

Reinaldo N. Takahashi; João B. Calixto; Ines M. Costa; Thereza C. M. Lima; Gina S. Morato; Mauro Nicolau; Giles A. Rae; Rosa M. R. Valle; Rosendo A. Yunes. (**)

RESUMO

Foram efetuados estudos químicos e farmacológicos dos extratos brutos hidroalcoólicos obtidos das folhas ou das raízes de *E. argentinum* ou de frações semi-purificadas desta planta. Os testes químicos revelaram a existência de alcalóides, fitosteróides, leucoantocianidinas, glicosídeos flavonóides, cumarinas e taninos. A análise farmacológica *in vivo* demonstrou que o extrato das folhas é menos tóxico que o da raiz. Tanto o extrato bruto como as frações semi-purificadas obtidas das folhas reduziram a locomoção a pressão arterial de rato e potenciaram o sono barbitúrico em camundongos. O extrato bruto, principalmente o da raiz, reduziu o edema induzido por carragenina na pata de rato. Testes *in vitro* demonstraram que o extrato bruto ou as frações semi-purificadas das folhas produziram uma ação semelhante à cocaína avaliada no canal deferente de rato. Além disso, o extrato bruto produziu relaxamento inespecífico no útero de rato e contração do íleo de cobaia. Os resultados obtidos sugerem que esta planta possui constituintes ativos dotados de distintas propriedades farmacológicas, destacando-se o efeito anti-inflamatório, além de uma ação tipo cocaína, merecendo, portanto, estudos químicos e farmacológicos complementares.

INTRODUÇÃO

O gênero *Erythroxylum* abrange cerca de 200 espécies que se encontram distribuídas nos trópicos, com predominância na América do Sul (Calixto et al., 1984). Sabe-se que algumas destas espécies contêm cocaína e alcalóides relacionados (Novak et al., 1984), entre outros constituintes, enquanto que em muitas outras, este alcalóide não tem sido identificado (Aynilian et al., 1974; Evans, 1981). O *Erythroxylum argentinum* é uma árvore pequena que predomina nos Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Popularmente é conhecida como baga do pombo, cocão, concon ou fruta de pombo e desde há muito

(*) Financiado pela CEME.

(**) Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Química.

tempo tem sido preconizada para o tratamento de várias moléstias (Hoehne, 1939). Assim esta e outras espécies deste gênero parecem apresentar efeitos farmacológicos distintos como purgativo, estimulante central e adstringente (Balbachas, 1956). O interesse do presente trabalho fundamenta-se no pouco conhecimento existente em relação aos constituintes químicos bem como efeitos farmacológicos do *Erythroxylum argentinum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do Material Botânico

O material botânico foi gentilmente coletado pelos professores Antonio Brezolin e Ademir Reis, do Departamento de Botânica da UFSC. A coleta foi realizada no interior da Ilha de Santa Catarina.

ANÁLISE QUÍMICA

Obtenção e Análise dos Extratos e das Frações Semipurificadas

Os extratos foram obtidos a partir de 200g de pó de folhas secas de *E. argentinum* por agitação contínua com etanol 96% ou água destilada, mediante refluxo durante 60 minutos. O material assim obtido foi filtrado e deixado em repouso em refrigerador durante 24 horas. Após nova filtração os extratos etanólico e aquoso foram misturados e concentrados em rotavapor até uma concentração de cerca de 15% do material vegetal. O extrato da raiz foi preparado utilizando o mesmo procedimento.

A fração alcaloídica do *E. argentinum* foi obtida segundo a metodologia descrita por Turner et al. (1981) e cujo esquema encontra-se na Fig. 1. A análise dos alcalóides foi efetuada através de cromatografia de camada delgada em placa de sílica gel G-60 (Merck), empregando-se clorofórmio-metanol (1:1 v/v) como solvente. Com o objetivo de detectar a presença de cocaína no extrato, o mesmo foi analisado em cromatografia gasosa. A coluna foi empacotada com 3% de OV-K7 como fase estacionária, e como suporte foi utilizado chromosorb W-AW-DMCS (80-100 mesh). Usou-se o nitrogênio como gás de arraste com um fluxo de 30 ml/min. As temperaturas da coluna, do detector e do injetor foram de 200, 300 e 295°C, respectivamente.

AÇÕES FARMACOLÓGICAS "IN VIVO"

Determinação da dose letal 50% (DL₅₀)

Dez camundongos (20-30 g) foram injetados intraperitonealmente (i.p.) com cada dose de extrato obtido da raiz (300, 400, 500, 600 mg/kg) ou das folhas do *E. argentinum* (2100, 2200, 2300 e 2400 mg/kg). As observações dos percentuais de morte foram efetuadas até 24 horas após a administração do extrato.

Movimentação Espontânea

Grupos de 12 camundongos receberam por via i.p. o seguinte tratamento: solução controle (NaCl 0,9%), extrato bruto hidroalcoólico de raiz (60 e 120 mg/kg) ou das folhas (20, 50, 100, 230 e 460 mg/kg) de *E. argentinum*, totalizando 84 animais. Imediatamente após a injeção, os animais foram colocados individualmente em caixas de movimentação.

ção para medida de sua atividade geral. Este índice foi registrado a cada 15min, durante 1 hora. Posteriormente, grupos adicionais de camundongos foram pré-tratados i.p. com as frações semi-purificadas do extrato nas doses de 3, 10 e 20 mg/kg e testados de maneira análoga à descrita anteriormente.

Potenciação do sono barbitúrico

Foram utilizados 30 camundongos subdivididos em 3 grupos de 10 animais cada: grupo controle e grupo experimental pré-tratado com extrato bruto de folhas desta planta (100 ou 200 mg/kg, i.p.). Trinta minutos após o pré-tratamento, os animais receberam pentobarbital sódico, 50 mg/kg, i.p. e registrou-se a duração do tempo de sono de cada animal.

Efeito Analgésico

Vinte camundongos machos foram subdivididos em 4 grupos de 5 animais cada: grupo controle e grupos injetados com extrato obtido das folhas de *E. argentinum* 30, 100 e 300 mg/kg, respectivamente. O efeito analgésico foi avaliado através do método da "placa quente", onde foi medido o tempo de reação do animal ao estímulo térmico nas patas. A reatividade térmica foi avaliada a intervalos de 20 min. durante 1 hora.

