

Fernando Amarante Silva (**), Ana Luiza Muccillo Baisch (**), Beatriz Oliveira (**), Ana Maria Battastini (**), Fiorina Torres (**), Gilmar Racoski (**), Eli Sinnot Silva (***), Marilene Farias Alam (***), Júlio César Gama Apolinário (****), 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. Esta 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 frequência de contração e do tonus 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". Estes dados poderiam explicar o uso abortivo.

INTRODUÇÃO

Os produtos naturais constituem uma enorme fonte de substâncias utilizadas pela

(*) Este trabalho foi parcialmente financiado pelo CNPq.

(**) Fundação Universidade do Rio Grande (FURG) - Deptº Ciênc. Fisiol. Rio Grande, RS

(***) Universidade Federal de Pelotas (UFPel) - Instituto de Biologia - Departamento de Fisiologia e Farmacologia - Pelotas, RS

(****) Bolsista CNPq

(*****) Escola Paulista de Medicina - InFar - São Paulo, SP

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, nos estimulou 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", "apiã-acanoçú", "pioya", "língua de lagarto", "vassatunga e petumba". Entretanto, o caboclo denomina genericamente de "guassatunga", "guassatonga" e "cassatunga", todas as espécies de *Casearia*. Na Argentina, recebe as denominações de "rajador", "palo de rajados", "guazatumba", "yerba de lagarto", "catiguã-oby" e "catiguã verde". Existe em toda a América tropical e, no Brasil, é encontrada em várias regiões, sendo muito comum em São Paulo (Possolo & Ferreira, 1949).

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 distica, sendo simples, pecioladas, lanceoladas, com bordos serrilhados e ápice acuminado; contra a luz, mostram pontos translúcidos correspondentes às glândulas de óleo essencial (Scavone et al., 1979). Está inscrita na Farmacopéia Brasileira onde consta, como parte usada, a folha. Os autores em geral (Balbachas, 1959; Possolo & Ferreira, 1949; Scavone et al., 1979), destacam o seu emprego na medicina popular como, antileprótico, cicatrizante, antisséptico, antifebril, estomáquico, hemostático e anestésico 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 Morfo-Biológicas 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 4h 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". Estes 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 1,0 g/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 próbites correspondentes, sendo então, a DL50 calculada pelo método gráfico e pela equação de regressão, fazendo-se $Y' = 5$ (próbites corrigidos, Gordon-Wright & Elder, 1980) (Carlini, 1973; Rocha e Silva, 1973).

Teste biológico "in vitro"

Para os testes biológicos, foram utilizadas ratas Wistar vírgens 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 sub-cutânea 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 (Moar & Hickman Jr., 1978). Após o sacrifício de cada animal por traumatismo craneano, segmentos de 1,5cm de corno uterino foram montados em cubas de 15ml (modificado da técnica desenvolvida por Magnus, 1904 (Rocha e Silva, 1973) com solução nutriente Krebs (Kr) a 37°C (Gordon-Wright & Elder, 1980) ou com solução nutriente De Jalon (Ja) a 30°C e em pH de 7,4 (método de Garcia e de De Jalon) (Câmara, 1967), 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% O₂, 5% CO₂ - White Martins) para equilibrar a solução nutridora, e a outra, amarrada a uma alavanca inscritora com uma pré-carga de 1g, que registra as variações de motilidade em cilindro esfumado movido por quinôgrafo, com ampliação de 8 vezes (Duarte et al., 1979).

Nos segmentos uterinos montados em Kr a motilidade espontânea foi mantida, avaliando-se os seguintes parâmetros: Frequência de Contração - FrCo (número de contrações em 10 min), 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 10 min.

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.

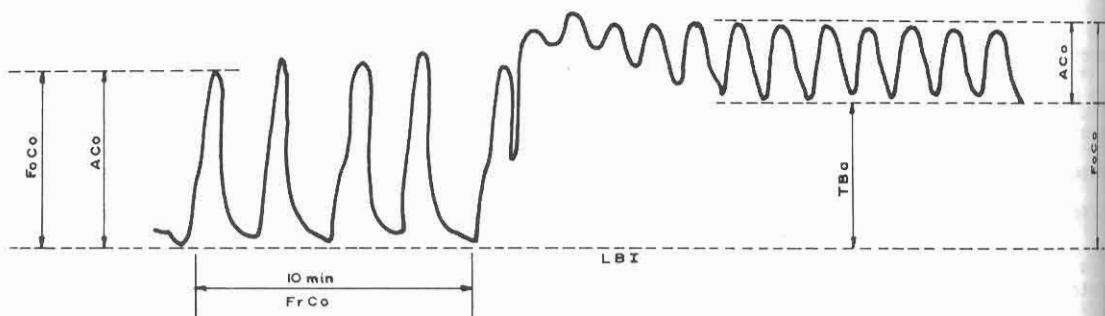


FIG. 1.- Representação esquemática de um registro de motilidade espontânea uterina. FrCo (Frequência de contração) ACo - (Amplitude de contração) (Força de Contração) TBa (Tonus Basal) e LBI (Linha de Base Inicial).

