

# Avaliação da Atividade Antinociceptiva de Frações Etanólicas e Diclorometano da Espécie *Leonurus Sibiricus*

## Autores

---

Rogério Grando

## Orientador

---

Luciane Cruz Lopes

## Apoio Financeiro

---

Fapic

## 1. Introdução

---

### 1 - INTRODUÇÃO

#### 1.1 - Dor

A nocicepção constitui a recepção, pelos nociceptores, de estímulos que codificam sinais para fornecer a informação ao sistema nervoso central da existência de uma injúria tecidual associada a um estímulo nocivo (GJERSTAD, TJOLSEN & HOLE, 1997). A dor é uma percepção subjetiva com uma dimensão psicológica.

A medida da dor e analgesia em animais apresentam uma variedade de problemas, pois a dor por si só constitui-se em entidade sensorial de multiplicidade, o termo dor é pobremente definido em relação a animais ou comportamento de animais (RANG *et al.*, 2003).

A partir destes conceitos, a utilização do termo dor seria mais adequada para o ser humano e nocicepção para animais experimentais.

Pode-se afirmar que ainda não dispomos de um fármaco antiinflamatório e antinociceptivo ideal embora altamente eficazes, os analgésicos de ação central não podem ser dissociados de efeitos adversos importantes. E os analgésicos de ação periférica têm seu uso limitado devido a propriedades inerentes freqüentemente não dissociáveis de efeitos indesejáveis tais como lesões do trato gastrointestinal e renal

(FERREIRA, 1993).

## 1.2 - As plantas medicinais e sua validação: *Leonurus sibiricus*

Embora o Brasil apresente uma flora extensamente rica e abrigue uma infinidade de espécies de interesse farmacológico, dados científicos sobre as plantas utilizadas em nosso meio que justifiquem o uso terapêutico e/ou que confirmem a ausência de toxicidade estão sendo produzidos muito lentamente (SOUZA-BRITO & SOUZA- BRITO, 1996).

As utilizações pouco cuidadosas de preparações de plantas dita medicinais, fora de seu contexto original e sem respaldo acadêmico, têm dado origem a intoxicações, atribuíveis aos efeitos já conhecidos da planta ou ainda ao uso incorreto, por confusão na identificação das espécies (QUER FONT, 1962; SCAVONE & PANIZZA, 1981). Por isso se justifica estudo com espécies de forma a validar seu uso terapêutico.

A espécie *Leonurus sibiricus* L. é originária da Ásia mas bem adaptada a este clima, pertence a família das Lamiaceas e é conhecida vulgarmente como rubim, erva de macaé. Possui como sinónimas científicas *Leonurus tataricus*, *Leonurus multifidus*, *Pazeria multifida*, *Stachys artemisiae*. É encontrada em terrenos baldios e nas proximidades de habitações, apresentando às vezes, pequenas formações periódicas e compactas (HOENE, 1943).

O gênero apresenta grande importância em medicina popular onde é usada em processos inflamatórios, antipiréticos, sedativo, casos de bronquite, coqueluche, afecções do estômago e do intestino, embarços gástricos, vômitos, diarréias, gripe, resfriado e reumatismo (CRUZ, 1985). Sob a forma de tintura alcoólica ou xarope é indicada na asma, além disso, atribuem-lhe propriedades tônicas, antiespasmódicas e béquicas (HOENE, 1943).

Em sua composição química são encontrados alcalóides como leorunina (KUBOTA & NAKASHIMA, 1930), leonuridina (TANG & HSU, 1940), estaquidrina (HUANG, 1959), o polissacarídeo estaquiose (MUROKAMI, 1943), glicosídeos apolares, iridóides, ácido ursólico, saponinas triterpênicas (KOZLVA, 1968), três diterpenos (leosibirina, isoleosibirina, leoribicina , SAVONA *et al.*, 1982) e flavonóides glicosídeos p-coumaril como a apigenina e a luteolina (TOMAS- BARBERAN, KRESTOVSKAYA & GIL, 1993).