Efeito sobre o limiar convulsivo

Foram utilizados 48 ratos machos. Cada animal foi tratado com solução controle ou com uma dose de extrato obtido das folhas desta planta (30, 100 e 200mg/kg, i.p.). De corridos trinta minutos, todos os animais foram injetados com pentileno-tetrazol (70mg/kg i.p.) e em seguida individualmente colocados em caixas de observação (15 x 27 x 18 cm) para o registro da presença ou não de convulsões, durante 20 minutos. Na ocorrência de convulsões, mediu-se a latência em segundos para o aparecimento das mesmas.

Pressão arterial de rato

Ratos machos pesando entre 250-350g, foram anestesiados com a associação de uretana 20% e nembutal 1% (0,4 mg/kg) i.p., e canuladas a artéria carótida externa e a veia femoral.

O registro da pressão arterial e da frequência cardíaca foi feito simultaneamente num polígrafo, antes e durante pico do efeito máximo dos extratos brutos (0,1; 1; 10; 30 e 100 mg/kg, i.v.) ou das frações semi-purificadas (0,1; 0,3; 1, 3 e 10 mg/kg, i.v.). Foi construída uma curva dose-resposta completa com cada animal, obedecendo a um intervalo mínimo de 10 min. entre cada administração.

Atividade antiédematogênica

Utilizando procedimento experimental descrito em estudo anterior (Calixto et al. 1984), registrou-se através do método pletismográfico o volume das patas de ratos machos (180 - 250 g). Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais: a) controle, somente com a injeção intraplantar de carragenina (100 µg); b) pré-tratados com indometacina 2 mg/kg (i.p.) 30 min. antes da injeção intraplantar de carragenina ou c) pré-tratados com o extrato bruto obtido da raiz, (112 mg/kg); d) pré-tratados com o extrato bruto obtido das folhas de *E. argentinum* (225 mg/kg). Foram efetuadas várias medidas em um período de 4 horas.

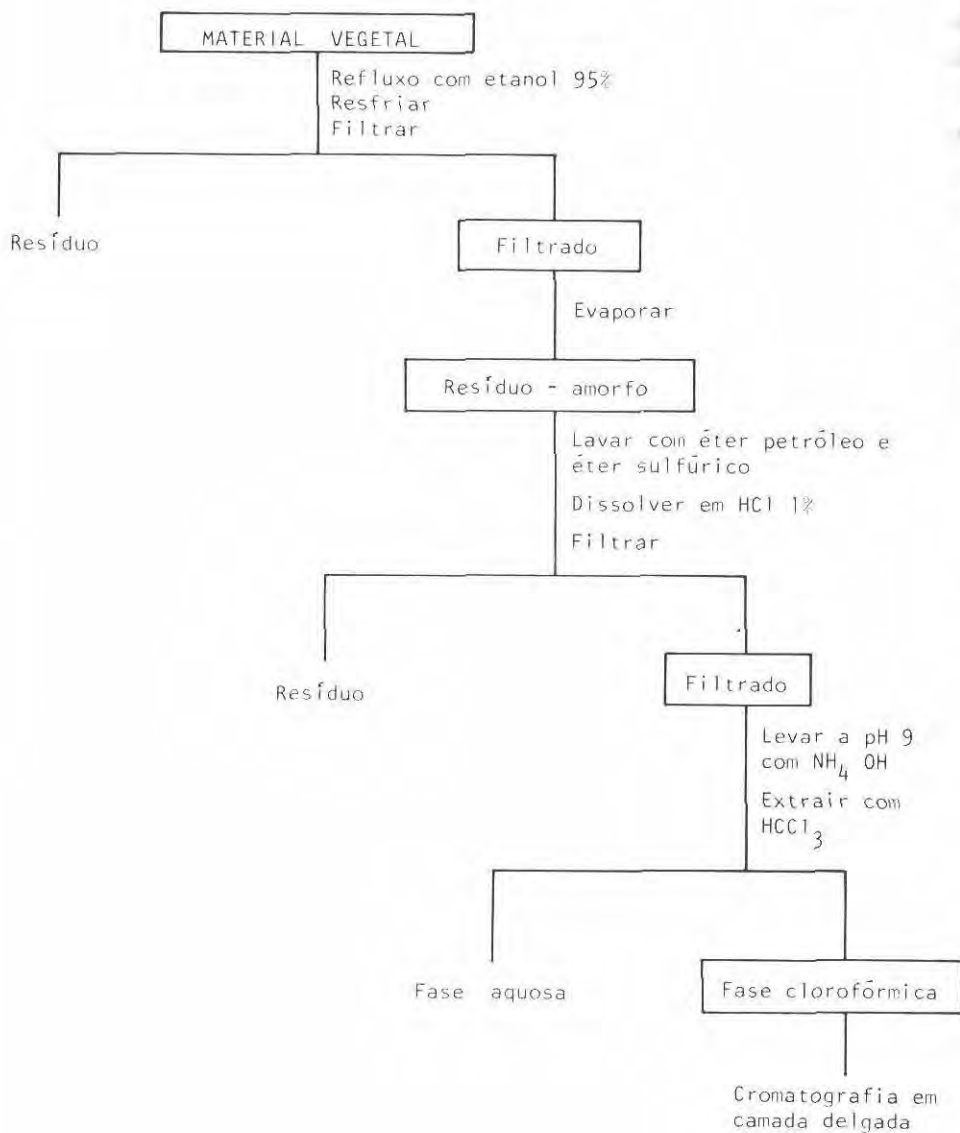


FIG. 1 - Esquema da metodologia empregada para a obtenção da fração alcaloídica das folhas do *Erythroxylum argentinum*.

AÇÕES FARMACOLÓGICAS "IN VITRO"

Íleo de cobaia

Segmentos de 1,5 a 2,0 cm de íleo de cobaia, obtidos da porção situada entre 30 e 10 cm próximos à junção íleo-cecal foram colocados em cubas de vidro contendo 10 ml de solução de Tyrode a 37°C, borbulhada com ar, e submetidos a uma carga basal de 1,0 g. Após 30 min. foram construídas três curvas cumulativas na seguinte seqüência: acetilcolina ou histamina e extrato bruto hidroalcoólico obtido das folhas de *E. argentinum*, na ausência e na presença de atropina (0,25 µ/ml) ou benadril (0,25 ou 0,5 µg/ml). Registrou-se as contrações isotônicas em quimógrafo. Em outros experimentos, depois de selecionada a DE₈₀ para a acetilcolina, histamina ou ao extrato bruto, a preparação foi exposta a uma dessas substâncias, previamente incubadas com 1 ml de plasma humano, a 37°C por 15 min.

