

DETERMINAÇÃO DA DL₅₀ DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *OCIMUM BASILICUM* EM CAMUNDONGOS *MUS MUSCULUS*

NOÉLE BETTEZ PEREIRA¹, RODRIGO BITTENCOURT DE BORBA¹, VIVIANE CARDOSO¹, LETICIA COSMO RODERJAN¹, WESLEY MAURÍCIO DE SOUZA² e LUCIANA NOWACKI³.

1- Acadêmicos do Curso Superior de Tecnologia em Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba, PR).

2- Farmacêutico Bioquímico, Prof. Dr^o da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba, PR).

3- Bióloga, Profa. Mestre da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba, PR).

Endereço eletrônico para correspondência: Luciana Nowacki ,
luciana.nowacki@utp.br

Endereço: Heitor Baggio Vidal, 1103, casa. Bairro Alto, Curitiba, PR
CEP 82.820-120. Telefone: 4188554070

Resumo

O manjeriçao, *Ocimum basilicum* L., pertence à família Lamiaceae, possui entre 50 e 150 espécies na Ásia Tropical, África, América Central e América do Sul. É uma planta arbustiva originária do norte da Índia, utilizada popularmente como estimulante digestivo, anti espasmódico, antisséptico e béquico. Os testes de DE₅₀ e DL₅₀ foram feitos com a intenção de encontrar a dose Letal e Específica do *Ocimum Basilicum* L. Durante o período de testes com a DL₅₀ os animais apresentaram alguns sinais de toxicidade, porém não letais até a dose de 2700 mg/kg. A DL50 para via intraperitoneal foi calculada pelo método de Karber e Behrens (1964), sendo estabelecida em 900 mg/kg. Já na DE₅₀, foram analisadas reações em camundongos da espécie *Mus Musculus*, desde contorções abdominais, aderência de pata, bradicardia, pilo ereção, com doses de 100mg/kg; 300mg/kg; 600mg/kg. Observou-se que em todas as doses os camundongos tiveram as mesmas reações. Nas doses mais baixas elas demoraram mais tempo para acontecerem, e nas doses mais altas elas aconteceram mais rapidamente. Esses resultados foram se modificando de acordo com as aplicações. A cada dia de tratamento os camundongos respondiam mais lentamente às doses, as reações demoravam mais tempo para acontecerem e duravam menos tempo.

Palavras-chave: *Ocimum Basilicu*, toxicidade, contorções abdominais

Abstract

The basil, *Ocimum basilicum* L., belongs to the family Lamiaceae, it has between 50 and 150 species in tropical Asia, Africa, Central America and South America. It is a shrub plant native to northern India, popularly used as a digestive stimulant, antispasmodic, antiseptic and cough medicine. The DE₅₀ and DL₅₀ tests were made with the intention of finding the Lethal and Specific doses of *Ocimum basilicum* L. During the tests period with the DL₅₀ the animals showed some signs of toxicity, but not lethal until the dose of 2700 mg/kg. The DL50 for intraperitoneal route was calculated by the Karber and Behrens method (1964), being established at 900 mg/kg. In the DE₅₀ were analyzed reactions in mice of *Mus Musculus* species, since abdominal contortions, paw adherence, bradycardia, pilo erection, with doses of 100mg/kg; 300mg/kg; 600mg/kg. It was observed that in all doses, the mice had the same reactions. At lower doses they took longer to happen, and at higher doses they happened more quickly. These results have been modified according to the applications. Each day of treatment, the mice responded more slowly to the doses, the reactions took longer to happen and lasted less time.

Keywords: *Ocimum Basilicum*, toxicity, abdominal contortions

1. Introdução

A história do uso de plantas medicinais tem mostrado que elas fazem parte da evolução humana e foram os primeiros recursos terapêuticos utilizados pelos povos. (Dorta EJ, 1998).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) acredita que, atualmente, a prática do uso de plantas medicinais é tida como a principal opção terapêutica de aproximadamente 80% da população mundial. O mercado mundial de fitoterápicos movimenta cerca de US\$ 22 bilhões por ano. Em 2000 o setor faturou US\$ 6,6 bilhões nos EUA e US\$ 8,5 bilhões na Europa. No Brasil estima-se que o comércio de fitoterápicos seja da ordem de 5% do mercado total de medicamentos, avaliado em mais de US\$ 400 milhões. (Pinto CA. Et al., 2002)

Dentro do consumo de plantas medicinais, e das relações com a fitoterapia, entre essas plantas encontra-se o Manjeriçãõ (*Ocimum basilicum* L.), pertence à família *Lamiaceae*, possuindo entre 50 e 150 espécies na Ásia Tropical, África, América Central e América do Sul (Labra, M. et al., 2004; Stuart, G. R, 1995) . Tem sido relatado que o teor de óleo essencial contido nesta planta encontra-se na faixa entre 1,5 e 3% (p/p), dependendo da região geográfica e da espécie (Stuart, G. R, 1995). Normalmente, há variações consideráveis entre os constituintes majoritários de uma espécie para outra, principalmente pelo fato dos componentes do óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. serem produzidos por duas rotas bioquímicas diferentes: rota do ácido chiquímico e rota do ácido mevalônico (Özcan, M. et al., 2002).

