

## ESTUDOS FARMACOLÓGICOS PRELIMINARES DOS EXTRATOS DA *CASEARIA SYLVESTRIS* SWARTZ\*

FERNANDO AMARANTE SILVA\*\*

ELI SINNOTT SILVA\*\*\*

JULIO CESAR GAMA APOLINARIO\*\*\*\*

ANA LUIZA MUCCILLO BAISCH\*\*

MARILÈNE FARIAS ALAM\*\*\*

BEATRIZ OLIVEIRA\*\*

ANA MARIA BATTASTINI\*\*

FIORINA TORRES\*\*

GILMAR RACOSKI\*\*

ANTONIO JOSÉ LAPA\*\*\*\*\*

### RESUMO

O "chá de bugre", *Casearia sylvestris* Swartz tem sido, popularmente, usado com várias finalidades. Mais recentemente lhe tem sido atribuído características abortivas. Essa possibilidade levou-nos a avaliar a toxicidade dos extratos brutos de suas folhas, e os efeitos no útero, sobre a motilidade espontânea e as contrações induzidas pela ocitocina. A dose letal média do extrato aquoso a quente é de 1,792g de resíduo, por quilo de peso, para camundongos albinos. Com a solução aquosa do extrato etanólico observamos, "in vitro", na motilidade espontânea uterina de ratas, aumento da freqüência de contração e do tônus basal e diminuição da amplitude de contração; na curva dose-resposta à ocitocina, diminuição da resposta máxima e aumento da dose efetiva média. O extrato aquoso a frio produziu, na motilidade espontânea uterina, aumento de todos os parâmetros observados; na curva dose-resposta à ocitocina, também aumentou a resposta máxima, diminuindo, entretanto, sua dose efetiva média. Os resultados sugerem que os extratos de folhas de *C. sylvestris* são capazes de modificar a atividade uterina, "in vitro". Esses dados poderiam explicar o uso abortivo.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Casearia sylvestris*; extratos brutos; teste biológico "in vitro" e "in vivo".

\* Este trabalho foi parcialmente financiado pelo CNPq.

\*\* Profs. do Dep. de Ciências Fisiológicas – FURG.

\*\*\* Profs. do Dep. de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Biologia – UFPel.

\*\*\*\* Bolsista do CNPq.

\*\*\*\*\* Escola Paulista de Medicina – InFar – São Paulo.

## ABSTRACT

The "bugre" tea, *Casearia sylvestris* Swartz has been popularly used with several aims. More recently some abortive characteristics have been ascribed to it. This possibility led us to evaluate the toxicity of rough extracts of its leaves and its effects on the uterus, on the spontaneous motility and the contractions induced by the oxytocin. The mean lethal dose of the watery extract at warm is 1,792g of residue, by weight kilograms to albino mice. With the watery solution of the ethanolic extract we observed "in vitro", in the spontaneous motility of the mice uterus, an increase of the contraction frequency and of the resting tone and a decrease of the contraction amplitude; in the curve of the answer to oxytocin a decrease of the maximum response and increase of the mean effective dose. The watery extract at cold produced in the spontaneous uterus motility, an increase of all the parameters observed; in the dose-response curve to oxytocin, the maximum response also increased, but its mean effective dose decreased. The results suggest that the extracts of leaves of *C. sylvestris* are capable of modify the uterus activity "in vitro". These data could explain the abortive usage.

KEY WORDS: *Casearia sylvestris*; rough extracts; biological test "in vitro" and "in vivo".

## INTRODUÇÃO

Os produtos naturais constituem uma enorme fonte de substâncias utilizadas pela Farmacologia e Terapêutica, onde inúmeros exemplos de plantas que eram empregadas popularmente, sem bases científicas, passaram agora a fazer parte do arsenal terapêutico moderno.

O uso empírico do "chá de bugre", como abortivo e para retirar placenta em pós-parto de animais da Região Centro-Oeste do Estado do Rio Grande do Sul, estimulou-nos a testar sua toxicidade e os seus efeitos sobre o útero.

