

POTENCIAL FARMACOLÓGICO E TÓXICO DE UM EXTRATO DICLOROMETÂNICO DAS FOLHAS DE *Calypttranthes spruceana* Berg (MYRTACEAE)

Gabrielly Galdino CONRADO; Carlos Cleomir de Souza PINHEIRO; Fernanda Guilhon SIMPLICIO Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; ²Orientador CPPN /INPA; ³Colaboradora UFAM

1. Introdução

Vários extratos de diferentes espécies vegetais são utilizados com finalidade medicamentosa pelo homem desde o início dos tempos. No entanto, grande parte desse uso permanece sem embasamento científico.

A espécie em estudo, *Calypttranthes spruceana* Berg. (Myrtaceae), é arbórea e pode atingir até três metros de altura, é encontrada na Amazônia em regiões inundáveis à beira de rios. O forte cheiro de laranja que exala de suas folhas, a que deve a designação *laranjinha*, acha-se modificado por um odor característico de cuminho, razão porque é também denominada, por alguns, *cuminirana* (Campos Corrêa *et al.*, 1972). Populações do interior do Amazonas consomem o chá de suas folhas como febrífugo.

As folhas produzem um óleo essencial rico em limoneno, terpeno bastante utilizado na indústria química e farmacêutica. É considerado um agente anticancerígeno, pois diminui a proliferação celular, a neoangiogênese tumoral, e induz a apoptose (Campos Corrêa *et al.*, 1972). Tem ampla demanda como solvente biodegradável e sua aplicação como componente aromático em diversas preparações.

Considerando o potencial farmacológico da família Myrtaceae, a necessidade de validação do uso medicinal das folhas da *C. spruceana*, e a notória importância farmacológica e comercial do limoneno, este estudo propôs a realização de uma avaliação farmacológica de um extrato diclorometânico obtido das folhas dessa espécie, coletada em área de várzea do Município de Itacoatiara no Estado do Amazonas.

2. Material e Métodos

Coleta e identificação do material botânico - Folhas da espécie *Calypttranthes spruceana* foram coletadas em área de várzea do Município de Itacoatiara, AM, pelo Sr. Eduardo Silva. Um material-testemunho foi coletado para a confecção da exsicata, que foi taxonomicamente identificada pelo Dr. William Rodrigues do Herbário da Coordenação de Pesquisas em Botânica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, onde a mesma encontra-se depositada sob o número 80424.

Obtenção do extrato diclorometânico - O material botânico (460 g de folhas) foi triturado em moinho de facas (MA 340, Marconi) e macerado com 1 L de diclorometano (DCM) por 72 horas cada extração. Após esse período, o extrato foi filtrado em papel de filtro analítico e concentrado no evaporador rotatório (TE 211, Tecnal) a 45 °C e sob pressão reduzida até o menor volume possível. O volume residual do solvente foi eliminado por secagem em estufa (Stabil-Therm, Blue Electric Company) a 40 °C e o extrato resultante foi transferido para um frasco com tampa e acondicionado a 8 °C até a utilização.

Avaliação da atividade citotóxica: Ensaios com Artemia Salina - Para eclosão dos ovos de *Artemia* foi utilizada neste trabalho a técnica proposta por Meyer *et al.* (1982). Em recipientes de PVC transparentes de 50 mL adicionou-se uma solução salina marinha artificial a 3,5% com pH 8,2 preparada a partir de água destilada com pH em torno de 5,8. A solução foi exposta à aeração constante e em seguida, foi adicionado 06 mg de ovos de *Artemia*, mantida a temperatura média de 25°C e luminosidade fluorescente. Após 24 horas, os ovos eclodiram transformando-se em náuplios, fase ideal para o bioensaio. Em seguida foram colocados 10 náuplios em cada círculo da Placa de Tratamento, onde foi adicionado o extrato nas concentrações de 500, 100, 50, 25 e 10 µg/kg em volume final de 4 ml. No grupo controle havia somente o veículo (solução salina a 0,9% e Tween 20 (2-5 %) na proporção de 0,4: 1). Após 24 horas, foi feita a leitura do número de indivíduos vivos e mortos e o cálculo da Concentração Letal Média (CL₅₀) foi realizada pelo método de Probitos.