Útero de rata

Foram utilizadas ratas (180-250 g) pré-tratadas 24 horas antes dos experimentos com benzoato de estradiol (0,5 mg/kg). Fragmentos do útero (1,5 cm) foram montados em 10 ml de solução nutriente de Jalon borbulhada com ar a 30°C. Inicialmente doses do extrato bruto das folhas foram adicionadas cumulativamente para testar seu efeito no tônus da preparação. Numa segunda etapa, após a construção de 2 curvas controles para acetilcolina ou ocitocina, o extrato bruto foi incubado durante 20 minutos em doses crescentes na preparação (0,25-2,0 mg/ml) e novas curvas dose-efeito a esses agonistas foram então realizadas na sua presença.

Canal deferente de rato

As preparações foram montadas segundo técnica já descrita (Calixto *et al.*, 1984). As contrações isotônicas foram registradas em quimógrafo sob uma carga basal de 1g. Após a construção de 2-3 curvas dose-efeito cumulativas à acetilcolina ou à noradrenalina, o extrato bruto obtido das folhas *E. argentinum* foi incubado em doses variáveis (0,1 - 1 mg/ml) durante 20 min. e novas curvas dose-efeito aos agonistas foram obtidas na sua presença. A sensibilidade da preparação aos agonistas foi avaliada através da determinação dos valores de pD₂. Um procedimento análogo foi conduzido para avaliar os efeitos da fração alcaloídica (40-120 µg/ml), dissolvida em propileno glicol (25%), nesta preparação.

Retó abdominal de sapo

Fragmentos de cerca de 2 x 0,4 cm de reto abdominal foram montados para registro de contrações isotônicas em 10 ml de solução de Ringer borbulhada com ar à temperatura ambiente, sob uma carga basal de 1 g. Após 30-40 minutos, foi construída uma curva cumulativa à acetilcolina e posteriormente diversas concentrações do extrato bruto das folhas de *E. argentinum* (0,5-2,0 mg/ml) foram incubadas nas preparações durante 20 minutos e novas curvas foram obtidas ao agonista na presença do extrato, a intervalos de 60 minutos.

Átrio esquerdo de rato

Esta preparação foi montada em 10 ml de solução de Tyrode a 37°C, borbulhada com

95%O₂ - 5%CO₂, sob tensão basal de 1g. As contrações isométricas, produzidas por estimulação elétrica, foram registradas num polígrafo. Os parâmetros de estimulação utilizados foram: pulsos quadrados de 2 msec de duração, freqüência de 2 a 3 Hz e voltagem 50% acima do limiar. Após 30 minutos do início da estimulação, o átrio foi exposto a doses crescentes cumulativas do extrato bruto obtido das folhas até a dose final de 1mg/ml.

DROGAS

As doses das drogas relacionadas a seguir foram determinadas e preparadas em termos de sais e quando não indicadas no texto, foram diluídas em solução salina 0,9%.

Acetilcolina, noradrenalina, atropina, indometacina, uretana pentilenotetrazol, histamina, neostigmina e atropina (Sigma), cocaína (Merck), carragenina (Viscarin, Marine Colloids), benadryl (Parke-Davis), ocitocina (Syntocinon, Sandoz), pentobarbital (Abbott).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Quando apropriado os resultados obtidos foram analisados através do teste "t" de Student para amostras não relacionadas. As diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando o índice de probabilidade foi menor que 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Análise Química

Tanto os extratos brutos obtidos das folhas quanto das raízes do *E. argentinum* apresentaram basicamente os mesmos constituintes: alcalóides, taninos, cumarinas, fenóis leucoantocianidinas e glicosídeos flavonóides.

Por outro lado, conforme indicado na Tabela 1, a análise química da fração alcaloídica do extrato de folhas, evidenciou a presença de 6 substâncias. O valor de RF para a cocaína (0,60) indica que possivelmente os alcalóides presentes possuem características químicas diferentes. Além disso, não foi possível detectar a presença de cocaína através de testes em cromatografia gasosa.

Tabela 1. Cromatografia de camada delgada para alcalóides do *E. argentinum*

MANCHA	RF
1	0,028
2	0,057
3	0,257
4	0,343
5	0,63
6	0,80
COCAÍNA	0,60

AÇÕES FARMACOLÓGICAS "IN VIVO"

Determinação da DL₅₀

A avaliação da toxicidade aguda (24 hs) do extrato bruto obtido da raiz do *E. argentinum* em camundongos indicou uma equação de reta de regressão $Y = 1,9981 + 7,6496X$, fornecendo uma DL₅₀ de 293,7 mg/kg (i.p.). Foi observado que doses acima de 200mg/kg provocaram uma intensa sedação, enquanto que doses acima de 500 mg/kg causavam mortes em cerca de 30 min.

Com relação ao extrato bruto obtido das folhas, a equação obtida foi $Y = 1,784 + 0,9226X$, fornecendo uma DL₅₀ de 2285,5 mg/kg. As mortes observadas nas doses acima de 2200 mg/kg ocorreram em 10 min. e eram geralmente precedidas de convulsões.

Movimentação espontânea

O extrato bruto obtido de *E. argentinum* nas doses de 230 e 460 mg/kg reduziram significativamente a movimentação dos camundongos. Entretanto, o efeito não se correlacionou com a dose empregada (Fig. 1B). Doses menores do extrato obtido das folhas (20, 50 e 100 mg/kg) não produziram diminuição significativa na movimentação. A administração do extrato da raiz nas doses de 60 e 120 mg/kg também causou uma redução na atividade motora dos camundongos. Entretanto este efeito também não foi dose-dependente (Fig. 1A). Por outro lado, a fração alcaloídica (3 mg/kg) produziu aumento estatisticamente significativo na movimentação espontânea (Fig. 1C). Porém as doses de 10 e 30 mg/kg da mesma fração não alteraram significativamente a atividade locomotora dos camundongos.