O extrato de *Ocimum basilicum* L. apresenta grande potencial de aplicação como agente antimicrobiano, agente medicinal, como caracterizador de sabor em alimentos e fragrância em produtos farmacêuticos (Labra, M. et al., 2004; Di Cesare, L. F. et al., 2003). A literatura é ampla em trabalhos referentes à obtenção de extratos de *Ocimum basilicum* L. empregando diferentes técnicas de extração, entre elas: hidrodestilação (Labra, M. et al., 2004; Özcan, M. et al., 2002; Lachowicz, K. J. et al., 1997; Menaker, A. et al., 2004; Diaz-Maroto, M. C. et al., 2002), extração supercrítica (Stuart, G. R, 1995; Lachowicz, K. J. et al., 1997; Menaker, A. et al., 2004; Diaz-Maroto, M. C. et al., 2002) e extração com solventes, tendo sido avaliados rendimento e composição química dos extratos, atividade antimicrobiana, características sensoriais e efeito do processo de secagem na composição química (Di Cesare, L. F. et al., 2003).

O manjeriço, *Ocimum basilicum* L., 1753 (*Lamiaceae*) é uma planta arbustiva originária do norte da Índia, utilizada popularmente, em forma de chá, como estimulante digestivo, anti espasmódico, antisséptico e béquico (Martins et al., 1994). Em condições de cortes sucessivos, a espécie apresenta boa produtividade até o segundo ano de cultivo. A senescência da parte aérea é mais rápida em situação de fertilizações pouco freqüentes, baixa disponibilidade hídrica e baixas temperaturas durante o inverno (Jorge et al., 1992; Kamada et al., 1999; Sartório et al., 2000).

O princípio ativo das plantas medicinais e aromáticas é mediado por meio de substâncias químicas pertencentes a diferentes categorias de compostos, tais como fenóis, terpenos, alcalóides, poliacetilenos, ácidos graxos, peptídeos, entre outros (Periotto et al., 2004). Quando estes compostos apresentam alguma propriedade inibitória, pode afetar a germinação de sementes de várias espécies, sendo a sensibilidade destas, variável com a concentração aplicada (Hruska et al., 1982).

O estudo da DL50 é de extrema importância para toxicologistas, pois existe uma relação gradativa da DL50 em determinados indivíduos e uma dose quântica para a população. Essas doses gradativas de um fármaco administrado a determinado indivíduo geralmente levam ao aumento da magnitude da resposta à medida que a dose aumenta. E é através da DL50 que se estabelecem as medidas de segurança a serem seguidas para reduzir os riscos que o produto pode apresentar à saúde humana.

Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivo, a partir da produção do extrato hidroalcoólico das folhas de *Ocimum basilicum*, determinar a DL₅₀ a curto e a longo prazo, após o tratamento de sete dias e vinte e um dias.

2. Materiais e Métodos

2.1 Animais

Os camundongos foram submetidos ao comitê de ética da Universidade Tuiuti do Paraná, com o protocolo 007-11p.

Em todos os experimentos, utilizou-se camundongos, machos e fêmeas, da raça *Mus Musculus*, mantidos no laboratório de Farmacologia da Universidade Tuiuti do Paraná, em condições de temperatura 21-22°C constante; luminosidade 12hs claro/12hs escuro; gaiolas plásticas individuais forradas com maravalha; água e ração *ad libitum*. Os animais tiveram livre acesso à água e à ração.

2.2 Material botânico e obtenção da matéria prima

Foram utilizadas folhas de *Ocimum basilicum*, adquiridas no Mercado Municipal de Curitiba/PR. O material foi pesado em balança semi-analítica, e armazenado em local seco e arejado.

