Ribeiro de Melo Junior e Luiz Lúcio Soares da Silva, por seus ensinamentos e suas contribuições nas análises histopatológicas.

A todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia - UFPE, estes que compartilharam seus conhecimentos e ensinaram a cada aluno os desafios do campo acadêmico.

A todos os colegas do Programa de Pós-Graduação em morfotecnologia por toda ajuda, seja na realização deste trabalho ou no crescimento pessoal, em especial, Tainá Maria, Elizabete Lucena e Renatha Sobreira. A todos meus amigos internos e externos a UFPE, que sempre acreditaram e me deram força para superar obstáculos e conseguir concluir mais essa etapa da vida.

Aos técnicos do laboratório em histotécnica, Paulo Gomes e Sandrine Arruda, e à técnica do laboratório de cultura de tecidos, Eliane Carvalho, pela paciência e disponibilidade, além de toda ajuda nos estudos experimentais.

Agradeço, também, à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - PROPESQ/UFPE, pelo apoio financeiro e aos funcionários da coordenação da Pós-Graduação em Morfotecnologia, por atenderam prontamente a todas as dúvidas e solicitações.

E como ninguém vence sozinho, quero agradecer mais uma vez e imensamente a todos!

## RESUMO

A iangambina, lignana isolada das folhas de *Ocotea duckei*, possui diversas atividades farmacológicas descritas na literatura, tais como: ação antitumoral, ansiolítica, hipotensiva e leishmanicida, no entanto poucas informações têm sido relatadas sobre sua toxicidade. Desta forma, conhecendo as potencialidades farmacológicas e a importância de avaliar a toxicidade de compostos ativos, este trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade “*in vitro*” e “*in vivo*” da iangambina. A toxicidade “*in vitro*” foi avaliada através do teste de atividade hemolítica em sangue de carneiro e a “*in vivo*” pelo sistema teste *Allium cepa* e toxicidade aguda em camundongos Swiss (*Mus musculus*). A iangambina não causou hemólise em eritrócitos de carneiro, quando avaliada a sua atividade hemolítica nas concentrações de 12,5, 25 e 50 µg/mL. No ensaio utilizando o sistema teste *Allium cepa*, a iangambina não apresentou toxicidade para o crescimento das radículas, não diminuiu o índice mitótico e não causou alterações cromossômicas nas células meristemáticas de *Allium cepa* nas concentrações de 12,5, 25 e 50 µg/mL. Já ensaio de toxicidade aguda na dose de 2000 mg/kg, a iangambina não causou morte dos animais, e não apresentou diferenças significativas nos parâmetros clínicos. Portanto, concluímos que a iangambina não foi citogenotóxica, não foi mutagênica e praticamente não tóxica nos sistemas e nas condições experimentais utilizadas, caracterizando-se como um princípio ativo promissor para pesquisas futuras.

Palavras-chave: Atividade hemolítica. *Allium cepa*. Toxicidade aguda. Histopatologia.

## ABSTRACT

Yangambin, lignan isolated from the leaves of *Ocotea duckei*, has several pharmacological activities described in the literature, such as: antitumor, anxiolytic, hypotensive and leishmanicidal action, however little information has been reported on its toxicity. Thus, knowing the pharmacological potentials and the importance of evaluating the toxicity of active compounds, this work aimed to evaluate the *in vitro* and *in vivo* toxicity of yangambin. *In vitro* toxicity was evaluated by the hemolytic activity test in sheep blood and *in vivo* by the *Allium cepa* test system and acute toxicity in Swiss mice (*Mus musculus*). yangambin did not cause hemolysis in sheep erythrocytes when evaluating its hemolytic activity at concentrations of 12.5, 25 and 50  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . In the assay using the *Allium cepa* test system, yangambin showed no toxicity for root growth, did not decrease mitotic index, and did not cause chromosomal changes in *Allium cepa* meristematic cells at concentrations of 12.5, 25 and 50  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . In the acute toxicity test at the dose of 2000 mg / kg, yangambin did not cause death in the animals, and did not present significant differences in the clinical parameters. Therefore, we conclude that yangambin was not cytogenotoxic, was not mutagenic and practically non-toxic in the systems and experimental conditions used, characterizing itself as a promising active principle for future research.

Keywords: Hemolytic activity. *Allium cepa*. Acute toxicity. Histopathology.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Entradas e saídas de fitoterápico notificadas por Secretarias de Saúde municipais e estaduais do Brasil.....	20
Figura 2 - Mapa de distribuição da família Lauraceae no mundo.....	21
Figura 3 - Distribuição das espécies de <i>Ocotea</i> no Brasil por região.....	23
Figura 4 - Imagens do caule, folhas e inflorescências da <i>Ocotea duckei</i> Vattimo-Gil...	24
Figura 5 - Estrutura química da iangambina.....	25
Esquema 1 - Obtenção do extrato etanólico e isolamento de lignóides totais das folhas de <i>Ocotea duckei</i> Vattimo-Gil.....	31
Figura 6 - Tubos contendo as amostras antes (1) e depois (2) de submetidas à centrifugação.....	32
Figura 7 - Bulbos de <i>Allium cepa</i> em contato com as soluções testes.....	33
Esquema 2 - Roteiro de observação do Screening Hipocrático dos camundongos após administração da dose de 2000 mg/Kg da iangambina.....	36
Gráfico 1 - Análise da toxicidade da iangambina em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> expostas a diferentes tratamentos.....	40
Figura 8 - Fotomicrografias das fases da divisão celular de células meristemáticas ( <i>Allium cepa</i> ) tratadas com controle negativo, com concentrações da iangambina 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL e controle positivo.....	42
Gráfico 2 - Média da evolução corporal dos animais experimentais durante 14 dias de observação.....	45
Figura 9 - Fotomicrografias do fígado de camundongos Swiss dos dois grupos experimentais.....	50
Figura 10 - Fotomicrografias dos rins dos animais dos dois grupos experimentais.....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ (125 MHz) da iangambina e comparação com os dados de RMN da literatura (BARBOSA-FILHO et al., 1999).....	38
Tabela 2 -	Absorção média e porcentagem de hemólise (média $\pm$ desvio padrão) em diferentes concentrações de iangambina.....	39
Tabela 3 -	Análise da toxicidade da iangambina em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> expostas a diferentes tratamentos.....	41
Tabela 4 -	Consumo de água e de ração de camundongos Swiss controlado por 14 dias após a administração da dose.....	44
Tabela 5 -	Média e desvio padrão do peso absoluto dos órgãos dos animais experimentais.....	45
Tabela 6 -	Efeitos da iangambina por via oral após administração em dose única (2000mg/kg) sobre os parâmetros hematológicos em fêmeas de camundongos Swiss.....	46
Tabela 7 -	Efeitos da iangambina administrada por via oral em dose única (sobre os parâmetros bioquímicos de camundongos Swiss fêmeas.....	47
Tabela 8 -	Morfometria expressa em $\mu\text{m}$ do espaço capsular (Cápsula de Bowman) e da área e perímetro dos glomérulos dos rins dos animais experimentais.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

ALT	Aspartato alanina-transferase
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato amino-transferase
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CEUA	Comissão de Ética em Uso de Animais
CHCM	Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dubleto
DL <sub>50</sub>	Dose Letal
EEB	Extrato Etanólico Bruto
EtOH	Etanol
g	Gramma
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HE	Hematoxilina-eosina
<i>Hz</i>	Hertz
IPCS	Programa Internacional de Segurança Química
ISO	International Standard Organization
kg	Quilograma
<i>m</i>	Multiplete
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
ppm	Partes por milhão
UNEP	Programa Ambiental das Nações Unidas
OECD	Guidelines for Testing of Chemicals
OMS	Organização Mundial de Saúde
Rf	Fator de Retenção
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

<i>s</i>	Singleto
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
VCM	Volume Corpuscular Médio
WHO	World Health Organization
$\delta$	Deslocamento químico em ppm

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1	OBETIVOS.....	16
1.1.1	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>16</b>
1.1.2	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
2.1	O USO DE PLANTAS MEDICINAIS.....	17
2.2	UTILIZAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS NO TERRITÓRIO BRASILEIRO..	18
2.3	CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA LAURACEAE.....	20
2.4	CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO <i>OCOTEA</i> .....	21
2.5	CONSIDERAÇÕES SOBRE <i>Ocotea duckei</i> VATTIMO-GIL.....	23
2.6	IANGAMBINA.....	24
2.7	ESTUDOS DE TOXICIDADE.....	25
2.7.1	<b>Toxicidade “<i>in vitro</i>”.....</b>	<b>26</b>
2.7.2	<b>Toxicidade “<i>in vivo</i>”.....</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
3.1	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	29
3.2	OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB).....	29
3.3	ISOLAMENTO DE LIGNÓIDES TOTAIS.....	29
3.4	CROMATOGRAFIA EM COLUNA (CC).....	30
4.5	TESTE DE ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	31
3.6	SISTEMA TESTE <i>Allium cepa</i> .....	32
3.6.1	<b>Análise da Toxicidade.....</b>	<b>32</b>
3.6.2	<b>Análise da Citotoxicidade.....</b>	<b>33</b>
3.6.3	<b>Análise da Genotoxicidade e mutagenicidade.....</b>	<b>33</b>

3.7	TOXICIDADE AGUDA EM CAMUNDONGOS SWISS.....	33
3.7.1	<b>Animais experimentais.....</b>	<b>33</b>
3.7.2	<b>Avaliação dos sinais de toxicidade (Screening Hipocrático).....</b>	<b>34</b>
3.7.3	<b>Avaliação da evolução ponderal e do consumo de água e ração.....</b>	<b>35</b>
3.7.4	<b>Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos.....</b>	<b>35</b>
3.7.5	<b>Método de eutanásia.....</b>	<b>36</b>
3.7.6	<b>Avaliação do peso dos órgãos.....</b>	<b>36</b>
3.7.7	<b>Morfometria e avaliação histopatológica dos órgãos.....</b>	<b>36</b>
3.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	37
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
4.1	ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	39
4.2	SISTEMA TESTE <i>Allium cepa</i> .....	40
4.3	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA.....	43
4.4	PARÂMETROS FISIOLÓGICOS.....	43
4.5	PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	46
4.6	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	47
4.7	PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS.....	48
5	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>53</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>54</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>63</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais, especialmente aqueles derivados de plantas, têm sido utilizados para atender aos cuidados da saúde humana desde os primórdios da medicina, servindo como fonte de medicamentos. E, nos últimos anos, fármacos derivados de plantas têm atraído a atenção de cientistas em todo o mundo devido a seus efeitos colaterais mínimos e efeitos positivos sobre a saúde humana (AYE, 2019).

A legislação sanitária brasileira define os medicamentos fitoterápicos como aqueles obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja segurança e eficácia estejam baseadas em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade (FRANÇA; VASCONCELOS, 2018).

Os processos científicos envolvidos para a transformação de uma planta medicinal em um medicamento priorizam a preservação da integridade química dos princípios ativos e, por consequência, a ação farmacológica do vegetal (OLIVEIRA; ROPKE, 2016). Para atingir esses objetivos, a produção do fitoterápico requer, necessariamente, estudos prévios relativos aos aspectos botânicos, agrônômicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos, e de desenvolvimento de metodologias de análise. (BOOKER et al., 2015).

A classificação botânica permitiu compreender melhor a natureza das plantas, de forma que se tornou possível conhecer as suas aplicações. A botânica aplicada à farmácia ou farmacobotânica, permite explorar as propriedades específicas e a ação dos metabólitos secundários presente nas plantas (SALATINO; BUCKERIDGE, 2016).

Pesquisas têm sido realizadas com diferentes espécies do gênero *Ocotea*, com o intuito de isolar e caracterizar os seus metabólitos secundários, assim como identificar os componentes bioativos (QUINET, 2018). Este gênero pertence à família Lauracea, possui uma ampla distribuição fitogeográfica no território brasileiro e apresenta um grande número de espécies com propriedades medicinais (BROTTO, 2013).

A espécie *Ocotea duckei* Vattimo-Gil é conhecida popularmente como “Louro-de-cheiro” ou “Louro-pimenta”, encontrada no Nordeste, nos estados: Pernambuco, Paraíba, Sergipe e Ceará, contendo uma variedade de metabólitos secundários, dentre eles a iangambina, uma lignana que figura como constituinte majoritário (MONTE-NETO, 2011).

Estudos farmacológicos atribuíram diversas atividades para a iangambina isolada da *Ocotea duckei* como: antitumoral em células colorretais, por induzir apoptose (HAUSOTT,

2003), ansiolítica (MULLALLY, 2016), efeito hipotensivo (ARAÚJO, 2014) e leishmanicida (MONTE-NETO, 2011; CAVALHEIRO, 2013).

Para a segurança e efetividade farmacológica, a Organização Mundial de Saúde (OMS) julga importante a realização de ensaios de toxicidade com as plantas de uso medicinal e de seus princípios ativos (OMS, 2011). O guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessária ao desenvolvimento de medicamentos propõe como estudos de segurança, os testes de toxicidade, de genotoxicidade, tolerância local e carcinogenicidade, como: o teste de toxicidade aguda e testes citogenéticos para avaliação de dano cromossômico (ANVISA, 2013).

Desse modo, conhecendo as potencialidades farmacológicas da iangambina, e sendo de fundamental importância avaliar a toxicidade de compostos com princípios ativos, este trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade “*in vitro*” e “*in vivo*” da iangambina isolada da *Ocotea duckei* (Lauraceae).

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

- Avaliar a toxicidade “*in vitro*” e *in vivo*” da iangambina isolada da *Ocotea duckei* Vattimo-Gil.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Isolar a iangambina das folhas de *Ocotea duckei* Vattimo-Gil;
- Investigar a toxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade e citotoxicidade da iangambina através do sistema teste *Allium cepa*;
- Avaliar a atividade citotóxica em eritrócitos de carneiro;
- Determinar a toxicidade aguda em camundongos;
- Realizar a morfometria e histopatologia do fígado e rins dos camundongos submetidos à toxicidade aguda.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O USO DE PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais são um reservatório de compostos biologicamente ativos com propriedades terapêuticas que ao longo do tempo tem sido relatados e utilizados por diversos grupos de pessoas para o tratamento de várias doenças (PANMEI et al., 2019). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, 85% da população dos países em desenvolvimento utilizam plantas medicinais em seus cuidados com a saúde (OMS, 2013).

Alguns fatores colaboram para o uso de plantas medicinais por parte da população de países em fase de desenvolvimento, como: problemas básicos das populações com vulnerabilidade econômica, que vão desde ter acesso ao atendimento hospitalar, realização de exames, bem como adquirir medicamentos remédios, embora tenha havido um grande crescimento da medicina a partir da segunda metade do século XX (OLIVEIRA, 2016).

Do ponto de vista científico, plantas com uma longa história de uso na etnomedicina podem ser uma fonte rica de substâncias para o tratamento de diversas doenças. Em virtude desse fato, tem-se observado um aumento no campo de estudo concernente a utilização de plantas medicinais, tendo como objetivo formulações de medicamentos com menos efeitos adversos (ALLKIM, 2017).

Dessa forma, são continuamente desenvolvidos estudos que visam comprovar a autenticidade das informações populares, de forma que ao longo do tempo, uma gama de compostos de origem vegetal inicialmente restritas, ao uso popular, está sendo incorporada ao arsenal terapêutico (EKOR, 2014).

Na última década houve uma maior aceitação e interesse público em produtos naturais tanto nos países em desenvolvimento como nos desenvolvidos, sendo estes disponíveis não só em farmácias, mas também em lojas de alimentos. Estima-se que até quatro bilhões de pessoas (representando 80% da população mundial) confiam nos medicamentos à base de plantas como fonte primária de cuidados da saúde (OMS, 2013).

Como o uso global de medicamentos à base de plantas continua a crescer e muitos produtos novos são introduzidos no mercado, questões de saúde pública, como intoxicações, e preocupações em torno de sua segurança são cada vez mais consideráveis. Embora alguns medicamentos fitoterápicos tenham potencial promissor e são amplamente utilizados, muitos

deles permanecem sem estudos farmacológicos comprobatórios de sua eficácia (AHMADI et al., 2016).

A Química de Produtos Naturais se destaca ao permitir o conhecimento estrutural dos metabólitos secundários responsáveis pelos efeitos farmacológicos das plantas medicinais. Em suas inúmeras atribuições, engloba o isolamento e a identificação dos constituintes químicos bioativos, atuando como fonte de novos fármacos, e realiza pesquisas para validação de medicamentos de origem vegetal, sendo assim, a base essencial para o direcionamento de estudos farmacológicos (YOUSSEF, 2013).

Ao longo da história da farmacologia e da medicina, pesquisadores isolaram compostos de espécies vegetais com valor medicinal que foram identificados seus princípios ativos comprovados através do conhecimento empírico popular resgatado nas comunidades tradicionais (BERLINCK et al., 2017).

