



## Estudo preliminar da atividade antiinflamatória de *Bryophillum calycinum* Salisb.

P.J.C. Sousa<sup>1</sup>, J.C.S. Rocha<sup>1</sup>, A.M. Pessoa<sup>1</sup>, L.A.D. Alves<sup>1</sup>, J.C.T. Carvalho<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Farmacodinâmica, Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Rod. Bernardo Sayão, s/n, 66075-150, Belém, PA, Brasil,

<sup>2</sup>Laboratório de Fitofármacos, Universidade de Alfenas, Rod. MG 179, km 0, Caixa Postal 23, 37130-000, Alfenas, MG, Brasil

**RESUMO:** Foram avaliados a toxicidade aguda (DL<sub>50</sub>) do Extrato Bruto Aquoso Liofilizado das folhas de *Bryophillum calycinum* Salisb. (EBALBc) e seu efeito antiinflamatório sobre o edema de pata de rato induzido por carragenina e dextrana. Com a dose de 500 mg/kg (p.o) inibiu o edema de pata induzido por dextrana de maneira significativa ( $p < 0.05$ , ANOVA, Teste de Student Newman-Keuls) nos tempos de 60 e 90 minutos, enquanto que somente a dose oral de 1 g/kg de EBALBc inibiu o edema de pata induzido por carragenina. Os resultados indicaram efeito anti-edematogênico do extrato quando testado sobre o edema de pata induzido por dextrana e carragenina, sugerindo, entretanto, maior especificidade de ação sobre o edema induzido por dextrana. Por via oral, com as doses de 0,1 a 8 g/kg o EBALBc, não desencadeou óbito, não sendo possível determinar a DL<sub>50</sub>.

**Unitermos:** *Bryophillum calycinum*, atividade antiinflamatória.

**ABSTRACT:** "Preliminary study of the anti-inflammatory activity of *Bryophillum calycinum* Salisb". The acute toxicity (LD<sub>50</sub>) and the anti-inflammatory effect of the crude freeze-dried aqueous extract of the leaves of *Bryophillum calycinum* Salisb. (EBALBc) was evaluated, on the rat paw edema induced by carrageenin and dextran. The dose of 500 mg/kg (p.o) inhibited the paw edema induced by dextran in a significant manner ( $p < 0.05$ , ANOVA, Student Newman-Keuls test) 60 and 90 minutes, after stimulus while only the oral dose of 1 g/kg of EBALBc inhibited the paw edema induced by carrageenin. The results indicated an anti-edematogenic effect of the extract when tested on the paw edema induced by dextran and carrageenin, suggesting larger specificity of action on the edema induced by dextran. The EBALBc administered orally, in the doses of the 0.1 to 8 g/kg, it did not cause death, making impossible to determine the LD<sub>50</sub>.

**Keywords:** *Bryophillum calycinum*, anti-inflammatory activity.

### INTRODUÇÃO

*Bryophillum calycinum* Salisb., conhecido popularmente como pirarucú, folha da fortuna, saião, S. Raimundo, é uma planta silvestre pertencente à família Crassulaceae e ao gênero *Bryophillum* (Van Den Berg, 1982).

Dentro da família Crassulaceae apenas um gênero, exótico, tem uma espécie muito usada na medicina popular que é o *Bryophillum* e dentro deste gênero encontramos uma espécie ornamental e bastante aproveitada na medicina caseira: *Bryophillum calycinum* Salisb (Van Den Berg, 1982).

*B. calycinum* Salisb. (*B. pinnatum*, *Kalanchoe pinnata*) Crassulaceae é uma planta nativa da África tropical (Hegnauer, 1966). Esta planta é largamente disseminada no Brasil onde as folhas são usadas na medicina popular para o tratamento de feridas, contusões, queimaduras, arranhões, abscessos entre outras doenças da pele, picadas de insetos, doenças do trato respiratório (Corrêa, 1931; Governo do Estado da Bahia, 1979), tratamento da tosse, dor de garganta, inflamações,

hematomas, glaucoma e medicação tópica em afecções cutâneas de natureza alérgica (Nassis et al., 1991).

