

Efeito da administração do extrato do Croton cajucara Benth em ratos normais

GRAZIELLA RAMOS RODRIGUES¹
SOLANGE MARIA DOVAL FONSECA²
SILVIA BONA³
MARILENE PORAWSKI⁴
NORMA ANAIR POSSA MARRONI⁵

RESUMO

Avaliamos o efeito da administração do extrato aquoso (EA) do Croton cajucara Benth (CcB) sobre os níveis plasmáticos de glicose, triglicerídios (TG) e colesterol, assim como as enzimas séricas marcadoras de função hepática, a lipoperoxidação e a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). Foram utilizados ratos machos Wistar (300g) divididos em 4 grupos (n=5): CO 7D- controle, 1,5 mL de água (i.g) por 7 dias; CcB- 1,5 mL (i.g) de extrato aquoso (EA) por 7 dias; CO 14D- controle 1,5 mL i.g de água por 14 dias e CcB 14D- 1,5 mL i.g. do EA por 14 dias. Os animais foram anestesiados e foi coletado sangue do plexo retro-orbital para dosagem de glicemia, triglicerídeos e colesterol e análises das enzimas séricas (AST, ALT, FA, A e dGT). Após, os animais foram sacrificados, os fígados foram retirados e homogeneizados para avaliação da LPO e da atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD. A análise estatística foi realizada através do teste “t” de Student sendo significativo $p < 0,05$. Os dados obtidos sugerem que o uso de EA de CcB em animais normais, durante os períodos estudados, não altera a glicemia, triglicerídeos, colesterol, enzimas séricas e não apresenta atividade pró-oxidante.

¹ Acadêmica do Curso de Biologia/ULBRA – Bolsista PIBIC/CNPQ

² Bióloga

³ Acadêmica do Curso de Biologia/ULBRA – Bolsista PROICT/ULBRA

⁴ Professora do Curso de Fisioterapia e do PPG Diagnóstico Genético e Molecular /ULBRA

⁵ Professora - Orientadora do Curso Medicina e do PPG Diagnóstico Genético e Molecular/ULBRA (nmarroni@terra.com.br)

Palavras-chave: Croton cajucara Benth, estresse oxidativo, enzimas antioxidantes.

ABSTRACT

We evaluated the effect of the administration of the aqueous extract (EA) of the Croton cajucara Benth (CcB) on the plasmatic levels of glucose, triglycerides (TG) and cholesterol, as well as the seric, the lipid peroxidation (LPO) and activities of the antioxidant enzymes catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) catalase in normal rats. As male rats Wistar (300g) were used and divided into 4 groups (n=5): CO 7D - control, received 1,5 mL of water distilled intragastrically (i.g) during 7 days; CcB - received 1,5 mL (i.g) of the aqueous extract (EA - extract of the leaves 1g/20mL) during 7 days; CO 14D - control, received 1,5 mL i.g of water distilled by 14 days and CcB 14D - received 1,5 mL i.g. do EA during 14 days. The animals were anesthetized and blood was collected from the retro-orbital plexus for glycemia dosage. triglycerides and cholesterol and analyses of the seric enzymes (AST, ALT, FA, A and äGT). Afterwards, the animals were sacrificed, the liver isoleted and homogenized for LPO evaluatin and activities of the antioxidant enzymes. Statistical analysis was done using the Student "t" test with a significance $p < 0,05$. Our date suggest that the uses of EA of CcB in normal animals, during the studied periods, does not alter glycemia, triglycerides, cholesterol, seric enzymes s and does not show present pro oxidant activity.

Key words: Croton cajucara Benth, oxidative stress, antioxidant enzymes.

INTRODUÇÃO

A espécie *Croton cajucara* Benth, pertence a família Euphorbiaceae, é uma planta arbustiva de casca purulenta com folhas alterna, lanceoladas e olentes. É encontrada freqüentemente na região Norte do Brasil. Na Amazônia é popularmente conhecida como Sacaca e representa um recurso medicinal de grande importância no tratamento de várias doenças. (VAN DEN BERG, 1982; DI STASI et al., 1989).

