

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO E CITOTÓXICO DE *Synadenium carinatum* Boiss (EUPHORBIACEAE).

Contribute to Phytochemical and Citotoxic Study of Synadenium carinatum Boiss (EUPHORBIACEAE)

Aline Alvares Machado*¹; Tomoe Nakashima¹; Waldir Antonio Silva²; Ernesto Renato Krüger³.

1. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Av. Prefeito Lothário Meissner, 632, Jardim Botânico, CEP: 80210-170, Curitiba, PR.

2. Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. R. dos Funcionários, 1540, Juvevê, CEP: 80035-050, Curitiba, PR

3. Laboratório Marcos Enrietti. R. Jaime Balão, 575, Hugo Lange, CEP: 80040-340, Curitiba, PR.

* Autor para correspondência e-mail: aline_alma@hotmail.com

Recebido em 23/03/2009, Aceito em 02/06/2011

RESUMO: *Synadenium carinatum* é uma planta da família Euphorbiaceae, latescente, utilizada como planta medicinal em diversas regiões do país com várias finalidades, entre elas câncer, inflamações, úlceras e como estimulante do sistema imunológico. Assim como outras do mesmo gênero, é conhecida como cega-olho, leitossinha, janaúba, e outros. Há muitos anos a população brasileira faz uso desta planta mesmo não existindo comprovações científicas sobre tais efeitos supostamente benéficos aos seres humanos. Assim, os objetivos deste trabalho foram caracterizar a espécie quimicamente e realizar testes *in vitro* para verificação de possível toxicidade animal, visando assim contribuir com o conhecimento popular. Foi realizado o *screening* fitoquímico da espécie, utilizando folhas frescas; os extratos apresentaram diversos metabólitos secundários de interesse farmacológico, entre eles: cumarinas, flavonóides, esteróides e/ou triterpenos, taninos, e outros. Os testes de citotoxicidade foram realizados

utilizando o látex, que é o produto da planta usado "terapeuticamente" pela população, em concentrações semelhantes às usadas popularmente. Os resultados demonstraram que, em concentrações mais elevadas, o látex apresenta citotoxicidade acentuada, o que inspira cuidados na sua utilização e em futuros testes em modelos animais e humanos.

Palavras-Chave: fitoquímica; *Synadenium carinatum*; screening fitoquímico; citotoxicidade.

ABSTRACT: *Synadenium carinatum* is a plant in the family *Euphorbiaceae*, latescent, used as a medical plant in many regions of Brazil with many purposes, among them to protect against cancer, inflammations and ulcers and to be an immunologic system stimulator. As other plants in the same genus, it is known as "cega-olho", "leitossinha", "janaúba", among other designations. For many years the Brazilian people has used this plant, although there is not scientific proof about its supposedly beneficial effects in human beings. Considering this, the aims of this paper were to characterize chemically this specie and to do tests *in vitro* in order to verify the possibility of animal toxicity and, then, to contribute to the popular knowledge. It was done fitochemical screening of this specie using its dry leaves; the extracts obtained showed many secondary metabolites of pharmaceutical interest, among them: cumarines, flavonoids, steroids and/or triterpenes, tanines, among others. The tests of cytotoxicity were done with latex, which is the product from the plant used "therapeutically" by the people, in concentrations similar to those popularly used. The results demonstrated that, in higher concentrations, latex shows accentuated citotoxicity, and this suggests awareness in its usage and in future tests in animal models or in humans.

INTRODUÇÃO

Fundamentalmente, o processo de *screening* ou triagem fitoquímica se baseia no princípio de que toda e qualquer substância presente na planta, independente da sua concentração, pode ser um princípio ativo (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Segundo DE LA CRUZ (2005), entre todos os medicamentos fabricados no mundo, 40% tiveram origem de fontes naturais, sendo que 60% dos fármacos utilizados para o tratamento de câncer são derivadas de produtos naturais. É então nesse sentido que a etnobotânica vem contribuir para o desenvolvimento de novas drogas (ELIZABETSKY, 2003). Segundo AMOROZO (1996), etnobotânica é a ciência que se

ocupa do estudo do conhecimento e das conceituações desenvolvidas pelas sociedades a respeito dos vegetais, incluindo o uso que se dá a eles. Trata-se, portanto, uma ciência altamente interdisciplinar, porque envolve não só a botânica, como também a fitoquímica, a farmacologia, a medicina, a antropologia e outras (FONTE, 2004).

Diretrizes da Organização Mundial de Saúde – OMS (WHO 2002) apontam para a necessidade de se incentivar as práticas populares no tratamento de doenças, fundamentando esses procedimentos sob uma base científica sólida; assim, torna-se necessário identificar práticas seguras e eficazes através das quais esses tratamentos alternativos se tornem viáveis.

A planta *Synadenium carinatum*, popularmente conhecida no Brasil como janaúba ou leitossinha, vem sendo usada pela medicina popular há muitos anos. Seu uso era tradicional entre os indígenas, que utilizavam a "garrafada", obtida através de diluição do látex da planta em água pura e fresca, como remédio "cura-tudo". Suas aplicações foram bastante difundidas para a cura de variados tipos de câncer, mas há relatos de populares utilizando a planta para outras enfermidades, tais como o diabetes e a úlcera. Porém, são poucos os estudos a respeito das supostas ações farmacológicas da planta, não havendo, portanto, evidências científicas que as comprovem (MACHADO; NAKASHIMA, 2007).

Estudos recentes realizados com a espécie demonstraram um grande potencial imunomodulador de um componente isolado a partir de seu látex, uma lectina (AFONSO-CARDOSO, 2007; ROGÉRIO, 2007). Contudo, sabe-se que a população faz uso do látex na sua forma "integral" (sem qualquer processo de purificação, da maneira como é extraído da planta); dessa maneira, pode-se dizer que há mais substâncias além desta já isolada neste produto que podem atuar de maneira conjunta, produzindo os efeitos benéficos sobre a saúde humana observados naqueles que dele fazem uso. Esta afirmação se baseia no princípio da ação sinérgica dos compostos químicos, neste caso, metabólitos secundários do vegetal, que significa que diferentes compostos químicos que têm uma mesma atividade atuam de forma conjunta, potencializando os efeitos uns dos outros (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO,

2001). Assim, embora o isolamento e identificação dos compostos químicos vegetais sejam de extrema utilidade, é preciso lembrar que frequentemente, no caso de medicamentos fitoterápicos, não é necessariamente aquela substância isolada a mais útil para o tratamento da doença: exemplo disto é o caso relatado por YUNES, PEDROSA e CECHINEL FILHO (2001), em que o grupo de pesquisa isolou e identificou duas espécies químicas a partir do vegetal *Croton urucurara*, sendo que nenhuma das duas isoladamente teve o mesmo desempenho do extrato na forma "integral", ou seja, como é utilizado pela população.

Synadenium grantii, apresenta diversos compostos químicos com possível ação farmacológica, entre eles diterpenos, alcalóides, flavonóides entre outros. Este mesmo trabalho, porém, concluiu que nenhum dos extratos obtidos possuía a ação antiulcerativa apontada pela medicina popular; também foi evidenciada a presença de glicosídeos cianogênicos ou cianogenéticos, que são potencialmente tóxicos a um grande número de organismos vivos, o que demonstra o risco da administração de extratos desta planta (FRANCISCO e PINOTTI, 2000; GRUPO, 1998).

