

Propriedades biológicas das sementes de *Joannesia princeps* Vellozo

Biological properties of the *Joannesia princeps* Vellozo seeds

Orlando Vieira de Sousa¹
Isabel Araújo Fioravante²
Célia Hitomi Yamamoto²
Maria Silvana Alves³
Glauciemar Del-Vechio-Vieira²
Aílson da Luz André de Araújo²

RESUMO

palavras-chave

Joannesia princeps

Euphorbiaceae

Plantas medicinais

Este trabalho teve como objetivo avaliar as propriedades biológicas do extrato metanólico, obtido por Soxhlet, seguido de partição líquido/líquido (frações hexânica, diclorometânica, em acetato de etila, butanólica e residual) das sementes de *Joannesia princeps*. A atividade laxante foi avaliada pelo teste da motilidade intestinal em camundongos. O método de difusão em ágar utilizando *Staphylococcus aureus* ATCC 29737, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Salmonella typhimurium* ATCC 13111 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 90271 e o bioensaio em *Artemia salina* foram utilizados para investigação da atividade antibacteriana e da toxidez, respectivamente. O extrato metanólico, as frações e a semente pulverizada aumentaram significativamente a motilidade intestinal. O extrato metanólico e a fração residual inibiram o crescimento de todas as amostras bacterianas de referência testadas, enquanto as frações hexânica e diclorometânica inibiram *Staphylococcus aureus* ATCC 29737, *Salmonella typhimurium* ATCC 13111 e *Streptococcus mutans* ATCC 25175. As frações em acetato de etila e butanólica foram ativas somente para *S. aureus* ATCC 29737. O extrato metanólico e as frações hexânica, diclorometânica e butanólica produziram CL_{50} de 56,28, 16,72, 14,82 e 67,29 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os resultados mostraram que as sementes de *J. princeps* exibem atividades laxante e antibacteriana, sendo tóxicas para *A. salina*.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the biological properties of the methanol extract, obtained by Soxhlet, followed by liquid/liquid partition with organic solvents (hexane, dichloromethane, ethyl acetate, butanol and residual fractions) of the *Joannesia princeps* seeds. Laxative activity was tested through the intestinal motility model in mice. The agar diffusion method using *Staphylococcus aureus* ATCC 29737, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Salmonella typhimurium* ATCC 13111 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 90271 and the Brine Shrimp Lethality bioassay were used to evaluate the antibacterial activity and the toxicity, respectively. The methanol extract, the fractions and the powder seeds increased the intestinal motility significantly. The methanol extract and residual fraction inhibited all reference strains tested, while the hexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol fractions inhibited only *S. aureus* ATCC 29737. The hexane and dichloromethane fractions were active against *Salmonella typhimurium* ATCC 13111 and *Streptococcus mutans* ATCC 25175. The methanol extract and hexane, dichloromethane and butanol fractions produced LC_{50} 56.28, 16.72, 14.82 and 67.29 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The results showed that *J. princeps* seeds present laxative and bacterial activities, being toxic to *A. salina*.

keywords

Joannesia princeps

Euphorbiaceae

Plants, Medicinal

1 Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica, Departamento Farmacêutico. E-mail: orlando.sousa@ufjf.edu.br

2 Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica, Departamento Farmacêutico.

3 Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica, Departamento de Análises Clínicas.

INTRODUÇÃO

A família Euphorbiaceae compreende cerca de 300 gêneros e 6000 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, ocorrem 70 gêneros com 1000 espécies difundidas em todos os tipos de vegetação (SOUZA; LORENZI, 2005). Plantas desta família possuem grande interesse comercial devido à produção de óleo usado em lubrificações, mas também apresentam destaque pelo seu potencial moluscicida e pela presença de substâncias terpenoídicas indutoras de tumor (JURY *et al.*, 1987).

Joannesia princeps Vellozo (Euphorbiaceae), popularmente conhecida como boleira e cutieira, é uma árvore encontrada nas regiões norte, nordeste e sudeste, principalmente em floresta pluvial de mata atlântica (AZEVEDO; SILVA, 2006; BALBACH, 1981; LOPES *et al.*, 2002). Os frutos contêm, geralmente, duas amêndoas que possuem 37% de óleo, sendo útil para fins medicinais e industriais (CHAVES; DAVIDE, 1996).