## 2.2 UTILIZAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS NO TERRITÓRIO BRASILEIRO

O panorama da cadeia produtiva de fitoterápicos no Brasil aponta que as últimas décadas foram um marco de divulgação dos conhecimentos de substâncias bioativas oriunda de vegetais. Nunca se teve no país tantos incentivos para produção de conhecimento científico, em diversas áreas, sobre os produtos naturais (CACCIA-BAVA et al, 2017).

Em 2009 foi divulgada a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), contemplando 71 plantas medicinais indicadas para uso terapêutico da população, que tem como finalidade nortear estudos e pesquisas em plantas medicinais que apresentam potencial para gerar produtos de interesse ao SUS, com o intuito de desenvolvimento e inovação na área de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2009).

Em 2010, por meio da Portaria nº 886, o Ministério da Saúde instituiu no âmbito do SUS a Farmácia Viva, que tem como atribuições realizar todas as etapas para a ascensão dos produtos naturais, iniciando pelo cultivo, abrangendo a coleta, o processamento, o armazenamento, a manipulação e a dispensação de preparações magistrais e oficinais de plantas medicinais e produtos fitoterápicos (BRASIL, 2010).

Em 2012, o Ministério da Saúde publicou nos Cadernos de Atenção Básica “Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica”, no qual se destaca o caráter estratégico da oferta de ações e serviços de fitoterapia na atenção básica (BRASIL, 2012).

Por sua vez, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 18 de 2013, dispôs sobre as boas práticas de processamento e armazenamento de plantas medicinais, preparação e dispensação de produtos magistrais e oficinais de plantas medicinais e fitoterápicos em farmácias vivas no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2013).

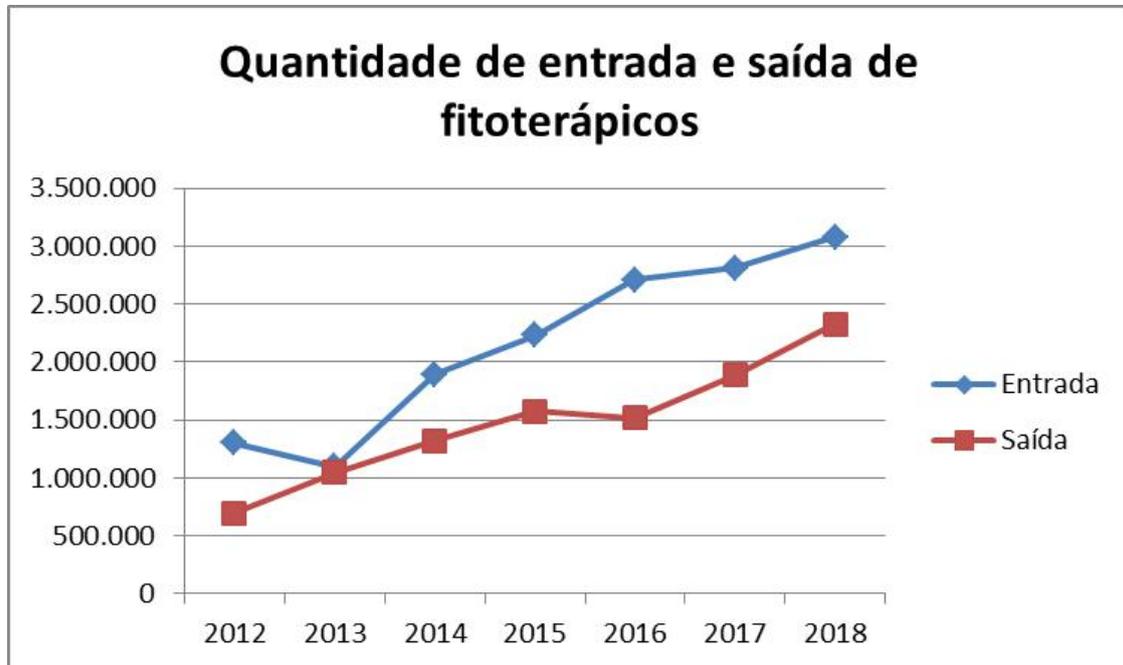
Em 2014, a RDC nº 26, definiu as categorias de medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico e estabeleceu os requisitos mínimos para o registro e renovação de registro de medicamento fitoterápico, e para o registro, renovação de registro e notificação de produto tradicional fitoterápico. Segundo essa resolução, medicamentos fitoterápicos são aqueles cuja segurança e eficácia estão baseadas em evidências clínicas, e produtos tradicionais fitoterápicos são aqueles cuja segurança e efetividade estão fundamentadas na tradicionalidade de uso por período mínimo de 30 anos, concebidos para serem utilizados sem necessidade de supervisão médica, em condições clínicas brandas (BRASIL, 2014).

Outra novidade da regulação foi a possibilidade da notificação para os fitoterápicos previstos no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira e que possuam monografia específica de controle da qualidade, publicada em farmacopeia reconhecida pela ANVISA. A notificação possibilita a imediata fabricação, importação ou comercialização do produto (COFID, 2015). No ano de 2017 foram registrados 66.445 atendimentos de Fitoterapia, em 1.794 estabelecimentos da Atenção Básica, distribuídos em 1.145 municípios, segundo dados do SISAB – Sistema de Informação em Saúde para a Atenção Básica (BRASIL, 2018).

As Secretarias de Saúde municipais e estaduais devem informar ao Ministério da Saúde as entradas, saídas e dispensações de medicamentos, entre eles os fitoterápicos, por meio do envio do conjunto de dados do Sistema Nacional de Gestão da Assistência Farmacêutica (Hórus). Conforme as informações recebidas das Unidades da Federação (UF) são notificadas as entradas e o total de saídas (Figura 1), considerando dispensação e perdas, de produtos fitoterápicos e plantas medicinais (BRASIL, 2019).

Entradas e saídas de fitoterápico notificadas por Secretarias de Saúde municipais e estaduais do Brasil.

Figura 1. Entradas e saídas de fitoterápico notificadas por Secretarias de Saúde municipais e estaduais do Brasil



Fonte: adaptado de: <<http://portalms.saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos>> Acesso em: 02 de fevereiro de 2019.

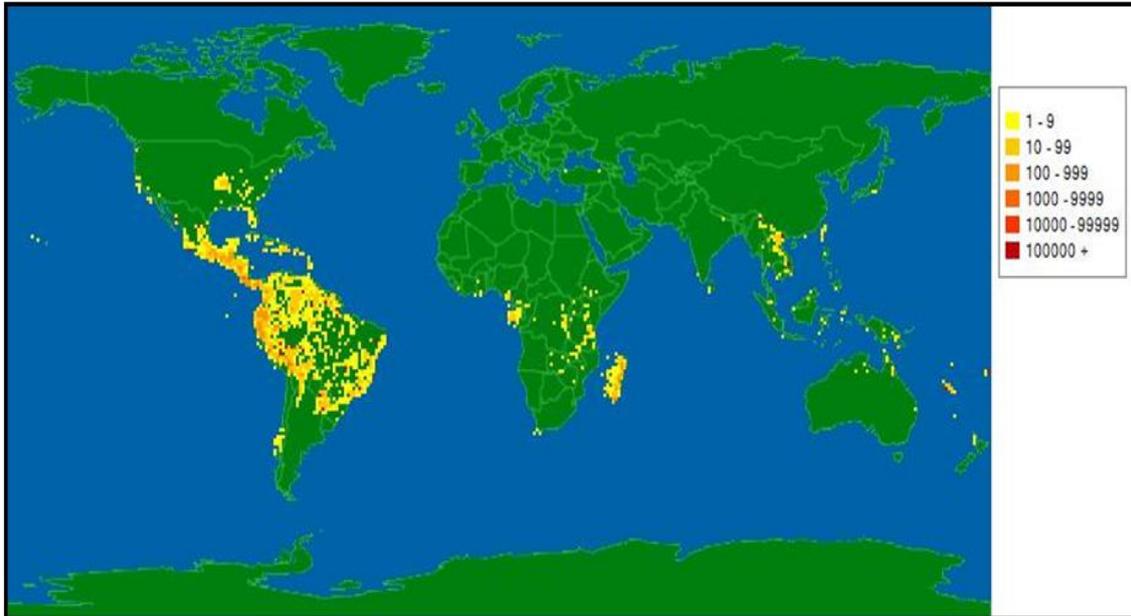
### 2.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA LAURACEAE

A família Lauraceae pertence às angiospermas, possui distribuição pantropical (Figura 2), sendo bem representada na América, Ásia tropical, Austrália e Madagascar, com pouca expressividade no sul da África, possuindo cerca de 3.500 espécies subordinadas a 50 gêneros. No Continente Americano encontram-se 29 gêneros e 900 espécies com grande diversidade em terras baixas da Amazônia e da América Central. No Brasil ocorrem aproximadamente 435 espécies, distribuídas em 24 gêneros (HINSINGER; STRIJK, 2017).

Lauraceae destaca-se entre as demais famílias pela sua importância econômica, onde, dentre as espécies utilizadas em larga escala, tem-se *Persea americana* (abacateiro), *Cinnamomum verum* (canela) e *Laurus nobilis* (louro). Outras são empregadas nas suas regiões de origem, como condimento (*Dicypellium caryophyllaceum*) ou para fazer chá (*Licaria puchury-major* e *Aniba canelilla*). Essências aromáticas, empregadas na indústria de perfumes, são obtidas de algumas espécies como canela-sassafrás (*Ocotea odorifera*) e pau-rosa (*Aniba rosaeodora*). A madeira das espécies de Lauraceae (*Ocotea*, *Nectandra* e

*Mezilaurus*) é amplamente explorada em diversas regiões para diferentes finalidades devido a sua alta durabilidade e resistência (ALVES et al., 2018).

Figura 2. Mapa de distribuição da família Lauraceae no mundo



Fonte: <<http://www.tropicos.org/Name/42000016?tab=maps#>>. Acesso em: 07 de Janeiro de 2019.

A família Lauraceae também é conhecida mundialmente pela utilização na medicina popular. O uso de plantas aromáticas é bastante difundido, em especial no tratamento de infecções microbianas, inflamações, dores, eczemas, na regulação da fertilidade e envenenamento por picada de cobra (RAHMOM et al., 2017).

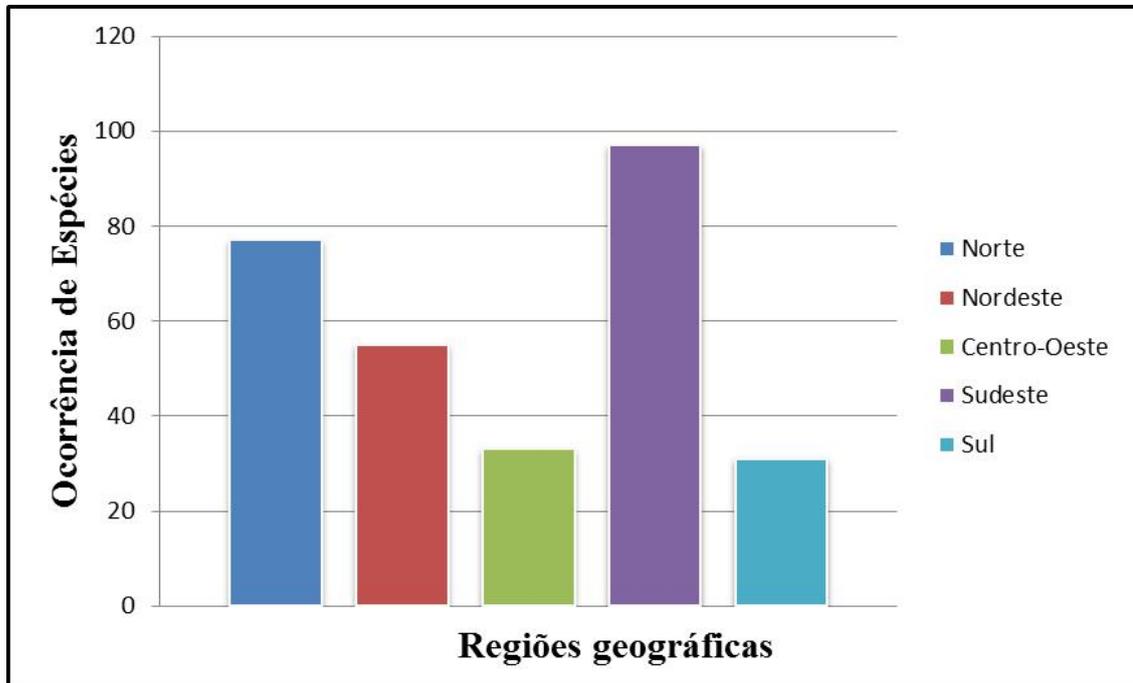
No Brasil, destacam-se especialmente as espécies dos gêneros *Ocotea* e de *Nectandra*, conhecidas popularmente como canelas, loureiros ou embuias, que remontam ao começo da colonização, quando foram exploradas para o emprego na construção naval e movelaria de luxo (GUIMARÃES et al., 2017).

#### 2.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO *OCOTEA*

O gênero *Ocotea* foi estabelecido por Aublet (1775) com a espécie *Ocotea guianensis*, é um gênero muito variável morfológicamente e considerado o maior gênero da família Lauraceae. Apresenta cerca de 350 espécies, a maioria nas Américas tropical e subtropical, desde o México até a Argentina, com poucas espécies na África e em Madagascar e ausentes

na Ásia. No Brasil, o gênero é bem representado com cerca de 170 espécies (Figura 3) (QUINET et al., 2012).

Figura 3. Distribuição das espécies de *Ocotea* no Brasil por região



Fonte: Adaptado de: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB8440>>. Acesso em: 07 Jan. 2019

Espécies do gênero *Ocotea* são utilizadas na medicina popular para o tratamento de infecções, picada de cobra, úlceras (*Ocotea caparrapi*), dor de cabeça (*Ocotea bullata*), febre, tosse (*Ocotea species*), cólicas menstruais (*Ocotea nicaraguensis*), diarreia (*Ocotea quixos*). No Norte e Nordeste brasileiro, várias espécies do gênero são utilizadas na medicina popular para o tratamento da dor, neuralgia, dispepsia e anorexia (SALLEH; AHMAD 2017).

Dentre as atividades farmacológicas descritas em algumas espécies de *Ocotea*, destacam-se como: antimalárica (BALLABENI et al., 2010), antibacteriana e antifúngica (CASTRO; LIMA, 2011), relaxante muscular (ARAÚJO, 2014), antioxidante (OGUNDAJO ET AL., 2018), antiinflamatória (SANTOS ET AL, 2019).

O gênero *Ocotea* é conhecido por ser uma fonte de neolignanas e alcaloides benzilisoquinoleínicos. Este gênero também apresenta suas espécies como geralmente

aromáticas, sendo desta forma utilizadas em produtos de perfumaria bem como aromatizantes (RAKOTONDRAIBE, 2015).

Diversas pesquisas têm sido conduzidas com diferentes espécies de *Ocotea*, visando o isolamento e a caracterização de compostos químicos. Dentre os metabólitos vegetais identificados, destacam-se os alcaloides benzilisoquinolínicos e aporfínicos, lignanas e neolignanas e óleos essenciais, constituídos por monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides (DELGADO et al., 2016).

## 2.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE *Ocotea duckei* VATTIMO-GIL

*Ocotea duckei* Vattimo-Gil é uma espécie arbórea ocorrente em área de Mata Atlântica secundária, conhecida popularmente como “louro-de-cheiro”, “louro-pimenta” e “louro-canela”, encontrada nos estados da Paraíba, Pernambuco, Ceará, Sergipe e Bahia e em áreas remanescentes da Floresta Atlântica. Compreende uma árvore de grande porte, com cerca de 10 m de altura, de copa arredondada, caule e ramos cilíndricos, verdes quando jovens tornando-se marrons na planta adulta, que apresenta flores dispostas em inflorescências com uma média de 45 flores por galho (Figura 4) (NÓBREGA et al., 2016).

Figura 4. Imagens do caule, folhas e inflorescências da *Ocotea duckei* Vattimo-Gil



Fonte: Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17944>>. Acesso em: 17 de Janeiro de 2019.