## 2. Objetivos

---

## **2- OBJETIVOS**

O objetivo desse trabalho é avaliar a possível atividade antinociceptiva dos extratos bruto diclorometânico da espécie *L.sibiricus*

## **3. Desenvolvimento**

---

### **3 – DESENVOLVIMENTO**

#### **3.1 – Preparo do material botânico**

##### **- Coleta e identificação**

O material botânico foi coletado no horto de plantas medicinais do CPQBA no período de set/out de 2005 e identificado pela Profa.Dra. Glyn Mara Figueira, sua exsicata está armazenada no horto de plantas medicinais do CPQBA – Unicamp (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas) e identificada como CPQBA 1.205.

##### **- Preparo do extrato bruto**

Cerca de 1,5kg da parte aérea da planta fresca foi seca em estufa a 45°C e logo após, moída em moinho de facas. Posteriormente a droga vegetal moída foi macerada com diclorometano PA durante 42h, sendo esta extração foi repetida por três vezes, com este mesmo solvente. Logo após o resíduo foi lavado com etanol 96%. Os solventes foram evaporados em rota evaporador a 45°C sobre pressão reduzida, constituindo respectivamente EBD e EBE.

#### **3.2 - Animais e grupo controle**

Foram utilizados camundongos da raça "swiss", machos, pesando em média 20g tratados com ração balanceada PURINA-LABINA, água "ad libitum" submetidos a ciclo claro-escuro de 12h.

Os extratos foram administrados por via oral, em animais em jejum, uma hora antes da realização dos modelos. O grupo controle negativo foi tratado com solução salina (NaCl 0.9%) pela via oral. O grupo controle positivo foi tratado com um fármaco padrão para aquela atividade em dose compatível com o efeito esperado.

### **3.3 - Modelos experimentais**

#### **3.3.1 - Contorções abdominais induzidas por ácido acético 1,2% (KOSTER *et al.*, 1959).**

Os animais foram tratados previamente com solução salina (10 mg/kg/vo), indometacina (30 mg/Kg/vo), EBE nas doses de 50 e 100 mg/Kg e EBD nas doses de 100 e 300 mg/Kg. As contorções abdominais foram induzidas pela injeção intraperitoneal de 0,2ml de ácido acético 1,2%. A contagem individual do número de contorções foi realizada entre o 5º e o 30º minuto após a administração do ácido acético.

#### **3.3.2 - Lamedura de pata induzida por formalina (DUBUISSON & DENNIS., 1953)**

Neste modelo os animais foram tratados com solução salina (10 mg/kg/vo), indometacina (30mg/kg/ip) e EBD de *Leonurus sibiricus* nas doses de (100 e 300mg/Kg), 1h após foi administrado 20µl de formalina a 1% subplantar na pata posterior direita dos animais. Foram avaliadas as duas fases do processo doloroso, a fase A (0-5min) e a fase B (25-30min).

#### **3.3.3 - Modelo de "Hot Plate" (EDDY & LAIMBACK, 1953)**

Neste modelo, a placa quente é mantida em  $55 \pm 1^\circ\text{C}$ . Os animais selecionados foram os que permaneceram de 6 à 10 segundos antes da administração da droga. Os animais foram tratados com morfina (20mg/kg/ip), solução salina, e EBD nas doses de 100 e 300mg/kg, os animais foram avaliados nos tempos 15, 30, 60, 90, 120 minutos após o tratamento.

## 4. Resultados

---

### 4 - RESULTADOS

#### 4.1 - Contorção por ácido acético

O tratamento oral com os extratos diclorometânico e etanólico de *L. sibiricus* diminuindo significativamente as contorções abdominais provocadas por ácido acético nas doses avaliadas (Figura 1) ambos apresentaram eficácia porém o EBE (em ambas doses) apresentou maior potência. O resultado está expresso em média  $\pm$  epm.