Trabalhos com outras espécies do gênero *Synadenium* também demonstraram a presença de glicoproteínas biologicamente ativas (MENON et al., 2002), o que pode nos levar a crer que a distribuição de certo tipo de padrão de proteínas de látex seja característico deste grupo vegetal. Além disso, muitos trabalhos recentes apontam

para a necessidade de maiores estudos sobre a família, em especial com o gênero *Synadenium* (SOUZA-FAGUNDES et AL, 2002; BITTNER et al, 2001; OLIVEIRA et al 2005; ROGÉRIO et al., 2007; PREMARTNA et al., 1981).

Ensaio *in vitro* com as substâncias de origem vegetal podem fornecer importantes dados sobre seu modo de ação, e assim guiar as próximas etapas de estudo; foi dessa forma que se chegou ao desenvolvimento de importantes fármacos da atualidade, tais como o etoposido e o paclitaxel, utilizados para o tratamento de vários tipos de câncer, e que são substâncias sintetizadas a partir da podofilotoxina, a toxina encontrada nas plantas do gênero *Taxus* (DAVID et al., 2007). Os testes de citotoxicidade *in vitro* consistem em expor direta ou indiretamente uma cultura de células de mamíferos a uma determinada substância, observando-se posteriormente as alterações causadas, como por exemplo, lise celular, inibição da formação de colônias celulares, descolamento do tecido, entre outros (INTERNATIONAL STANDARD, 1992; ROGERO et al., 2003). Essas modificações são observadas normalmente através de mecanismos de coloração, que são aplicados à cultura de células após um determinado período de exposição ao material em teste (CARVALHO et al., 2004; VALADARES; CASTRO; CUNHA, 2008; MOREIRA, WEISS, KRÜGER, 2000).

As células de traquéia de feto bovino se caracterizam pelo crescimento em uma única camada de células, não formando estratos, e se aderem às paredes do poço de

cultivo; apresentam ainda formato ligeiramente alongado, com núcleo mais ou menos central. Elas foram escolhidas para este estudo por serem de fácil cultivo e por apresentarem resposta clara a estímulos exógenos rapidamente (COLES, 1984; KRÜGER et al, 1998; MARCONDES; GONÇALVES, 2008). É importante lembrar que os extratos de *Synadenium carinatum* usados pela população são bastante diluídos. Isso diminui a concentração dos compostos e, conseqüentemente, pode reduzir a sua citotoxicidade, conforme já descrito por outros autores (MÖCKEL et AL, 1997)

Pelo fato de haverem poucos estudos do tipo *screening* com o gênero e das crescentes evidências de sua bioatividade (VALADARES; CASTRO; CUNHA, 2008; JÄGER; HUTCHINGS; VAN STADEN, 1996; AFONSO-CARDOSO et al, 2007), bem como pela carência de estudos de toxicidade com o produto utilizado pela população, este trabalho foi realizado tendo como objetivos: caracterizar quimicamente a planta *Synadenium carinatum*; avaliar o potencial tóxico de seu látex em culturas de células de traquéia de feto bovino; contribuir com o conhecimento popular sobre o vegetal em estudo; contribuir com o conhecimento acadêmico em relação à espécie.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material botânico

Amostras coletadas para este estudo de um exemplar de cultivo domiciliar de propriedade de um dos autores do trabalho, na cidade de Bauru, no Estado de São Paulo. Foram utilizadas folhas frescas para o estudo fitoquímico e látex para realização do estudo de toxicidade *in vitro*.

Obtenção dos extratos e frações

Obtenção do extrato bruto hidroalcoólico

O extrato hidroalcoólico foi preparado segundo a metodologia de Moreira (1979) modificada por Nakashima (1993). O extrato bruto foi obtido por maceração a frio. Folhas do vegetal foram fragmentadas com o auxílio de uma tesoura e deixadas imersas no líquido extrator em diferentes concentrações em frasco âmbar devidamente fechado, durante um período de aproximadamente 10 dias para cada concentração do líquido extrator. O líquido extrator usado foi o etanol (EtOH) em diferentes concentrações, sendo elas 50%, 70% e P.A. Após o período de maceração, o extrato bruto foi filtrado em funil de vidro com papel de filtro e então levado a um balão apropriado para ser concentrado em rotavapor até que seu volume fosse reduzido a aproximadamente um terço do original. Esse processo visa à retirada do excesso do solvente para assim diminuir a interferência deste no processo posterior de fracionamento.

Obtenção das frações

As frações foram obtidas pela adição de solventes orgânicos de polaridades crescentes: n-hexano, clorofórmio e acetato de etila, nessa ordem. O processo de fracionamento foi realizado em funil de separação, onde o extrato bruto foi levado após ser concentrado no rotavapor e resfriado à temperatura ambiente. Cada solvente foi adicionado em volumes pequenos ao extrato bruto, na proporção de 1:1, sendo agitado e recuperado em seguida em frasco à parte, correspondendo assim à fração obtida. Tal fração foi completada com o solvente utilizado de forma a completar 200 mL. Após a adição de cada diferente solvente o extrato bruto foi levado à evaporação em banho-maria para retirada do excesso do produto.

Após o fracionamento com cada um dos três solventes, obteve-se a fração hidroalcoólica, que corresponde ao líquido final do extrato bruto após cada partição com os solventes orgânicos.

Todas as frações estiveram acondicionadas em frascos rotulados e devidamente fechados em geladeira até o momento do seu uso, e foram denominadas F1 (fração n-hexânica), F2 (fração clorofórmica), F3 (fração acetato de etila) e HA (fração hidroalcoólica).

Obtenção do extrato aquoso

O extrato aquoso 20% foi preparado segundo a metodologia de Moreira (1979) modificada por Nakashima (1993). Uma quantidade de 800ml de água foi adicionada de 200g de folhas frescas fracionadas de *Synadenium carinatum*. Essa solução foi

levada ao banho-maria a aproximadamente 60°C, por um período de 6 horas. Após esse procedimento, o líquido foi filtrado em papel de filtro e algodão. O extrato aquoso 20% não foi fracionado, de modo que as reações foram realizadas com o mesmo sem qualquer preparo anterior, a não ser os indicados nas metodologias que seguem.

Ensaio fitoquímico

Preparar tubos de ensaio com 200 mg de limalha de magnésio e adicionar 5 mL de cada uma das frações nos tubos. Colocar os tubos em béquer com gelo, levar a capela e adicionar lentamente HCl fumegante.

A confirmação da presença de heterosídeos flavônicos ocorre quando há a mudança de coloração da fração: amarelo a vermelho, para flavonas; vermelho a vermelho-sangue para flavonol e diidroflavonol; vermelho a violeta para flavononas; vermelho rosado, para derivados antocianoínicos.

Reação de Taubock ou oxalo-bórica

Levar a secura em banho-maria 10 mL de cada uma das frações. Ao resíduo seco, adicionar 5 gotas de acetona e 30 mg de uma mistura de ácido bórico e ácido oxálico, na proporção de 1:1. Agitar bem e levar à secura. Ao resíduo, adicionar 5 mL de éter etílico, transferindo então para tubos de ensaio. Observar sob ultravioleta (UV).

Considera-se a reação com resultado positivo quando observada fluorescência amarelo-esverdeada, indicando a presença de flavonóides do tipo flavonóis.