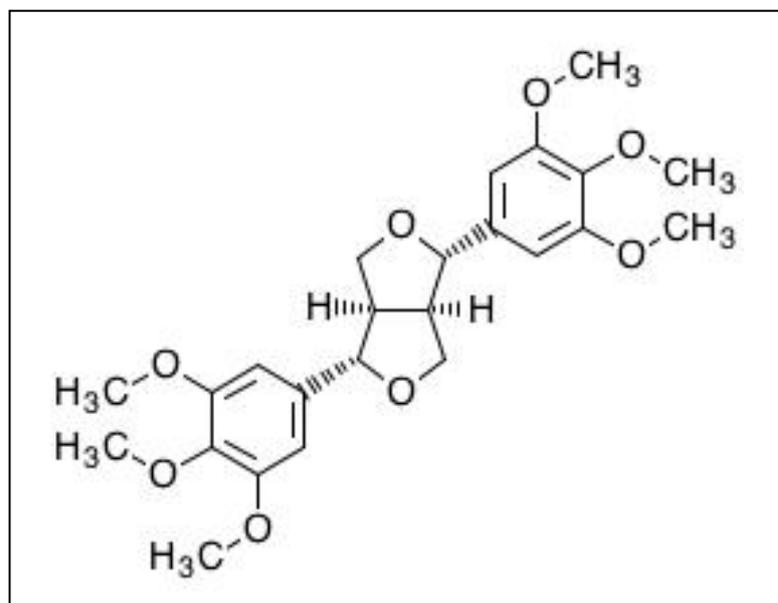
Estudos químicos realizados com a referida espécie relataram a presença de três alcaloides benzilisoquinolínicos: reticulina, coclaurina e N-acetilmorjuzifina. Também foi

isolado um alcaloide aporfínico, a laureliptina. Para essa espécie também são relatadas várias lignanas como: iangambina, epiiangambina, sesartemina, episesartemina, siringaresinol, 4'-O-demetilepimagnolin A e (+) - 4''- O- demetilepimagnolin A (TELES, 2012).

## 2.6 IANGAMBINA

A iangambina é uma lignana do tipo furofurânica (Figura 5), e representa o maior constituinte da fração total de lignóides da *Ocotea duckei* Vattimo (MORAIS et al., 1999).

Figura 5. Estrutura química da iangambina



Fonte: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/443028#section=Top>>

Acessado em: 30 de janeiro de 2019.

Os primeiros estudos realizados com a iangambina isolada da *O. duckei* foram relatados por Pachú et al. (1993), os quais sugeriram atividade depressora do sistema nervoso central, podendo atuar como anticonvulsivante e hipnótico-sedativo.

Almeida e colaboradores (1995) avaliaram a ação analgésica, onde a iangambina mostrou um efeito inibitório significativo do número de contorções abdominais induzidas por ácido acético, um teste que envolve estímulo químico. A iangambina também apresentou atividade de inibidor seletivo do fator de agregação plaquetária (PAF) em choque anafilático (CASTRO-FARIA-NETO et al., 1995; ARAÚJO et al., 2001).

Outras pesquisas demonstraram que a iangambina possui efeito de indução de apoptose em células de tumor colorretal (HAUSOTT et al., 2003); atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SOUSA et al., 2005; LIMA, 2005) e atividade antiinflamatória, como inibidor da produção de óxido nítrico (inibição da enzima iNOS) (KIM et al., 2009).

Trabalhos realizados *in vitro* por Monte-Neto e colaboradores (2011) com parasitas das espécies de *Leishmania chagasi* e *L. amazonenses* mostraram que a iangambina apresenta uma significativa atividade antipromastigota e anti-amastigota em macrófagos murinos infectados com *L. chagasi*. E Araújo et al. (2014) demonstrou que a iangambina induz efeitos hipotensivos e taquicárdicos em ratos normotensos.

Contudo, poucos estudos foram relatados sobre o potencial toxicológico da iangambina. Foi relatado apenas em teste de Ames, onde a iangambina não apresentou mutagenicidade (MARQUES et al., 2003), e teste de toxicidade em macrófagos murinos e desenvolvimento embrionário de Ouriço-do-mar por Monte-Neto et al. (2008).

## 2.7 ESTUDOS DE TOXICIDADE

A toxicidade refere-se à capacidade inerente e potencial de uma substância em provocar efeitos nocivos para o organismo do indivíduo. No estudo de toxicidade os aspectos que devem ser avaliados envolvem a determinação da intensidade do efeito adverso, concentração/dose e a duração da exposição (ANVISA, 2013).

Os testes toxicológicos pré-clínicos permitem o embasamento científico para prever os principais efeitos colaterais e as consequências de uma overdose para posterior escalonamento em humanos (CHAMPMAN, 2010). O objetivo principal de estudos toxicológicos pré-clínicos é identificar uma dose inicial segura para estudos clínicos de fase I, o potencial toxicológico do fármaco e a reversibilidade dos efeitos adversos, lesão e morte celulares induzidas por fármacos que geralmente são causadas por metabólitos reativos do fármaco, envolvendo interações não covalentes e/ou covalentes com moléculas-alvo (OECD, 2014).

Os estudos pré-clínicos preconizam a avaliação farmacológica em sistemas “*in vitro*” e posteriormente em animais (“*in vivo*”) para a obtenção do maior conhecimento possível acerca das propriedades e dos efeitos adversos do fármaco em desenvolvimento. Desta forma, o composto é submetido a testes de toxicidade a curto e longo prazo em animais, para que suas propriedades farmacológicas possam ser definidas dentro de uma relação dose-resposta (FERREIRA, et al. 2009). A duração do teste pré-clínico toxicológico está relacionada com a

provável duração do uso terapêutico. Os estudos clínicos correspondem à pesquisa conduzida em pacientes, ou em voluntários saudáveis, usualmente, destinada a avaliar um novo tratamento (SILVA, 2010).

Portanto, a avaliação da toxicidade do futuro fitoterápico, bem como a verificação de sua ação, assegura a aplicabilidade terapêutica através de ensaios pré-clínicos e clínicos imprescindíveis para a validação e o uso seguros de um medicamento (DUNNICK; NYSKA, 2013).

### 2.7.1 Toxicidade “*in vitro*”

Estudos *in vitro* são importantes para a compreensão dos mecanismos de interação com organismos vivos e são cada vez mais propostos para substituir testes de toxicidade *in vivo*. Estes ensaios constituem a primeira etapa para avaliação da viabilidade de utilização de diversos materiais para a saúde, e estes estudos são geralmente realizados em cultura de células (citotoxicidade) (ALGARABLY, 2019).

Fatores relevantes devem ser considerados para a realização de testes de citotoxicidade, como a compreensão de mecanismos celulares perante diversos tipos de materiais; o baixo custo e rapidez dos testes, assim como, a redução da utilização de animais na experimentação “*in vivo*” (HAMON, 2015).

Diversos tipos de células são utilizados em testes de citotoxicidade e são selecionadas segundo as possíveis aplicações do material em estudo. Dentre estas células, pode-se utilizar células sanguíneas para materiais que entrarão na corrente sanguínea e terão distribuição sistêmica, constituindo-se como testes de hemocompatibilidade (ISO, 2010).

As hemácias representam cerca de 90% das células sanguíneas e possuem características estruturais e moleculares interessantes como modelos experimentais em estudos toxicológicos, possuem estrutura complexa, tendo em sua superfície grande quantidade de lipídeos e proteínas, sua membrana consiste em uma bicamada fosfolipídica (barreira intra/extracelular), que representa 50% de sua massa, são responsáveis por fenômenos como a comunicação entre as células, reconhecimento imunológico e adesão celular (SARKAR, 2018).

A ruptura da membrana e a liberação da hemoglobina presente nas hemácias são denominadas de hemólise, quando a hemoglobina está livre no plasma pode acarretar danos a órgãos vitais como fígado, rins e coração, sendo importante como forma de avaliação em

testes de citotoxicidade (FLOOD; BURKHOLDER, 2018). Diversos métodos estão disponíveis para avaliação da atividade hemolítica, dentre elas destaca-se a observação da absorvância em ultravioleta, técnica recomendada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (SOUZA et al., 2017).

### 2.7.2 Toxicidade “*in vivo*”

Os testes “*in vivo*” não só servem para corroborar os resultados “*in vitro*”, como também podem ser usados para selecionar as dosagens utilizadas para a obtenção de uma melhor eficácia terapêutica (SHARIFI et al., 2012).

O sistema teste *Allium cepa* é um estudo experimental e comparativo, considerado um excelente bioindicador para o primeiro screening da genotoxicidade de plantas medicinais, devido ao seu baixo custo, confiabilidade e concordância com outros testes. É reconhecido pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como teste eficiente para monitoramento e análise *in situ* da toxicidade e genotoxicidade de substâncias (MOREIRA et al., 2014).

*Allium cepa* é um vegetal superior da família Amaryllidaceae muito utilizado por pesquisadores em ensaios toxicológicos, uma vez que o ensaio utiliza um modelo que é suficientemente sensível para detectar inúmeras substâncias que causam alterações cromossômica. É um modelo eficiente *in vivo*, no qual as raízes crescem em contato direto com a substância de interesse, permitindo que os possíveis danos ao DNA das células possam ser esmados (TEDESCO; LAUGHINGHOUSE IV, 2012).

O teste com *A. cepa* proporciona análise de toxicidade através de dois parâmetros: macroscópicos, que se baseiam em formação de tumores, raízes torcidas e avaliação de crescimento de raízes; e microscópicos, como os índices mitóticos, para análise de taxa de divisão celular e aberrações cromossômicas (CUCHIARA et al., 2012).

Para avaliação da toxicidade “*in vivo*” em animais, são geralmente utilizados testes de dose única (toxicidade aguda) ou de doses repetidas (toxicidade subcrônica). Quanto ao modelo animal a ser estudado, os testes devem ser conduzidos com no mínimo duas espécies de mamíferos, incluindo uma espécie não roedora. A dose limite a ser testada será aquela em que se alcance evidência de toxicidade não letal ou até no máximo 2000 mg/kg/dia para roedores e não roedores. Deve haver um período de observação dos animais, no mínimo 14

dias após a administração da droga. No dia da administração os animais devem ser observados no mínimo duas vezes e, posteriormente, no mínimo uma vez ao dia (OECD, 2008a).

Os parâmetros a serem avaliados no teste de toxicidade aguda são: mortalidade; sinais clínicos (incluindo parâmetros comportamentais); variações no peso corporal e no consumo de ração e água; patologia clínica (hematologia, bioquímica); latência, duração e reversibilidade da toxicidade; investigações anátomo e histopatológicas. Estes estudos devem ser realizados anteriormente à Fase I da Pesquisa Clínica. Não é exigida a determinação de DL50 (dose letal 50% - dose que mata 50% dos animais) por ser um método que implica em grande precisão estatística, conforme o guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos (ANVISA, 2013).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As folhas de *Ocotea duckei* Vattimo foram coletadas em agosto de 2017, no município de Santa Rita, estado da Paraíba. A identificação botânica do material vegetal foi realizada pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra, do Centro de Biotecnologia (CBiotec/UFPB). Uma exsicata desta espécie encontra-se depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB), do Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN / UFPB) sob o código AGRA 4309.

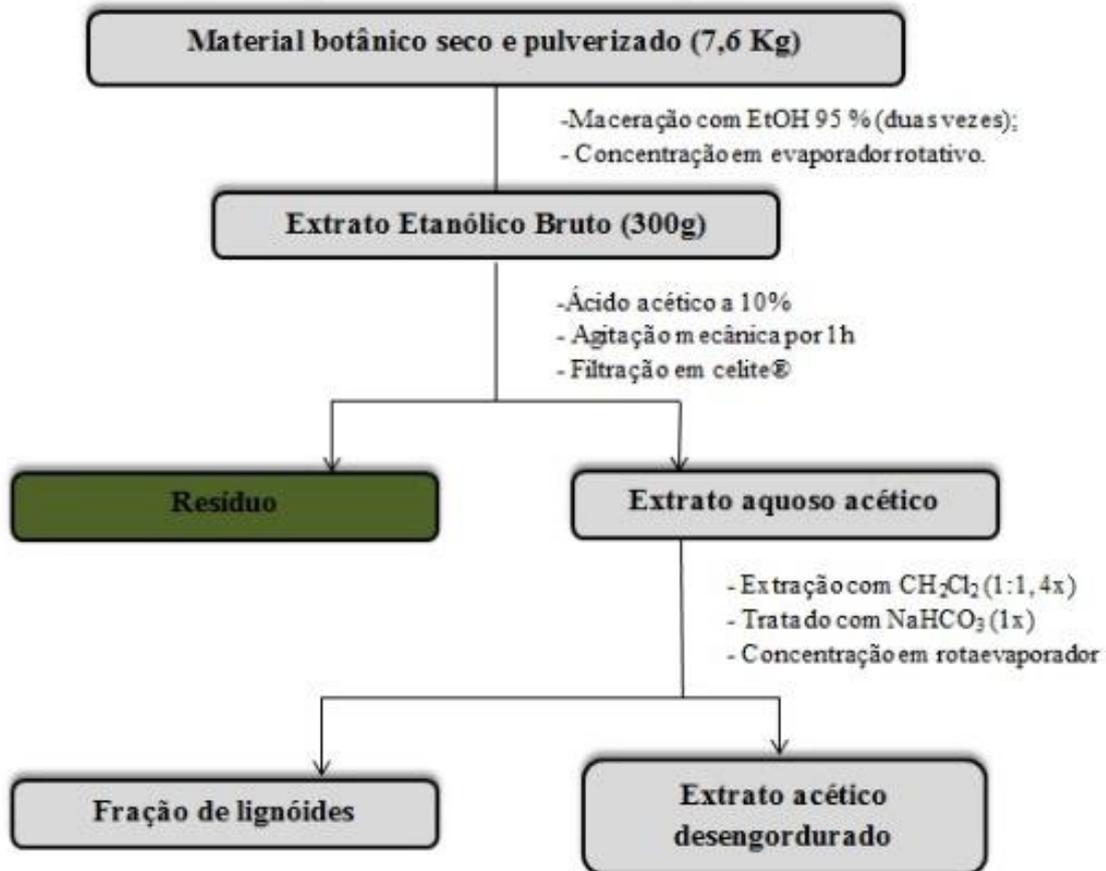
#### 3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB)

Utilizou-se 15 Kg do material vegetal. Este foi desidratado em estufa de ar circulante à temperatura média de 37 °C durante 48 horas, sendo em seguida pulverizado com auxílio de um moinho mecânico, obtendo-se o pó seco da planta com rendimento de 7,6 Kg. Após isso, o pó foi submetido à extração com etanol a 95%, sendo esse processo repetido por duas vezes, em intervalos de cinco dias para cada extração. Ao total, foi utilizado cerca de 50 L de etanol para a extração, obtendo-se a solução extrativa etanólica (35 L), a qual foi concentrada em evaporador rotativo a 46 °C, para obtenção do extrato etanólico bruto (EEB, 500 g), com rendimento de 6,58% em relação ao pó seco da planta.

#### 3.3 ISOLAMENTO DE LIGNÓIDES TOTAIS

Com a finalidade de obter a iangambina de forma mais direta, utilizou-se a metodologia descrita por Barbosa-Filho et al. (1999) para o isolamento dos lignóides totais de *Ocotea duckei*. Cerca de 300 g do EEB foram suspensos em 1250 mL de uma solução de ácido acético a 10% e homogeneizados durante 60 min em agitador mecânico (IKA-RW-20) sendo em seguida filtrado sob Celite ®, obtendo-se um resíduo insolúvel e uma solução aquosa ácida. Essa solução foi extraída em ampola de separação com 4x500 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para obtenção da fase diclorometano, a qual foi tratada com solução de NaHCO<sub>3</sub> (1x), em seguida essa solução foi filtrada e concentrada sob pressão reduzida, fornecendo a fração de lignóides totais (FLT) de *O. duckei*, com rendimento de 3,0% em relação ao peso do EEB utilizado (Esquema 1).

Esquema 1. Obtenção do extrato etanólico e isolamento de lignóides totais das folhas de *Ocotea duckei* Vattimo-Gil



Fonte: o autor.

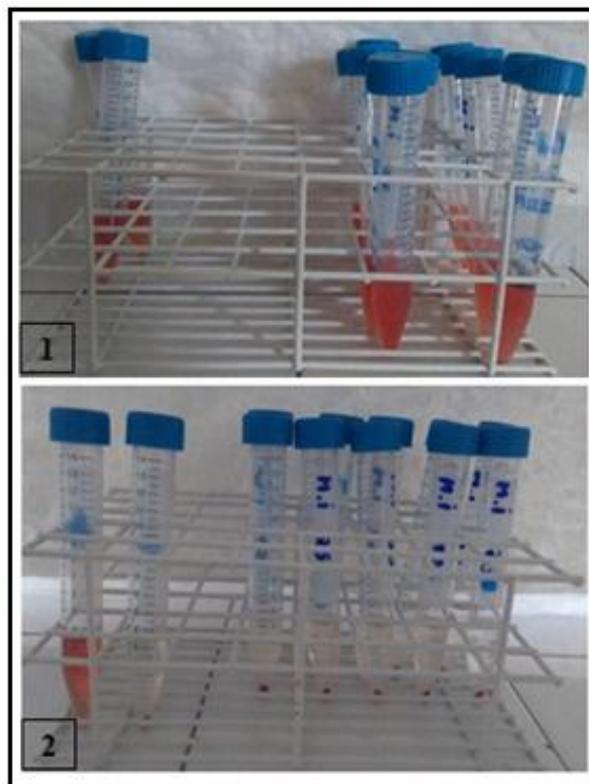
### 3.4 CROMATOGRAFIA EM COLUNA (CC)

A FLT obtida pela marcha de lignóides foi submetida à cromatografia em coluna (CC) de sílica gel 60 (MERCK - 0,063 – 0,200 mm), com eluentes hexano, diclorometano e metanol, puros ou em misturas binárias, em gradiente crescente de polaridade. Foram obtidas 80 frações de 125 mL, as quais foram concentradas sob pressão reduzida, analisadas por Cromatografia em Coluna Delgada Analítica (CCDA) e reunidas de acordo com seus fatores de retenção (Rfs). A identificação da iangambina foi realizada por análise de dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  em comparação com os publicados na literatura (BARBOSA-FILHO, 1999).