O "chá de bugre" é denominação popular da *C. sylvestris*, também conhecida como "erva de lagarto", "pau de lagarto", "erva de teiú", "língua de teiú", "língua de tiú", "varre forno", "café bravo", "apiá-acanoçú", "pioya", "língua de lagarto", "vassatunga" e "petumba". Entretanto, o caboclo denomina genericamente de "guasatunga", "guassatonga" e "cassatunga", todas as espécies de *Casearia*. Na Argentina, recebe as denominações de "rajador", "palo de rajados", "guazatumba", "yerba de lagarto", "catiguá-oby" e "catiguá verde". Existe em toda a América tropical e, no Brasil, é encontrada em várias regiões, sendo muito comum em São Paulo<sup>7</sup>.

No Rio Grande do Sul, encontramos nas Regiões Centro-Oeste e no litoral Sul.

*C. sylvestris* é planta arbórea, da família Flacourtiaceae, atingindo cerca de 3,5m de altura, cujas folhas apresentam disposição alterna e dística, sendo simples, pecioladas, lanceoladas, com bordos serrilhados e ápice acuminado; contra a luz, mostram pontos translúcidos correspondentes às glândulas de óleo essencial<sup>9</sup>. Está inscrita na Farmacopéia Brasileira onde consta, como parte usada, a folha. Os

autores em geral<sup>1,7,9</sup>, destacam o seu emprego na medicina popular como, anti-leprótico, cicatrizante, anti-séptico, antifebril, estomáquico, hemostático e anes-tesiante de lesões da pele e mucosas. Não encontramos, nos trabalhos revisados, nenhuma referência ao seu uso abortivo.

O objetivo deste trabalho foi determinar a dose letal média (DL50) e os efeitos, em útero isolado de ratas, dos extratos brutos das folhas de *C. sylvestris*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção do material botânico

A matéria-prima deste trabalho foi coletada no município de Bom Retiro do Sul, RS e identificada no Departamento de Ciências Morfobiológicas da FURG, como sendo *Casearia sylvestris* Swartz.

As folhas foram secas à temperatura ambiente, moídas e conservadas em pacotes de papel ao abrigo da luz e umidade.

### Obtenção dos extratos brutos

Trabalhou-se com 3 tipos de extratos: etanólico a quente, aquoso a quente e aquoso a frio.

O extrato etanólico foi obtido com aparelho de Soxhlet, onde 45g de material foram mantidos sob refluxo, durante 6 horas, com 180ml de etanol absoluto p.a. (Merck). O resíduo pastoso verde escuro, obtido pela evaporação do etanol, foi dissolvido em água destilada e desionizada, o que passamos a chamar de solução aquosa do extrato etanólico.

O extrato aquoso a quente, foi obtido também, com aparelho de Soxhlet, submetendo a refluxo 45g de material, durante 6 horas, com 180ml de água destilada e desionizada.

O extrato aquoso a frio foi obtido a partir de 120g de folhas secas e moídas e 800ml de água destilada e desionizada, com agitação de 4 em 4 horas, durante 4 dias, ao final dos quais foi filtrada em algodão e refiltrada em papel de filtro. O extrato, assim, obtido, foi dividido em vários frascos pequenos e conservado sob congelamento, sendo descongelado no momento de usar.

A concentração dos extratos brutos foi determinada pelo processo de evaporação, em estufa, com pesagens consecutivas até a obtenção de dois valores iguais.

### Teste biológico "in vivo" (DL50)

Para o cálculo da DL50, foram utilizados camundongos suíços albinos de ambos os sexos, com o peso de  $34 \pm 1,2g$ , mantidos em gaiolas com água e ração "ad libitum". Esses animais, divididos em cinco grupos de dez, foram injetados com o extrato aquoso a quente de *C. sylvestris* nas doses de 3,0 - 2,5 - 2,0 - 1,5 e 1,0g/kg de peso via intraperitoneal, observando-se o número de óbitos, por grupo, no período de 24 horas. Do percentual de animais que morreram, em cada grupo, utilizando-se a tabela de retificação da curva sigmóide "mortalidade-dosagem", foram determinados os próbitos correspondentes, sendo então, a DL50 calculada

pelo método gráfico e pela equação de regressão, fazendo-se  $Y' = 5$  (próbitos corrigidos 5) (3 e 8).