No estado do Pará as folhas e as cascas do caule dessa planta são utilizadas pela população na forma de chá, para o tratamento da diabetes, diarreia, malária, febre, distúrbios gastrointestinais, renais e hepáticos e no controle de níveis elevados de colesterol (LUNA COS-

TA et al., 1999; MACIEL, PINTO, VIEGA, 2001; HIRUMA-LIMA et al., 2000).

Estudos mostram que várias doenças têm sido freqüentemente associadas com danos oxidativos, o que está diretamente envolvido na formação de espécies ativas de oxigênio (EAO) e outros radicais livres que podem ser produzidos por fontes exógenas ou endógenas. Uma forma adequada de combater esta situação é o uso de substancias antioxidantes.

Em organismos aeróbios, a produção normal de EAO é balanceada pela atividade das defesas antioxidantes endógenas. Quando esse balanço é rompido em favor dos agentes oxidantes, diz-se que a célula ou organismo encontra-se sob estresse oxidativo. Essa condição pode levar o organismo a desenvolver respostas adaptativas

ou provocar danos como lipoperoxidação das membranas celulares, degradação de proteínas e lesão ao DNA (SALO et al., 1991).

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, presentes em concentrações relativamente baixas, inibem significativamente a taxa de oxidação sobre locais alvos. Como antioxidantes não enzimáticos existem as vitaminas A e E, o ácido ascórbico, o ácido úrico, a glutatona, a melatonina, certos flavonóides, entre outros. Dentre os antioxidante enzimáticos responsáveis pela detoxificação das EAO podemos citar a catalase, a superóxido dismutase e a glutatona peroxidase (HALLIWEL, GUTTERIDGE, 1989).

Os extratos de plantas, praticamente todas as que contêm bioflavonóides apresentam uma significativa ação antioxidante, capaz de diminuir os efeitos nocivos gerados pelos radicais livres e, conseqüentemente, o surgimento das doenças associadas a eles.

A Sacaca também é comercializada em farmácias de manipulação e neste caso o pó das cascas do caule é vendido em cápsulas. Já as folhas são comercializadas livremente, para distúrbios do fígado e auxílio na digestão de alimentos gordurosos. O pó das folhas é vendido também em farmácias de manipulação, com indicação hepatoprotetora e, para dietas de emagrecimento, em alguns casos o pó é misturado com pó do boldo do Chile.

O uso freqüente dessa planta pela população do Norte do país foi um importante incentivo para os estudos da Sacaca, visando comprovar se os efeitos do uso prolongado da mesma estão relacionados com os casos de hepatite tóxica ocorridos em Belém. (MACIEL, 1997; MACIEL et al., 1998).

Inúmeros casos de hepatite tóxica foram notificados em hospitais públicos da região Amazônica devido ao uso prolongado dessa planta (MACIEL, PINTO, VIEGA, 2001). A disseminação de uso tem chegado a lugares distantes do país, como em nosso estado, na cidade de Caxias do Sul.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da administração do extrato aquoso (EA) do *Croton cajucara* em ratos normais sobre os níveis plasmáticos de glicose, triglicerídios e colesterol, determinar os níveis séricos das enzimas: ALT, AST, A, FA e dGT e avaliar o estresse oxidativo através das medidas de LPO e a atividade das enzimas antioxidantes: CAT e SOD.

MATERIAL E MÉTODOS

Procedimento experimental

Os animais eram provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS. Durante o experimento os animais foram mantidos no Biotério de Farmacologia, em caixas plásticas de 47x34x18cm forradas com maravalha, em ciclo de 12 horas claro/escuro e temperatura entre 20 e 25°C. Água e a ração foram administradas *ad libitum*.