#### 4.2 - Lamedura de pata induzida por formalina

O tratamento com EBD em ambas as doses diminuiu o Índice de Dor (ID) tanto na fase A (100 mg/kg -  $82,55 \pm 6,95$ ; 300 mg/kg -  $91,52 \pm 4,38$ ), controle ( $119,78 \pm 4,06$ ) e indometacina ( $84,99 \pm 4,06$ ) (ANOVA  $F_{(3,21)} = 3,55$ ;  $p < 0,0345$ ) quanto na fase B (100mg/kg -  $28,35 \pm 4,21$ ; 300 mg/kg -  $8,77 \pm 4,21$ , controle ( $63,33 \pm 3,27$ ) e indometacina ( $13,36 \pm 3,64$ ) (ANOVA  $F_{(3,25)} = 38,8$   $p < 0,001$  (Figura 2).

#### 4.3- Modelo de “Hot Plate”

A tabela 1 apresenta a evolução temporal da resposta antinociceptiva da morfina e do extrato em camundongos, nos respectivos tempos de observação. Os resultados obtidos estão expressos como a média  $\pm$  epm da diferença das latências (segundos) de cada grupos testados. Neste modelo o EBD em ambas as doses não apresentou resultado significativo quanto comparado aos controles (antes- ANOVA  $F_{(3,18)} = 0,86$   $p < 0,4805$ ; 15min - ANOVA  $F_{(3,18)} = 74,92$   $p < 0,0001$ ; 30min- ANOVA  $F_{(3,18)} = 185,58$   $p < 0,0001$ ; 60min - ANOVA  $F_{(3,18)} = 112,13$   $p < 0,0001$ ; 90min - ANOVA  $F_{(3,18)} = 15,53$   $p < 0,0001$ ; 120min- ANOVA  $F_{(3,18)} = 23,60$   $p < 0,0001$ ).

## 5 - DISCUSSÃO

Trabalhos publicados por Islam *et al.*, (2005) mostram que o extrato metanólico da espécie apresenta atividade nos modelos de nocicepção quando testado por via i.p. Os resultados obtidos nos ensaios utilizados marcam que os princípios ativos estão contidos tanto no extrato etanólico e diclorometânico da espécie *L. sibiricus*.

Além dos alcalóides e terpenos já identificados na espécie a presença de iridóides em sua composição química nos revela a possível atividade da espécie pois este composto está relacionado com a inibição da iNOS (óxido nítrico sintase) diminuindo assim a expressão de NO, um importante mediador inflamatório (PICERNO *et al.*, 2005). A atividade antiinflamatória e antinociceptiva do triterpeno ácido ursólico já foi confirmada ( TAPONDJOU *et al.*, 2003). A atividade atribuída a esse composto é devido a inibição da enzima ciclooxigenase, principal enzima na síntese de prostanóides.

A inibição da Fase B no modelo de lambadura e a falta de atividade do EBD no modelo de “Hot plate” nos indica que o mecanismo de ação deste extrato se relaciona com a atividade periférica diretamente no processo inflamatório, inibindo os mediadores através da presença dos constituintes acima.

## 5. Considerações Finais

---

## 6- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Desta forma, infere-se que possivelmente a atividade antinociceptiva apresentada por estes tipo de extrato, possa estar relacionada a presença de ácido ursólico e iridóides, cuja atividade sobre mediadores antiinflamatórios já foram descritas, justificando a atividade do EBD nos modelos e contorção por acido acético e na fase B do modelo de formalina e também a ausência de atividade no modelo de “hot plate”.

Este trabalho confirma indicações populares desta espécie, confirma estudos iniciais feitos por outro autor somente utilizando extrato metanólico, porém somente pela via intraperitoneal e avança no sentido de mostrar atividade pela via oral indicando que os compostos responsáveis são os mais polares.

## Referências Bibliográficas

---

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CRUZ, G. **Dicionário de Plantas úteis do Brasil**. 3ed. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira S.A., 1985, p. 322 e 323.

DUBUISSON, D. & DENNIS, S.G. **The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats**. *Pain*, v.4, 1977, p.161-174,

EDDY, N.B. & LAIMBACK, D. **Synthetic analgesics II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines**. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.107, 1953, p.385-393.

Ferreira, S.H. **The role of interleukins and nitric oxide in the mediation of inflammatory pain and its control by peripheral analgesics**. *Drugs*. 1993, Review.