Nos segmentos uterinos montados em Ja, foram construídas curvas dose-resposta cumulativa à ocitocina (Sigma) (Van Rossum, 1963), fazendo-se variar as concentrações de 10^{-5} a 3×10^{-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 Jalón 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 0,01 mg/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 (Scheffler, 1969) 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 ²	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 (Carlini, 1973).

Y' = PRÓBITES CORRIGIDOS, PELA EQUAÇÃO DE REGRESSÃO =

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

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

Empregando-se as fórmulas para próbite corrigido e fazendo-se próbite = 5 ($Y'=5$) (Carlini, 1973), a DL50 determinada foi 1,792g de resíduo das folhas de *C. sylvestris* por quilo de peso de animal. Constatou-se, inicialmente, que o extrato aquoso a quente de *C. sylvestris* apresenta baixa toxicidade evidenciada pela DL50 extremamente elevada (Fig. 2)

Y' PRÓBITES CORRIGIDOS

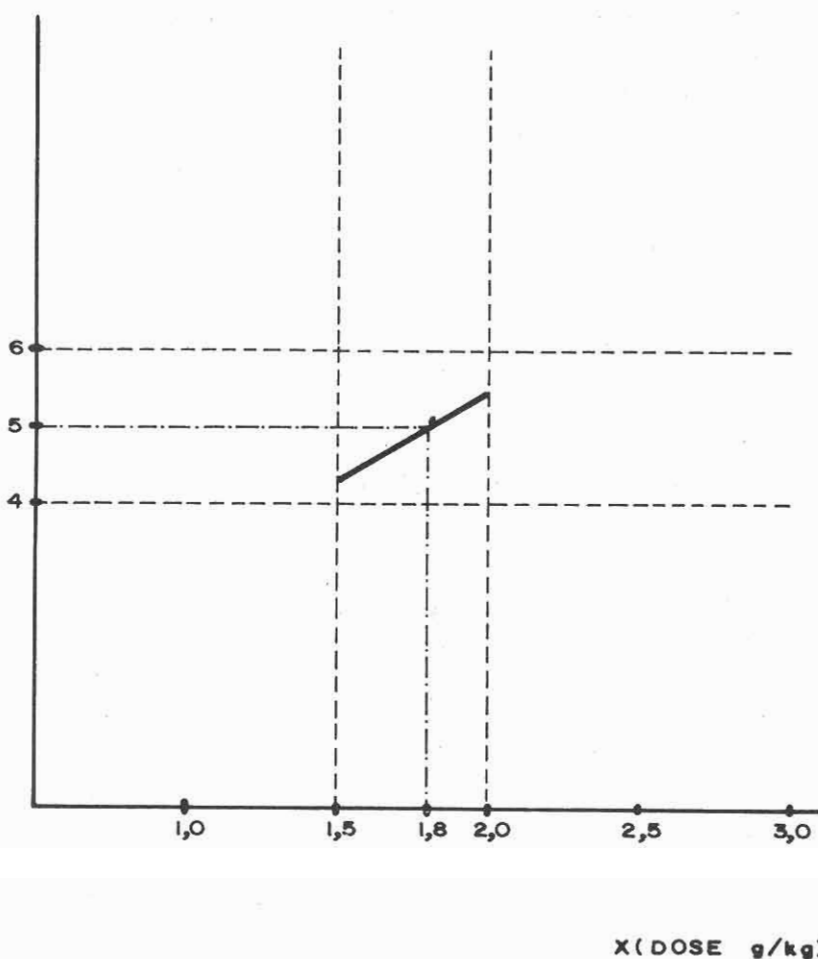


FIG. 2 - Cálculo da DL50 para *C. sylvestris* em camundongos através do método gráfico (Carlini, 1973). Os Dados utilizados encontram-se na Tabela 1.

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 0,5 mg/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 a 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 10 min., 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 0,21cm, 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 10 min., amplitude de contração e tônus basal medidos em centímetros. Os valores apresentados na tabela representam médias \pm erros-padrão de 17 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 ± 4,87%, aumento da DE50 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).