Na medicina popular, esta planta é indicada como purgativo, para perturbações menstruais, febre pernicioso, antimicrobiano, sífilis, escrofulose e inchaço (BALBACH, 1981; MORS; RIZZINI, 1966). O óleo das cascas da raiz é usado como laxante e o extrato das sementes exibe forte atividade anti-helmíntica (FREISE, 1929). A atividade anti-helmíntica foi atribuída a alcalóides isolados de diferentes partes da planta (ACHENBACH; BENIRSCHKE, 1997; FREISE, 1929). Além disto, neolignanais tais como isoamericanina A, americanol A, isoamericanol A e (\pm) 3,3'-bisdemetilpinoresinol foram identificadas nas sementes (WAIBEL *et al.*, 2003).

O uso etnomedicinal das sementes de *J. princeps*, em especial como laxante e antimicrobiano, ainda carece de testes farmacológicos e clínicos que o respaldem cientificamente. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo investigar o efeito laxante sobre o trânsito intestinal em camundongos, a inibição do crescimento bacteriano e a toxidez pelo bioensaio em *Artemia salina* das sementes de *J. princeps*.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do vegetal

J. princeps foi coletada na cidade de Nova Era, estado de Minas Gerais, em março de 2005. Uma exsicata foi identificada e depositada no Herbário Leopoldo Krieger da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) sob o nº 42053.

Preparo dos extratos

Sementes secas e pulverizadas (235 g) de *J. princeps* foram submetidas à extração por Soxhlet em metanol P.A. até esgotamento. Após evaporação do solvente, o extrato

metanólico (EM) foi solubilizado em metanol:água na proporção de 1:9 e fracionado por partição líquido/líquido em hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol, obtendo as frações hexânica (FH), diclorometânica (FD), em acetato de etila (FA), butanólica (FB) e a residual hidrometanólica (FR) (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). A semente pulverizada (PO), o extrato metanólico (EM) e as frações preparadas (FH, FD, FA, FB e FR) foram utilizadas para avaliar as propriedades biológicas.

Animais

Foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos, pesando entre 25 e 30 g, provenientes do Centro de Biologia da Reprodução da UFJF. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com ração e água *ad libitum* em temperatura ambiente e, doze horas antes da realização dos experimentos, foram privados de ração. Os protocolos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEAA) desta instituição sob processo nº. 013/2005.

Teste da motilidade intestinal em camundongos

Neste ensaio, foram formados sete grupos experimentais (EM, FH, FD, FA, FB, FR e PO) e um controle, cada grupo com oito animais ($n = 8$). As amostras de *J. princeps* foram solubilizadas com 0,2 mL de *tween* 80 e suspensas em solução salina estéril (JANSSEN; JAGENEAU, 1957; WONG; WAI, 1981). Doses de 250, 500 e 1000 mg/kg foram administradas, via oral, nos respectivos grupos. No grupo controle foi aplicada solução salina acrescida de 0,2 mL de *tween* 80. Após 45 minutos da administração das amostras, os animais receberam uma solução de carvão ativo 10% em goma arábica a 5% (0,3 mL/animal) também por via oral e, transcorrido o mesmo período de tempo da aplicação dessa solução, foram sacrificados para extirpação do intestino desde o piloro até o início do ceco. As medidas do comprimento total do intestino delgado e da distância percorrida pelo carvão ativo, em centímetros, foram determinadas. Os resultados foram expressos em porcentagem do comprimento total do intestino delgado.

Avaliação da atividade antibacteriana

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada de acordo com o método de difusão em ágar (KONEMAN *et al.*, 1997), com modificações. O meio utilizado foi o ágar Anti-1 de dupla camada com suspensão a 1% da amostra bacteriana de referência previamente padronizada a 25% de transmitância. Foram utilizadas as seguintes amostras bacterianas de referência: *Staphylococcus aureus* ATCC 29737, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Salmonella typhimurium* ATCC 13111

e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 90271. Foram testadas soluções de 100 mg/mL de EM, FH, FD, FA, FB e FR. Cilindros de aço inox de diâmetro interno de 5,5 mm foram preenchidos com 50 µL, 100 µL e 250 µL de cada solução, em duplicata, contendo 5 mg, 10 mg e 25 mg, respectivamente. Como controle positivo de atividade empregou-se ampicilina (0,1 µg/mL). Após 24 horas de incubação a 37°C, o diâmetro do halo de inibição do crescimento foi medido em milímetros.