#### 4.5 TESTE DE ATIVIDADE HEMOLÍTICA

O teste hemolítico foi realizado seguindo a metodologia descrita por Dacie e Lewis (1975), com modificações. Amostras de sangue de carneiro comercial foram adquiridas da empresa Laborclin® (25 µL). Foram analisadas três concentrações da iangambina: 12,5 µg/mL, 25 µg/mL e 50 µg/mL, diluídas em solução salina NaCl 0,9%. Um tubo contendo apenas a solução salina foi designado para o controle negativo e para o controle positivo utilizou-se água destilada (Figura 6). Em seguida, cada tubo recebeu 25 µL de sangue de carneiro e foram encubados por 30 min. Após esse período, as amostras foram submetidas à centrifugação 3500 G durante 15 min. Em seguida, o sobrenadante foi analisado no espectrofotômetro Bioplus (BIO-200) com comprimento de onda 540 nm, para obter a absorbância resultante. O ensaio foi realizado em triplicata e o percentual hemolítico foi definido com o resultado do controle positivo sendo designado como 100%. O percentual de hemólise baseou-se na fórmula:  $\% = \frac{Ab. \times 100\%}{1,75}$ .

Figura 6. Tubos contendo as amostras antes (1) e depois (2) de submetidas à centrifugação



Fonte: o autor.

### 3.6 SISTEMA TESTE *Allium cepa*

#### 3.6.1 Análise da Toxicidade

A análise da toxicidade foi realizada utilizando o sistema teste *Allium cepa* conforme descrito por Fiskejő (1985) com modificações. A iangambina isolada da *O. duckei* foi testada em três concentrações 12,5 µg/mL, 25 µg/mL e 50 µg/mL, com diluições em água destilada. Foram utilizadas estas concentrações baseando-se na IC50 descrita na literatura para *Leishmania amazonensis* e *chagasi*, 45 e 50 µg/mL, respectivamente. Foram utilizados bulbos não germinados e saudáveis de peso entre 100-120 g, adquiridos em estabelecimento comercial em Recife-Pernambuco, os quais foram postos a germinar por um período de cinco dias, a temperatura ambiente, em tubos de polipropileno (50 mL), com a parte inferior mergulhada nas soluções testes da iangambina e soluções controle, constituindo cinco tratamentos (Figura 7). Água destilada foi usada como controle negativo (CN) e Sulfato de cobre (0,6 µg/ml), uma substância comprovadamente enotóxica e mutagênica, como controle positivo (CP). sendo sete bulbos para cada tratamento, totalizando 35 bulbos. Após o período de germinação, foi medido o comprimento das três maiores raízes em cada bulbo de cada tratamento. Os resultados obtidos das concentrações testes foram comparados com o controle negativo e controle positivo.

Figura 7. Bulbos de *Allium cepa* em contato com as soluções testes



Fonte: o autor.

### 3.6.2 Análise da Citotoxicidade

As radículas coletadas e fixadas numa solução de álcool etílico/ácido acético (3/1) por 24 horas. Após esse período, foram lavadas em água corrente, hidrolisadas com HCl a 45% por 10 minutos. Após a retirada do HCl, as amostras foram novamente lavadas e coradas com hematoxilina. Em seguida, as amostras foram transferidas para as lâminas, cortando-se a parte meristemática e empregada à técnica de esmagamento.

Para a avaliação da citotoxicidade da iangambina em células meristemáticas das cebolas, utilizou-se o cálculo de índice mitótico (IM), que foi estabelecido pela relação entre o número de células em divisão e o número total de células analisadas. Para o IM foi realizada a seguinte equação:  $IM = NCM/NTC \times 100$ , onde NCM corresponde ao número de células em mitose e NTC ao número total de células contabilizadas. A partir dos valores obtidos na equação acima, é possível avaliar o potencial citotóxico das amostras em inibir ou aumentar a proliferação celular (GUERRA, 2002).

### 3.6.3 Análise da Genotoxicidade e mutagenicidade

Foram analisadas 5.000 células de cada tratamento das radículas de *Allium cepa*. As preparações histológicas foram avaliadas com auxílio de microscópio ótico (Leica, Wetzlar, Germany) com a objetiva de 100X acoplado a câmera Motic e foram observadas as células em interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase e quantificadas as anormalidades cromossômicas. Posteriormente, foi realizada a captura de imagem usando a câmara Motic acoplada ao Microscópio óptico (GUERRA, 2002).

## 3.7 TOXICIDADE AGUDA EM CAMUNDONGOS SWISS

### 3.7.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss fêmeas (*Mus musculus*) pesando entre 28 e 32 g, na faixa etária próxima de 60 dias (jovens adultos) no total de 12 animais, obtidos do biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os animais foram alocados em gaiolas de polietileno em grupos de três, mantidos sob condições controladas de temperatura de  $21 \pm 1$  °C sob o ciclo dia/noite natural (12 h claro e 12 h escuro), com água e alimento (tipo pellets de ração da marca Purina®) *ad libitum* durante o experimento e sem uso de qualquer medicação. Antes da realização de qualquer protocolo experimental, os animais foram colocados no ambiente de trabalho por, pelo menos, 30

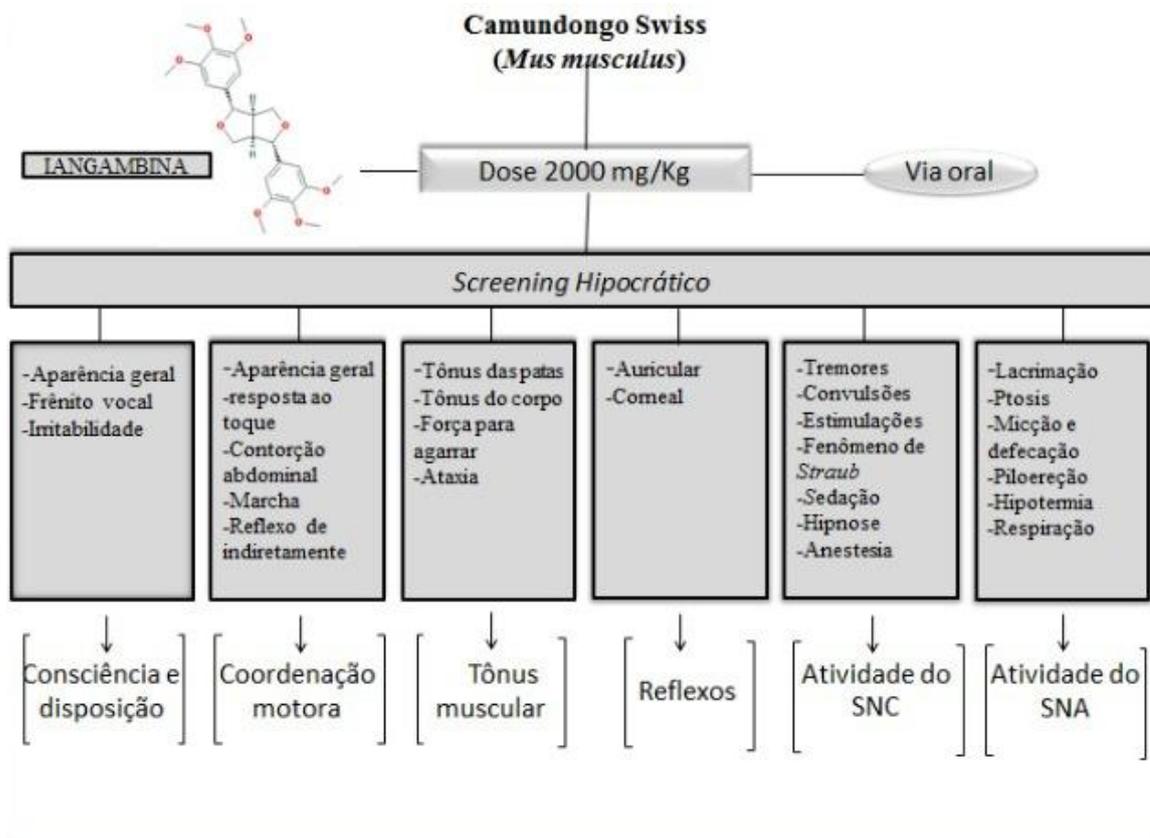
minutos de antecedência à execução do experimento. Todos os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Biociências – UFPE, sob o processo nº 23076.023060/2018-50 (Anexo 1).

### **3.7.2 Avaliação dos sinais de toxicidade (Screening Hipocrático)**

O presente trabalho seguiu as diretrizes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) para o teste de classe de toxicidade aguda (Acute Toxic Class Method – OECD 423) (OECD, 2001). Observou as indicações da Portaria 116/96 do Ministério da Saúde, para avaliação da toxicidade aguda oral de substâncias químicas e estudos de toxicidade de dose única de novas drogas, além de enquadrar nas exigências da RDC 14, de 31 de Março de 2010 da ANVISA/MS (BRASIL, 2010).

A iangambina foi dissolvida em solução salina 0,9% (veículo) e administrada por via oral apenas uma única vez na dose de 2000 mg/kg para avaliação detalhada dos sinais clínicos de toxicidade nos animais experimentais (n=6), exemplos: aparência geral, ataxia, frênto vocal, irritabilidade, tônus do corpo, tremores, salivação, lacrimejamento, ptose palpebral, convulsões e movimentos anormais e mortalidade dos animais (SILVA et al., 2016) (Esquema 2). O grupo controle (n=6) recebeu apenas veículo de solução salina NaCl 0,9% com o mesmo volume (10 mL/kg) e pela mesma via que o grupo de animais tratado com a iangambina. Os sinais de toxicidade (Screening Hipocrático), a intensidade e a duração foram classificadas numa escala de 0 a 4 (ausente, raro, pouco, moderado, intenso), para posterior análise. Os animais foram observados individualmente após a administração nos primeiros trinta minutos, periodicamente após as duas primeiras horas e diariamente durante 14 dias.

Esquema 2. Roteiro de observação do Screening Hipocrático dos camundongos após administração da dose de 2000 mg/Kg da iangambina



Legenda: (SNC) Sistema Nervoso Central, (SNA) Sistema Nervoso Autônomo.

### 3.7.3 Avaliação da evolução ponderal e do consumo de água e ração

Para a avaliação de possíveis efeitos tóxicos após a administração da iangambina 2000 mg/Kg, os animais foram pesados diariamente em balança semi-analítica sempre no mesmo horário, bem como, avaliados os consumos de água e ração.

### 3.7.4 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos

O sangue foi coletado por punção cardíaca e acondicionado em dois tipos de tubo (1 mL), sendo um com anticoagulante EDTA para determinação dos parâmetros hematológicos (eritrograma e leucograma) e o outro sem anticoagulante para obtenção do soro e determinação dos parâmetros bioquímicos, este foi centrifugado por 10 minutos a 3500 rpm, para obtenção do soro e análises bioquímicas: ureia, creatinina, colesterol total, glicose e

transaminases (aspartatoaminotransferase – AST e alanina aminotransferase-ALT) (PITA, 2010). Para as análises bioquímicas foram utilizados Kits específicos para o equipamento bioquímico automático Cobas Mira Plus® (Roche Diagnostic System) e os exames hematológicos foram realizados no equipamento CELL-DYN Ruby (Analisador Hematológico Automático).

### **3.7.5 Método de eutanásia**

Ao final do experimento de toxicidade aguda, todos os animais foram anestesiados com solução de xilazina-cetamina 0,2 mL/100g [8,75 mL de cetamina (100 mg/mL) e 1,25 mL de xilazina (100 mg/mL)], conforme protocolo da Cornell University/Cornell Center for Animal Resources and Education (KOHN, et al., 1997), e eutanasiados por deslocamento cervical.

### **3.7.6 Avaliação do peso dos órgãos**

Sucedida à eutanásia, foi feita avaliação macroscópica dos órgãos e logo em seguida foi determinado o peso absoluto e relativo dos seguintes órgãos; fígado e rins, utilizando uma balança de precisão. O peso relativo dos órgãos em estudo foi calculado utilizando a fórmula: Peso relativo do órgão (%) = (peso do órgão/peso do camundongo).

### **3.7.7 Morfometria e avaliação histopatológica dos órgãos**

O procedimento de preparo e avaliação histopatológica dos órgãos (fígado e baço) foi realizado no laboratório de histotécnica do Departamento de Histologia e embriologia da UFPE. Em seguida, foram fixadas, por 24 h, em solução de formol tamponado (100mL de formaldeído 37%: 900 mL de água destilada; 4,0 g de fosfato de sódio monobásico; 6,5 g de fosfato de sódio dibásico (anidro) a 10%), na proporção de 20 vezes o volume do fixador em relação ao volume das peças. Após a fixação, os fragmentos foram lavados em água corrente por cinco minutos, iniciando-se assim o processo de desidratação em álcool etílico, em série crescente desde 70% até álcool absoluto. Posteriormente, procedeu-se a clarificação com xilol, inclusão em parafina histológica, seccionadas a 5 µm e corados com hematoxilina e eosina (JUNQUEIRA, 2015).

A análise morfométrica foi realizada no laboratório de cultura de tecidos do Departamento de Histologia e Embriologia da UFPE. As imagens obtidas das lâminas de rim e fígado foram capturadas através de um microscópio Olympus BX-41, acoplado a uma câmera (Motic). O programa de processamento de imagens utilizado foi o Motic Images Plus Versão 2.0 ML, na resolução de 1280x1024 pixels e no formato JPEG. Foi utilizado o programa IMAGEJ, um software para processamento e análise de imagens, desenvolvido por Wayne Rasband no National Institute of Mental Health, USA (GIRISH; VIJAYALAKSHMI, 2004). Foram medidos, em média, 50 glomérulos renais de cada animal.

### 3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados paramétricos foram submetidos à ANOVA unidirecional, com pós-teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Os dados não paramétricos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn, a 5% de probabilidade. A análise de correlação foi realizada com base no método de Spearman. As análises foram realizadas e os gráficos foram gerados no software GraphPad Prism (versão 7.0).

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A iangambina foi isolada da *Ocotea duckei* através de cromatografia em sílica gel e analisada por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ . Os dados espectrais dos deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono das frações, obtidos através da RMN, permitiu a comprovação da presença da iangambina, quando comparados com os valores da literatura (Tabela 1) (BARBOSA-FILHO, 1999).

**Tabela 1.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  (125 MHz) da iangambina e comparação com os dados de RMN da literatura (BARBOSA-FILHO et al., 1999)

C	$\delta_{\text{C}}$	LITERATURA	H	$\delta_{\text{H}}$	LITERATURA
1	54,5	54,6	1	3,06 (m)	3.11 (m)
2	86,16	86,2	2	4,71	4.76 (d, J=4.2 Hz)
4	72,12	72,2	4ax	3,70-3,96 (m)	3.80-3.96 (m)
5	54,5	54,6	4eq	4,26-4,30 (m)	4.30-4.40 (m)
6	86,02	86,2	5	3,06 (m)	3.11 (m)
8	72,12	72,2	6	4,71	4.76 (d, J=4.2 Hz)
1'	136,85	136,9	8ax	3,78-3,96 (m)	3.80-3.96 (m)
1''	136,85	136,9	8eq	4,26-4,30 (m)	4.30-4.40 (m)
2'	102,9	103,2	2'	6,52-6,56 (s)	6.59 (s)
2''	102,9	103,2	2''	6,52-6,56 (s)	6.59 (s)
3'	153,56	153,7	6'	6,52-6,56 (s)	6.59 (s)
3''	153,56	153,7	6''	6,52-6,56 (s)	6.59 (s)
4'	137,57	137,8	OCH <sub>3</sub> (4')	3,70 (s)	3.86 (s)
4''	137,57	137,8	OCH <sub>3</sub> (4')	3,86 (s)	3.86 (s)
5'	153,56	153,7	OCH <sub>3</sub> (4')	3,88 (s)	3.88 (s)
5''	153,56	153,7	OCH <sub>3</sub> (4')	3,88 (s)	3.88 (s)

6'	102,9	103,2	OCH <sub>3</sub> (4')	3,88 (s)	3.88 (s)
6''	102,9	103,2	OCH <sub>3</sub> (4')	3,88 (s)	3.88 (s)
OCH <sub>3</sub> (4')	60,96	61,0			
OCH <sub>3</sub> (4'')	61,4	61,0			
OCH <sub>3</sub> (3',5')	56,29	56,0			
OCH <sub>3</sub> (3'',5'')	56,36	56,8			

#### 4.1 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

A iangambina não causou hemólise em eritrócitos de carneiro nas concentrações testes (12,5, 25 e 50 µg/mL), pois, não houve diferença significativa a nível de  $p > 0,05$ , quando estas foram comparadas ao controle negativo, indicando que não houve atividade hemolítica (Tabela 2). Resultados semelhantes foram encontrados com extrato metanólico de Canela (*Cinnamomum tamala*) gênero pertencente a Lauraceae (DANDAPAT et al., 2014).