Reação de Pacheco

Em cápsulas de porcelana, levar 10 mL de cada fração à secura em banho-maria. Adicionar ao resíduo seco alguns cristais de acetato de sódio (AcONa) e 0,1 mL de anidrido acético e aquecer em fogareiro. Em seguida, adicionar 0,1 mL de HCl concentrado.

A presença de diidroflavonóis nesta reação é indicada pela formação de coloração roxa.

4.5.1.2.4 Reação de zinco (Zn) em HCl

Preparar um tubo de ensaio para cada fração com uma pastilha de zinco (Zn). Colocar 10 mL das frações F1, F2 e F3 em cápsulas de porcelana e levar à secura em banho-maria. Não há necessidade de concentrar a fração hidroalcoólica. Ao resíduo seco das frações levadas ao banho-maria, adicionar 10 mL de EtOH.

Levar 5 mL de cada fração aos tubos de ensaio previamente preparados e colocá-los em béquer com gelo. Na capela, adicionar lentamente algumas gotas de HCl fumegante.

A mudança da coloração da fração para roxo confirma a presença de diidroflavonóis.

Pesquisa de cumarinas

Reação 1

Em cápsulas de porcelana, concentrar 30 mL das frações F1, F2 e F3 em banho-maria, até que seu volume se reduza a 5 mL.

O mesmo volume da fração HA (30 mL) deve ter seu pH reduzido para 1 com a adição de HCl 2N. Após esse procedimento, deve ser levada ao banho-maria ou à chapa para que seja concentrada também, atingindo o volume de 5 mL. Deixar esfriar e levar a fração concentrada para um funil de separação, adicionando 20 mL de éter etílico (em 2 vezes de 10 mL) para extração de uma fração etérea. Essa fração etérea obtida da fração hidroalcoólica deve ser levada para concentrar em banho-maria até que seu volume também seja reduzido para 5 mL.

Cada uma das frações concentradas (F1, F2, F3 e etérea) deve ter 3 mL

transferidos para tubos de ensaio. Adicionar 2 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 1N recém-preparado e levar os tubos para uma câmara de luz ultravioleta (UV) em 366 nm, por um período de 15 minutos.

Observa-se a confirmação da presença de cumarinas se houver fluorescência azul ou verde-amarelada.

Reação 2

Os 2 mL restantes das frações preparadas para a reação anterior devem ser depositados em tiras de papel de filtro previamente preparadas e identificadas, formando três pontos de aproximadamente 1cm cada. Sobre duas das manchas, aplicar uma gota da solução de NaOH 1N recém-preparada (manchas 1 e 2). Cobrir a mancha 1 com uma moeda ou papel-alumínio e expor ao UV a 366 nm por 15 minutos.

A presença de cumarinas pode ser confirmada se for observada fluorescência azul ou verde-amarelada na mancha 2.

Pesquisa de heterosídeo antraquinônico

Reação de Bomtrager

Transferir 30 mL de cada uma das frações para balões de fundo redondo, com capacidade para 100 mL ou 250 mL. Adicionar 5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 10%. Acoplar ao condensador e levar para refluxo por 30 minutos, filtrando em seguida, ainda quente, com papel de filtro.

As frações hexânica, clorofórmica e acetato devem ser levadas para funis de separação e adicionadas de 30 mL de água destilada, formando então uma fração orgânica de cada fração original.

A fração hidroalcoólica deve ser extraída com 20 mL de éter etílico, também em funil de separação, formando assim a fração etérea da fração original.

Concentrar cada uma dessas frações – as três orgânicas e a etérea obtidas – em banho-maria até que se atinja um volume de aproximadamente 5 mL. Transferir para tubos de ensaio as frações concentradas e adicionar 5 mL da solução de hidróxido de amônia (NH₄OH), agitando lentamente.

A mudança da coloração da fração para vermelho indica presença de naftoquinonas e/ou antraquinonas.

Pesquisa de esteróides/triterpenos

Reação de Libermann Bouchard

Em cápsulas de porcelana, evaporar 30 mL de cada uma das frações em banho-maria até a secura. Dissolver os resíduos em 5 mL de clorofórmio e filtrar.

Com o auxílio de uma pipeta, levar, de cada uma das frações, as seguintes quantidades a três tubos de ensaio diferentes: 0,1 mL; 0,5 mL; 1,0 mL. Em seguida, completar os volumes com clorofórmio até 2 mL.

Em capela, adicionar 1 mL de anidrido acético e 2 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado.

A mudança da coloração do extrato para rósea ou azul indica a presença de esteróides ou triterpenos com função carbonila (C=O) no carbono 3 e dupla ligação entre os carbonos 5 e 6 da estrutura.

Se ocorrer coloração verde, indica função hidroxila (OH) no carbono 3 e dupla ligação entre os carbonos 5 e 6.

Coloração amarela indica possível metilação (CH₃) no carbono 14.

Reação de Keller Kelliani

Preparar 4 tubos de ensaio, adicionando 2 mL de H₂SO₄.

Levar à secura 2 mL de cada uma das frações no banho-maria, em cápsulas de porcelana. Dissolver os resíduos com 2 mL de ácido acético glacial e 0,2 mL de solução aquosa de cloreto férrico 1%. Transferir cautelosamente as misturas para os tubos de ensaio previamente preparados.

O desenvolvimento de coloração azul na zona de contato entre os dois líquidos ou na fase acética indica presença de desoxi-açúcares do tipo esteróides.

Desenvolvimento de coloração verde na zona de contato ou na fase acética pode indicar a presença de desoxi-açúcares do tipo triterpenóides.

Reação de Baljet

Preparo prévio de duas soluções:

- a) Solução A: ácido pícrico em etanol, a 5%;
- b) Solução B: hidróxido de sódio 10%.

Colocar 2 mL de cada uma das frações em tubos de ensaio e adicionar, em cada tubo, 1 mL de cada uma das soluções A e B.

Reação positiva: coloração laranja, indicando a presença de geninas com anel lactônico pentagonal insaturado.

Reação de Tollens

Levar à secura, em cápsulas de porcelana, 2 mL de cada uma das frações em banho-maria. Ao resíduo, adicionar 1 mL de piridina, 0,5 mL de solução aquosa de nitrato 10%, 0,5 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio 5% e adicionar hidróxido de amônia

até a completa dissolução do precipitado. Levar a solução a uma chama até atingir fervura.

Reação positiva: formação de espelho de prata, o que indica insaturação no anel A ou B.

Reação de Kedde

Preparar previamente os seguintes reativos:

- a) reativo A: ácido 3,5-dinitrobenzóico a 2%, em EtOH;
- b) reativo B: hidróxido de potássio a 6%, em água destilada.

Levar cada uma das frações à secura em cápsulas de porcelana, no banho-maria. Dissolver o resíduo em metanol e transferir para tubos de ensaio. Adicionar 0,5 mL do reativo A e 0,5 mL do reativo B.

Reação positiva: coloração violeta ou azul, que indica a presença de heterosídeos ou geninas com anel lactônico insaturado.

Reação de Legal

Levar a secura 2 mL de cada uma das frações, em cápsulas de porcelana, no banho-maria. Dissolver os resíduos em peridina.

Transferir para tubos de ensaio. Nos tubos, adicionar duas gotas do reativo nitroprusiato de sódio e uma pastilha de NaOH.

Reação positiva: desenvolvimento de coloração rosa, indicando a presença de lactonas sesquiterpênicas, com anel γ -lactona α,β insaturado. Teste também sensível a metilcetonas.