O material vegetal foi identificado pelo Osmar dos Santos Ribas, chefe de serviço curadoria herbário MBM. E o *Ocimum basiculum L.* foi tombado no acervo do MBM, cujo número de registro é 364260

2.3 Obtenção do extrato

O extrato hidroalcoólico foi produzido segundo a orientação do processo da Farmacopéia Brasileira (Dias da Silva, 1929), adaptado por Younes *et al.*, (2000), onde misturou-se o manjeriço com a solução hidroalcoólica (álcool etílico 70%). Essa solução foi estocada à temperatura ambiente, protegida da luz por um período de 7 dias, em seguida foi feita a filtragem do material. A partir da solução filtrada, produziu-se o extrato com auxílio do rotaevaporador a 50°C retirando-se todo o solvente. Em seguida o extrato foi liofilizado para completa evaporação da água, obtendo-se o extrato bruto hidroalcoólico do manjeriço, com um rendimento de 8,85%.

2.4 Metodologia

2.4.1 Determinação da DL₅₀ aguda

Para a determinação da DL₅₀ aguda os animais foram diferenciados entre si com solução corante de ácido pícrico e de forma aleatória.

Os espécimes foram divididos em seis grupos, sendo eles e suas respectivas dosagens: G1 – grupo controle; G2 – 100mg/kg; G3 – 300mg/kg; G4 – 900mg/kg; G5 – 2700mg/kg; G6 – 5000mg/kg, obtendo-se um total de 36 camundongos, sendo o grupo controle tratado com salina e todos os grupos receberam o volume padrão de 10ml/kg.

As injeções foram realizadas por via intraperitoneal do lado esquerdo, após anti-sepsia da pele com álcool etílico a 70 °GL.

Logo após as administrações os animais foram colocados sob a bancada para observação das alterações comportamentais dos animais.

A DL₅₀ foi estabelecida pelo método de Karber & Behrens (1964) a partir da determinação de D1 (maior dose de sobrevivência) e D2 (menor dose de letalidade), traduzidos pela seguinte fórmula:

$$DL50 = \frac{DF - \sum (A.B)}{N}$$

Onde:

DF = dose mínima capaz de matar todos os animais

A = diferença entre duas doses consecutivas

B = animais mortos entre duas doses consecutivas

n = número total de animais por lote

2.4.2 Teste de toxicidade de 7 dias de tratamento

Após a determinação da DL₅₀ as doses foram reduzidas a um padrão seguro de dosagem e os animais foram tratados durante setes dias consecutivos uma vez ao dia com as doses de 150, 300 e 600 mg/kg ip., sendo o grupo controle tratado com salina . todas as administrações foram realizadas seguindo o volume padrão de 10ml/kg.

2.4.3 Testes com dosagem de vinte e um dias

Os espécimes foram divididos em quatro grupos, sendo eles e suas respectivas dosagens: Salina – grupo controle; G1 – 150mg/kg; G2 – 300mg/kg; G3 – 600mg/kg, com um total de 24 camundongos.

O grupo controle foi tratado durante os vinte e um dias com salina e os demais grupos foram tratados, pela sua respectiva dosagem, com o extrato de *Ocimum basilicum L.*

3. Resultados e Discussão

3.1 Determinação da DL₅₀ aguda

A partir das dosagens aplicadas, e com o cálculo da fórmula de Karber & Behrens (1964) obteve-se a DL₅₀ de 350 mg/kg. Segundo Schuartsman (1980), a classificação de toxicidade do cravo-da-índia de 255mg/kg para uso intraperitoneal

tem sua definição como muito tóxico (grau 4), com a DL₅₀ do manjeriço de 350mg/kg, podemos classificá-lo, também em grau 4, como muito tóxico.

$$DL50 = \frac{DF - \sum (A.B)}{N} = \frac{2700 - (200.3)}{6} = 350\text{mg/kg}$$

A classificação da toxicidade relativa dos agentes químicos de acordo com a DL50 seguiu a proposta de Silva (2006): grau 6 (DL50 < 5 mg/kg) = supertóxico; grau 5 (DL50 = 5-50 mg/kg) = extremamente tóxico; grau 4 (DL50= 50-500 mg/kg) = muito tóxico; grau 3 (DL50 = 0,5-5 g/kg) = moderadamente tóxico; grau 2 (DL50 = 5-15 g/kg) = pouco tóxico; grau 1 (DL50 >15 g/kg) = praticamente atóxico. (Rômulo et.al 2009)

Do ponto de vista toxicológico, toda substância pode ser considerada um agente tóxico, dependendo das condições de exposição: dose administrada ou absorvida, tempo e frequência de exposição e vias de administração (Barros & Davino, 1996).

Nas dosagens de 5000mg/kg e 2700mg/kg de EBH, todos os camundongos foram a óbito após contorções abdominais, miose e redução da frequência respiratória, segundos após a aplicação.