Tabela 2. Absorção média e porcentagem de hemólise (média ± desvio padrão) em diferentes concentrações de iangambina

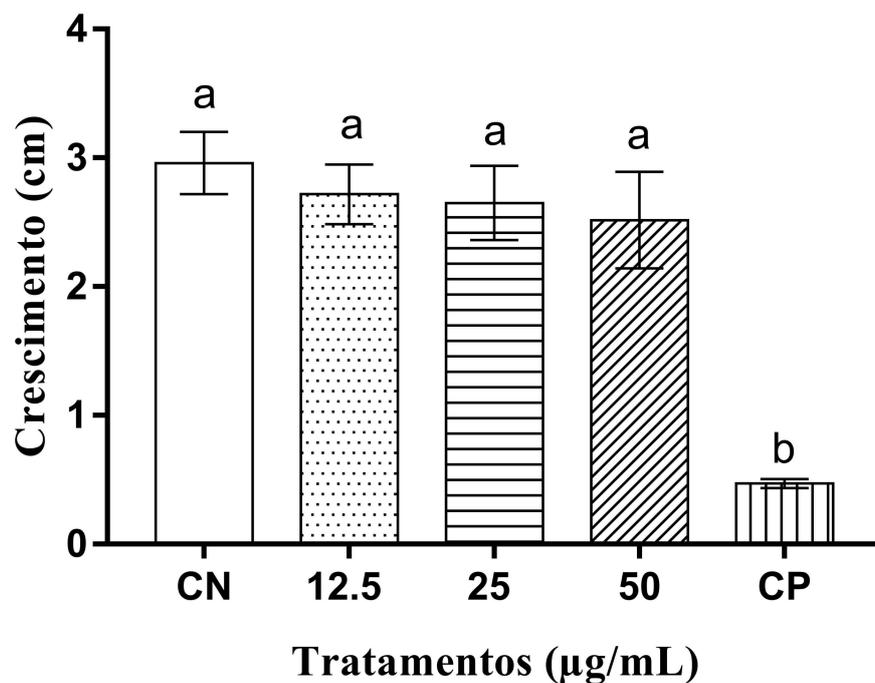
CONCENTRAÇÕES	ABSORBÂNCIA MÉDIA	PERCENTUAL D HEMÓLISE (%)
50 µg/mL	0,0096	0,6487 ns
25 µg/mL	0,0096	0,6488 ns
12,5 µg/mL	0,0102	0,6807 ns
Controle Negativo	0,0103	0,6840 ns

NS = não houve diferença significativa a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

#### 4.2 SISTEMA TESTE *Allium cepa*

A iangambina não apresentou toxicidade, segundo as condições testadas, nas radículas de *Allium cepa*. Visto que, não houve diferença significativa ( $p > 0,5$ ) na média de crescimento das radículas expostas aos tratamentos nas concentrações 12,5  $\mu\text{g/mL}$ , 25  $\mu\text{g/mL}$  e 50  $\mu\text{g/mL}$  quando comparadas a média do controle negativo (água destilada), mas apresentou diferença significativa ( $p < 0,5$ ) quando comparadas ao controle positivo (Sulfato de cobre 0,6  $\mu\text{g/mL}$ )(Gráfico 1). Resultados semelhantes foram encontrados com o extrato etanólico de *Cinnamomum verum* (canela), uma espécie da família Lauraceae, o qual não apresentou alterações no crescimento de radículas de *Allium cepa* (SILVA et al., 2018).

Gráfico 1. Análise da toxicidade da iangambina em células meristemáticas de *Allium cepa* expostas a diferentes tratamentos



Barras indicam média  $\pm$  desvio padrão. Os dados foram submetidos à ANOVA one-way e pós-teste de Tukey a 5% de probabilidade. As letras iguais não diferem significativamente.

As células meristemáticas *A. cepa* expostas as concentrações (12,5  $\mu\text{g/mL}$ , 25  $\mu\text{g/mL}$  e 50  $\mu\text{g/mL}$ ) da iangambina não apresentaram diminuição e nem aumento no índice mitótico. Visto que, os valores do índice mitótico das radículas expostas aos tratamentos quando comparados aos do controle negativo não mostraram diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ).

Porém, quando considerado o controle positivo a diferença foi significativa  $p < 0,05$ , indicando que a iangambina não possui potencial citotóxico (Tabela 3). Estes resultados obtidos “*in vivo*” corroboram com os encontrados “*in vitro*” por Monte-Neto et. al. (2008), onde a iangambina também não apresentou citotoxicidade em macrófagos murinos e em células embrionárias de ouriço do mar.

Tabela 3. Análise da toxicidade da iangambina em células meristemáticas de *Allium cepa* expostas a diferentes tratamentos

TRATAMENTOS	NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS	CÉLULAS EM INTÉRFASE	CÉLULAS EM DIVISÃO	ÍNDICE MITÓTICO (%)
<b>Controle Negativo</b>	5.000	4.585	415	8,29 a
<b>Controle Positivo</b>	5.000	4756	248	4,82 b
<b>12,5 µg/mL</b>	5.000	4.639	361	7,22 a
<b>25 µg/mL</b>	5.000	4.631	369	7,38 a
<b>50 µg/mL</b>	5.000	4.641	359	7,19 a

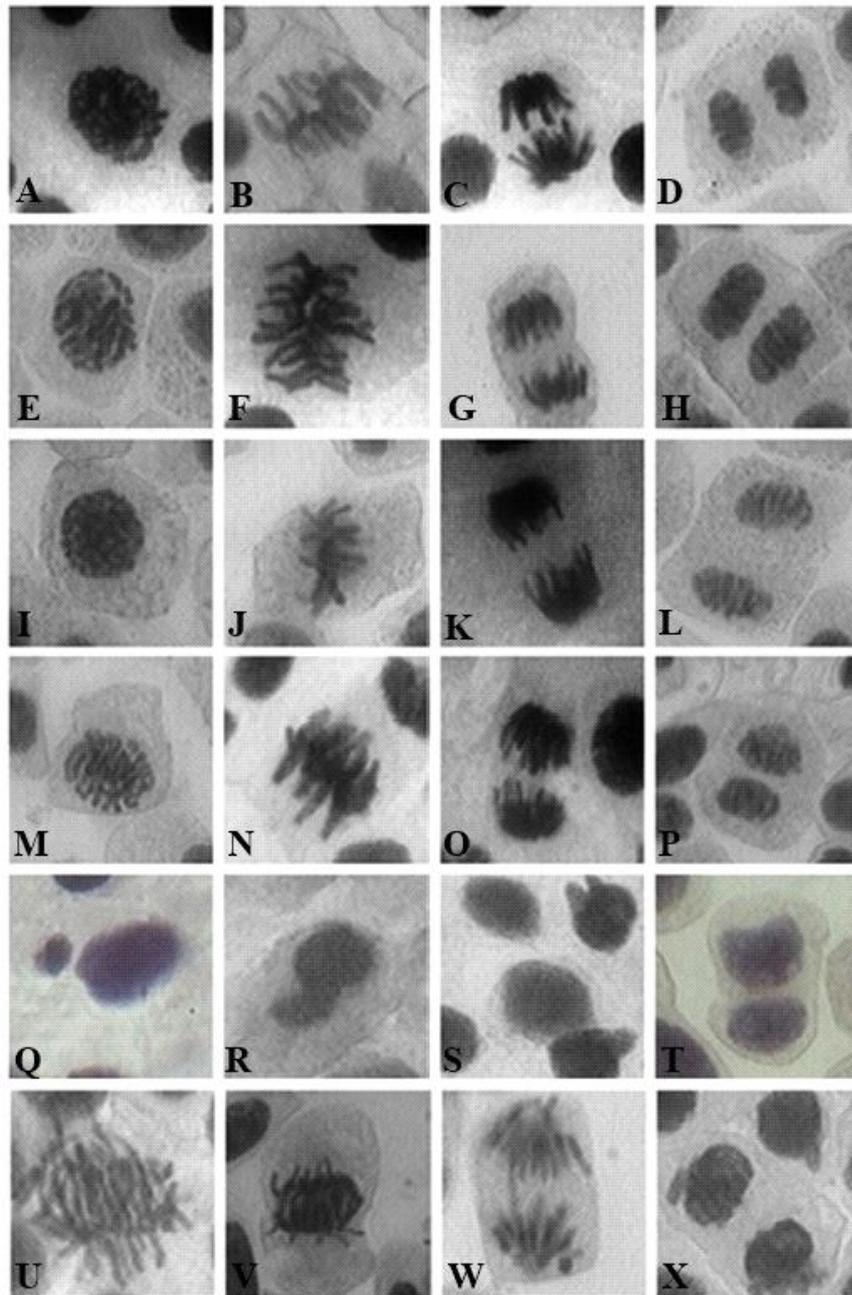
Letras iguais não diferem significativamente.

Através do sistema teste *Allium cepa* também é possível observar ocorrência de alterações cromossômicas no ciclo celular, e, portanto, este método tem sido usado como indicativo de riscos sobre o consumo de diferentes produtos (VERMA; SRIVASTAVA, 2018).

Nas análises das células meristemáticas de *A. cepa* tratadas com a iangambina foram encontradas células mitóticas normais, semelhantes ao controle negativo, sugerindo que a iangambina não é genotóxica e, portanto, não mutagênica. No entanto, nas células meristemáticas tratadas com o controle positivo, foram evidenciadas células com anormalidades cromossômicas, entre elas: anáfase retardada, pontes em anáfase, quebra cromossômica, micronúcleos e telófase desorientada (Figura 8).

Não foram encontradas, na literatura consultada, evidências científicas relacionadas à ação da iangambina em células vegetais. Mas no estudo realizado por Marques (2003), a iangambina e o extrato etanólico de *Ocotea duckei* Vattimo-Gil não apresentaram potencial mutagênico às cepas de *Salmonella typhimurium* no teste de Ames.

**Figura 8.** Fotomicrografias das fases da divisão celular de células meristemáticas (*Allium cepa*) tratadas com controle negativo, com concentrações da iangambina 12,5  $\mu\text{g/mL}$ , 25  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$  e controle positivo



**Legenda:** controle negativo (A-D), concentrações da iangambina 12,5  $\mu\text{g/mL}$  (E-H), 25  $\mu\text{g/mL}$  (I-L), 50  $\mu\text{g/mL}$  (M-P) e controle positivo (Q-R). (A, E, I, M): prófase normal, (B, F, J e N): metáfase normal, (C, G, K e O): anáfase normal, (D, H, L e P): telófase normal, Q: célula com micronúcleo, R: núcleo lobulado, S: interfase com botão nuclear, T: célula

binucleada, **U**: pontes múltiplas na anáfase, **V**: anáfase retardada, **W**: anáfase com ponte e quebra cromossômica e **X**: célula binucleada. Coloração: Hematoxilina e eosina (HE).  
Objetiva: 1000x.

#### 4.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA

O ensaio de toxicidade aguda na dose 2000 mg/kg, a iangambina não causou mortalidade nos animais, após a administração ou durante todo o período do estudo (14 dias no total). A não mortalidade dos animais nesta dose é considerada um dado positivo, de acordo com o Guia 425 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) a amostra é considerada praticamente não tóxica quando apresenta um valor de DL50 acima de 2000 mg/kg ou entre 2000 e 5000 mg/kg, se enquadrando na Classe 5, e portanto, considerada de baixa toxicidade, indicando uma certa margem de segurança no seu uso (OECD, 2008).

A respeito do screening hipocrático realizado, a administração da iangambina na dose de 2000 mg/kg causou algumas alterações no comportamento dos animais apenas durante os 30 minutos de observação após a administração, quando comparados ao grupo controle negativo, no que se refere a atividade e coordenação do sistema motor, reflexos e atividades sobre o sistema nervoso central. Mas após os 30 minutos a atividade motora e os padrões de comportamento permaneceram preservados até o 14º dia de avaliação.

As alterações observadas neste estudo foram semelhantes às encontradas no estudo comportamental de camundondos Swiss realizado por Souza (2005), o qual comprovou a atividade depressora do sistema nervoso central, diminuição da atividade locomotora e prolongamento do tempo de sono por indução da iangambina.

#### 4.4 PARÂMETROS FISIOLÓGICOS

No que diz respeito ao consumo de água e de ração, os dados estão apresentados na Tabela 4. De acordo com os resultados obtidos pode-se observar que não houve diferença estatisticamente significativa nos consumos dos animais que recebeu a dose 2000 mg/Kg da iangambina em relação ao controle.

Variáveis como: diminuição ou aumento do consumo de água e ração, assim como perda ou aumento de peso, são parâmetros eficazes em estudos toxicológicos para indicar

alterações fisiológicas causadas pela toxicidade de uma substância em um animal. (TRAESEL et al., 2016). Portanto, a iangambina não apresenta estes sinais clínicos de toxicidade para camundongos.

Tabela 4. Consumo de água e de ração de camundongos Swiss controlado por 14 dias após a administração da dose

<b>Grupos</b>	<b>Dose (mg/Kg)</b>	<b>Consumo de Ração (g/dia)</b>	<b>Consumo de Água (mL/dia)</b>
<b>Controle</b>	-	15,8 ± 4,5 ns	45 ± 1,96 ns
<b>Iangambina</b>	2000	16,8 ± 3,9 ns	44,3 ± 2,76 ns

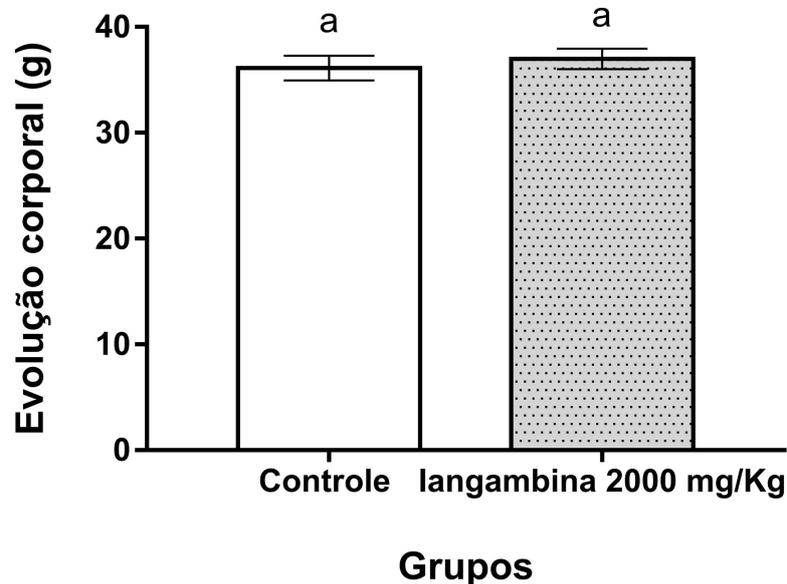
Dados estão apresentados como média ± desvio padrão da média de seis animais, analisados por Teste T de Student  $p < 0,05$  comparado com grupo controle (ns= não significativo).

A evolução corporal observada durante o período de 14 dias dos animais tratados com a dose de 2000 mg/Kg da iangambina também não apresentou diferença estatística significativa quando comparada ao grupo controle (Gráfico 2). A média do peso final dos animais que receberam a dose (36,11g) e grupo controle (36,98g) em relação a média inicial 35,6g e 36,0g, respectivamente, está de acordo com os dados esperados para variação de peso corpóreo, os quais, não devem ultrapassar 20% do peso médio inicial animal (OECD, 2008).