Foram utilizados ratos machos Wistar (300g). Esses animais foram divididos em 4 grupos, cada grupo contendo 5 animais:

- CO 7D - controle, receberam 1,5mL de água destilada intragástrica (i.g.) durante 7 dias;
- CcB 7D- receberam 1,5 mL i.g. do EA (extrato aquoso das folhas 1g/20mL H₂O) durante 7 dias;

- CO 14D - controle receberam 1,5 mL i.g. água destilada durante 14 dias;
- CcB 14D - receberam 1,5mL i.g. do EA durante 14 dias.

A concentração do extrato aquoso de *Croton cajucara*: 1grama de folhas secas (provenientes de Santarém, Pará) em 20 mL de água destilada.

Processamento dos tecidos

Após cada período (7 e 14 dias), os animais foram anestesiados através da administração das drogas de Cloridrato de Xilazina 2% 50mg/Kg de peso corporal e Cloridrato de Cetamina 100mg/Kg de peso corporal intraperitonealmente.

Foi coletado sangue do plexo retro orbital para determinação dos níveis plasmáticos de glicose, triglicerídeos e colesterol e das enzimas séricas (ALT, AST, A, FA e dGT. Após foi realizada uma laparotomia e retirado o fígado, separado em porções e congelado em nitrogênio líquido. Os tecidos foram mantidos à -70°C para posterior análise. Para análise das provas de lipoperoxidação (TBARS e QL) e atividade da enzimas (CAT e SOD), os tecidos foram pesados e colocados em solução de tampão fosfato 20mM (KCl 140mM) na proporção de 9mL por grama de tecido. Os tecidos foram homogeneizados em ULTRATURRAX (IKA-WERK) durante 80 segundos, à temperatura de 0-2°C. Os homogeneizados foram centrifugados em centrífuga refrigerada (SORVALL® RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge), durante 10 minutos a 4000 rpm (LLESUY *et. al.*, 1985). Retirou-se o sobrenadante que foi utilizado para dosagem de proteína, determinação da lipoperoxidação e atividade das enzimas CAT e SOD.

Quantificação de proteínas

A proteína dos tecidos homogeneizados foi quantificada, segundo o método de Lowry *et. al.*, (1951). Este método utiliza como padrão uma solução de albumina bovina (SIGMA) 1mg/ml (no caso, utilizam-se volumes de 50, 100 e 150 microlitros). Coloca-se uma alíquota do homogeneizado (20 microlitros) em 0,8 ml de água destilada e 2,0 ml do reativo C. Este último preparado no momento e consistia na mistura de 50,0 ml do reativo A (NaHCO₃ 2% em NaOH 0,10N), 0,5 ml do reativo B1 (CuSO₄ 5 H₂O 1%) e 0,5 ml do reativo B2 (tartarato de sódio e potássio 2%). Após a adição do reativo C, aguarda-se 10 minutos e, após este período, coloca-se 0,2 ml de Reativo de Folin-Ciocalteu 2N (Laborclin), na concentração de 1:3 em água destilada. Após 30 min, desenvolvia cor azul. A leitura foi realizada a 625nm em espectrofotômetro (UV Vis Spectrophotometer METROLAB 1700).

Quantificação da glicemia

Para determinação da glicemia em plasma foi utilizado o teste enzimático colorimétrico descrito no Kit LABTEST. A leitura da absorbância da amostra foi realizada em espectrofotômetro a 505nm. Os valores foram expressos em miligramas por decilitro (mg/dL).

Quantificação dos triglicerídeos

Para a determinação de triglicerídeos em plasma foi utilizado o método enzimático-colorimétrico (GPO/POD), descrito no Kit CELM. Como padrão utilizou-se a solução estabilizada glicerol. A leitura da absorbância da

amostra foi realizada em espectrofotômetro a 505nm. Os valores foram expressos em miligramas por decilitro (mg/dL).