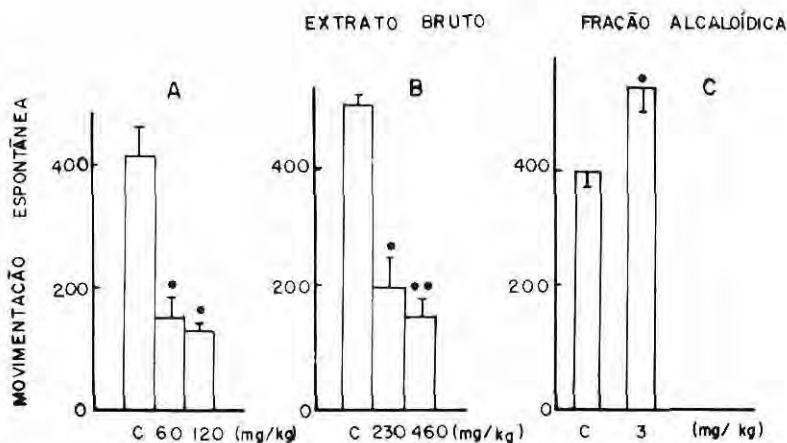


FIG. 1. Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (A e B) ou da fração alcaloídica (C) obtidos das folhas do *E. argentinum* sobre a movimentação espontânea em camundongos durante 1 hora. As linhas verticais sobre as barras representam os erros-padrão das médias de 12 animais.

Potenciação do sono barbitúrico

Na Fig. 2 observa-se que o pré-tratamento com as doses de 100 e 200 mg/kg do extrato bruto das folhas potenciou significativamente o tempo de sono induzido pelo barbitúrico em camundongos.

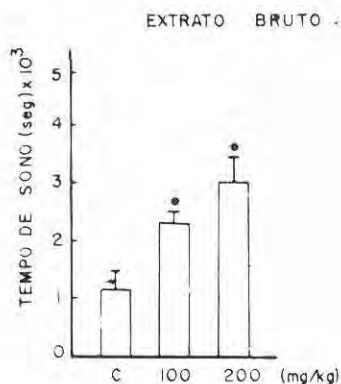


FIG. 2. Efeito do extrato bruto hidroalcoólico obtido das folhas do *E. argentinum* sobre a potenciação do sono barbitúrico. As linhas verticais sobre as barras representam os erros padrão das médias de 10 animais

Efeito analgésico

Os camundongos injetados com o extrato bruto das folhas de *E. argentinum* nas 3 doses testadas não apresentaram um tempo de reatividade térmica estatisticamente diferente em relação aos animais do grupo controle, indicando ausência de efeito analgésico.

Efeito sobre o limiar convulsivo

Não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais e controle no que diz respeito aos efeitos do *E. argentinum* sobre o limiar convulsivo.

Os animais pré-tratados com doses menores de extrato bruto das folhas (30 e 100 mg/kg) mostraram apenas uma tendência em aumentar a latência para o início das convulsões induzidas pela pentilenotetrazol 70 mg/kg.

Pressão arterial de rato

A administração intravenosa tanto de doses crescentes do extrato bruto obtido das folhas, ou da fração alcaloídica (0,1-10 mg/kg), produziram no rato anestesiado uma diminuição dose-dependente da pressão arterial e da frequência (Fig. 3). O pré-tratamento com atropina (1 mg/kg) aboliu totalmente o efeito hipotensor e bradicárdico induzido pela fração alcaloídica, enquanto que a administração de um anticolinesterásico potenciou o efeito hipotensor do *E. argentinum*.

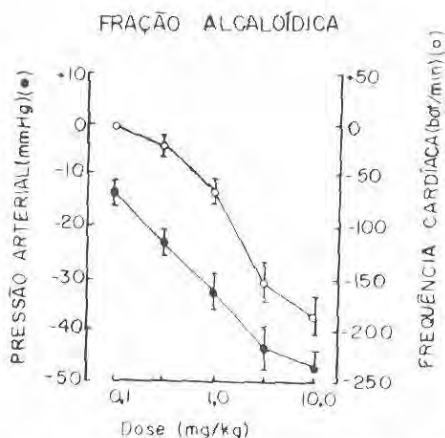


FIG. 3. Efeito da fração alcaloídica obtida das folhas do *E. argentinum* sobre a pressão arterial de rato anestesiado. Cada ponto representa a média de 3 experimentos e as barras verticais os erros padrão.

Atividade anti edematogênica

Conforme ilustra a Figura 4, tanto a administração intraperitoneal como a oral do extrato bruto obtido das folhas do *E. argentinum*, reduziram significativamente o edema induzido na pata de rato pela injeção de carragenina. Porém, o extrato obtido da raiz apresentou atividade anti edematogênica significativa somente quando administrado por via intraperitoneal. Entretanto, tanto o extrato bruto da raiz como das folhas apresentaram atividade anti edematogênica maior do que aquela obtida pela indometacina (2 mg/kg, i.p.) da ordem de 92%, 90% e 67% respectivamente, no último intervalo de tempo estudado (Fig. 4).

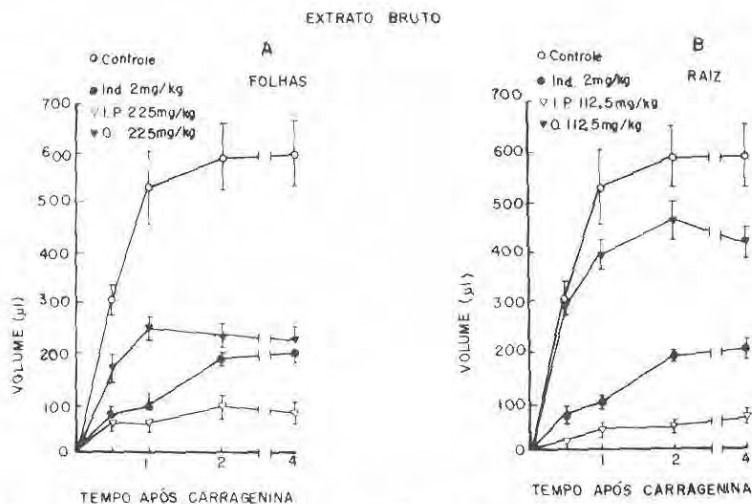


FIG. 4. Efeito do extrato bruto hidroalcoólico obtido das folhas (A) ou da raiz (B) do *E. argentinum* sobre o edema induzido pela carragenina na pata do rato. Abscissas: tempo em horas. Cada ponto representa a média de 6 experimentos e as barras verticais os erros padrão.

AÇÕES FARMACOLÓGICAS "IN VITRO"

Íleo de cobaio

No íleo de cobaio, o extrato bruto obtido das folhas do *E. argentinum*, promoveu contração de forma concentração-dependente atingindo contração máxima ligeiramente superior a observada para acetilcolina. Porém, o extrato foi cerca de 1.000 vezes menos potente. A incubação de atropina 0,25 µg/ml antagonizou totalmente o efeito do extrato.