### Teste biológico "in vitro"

Para os testes biológicos, foram utilizadas ratas Wistar virgens, com peso de  $207g \pm 4$  (SEM), mantidas com água e ração "ad libitum" na fase de estro do ciclo sexual. Esta fase foi induzida por injeção subcutânea de  $4mg/kg$  de peso de benzoato de dihidrofoliculina (dihidroestrone) (Procio – lab. Procampo) 24 horas antes de cada experimento e confirmada através de esfregaço vaginal<sup>6</sup>. Após o sacrifício de cada animal por traumatismo craniano, segmentos de  $1,5cm$  de corno uterino foram montados em cubas de  $15ml$  (modificados da técnica desenvolvida por Magnus, 1904)<sup>8</sup>, com solução nutriente Krebs (Kr) a  $37^\circ C$ <sup>5</sup>, ou com solução nutriente De Jalon (Ja) a  $30^\circ C$ , e em pH de  $7,4$  (método de Garcia e De Jalon)<sup>2</sup>, de acordo com o que se pretendia observar. Uma das extremidades destes segmentos foi amarrada a uma haste de vidro terminada em "S", por onde borbulhava carbogênio ( $95\% O_2$ ,  $5\% CO_2$  – White Martins), para equilibrar a solução nutritiva, e a outra, amarrada a uma alavanca inscritora com uma pré-carga de  $1g$ , que registrava as variações de motilidade em cilindro esfumaçado movido por quimógrafo, com ampliação de 8 vezes<sup>4</sup>.

Nos segmentos uterinos montados em Kr, a motilidade espontânea foi mantida, avaliando-se os seguintes parâmetros: Freqüência de Contração – FrCo (número de contrações em 10min); Amplitude de Contração – ACo (medida em centímetros); Força de Contração – FoCo (medida em centímetros) desde a Linha de Base Inicial – LBI até o pico da contração; Tônus Basal – TBa (medida em centímetros), de acordo com a variação da LBI (Fig. 1). Sempre que se apresentaram variações espontâneas de ACo, FoCo e TBa, os resultados expressaram as médias destas variações em 10min.

Imediatamente, após as observações iniciais da motilidade espontânea, utilizando-se preparações diferentes para cada extrato, foram adicionados ao banho (incubação)  $0,5mg/ml$  de solução aquosa do extrato etanólico de *C. sylvestris*, ou  $1,5mg$  de extrato aquoso a frio e registradas as alterações.

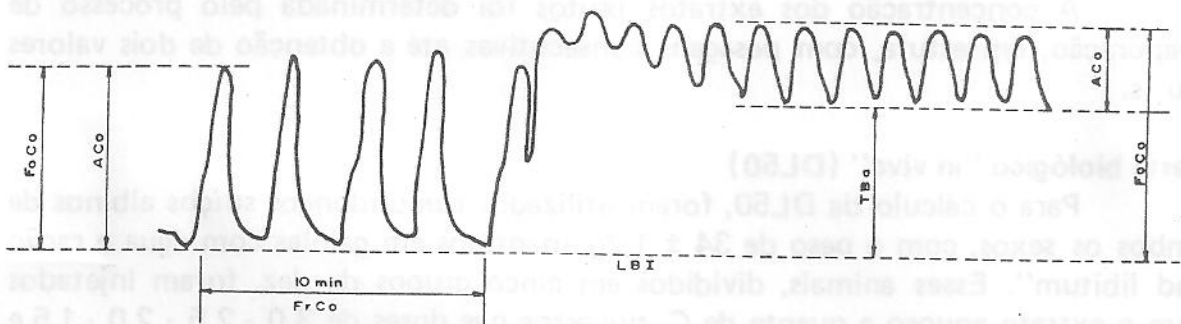


FIGURA 1 – Representação esquemática de um registro de motilidade espontânea uterina. FrCo (Freqüência de Contração), ACo (Amplitude de Contração), FoCo (Força de Contração), TBa (Tonus Basal) e LBI (Linha de Base Inicial).



Nos segmentos uterinos montados em Ja, foram construídas curvas dose-resposta cumulativa à ocitocina (Sigma)<sup>11</sup>, fazendo-se variar as concentrações de  $10^{-5}$  a  $3 \times 10^{-2}$  UI/ml. Foram avaliadas a resposta contrátil máxima e a dose efetiva média (DE50).

Seguindo a curva dose-resposta inicial à ocitocina, o segmento uterino foi continuamente incubado, para cada extrato separadamente, durante 15 minutos com a solução De Jalon contendo doses variadas de solução aquosa de extrato etanólico ou do extrato aquoso a frio. A solução aquosa do extrato etanólico foi utilizada na dose de incubação de 0,5mg/ml, e o extrato aquoso a frio foi utilizado na dose de incubação de 0,02mg/ml.