Bioensaio em *Artemia salina*

O bioensaio foi realizado transferindo 10 larvas de *Artemia salina* para tubos de ensaio, em quadruplicata, contendo as seguintes concentrações de EM, FH, FA, FD, FB e FR: 10, 50, 100, 500 e 1000 µg/mL. Os tubos foram mantidos sob iluminação e, após 24 horas de exposição aos extratos, procedeu-se à contagem do número de larvas sobreviventes. Neste teste, utilizou-se timol como controle positivo (MEYER *et al.*, 1982). A CI_{50} foi determinada pela regressão linear entre o logaritmo da dose fornecida e unidades probabilísticas de percentagem de mortos pelo teste dos probitos (LITCHFIELD; WILCOXON, 1949).

Análises estatísticas

Os resultados do teste da motilidade intestinal foram demonstrados através da média das porcentagens \pm erro padrão (EP). A análise de variância seguida do teste de Student Newman-Keuls foi usada para medir o grau de significância para $p < 0,05$ em relação ao controle.

RESULTADOS

O ensaio do trânsito intestinal em camundongos demonstrou significativo aumento da motilidade intestinal dos animais após administração do extrato metanólico, frações e semente pulverizada de *J. princeps* na dose de 1000 mg/kg, quando comparados ao grupo controle (Tabela 1). Este efeito também foi observado nas doses de 250 e 500 mg/kg após tratamento com o extrato metanólico, frações diclorometânica e residual e sementes pulverizadas.

Os resultados da atividade antibacteriana são mostrados na Tabela 2. Pela análise desta Tabela, observa-se que todas as amostras bacterianas testadas foram inibidas pelo extrato metanólico e fração residual na concentração de 25 mg. Nesta mesma concentração, verificou-se que as frações hexânica, diclorometânica, em acetato de etila e butanólica foram ativas frente *S. aureus*. As frações hexânica e diclorometânica também inibiram o crescimento de *Streptococcus mutans* e *Salmonella typhimurium*.

O teste de toxidez mostrou que o extrato metanólico e as frações hexânica, diclorometânica e butanólica foram ativos frente ao microcrustáceo *A. salina*, produzindo

CL50 de 56,28, 16,72, 14,82 e 67,29 µg/mL, respectivamente (Tabela 3). As frações hexânica e diclorometânica foram cerca de 20 vezes mais tóxica do que o timol, controle positivo.

TABELA 1

Distâncias percorridas pelo carvão ativo no intestino de camundongos sob a influência do tratamento das sementes de *J. princeps*

Grupos	Doses (mg/kg)	Média \pm EP (%)	Estímulo (%)
Controle	--	44,20 \pm 1,98	-
EM	250	51,75 \pm 1,22*	16,51
	500	55,31 \pm 0,91*	25,13
	1000	67,76 \pm 2,29*	53,30
FH	250	41,00 \pm 0,65	-
	500	41,87 \pm 1,52	-
	1000	83,67 \pm 1,77*	89,30
FD	250	51,00 \pm 1,00*	15,38
	500	54,44 \pm 1,20*	23,17
	1000	64,54 \pm 3,49*	46,02
FA	250	38,62 \pm 0,60	-
	500	39,63 \pm 1,25	-
	1000	51,98 \pm 0,85*	17,60
FB	250	39,38 \pm 0,84	-
	500	41,87 \pm 1,52	-
	1000	52,15 \pm 4,87*	17,99
FR	250	58,75 \pm 1,13*	32,92
	500	68,44 \pm 1,61*	54,84
	1000	90,52 \pm 2,15*	104,80
PO	250	54,62 \pm 0,94*	23,57
	500	61,58 \pm 1,21*	39,32
	1000	64,99 \pm 2,93*	47,04

*Significativo em relação ao controle para $p < 0,05$.