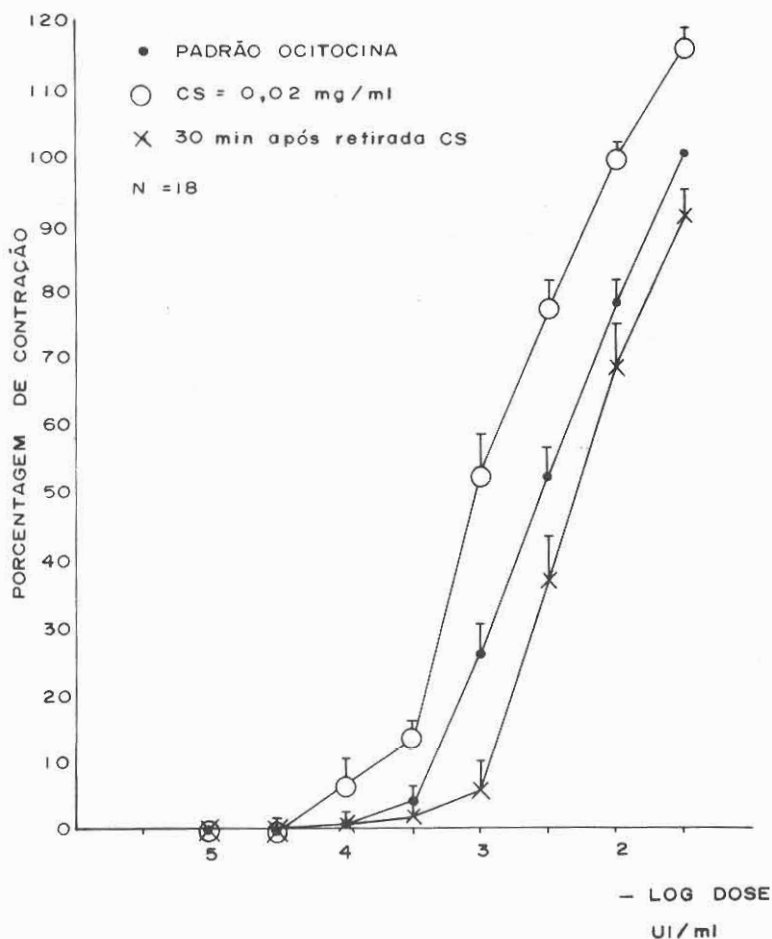


FIG. 3 - "Curva dose-resposta" cumulativa do útero à ocitocina, com as alterações observadas após a incubação do extrato etanólico de *C. sylvestris* (Cs) e a recuperação, 30 min. após a retirada do extrato. O gráfico expressa média ± erros-padrão de doze experiências.

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.

Na concentração do extrato aquoso a frio de 0,02mg/ml, observamos aumento da resposta máxima em 15,66 ± 2,53%, diminuição da DE50 à ocitocina em $1,29 \times 10^{-3} \pm 0,56 \times 10^{-4}$

UI/ml e desvio da curva para a esquerda (Fig. 4).