Na dosagem de 300mg/kg, os camundongos tiveram piloereção, dificuldade respiratória, contorções abdominais, miose e sonolência. Apenas um camundongo desse grupo foi a óbito minutos após a aplicação.

Na dosagem de 100mg/kg foi observado dificuldade respiratória, miose, piloereção e contorções abdominais. Nenhum dos camundongos desse grupo foi a óbito.

4.2 Teste com dosagem de 7 dias

No intuito de observar a toxicidade a longo prazo foi realizada a administração de EBH durante 7 e 21 dias. Durante todas as aplicações, 90% dos grupos com doses de 150mg/kg apresentaram bradicardia, dificuldade respiratória, miose e camundongos que não tinham apreensão de pata.

No teste de toxicidade subcrônica durante 7 dias, observamos que apesar alterações de comportamento não obteve-se óbitos, o que demonstra que o EBH de *Ocimum basilicum L.* não possui toxicidade aguda a curto prazo (7dias). Como o tratamento teve uma duração de sete dias, não podemos definir se, após esses sete dias, algum dos camundongos teria ido a óbito.

4.3 Teste com dosagem de 21 dias

Na doses de 300mg/kg, as contorções abdominais e dificuldades respiratórias foram mais freqüentes. Nesse grupo tivemos dois óbitos, além de todos os camundongos apresentarem, também, bradicardia, piloereção.

Bradicardia, piloereção, dificuldade respiratória, camundongos sem apreensão de pata e contorções abdominais também foram observados mais rapidamente nos camundongos com as dosagens de 600mg/kg, pois eles respondiam mais rapidamente às doses após a aplicação.

Porém, quando administrado durante 21 dias, obtivemos óbitos nas doses de 300mg/kg mas não na dose de 600 mg/kg, o que sugere muito mais um erro de administração do experimentador do que a toxicidade do extrato propriamente dito. Pois, caso isso tivesse ocorrido, teríamos visualizado mortes na maior dose (600mg/kg). Os dados obtidos de comportamento a partir da dose de 300 mg/kg sugerem que os animais apresentaram dor abdominal devido as contorções abdominais (Hunskaar & Hole, 1987), pois segundo Hunskaar & Hole (1987), as contorções abdominais são demonstrativos de dor comportamental.

Segundo Cosendey et. al 2000, o manjeriço tem propriedades estimulantes, porém, com os efeitos de miose intensa, queda na respiração e frequência cardíaca, redução da atividade motora e prostração animal que demonstram um efeito sedativo do SNC, consideramos que o manjeriço é uma planta com propriedades sedativas.

4. Conclusão

Os resultados obtidos nesse estudo mostram que o *Ocimum basilicum* é um agente tóxico quando isolado em forma de extrato hidroalcoólico aplicado por via intraperitoneal, dependendo da dose administrada ou absorvida, tempo e a freqüência de exposição.

7. Referências Bibliográficas

ALVES, M.C.S. et al. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.11, p.1083-6, 2004.

Antonelli, A.; Fabbri, C.; Boselli, E.; *Food Chem.* **1998**, 63, 485.

BLANK, A.F. et al. Novas Cultivares Maria Bonita: cultivar de manjeriço tipo linalol. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.42, n.12, p.1811-3, 2007.

Barros SBM, Davino SC 1996. Avaliação da toxicidade. In: Oga, S. *Fundamentos de Toxicologia*. 1.ed. São Paulo: Atheneu.

Di Cesare, L. F.; Forni, E.; Viscardi, D.; Nani, R. C. J.; *Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 3575.

DIAS DA SILVA, R.A. **Pharmacopéia dos Estados Unidos do Brasil**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, p. 634, 1929.

Diaz-Maroto, M. C.; Pérez-Coelho, M. S.; Cabezudo, D.; *J. Chromatogr., A* **2002**, 947, 23.

Dorta EJ. Introdução. In: Escala Rural: especial de plantas medicinais. 1(4):1-62. São Paulo: Escala Ltda; 1998.

Esmelindro, A. A.; Girardi, J. S.; Mossi, A.; Jacques, R.; Dariva, C.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 1990.

Esmelindro, M. C.; Toniazzo, G.; Lopes, D.; Oliveira, D.; Dariva, C.; *J. Food Eng.* **2005**, 70, 588.

Farias, M. R. Em *Farmacognosia da planta ao medicamento: Avaliação da Qualidade de matéria primas vegetais*; Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; de Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R., eds.; 5ª ed., UFSC e UFRGS Ed.: Porto Alegre, 1999.

Goff J. As doenças têm história. 2a ed. Lisboa: Terramar; 1997.