Animais- Para realização dos testes farmacológicos relatados nos itens posteriores neste estudo foram utilizados cento e quarenta e quatro camundongos albinos fêmeas (*Mus musculus*, variedade *albinus*) com pesos entre 20 - 30 gramas fornecidos pelo Biotério do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA). Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura (25°C) e ciclo claro/escuro de 12 h, com livre acesso a água e ração.

Screening Hipocrático: Testes gerais de atividade farmacológica (Rocha Silva, 1968)

Seis grupos de seis camundongos receberam doses de 2000, 1000, 750, 500, 250 e 10 mg/kg do extrato por via intraperitoneal e quatro grupos receberam doses de 5000, 3000, 1000 e 500 mg/kg por via oral. Para cada grupo, um animal adicional recebeu solução salina a 0,9% e Tween 20 (2-5 %) na proporção de 0,4: 1 pela mesma via, servindo então como controle negativo. Após a administração do extrato, os animais foram observados continuamente por 180 minutos em um campo experimental confeccionado em acrílico e a cada 24 horas durante 14 dias com livre acesso de água e comida. Os parâmetros de toxicidade foram anotados com as recomendações de Rocha Silva (1968).

Toxicidades agudas (doses simples) - Para esta análise, foram registradas as mortes que ocorreram entre os animais que foram submetidos ao *Screening Hipocrático*. O cálculo da dose letal aproximada (DLA) foi realizado pelo método de Probitos com o auxílio do *software* StatPlus versão 2007 (Analystsoft).

Avaliação preliminar da atividade anti-inflamatória: Teste das contorções abdominais (Lapa et al. 2008) - O extrato diclorometânico foi administrado em quatro grupos de seis camundongos, por via intraperitoneal (10 e 50 mg/kg) e oral (250 e 500 mg/kg), uma hora antes da aplicação de 10 mL/kg de ácido acético 1% intraperitonealmente (Koster et al. 1959). O grupo controle recebeu 10 mL/kg de solução salina a 0,9% e Tween 20 (2-5 %) na proporção de 0,4: 1. Indometacina (Indocid®, MSD) a 25 mg/kg e citrato de fentanila (Fentanest®, Cristália) a 20µg/kg, suspensos em solução salina, foram utilizados como controles positivos. A atividade analgésica foi avaliada por contagem cumulativa do número de contorções abdominais durante os 120 minutos subseqüentes à injeção do ácido acético, em relação ao controle negativo.

Avaliação da atividade analgésica: Teste de Placa Quente (Lapa et al. 2008) - Os camundongos são colocados individualmente em uma placa quente com temperatura constante de 52°C. Após a obtenção de dois valores basais (com intervalos de 30 min), diferentes grupos de 6 camundongos receberam doses de 100, 200 e 400 mg/kg do extrato pela via oral e doses de 10, 50 e 100 mg/kg do extrato pela via intraperitoneal. O grupo controle recebeu 10 mL/kg de solução salina a 0,9% e Tween 20 (2-5 %) na proporção de 0,4: 1 e Citrato de fentanila (Fentanest®, Cristália) a 20µg/kg, suspensos em solução salina, foi utilizado como controle positivo. O tempo máximo de contato do animal com a placa foi de 15 segundos para que não ocorressem lesões. A resposta foi avaliada decorridos 30, 60, 120 e 180 min da administração das drogas.

Análise estatística - A avaliação dos resultados dos testes farmacológicos foram realizados pelo método de Probitos e Finish com o auxílio do *software* StatPlus versão 2007 (Analystsoft) e as análises de variância utilizando o método de Student-Newman-Keuls, considerando o nível de significância de $p < 0,05$ e intervalo de confiança de 95%.

3. Resultados e Discussão

Os ensaios para atividade citotóxica com larvas de *Artemia salina* realizados com o extrato diclorometânico das folhas de *Calypttranthes spruceana* em diferentes concentrações (500, 100, 50, 25, 10 µg/mL), apresentaram efeitos citotóxicos na concentração letal (CL₅₀) de **17,075** µg/mL quando comparado ao controle negativo (solução salina a 0,9% e Tween 20 (2-5 %) na proporção de 0,4: 1).