Cada preparação serviu como seu próprio padrão.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Foi admitida a hipótese de que os fenômenos observados obedeceram a uma distribuição normal, tendo sido aplicado para análise dos resultados o teste "t" de Student bicaudal<sup>10</sup>, para amostras pareadas.

As alterações foram consideradas significativas para  $p < 0,05$ .

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro-padrão.

## RESULTADOS E CONCLUSÕES

### Análise toxicológica

Os resultados expressos na Tabela 1 nos permitiram determinar a DL50.

TABELA 1 — Análise da mortalidade em camundongos injetados, via intraperitoneal, com extrato aquoso de *C. sylvestris*.

X	Nº ANIMAIS	% MORTES	Y	X <sup>2</sup>	XY	Y'
1,0	10	10	3,7184	1	3,7184	3,07956
1,5	10	10	3,7184	1,25	5,5776	4,29200
2,0	10	70	5,5244	4	11,0488	5,50440
2,5	10	80	5,8416	6,25	14,6040	6,71676
3,0	10	100	8,7190	9	26,1570	7,92916

X = DOSE em g/kg

Y = PRÓBITES — Tabela de retificação da curva sigmóide mortalidade-dosagem (3)

Y' = PRÓBITES CORRIGIDOS, PELA EQUAÇÃO DE REGRESSÃO =

$$\bar{Y} + b ( X - \bar{X} ), \text{ onde}$$

$$b = \frac{\sum XY - (\bar{X}\bar{Y} n)}{\sum X^2 - \bar{X}^2 n} \text{ onde } \underline{n} \text{ significa o número de doses empregadas (neste caso } n = 5 \text{).}$$

Empregando-se as fórmulas para próbite corrigido e fazendo-se próbite = 5 ( $Y' = 5$ ), a DL50 determinada foi 1,792g de resíduo das folhas de *C. sylvestris* por quilo de peso de animal<sup>3</sup>. Constatou-se, inicialmente, que o extrato aquoso a quente de *C. sylvestris* apresenta baixa toxicidade evidenciada pela DL50 extremamente elevada (Fig. 2).