Grams WFMP. Plantas medicinais de uso popular em cinco distritos da ilha de Santa Catarina Florianópolis, SC [dissertação]. Curitiba (PR): Setor de Ciências Biológicas da UFPR; 1999.

Guenter, E.; *The essential Oils*, Krieger Publishing Company, 1974, vol. III.

HRUSKA, A.F.; DIRR, M.A.; POKORNY, F.A. Investigation of anthocyanic pigments and substances inhibitory to seed germination in the fruit pulp of *Liriope muscari*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.107, p.468-73, 1982.

Hunskar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 1987; 30:103-4.

JORGE, L.I.F.; ROQUE, N.F.; FERRO, V.O. *Ocimum micranthum* Willd: manjeriço do Brasil: caracterizações histológica e química. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.52, n.2, p.47-50, 1992.

KAMADA, T. et al. Plasticidade fenotípica do óleo essencial em acessos de manjeriço (*Ocimum* spp.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.1, n.2, p.13-22, 1999.

Labra, M.; Miele, M.; Ledda, B.; Gras, F.; Mazzei, M.; Sala, F.; *Plant Sci.* **2004**, *167*, 725.

Lachowicz, K. J.; Jones, G. P.; Briggs, D. R.; Bienvenu, F. E.; Palmer, M. V.;

Mishra, V.; Hunter, M. M.; *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 2660.

Lawrence, B. M. Em *Advances in Labiatae Science*; Harley, R. M.; Reynolds, T., eds.; Ed. The Royal Botanic Gardens Kew, 1992.

Leite SN. Além da medicação: a contribuição da fitoterapia para a saúde pública [dissertação]. São Paulo (SP): Departamento de Saúde Materno-Infantil da Faculdade de Saúde Pública/USP; 2000.

Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. São Paulo: Instituto Plantarum; 2002.

MARASCHIN-SILVA, F.; AQÜILA, M.E.A. Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Acta Botânica Brasílica**, v.20, n.1, p.61-9, 2006.

Martins ER, Castro DM, Castellani DC, Dias JE. Plantas medicinais. Viçosa: Ed. UFV; 2000.

MARTINS, E.R. Estudos em *Ocimum selloi* Benth: isoenzimas, morfologia e óleo essencial. In: MING, L.C. **Plantas medicinais, aromáticas e condimentares**: avanços na pesquisa agrônômica. Botucatu: UNESP, 1998. p.97-126.

MARTINS, E.R. et al. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 1994. 220p.

Menaker, A.; Kravets, M.; Koel, M.; Orav, A.; *C. R. Chim.* **2004**, 7, 629.

Özcan, M.; Chalchat, J. C.; *Czech J. Food Sci.* **2002**, 20, 223.

PERIOTTO, F. et al. Efeito alelopático de *Andira humilis* Mart. ex Benth na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. **Acta Botânica Brasílica**, v.18, n.3, p.425-30, 2004.

PICCOLO, G. et al. Efeito alelopático de capim limão e sabugueiro sobre a germinação de guanxuma. **Ciências Agrárias**, v.28, n.3, p.381-6, 2007.

Pinto CA, Silva DHS, Bolzani US, Lopes NP, Epifânio RA. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quim. Nova.* 2002 Mar-Abr; 25(1 supl.):45-61.

Plantas que curam. A natureza a serviço da sua saúde. v.1. São Paulo: Três livros e fascículos; 1983.

RABELO, M. et al. Antinociceptive properties of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae). **Brazilian Journal Medical and Biological Research**, v.36, p.521-4, 2003.

Rômulo et. al. **Estudo toxicológico pré-clínico (agudo) do extrato do *Syzygium aromaticum* (L) em roedores**. Programa Integrado de Pós-Graduação em Odontologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 2009

SARTÓRIO, M.L. et al. **Cultivo de plantas medicinais**. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 2000. 260p.

Silva ECB 2006. *Avaliação biológica de Caesalpinia echinata Lam.- Fabaceae/Caesalpinioideae – usos e riscos*. Recife, 116 p. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco.

SOUZA, C.S.M. et al. Alelopatia do extrato aquoso de folhas de aroeira na germinação de sementes de alface. **Revista Verde**, v.2, n.2, p.96-100, 2007.

SOUZA-FILHO, A.P.S. et al. Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*. **Planta daninha**, v.24 n.4, p.649-56, 2006.

Stuart, G. R.; *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 1995.

Viña, A.; Murillo, E.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, *14*, 744.

YOUNES, R.N.; VARELLA, A.D; SUFFREDINI, I.B. Extração e rastreamento de novas drogas em plantas brasileiras. **Ata Oncologia Brasileira**, v. 20, p. 15-19, 2000.