A administração do extrato diclorometânico das folhas da *C. spruceana* em camundongos produziu contorções abdominais em cerca de dois minutos após a aplicação nas doses de 10, 250 e 500 mg/kg administradas pela via intraperitoneal durante aproximadamente 20 minutos. Também foram observados piloereção, tremor da cauda, espasmos musculares, tremores grosseiros e hiperemia, em todas as doses testadas pela via intraperitoneal, sugerindo que o extrato tenha uma ação estimulante no sistema nervoso central (Rocha Silva, 1968), além de ptose, dispnéia e reclusão à borda da caixa. Os parâmetros citados acima não foram observados nas doses administradas oralmente, o que sugere maior segurança na utilização terapêutica desse extrato por essa via.

Mortes foram observadas apenas em animais que receberam administração intraperitoneal desse extrato, sendo a DLA, nesse caso, de **1265,9** mg/kg.

A análise dos dados do teste das contorções abdominais mostrou que o extrato apresenta atividade anti-inflamatória estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, por ambas as vias, com $p < 0,05$ em todos os casos. No entanto, as doses administradas pela via oral (250 e 500 mg/kg) não apresentaram atividade superior à dos controles positivos, como as doses administradas pela via intraperitoneal (Figura 1).

A análise dos dados do teste de placa quente mostrou, de forma geral, que o extrato diclorometânico de *C. spruceana* apresenta uma atividade analgésica estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$). No entanto não foi verificada diferença estatisticamente significativa em relação ao controle positivo (Citrato de Fentanila) como pode ser observado na figura 2.

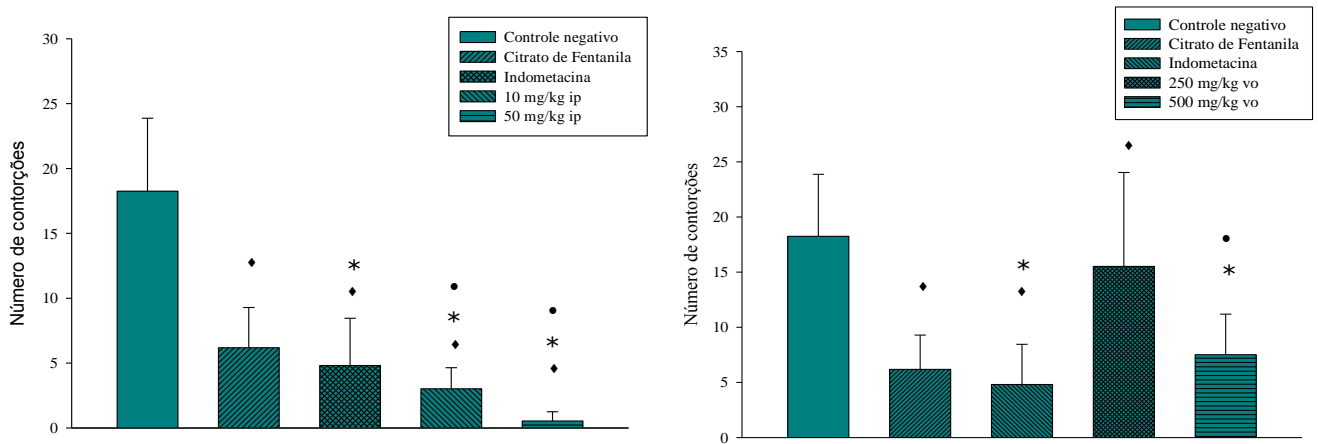


Figura 01 – Atividade anti-inflamatória do extrato diclorometânico das folhas de *C. spruceana*. A, resposta das doses administradas pela via intraperitoneal; B, resposta das doses administradas pela via oral. Valores de p versus controle negativo: * $p < 0.05$. Valores de p versus citrato de fentanila: * $p < 0.05$. Valores de p versus indometacina: * $p < 0.05$