Alteração no peso corporal é um claro indicativo de efeitos toxicológicos causados por substâncias em teste de toxicidade aguda (BERENGUER-RIVAS et al., 2013). Portanto, podemos inferir que a iangambina não apresentou toxicidade para os camundongos na dose de 2000 mg/Kg, no que se refere a este parâmetro. █

Resultados semelhantes foram encontrados na avaliação da toxicidade aguda na dose 2.000 mg/kg do extrato metanólico de folhas de *Actinodaphne sesquipedalis*, uma espécie da família Lauraceae, o qual também não demonstrou alterações no consumo de ração e água, nem variações de peso corporal nos animais (OMAR, 2017).

Gráfico 2. Média da evolução corporal dos animais experimentais durante 14 dias de observação



Barras indicam média  $\pm$  desvio padrão. Dados analisados por Teste T de Student  $p < 0,05$  comparado com grupo controle. As letras iguais não diferem significativamente.

Na análise macroscópica do fígado e rins dos animais que receberam a dose de 2000 mg/Kg da iangambina, não foram observadas alterações na coloração e aspecto dos órgãos, em relação ao grupo controle. A análise do peso também não evidenciou aumento ou diminuição do tamanho, pois não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,5$ ) quando comparado ao grupo controle (Tabela 5). Sugerindo que não houve indícios de toxicidade nos rins e no fígado, uma vez que, alterações na morfologia, aumento ou diminuição, assim como sinais de hemorragia, revelam efeitos toxicológicos (GUPTA, 2018).

Tabela 5. Média e desvio padrão do peso absoluto dos órgãos dos animais experimentais

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	FÍGADO (g)	RINS (g)
Controle	-	2,29 $\pm$ 0,30 ns	0,552 $\pm$ 0,015 ns
Iangambina	2000	2,248 $\pm$ 0,55 ns	0,537 $\pm$ 0,125 ns

Dados da tabela estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da média de seis animais, analisados por Teste T de Student  $p < 0,05$  comparado com grupo controle (ns= não significativo).

#### 4.5 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

A iangambina na dose de 2000 mg/Kg não causou alterações hematológica aos camundongos (Tabela 6). Não houve diferença estatística significativa entre os animais que receberam a dose em relação ao grupo controle. Os valores do hemograma estão de acordo com os de referência para a espécie (SANTOS, 2016).

Tabela 6. Efeitos da iangambina por via oral após administração em dose única (2000mg/kg) sobre os parâmetros hematológicos em fêmeas de camundongos Swiss

<b>Parâmetros hematológicos</b>	<b>Controle</b>	<b>Iangambina 2000 mg/Kg</b>	<b>Valores de Referência (SANTOS, 2016)</b>
<b>Eritrócitos (<math>10^6</math> /mm<sup>3</sup>)</b>	9,745 $\pm$ 0,4355	9,945 $\pm$ 0,3088	5.2 – 10.4
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	14,24 $\pm$ 0,2931	14,2 $\pm$ 0,0678	11.1 – 14.8
<b>Hematócrito (%)</b>	43,9 $\pm$ 1,24	44,58 $\pm$ 1,536	32.1 – 46.5
<b>VCM (<math>\mu</math>m<sup>3</sup>)</b>	46,85 $\pm$ 0,5626	46,77 $\pm$ 0,6048	44.2 – 58.5
<b>HCM (pg)</b>	15,32 $\pm$ 0,2871	14,94 $\pm$ 0,4479	14.0 – 18.7
<b>CHCM (g/dL)</b>	32,43 $\pm$ 0,3323	32,2 $\pm$ 0,5502	28.4 – 38.5
<b>Plaquetas (<math>10^3</math> /mm<sup>3</sup>)</b>	754,5 $\pm$ 27,23	757,2 $\pm$ 35,05	315 – 758
<b>Neutrófilos (%)</b>	19,11 $\pm$ 4,286	21,02 $\pm$ 2,998	10 – 23
<b>Eosinófilos (%)</b>	0,202 $\pm$ 0,081	0,192 $\pm$ 0,1523	0 – 3
<b>Basófilos (%)</b>	1 $\pm$ 0,3215	0,8333 $\pm$ 0,4372	0 – 1
<b>Linfócitos (%)</b>	75,2 $\pm$ 3,674	77,16 $\pm$ 3,498	74 – 90
<b>Monócitos (%)</b>	2,364 $\pm$ 0,85	1,012 $\pm$ 0,2648	0 – 5

Dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da média de seis animais, analisados por Teste T de Student  $p < 0,05$  comparado com grupo controle.

Estes resultados indicam que a iangambina não apresentou toxicidade nos parâmetros de produção e morfologia de células sanguíneas dos animais experimentais. Pois o sistema hematopoiético é extremamente sensível a atividades de agentes tóxicos, principalmente aqueles com potencial mutagênico ou citotóxico, resultando em alterações qualitativas ou quantitativas, transitórias ou permanentes (MAXIE, 2015).

No estudo de toxicidade aguda em roedores na dose 2000 mg/Kg utilizando o extrato etanólico de *Litsea glutinosa*, uma espécie de um gênero de Laurácea, os parâmetros sanguíneos também foram avaliados quanto à toxicidade hematológica e não foram evidenciados efeitos adversos na hematopoese dos animais (SUMITHREGOWDA et al., 2017).

#### 4.6 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Os resultados descritos na Tabela 7 demonstraram que houve diferença estatística significativa ( $P < 0,5$ ), apenas na atividade hepática monitorada pelo nível de ALT (Aspartato alanina-transferase), contudo, as demais atividades analisadas (Glicose, Ureia, Creatinina, Colesterol Total e AST) não apresentaram diferença estatística significativa ( $P > 0,5$ ) quando comparado os valores séricos dos animais tratados com a iangambina 2000 mg/Kg aos do grupo controle.

Tabela 7. Efeitos da iangambina administrada por via oral em dose única (sobre os parâmetros bioquímicos de camundongos Swiss fêmeas.

<b>Parâmetros Bioquímicos (Unidade)</b>	<b>Controle</b>	<b>Iangambina 2000 mg/Kg</b>
<b>Glicose (mg/dL)</b>	171,5 ± 14,9	155,8 ± 12,76
<b>Ureia (mg/dL)</b>	35 ± 3,033	32,67 ± 2,261
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,2 ± 0,03162	0,22 ± 0,03742
<b>Colesterol total (mg/dL)</b>	58,67 ± 3,383	63,5 ± 2,941
<b>TGO/AST (U/L)</b>	151,5 ± 3,797	184 ± 17,48
<b>TGP/ALT (U/L)</b>	52 ± 3,755	70,2 ± 3,056**

Dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da média de seis animais, analisados por Teste T de Student  $p < 0,05$  comparado com grupo controle (\*= diferença estatística significativa).

Embora os animais experimentais que receberam a dose de 2000 mg/Kg tenha evidenciado uma elevação no nível sérico de Aspartato alanina-transferase (ALT), apresentando diferença estatística do controle, podemos levar em consideração que não houve comprometimento hepático. Pois, apesar de alterações nas concentrações séricas de ALT caracterizar doença hepática, muitas vezes podem não ter nenhum significado clínico, uma vez que, o aumento de enzimas citoplasmáticas, como ALT, deve-se também a outros fatores, como por exemplo: aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática (WORASUTTAYANGKURN et al., 2012).

Os resultados obtidos nesse estudo não mostraram alterações significantes nos níveis plasmáticos de ureia e creatina entre os grupos de animais tratados com a iangambina em comparação ao grupo controle, sugerindo o não comprometimento da atividade renal, pois estes compostos nitrogenados não proteicos (NPN) são considerados marcadores desta função (KIRSZTAJNS; BASTOS, 2015). Assim como, mais uma vez sugere o não comprometimento hepático, uma vez que, a ureia é um produto da degradação do metabolismo dos aminoácidos, produzida a partir da amônia no ciclo da ureia hepática (NELSON; COX, 2018).

Resultados semelhantes foram encontrados em extratos de *Persea americana* Mill, uma espécie de outro gênero de Lauraceae, onde não foi evidenciado potencial tóxico para camundongos fêmeas na dose de 2000 mg/Kg. Embora tenham observado um aumento nos níveis séricos de marcadores hepáticos (AST e ALT) constatou-se o não comprometimento do fígado, assim como, não houve comprometimento da atividade renal (KAMAGATE et al., 2016).

#### 4.7 PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS

Para avaliação mais detalhada dos possíveis efeitos tóxicos da iangambina na dose de 2000 mg/Kg sobre os órgãos dos camundongos, foi realizada uma avaliação histopatológica dos rins e fígado, órgãos alvos de efeitos toxicológicos (GUPTA, 2018).

A análise histopatológica do fígado dos animais que receberam a dose de 2000 mg/Kg da iangambina revelaram características semelhantes ao grupo controle, com a manutenção da

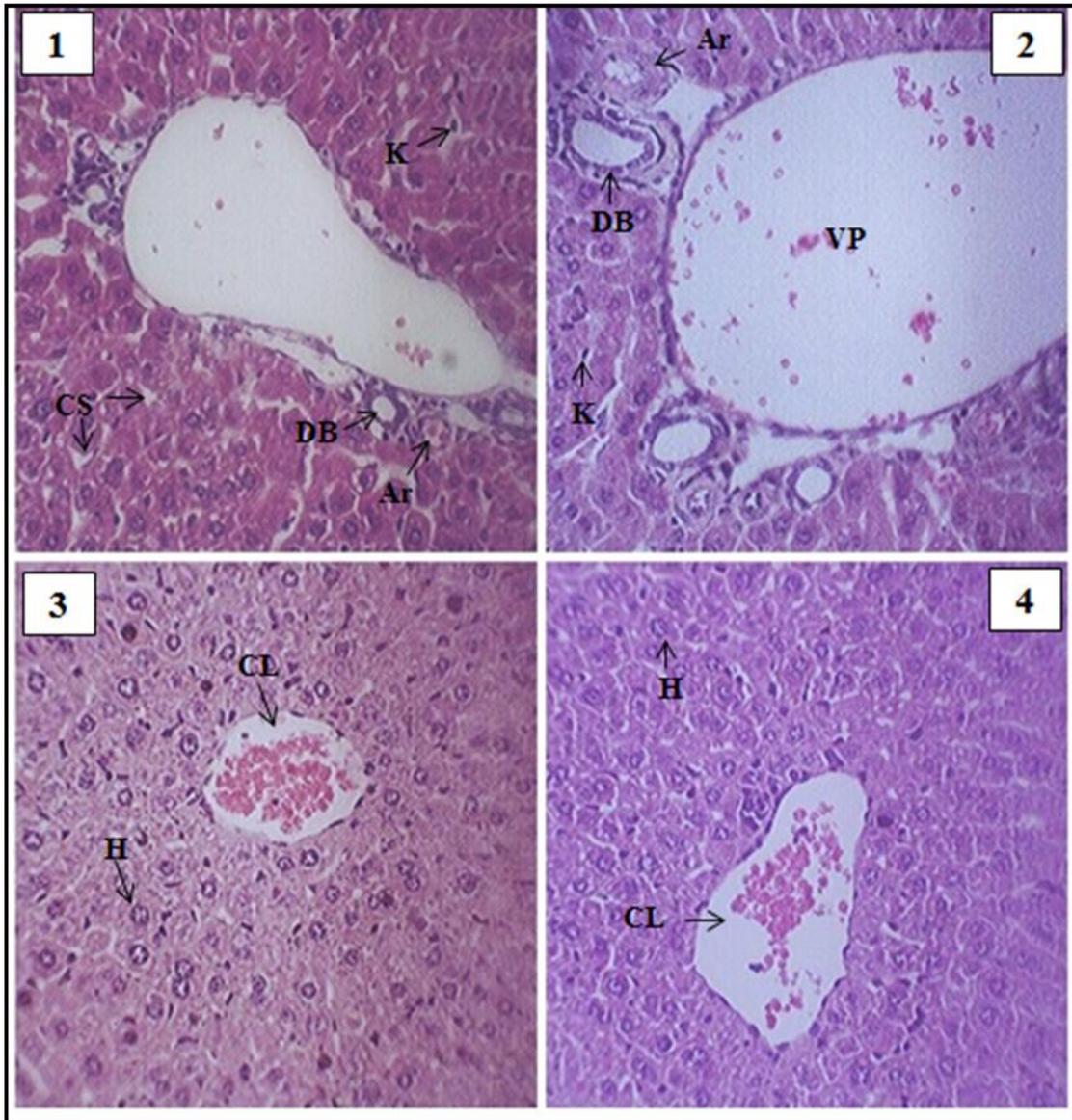
arquitetura histológica do órgão, distribuição normal da veia centrolobular, das estruturas do espaço porta e dos capilares sinusóides. Os espaços portais encontram-se regularmente distribuídos, cuja matriz apresenta a tríade portal de Glisson composta de um ramo da artéria hepática, um ramo da veia porta e um ducto biliar (Figura 9).

Em uma análise histológica do fígado normal encontram-se hepatócitos, os quais apresentam núcleo central, arredondado com um ou dois nucléolos bem evidenciados. Estas células se agrupam formando os lóbulos hepáticos. Em cada lóbulo hepático encontram-se uma veia centrolobular, veia porta, uma artéria hepática, um ducto biliar e vasos linfáticos. Os espaços entre os lóbulos são chamados de sinusóides (capilares hepáticos compostos por células endoteliais típicas de capilares sanguíneos e macrófagos chamados de células de Kupffer). As células de Kupffer são estreladas, ativamente fagocitárias, e tem a característica de englobar hemácias remanescentes, resíduos e materiais particulados (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2017).

Extratos hidroalcoólicos de *Litsea floribunda*, uma espécie da família Lauraceae, também não causaram mortalidade ou efeitos toxicológicos em todos os parâmetros analisados ou hepatotoxicidade na dose de 2000 mg / kg, sendo considerado praticamente não tóxico (DEVIKA; NALINI, 2018).

A estrutura do rim sem alterações patológicas consiste na presença de uma cápsula de tecido conjuntivo denso e duas zonas denominadas medular e cortical. Na zona medular identifica-se estruturas cônicas ou piramidais (pirâmides de Malpighi), tais estruturas entram em contato com a zona cortical que é contínua e ocupa os espaços deixados pelas pirâmides. Há ainda a presença de estruturas vasculares denominadas de corpúsculos de Malpighi do rim, formado por capilares envolvidos pela cápsula de Bowman (GARTNER, 2017).

Figura 9. Fotomicrografias do fígado de camundongos Swiss dos dois grupos experimentais



**Legenda:** 1- Controle: detalhe do espaço porta, no qual se observa a Veia Porta hepática (VP), Ducto biliar (DB) e Artéria (Ar), também os capilares sinusóides (CS) e as células de Kupfer (K); 2- Iangambina 2000 mg/Kg: observa-se os aspectos da arquitetura histológica mantida e semelhante ao grupo controle, o espaço porta e suas estruturas com distribuição normal; 3- Controle: são observados hepatócitos (H) com tamanho regulares e uma veia centro-lobular (CL). 4- Iangambina 2000 mg/Kg: assim como no grupo controle, os hepatócitos de tamanho regulares e veia centro-lobular com distribuição normal. Cortes corados com Hematoxilina e Eosina (HE), com aumento de 400x.

Os rins dos animais que receberam a dose de 2000 mg/Kg da iangambina, apresentaram-se dentro dos limites de normalidade histológica, com arquitetura glomerular e tubular preservada. Foram encontradas apenas algumas alterações histológicas, reacionais, focais, mínimas, como: infiltrado inflamatório linfoplasmocitário (Figura 11). Não houve diferença estatística no diâmetro do espaço capsular (cápsula de Bowman) nem no tamanho (área e perímetro) dos glomérulos quando comparados aos dos animais do grupo controle (Tabela 8). Estes resultados indicam que a iangambina na dose 2000 mg/Kg não exibiu de alterações nefrotóxicas.