Ensaio com extrato aquoso

Pesquisa de heterosídeos antociânicos

Em três tubos de ensaio, devidamente numerados de 1 a 3, colocar 5 mL do extrato aquoso. Acidificar o tubo número 1 (pH 4); alcalinizar o tubo número 2 (pH 10); neutralizar o tubo número 3 (pH 7).

A reação é considerada positiva se houver as seguintes mudanças de coloração:

- a) meio ácido (tubo 1): tons avermelhados;
- b) meio básico (tubo 2): tons azulados;
- c) meio neutro (tubo 3): tons violáceos.

Aparecimento da coloração verde em qualquer dos meios indica a presença de heterosídeos flavônicos.

Pesquisa de heterosídeos saponínicos

Ensaio da espuma: depositar em três tubos de ensaio 2 mL do extrato aquoso. Agitar cada um deles energicamente, durante 5 minutos. Medir a altura do anel de espuma formado logo após a agitação.

A persistência de anel de espuma de tamanho igual ou maior que 1 cm após o repouso indica a presença de heterosídeos saponínicos.

Pesquisa de heterosídeos cianogênicos

Reação do isopurpurato de sódio

Transferir para um tubo de ensaio ou tubo de Roux, 5 mL do extrato aquoso de modo a não umedecer as paredes do tubo. Adicionar ao extrato 1 mL de H₂SO₄ 1N. Suspender dentro do tubo uma tira de papel picro sódico como auxílio de uma rolha de cortiça, de modo que o papel não toque no líquido. Levar o tubo ao banho-maria a 60°C, por 30 minutos.

O papel picro sódico adquire uma coloração avermelhada na presença de heterosídeos cianogênicos.

Reação de Schoembein

Em cápsula de porcelana, depositar 5 mL do extrato aquoso. Adicionar 4 gotas de solução de NaOH 10% ou KOH (hidróxido de potássio) 10%, 3 cristais de sulfato ferroso e uma gota de cloreto de ferro III (FeCl₃) 1%. Aquecer a mistura até a ebulição e adicionar 1 gota de HCl concentrado.

O desenvolvimento de coloração azul característica – azul da Prússia – indica presença de heterosídeos cianogênicos.

Pesquisa de taninos

Reação com cloreto férrico

Adicionar 3 a 5 gotas de solução aquosa de cloreto férrico 1% em 1 mL do extrato aquoso.

Desenvolvimento de coloração azul ocorre na presença de taninos; coloração verde, na presença de flavonóides; e coloração marrom na presença de poli fenóis.

Reação da solução de gelatina

Em três tubos de ensaio, identificados de 1 a 3, adicionar 0,5 mL; 1,0 mL; 2,0 mL do extrato aquoso em cada tubo, respectivamente. Adicionar em cada tubo 2,0 mL de solução de gelatina 2,5%.

A formação de precipitado indica a presença positiva de taninos.

Reação de sulfato de ferro amoniacal

Adicionar 2 gotas de sulfato de ferro amoniacal a 5 mL do extrato aquoso, em tubo de ensaio.

A ocorrência de coloração azul indica a presença de taninos; coloração verde

indica flavonóides; e coloração marrom indica polifenóis.

Reação de cloridrato de emetina

Em tubo de ensaio, depositar 1 mL do extrato aquoso. Adicionar 4 mL de água destilada e 2 gotas de solução aquosa de cloridrato de emetina 1%.

O desenvolvimento de precipitado indica a presença de taninos.

Reação de cianeto de potássio

Preparar previamente uma solução de ácido acético diluído em 1 mL de solução aquosa de cianeto de potássio 10%. Adicionar uma gota desta solução a 5 mL do extrato, em tubo de ensaio.

Desenvolvimento de coloração rosada indica a presença de taninos contendo ácido gálico.

Reação de ácido nitroso

Transferir para uma cápsula de porcelana 5 mL do extrato aquoso. Adicionar alguns cristais de nitrito de potássio e 5 gotas de ácido sulfúrico 0,5%.

Se houver aparecimento de coloração rosada, que passa ao púrpura e ao índigo, consideramos a presença de taninos associados a ácido elágico.

Reação do dicromato de potássio

Em tubo de ensaio, depositar 5 mL do extrato aquoso e adicionar 3 gotas de dicromato de potássio 1%.

Desenvolvimento de precipitado ao término da reação indica a presença de taninos.

Ensaio de Staniasy

Transferir para um balão de junta 24/40 de 250 mL de capacidade 30 mL do extrato aquoso, 6 mL de formaldeído 40% e

4 mL de HCl 37%. Acoplar a um condensador de bolas e levar ao refluxo durante uma hora. Deixar esfriar e filtrar com papel de filtro. Serão utilizados o filtrado e os resíduos do papel de filtro.

Reação com os resíduos: lavar o papel de filtro com etanol 50% e gotejar sobre o resíduo lavado algumas gotas de solução aquosa de KOH 5%.

Coloração verde ao término da reação indica a presença de taninos condensados.

Reação com o filtrado: sem agitar, adicionar acetato de sódio e algumas gotas de solução aquosa de cloreto férrico 1%.

Coloração azulada ao término da reação indica a presença de taninos hidrolisáveis.

Pesquisa de aminogrupos

Reação com ninhidrina: em cápsula de porcelana, depositar 10 mL do extrato aquoso e levar para concentrar em banho-maria, a uma temperatura aproximada de 60°C, até atingir 5 mL.

Em papel de filtro ou em placa cromatográfica (CCD), depositar 5 gotas do extrato concentrado, formando uma mancha. Deixar secar e nebulizar ou gotejar com ninhidrina sobre a mancha. Levar a estufa para aquecimento, durante aproximadamente 15 minutos.

A reação é considerada positiva se houver aparecimento de coloração azul ou violeta, indicando a presença de aminogrupos.

Pesquisa de ácidos fixos

Transferir para um balão, de 100 mL, 20 mL do extrato aquoso e 2 mL de NaOH 1N. Acoplar a um condensador de bolas e levar ao refluxo por 30 minutos. Deixar esfriar e acidificar a solução com H₂SO₄ e extrair com éter etílico, adicionando-o em três vezes, de 10 mL cada.

Adicionar à fração éterea carvão ativado, filtrar e levar a secar em banho-maria a 50°C. Aquecer o resíduo durante 10 minutos, em estufa, a temperatura de 100°C. Esfriar e adicionar 5 mL de solução aquosa de hidróxido de amônia 1N. Filtrar e depositar 3 gotas deste extrato em um papel, formando uma mancha de aproximadamente 1cm. Gotejar sobre a mancha o reativo de Nessler.

O desenvolvimento de coloração indica a presença de ácidos fixos.

Pesquisa de ácidos voláteis

Em um tubo de ensaio, depositar 5 mL do extrato aquoso sem umedecer as paredes. Suspender uma tira de papel de tornassol ou de pH (0-14) com auxílio de uma rolha de cortiça, de modo que o papel não toque o líquido. Levar o tubo ao banho-maria, a uma temperatura de 60°C por 30 minutos.

Caso haja a presença de ácidos voláteis, o papel irá adquirir coloração avermelhada.