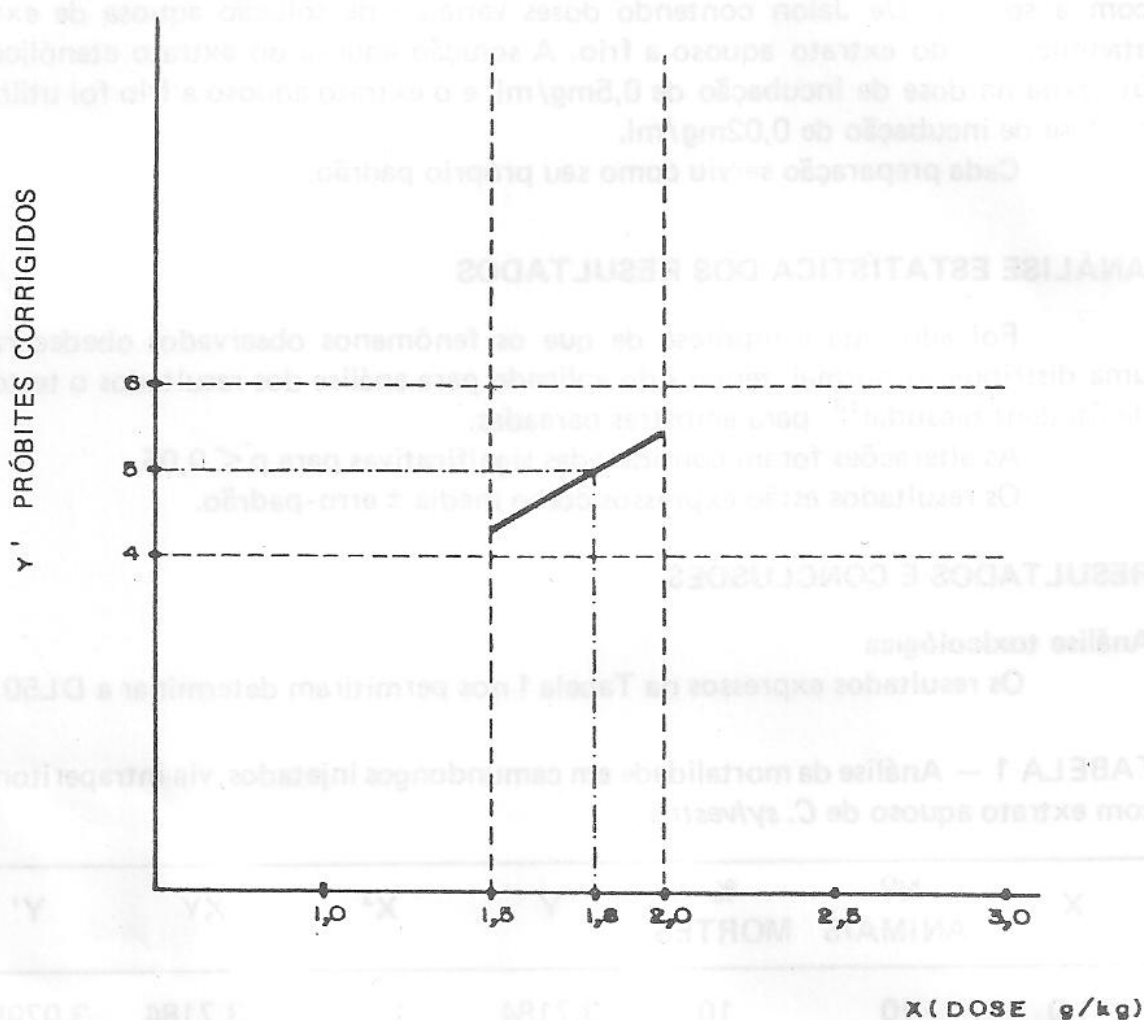


FIGURA 2 — Cálculo da DL50, para *C. sylvestris*, em camundongos, através do método gráfico (3). Os dados utilizados encontram-se na Tabela 1.

### Testes biológicos "in vitro"

Os efeitos de *C. sylvestris* sobre a motilidade espontânea uterina foram dependentes dos tipos de extratos utilizados para incubação.

Quando a preparação foi incubada, durante 15 minutos, com solução aquosa do extrato etanólico na concentração de 0,5mg/ml, observamos, em 8 experiências, aumento da FrCo em  $13,03 \pm 3,61\%$ , aumento do TBa em  $1,75 \pm 1,65\text{cm}$  e diminuição da ACo em  $34,27 \pm 7,5\%$ , evidenciando alterações significativas. Observamos uma tendência à diminuição da FoCo em  $2,59 \pm 7,8\%$ , embora esta alteração não tenha sido significativa (Tab. 2).

TABELA 2 – Variações na motilidade espontânea uterina, com solução aquosa de extrato etanólico de *C. sylvestris*. Freqüência de contrações em 10min, amplitude de contrações, força de contração e tônus basal medidos em centímetros. Os valores apresentados na tabela representam médias  $\pm$  erros-padrão de oito experiências.

PROPRIEDADES	PADRÃO	INCUBADO 0,5mg/ml
FrCo	9,62 $\pm$ 1,15	9,87 $\pm$ 1,78*
A Co	10,93 $\pm$ 2,71	7,86 $\pm$ 2,72*
FoCo	13,72 $\pm$ 3,17	13,38 $\pm$ 2,99
T Ba	0,0	1,75 $\pm$ 0,65*

\*Significativo para  $p < 0,05$ , quando comparado com o padrão.

Por outro lado, quando a preparação foi incubada, também durante 15 minutos, com o extrato aquoso a frio na concentração de 1,5mg/ml, observamos ao final de 17 experiências, aumento da FrCo em  $67,65 \pm 17,32\%$ , aumento do T Ba em  $0,54 \pm 0,21$ cm, aumento da A Co em  $163,01 \pm 58,31\%$ , e aumento da FoCo em  $205,81 \pm 75,8\%$ , evidenciando alterações significativas (Tab. 3).

TABELA 3 – Variações na motilidade espontânea uterina com extrato aquoso a frio de *C. sylvestris*. Freqüência de contrações em 10min, amplitude de contração e tônus basal medidos em centímetros. Os valores apresentados na tabela representam médias  $\pm$  erros-padrão de dezessete experiências.

PROPRIEDADES	PADRÃO	INCUBADO 1,5mg/ml
FrCo	6,94 $\pm$ 0,6	10,94 $\pm$ 1,05*
A Co	4,26 $\pm$ 0,71	5,81 $\pm$ 0,51*
FoCo	4,26 $\pm$ 0,71	6,35 $\pm$ 0,62*
T Ba	0,0	0,54 $\pm$ 0,21*

\*Significativo para  $p < 0,05$ , quando comparado com o padrão.