GJERSTAD, J.; TJOLSEN, A. & HOLE, K. **A dual effect of SHT1B receptor stimulation on nociceptive dorsal horn neurons in rats**. *Eur. J. Pharmacol.*1997, p.335(2-3): 127-32.

HOENE, F.C., **Flora Brasileira: Labiadas**. V. XLVIII. São Paulo, S.P.; Graphicars, 1943. p 47 e 48.

HUANG, S. H. **Alkaloids of the Chinese drug I \_ Mu\_ Tsao, *Leonurus sibiricus***. I. Stachydrine. Yao Hsueh Pao, v. 7, 1959, p. 59-64.

[ISLAM, M.A.](#); [AHMED, F.](#); [DAS, A.K.](#) & [BACHAR, S.C.](#) **Analgesic and anti-inflammatory activity of *Leonurus sibiricus***. Fitoterapia. Jun. 2005, p. 359-62

KOSTER, R.; ANDERSON, M. & DE BEER, E.J. **Acetic acid for analgesic screening**. Fed. Proc. n.18. ,1959, p. 418-420.

KOZLVA, L.M. **Glycosides of pentalaciniate motherwort**. Mosk. Med. Inst., cidade, v. 61, 1968, p.345-8.

KUBOTA, S. & NAKASHIMA, S. **The study of *Leonurus sibiricus* L. I. Chemical study of alkaloids "leonurine" isolated from *Leonurus sibiricus* L.** Folia Pharmacol. Japon., v. 11 n.2, 1930, p. 159-67.

MURAKAMI, S. **Investigations on the carbohydrates of Labiates. V The distribution of stachyose in the underground organs of Labiates**. Acta Phytochim., v.13, 1943 , p. 161-84.

[PICERNO, P.](#); [AUTORE, G.](#); [MARZOCCO, S.](#); [MELONI, M.](#); [SANOGO, R.](#) & [AQUINO, R.P.](#)  
**Anti-inflammatory activity of verminoside from *Kigelia africana* and evaluation of cutaneous irritation in cell cultures and reconstituted human epidermis.** J Journal of natural products., 68(11), 2005, p1610-1614.

QUER FONT. **Plantas Medicinales**, Editorial sabor. S.A. Barcelona-Madrid-Bueno Aires- Rio de Janeiro-México- Monteviéo, 1962. p. 672.

RANG, H. P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. & MOORE, P.K. **Farmacologia**.5ed. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier. 2003. p. 640-665.

SAVONA, G.; PIOZZI, F. BRUNO, M. & RODRIGUES, B. **Diterpenoids from *Leonurus sibiricus*.** Phytochemistry, Oxfors, v. 21, n11, 1982, p. 2699-2701.

SCAVONE, O. & PANIZZA, S. **Plantas Tóxicas**. 2ed. São Paulo: CODAC-USP, 1981. 128p.

