

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

TIAGO BRANQUINHO OLIVEIRA

**ESTUDO FARMACOGNÓSTICO, INVESTIGAÇÃO
DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA,
LEISHMANICIDA E TOXICIDADE AGUDA DE
Rhamnidium elaeocarpum Reissek –
RHAMNACEAE (CAFEZINHO)**

Goiânia
2009

TIAGO BRANQUINHO OLIVEIRA

**ESTUDO FARMACOGNÓSTICO, INVESTIGAÇÃO
DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA,
LEISHMANICIDA E TOXICIDADE AGUDA DE
Rhamnidium elaeocarpum Reissek –
RHAMNACEAE (CAFEZINHO)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas
Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. José Realino de Paula

Goiânia
2009

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(GPT/BC/UFG)

Oliveira, Tiago Branquinho.
O482e **Estudo farmacognóstico, investigação das atividades antimicrobiana, leishmanicida e toxicidade aguda de *Rhamnidium elaeocarpum* Reissek - Rhamnaceae (Cafezinho) [manuscrito] / Tiago Branquinho Oliveira. – 2009.**

79 f. : il., figs., qds., tabs.

Orientador: Prof. Dr. José Realino de Paula.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, 2009.

Bibliografia: f.66-79.

1. *Rhamnidium elaeocarpum* 2. Atividade antimicrobiana 3. Concentração inibitória mínima 4. Flavonóides 5. Saponinas 6. Taninos 7. Alcalóides 8. Plantas medicinais I. Paula, José Realino. II. Universidade Federal de Goiás. **Faculdade de Farmácia** III. Título.

CDU: 633.88:615.322

TIAGO BRANQUINHO OLIVEIRA

**ESTUDO FARMACOGNÓSTICO, INVESTIGAÇÃO
DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA,
LEISHMANICIDA E TOXICIDADE AGUDA DE
Rhamnidium elaeocarpum Reissek –
RHAMNACEAE (CAFEZINHO)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás. Em 27 de agosto de 2009, pelo mestrando Tiago Branquinho Oliveira

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Realino de Paula (FF/UFG)
Presidente

Profa. Dra. Paula Melo Martins (UEG)

Profa. Dra. Clévia Ferreira Duarte Garrote
(FF/UFG)

Dedico este trabalho a meus pais, irmã e cunhados, e, à minha esposa Daniella por serem os maiores incentivadores desta conquista.

AGRADECIMENTOS

O meu muito obrigado:

Ao meu querido orientador, Professor Doutor José Realino de Paula, por acreditar no meu potencial e pelo investimento no meu trabalho; por seu apoio incondicional e por me brindar com seus conhecimentos, sua cultura, sua competência e sua sabedoria;

À banca examinadora por seu interesse e disposição;

Aos professores Dr. Luiz Carlos da Cunha, Dra. Laila Salmen Espindola, Dra. Ieda Maria Sapateiro Torres, Dra. Maria Teresa Freitas Bara pelo auxílio nos testes biológicos disponibilizando material humano, intelectual e físico;

Às professoras Dra. Leonice Manrique Faustino Tresvenzol e Dra. Tatiana Sousa Fiuza, pela colaboração na revisão final;

Aos professores e funcionários da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás que viabilizaram o cumprimento das exigências acadêmico-administrativas necessárias à minha formação;

À Universidade Estadual de Goiás e ao Centro Universitário de Anápolis, por abrir suas portas, dando a oportunidade de ampliar minha experiência acadêmica;

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais da FF/UFG e professores pelo carinho e receptividade;

Aos amigos e companheiros de bancada Daniel, Beatriz, Gilvana, Flaubertt, Liuba pela amizade, companheirismo e colaboração na realização das várias etapas desta pesquisa;

À minha orientanda Rebeca Lemos Soares pelo auxílio no desenvolvimento de algumas etapas deste trabalho.

“Lembra-te de que dentro de ti mesmo se esconde o que te move, ou seja, o cordel do fantoche. Aí esta a voz que persuade, aí esta a vida, aí está, verdadeiramente, o homem.”

