

Avaliação da captação de glutamato em culturas de células de retina de embrião de galinha provocados pelo Acetato de Cunaniol.

*Raimundo Negrão Neto¹(PG), Moisés Hamoy²(PG), Milton N. da Silva¹(PQ), Sandra C. R. Monteiro¹(IC), Ana C. M. dos Santos¹(IC), Alberto C. Arruda¹(PQ), Paulo R. da C. Sá¹(PG)
negraoneto@yahoo.com.br

¹ Instituto de Ciências Exatas e Naturais/PPGQ/Universidade Federal do Pará.

² Instituto de Ciências Biológicas/PPGCB/Universidade Federal do Pará.

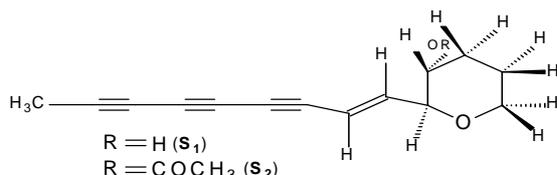
Palavras Chave: Acetato de Cunaniol, HPLC, glutamato.

Introdução

Clibadium sylvestre (Compositae) e é amplamente distribuída na região Amazônica, onde é conhecida como **cunambi**, sua ingestão causa “embriaguez”, ou mesmo morte dos peixes, por esse motivo é usada por índios e caboclos brasileiros na pesca predatória. O presente trabalho objetiva fazer um estudo químico e biológico das folhas de *Clibadium sylvestre*. A partir do extrato hexânico foram isolados por HPLC o Cunaniol (**S₁**) e o Acetato de Cunaniol (**S₂**). Apenas a substância **S₂** foi utilizada nos testes biológicos.

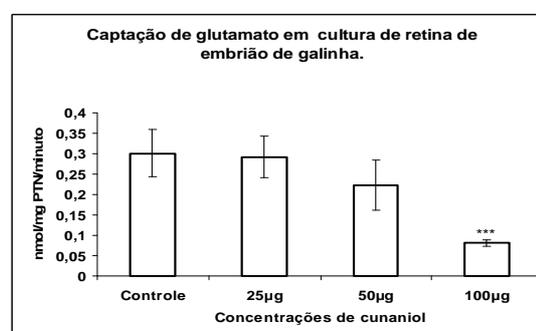
Resultados e Discussão

O extrato hexânico das folhas de *Clibadium sylvestre* foi fracionado em CCVU, utilizando-se misturas de solventes com polaridade crescente, resultando num total de 4 frações: Hex- AcOEt 10%, 30%, 50% e 100%. As frações obtidas foram monitoradas através de CCDC, em seguida reunião e pré-tratamento em SPE das frações 30% e 50%, sendo posteriormente injetadas em alíquotas de 500 µL no sistema HPLC semipreparativo da marca VARIAN. Para o isolamento das substâncias **S₁** e **S₂**, utilizou-se um sistema isocrático de H₂O/CH₃CN 60% (fase móvel) e como fase estacionária uma coluna semipreparativa Gemini C18 (250 x 10mm), 5 µm e pré-coluna C18, monitorada em um comprimento de onda de 242nm com fluxo de 4.7 ml/min, obtendo-se 49 mg de **S₁** e 335 mg de **S₂**. As substâncias isoladas tiveram suas estruturas elucidadas, através da análise dos dados espectrais de RMN de hidrogênio e carbono-13, comparados aos dados da literatura.



Culturas mistas de células de retina foram tripsinizadas e colocadas em placas com meio DEMEM para crescimento em estufa de CO₂. A captação de glutamato foi feita no sétimo dia de crescimento da cultura, após a qual foram

incubadas por 10min com diferentes doses de Acetato de Cunaniol. Em seguida foram adicionados 10µl de glutamato marcado (0,25µCi/ml). As células foram lavadas e destruídas com TCA (ácido tricloroacético) a 5%. 150 µl da amostra foram utilizados para dosagem de proteína segundo método de Bradford (1976).



*** P<0,005

A substância acetato de cunaniol possui influência sobre a via Glutamatérgica possibilitando menos captação do neurotransmissor em células de retina de pintos em fase embrionária.

Conclusões

Os resultados observados nestes testes bioquímicos sugerem que a substância acetato de cunaniol possui influência sobre a via Glutamatérgica possibilitando menos captação do neurotransmissor em células de retina de pintos em fase embrionária e que um dos mecanismos pelo qual é provocada a excitabilidade dos animais *in vivo* seria a maior concentração do neurotransmissor glutamato fora das células agindo em seus receptores.

Agradecimentos

A Universidade Federal do Pará pela infra-estrutura para realização do trabalho.

¹ BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* (1976), 72. 248-254

² COSTA, E. A. et al. Behavioral effects of a neurotoxic compound isolated from *Clibadium surinamense* L.(Asteraceae). *Neurotoxicology and Teratology* (2006), 28(3), 349-353.

³ HAMOY, M. Convulsões induzidas pelo extrato aquoso de *Clibadium sylvestre*, um modelo experimental de epilepsia generalizada. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Pará, Belém. 2002. 70 p.