Os efeitos de *C. sylvestris* sobre a curva dose-resposta cumulativa à ocitocina no útero, também, foram dependentes dos tipos de extratos utilizados para incubação.

Os resultados obtidos da incubação uterina com solução aquosa do extrato etanólico na concentração de 0,5mg/ml mostraram diminuição na resposta contrátil máxima em  $36,41 \pm 4,87\%$ , aumento da DE50 e da ocitocina em  $28,68 \times 10^{-4} \pm 9,37 \times 10^{-4}$  UI/ml, e desvio da curva para a direita (Fig. 3).

A incubação uterina com extrato aquoso a frio mostrou respostas opostas às provocadas pela incubação com a solução aquosa do extrato etanólico, conforme podemos verificar a seguir.

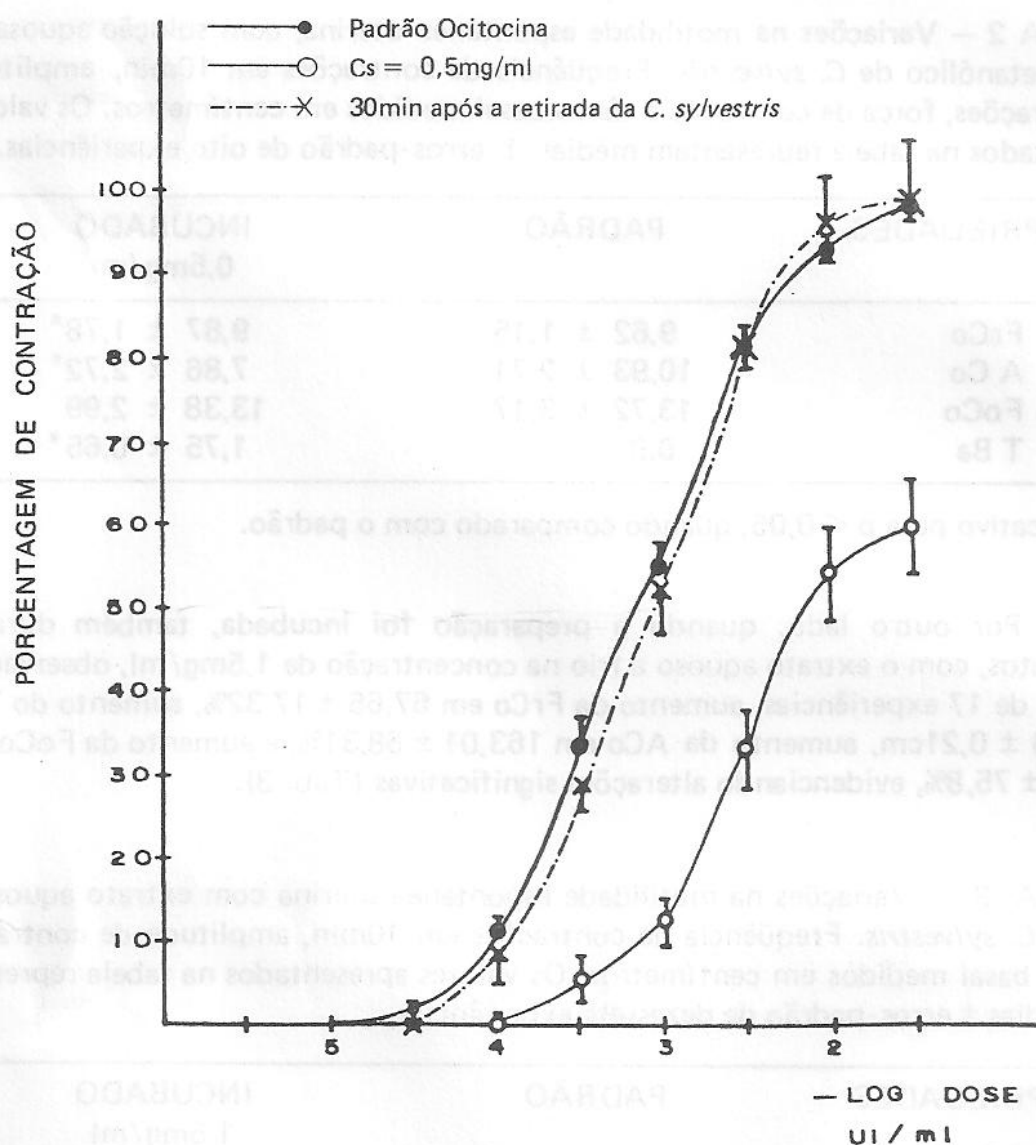


FIGURA 3 — “Curva dose-resposta” cumulativa do útero à ocitocina, com as alterações observadas após a incubação do extrato etanólico de *C. sylvestris*, e a recuperação, 30min, após a retirada do extrato. O gráfico expressa média  $\pm$  erros-padrão de dose-experiências.

Na concentração do extrato aquoso a frio de 0,02mg/ml, observamos aumento da resposta máxima em  $15,66 \pm 2,53\%$ , diminuição da DE50 à ocitocina, em  $1,29 \times 10^{-3} \pm 0,56 \times 10^{-3}$  UI/ml, e desvio da curva para a esquerda (Fig. 4).

A análise global dos testes “in vitro” dos extratos da *C. sylvestris* sugerem que, no extrato etanólico, existem frações que provocam reduções das propriedades uterinas, uma vez que produzem aumento na DE50 e diminuição na resposta máxima à ocitocina, ao mesmo tempo que reduzem a ACo. Por outro lado, nas experiências com o extrato aquoso a frio predominaram os aumentos das propriedades uterinas caracterizados por significantes aumentos na FrCo, ACo, FoCo e resposta contrátil máxima à ocitocina, com diminuição da DE50.