Marco Aurélio

RESUMO

Nos últimos anos o tratamento com medicamentos à base de plantas medicinais tem aumentado. Uma preocupação em relação à utilização desses produtos naturais consiste no controle de qualidade farmacobotânico, fitoquímico e ensaios de pureza, que compõem as especificações técnicas de uma determinada espécie vegetal. Além disso, estudos farmacológicos e toxicológicos devem ser realizados, visando a sua eficácia e segurança. Este trabalho teve por objetivo realizar a avaliação farmacognóstica, toxicidade aguda e avaliação das atividades antimicrobiana e leishmanicida do extrato etanólico das folhas, frutos, cascas do caule e cascas da raiz de *R. elaeocarpum* Reissek. Amostras da *R. elaeocarpum* foram coletadas no município de Campestre-GO, a descrição dos aspectos macroscópicos das folhas, casca do caule e casca da raiz foi realizada à vista desarmada observando as características macroscópicas gerais de drogas vegetais; a análise microscópica foi realizada através da observação de cortes histológicos submetidos à coloração. A análise qualitativa das principais classes de metabólitos secundários presentes foi realizada na amostra pulverizada. Os ensaios para determinação do teor de água, cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido foram realizados segundo a Farmacopéia Brasileira IV. O extrato etanólico bruto foi obtido por maceração e as frações foram obtidas por partições, líquido-líquido, sucessivas com hexano, diclorometano e acetato de etila. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pelo método de diluição em ágar. O procedimento foi realizado segundo normas do NCCLS 2004 (M7-A7). A avaliação da toxicidade aguda dos extratos etanólicos brutos teve como referência as Diretrizes 423 da *Organisation for Economic Co-Operation and Development* (OECD). A atividade leishmanicida foi testada para as formas promastigotas de *Leishmania (L) chagasi*. A maior parte das características morfoanatômicas observadas está de acordo com o padrão típico da família. Na prospecção fitoquímica da folha, cascas da raiz, cascas do caule e fruto de *R. elaeocarpum* verificou-se a presença de flavonóides e alcalóides. Verificou-se, também, a presença de heterosídeos saponínicos e taninos na folha, cascas da raiz, cascas do caule sendo ausente no fruto. Os extratos e as frações que obtiveram o menor valor de Concentração Inibitória Mínima ($0,390 \text{ mg.mL}^{-1}$) frente aos microrganismos testados apresentaram atividade inibitória moderada. Nenhum dos extratos e frações apresentou boa atividade inibitória. No que se diz a respeito à investigação toxicológica, durante todo o período de observação dos animais durante a avaliação de toxicidade aguda não ocorreu morte. Através das observações comportamentais feitas por meio do *screening* hipocrático atribuiu-se pontuação zero para todos os itens avaliados. A necropsia dos animais não evidenciou nenhuma alteração macroscópica que justificasse o estudo histopatológico dos órgãos (rins, baço e fígado) selecionados para análise. Neste estudo foi demonstrado ainda que a utilização do extrato bruto e as frações de folhas de *R. elaeocarpum* induziu a morte das formas promastigotas de *L. (L) chagasi in vitro*. Os resultados apresentados abrem perspectivas para o futuro isolamento, purificação e identificação das substâncias bioativas de *R. elaeocarpum*.

Palavras Chave: concentração inibitória mínima. flavonóides. saponinas. taninos. alcalóides.

ABSTRACT

In the last years the treatment with medicines made from medicinal plants has increased. A concern about the usefulness of these natural products is the quality control pharmacobotanical, phytochemical and purity tests, which make up the technical specifications of a particular plant species. Moreover, pharmacological and toxicological studies must be conducted in order to effectiveness and safety. This study aimed to carry out the assessment pharmacognostic, acute toxicity and evaluation of antimicrobial and leishmanicidal of the ethanol extract of the leaves, fruit, stem bark and root bark of *R. elaeocarpum* Reissek. Samples of *R. elaeocarpum* were collected in the municipality of Campestre-GO, a description of the macroscopic aspects of the leaves, stem bark and root bark was carried to the naked eye by observing the macroscopic general of vegetal drugs; the microscopical analysis was performed by observing the histological stained. The qualitative analysis of the major classes of secondary metabolites present in the sprayed sample. The tests for water content, total ashes and acid insoluble ashes had been carried through according to the Brazilian Pharmacopoeia IV. The crude ethanol extract was obtained by maceration and the fractions were obtained by partition, liquid-liquid, successive with hexane, dichloromethane and ethyl acetate. Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by agar dilution. The procedure was performed according to NCCLS standards 2004 (M7-A7). The evaluation of acute toxicity of ethanol extracts had reference to the Guidelines of 423 Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD). The leishmanicidal activity was tested for the promastigotes forms of *Leishmania (L) chagasi*. Most of the morphological and anatomical characteristics observed are consistent with the typical family. In phytochemical screening of leaf, root bark, stem bark and fruit of *R. elaeocarpum* verified the presence of flavonoids and alkaloids. It was also the presence of heterosides saponins and tannins in leaf, root bark, stem bark and is absent in the fruit. The extracts and fractions that had obtained the lowest value of minimum inhibitory concentration (0,390 mg.mL⁻¹) against microorganisms tested showed moderate inhibitory activity. None of the extracts and fractions showed good inhibitory activity. As is said about the toxicological research, throughout the period of observation of animals during the evaluation of acute toxicity was not death. Through behavioral observations made through the hippocratic screening is assigned a zero score for all evaluated items. The necropsy of the animals did not evidence any macroscopic alterations to justify the histopathology of the organs (kidney, spleen and liver) selected for analysis. This study demonstrated that the use of crude extract and fractions of leaves of *R. elaeocarpum* induced death of promastigotes forms of *L. (L) chagasi in vitro*. The presented results open perspectives for the future isolation, purification and identification of bioactive substances of *R. elaeocarpum*.