Vários compostos tais como glicosídeos flavonoídicos, alcanos, álcoois, triterpenos, esteróides, compostos fenólicos e bufadienolídeos foram isolados da planta (Gand; Gupta, 1971, 1972, 1973; Ichikawa et al., 1986; Siddiqui et al., 1989; Yamaquishi et al., 1988; Yamaquishi et al., 1989).

Vários estudos anteriores realizados demonstraram que o suco possui ação depressora inespecífica sobre o sistema nervoso central caracterizada por sonolência e imobilidade dos animais e também demonstrou ser um potente antagonista dos receptores H<sub>1</sub> a nível periférico além de induzir a atividade dopaminérgica central. Em trabalhos subsequentes aumentou a receptividade sexual em ratas e prejudicou o desempenho sexual em ratos (Nassis et al., 1991; Nassis et al., 1992; Nassis et al., 1995)

Neste trabalho, estudou-se o efeito antiinflamatório do Extrato Bruto Aquoso Liofilizado das folhas de *Bryophillum calycinum* Salisb. (EBALBc)

sobre o modelo de edema de pata de rato induzido por carragenina e dextrana, e avaliou-se a toxicidade aguda do EBALBc em camundongos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

As folhas foram coletadas no mês de março de 2002, nas cidades de Ananindeua e Mosqueiro, Pará, Brasil, e a identificação botânica foi realizada pelo Dr. Mário Jardim do Museu Paraense Emílio Goeldi. A excisata encontra-se depositada no herbário do mesmo Museu, sob o número 10120.

### Obtenção do EBALBc

As folhas frescas colhidas, pesando inicialmente 2.280 kg, foram secas em estufa a 45°C durante três dias, e após secagem, as mesmas foram trituradas em um aparelho triturador mecânico e pesadas aferindo-se 132g. O material pulverizado foi acondicionado em recipiente de vidro e depois transferido para posterior extração. O material seco e pulverizado foi submetido à extração em aparelho extrator soxhlet usando água como solvente, e o produto extrativo, após liofilização, rendeu 80,8g (EBALBc). A prospecção fitoquímica do EBALBc foi feita seguindo a técnica descrita por Barbosa (2004).

### Animais

Foram utilizados Ratos Wistar, adultos, machos, pesando entre 180 a 200g e camundongos Swiss albinos, machos pesando entre 20 e 25 g; todos provenientes do Biotério da Fundação Instituto Evandro Chagas (Belém, Pará) e mantidos no Biotério do Laboratório de Farmacodinâmica da UFPa, climatizados, com ciclo de 12h claro/12h escuro e tratados com água e ração *ad libitum*.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Alfenas, através do parecer nº 184/2004.

### Determinação da toxicidade aguda (DL<sub>50</sub>)

Nos experimentos de toxicidade aguda foram utilizados camundongos, separados em grupos de 10 animais, e mantidos em jejum de 12 horas. Os grupos foram tratados por via oral com EBALBc nas doses de 0,1; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; e 8 g/kg, em um volume final de 0,1 mL/10g de peso do animal (dose única). Após a administração, todos os grupos foram observados durante 4h seguidas e nas 24, 48 e 72 horas.

Seguindo o teste hipocrático descrito por Malone e Robichaud (1962) os parâmetros comportamentais observados foram: atenção, alerta, analgesia, atividade motora espontânea, locomoção, falta de apetite, apatia,

resposta ao tato, secreção nasal, piloereção, ptose, frequência respiratória, cianose, estereotipia, contorção, agressividade, ataxia e postura, sudorese, micção, diarreia e convulsão.

### Avaliação da atividade antiinflamatória

#### *Edema de pata induzido por carragenina e dextrana*

Os animais foram separados em grupos de 6 animais, e uma hora antes da aplicação dos agentes inflamatórios (0,1 mL de carragenina 1% (p/v, tipo IV), e 0,1 mL de dextrana 0,1% (p/v, D-1537, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) foram tratados, por via oral, com EBALBc nas doses de 0,25, 0,5 e 1,0 g/kg, indometacina (5 mg/kg, diluída em bicarbonato de sódio à 5% (p/v), (Sigma)), e ciproheptadina (0,005g/kg, Periatin<sup>®</sup>, Prodome, Brasil) em volume final de 0,1mL/100g de peso do animal. Na região intraplantar da pata direita foram administrados carragenina ou dextrana e igual volume de solução salina na pata esquerda. O volume em mL da pata foi medido usando o método descrito por Winter et al., (1962) imediatamente após e em intervalos de 1, 2, 3, 4 e 5 horas da injeção de carragenina, e imediatamente após a administração de dextrana e solução salina, em intervalos de 30 minutos, durante 2 horas, com auxílio de um sistema baseado no deslocamento de água descrito por Carvalho et al., (1996).

### Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média. Foram considerados estatisticamente diferentes os resultados que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% (p < 0,05), aplicando-se ANOVA e Teste de Student Newman-Keuls para comparações múltiplas.

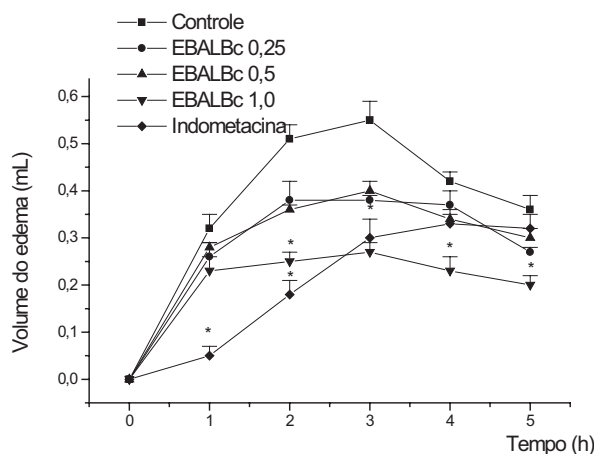
## RESULTADOS

O ensaio de prospecção fitoquímica sugeriu a presença de alguns grupos fitoquímicos, dentre os quais saponinas, esteróides, triterpenóides, flavonóides, carotenóides, depsídeos e depsidonas.

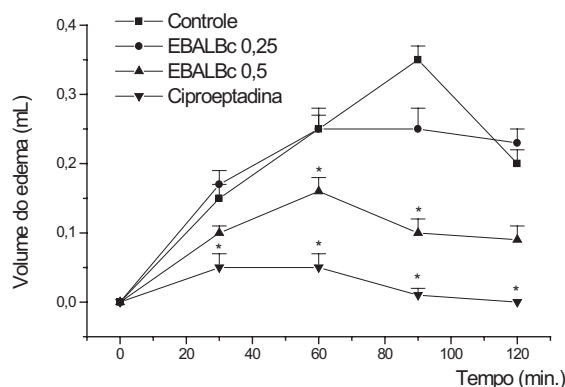
### Toxicidade aguda (DL<sub>50</sub>)

Não houve morte para as doses de 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 g/kg de EBALBc administrado oralmente em camundongos, portanto não foi possível determinar a DL<sub>50</sub>, e estes resultados sugerem um alto grau de segurança para o EBALBc.

As alterações comportamentais observadas com administração de EBALBc nas doses acima de 1 g/kg foram agitação inicial com posterior depressão, micção e defecação alterados acima do normal. Esses efeitos desapareceram 24 horas após a administração oral.



**Figura 1.** Efeito do Extrato Bruto Aquoso Liofilizado de *Bryophyllum calycinum* (EBALBc, 0,25g/kg, 0,5g/kg e 1g/kg, v.o) e indometacina (5 mg/kg) sobre o edema de pata de rato induzido por carragenina (1%). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM. (erro padrão da média) de  $n = 6$ /grupo. \*  $p < 0,05$ ; ANOVA, seguida do teste de Student Newman-Keuls.



**Figura 2.** Efeito do Extrato Bruto Aquoso Liofilizado de *Bryophyllum calycinum* (EBALBc, 0,25g/kg, e 0,5g/kg, v.o) e ciproheptadina (0,005g/kg) sobre o edema de pata de rato induzido por dextrana (0,1%). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM. (erro padrão da média) de  $n = 6$ /grupo. \*  $p < 0,05$ ; ANOVA, seguida do teste de Student Newman-Keuls.

## Edema de pata induzido por carragenina e dextrana

As doses de 0,25 e 0,5g/kg não apresentaram inibição do volume de edema induzido por carragenina de maneira significativa em relação ao grupo controle. Porém, a dose de 1g/kg reduziu o edema de forma significativa em relação ao grupo controle, sendo esta redução observada a partir da 2ª hora após a administração oral de EBALBc. A indometacina (droga padrão) na dose de 5 mg/kg inibiu a formação de edema significativamente (Figura 1).