Visando obter informações adicionais quanto ao provável princípio responsável pelo efeito contrátil no íleo de cobaio, o extrato bruto foi previamente incubado com plasma humano. Os traçados gráficos representados na Fig. 5, indicam que a exemplo do que ocorre com a acetilcolina, a incubação prévia do extrato com plasma humano praticamente aboliu o efeito contrátil.

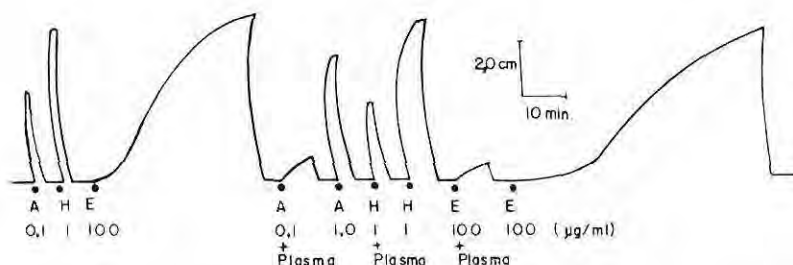


FIG. 5. Traçado gráfico representativo obtido para a acetilcolina (A), histamina (H) ou para o extrato das folhas do *E. argentinum* (E), na ausência ou na presença de plasma humano.

Útero de rata

Ao contrário do que foi observado para o canal deferente de rato, o extrato bruto obtido das folhas de *E. argentinum* não produziu qualquer resposta contrátil no útero de rata, propiciando apenas o aparecimento de automatismo. A incubação do extrato (0,25 a 2 mg/ml) produziu redução concentração-dependente da resposta máxima à acetilcolina e à ocitocina, sendo que o extrato foi ligeiramente mais potente em inibir a ocitocina. A inibição foi facilmente revertida pela lavagem da preparação (30-60 min.).

Canal deferente de rato

A administração de doses cumulativas do extrato bruto das folhas de *E. argentinum* (0,01 e 30 mg/ml), determinou pequeno efeito contrátil nesta preparação (10-15% da resposta máxima à noradrenalina), além de ter propiciado o aparecimento de contrações espontâneas. Porém, esse efeito desaparecia gradativamente após construção de curvas concentração-resposta sucessivas ao extrato. Resultados similares foram também obtidos para a cocaína nesta preparação.

Quando o extrato bruto foi incubado previamente durante 20 minutos (1 mg/ml), observou-se deslocamento paralelo e significativo a esquerda na curva concentração-efeito à noradrenalina (cerca de 20 vezes), causando apenas pequena redução da resposta máxima

ao agonista (Fig. 6A e Tab. 2). Em relação ao efeito contrátil produzido à acetilcolina, o extrato bruto obtido das folhas do *E. argentinum* (0,5 e 1,0 mg/ml) produziu deslocamento à esquerda na curva concentração-resposta (2,8 e 4,3 vezes respectivamente); entretanto, observou-se acentuada redução da resposta máxima (19 e 26% respectivamente). Nas mesmas condições experimentais, a cocaína (3,2 µg/ml) produziu maior deslocamento à esquerda sobre a curva dose-resposta à acetilcolina (cerca de 11 vezes), além de ter determinado aumento de cerca de 50% sobre a resposta máxima. No entanto, o extrato obtido das raízes desta planta (0,5 e 1,0 mg/ml) produziu redução da resposta máxima à noradrenalina e à acetilcolina, não induzindo o aparecimento de contrações espontâneas (automatismo) e nem produzindo potenciação da resposta contrátil a esses agonistas.

A exemplo do ocorrido para o extrato bruto, a administração de concentrações crescentes da fração alcaloídica do extrato das folhas, dissolvida em propileno-glicol a 25% também induziu um pequeno efeito contrátil no canal deferente de rato, além de ter facilitado o aparecimento das contrações espontâneas. Quando a fração alcaloídica (40 µg/ml) permaneceu durante 20 minutos em contato com a preparação, observou-se novamente deslocamento paralelo e significativo à esquerda na curva concentração-resposta à noradrenalina (cerca de 5 vezes) sem causar contudo, variação no efeito máximo (Fig. 6B e Tab.2). No entanto, concentrações maiores dessa fração (80 e 160 µg/ml) não causaram deslocamento da curva concentração-resposta à noradrenalina, além da última concentração ter causado redução significativa da resposta máxima ao agonista.

Resultados semelhantes foram também obtidos quando a cocaína (0,32 ou 3,2 µg/ml) foi incubada na preparação (Fig. 6C e Tab. 2), evidenciando uma potenciação de cerca de 11 e 50 vezes sobre a resposta contrátil à noradrenalina respectivamente.