Quantificação do colesterol

Para a determinação de colesterol em plasma foi utilizado o método enzimático-colorimétrico (COE/COD/POD), descrito no Kit CELM. Como padrão utilizou-se a solução tampão Tris e Fenol. A leitura da absorvância da amostra foi realizada em espectrofotômetro a 505nm. Os valores foram expressos em miligramas por decilitro (mg/dL).

Avaliação da lipoperoxidação (LPO):

a) Método de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A técnica de TBARS foi realizada conforme o método de BUEGE & AUST, (1978). Utilizou-se solução de ácido tricloroacético 10%, o homogeneizado obtido de cada tecido de rato, ácido tiobarbitúrico 0,67% e água destilada. Essa mistura foi aquecida a 100°C, em banho-maria, durante 15 minutos e resfriada em gelo por aproximadamente 10 minutos. Após, acrescentou-se álcool n-butílico, agitando por 40 segundos em VORTEX, e centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm. Assim obteve-se um sobrenadante corado, resultante da reação de malondialdeído e outros subprodutos liberados na LPO. O sobrenadante foi retirado e colocado em cubeta de vidro para leitura a 535 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em nanomoles por miligrama de proteína (nmoles/mg prot.).

b) Determinação da quimiluminescência por hidróxido de tert-butila (QL)

O método consiste em adicionar um hidroperóxido orgânico de origem sintética (hidroperóxido de tert-butila) ao homogeneizado dos tecidos em estudo. Avalia-se a capacidade de resposta mediante a determinação de quimiluminescência (QL) produzida por amostra. Em tecidos submetidos a estresse oxidativo, o valor da QL iniciada por hidroperóxido de tert-butila (t-BOOH) é maior que o valor correspondente a esse tecido em condições fisiológicas (pré-estresse). A QL foi medida em um contador com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio (Liquid Scintillation Corenter, 1209 RACKBETA, LKB Wallar). Os homogeneizados de tecido serão colocados em vials de vidro. Para evitar a fosforescência dos vials ativada pela luz fluorescente, estes serão protegidos da luz até o momento do uso e as determinações feitas em sala escura. O ensaio será realizado num meio de reação consistindo numa solução reguladora de tampão fosfato e utilizando-se o t-BOOH 3mM. Para cálculo de QL iniciada por t-BOOH, foi considerada a emissão máxima, descontada a emissão basal (a QL do vial mais o tampão). Os resultados serão expressos em contas por segundo (cps) por mg de proteína (GONZÁLEZ-FLECHA, LLESUY, BOVERIS, 1991).

Atividade das enzimas antioxidantes:

Catalase (CAT)

A atividade da enzima catalase foi avaliada, conforme descrito por Boveris & Chance (1973), através da determinação em espectrofotômetro

da velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio (0,3 M), adicionado a amostra. Sendo a decomposição do peróxido de hidrogênio diretamente proporcional à atividade da CAT. São colocados em cubeta de quartzo o tampão fosfato 50mM com pH 7, o homogeneizado e o peróxido de hidrogênio. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 240nm e os dados expressos em pico moles por miligrama de proteína (pmoles/mg prot.).

Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima antioxidante SOD, foi avaliada segundo a técnica descrita por MIRSA & FRIDOVICH (1983) para determinação em espectrofotômetro da capacidade da SOD em inibir a reação do radical superóxido com adrenalina. Na cubeta de quartzo, coloca-se tampão glicina 50mM com pH 11, uma alíquota de homogeneizado e adrenalina. Após

agitação é realizada leitura a 480 nm em espectrofotômetro. Os dados são expressos em Unidades de SOD por miligrama de proteína (USOD/ mg prot.).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos com média + EP de n valores. A comparação entre os grupos foi realizada através do teste “t” de Student (*In Stat Program*) com $p < 0,05$ considerado significativo.

RESULTADOS

A glicemia, triglicerídeos e colesterol dos animais medida após 7 e 14 dias de tratamento com o extrato de *Croton Cajucara* não apresentou diferença significativa entre os grupos (Figura 1).