A dose de 0,25 g/kg não inibiu o edema induzido por dextrana em comparação ao grupo controle. Porém, a dose de 0,5 mg/kg reduziu de maneira significativa, sendo esta redução observada a partir dos 60 minutos após a administração oral de EBALBc. A droga padrão usada (ciproheptadina) apresentou redução significativa a partir de 30 minutos (Figura 2).

## DISCUSSÃO

O estudo da toxicidade aguda demonstrou que o EBALBc, administrado por via oral, não foi capaz de induzir morte nos animais de experimentação (camundongos). Sabe-se que a  $DL_{50}$  é, tradicionalmente, um dos parâmetros para avaliação da toxicidade aguda. A ausência de óbitos mostra que o EBALBc apresenta boa margem de segurança apesar de que, nas doses acima de 1 g/kg, a maioria dos animais apresentou agitação inicial seguida de depressão. Este último resultado está de acordo com estudos que avaliaram os efeitos do suco de *B. calycinum* sobre o sistema nervoso central demonstrando inibição da atividade locomotora em campo aberto e potencialização do tempo de sono induzido por pentobarbital em ratos (Nassis et al., 1991), e em trabalhos subsequentes houve aumento da atividade dopaminérgica central avaliado através do teste de esquiava ativa (Nassis

et al., 1995).

Neste estudo utilizou-se como agentes inflamatórios carragenina que induz a síntese e liberação de prostaglandinas (Santos; Rao, 1998; Di Rosa et al., 1971), e dextrana que é um agente inflamatório conhecido por induzir edema mediado por histamina e 5-hidroxitriptamina (serotonina) (Katz et al., 1984), conseqüente à degranulação de mastócitos (Lo et al., 1982).

O EBALBc apresentou efeito anti-edematogênico no teste de edema de pata induzido por carragenina a partir da dose de 1 g/kg. A carragenina induz exsudato rico em proteínas que contém grande número de neutrófilos (Lo et al., 1982), e apresenta três fases distintas envolvidas na resposta inflamatória aguda. A primeira relaciona-se à liberação de histamina e serotonina, a segunda fase envolve a liberação de bradicinina enquanto as prostaglandinas estão envolvidas na última fase (Di Rosa et al., 1971). O EBALBc foi capaz de reduzir o edema de pata em todas as fases da resposta inflamatória na dose acima referida, sugerindo um efeito inespecífico.

O EBALBc, administrado por via oral, apresentou efeito sobre o edema de pata induzido por dextrana sendo que este efeito foi obtido com a dose de 0,5 g/kg, apresentando inibição em torno de 31,17% no pico máximo de edema. Este resultado é corroborado por trabalhos anteriores onde foi observado que o *B. calycinum* apresentou efeito inibitório das contrações induzidas por histamina no íleo isolado de cobaia produzindo deslocamento para a direita da curva concentração-resposta da histamina sem redução da resposta máxima, sugerindo um antagonismo competitivo para histamina. No mesmo estudo foi experimentado o efeito do suco de *B. calycinum* sobre a contração da musculatura lisa brônquica de cobaia e também sobre a secreção gástrica de HCl. No primeiro, o suco protegeu cobaias da morte por asfixia induzida por histamina (embora o efeito protetor tenha sido de curta duração) e no segundo o suco não foi eficaz na proteção à mucosa gástrica da ulceração induzida por histamina. Esses achados sugerem que o *B. calycinum* age como antagonista competitivo dos receptores histamínicos-H<sub>1</sub>, porém não como antagonista dos receptores histamínicos-H<sub>2</sub> (Nassis et al., 1992).

Em estudos fitoquímicos anteriores, flavonóides foram isolados do extrato da planta (Ichikawa et al., 1986; Gaind; Gupta, 1972). Como os flavonóides possuem diversas atividades farmacológicas, entre as quais antiinflamatória, é possível que esta classe de substância possa ser responsável pela ação anti-histamínica (Havsteen, 1983).

O resultado do presente estudo auxilia na indicação popular do *B. calycinum* e demonstra que o EBALBc é capaz de reduzir o edema de pata induzido por carragenina e dextrana.