Keywords: leishmaniasis. products with antimicrobial action. minimum inhibitory concentration. flavonoids. saponins. tannins. alkaloids.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 FAMÍLIA RHAMNACEAE.....	12
1.2 ATIVIDADE BIOLÓGICA E TOXICIDADE AGUDA.....	15
1.2.1 Avaliação da Atividade Antimicrobiana.....	15
1.2.2 Pesquisa de Agentes Leishmanicidas.....	21
1.2.3 Avaliação da Toxicidade Aguda.....	23
2 OBJETIVO GERAL.....	26
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 COLETA DE MATERIAL BOTÂNICO.....	27
3.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA.....	27
3.2.1 Análise Microscópica da Folha.....	28
3.2.2 Análise Microscópica da Casca do Caule e Casca da Raiz.....	28
3.3 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA.....	29
3.3.1 Pesquisa de Heterosídeos Antraquinônicos.....	29
3.3.2 Pesquisa de Heterosídeos Digitálicos.....	29
3.3.3 Pesquisa de Flavonóides.....	30
3.3.4 Pesquisa de Heterosídeos Saponínicos.....	31
3.3.5. Pesquisa de Pesquisa de Taninos e Compostos Fenólicos.....	32
3.3.6. Pesquisa de Alcalóides.....	33
3.3.7. Pesquisa de Cumarinas.....	33
3.4 TESTES DE PUREZA.....	34
3.4.1 Umidade.....	34
3.4.2 Teor de Cinzas Totais.....	34
3.4.3 Determinação do Teor de Cinzas Insolúveis em Ácido Clorídrico (HCl).....	35
3.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB).....	36
3.6 FRACIONAMENTO.....	36
3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	37
3.7.1 Extratos e Frações Avaliadas.....	38
3.7.2 Preparo do Inóculo Microbiano.....	38
3.8 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA.....	39
3.8.1 Extratos Avaliados.....	39
3.8.2 Animais.....	39
3.8.3 Procedimento Experimental.....	40
3.9 ATIVIDADE LEISHMANICIDA.....	41
3.9.1 Ensaio preliminar para <i>L (L) chagasi</i>	41
3.9.2 Determinação da concentração inibitória de 50% (CI ₅₀) contra <i>L (L) chagasi</i>	42
4 RESULTADOS.....	43
4.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	43
4.2 CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA.....	46
4.3 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA.....	52
4.4 TESTES DE PUREZA.....	53

4.5	OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB).....	54
4.6	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	54
4.7	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA.....	57
4.8	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA.....	58
5	DISCUSSÃO.....	59
5.1	CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA.....	59
5.2	PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA.....	60
5.3	TESTES DE PUREZA.....	61
5.4	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	62
5.5	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA.....	63
5.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA.....	64
6	CONCLUSÕES.....	65
7	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos o tratamento com medicamentos à base de plantas medicinais tem aumentado, e, é fundamental que a comunidade médica assim como outros profissionais da área da saúde atente para esse potencial, para que possamos utilizá-lo (BOTSARIS; MACHADO, 1999). Em Goiás, devido a fatores culturais, e também, ao reduzido poder aquisitivo de grande parte da população, é comum o uso de plantas medicinais, muitas vezes sem os devidos conhecimentos quanto à “prescrição” e/ou qualidade (MENDONÇA *et al.*, 2007).