Tabela 8. Morfometria expressa em  $\mu\text{m}$  do espaço capsular (Cápsula de Bowman) e da área e perímetro dos glomérulos dos rins dos animais experimentais

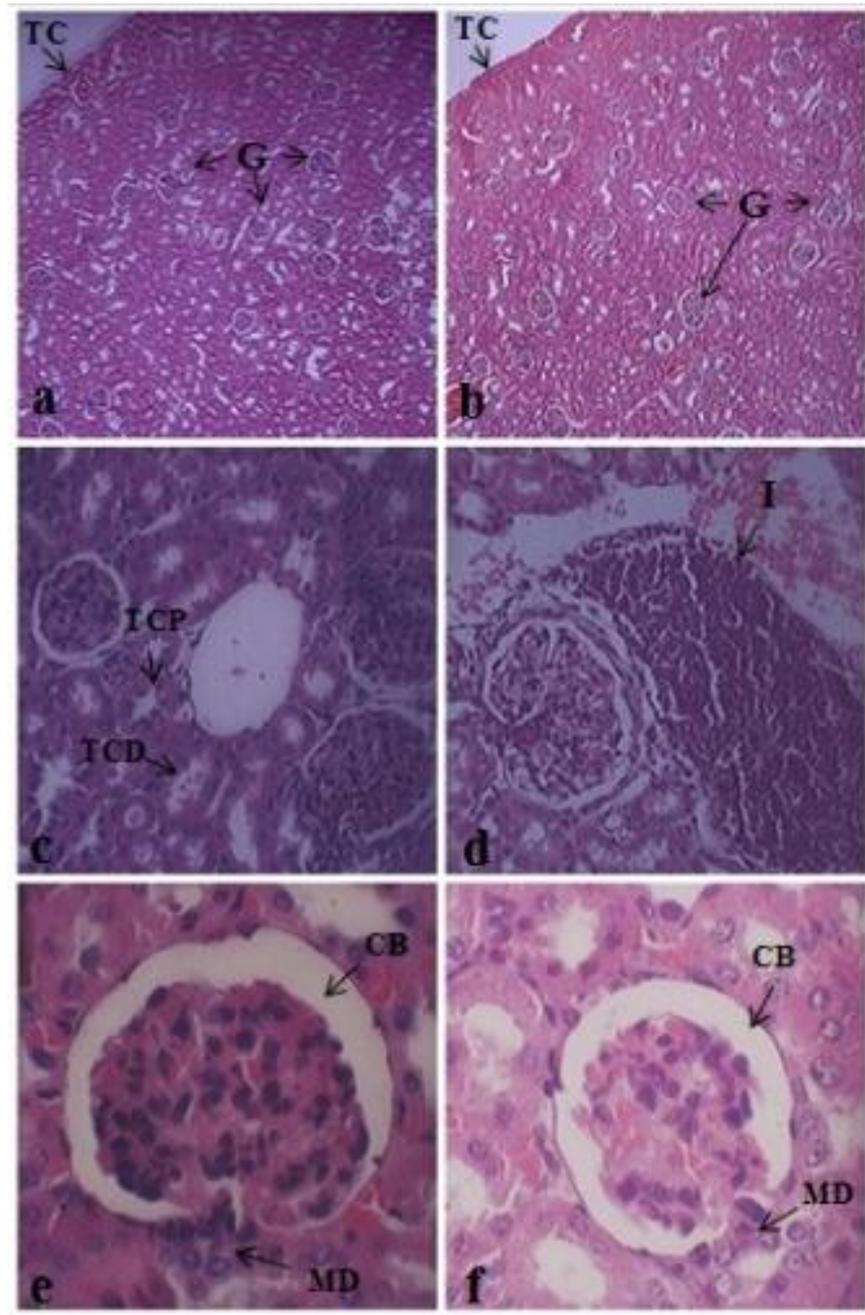
<b>MORFOMETRIA</b>	<b>IANGAMBINA 2000mg/Kg</b>	<b>CONTROLE</b>
<b>Diâmetro do espaço capsular (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	22803 $\pm$ 808,8 ns	25018 $\pm$ 799,5 ns
<b>Área dos glomérulos (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	49462 $\pm$ 3782 ns	47087 $\pm$ 2538 ns
<b>Perímetro dos glomérulos (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	731014 $\pm$ 24970 ns	767677 $\pm$ 20255 ns

Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da média de seis animais, analisados por Teste T de Student  $p < 0,05$  comparado com grupo controle (ns= não significativo).

Uma avaliação associando-se resultados bioquímicos e histopatológicos confirma que a iangambina não promoveu lesões renais comprometedoras na dose aguda estudada.

No estudo de toxicidade aguda do extrato etanólico de *Cinnamomum cassia*, uma espécie da família Lauraceae, realizado na dose máxima (2000 mg/Kg), foram encontrados resultados semelhantes, uma vez que também não houveram alterações nos parâmetros fisiológicos (pesos corporais e consumo de água e ração), parâmetros hematológicos, parâmetros bioquímicos, e não foram observadas alterações comprometedoras para atividade renal (YUN, 2018).

Figura 10. Fotomicrografias dos rins dos animais dos dois grupos experimentais



**Legenda:** **a:** Controle – Zona cortical, evidenciando a cápsula do tecido conjuntivo (TC) e os glomérulos (G) (HE 20x); **b:** Iangambina 2000 mg/Kg- Zona cortical com características semelhante ao grupo controle (HE 20x). **c:** Controle - Glomérulo de Malpighi, túbulo contorcido proximal (TCP) e distal (TCD) (HE 400x); **d:** Iangambina 2000mg/Kg - Infiltrado linfoplasmocitário (I) (HE 400x). **e:** Controle - Glomérulo (G) preservado envolvido por cápsula de Bowman (CB), mácula densa (MD) (HE 1000x); **f:** Iangambina 2000 mg/Kg- Glomérulo (G) preservado com características semelhantes ao grupo controle (HE 1000x).

## 5 CONCLUSÃO

A iangambina isolada das folhas de *Ocotea dukei*, em testes *in vitro* e *in vivo*, não mostrou ser citotóxica, genotóxica e mutagênica, bem como, apresenta um valor de DL50 acima de 2000 mg/kg, portanto, foi considerada de baixa toxicidade ou praticamente não tóxica para camundongos Swiss, os quais permaneceram com estrutura e morfologia do fígado e dos rins preservadas, caracterizando-se como um princípio ativo promissor para pesquisas futuras.

## REFERÊNCIAS

- AHMADI, B. B.; BAHMANI, M.; TAJEDDINI, P.; NAGHDI, N.; KOPAEI, M. R. **An ethno-medicinal study of medicinal plants used for the treatment of diabetes.** *Journal of Nephropathology*; 5(1):44-50, 2016.
- ALGHARABLY, E. A. H.; KREUTZ, R. ; GUNDERT-REMY, U. **Importance of in vitro conditions for modeling the in vivo dose in humans by in vitro–in vivo extrapolation (IVIVE).** *Archives of Toxicology*, 1:1-7, 2019.
- ALLKIN, B. **Useful plants - medicines:** at least 28, 187 plant species are currently recorded as being of medicinal use. In: Willis, K.J. (Ed.), *State of the World's Plants*. Editor: Willis, K.J., London (UK), 2017.
- ALMEIDA, R.N.; PACHÚ, C.O.; BARBOSA-FILHO, J.M. **Avaliação da possível atividade analgésica da iangambina obtida da *Ocotea duckei* Vattimo.** *Cienc. Cult. Saúde*. v. 14, p. 7–10, 1995.
- ALVES, F. M.; DOMINGOS, D. Q.; VAZ, P. P.; ARRUDA, R. C. O.; SOUZA, V. C.; **Check-list de Lauraceae Juss. para Mato Grosso do Sul, Brasil.** *Iheringia, Série Botânica*, 73(supl.):231-238, 2018.
- ANVISA (Brasil). Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos.** Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF, Brasília, 2013.
- ARAÚJO C. V.; BARBOSA-FILHO J. M.; CORDEIRO R. S.; TIBIRIÇÁ E. **Protective effects of yangambin on cardiovascular hyporeactivity to catecholamines in rats with endotoxin-induced shock.** *Naunyn-Schmiedeberg’s Arch. Pharmacol.* 363, 267-275, 2001.
- ARAÚJO, I. G. A, SILVA, D.F.; ALUSTAU, M. C.; DIAS, K. L. G.; CAVALCANTE, K. V. M.; VERAS, R. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ANJOS-NETO, M.; BENDHACK, L. M.; CORREIA, N. A; MEDEIROS, I. A. **Calcium Influx Inhibition is Involved in the Hypotensive and Vasorelaxant Effects Induced by Yangambin.** *Molecules*, 19: 6863-6876, 2014.
- AYE, M. M.; AUNG, H. T.; SEIN, M. M.; ARMIJOS, C. **A Review on the Phytochemistry, Medicinal Properties and Pharmacological Activities of 15 Selected Myanmar Medicinal Plants.** *Molecules*, 24(2): 293, 2019.
- BALLABENI, V., TOGNOLINI, M., GIORGIO, C., BERTONI, S., BRUNI, R. AND BAROCELLI, E. ***Ocotea quixos* Lam. essential oil:** In vitro and in vivo investigation on its anti-inflammatory properties. *Fitoterapia*. 81: 289-295, 2010.

BARBOSA-FILHO, J. M.; VARGAS, M. R. W.; SILVA, I. G.; FRANÇA, I. S.; MORAIS, L. C. S. L.; CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S.; SOUZA, M. F. V.; CHAVES, M. C. O.; ALMEIDA, R. N.; AGRA, M. F. ***Ocotea duckei***: Exceptional source of yangambin and other furofuran lignans. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 71: 231-238, 1999.

BERENGUER-RIVAS, C. A.; CASTILLO, A. A.; MARTÍNEZ, H. S.; ZAPATA, E. P.; HERNÁNDEZ, J. B.; TASSÉ, Y.M. **Acute oral toxicity of *Azadirachta indica* (Neem Tree)**. *Rev. Cubana Plant Med*, 18: 502-507, 2013.

BERLINCK, R. G. S.; BORGES, W. S.; SCOTTI, M. T.; VIEIRA, P. C. **A QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS DO BRASIL DO SÉCULO XXI**. *Química Nova*, volume 40, nº6, São Paulo, 2017.

BOOKER, A.; JOHNSTON, D.; HEINRICH, M. **Value Chains of Herbal Medicines—Ethnopharmacological and Analytical Challenges in a Globalizing World**. *Evidence-Based Validation of Herbal Medicine*, 29–44, 2015.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Agência Saúde, 06/03/2009. Disponível em:  
<[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms\\_relacao\\_plantas\\_medicinais\\_sus\\_0603.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf)>  
> Acessado em: 20 de Janeiro de 2019.

BRASIL, 2010a. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 17, de abril de 2010: Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos**. Disponível:  
<[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0017\\_16\\_04\\_2010.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0017_16_04_2010.html)> Acessado em: 02 de Fevereiro de 2019.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Portaria GM/MS nº 533, de 28 de março de 2012**: Estabelece o elenco de medicamentos e insumos da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). *Diário Oficial da União*, Brasília – DF, 2013.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Resolução-RDC Nº 14, DE 14 DE MARÇO DE 2013**: Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Insumos Farmacêuticos Ativos de Origem Vegetal. *Diário Oficial da União*, Brasília – DF, 2013.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 26, de 13 de maio de 2014**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília – DF, 2014.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais 2018**. Brasília – DF 2018.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Plantas medicinais e fitoterápicos no SUS**. Disponível em:  
<<http://portalms.saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-de-plantas-medicinais-e->

fitoterapicos-ppnmpf/plantas-medicinais-e-fitoterapicos-no-sus>. Acessado em 02 de fevereiro de 2019.

BROTTO, M. L.; CERVI, A. C.; SANTOS, E. P. **O gênero *Ocotea* (Lauraceae) no estado do Paraná, Brasil.** Rodriguésia 64(3): 495-525, 2013.

CACCIA-BAVA, M. C. G. G; BERTONI, B. W.; PEREIRA, A. M. S.; MARTINEZ, E. Z. **Disponibilidade de medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais nas unidades de atenção básica do Estado de São Paulo:** resultados do Programa Nacional de Melhoria do Acesso e da Qualidade da Atenção Básica (PMAQ). Ciênc. saúde colet, 22 (5): 1651-1659, 2017.

CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BOZZA, P. T.; CRUZ, H. N.; SILVA, C. L. M.; VIOLANTE, F. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; THOMAS, G.; MARTINS, M. A.; TIBIRIÇÁ, E. V.; NOEL, F.; CORDEIRO, R. S. B. **Yangambin: a new naturally occurring platelet activating factor receptor antagonist: binding and in vitro functional studies.** Planta Medica, v. 61, n. 2, p. 101-105, 1995.

CASTRO, R. D.; LIMA, E. O. **Atividade antifúngica dos óleos essenciais de sassafrás (*Ocotea odorifera Vell.*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) sobre o gênero *Candida*.** Rev. Bras Pl. Med. Botucatu. 13: 203-208, 2011.

CAVALLHEIRO, A. H.; ROSSETI, F.; OLIVEIRA, F. M.; BERRETTA, A. A. **hplc-quantification of yangambin and cytotoxicity of ocotea duckei extract against fibroblast cell line 1929 for studies in neglected diseases such as leishmaniasis.** Planta medica, 79:1130-1134, 2013.

CHAMPMAN, K. **“The value of acute toxicity studies to support the clinical management of overdose and poisoning: A cross-discipline consensus.”** Regulatory Toxicology and Pharmacology, 354-359, 2010.

COFID 2015. **Orientação sobre a Notificação Simplificada de Produto Tradicional Fitoterápico (PTF).** ANVISA. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/9b3b5b80482293e390d7b5bdc15bfe28/Notificacao%20de%20PTF.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso 02 de fevereiro de 2019.

CUCHIARA, C. C.; BORGES, C. S.; BOBROWSKI, V. L. **Sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador da citogenotoxicidade de cursos d'água.** Tecnologia, Ciência e Agropecuária, v. 6, n. 1, p. 33-38, 2012.

DACIE JV, LEWIS SM. **Practical Haematology.** 5th edition. Churchill Livingstone: Edinburgh, London, New York, 1975.

- DANDAPAT, S.; KUMAR, M.; M. P. SINHA. **Therapeutic efficacy of *Cinnamomum tamala* (Buch.-Ham.) and *Aegle marmelos* (L.) leaf.** Balneo Research Journal, V .5: 113-122, 2014.
- DELGADO, W.A.; CUCA, L.E.; CAROPRESE, J.F. **Chemical composition of essential oil of *Ocotea cymbarum* Kunth (cascarilla and/or sassafras) from the Orinoquia region.** Rev. Cubana Plant Med. 21(3): 248-260, 2016.
- DEVIKA, M.; NALINI, M. S. ***In vivo Litsea* evaluation of anxiolytic activity of aqueous and ethanolic extracts of floribunda (Bl.) Gamble –Lauraceae.** Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology, 4(1): 31-37, 2018.
- DUNNICK, J. K.; NYSKA, A. **The toxicity and pathology of selected dietary herbal medicines.** Toxicol. Pathol. 41: 374–386, 2013.
- EKOR, M. **The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety.** Frontiers in Pharmacology, 10;4:177, 2014.
- FERREIRA, F.G., M. C. POLLI, Y. OSHIMA FRANCO, e L. F. FRACETO. **“Fármacos: do desenvolvimento à retirada do mercado.”** Revista Eletrônica de Farmácia, 6 (1): p.14-24, 2009.
- FISKEJÖ G. **Allium test II: Assessment of a chemical’s genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in roots tips of *Allium cepa* L.** Environmental Toxicological and Waters Quality. International Journal, 9: 235-241, 1985.
- FLOOD, S. L.; BURKHOLDER, J. M. ***Chattonella subsalsa* (Raphidophyceae) growth and hemolytic activity in response to agriculturally-derived estuarine contaminants.** Harmful Algae, V. 76: 66-79, 2018.
- FRANÇA, E.; VASCONCELLOS, A. G. **Patentes de fitoterápicos no Brasil: uma análise do andamento dos pedidos no período de 1995-2017.** Caderno de Ciências e Tecnologia, Brasília. V. 35, n. 3, p. 329-359, 2018.
- GARTNER, L. P. **Tratado de histologia.** Elsevier, 4º Edição, 2017.
- GIRISH, V.; VIJAYALAKSHMI, A. **Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ.** Indian J Cancer. 41(1): 47, 2004.
- GUERRA M; SOUSA M. **Como observar os cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana.** Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002.
- GUIMARÃES, F. B.; TOMAZELLO-FILHO, M.; RODRIGUES, A. C. **Caracterização anatômica macroscópica do lenho de árvores de espécies de canela, *Ocotea* e *Nectandra* (Lauraceae), ocorrentes no estado de Santa Catarina.** Biotemas, 30 (3): 9-24, 2017.
- GUPTA, P. K. **Illustrated Toxicology: With Study Questions.** ACADEMIC PRESS, Volume 1. 2018.