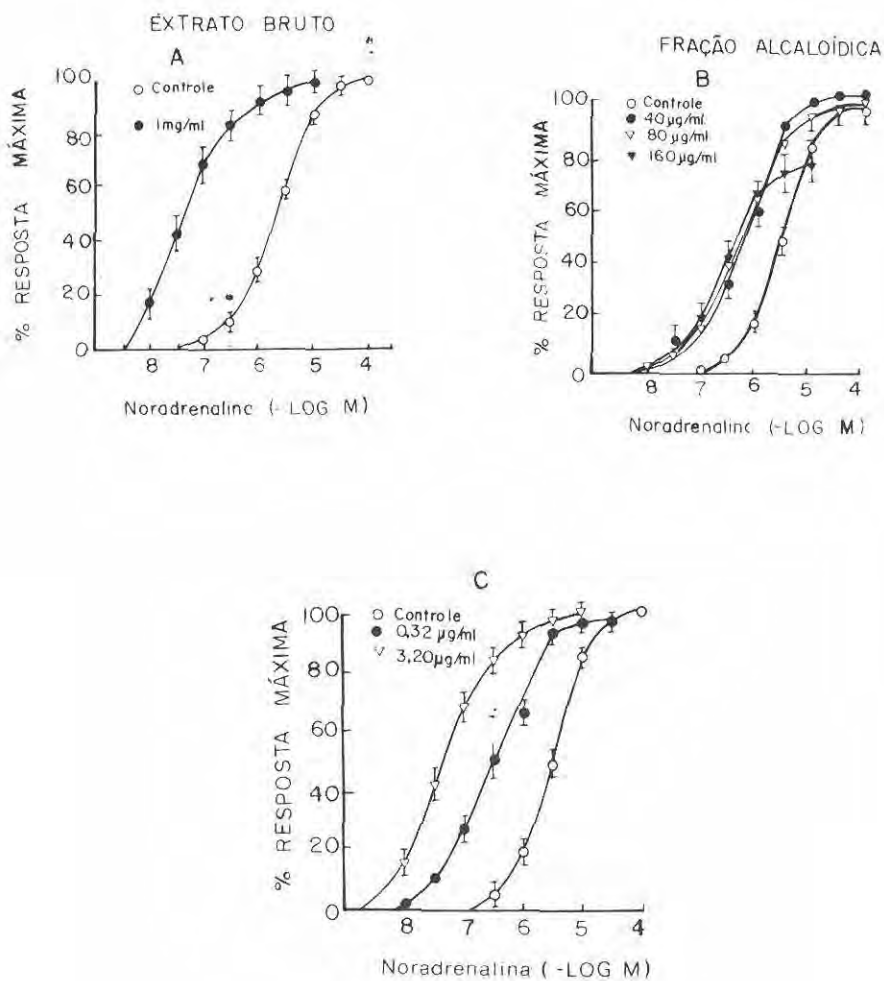


FIG. 6 - Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (A), da fração alcaloídica das folhas do *E. argentinum* (B) ou da cocaína (C), sobre a curva dose-resposta média à noradrenalina no canal deferente isolado de rato. Cada ponto representa a média de 8-12 experimentos e as barras verticais os erros padrão.

Tabela 2. Efeito do extrato bruto hidroalcoólico e das frações semi-purificadas das folhas do *Erythroxylum argentinum* ou da cocaína sobre as respostas contráteis à noradrenalina no canal deferente isolado de rato (média \pm erro-padrão).

	EFEITO MÁXIMO	pD_2^a	$\Delta \text{LOG } pD_2^b$	DR ^c
CONTROLE	100	5,63 \pm 0,06	-	-
<i>Erythroxylum argentinum</i> (1,0 mg/ml) (S)	88	7,08 \pm 0,13	1,45	28,1*
FRAÇÃO ALCALÓIDICA (40 μ g/ml) (12)	100	6,27 \pm 0,09	0,63	4,3*
COCAÍNA 10 ⁻⁶ M (0,32 μ g/ml) (S)	97,2	6,58 \pm 0,09	1,05	11,2*
COCAÍNA 10 ⁻⁵ M (3,2 μ g/ml) (S)	100	7,28 \pm 0,18	1,70	50,1*

a - Logarítmo negativo da concentração molar de noradrenalina que produz 50% do efeito máximo.

b - pD_2 para noradrenalina na presença de *Erythroxylum argentinum* ou de cocaína menos pD_2 controle.

c - Deslocamento à esquerda da curva dose-resposta à noradrenalina.
- Entre parenteses número de experimentos por grupo.

* - Difere significativamente ($p < 0,01$).

Com relação ao efeito contrátil produzido pela acetilcolina, a fração alcoólica (160 μ g/ml) produziu deslocamento discreto à esquerda, mas significativo (2 vezes) sem causar variação da resposta máxima.

Reto abdominal de sapo

A administração de concentrações crescentes do extrato bruto das folhas não produziu qualquer modificação no tônus da preparação. Porém, quando o mesmo foi deixado em contato com a preparação (0,5 e 2,0 mg/ml) durante 20 minutos, observou-se um deslocamento dose-dependente significativo à direita da curva dose-resposta à acetilcolina, associado a uma redução da resposta máxima à esse agonista (Fig. 7 e Tab. 3). Tanto a redução da resposta máxima, como o deslocamento na curva dose-resposta à acetilcolina foram prontamente revertidos após a lavagem da preparação.

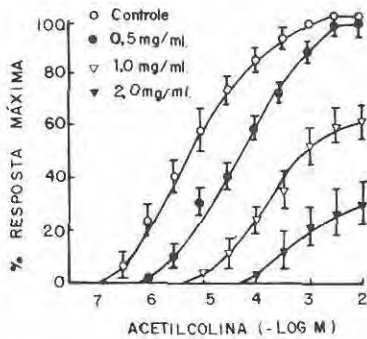


FIG. 7. Efeito do extrato bruto hidroalcoólico obtido das folhas do *E. argentinum*, sobre a curva do se-resposta média à acetilcolina no reto abdominal isolado de sapo. Cada ponto representa a média de 5 experimentos e as barras verticais os erros padrão.

Tabela 3. Efeito do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *E. argentinum* sobre as respostas contráteis à acetilcolina no músculo reto abdominal de sapo (média \pm erro-padrão).

	EFEITO MÁXIMO%	pd_2^a	$\Delta \text{LOG } pd_2^b$	DR ^c
CONTROLE (5)	100	$5,30 \pm 0,14$	-	-
<i>E. argentinum</i> (0,5 mg/ml) (5)	$98,4 \pm 2,2$	$4,55 \pm 0,09$	0,75	5,6*
<i>E. argentinum</i> (1,0 mg/ml) (5)	$60,6 \pm 7,7$	$3,69 \pm 1,61$	1,61	40,7*
<i>E. argentinum</i> (2,0 mg/ml) (5)	$29,5 \pm 10,4$	-	-	-

a - Logarítmo negativo da concentração molar de acetilcolina que produz 50% do efeito máximo.

b - pd_2 para a acetilcolina controle menos pd_2 na presença de *E. argentinum*.

c - Deslocamento à direita da curva dose-resposta à acetilcolina.

* - Difere significativamente ($P < 0,05$).
Entre parênteses indicam o número total de experimentos por grupo.

Tabela 2. Efeito do extrato bruto hidroalcoólico e das frações semi-purificadas das folhas do *Erythroxylum argentinum* ou da cocaína sobre as respostas contráteis à noradrenalina no canal deferente isolado de rato (média \pm erro-padrão).

	EFEITO MÁXIMO	PD_2^a	$\Delta \text{LOG } PD_2^b$	DR ^c
CONTROLE	100	5,63 \pm 0,06	-	-
<i>Erythroxylum argentinum</i> (1,0 mg/ml) (5)	88	7,08 \pm 0,13	1,45	28,1*
FRAÇÃO ALCALOÍDICA (40 μ g/ml) (12)	100	6,27 \pm 0,09	0,63	4,3*
COCAÍNA $10^{-6}M$ (0,32 μ g/ml) (5)	97,2	6,58 \pm 0,09	1,05	11,2*
COCAÍNA $10^{-5}M$ (3,2 μ g/ml) (5)	100	7,28 \pm 0,18	1,70	50,1*

a - Logarítmo negativo da concentração molar de noradrenalina que produz 50% do efeito máximo.

b - PD_2 para noradrenalina na presença de *Erythroxylum argentinum* ou de cocaína menos PD_2 controle.

c - Deslocamento à esquerda da curva dose-resposta à noradrenalina.
- Entre parenteses número de experimentos por grupo.