## REFERÊNCIAS

- Barbosa WLR 2004. Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. *Revista Científica da UFPA* 4: 1-19.
- Carvalho JCT, Teixeira JRM, Souza PJC, Bastos JK, Dos Santos Filho D, Sarti SJ 1996. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. *J Ethnopharmacol* 53: 175-178.
- Corrêa MP 1931. *Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: IBAMA, Ministério da Agricultura.
- Di Rosa M, Giroud JP, Willoughby DA 1971. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J Pathol* 104: 15-28.
- Gaind KN, Gupta RL 1972. Alkanes, alkanols, triterpenes and sterols of *K. pinnata*. *Phytochemistry* 11: 1500-1502.
- Gaind KN, Gupta RL 1973. Flavonoid glycosides from *K. pinnata*. *Planta Med* 23: 368-373.
- Gaind KN, Gupta RL 1971. Phenolic components from the leaves of *K. pinnata*. *Planta Med* 20: 149-53.
- Governo do Estado da Bahia. 1979. *Inventário das plantas medicinais do Estado da Bahia*. Salvador: Governo da Bahia, p. 524-525.
- Havsteen B 1983. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol* 32: 1141-1148.
- Hegnauer R 1966. *Chemotaxonomie der Pflanzen*. Basel: Birkhäuser Verlag.
- Ichikawa M, Ogura M, Lijima T 1986. Antiallergic flavone glycoside from *Kalanchoe pinnatum*. *Jpn. Kokai Tokyo Koho* 61 118,396, apud *Chemical Abstracts* 105: 178423q.
- Katz LB, Theobald HD, Bookstaff RC 1984. Characterization of the enhanced paw edema response to carrageenan and dextran in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-treated rats. *J Pharmacol Exp Ther* 230: 670-677.
- Lo TN, Almeida AP, Beaven MA 1982. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory response in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. *J Pharmacol Exp Ther* 221: 261-267.
- Malone MH, Robichaud RC 1962. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. *Lloydia* 25: 320-332.
- Nassis CZ, Haebisch EMAB, Giesbrecht AM 1992. Antihistamine activity of *Bryophyllum calycinum*. *Braz J Med Biol Res* 25: 929-36.
- Nassis CZ, Lago LC, Mory SB, Raquel MKS, Figueiredo CR, Lebre AT, Giesbrecht AM 1991. Estudo da ação depressora inespecífica do suco extraído das folhas de *Bryophyllum calycinum* Salisb. (Crassulaceae) sobre o sistema nervoso central: comparação com os efeitos da difenidramina. *Arquivos Médicos do ABC* 14: 64-68.
- Nassis CZ, Bagarollo CA, Monteiro NC, Ozores DP, Yamashiro K, Freitas ALP 1995. Efeito do suco

- extraído das folhas de *Bryophyllum calycinum* Salisb. (Crassulaceae) sobre o aprendizado da esquiva ativa, em ratos. *Arquivos Médicos do ABC 18*: 7-9.
- Santos FA, Rao VS 1998. Inflammatory edema induced by 1,8-cineole in the hindpaw of rats: a model for screening antiallergic and anti-inflammatory compounds. *Phytomedicine 5*: 115-119.
- Siddiqui S, Faizi S, Siddiqui BS, Sultana N 1989. Triterpenoids and phenanthrenes from leaves of *B. pinnatum*. *Phytochemistry 28*: 2433-2438.
- Van Den Berg ME 1982. *Plantas medicinais na Amazônia - Contribuição ao seu conhecimento sistemático*. Belém: CNPq/PTU p. 142-143.
- Winter CA, Risley EA, Nuss GW 1962. Carrageenin-induced edemas in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol 111*: 544-547.
- Yamaquishi T, Haruna M, Yan XZ, Chang II, Lee KH 1989. Antitumor agents. 110. Bryophyllin B, a novel potent cytotoxic bufadienolide from *B. pinnatum*. *J Nat Prod 52*: 1071-1079.
- Yamaquishi T, Yan XZ, Mcphail DR, Mcphail AT, Lee K 1988. Structure and stereochemistry of bryophyllin A. *Chem Pharm Bull 36*: 1616-1617.