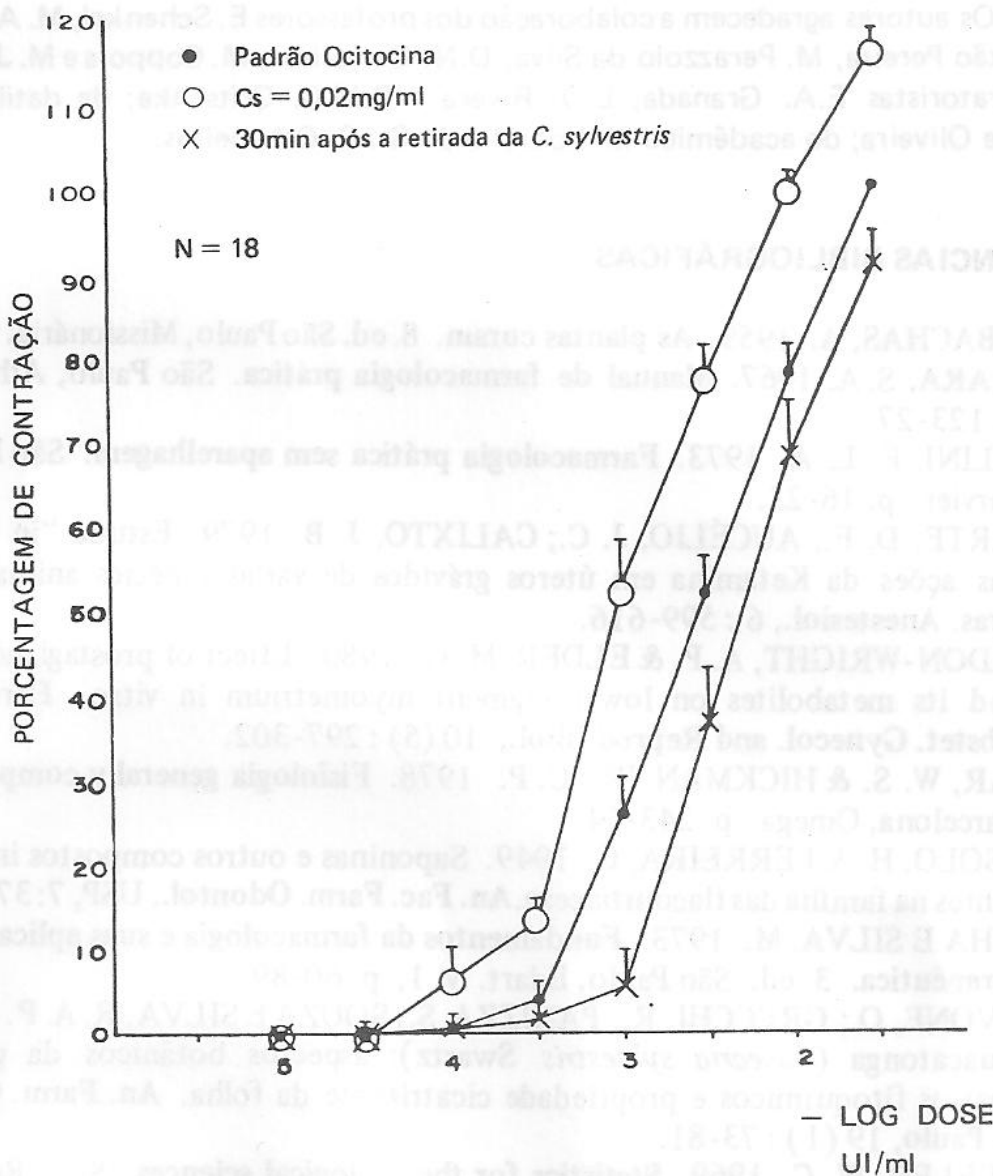


FIGURA 4 – “Curva dose-resposta” cumulativa do útero à ocitocina, com as alterações observadas após a incubação do extrato aquoso a frio de folhas de *C. sylvestris*. O gráfico expressa médias  $\pm$  erros-padrão de dezoito experiências.

Logo, poderíamos sugerir a presença, em *C. sylvestris*, de princípios inibidores e estimulantes das propriedades uterinas.

As investigações químicas, assim como os testes biológicos com *C. sylvestris*, continuam desenvolvendo-se a fim de isolar e identificar as substâncias responsáveis pelas alterações descritas. A identificação de alguns componentes já isolados<sup>7</sup> facilitará a análise biológica, que se pretende efetuar. Entretanto, a suposta propriedade abortiva do “chá de bugre”, ainda não ficou esclarecida.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a colaboração dos professores E. Schenkel, M. Amado, C.M. Paixão Pereira, M. Perazzolo da Silva, D.N. Gonçalves, M. Coppola e M. Junges; das laboratoristas E.A. Granada, L.O. Rivera e R.M.C. Gritschke; da datilógrafa M.A.B. de Oliveira; do acadêmico M. Sobral e do Sr. C. Cabanellos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BALBACHAS, A. 1959. *As plantas curam*. 8. ed. São Paulo, Missionária. 229p.
2. CÂMARA, S. A. 1967. *Manual de farmacologia prática*. São Paulo, Atheneu, p. 123-27.