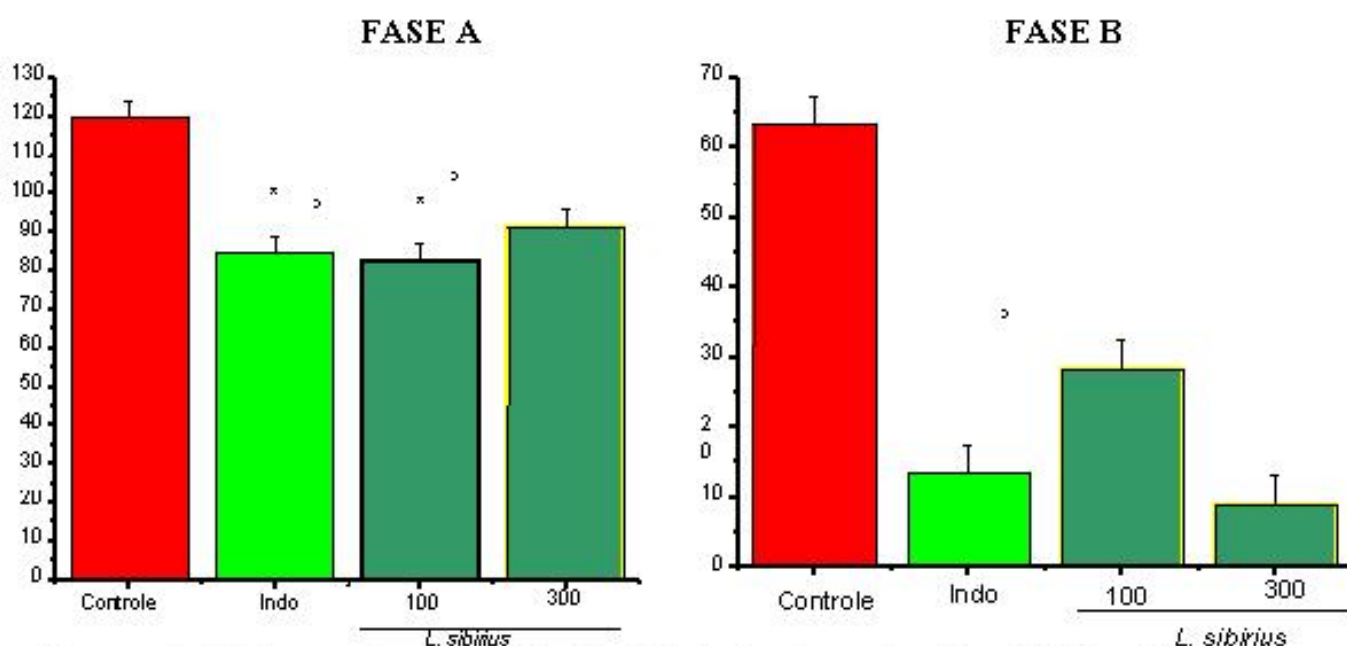
SOUZA-BRITO, A R.M. & SOUZA-BRITO, A A. **Forty years of brazilian medicinal plant research**, J. Ethnopharmacol., 1993 p. 39: 53-67.

TANG, T.H. & HSU, C.W. **The chemical constituents os the chineses drug I \_ mu\_ tasao.** J. Chinese Chem. Soc. V.7, 1940, p.105-10.

[TAPONDJOU, L.A.](#); [LONTSI, D.](#); [SONDENGAM, B.L.](#); [CHOI, J.](#); [LEE, K.T.](#); [JUNG, H.J.](#) & [PARK, H.J.](#) **In vivo anti-nociceptive and anti-inflammatory effect of the two triterpenes, ursolic acid and 23-hydroxyursolic acid, from Cussonia bancoensis.** Arch Pharm Res. fev. 2003, p.143-6

TOMAS- BARBERAN, F. A.; KRESTOVSKAYA, T. & GIL, M.; **Flavonoid p\_ coumaroylglycosides in some Leonurus, Chaitutus e Panzeria species (laminaceae).** Biochem. Syst. Ecol., v.21, n.4, 1993., p.531-2.

## Anexos



**Figura 2:** Efeito na fase inicial (A 0-5min) e fase final (B 25-30min) do processo doloroso do EBD (100 e 300mg/Kg) de *Leonurus sibiricus* no modelo de lambadura de pata por formalina. ANOVA  $F_{(3,25)} = 38,8$   $p < 0,001$

Tabela1: Avaliação da permanência dos camundongos submetidos ao modelo de "hot plate" na placa quente após o tratemnto com *Leonurus sibiricus*

Tempo observação	Tratamento					
	Permanência na placa quente (seg)					
	antes	15min	30min	60min	90min	120min
Controle	9,0 ± 1,52	8,6 ± 0,88	9,6 ± 1,45	9,0 ± 1,15	8,33 ± 0,88	9,0 ± 1,15
morfina	7,5 ± 0,95	31,7 ± 2,2	39,0 ± 0,57	37,7 ± 1,31	27,25 ± 4,38	19,2 ± 0,75
<i>L. sibiricus</i> 100mg/kg	8,0 ± 0,53	11,1 ± 0,73	10,7 ± 1,10	10,1 ± 0,85	11,14 ± 1,03	9,7 ± 0,91
<i>L. sibiricus</i> 300mg/kg	9,2 ± 0,8	9,6 ± 0,6	8,4 ± 0,50	10,0 ± 1,58	9,0 ± 1,30	9,0 ± 0,89