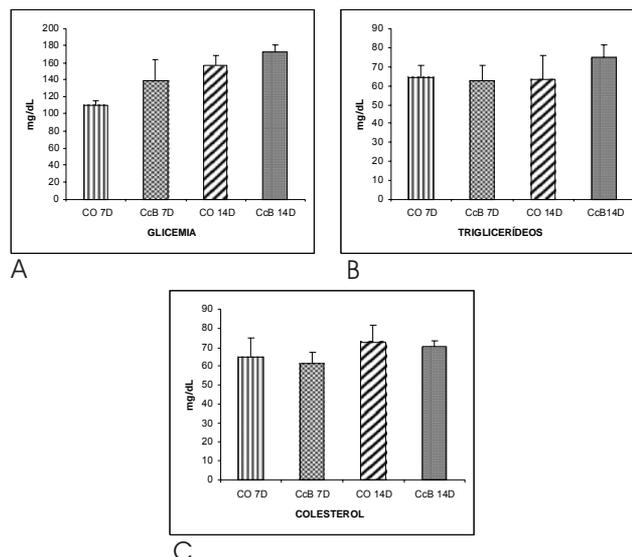


Figura 1 - Determinação dos níveis plasmáticos de glicemia (A), triglicerídeos (B) e colesterol (C).

Os valores plasmáticos das enzimas séricas ALT, AST, A, FA e dGT não apresentaram al-

terações com o uso do *Croton cajucara* Benth nos períodos estudados (Figura 2).

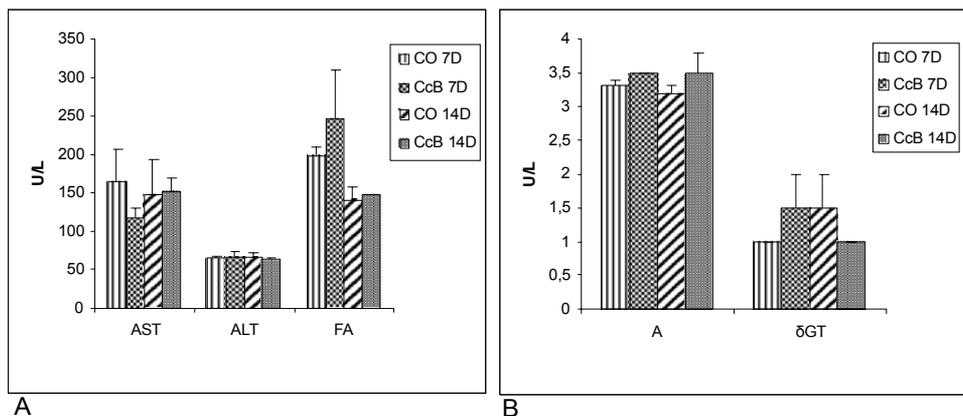


Figura 2 - Valores plasmáticos ALT, AST e FA (A), valores plasmáticos dGT e A (B).

A avaliação de dano oxidativo medido pelas técnicas de TBARS e QL indicaram que o tratamento com *Croton cajucara* não provocou al-

teração na lipoperoxidação no fígado dos ratos nos períodos estudados (Figura 3).