Uma preocupação em relação à utilização desses produtos naturais consiste no controle de qualidade farmacobotânico, fitoquímico e ensaios de pureza, que compõem as especificações técnicas de uma determinada espécie vegetal. Além disso, estudos farmacológicos e toxicológicos devem ser realizados, visando assegurar seu uso (ARANTES *et al.*, 2005).

Para o estudo de plantas medicinais visando avaliar seu potencial para o desenvolvimento de medicamentos, várias etapas precisam ser executadas. Nesse contexto, a primeira etapa contempla o estudo botânico, que está relacionado com a identificação da amostra. A identidade botânica de uma espécie vegetal é definida por meio da análise de suas características morfológicas em comparação com a monografia dessa espécie já descrita na literatura e material depositado em herbário e identificado por especialista (MENTZ; BORDIGNON, 2004). Da mesma forma, é importante o estabelecimento de características morfoanatômicas que permitam diferenciá-la de outras espécies, com as quais possa ser confundida. A identificação macroscópica e microscópica é uma exigência da legislação brasileira na avaliação da autenticidade de droga de origem vegetal (BRASIL, 2004b).

A etapa de ensaios biológicos pré-clínicos relaciona-se aos ensaios farmacodinâmicos, farmacocinéticos e toxicológicos em animais de laboratório. O primeiro objetivo desses testes é mostrar a eficácia, bem como, o grau de toxicidade do produto em avaliação. Em geral, a investigação farmacológica preliminar utiliza modelos experimentais relevantes relacionados às ações terapêuticas sugeridas pelos dados etnofarmacológicos. As espécies de animais mais utilizadas nesses estudos são ratos, camundongos, cobaias, coelhos, cães e, em alguns casos, macacos e porcos. Dependendo da atividade biológica pesquisada, os experimentos

podem envolver órgãos ou tecidos isolados, sistemas enzimáticos, cultura de células, cultura de bactérias, vírus e protozoários. Posteriormente, estudos farmacológicos com as frações, substâncias isoladas e/ou formulações farmacêuticas a serem comercializadas, deverão ser realizados para subsidiar os estudos clínicos (LAPA *et al.*, 2004).

Como não existem testes de novos fármacos *in anima nobile* sem risco intrínseco de reações adversas, a etapa pré-clínica visa determinar experimentalmente o grau de segurança para os testes clínicos. A etapa clínica é a executada na espécie humana e está dividido em quatro fases seqüenciais realizadas apenas se existirem indicações seguras de que os benefícios do uso medicinal do novo produto suplantam os riscos de uma possível ação tóxica.

A etapa farmacotécnica e de controle de qualidade estão relacionadas ao preparo da forma farmacêutica para administração, com a garantia da qualidade e uniformidade da amostra, assim como com sua estabilidade durante os testes pré-clínicos e clínicos. Comprovada a efetividade, quantificado o efeito principal e eventualmente as ações colaterais, novos testes de toxicidade são justificados. Estes têm o objetivo de detectar reações inesperadas produzidas pelo uso continuado do produto, tanto as desencadeadas pela administração acidental de doses excessivas, como as conseqüentes do acúmulo causado pelo desbalanceamento entre administração e eliminação do fármaco no organismo (LAPA *et al.*, 2004).

Dentro desse contexto de uso terapêutico de plantas medicinais visando o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos, o Brasil assume uma condição privilegiada, pois é detentor de uma ampla biodiversidade. Com pequenas modificações, os grandes espaços geográficos brasileiros são hoje também conhecidos como domínios morfoclimáticos e fitogeográficos, sendo eles: o Domínio Amazônico, o Domínio da Mata Atlântica, o Domínio das Caatingas, o Domínio dos Cerrados, o Domínio da Araucária e o Domínio das Pradarias do Sul, segundo Ab'Saber (1970). No Domínio do Cerrado predomina o Bioma do Cerrado, todavia, outros tipos de Biomas também estão representados, seja como tipos "dominados" ou "não predominantes" (caso das Matas Mesófilas de Interflúvio), seja como encaves (ilhas ou manchas de caatinga, por exemplo), ou penetrações de Florestas de Galeria, de tipo amazônico ou atlântico, ao longo dos vales úmidos dos rios. O bioma cerrado, em riqueza de espécies vegetais só é superado pelas florestas