Produto testado

WEISS; KRÜGER, 2000). As culturas de células foram feitas e mantidas em placas de cultivo com 96 poços (NAPCO, modelo

Em frasco de Eppendorff de 10ml, o látex de *Synadenium carinatum* foi diluído em água numa proporção similar a concentração em que a população o utiliza: 900µL para 1100µL de água, dando assim origem à diluição 1. Foram realizadas outras 7 diluições, de base 10, coletando-se 100µL da diluição anterior e diluindo-a em 900µL de água, originando assim 8 diferentes diluições. Cada uma dessas diluições foi então numerada, de 1 (10⁻¹) a 8 (10⁻⁸), conforme seu grau de diluição. Foi testado o látex, inicialmente, por ser esse o produto utilizado pela população no suposto combate às enfermidades. As frações não foram testadas porque alguns dos solventes utilizados em sua preparação são conhecidos como tóxicos, o que poderia falsear os resultados dos testes. Além disso, como não foi feito o isolamento de nenhum grupo ou composto químico específico nas frações, os resultados não teriam relevância para estudos futuros.

Ensaio de citotoxicidade

As culturas de células de traquéia de feto bovino utilizadas neste estudo foram previamente estabilizadas por 48 horas após a semeadura, em meio de cultura constituído de um meio básico F10-199 Invitrogen (EDDINGTON; BRIDGES, 1985), adicionado de 10% de FBS (soro bovino fetal), penicilina (100UI/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e anfotericina B (2,5 µg/mL) (MOREIRA; 6100), conforme mostra a FIGURA 1, e em incubadora de CO₂ para cultivo de células

(TRP) a 28°C e a uma saturação máxima de 5% de CO₂.

Foram utilizadas 3 placas de cultivo, sendo que as placas 1 e 2 receberam o produto testado, e a placa denominada 3 foi a placa-controle; as placas testadas 1 e 2 tiveram respectivamente, 10µL e 20µL de meio de cultura retirado e substituído pela mesma quantidade de uma das oito diferentes concentrações de látex diluído em água (diluições 1 a 8 previamente preparadas). Foram feitas 8 repetições para cada diferente diluição em cada uma das placas testadas, de modo a garantir a confiabilidade dos resultados. Assim, nas placas 1 e 2, ao final da aplicação do produto testado, cada poço de cultivo continha as células em seu meio de cultura adicionado de determinada quantidade do látex diluído, de modo que ao final, as placas testadas e a

placa controle tinham a mesma quantidade de meio de cultura ou, no caso das placas-teste, meio de cultura adicionado do produto em teste. Na placa-controle, os poços de cultivo continham apenas as células e o meio de cultura, objetivando observar o desenvolvimento das células em um ambiente comum, sem alterações.

O acompanhamento do crescimento das culturas foi feito a cada intervalo de 24 horas, utilizando-se microscópio invertido. No quarto dia, as placas foram lavadas e coradas com o corante Azul de Tripiano para análise da viabilidade das culturas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As tabelas 1 e 2 mostram os resultados obtidos para a análise fitoquímica preliminar realizada com os extratos de *Synadenium carinatum*:

Fração				
Metabólito	F1	F2	F3	HÁ
Alcalóides	-	++	-	-
Heterosídeos				
Flavônicos	-	+	+++	-
Cumarinas	-	+	++	-
Heterosídeos				
Antraquinônicos	-	-	-	+
Esteróides e/ou				
Triterpenos	+++	+++	-	-

Quadro 1. Resultados dos testes fitoquímicos para as frações F1, F2, F3 e hidroalcoólica (HA) do extrato bruto hidroalcoólico de *Synadenium carinatum*.

Grupos de Compostos	Resultado
Heterosídeos Antociânicos	+++
Heterosídeos Saponínicos	---
Heterosídeos Cianogênicos	---
Taninos Hidrolisáveis	+++
Taninos Não-hidrolisáveis	+++
Aminogrupos	+++
Ácidos Fixos	+++
Ácidos Voláteis	---

Legenda: Presença da classe de metabólitos secundários indicada por:

+: reação fracamente positiva

++: reação positiva

+++ : reação fortemente positiva

Ausência indicada por:

-: ausente

Quadro 2. Resultados dos testes fitoquímicos para extrato aquoso de *Synadenium carinatum*.

Esses resultados corroboram com outros estudos realizados com o gênero as espécies do gênero no sentido de realizar um levantamento genérico da composição química, e não havendo outros estudos similares realizados com a mesma espécie, o presente se revela sobremaneira interessante e, ao mesmo tempo, carecendo de outras informações que possam confirmar os resultados obtidos.

O conteúdo de flavonóides, evidenciado através de reações com fortes positivos, é de especial interesse, pois este grupo de metabólitos secundários é responsável por inúmeras funções relevantes no metabolismo humano e animal, destacando-se entre elas as capacidades imunomoduladora e também a antioxidante (HAVSTEEN, 2002; SIMONI et al, 2002).

(GRUPO 1998; BITTNER et al, 2001; MENON, 2002). Sendo poucos os estudos envolvendo

Para o grupo de esteróides/triterpenos também foram obtidas reações fortemente positivas em certas frações do extrato hidroalcoólico (F1 e F2), de forma que este deve ser um grupo avaliado mais cuidadosamente em estudos futuros.

Os ensaios de citotoxicidade revelaram que o produto em teste pode ser bastante tóxico em concentrações altas quando aplicado no cultivo de células de traquéia de feto bovino. As concentrações mais altas foram extremamente tóxicas às células tanto na quantidade de 10µL como de 20µL – diluições 1 e 2, e diluições 1, 2 e 3, respectivamente. Nos ensaios com a diluição 1, em ambas as placas (1, 10µL e 2, 20µL), foi observada grande quantidade de células

em processo de morte celular, com reações características – núcleo aumentado e granuloso, intensa vacuolização, rompimento de membrana, danos à forma e ao tecido e outros (figuras 1 e 2); após a lavagem, houve total desprendimento da camada de células (figura 3). Também foram observados grandes danos à morfologia

celular e/ou histológica na diluição 2, na placa 1 e nas diluições 2 e 3 da placa 2. Conforme a diluição do produto, os efeitos danosos foram gradativamente menores, estando também relacionados com a quantidade em que foram aplicados nos cultivos celulares (Figura 4).

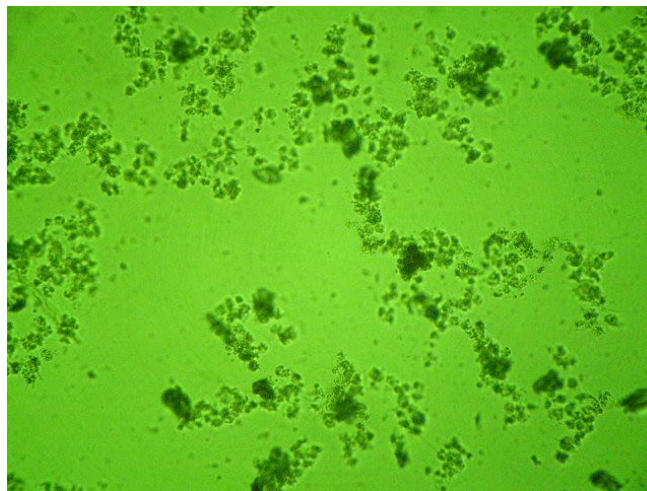


Figura 1. Placa 1 observada no 3º dia do experimento, poço de cultivo contendo a maior concentração – diluição 1; a notar as características de células mortas/em processo de morte, alta desorganização do tecido, deformação acentuada das células e alta granulação citoplasmática (aumento de 400X).