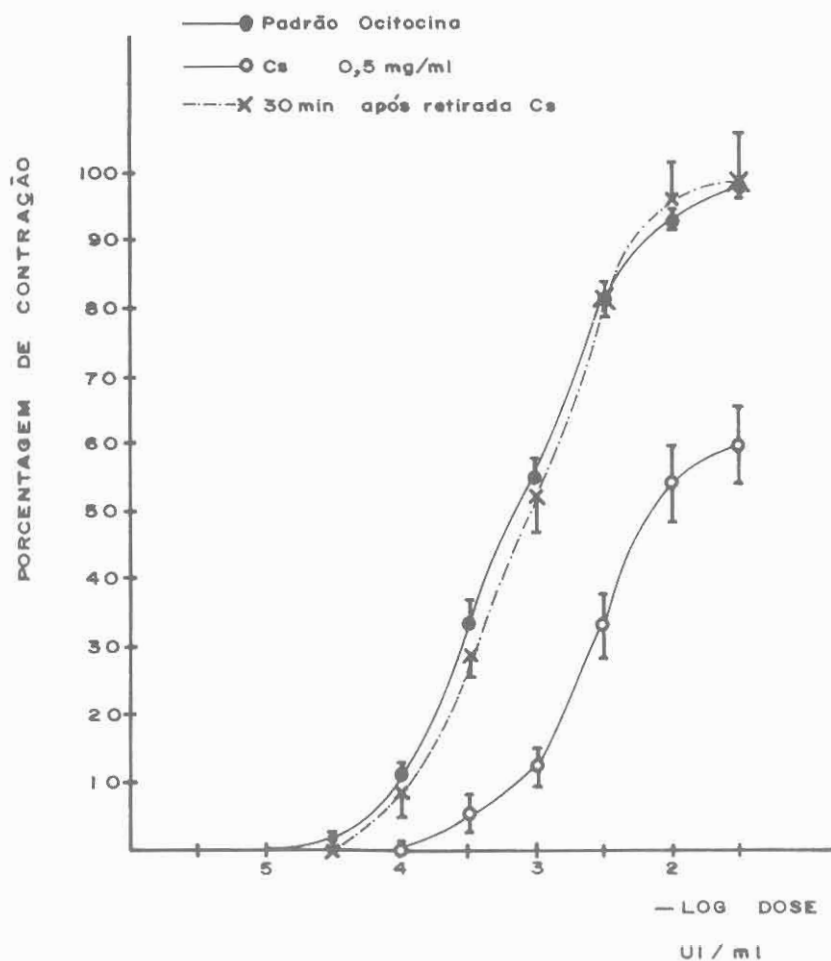


FIG. 4 - "Curva dose-resposta" cumulativa do útero à ocitocina, com as alterações observadas após a incubação do extrato aquoso a frio de folhas de *C. sylvestris* (Cs). O gráfico expressa médias \pm erros-padrão de 18 experiências.

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.

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 se desenvolvendo a fim de isolar e identificar as substâncias responsáveis pelas

alterações descritas. A identificação de alguns componentes já isolados (Possolo & Ferreira, 1949) facilitarã a análise biol3gica que se pretende efetuar. Entretanto, a suposta propriedade abortiva do "chã de bugre" ainda não ficou esclarecida.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a colabora3o dos professores E. Schenkel, M. Amado, C.M. Paixão Pereira, M. Perazzolo da Silva, D.N. Gonçaves, M. Coppola e M. Junges; das laboratoristas E.A. Granada, L.O. Rivera e R.M.C. Gritschke; da datil3grafa M.A. B. de Oliveira; do acad3mico M. Sobral e do Sr. C. Cabanellos.

SUMMARY

The "chã de bugre", *Casearia sylvestris* Swartz has been popularly used for several purposes. More recently, abortive characteristics have been attributed to it. This possibility has prompted us to evaluate the toxicity of its crude natural products and their "in vitro" effects on uterine motility. The median lethal dose of the aqueous extract from *C. sylvestris* leaves is 1792g/kg, in albino mice. With the aqueous solution of the ethanol extract we have observed "in vitro" on rat uterine spontaneous motility; increase of frequency of contraction, elevation of resting tone and decrease in the amplitude of contraction. This solution of ethanol extract has reduced the maximum response and increased the median effective dose (ED50) to oxytocin. The aqueous mecerated solution, a kind of galenical preparation, has increased all the parameters observed on uterine spontaneous motility; it has also affected the cumulative dose-response of oxytocin by increasing the maximum response and decreasing the ED50. These results suggest that extracts from leaves of *C. sylvestris* are able to modify, "in vitro", uterine activity. These data are in agrument with the popular use of this plant as abortive, in our country.

Referências bibliogrãficas

- Balbachas, A. - 1959. *As plantas curam*, 8 ed. Ed. Missionãria, São Paulo. 229p.
- Cãmara, S.A. - 1967. *Manual de farmacologia prãtica*, Ed. Atheneu, São Paulo. p.123-127.
- Carlini, E.L.A. - 1973. *Farmacologia prãtica sem aparelhagem*, Ed. Sarvier, São Paulo. p. 16-23.
- Duarte, D.F.; Auc3lio, J.C.; Calixto, J.B. - 1979. Estudo "in vitro" das a3o3es da ketamina em 3teros grãvidos de vãrias esp3cies animais. *R. bras. anesthesiol.*, 6:599-616.
- Gordon-Wright, A.P. & Elder, M.G. - 1980. Effect of prostaglandin E₂ and its metabolites on lower segment myometrium in vitro. *Europ. J. obstet. gynecol. and reprod.*

biol., 10/5:297-302.

Moar, W.S. & Hickman Jr., C.P. - 1978. **Fisiologia general y comparada**. Ediciones Omega, Barcelona. p. 243-254.

Possolo, H. & Ferreira, C. - 1949. Saponinas e outros compostos interessantes na família das flacourtiaceae. **An. Fac. Farm. Odontol. USP.**, 7:377-385.

Rocha e Silva, M. - 1973. **Fundamentos da farmacologia e suas aplicações à terapêutica**, 3 ed. Edart, São Paulo, 1:60-89.

Scavone, O.; Grecchi, R.; Panizza, S. e Souza; 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.

Scheffler, W.C. - 1969. **Statistics for the biological sciences**. Reading, Addison-Wesley. p. 40-47.

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.