TABELA 2

Atividade antibacteriana das amostras obtidas das sementes de *J. princeps*

Amostra	Diâmetro do halo de inibição do crescimento (mm)				
	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>
EM 5 mg	11	-	-	-	-
EM 10 mg	13	-	-	-	-
EM 25 mg	16	11	12	10	10
FH 5 mg	-	-	-	-	-
FH 10 mg	-	-	-	-	-
FH 25 mg	11	10	-	12	-
FD 5 mg	-	-	-	-	-
FD 10 mg	-	-	-	-	-
FD 25 mg	12	13	-	12	-
FA 5 mg	-	-	-	-	-
FA 10 mg	-	-	-	-	-
FA 25 mg	12	-	-	-	-
FB 5 mg	-	-	-	-	-
FB 10 mg	-	-	-	-	-
FB 25 mg	11	-	-	-	-
FR 5 mg	12	-	-	-	-
FR 10 mg	13	-	12	10	10
FR 25 mg	16	13	14	12	12
Ampicilina 0,01 µg	24	20	20	26	19

TABELA 3

Citotoxicidade das amostras obtidas das sementes de *J. princeps* através do bioensaio em *A. salina*

Grupo	Concentração (µg/mL)	CL ₅₀ (µg/mL)	Intervalo de Confiança (95%)
EM	10, 50, 100, 500 e 1000	56,28	35,39 – 89,50
FH	10, 50, 100, 500 e 1000	16,72	7,03 – 39,74
FD	10, 50, 100, 500 e 1000	14,82	7,78 – 28,24
FA	10, 50, 100, 500 e 1000	> 1000	-
FB	10, 50, 100, 500 e 1000	67,29	23,73 – 89,50
FR	10, 50, 100, 500 e 1000	> 1000	-
PO	10, 50, 100, 500 e 1000	> 1000	-
Timol	10, 50, 100, 500 e 1000	346,67	248,56 – 483,53

DISCUSSÃO

A atividade laxante de *J. princeps* pode estar associada ao seu efeito propulsor da motilidade intestinal. Os resultados demonstraram que a boleira possui efeito laxante neste modelo testado, comprovando seu uso na medicina popular. Entretanto, estudos fitoquímicos são necessários para identificação da(s) substância(s) ativa(s), assim como investigações farmacológicas para elucidar os mecanismos de ação.

A atividade antibacteriana parece depender da concentração dos extratos testados. Entretanto, os resultados negativos no ensaio de difusão em ágar podem ser decorrentes de características lipofílicas dos extratos, pois meio de cultura que apresenta ágar como agente solidificante é considerado um gel perfeito para substâncias com características hidrofílicas (ROMEIRO, 2001). Deste modo, as amostras mais ativas foram aquelas com características hidrofílicas presentes no extrato metanólico e na fração residual. Apesar disto, os resultados da atividade antibacteriana demonstrados corroboram com o uso popular desta planta como antimicrobiano.

Na avaliação da toxidez de extratos de plantas pelo bioensaio em *A. salina*, valores de CL₅₀ abaixo de 1000 µg/mL são considerados bioativos (MEYER *et al.*, 1982). Através da aplicação da classificação de Meyer *et al.* (1982), o extrato EM e as frações FH, FD, FB foram considerados tóxicos contra *A. salina*. Estes resultados sugerem que as sementes de *J. princeps* têm potencial tóxico, requerendo estudos toxicológicos mais aprofundados antes de serem indicadas como fitoterápico.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram o potencial das atividades biológicas de *J. princeps*, incentivando novas pesquisas com intuito de identificar o princípio ativo. Além disto, comprova o uso popular das sementes como laxante.