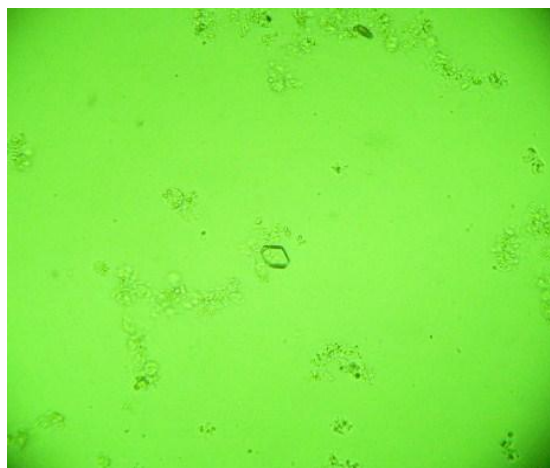


Figura 2. Placa 2 observada no 3º dia do experimento, um dos poços de cultivo contendo a maior concentração – diluição 1; como na

placa I, pode-se notar a alta desorganização do tecido e deformação acentuada das células, possivelmente caracterizando também células mortas/em processo de morte. Digno de nota ressaltar que, nesta observação, já se nota uma quantidade de células menor que na placa 1 (acima), o que pode estar demonstrando que o produto inibiu a proliferação e adesão celular, levando-as a morte (aumento de 400X).

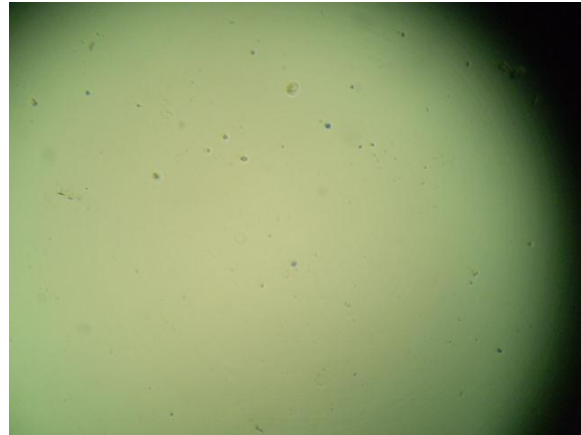
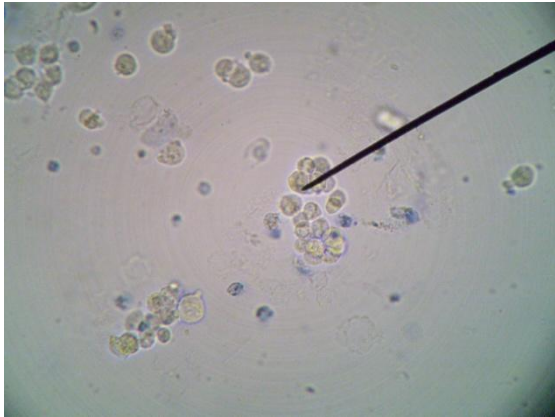


Figura 3. À esquerda, placa controle ao final do experimento, após a lavagem e aplicação do corante; à direita, placa 1, onde se pode observar o completo desprendimento da camada aderente de células, caracterizando aquilo que os autores denominam de "efeito severo" (aumento de 400X).

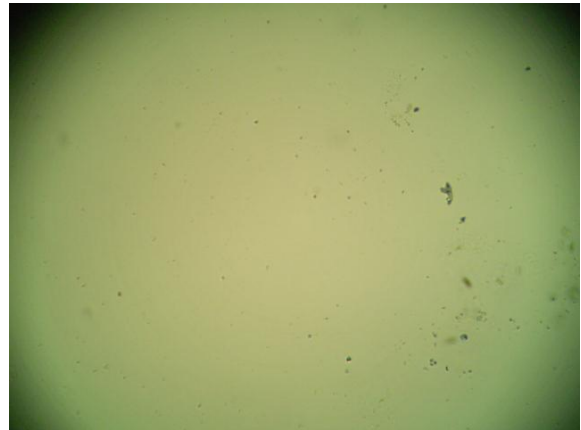
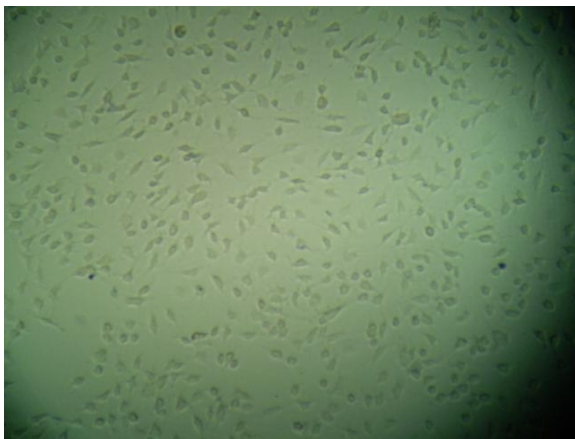


Figura 4. Imagens dos efeitos do látex, na diluição 3, aplicado nas placas 1 (à esquerda) e 2 (à direita). Observa-se claramente a diferença entre os efeitos, sendo possível relacioná-los com a quantidade aplicada em cada placa (aumento de 400X).

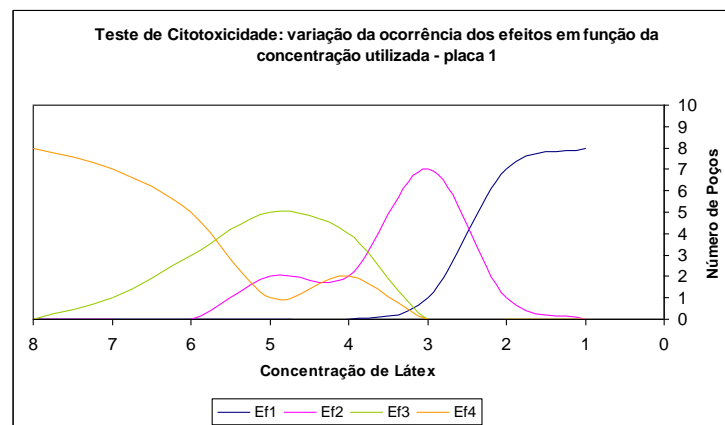
As figuras A e B mostram a variação dos efeitos ocorridos nos cultivos celulares

segundo a concentração de látex aplicado, sendo a figura A referente aos efeitos

ocorridos na Placa I e a figura B referente aos efeitos ocorridos na Placa II. A classificação desses efeitos foi desenvolvida pelos autores, dadas as condições específicas do estudo.

Os efeitos tóxicos causados pelo látex foram classificados em quatro grupos: 1, que caracteriza o desprendimento total do tecido e morte celular intensa; 2, baixo índice de

sobrevivência, não-formação de tecido uniforme, com células agrupadas em grumos e apresentando características relacionadas com o processo de morte celular (alta granulação citoplasmática e vacuolização); 3, discreta organização tecidual; 4, formação normal da camada aderente de células, não apresentando danos visíveis.



LEGENDA:

Ef 1: desprendimento total da camada aderente de células: nenhuma célula viva ou morta pôde ser vista após a lavagem e coração da placa de cultivo.

Ef 2: alta incidência de morte celular, não-formação da característica monocamada aderente de células - ausência de tecido organizado; células deformadas agrupadas pontualmente - "grumos".

Ef 3: presença de leve organização de tecido - formação ainda desorganizada de uma monocamada aderente de células; incidência de morte celular razoável.