* - Difere significativamente ($p < 0,01$).

Com relação ao efeito contrátil produzido pela acetilcolina, a fração alcaloídica (160 μ g/ml) produziu deslocamento discreto à esquerda, mas significativo (2 vezes) sem causar variação da resposta máxima.

Reto abdominal de sapo

A administração de concentrações crescentes do extrato bruto das folhas não produziu qualquer modificação no tônus da preparação. Porém, quando o mesmo foi deixado em contato com a preparação (0,5 e 2,0 mg/ml) durante 20 minutos, observou-se um deslocamento dose-dependente significativo à direita da curva dose-resposta à acetilcolina, associado a uma redução da resposta máxima a esse agonista (Fig. 7 e Tab. 3). Tanto a redução da resposta máxima, como o deslocamento na curva dose-resposta à acetilcolina foram prontamente revertidos após a lavagem da preparação.

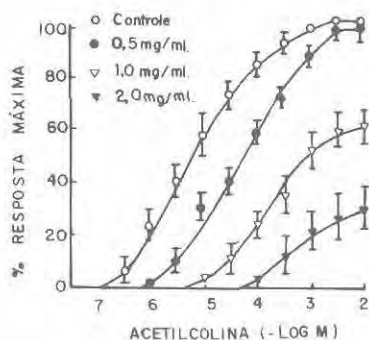


FIG. 7. Efeito do extrato bruto hidroalcoólico obtido das folhas do *E. argentinum*, sobre a curva do se-resposta média à acetilcolina no reto abdominal isolado de sapo. Cada ponto representa a média de 5 experimentos e as barras verticais os erros padrão.

Tabela 3. Efeito do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *E. argentinum* sobre as respostas contráteis à acetilcolina no músculo reto abdominal de sapo (média \pm erro-padrão).

	EFEITO MÁXIMO%	pD_2^a	$\Delta \text{LOG } pD_2^b$	DR^c
CONTROLE (5)	100	$5,30 \pm 0,14$	-	-
<i>E. argentinum</i> (0,5 mg/ml) (5)	$98,4 \pm 2,2$	$4,55 \pm 0,09$	0,75	5,6*
<i>E. argentinum</i> (1,0 mg/ml) (5)	$60,6 \pm 7,7$	$3,69 \pm 1,61$	1,61	40,7*
<i>E. argentinum</i> (2,0 mg/ml) (5)	$29,5 \pm 10,4$	-	-	-

a - Logarítmo negativo da concentração molar de acetilcolina que produz 50% do efeito máximo.

b - pD_2 para a acetilcolina controle menos pD_2 na presença de *E. argentinum*.

c - Deslocamento à direita da curva dose-resposta à acetilcolina.

* - Difere significativamente ($P < 0,05$).
Entre parênteses indicam o número total de experimentos por grupo.

Átrio esquerdo de rato

Os experimentos com o extrato bruto obtido das folhas do *E. argentinum* revelaram um efeito inotrópico negativo no átrio. Assim, observou-se um nítido efeito depressor sobre a contratilidade com doses baixas como 1 µg/ml e atenuação da depressão com doses maiores.

DISCUSSÃO

A análise química indicou que o extrato bruto hidroalcoólico obtido das folhas do *E. argentinum* contém diversos princípios ativos, tais como alcalóides, cumarinas, fenóis glicosídeos, flavonóides, leucoantocianidinas os quais podem possuir propriedades farmacológicas importantes, recomendando o seu uso medicinal. Através da metodologia fitoquímica convencional utilizada não se detectou constituintes tipo-cocaína; porém, como o teor de cocaína é geralmente baixo em muitas espécies do gênero, parece evidente que estudos químicos mais apropriados sejam necessários para a sua detecção (Aynilian *et al.*, 1974; Evans, 1981; Youssefi *et al.*, 1974).

Os testes farmacológicos com o extrato bruto obtido da raiz de *E. argentinum* e com a fração alcaloídica desta planta foram limitadas pela escassa quantidade de material obtido. Entretanto, os resultados de alguns experimentos em que se utilizou o extrato bruto das folhas, da raiz e da fração alcaloídica desta planta indicam efeitos apenas quantitativamente diferentes. Embora os constituintes químicos presentes na raiz sejam praticamente os mesmos encontrados nas folhas, é importante ressaltar que o extrato bruto obtido da raiz apresentou uma toxicidade aguda bem maior do que o das folhas.

Ações farmacológicas semelhantes à cocaína foram observadas tanto com o extrato bruto obtido das folhas como com a fração semi-purificada desta planta. Assim, no canal deferente isolado de rato a fração alcaloídica do *E. argentinum* promoveu deslocamento paralelo à esquerda da curva dose-resposta à noradrenalina, efeito similar ao obtido para a cocaína, porém, foi cerca de 150 a 200 vezes menos potente na produção deste efeito. Por outro lado, a fração alcaloídica foi cerca de 3 a 4 vezes mais ativa que o extrato bruto na indução do deslocamento da curva.

Curiosamente, os testes psicofarmacológicos não evidenciaram a presença de constituintes com ação estimulante central. Ao contrário, o extrato bruto obtido das folhas produziu em várias doses redução da atividade motora e potenciação do sono barbitúrico.

Tanto o extrato bruto obtido das folhas do *E. argentinum* quanto a fração alcaloídica desta planta, promoveram contração do fêlo isolado de cobaia, indicando a presença de substâncias com propriedades colinomiméticas e que poderiam também ser responsáveis pelo efeito hipotensor do extrato ou de constituintes presentes na fração alcaloídica, quando administrados endovenosamente no rato. Porém, não se pode descartar a existência de outras substâncias, histaminérgicas e/ou serotoninérgicas, no extrato, que poderiam ser responsáveis por esses efeitos sobre o fêlo de cobaia e a pressão arterial de rato (Feng *et al.*, 1964; Hooper & Leonard, 1965).