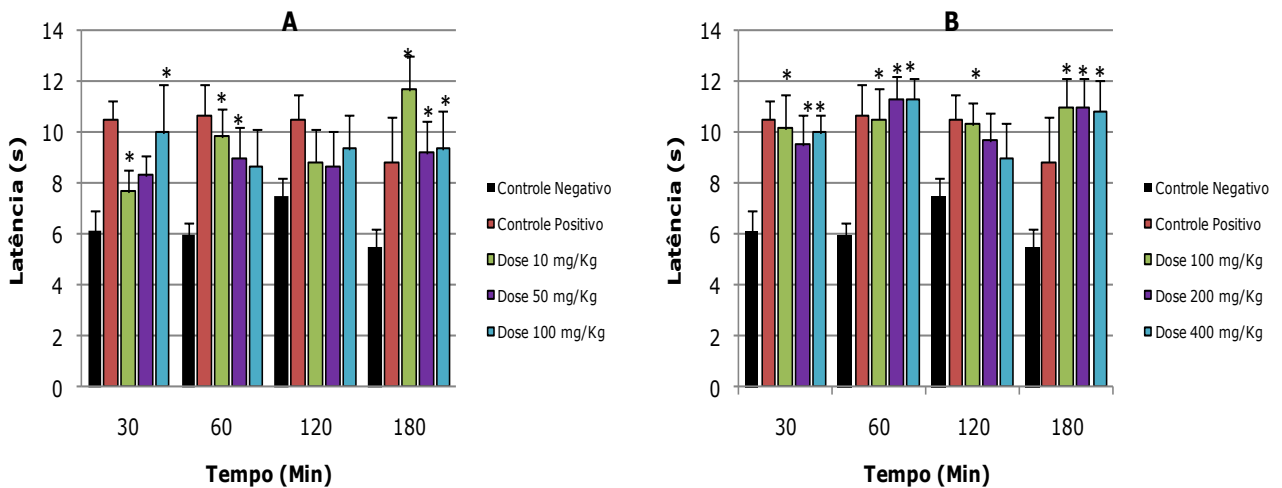


Figura 02 – Atividade analgésica do extrato diclorometânico das folhas de *C. spruceana*. A, resposta das doses administradas pela via intraperitoneal; B, resposta das doses administradas pela via oral. Valores de p versus controle negativo: * $p < 0,05$.

4. Conclusão

Em acordo com os resultados obtidos, conclui-se que o extrato diclorometânico das folhas de *Calypttranthes spruceana* demonstrou ter larga aplicação em pesquisa para a descoberta de compostos com atividades citotóxicas de princípios bioativos presentes em extratos de plantas, assim como um grande potencial analgésico e anti-inflamatório, sugerindo suas potencialidades para fins terapêuticos. Os resultados podem estar relacionados ao seu uso na medicina popular, entretanto, a espécie merece ser objeto de novos estudos para garantir o uso seguro pela população.

5. Referências

Campos Correa, H.G.; Da Silva, M.L.; Maia, J.G.S.; Gottlieb, O.R.; Mourão, J.C.; Marx, M.C.; De Moraes, A.A.; Magalhães, M.T. 1972. Óleos essenciais de espécies do gênero *Calypttranthes*. *Acta Amazonica*, 2 (3): 53-54.

Lapa, A. J.; Soucar, C.; Landman, M. T.; Castro, M. S.; Lima, T. C. 2008. *Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica de Plantas Medicinais*. São Paulo: Lagoa Editora Ltda.

Koster, R.; Anderson, M.; Debeer, E. J. 1959. – Acetic acid analgesic screening. *Federations Proceeding 18*: 418-420pp.

Meyer, B. N.; Putam, J. E.; Jacobson, L. B.; Nichols, D. E.; Mclaughlin, J.L. 1982. A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica 45*: 31 – 4pp.

Rocha Silva, M. 1968. Métodos estatísticos aplicados à Farmacologia, cap. 3. em: *Fundamentos de Farmacologia e suas aplicações à Terapêutica*. Vol. 1. 2º ed. Editora Ltda. São Paulo.