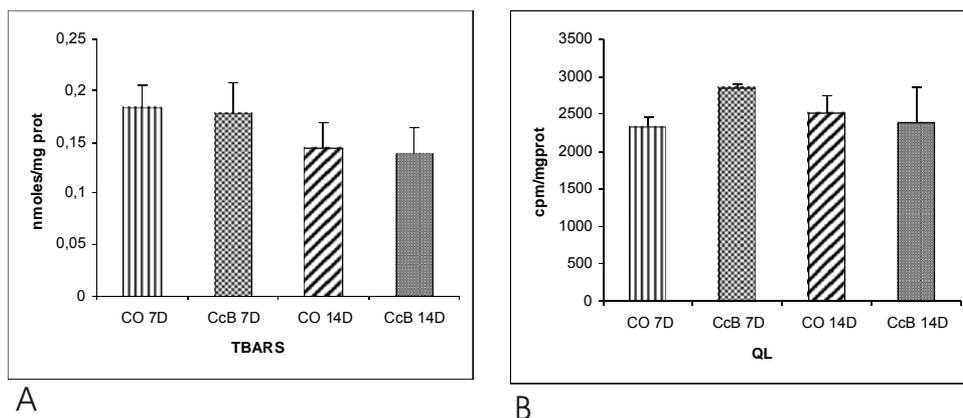


Figura 3 - Determinação dos níveis de lipoperoxidação, pelo método de TBARS (A) e QL (B).

A medida da atividade da CAT e SOD não apresentaram alterações significativas entre os

grupos (Figura 4)

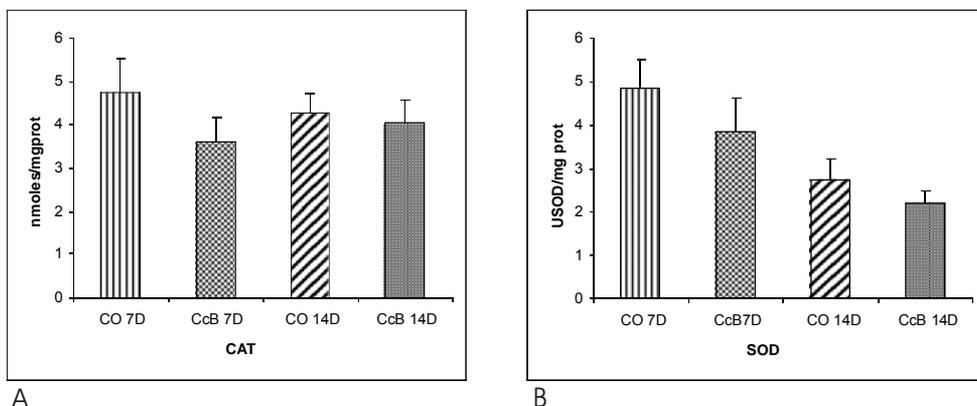


Figura 4 - Medida e desvio padrão da atividade da enzima CAT (A) e da SOD (B).

DISCUSSÃO

Alguns trabalhos experimentais têm sido realizados a fim de investigar a ação farmacológica do *Croton cajucara* Benth, pois ela vem sendo utilizada de forma aleatória, principalmente no Norte do Brasil, muitas vezes levando ao óbito por efeitos hepatotóxicos.

Inúmeros casos de hepatite tóxica foram notificados em hospitais públicos devido ao uso prolongado dessa planta (MACIEL, PINTO, VIEGA, 2001).

O *Croton cajucara* Benth, tem importância na medicina popular, sendo utilizada no tratamento do diabetes, redução do colesterol, emagrecimento, distúrbios hepáticos e doenças renais (LUNA COSTA et al., 1999; MACIEL, PINTO, VIEGA, 2001; HIRUMA-LIMA et al., 2000) e é administrada através de chá ou cápsulas feitos com as folhas ou com a casca (MACIEL, PINTO, VIEGA, 2001).

No presente trabalho a administração crônica do extrato aquoso de *C. cajucara* em ratos

normais não mostrou alterações nos níveis de glicemia, triglicerídeos e colesterol total, sugerindo que em animais normais esse extrato não interfere de forma significativa, modificando o metabolismo de carboidratos e gorduras.

Em relação à avaliação da integridade hepática, todos os animais tiveram os níveis séricos de AST, ALT, FA, A e α GT sem alteração significativa. Esses resultados indicam que o tratamento por 7 ou 14 dias com o extrato aquoso de folhas do *C. cajucara* não altera a função hepática nesse modelo estudado.

A avaliação da lipoperoxidação pode ser realizada através da medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) o qual verifica a formação de malondialdeído, que é um subproduto do processo de oxidação das membranas lipídicas celulares (BUEGE, AUST, 1978).