Ef 4: formação de monocamada aderente de células; baixa incidência de morte celular (comparável ao controle).

Figura A. As curvas representadas no gráfico mostram a variação dos efeitos tóxicos exibidos pelo látex de *Synadenium carinatum* segundo o número de poços afetados e a concentração de látex utilizada na Placa 1, onde foram utilizados 10µL de cada diluição. O eixo X representa a concentração de látex do produto testado (diluições de 1 a 8, sendo 1 a mais concentrada e 8 a mais diluída) e o eixo Y o número de poços em que foi observado o efeito descrito (efeitos 1 a 4 – Ef1 a Ef4).

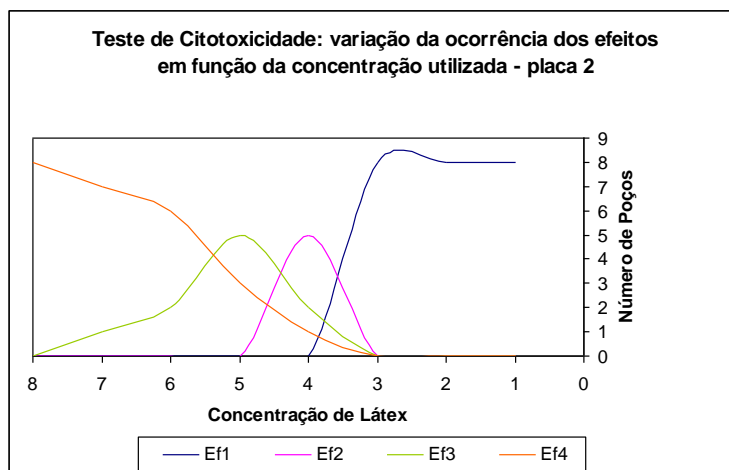


Figura B. As curvas representadas no gráfico mostram a variação dos efeitos tóxicos exibidos pelo látex de *Synadenium carinatum* segundo o número de poços afetados e a concentração de látex utilizada na Placa 2, onde foram utilizados 20µL de cada diluição. O eixo X representa a concentração de látex do produto testado (diluições de 1 a 8, sendo 1 a mais concentrada e 8 a mais diluída) e o eixo Y o número de poços em que foi observado o efeito descrito (efeitos 1 a 4 – Ef1 a Ef4).

As figuras C e D mostram a ocorrência dos danos mais severos causados à estrutura celular/histológica observados no estudo, sendo os gráficos referentes às Placas I e II,

respectivamente. Foram considerados como “efeitos severos” os efeitos 1 e 2, descritos anteriormente.

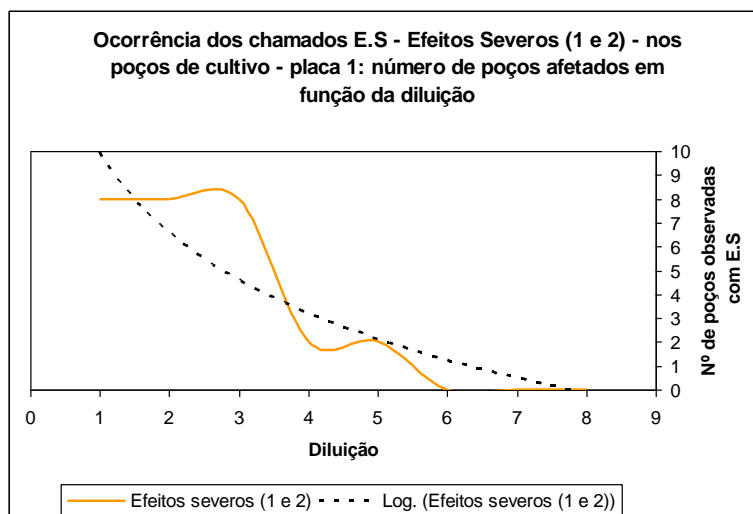


Figura C. Variação da ocorrência dos “efeitos severos” (1, desprendimento total da camada aderente de células e 2, alta incidência de morte celular) causados pelo látex na Placa 1, em função da diluição aplicada. Uma curva logarítmica foi construída com base nos valores aplicados no gráfico, a fim de melhor visualizar a variância dos dados.

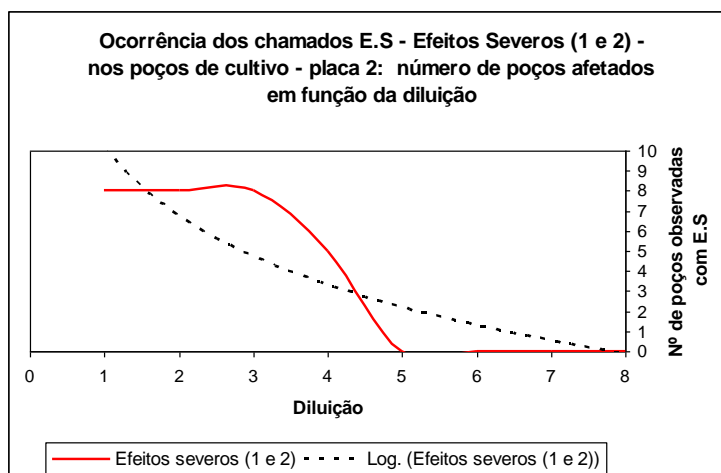


Figura D. Variação da ocorrência dos “efeitos severos” (1, desprendimento total da camada aderente de células e 2, alta incidência de morte celular) causados pelo látex na Placa 1, em função da diluição aplicada. Uma curva logarítmica foi construída com base nos valores aplicados no gráfico, a fim de melhor visualizar a variância dos dados.

Baseados nos dados obtidos, os autores puderam estabelecer a DTCC₅₀ (dose tóxica em cultivo celular letal para 50% das culturas) para o produto em teste, utilizando

o método de Reed-Munch (REED; MUNCH, 1938; YAMAMOTO et al, 1998). Segundo esse método, a DTCC₅₀ para a maior concentração - 10µL - é de 10^{-2,5} e para a

maior concentração testada - 20µL - é de 10^{3,5}, o que significa que doses menores do que

estas são as indicadas para uma possível aplicação terapêutica.

CONCLUSÃO

Synadenium carinatum mostra-se com um grande potencial farmacológico, do ponto de vista de seu conteúdo de metabólitos secundários, carecendo de maiores investigações para isolamento e identificação dos compostos de interesse.

Os ensaios de citotoxicidade revelaram que o látex do vegetal é potencialmente tóxico em concentrações altas, causando, por outro lado, danos celulares menos severos ou imperceptíveis, no intervalo

observado, em contrações medianas e baixas, nas duas quantidades utilizadas.

Os resultados apontam ainda para a necessidade do prosseguimento dos estudos com o vegetal, de maneira a contribuir com o conhecimento acadêmico e popular sobre sua ação terapêutica.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório Marcos Enrietti, Curitiba, PR.

REFERÊNCIAS

AFONSO-CARDOSO, S. R. et al. Protective effect of lectin from *Synadenium carinatum* on *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. Korean Journal of Parasitology, Seul, v.45, n.4, p.255-266, Dezembro 2007

AMOROZO, M. C. M. A. A abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais. In: DI STASI, L. C. Plantas medicinais: arte e ciência. São Paulo: UNESP, 1996, p.57-63.