REFERÊNCIAS

- ACHENBACH, H.; BENIRSCHKE, G. Joannesialactone and other compounds from *Joannesia princeps*. **Phytochemistry**, v.45, p.149-57, 1997.
- AZEVEDO, S. K. S.; SILVA, I. M. Plantas medicinais e de uso religioso comercializadas em mercados e feiras livres no Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Acta Bot Bras.**, v.20, p.185-94, 2006.
- BALBACH, A. **A Flora Nacional na Medicina Doméstica**. 17. ed. São Paulo: Edificação do Lar, 1989. 919p.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Quím Nova**, v.21, p.99-105, 1998.
- CHAVES, M. M. F.; DAVIDE, A. C. Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas de *Joannesia princeps* Vell. – Euphorbiaceae. **Rev Bras Sementes**, v.18, p.208-13, 1996.
- FREISE, F. W. Einig unbekante. Anthelminthica Brasiliens. **Deutsche Apotheker-Zeitung**, v.44, p.1480-2, 1929.
- JANSEN, P.; JAGENAU, A. H. A new series of potent analgesics. Part I - Chemical structure and pharmacological activity. **J Pharm Pharmacol**, v.9, p.381-400, 1957.
- JURY, S. L. **The Euphorbiales chemistry, taxonomy & economic botany**. San Diego: Academic Press, 1987. 326p.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C. ; JR. WINN, W. C. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1997. 1395p.
- LITCHFIELD, J. T.; WILCOXON, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. **J Pharmacol Exp Ther**, v.96, p.99-113, 1949.
- LOPES, W. P.; SILVA, A. F.; SOUZA, A. L.; MEIRA NETO, J. A. A. Estrutura fitossociológica de um trecho de vegetação arbórea no parque estadual do Rio Doce - Minas Gerais, Brasil. **Acta Bot Bras**, v.16, p.443-56, 2002.
- MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; McLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active constituents. **Planta Med**, v.45, p.31-4, 1982.
- MORS, W. B. ; RIZZINI, C. T. **Useful plants of Brazil**. San Francisco: Holden Day Inc., 1966. 160p.
- ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: Editora UFV, 2001. 279p.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática – guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2005. 640p.

WAIBEL, R.; BENIRSCHKE, G.; BENIRSCHKE, M.; ACHENBACH, H. Sesquieolignans and other constituents from the seeds of *Joannesia princeps*. **Phytochemistry**, v.62, p.805-11, 2003.

WONG, C. L.; WAY, M. K. Effects of aspirin and paracetamol on naloxone reversal or morfine-induced inhibition of gastrointestinal in mice. **Eur J Pharmacol**, v.73, p.11-9, 1981.

Enviado em 28/09/2007

Aprovado em 22/11/2007

Cada autor deve ler e assinar os documentos (1) Declaração de Responsabilidade e (2) Transferência de Direitos Autorais.

Primeiro autor:

Título do manuscrito:

Declaração de Responsabilidade:

Todas as pessoas relacionadas como autores devem assinar declaração de responsabilidade nos termos abaixo:

- Certifico que participei suficientemente do trabalho para tornar pública minha responsabilidade pelo seu conteúdo.
- Certifico que o manuscrito representa um trabalho original e que nem este manuscrito, em parte ou na íntegra, nem outro trabalho com conteúdo substancialmente similar, de minha autoria, foi publicado ou está sendo considerado para publicação em outra.
- Atesto que, se solicitado, fornecerei ou cooperarei totalmente na obtenção e fornecimento de dados sobre os quais o manuscrito está baseado, para exame dos editores.»
- No caso de manuscritos com mais de 6 autores a declaração deve especificar o nível de participação de cada autor. Conforme abaixo exemplificado.
- Certifico que:
 1. Contribuí substancialmente para a concepção e planejamento ou análise e interpretação dos dados;
 2. Contribuí significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo;
 3. Participei da aprovação da versão final do manuscrito.

Nome por extenso do(s) autor(es) Data

autor:.....data:.....
autor:.....data:.....
autor:.....data:.....
autor:.....data:.....

2. Transferência de Direitos Autorais: “Declaro que em caso de aceitação do artigo pela HU Revista, concordo que os direitos autorais a ele referentes se tornarão propriedade exclusiva da HU Revista, vedada qualquer reprodução, total ou parcial, em qualquer outra parte ou meio de divulgação, impressa ou eletrônica, sem que a prévia e necessária autorização seja solicitada e, se obtida, farei constar o competente agradecimento à HU Revista.”

(exemplo página 112)

Nome por extenso do(s) autor(es) e data

autor:.....data:.....
autor:.....data:.....
autor:.....data:.....
autor:.....data:.....