Outro método de verificação da lipoperoxidação de maior sensibilidade e especificidade é a quimiluminescência (QL) iniciada por hidroperóxido de tert-butil.

A avaliação da lipoperoxidação através das técnicas de TBARS e QL, em homogeneizado de fígado de ratos Co e CcB (7 e 14 dia) não mostrou alteração significativa na peroxidação lipídica pelas técnicas estudadas.

As medidas de atividades enzimáticas da SOD e CAT também não apresentaram alterações significativas entre os grupos estudados.

As enzimas antioxidantes estão distribuídas por todo o organismo e dependem do consumo de oxigênio, da taxa metabólica, da concentração de íons metálicos e da quantidade de ácidos graxos presentes, sendo a primeira linha de defesa contra ações oxidantes do organismo. Em nosso trabalho o uso do *Croton cajucara* Benth, nas doses utilizadas não interferiu no equilíbrio redox celular.

Dessa maneira, pelos resultados obtidos neste trabalho, a sacaca administrada nos período de 7 e 14 dias não ocasionou diferença significativa os parâmetros estudados.

CONCLUSÕES

Pelos dados obtidos neste trabalho podemos concluir que a administração do extrato aquoso da folha do *Croton cajucara* Benth em ratos normais por 7 e 14 dias:

- não apresentou diferença os níveis plasmático da glicemia, triglicerídeos e colesterol.
- não apresentou diferença significativa na avaliação das enzimas séricas hepáticas.
- não apresentou dano oxidativo nas mem-

branas lipídicas avaliadas por TBARS e QL.

- não apresentou alteração na atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD.

Com base nesses dados, podemos sugerir que o uso do extrato aquoso da Sacaca não apresenta atividade pró-oxidante nos períodos estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOVERIS, A.; CHANCE B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochemical Journal**, v. 134, p.707-716, 1973.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzimology**, v. 52, p. 302-309, 1978.

DI STASI, L. C. et al. **Plantas medicinais da Amazônia**. São Paulo: UNESP, 1989.

GONZALEZ-FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. **Free Radical Biology and Medicine**, v.10, p.93-100, 1991.

HALLIWEL, B.; GUTTERIDGE, J. C. M. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3th ed. Oxford Unifersity Press, 1999.

HIRUMA-LIMA, C. A. et al. Gastroprotetive effect of essentialoil fron *Croton cajucara* benth (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.69, p.229-234, 2000.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, M. J.; FARR, A. L. Protein measurement with the foline reagent. **Journal of Biology Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.

LUNA COSTA, A. M. et al. Antioestrogenic Effect of *trans*-dehydrocrotonin, a nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara* Benth in Rats. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PHARMACOLOGY. 13., 1999, Munich. **Proceedings...** Munich, 1999. p.51.

MACIEL M. A. M.; PINTO, A. C.; VIEGA, V. F. Plantas Mediciniais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, p.429-438, 2001.

MACIEL, M. A. M. **Croton cajucara**: uma escolha etnobotânica. 1997. Tese (Doutorado em Química) - Faculdade de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1997.

MACIEL, M. A. M. et al. Estudo da Variação dos Teores de Terpenóides Bioativos Isolados de *Croton cajucara* Benth, Nativos e Cultivados no Estado do Pará. **Revista da Univerdade Rural - Série Ciências Exatas e da Terra**, v.18/20, p.17-34, 1998.

MIRSA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v.247, p.3170-3175, 1972.

SALO, D. C.; DONOVAN, C. M.; DAVIES, K. J. A. HSP 70 and other possible heat shock proteins are induced in skeletal muscle, heart and liver during exercise. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 11, p.239-246, 1991.

VAN DEN BERG, M. E. **Plantas medicinais na Amazônia** – Contribuição ao seu conhecimento sistemático. Belém: Falangola, 1982.