Além disso, o extrato bruto das folhas do *E. argentinum* revelou uma forte ação bloqueadora dose-dependente sobre a acetilcolina em receptores nicotínicos (reto abdominal de sapo). Essa atividade embora interessante sob o aspecto farmacológico constitui-se quase que numa exceção dentro do gênero *Erythroxylum*, uma vez que geralmente os alcalóides do tipo tropano apresentam freqüentemente especificidade em bloquear os receptores muscarínicos. Outras ações observadas após a administração do extrato bruto tais como o relaxamento do útero isolado de rata e mesmo os efeitos depressores centrais já mencionados podem estar associados à presença de taninos na planta. Estudos anteriores deste laboratório e vários outros autores têm confirmado esta depressão inespecífica causada freqüentemente pela presença de substâncias tânicas nos extratos (Calixto & Nicolau, 1984; Farnsworth et al., 1968; Hooper & Leonard, 1965; Sandberg & Cronlund, 1982; Takahashi et al., 1984).

Embora a Medicina Popular não aponte uma ação antiinflamatória para o *E. argentinum* os resultados obtidos no presente estudo foram surpreendentes quanto a esse aspecto. Assim, o *E. argentinum* parece conter algum princípio capaz de inibir o edema produzido pela carragenina, quer quando administrada por via oral (extrato bruto obtido das folhas) como por via intraperitoneal (extratos brutos obtidos das folhas e da raiz). Tal fato descarta em parte a possibilidade desta ação ser decorrente da presença de substâncias tânicas no extrato, pois estas últimas apresentam via de regra atividade antiedematogênica mais intensa, somente quando administradas por via intraperitoneal (dados não publicados).

Estudos semelhantes em que se analisou o possível efeito anti-inflamatório de extratos brutos de 163 espécies vegetais administradas por via i.p. em relação ao edema induzido pela carragenina, evidenciaram que apenas 6 dessas plantas apresentaram inibição da atividade antiedematogênica superior a 60% (Benoit et al., 1976). Uma vez que substâncias presentes no extrato bruto de *E. argentinum* promoveram atividade antiedematogênica por via intraperitoneal e oral, respectivamente na ordem de 90% e 60%, parece claro a importância de se investigar numa etapa posterior, o princípio responsável por esta atividade.

Em conclusão, o presente estudo indica que o *E. argentinum* é uma espécie rica em alcalóides, além de outros princípios ativos portadores de atividades farmacológicas distintas, destacando-se entre elas o efeito anti-inflamatório *in vivo* e uma similar à cocaína *in vitro*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos profs. Antonio Bresolin e Ademir Reis pela coleta e classificação do *E. argentinum*.

SUMMARY

Chemical and pharmacological studies were carried out using crude hydroalcoholic extracts obtained from the leaves or roots of *E. argentinum* or the semipurified fractions of this plant. Chemical analysis detected the presence of alkaloids, phytosteroids, leucoanthocyanidins, flavonoid glycosides, coumarins and tannins. Qualitatively similar pharmacological effects were observed in experiments using both extracts from the leaves or roots. Experiments *in vivo* revealed that the crude extract and the semipurified fractions from the leaves reduced locomotor activity, blood pressure, carragenin-induced paw edema and potentiated barbiturate-induced sleeping-time in laboratory animals. *In vitro* studies demonstrated that the leaf extract or the semipurified fractions induced a cocaine-like effects on the rat vas deferens, a non-specific relaxation of the rat uteri and a contraction of the guinea-pig ileum. It is concluded that *E. argentinum* contains active compounds responsible for the antiinflammatory effect and cocaine-like action observed *in vitro*, which merit emphasis in future research.

Referências bibliográficas

- Aynilian, G. H.; Dukej, A.; Gentner, W. A.; Farnsworth, N. R. - 1974. Cocaine content of *Erythroxylum* species. **J. Pharm. Sci.**, 63: 1938-1939.
- Balbachas, A. - 1956. **As plantas curam**. Ed. Miss. "A verdade presente", S. P., 3ª Ed.
- Benoit, P. S.; Fong, H. H. S.; Svoboda, G. H.; Farnsworth, N. R. - 1976. Biological and phytochemical evaluation of plants XIV antiinflammatory evaluation of 163 species of plants. **Lloydia**, 39: 206-271.
- Calixto, J. B. & Nicolau, M. - 1984. Ações farmacológicas do ácido tânico. I. Efeito sobre a musculatura lisa e o sistema cardiovascular. **Ciência e Cultura** (no prelo).
- Calixto, J. B.; Lima, T. C. M.; Morato, G. S.; Nicolau, M.; Schmith, C. C.; Takahashi, R. N.; Valle, R. M. R.; Yunes, R. A. - 1984. Análise química e farmacológica da *Cordyline dracaenoides* (Agavaceae). **Ciência e Cultura** (no prelo).
- Evans, W. C. - 1981. The comparative phytochemistry of the genus *Erythroxylum*. **J. Ethnopharmacol.**, 3: 265-277.
- Farnsworth, N. R.; Henry, L. K.; Svoboda, G. H.; Blauster, R. N.; Fong, H. H. S.; Quimby, M. W.; Yates, M. J. - 1968. Biological and phytochemical evaluation of plants. II. Test results from and additional 200 accessions. **Lloydia**, 31: 237-240.
- Feng, P. C.; Haynes, L. J.; Magnus, K. E.; Plimmer, J. R. - 1964. Further pharmacological screening of some West Indian medicinal plants. **J. Pharm. Pharmacol.**, 16: 115-117.
- Hoehne, F. C. - 1939. **Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais**. Graphicas,
- Hooper, P. A. & Leonard, B. E. - 1965. Pharmacological properties of some west indian plants. **J. Pharm. Pharmacol.**, 17: 98-107.
- Novak, M.; Salemink, C. A.; Khan, I. - 1984. Biological activity of the alkaloids of *Erythroxylum coca* and *Erythroxylum novagranatense*. **J. Ethnopharmacol.**, 10: 261-274.
- Sandberg, F. & Cronlund, A. - 1982. An ethnopharmacological inventory of medicinal and toxic plants from equatorial Africa. **J. Ethnopharmacol.**, 5: 187-204.
- Takahashi, R. N.; Lima, T. C. M.; Morato, G. S. - 1984. Ações farmacológicas do ácido tânico. II. Atividade sobre o SNC. **Ciência e Cultura** (no prelo).
- Turner, C.; Mahand, C. V.; Ecohlt, M. A. - 1981. Constituents of *E. coca*. II. Gas chromatographic analysis of cocaine and other alkaloids in coca leaves. **J. Ethnopharmacol.**, 3: 293-298.
- Youssefi, M.; Cooks, R. G.; McLaughlin, J. L. - 1979. Mapping of cocaine and cinnamoyl-cocaine in whole coca plant tissues by MIKES (Letter to the Editor). **J. Amer. Chem. Soc.**, 101: 3440-3402.