BITTNER, M. et al. Estudio químico de especies de la familia Euphorbiaceae em Chile. Bol. Soc. Chil. Quim., Concepción, v.46, n.4, p.1-15, Dec 2001.

CARVALHO, J. E. M. et al. Study of bronchoalveolar lavage in leptospirosis patients with pulmonary involvement. J. Bras. Pneumol., São Paulo, v.30, n.2, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132004000200010&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 23 de julho de 2007.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para a otimização da atividade. Quím. Nova, São Paulo, v.21, n.1, p.99-105, jan./fev. 1998.

Machado, A. A., Nakashima T., Silva W. A., Krüger E. R. / Revista Eletrônica de Farmácia Vol VIII (2), 1 – 24, 2011

COLES E. H. Patologia clínica veterinária. 3ª ed. Manole: São Paulo, 1984. p.390-426.

DAVID, J. P. et al . Lignanas e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blanchetii*. Quím. Nova, São Paulo, v.24, n.6, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422001000600004&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em 23 de julho de 2007.

DE LA CRUZ, M. G. (org.) O acesso aos fitoterápicos e plantas medicinais e a inclusão social – diagnóstico situacional da cadeia produtiva farmacêutica no Estado do Mato Grosso. Fitoplama, Secretaria de Estado da Saúde, Governo do Mato Grosso, Brasil, 2005.

EDDINGTON, N.; BRIDGES, C. G. Experimental reactivation of equid herpesvirus 1 (EHV-1) following the administration of corticosteroids. Equine Veterinary Journal, v.17, p.369-371, 1985.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia. Cienc. Cult., Campinas, v.55, n.3, p.35-36, jul./set. 2003.

FONTE, N. N. A complexidade das plantas medicinais: algumas questões de sua produção e comercialização. Curitiba, 2004. 183 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

FRANCISCO, I. A.; PINOTTI, M. H. P. Cyanogenic glycosides in plants. Braz. Arch. Biol. Technol., Curitiba, v.43, n.5, p.24-27, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132000000500007&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 23 de julho de 2007.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacology & Therapeutics, Oxford, v.26, p.67-202, 2002.

GRUPO, L. R. P. Contribuição ao estudo Anatômico, Fitoquímico e Farmacológico de *Synadenium carinatum* Hook f. (Euphorbiaceae). Curitiba, 1998. 78 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Programa de Pós-Graduação em Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

INTERNATIONAL STANDARD. Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for Cytotoxicity: *in vitro* methods. ISO 10993, 1992.

Machado, A. A., Nakashima T., Silva W. A., Krüger E. R. / Revista Eletrônica de Farmácia Vol VIII (2), 1 – 24, 2011

JÄGER, A.; HUTCHINGS, A.; VAN STADEN, J. Screening of Zulu medicinal plants for prostaglandin-synthesis inhibitors. *Journal of Ethnopharmacology*, v.52, p.95-100, 1996.

KRÜEGER, E. R. et al. Protocolo para cultivo *in vitro* de células de traquéia de feto bovino. *Arch. Vet. Scienc.*, v.3(1), p.25-30, 1998

MACHADO, A.A. ; NAKASHIMA, T. Review about *Synadenium Boiss* genus (EUPHORBIACEAE). Congresso Internacional de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – CIFARP, Ribeirão Preto, SP, 2007. Painel.

MARCONDES, J. S. ; GONÇALVES, R. C. Metodologia de colheita de células do trato respiratório em ovinos sadios através de técnica de lavagem traqueobrônquica por via nasotraqueal. *Ciência Animal Brasileira*, v.9, n.2, p.418-426, abr./jun. 2008.

MENON, M. et al. Isolation and characterization of proteolytic enzymes from the latex of *Synadenium grantii* Hook, 'f'. *Plant Science*, San Francisco, v.163, n.1, p.131-139(9), 2002.

MÖCKEL, B. et al. Effects of mistletoe lectin I on human blood cell lines and peripheral blood cells: cytotoxicity, apoptosis and induction of cytokines. *Drug Res.*, n.47, 1145-1151, 1997.

MOREIRA, N.; WEISS, R. R.; KRÜGER, E. R. Freqüência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus equino tipo 1. *Scientia Agraria*, Curitiba, v.1, n.1-2, p.9-14, 2000.

OLIVEIRA, R. B. et al. Toxicidade aguda de látex e extrato etanólico de folhas de *Synadenium umbellatum* em camundongos. *Revista Eletrônica de Farmácia*, Goiânia, v.2, n.2, suplemento, 2005. Disponível em: <http://www.farmacia.ufg.br/revista/_pdf/vol2_2_supl/resumos/ref_v2_2_supl-2005_p137-139%20Oliveira2.pdf>. Acesso em 12 de maio de 2005.

OLIVEIRA, R. B. et al. Avaliação dos efeitos depressores centrais do extrato etanólico das folhas de *Synadenium umbellatum* Pax. e de suas frações em camundongos albinos. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, São Paulo, v.44, n.3, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322008000300019&lng=&nrm=iso>. Acesso em: 5 de maio de 2008. doi: 10.1590/S1516-93322008000300019

Machado, A. A., Nakashima T., Silva W. A., Krüger E. R. / Revista Eletrônica de Farmácia Vol VIII (2), 1 – 24, 2011

PREMARATNA, A. et al. Isolation, purification and properties of a lectin from the latex of *Synadenium grantii* Hook f. Indian Journal of Biochemistry & Biophysics, New Delhi, v.18, n.2, p.32-35, 1981.

REED, L.J; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. American Journal of Hygiene, n.27, p.493-497, 1938.

ROGÉRIO, A. P. Anti-asthmatic potential of a D-galactose binding lectin from *Synadenium carinatum* latex. Glycobiology Advance Access. Disponível em: <<http://glycob.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/cwm053v1>>. Acesso em 29 de maio de 2007.

ROGERO, S. O. et al. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. Mat. Res., São Carlos, v.6, n.3, p. 317-320, 2003.

SIMONI, I.C. et al. Avaliação da citotoxicidade de biflavonóides isolados de *Ouratea spectabilis* (OCHINACEAE) em células de córnea de coelho SIRC. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.69, n.4, p.95-97, out/dez, 2002.

SOUZA-FAGUNDES, E. M. et al. Screening and fractionation of plant extracts with antiproliferative activity on human peripheral blood mononuclear cells. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.97(8), p.1207-1212, Dez. 2002.

TRESVENZOL, L.M., et al. Estudo sobre o comércio informal de plantas medicinais em Goiânia e cidades vizinhas. Revista Eletrônica de Farmácia, Goiânia, v.3, n.2, p. 22-28, 2006.

VALADARES, M. C.; CASTRO, N. C.; CUNHA, L. C. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células de medula óssea de camundongos. Rev. Bras. Cienc. Farm., São Paulo, v. 43, n. 4, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322007000400017&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 18 de setembro de 2008. doi: 10.1590/S1516-93322007000400017

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines on good agricultural and collection practices. Geneva, 2002.

Machado, A. A., Nakashima T., Silva W. A., Krüger E. R. / Revista Eletrônica de Farmácia Vol VIII (2), 1 – 24, 2011

YAMAMOTO, A. Y. et al. Diagnóstico de infecção congênita e perinatal por citomegalovírus utilizando a reação em cadeia da polimerase. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 31, p. 19-26, jn-fev, 1998.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. Quim. Nova, São Paulo, v.24, n.1, p. 147-152, 2001.