3. CARLINI, E. L. A. 1973. *Farmacologia prática sem aparelhagem*. São Paulo, Sarvier. p. 16-23.
4. DUARTE, D. F.; AUCÉLIO, J. C.; CALIXTO, J. B. 1979. Estudo "in vitro" das ações da Ketamina em úteros grávidos de várias espécies animais. *R. Bras. Anesthesiol.*, 6 : 599-616.
5. GORDON-WRIGHT, A. P. & ELDER, M. G. 1980. Effect of prostaglandin E<sub>2</sub> and its metabolites on lower segment myometrium in vitro. *Europ. J. Obstet. Gynecol. and Reprod. Biol.*, 10 (5) : 297-302.
6. MOAR, W. S. & HICKMAN JR., C. P. 1978. *Fisiologia general y comparada*. Barcelona, Omega. p. 243-54.
7. POSSOLO, H. & FERREIRA, C. 1949. Saponinas e outros compostos interessantes na família das flacourtiaceae. *An. Fac. Farm. Odontol., USP*, 7:377-85.
8. ROCHA E SILVA, M. 1973. *Fundamentos da farmacologia e suas aplicações à terapêutica*. 3. ed. São Paulo, Edart. v. 1, p. 60-89.
9. SCAVONE, O.; GRECCHI, R.; PANIZZA, S.; SOUZA E SILVA, R. A. P. 1979. Guaçatonga (*Casearia sylvestris* Swartz): aspectos botânicos da planta, ensaios fitoquímicos e propriedade cicatrizante da folha. *An. Farm. Quím. S. Paulo*, 19 (1) : 73-81.
10. SCHEFLER, W. C. 1969. *Statistics for the biological sciences*. S. l., Reading Addison Wesley. p. 40-7.
11. VAN ROSSUM, J. M. 1963. Cumulative dose-response curves: technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drugs parameters. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 143 : 299-330.