- HAMON, J.; RENNER, M.; JAMEI, M.; LUKAS, A.; KOPP-SCHNEIDER, A.; BOIS, F. Y. **Quantitative in vitro to in vivo extrapolation of tissues toxicity.** *Toxicol In Vitro* 30:203–216, 2015.
- HAUSOTT B, GREGER H, MARIAN B. **Naturally occurring lignans efficiently induce apoptosis in colorectal tumor cells.** *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 129: 569-576, 2003.
- HINSINGER, D. D.; STRIJK, J. S. **Toward phylogenomics of Lauraceae:** The complete chloroplast genome sequence of *Litsea glutinosa* (Lauraceae), an invasive tree species on Indian and Pacific Ocean islands. *Plant Gene*, v, 9: 71-79, 2017.
- International Organization for Standardization (ISO). ISO 10993-5. **Biological evaluation of medical devices – Tests for in vitro cytotoxicity.** Switzerland; 2009.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN, P. **Histologia básica:** texto e atlas. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.
- KAMAGATE, M; KOUAME, N. M.; KOFFI, E.; KADJA, A. B.; CAMILLE, K.; YAO, N. A. R.; BALAYSSAC, E.; DAUBREY-POTEY, T.; N'ZOUÉ, K. S.; DIE-KACOU, H. M. **Acute toxicity and hypoglycaemic activity of the leaf extracts of *Persea americana Mill.* (Lauraceae) in Wistar rats.** *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, V. 10(33): 690-698, 2016.
- KIM, J. Y.; LIM, H. J.; LEE, D. Y.; KIM, J. S.; KIM, D. H.; LEE, H. J.; KIM, H. D.; JEON, R.; RYU, J.-H. **In vitro anti-inflammatory activity of lignans isolated from *Magnolia fargesii*.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 19, n. 3, p. 937-940, 2009.
- KIRSZTAJN, G. M.; BASTOS, M. G. **A Call to Prevention.** *Brazilian Journal of Nephrology*, v. 37 (3), 2015.
- LIMA, V.T.M. **Avaliação dos Efeitos Centrais da Iangambina Isolada de *Ocotea duckei* Vattimo:** Estudo Comportamental e Neuroquímico em Córtex Motor e Corpo Estriado de Camundongo. 2005. Tese (Doutorado em Farmacologia). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- MARQUES, R. C.; MEDEIROS, S. R.; DIAS, C.S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGNEZ-LIMA, L. F. **Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test.** *Mut.Res.-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 536:117-120, 2003.
- MAXIE, GRANT. **Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals.** E-BOOK; Elsevier Health Sciences, Volume 3, 2015
- MONTE-NETO, R. L.; SOUSA, L. M. A.; DIAS, C.S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; OLIVEIRA, M. R. **Yangambin cytotoxicity:** a pharmacologically active lignan obtained

from *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae). Zeitschrift für Naturforschung C: Journal of Biosciences, 63: 681-686, 2008.

MONTE-NETO, R. L.; SOUSA, L. M. A.; DIAS, C. S.; FILHO, J. M. B.; OLIVEIRA, M. R.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. **Morphological and physiological changes in Leishmania promastigotes induced by yangambin, a lignan obtained from *Ocotea duckei*.** Experimental Parasitology, v. 127 (1): 215-221, 2011.

MOREIRA, T. C.; MOREIRA, M. G. C.; MOREIRA, V. C.; LEOPOLDO, J. R.; AGOSTINHO, L. A. **Avaliação da toxicidade e da genotoxicidade da ivermectina e da deltametrina através de bioensaio com *Allium cepa*.** REVISTA CIENTÍFICA DA FAMINAS, V. 9, N. 1, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger.** Artmed Editora, 7ª Ed., 2018.

NÓBREGA, S. R.; FORTUNATO, M. E. M.; QUIRINO, Z. G. M. **Biologia reprodutiva, visitantes florais e dispersão de *Ocotea duckei* Vattimo-Gil (Lauraceae) na Reserva Biológica Guaribas, Paraíba, Brasil.** Gaia Scientia (2016). Volume 10(4): 252-261.

OECD - Organization for Economic Co-operation and Development. **Guidelines for testing of chemical. Acute oral toxicity – up-and-down-procedure.** OECD (Ed.): Paris, 2018<sup>a</sup>.

OECD - Organization for Economic Co-operation and Development. **Education at a Glance 2014.** OECD Indicators, OECD Publishing, 2014.

OGUNDAJO, L. A.; ADENIRAM, L. A.; ASHAFI, A. O. **Medicinal properties of *Ocotea bullata* stem bark extracts: phytochemical constituents, antioxidant and anti-inflammatory activity, cytotoxicity and inhibition of carbohydrate-metabolizing enzymes.** Journal of Integrative Medicine, 16(2):132-140, 2018.

OMAR, H.; NORDIN, N.; HASSANDARVISH, P.; HAJREZAIE, M.; AZIZAN, A. H. S.; FADAEINASAB, M.; MAJID, N. A.; ABDULLA, M. A.; HASHIM, N. M.; ALI, H. M.; **Methanol leaf extract of *Actinodaphne sesquipedalis* (Lauraceae) enhances gastric defense against ethanol-induced ulcer in rats.** Drug Design, Development and Therapy, 11: 1353–1365, 2017.

OLIVEIRA, A. C. D. ; ROPKE, C. D. **Os dez anos da Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (PNPMF) e os principais entraves da cadeia produtiva de extratos vegetais e medicamentos fitoterápicos no Brasil.** Revista Fitos, V. 10(2), 95-219, 2016.

PACHU, C. O.; ALMEIDA, R. N.; BARBOSA-FILHO, J. M. **Atividade depressora do sistema nervoso central pela iangambina.** Revista Ciência Cultura e Saúde, v. 12, p. 14-16, 1993.

PANMEI, R.; GAJUREL, P. R.; SINGH, B. **Ethnobotany of medicinal plants used by the Zeliangrong ethnic group of Manipur, northeast India**. *Journal of Ethnopharmacology*, V. 1, p. 1-30, 2019.

QUINET, A.; BAITELLO, J. B.; MORAES, P. L. R. **Lauraceae**. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2012. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000143>>. Acesso em: 5 de Dezembro de 2018.

RAKOTONDRAIBE, L. H.; GRAUPNER, P. R.; XIONG, Q.; OLSON, M.; WILEY, J. D.; KRAI, P.; BRODIE, P. J.; CALLMANDER, M. W.; RAKOTOBÉ, E.; RATOVOSON, F.; RASAMISON, V. E.; CASSERA, M. B.; HAHN, D. R.; KINGSTON, D. G. I.; FOTSO, S. **Neolignans and Other Metabolites from *Ocotea cymosa* from the Madagascar Rain Forest and Their Biological Activities**. *J. Nat. Prod.*, 78 (3):431–440, 2015.

SALATINO, A.; BUCKERIDGE, M. **“Mas de que te serve saber botânica?”**. *Estudos Avançados*, V. 30 (87), P. 177-196, 2016.

SALLEH, W. M. N. H. W.; AHMAD, F. **Phytochemistry and Biological Activities of the Genus *Ocotea* (Lauraceae): A Review on Recent Research Results (2000-2016)**. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7 (05), 204-218, 2017.

SANTOS, E. W.; OLIVEIRA, D.; HASTREITER, A.; SILVA, G.; BELTRAN, J.; TSUJITA, M.; CRISMA, A.; NEVES, S.; FOCK, R.; BORELLI, P. **Valores de referência hematológicos e bioquímicos para camundongos das linhagens C57BL/6, Swiss Webster e BALB/c**. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 53(2), 138-145, 2016.

Santos, M. F. C.; Alcântara, B. G. V.; Felicianoa, C. R.; Silva, A. F.; Maiolini, T. C. S.; Neto, K. A.; Murgu, M.; Paula, D. A. C.; Soares, M. G. **New bicyclic [3.2.1] octane neolignans derivatives from *Aniba firmula* with potent in vivo anti-inflammatory activity on account of dual inhibition of PGE2 production and cell recruitment**. *Phytochemistry Letters*, 30: 31–37, 2019.

SARKAR, S.; BOSE, D.; GIRI, R. P.; MUKHOPADHYAY, M. K.; CHAKRABARTI, A. **Status of Membrane Asymmetry in Erythrocytes: Role of Spectrin**. *Biochemical and Biophysical Roles of Cell Surface Molecules*, 3–11, 2018.

SHARIFI, S., BEHZADI, S., LAURENT, S., FORREST, M. L., STROEVE, P., MAHMOUDI, M., MAISTRIAU, A. **Toxicity of nanomaterials**. *Chemical Society Reviews*, 41(6), 63 2323–2343, 2012.

SILVA, N. C. C; FERNANDES JÚNIOR, A. **Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity**. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 16, p. 402-413, 2010.

- SILVA, S. L.; NASCIMENTO, A. A.; RIBEIRO, E F. B.; RIBEIRO, R. B.; ALVES, C. M.; SANTOS, A. M.; BURMANN, A. P. R.; MIRA-NETO, R. A. **Avaliação da toxicidade aguda pré-clínica do extrato metanólico das cascas do caule de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae).** ACTA AMAZONICA, V. 46(1): 73 – 80, 2016.
- SILVA, R. M. G.; CARVALHO, A. C. M.; MATIOLLI, L. S.; FIGUEIREDO, C. C. M.; GOMES, A. C.; FERREIRA, P. C.; SILVA, L. P. **Genotoxicity and antioxidant activity of spices and herbs used in brazilian cuisine.** Bioscience Journal Uberlândia, v. 34 (3): 727-743, 2018
- SOUSA, F. C. F.; LIMA, V. T. M.; LACERDA, C. D. G.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VIANA, G. S. **Central nervous system activity of yangambin from *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae) in mice.** Phytotherapy Research 2005, 19: 282-286.
- SOUZA, T. C.; GUEDES, A. S.; SANTOS, L. C. S.; **Estudo fotoquímico e avaliação *in vitro* da atividade hemolítica de extratos aquosos do *Illicium verum* utilizado para o tratamento dos sintomas clínicos da dengue.** Revista Diálogos & Ciência (D&C), v. 2, n. 40 (17), p.141-157, 2017.
- SUMITHREGOWDA, A. H.; VENKATARANGAIAH, K.; HONNENAHALLY, K. M.; MANJUNATH, V. N. **Cytotoxicity and Oral Acute Toxicity Studies of *Litsea glutinosa* C. B (ROB) Stem Bark Ethanol Extract.** Pharmacogn J., 9(6): 880-886, 2017.
- TEDESCO, S. B.; LAUGHINGHOUSE, H. D. **Bioindicator of Genotoxicity: The Allium cepa Test.** Environmental Contamination, 4: 137-156, 2012.
- TELES, M. M. R. S. **Estudo fitoquímico de *Ocotea duckei* Vattimo (LAURACEAE).** TESE. 2012. Disponível em: <  
<https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/tede/6796/1/arquivototal.pdf>> Acessado em: 12 de Janeiro de 2019.
- TRAESEL, G. K.; MENEGATI, S. E. L. T.; SANTOS, A. C.; SOUZA, R. I. C.; VILLAS-BOAS, G. R.; JUSTI, P. N.; KASSUYA, C. A. L.; ARGANDOÑA, E. J. S.; OESTERREICH, S. A.; **Oral acute and subchronic toxicity studies of the oil extracted from pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.) pulp in rats.** Food Chem. Toxicol. 97, 224–231, 2016.
- VERMA, S.; SRIVASTAVA, A.; **Bioassessment of Genotoxicity Due to Flux in Soil Nitrogen Dynamics Caused by Addition of Ammonium Nitrate.** Cytologia, 83(3), 271-275, 2018.
- YOUSSEF, R. S. A. **Medicinal and non-medicinal uses of soma plants found in the middle region of Saudo Arabia.** J Med Plants Res., 7 (34): 2501, 2013.
- YUN, J. W.; YOU, J. R.; KIM, Y. S.; KIM, S. H.; CHO, E. Y.; YOON, J. H.; KWON, E.; JANG, J. J.; PARK, J. S.; KIM, H. C.; CHE, J.; KANG, B. C. ***In vitro* and *in vivo* safety**

**studies of cinnamon extract (Cinnamomum cassia) on general and genetic toxicology.** Regulatory Toxicology and Pharmacology, 95: 115-123, 2018.

WHO. **The world medicines situation 2011:** traditional medicines: global situation, issues and challenges. world health organization, geneva, 2011.

World Health Organization – WHO. **Traditional medicine strategy:** 2014-2023. Printed in Hong Kong SAR, China, 2013.

## ANEXOS

## ANEXO A – Parecer de aprovação do comitê de Ética de uso Animal (CEUA)



Universidade Federal de Pernambuco  
 Centro de Biociências  
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n  
 50670-420 / Recife - PE - Brasil  
 Fones: 2126 8842  
 ceua@ufpe.br

Recife, 20 de dezembro de 2018

Ofício nº 110/18

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

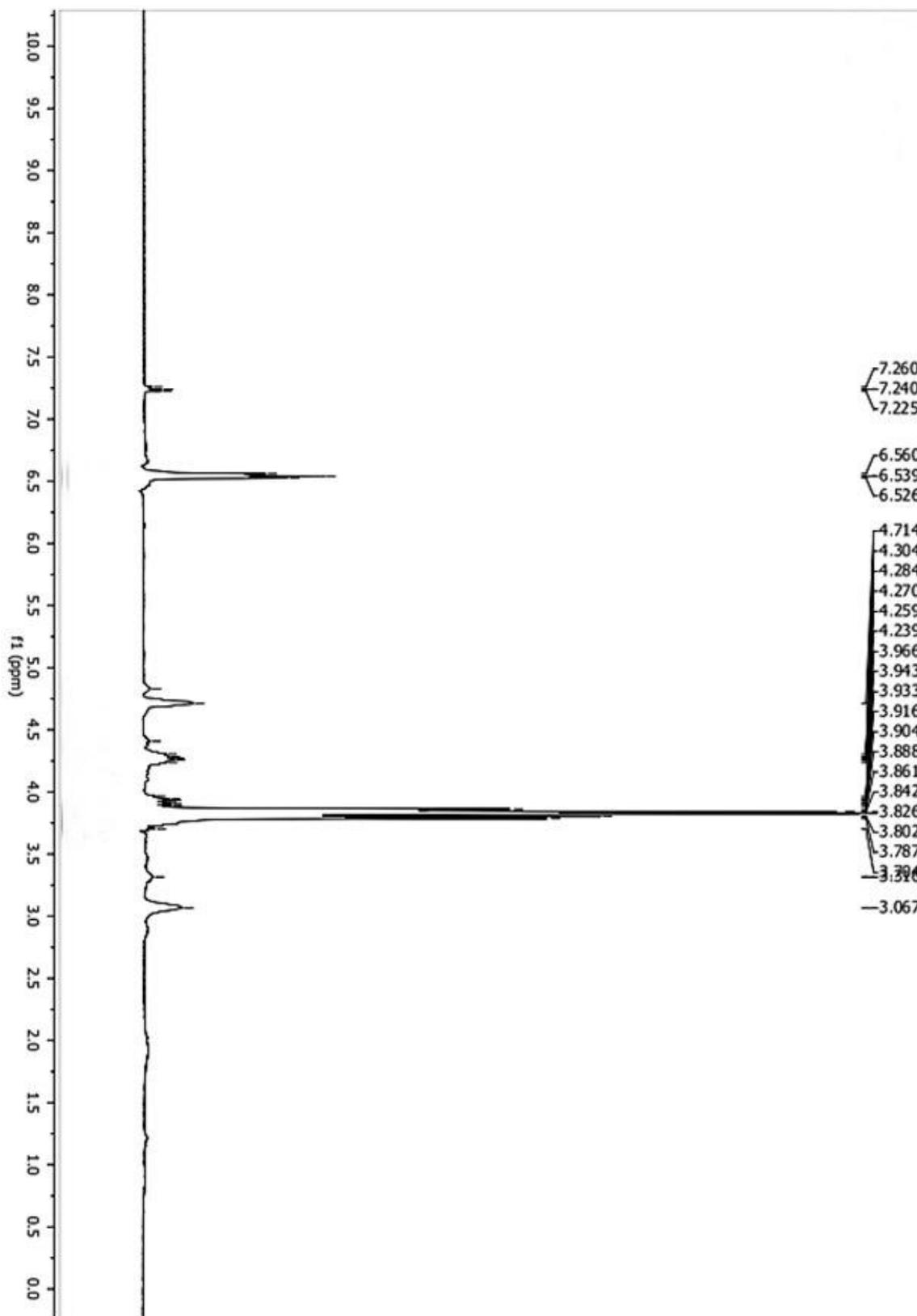
Para: **Prof.ª Ivone Antônia de Souza**  
 Departamento de Antibióticos  
 Centro de Biociências  
 Universidade Federal de Pernambuco  
 Processo nº 23076.023060/2018-50

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação da Toxicidade Aguda da langambina em Camundongos Swiss.**” registrada com o nº 23076.023060/2018-50, sob a responsabilidade de **Prof.ª Ivone Antônia de Souza** que envolvem a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 18/12/2018.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Dezembro/2018 a Fevereiro/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Isogênico
Nº de animais	12
Peso/Idade	25-35g/ 60 dias
Sexo	(Macho e Fêmea)
Origem	Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental (Bioterio do Departamento de Antibióticos da UFPE)

Atenciosamente,

Prof. Sebastião R. F. Silva  
 Vice-Presidente CEUA/UFPE  
 SIAPE 2345691

ANEXO B - Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN da iangambina.

ANEXO C - Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN da iangambina.