



# Screening de plantas com potencial fitotóxico

## Screening of plants with potential phototoxic

Recebido em 04/11/2011

Aceito em 30/11/2011

Allana M. Lacerda<sup>1\*</sup>, Ana Karina Modolo<sup>1</sup>, Rosemary C. Matias<sup>2</sup>, Hemerson Pistori<sup>3</sup>, Mami Yano<sup>4</sup>, Antonia R. Roel<sup>5</sup>, Karla R. A. Porto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Curso de Nutrição, Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), 79117-900, Campo Grande, MS, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Anhanguera, Uniderp, 79003-010, Campo Grande, MS, Brasil

<sup>3</sup>GPEC, Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), 79117-900, Campo Grande, MS, Brasil

<sup>4</sup>Curso de Farmácia, Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), 79117-900, Campo Grande, MS, Brasil

<sup>5</sup>Mestrado em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), 79117-900, Campo Grande, MS, Brasil

### RESUMO

A obtenção de medicamentos a partir de metabólitos secundários de plantas, bem como o desenvolvimento de pesticidas, tem despertado grande interesse da pesquisa. O bioma Cerrado possui uma das maiores floras do mundo, compondo um cenário exuberante da diversidade biológica. Neste trabalho, um *screening* foi realizado com plantas coletadas no Cerrado, para avaliar o seu potencial fitotóxico e na biomonitorização, para: *Nerium oleander*, *Tithonia diversifolia*, *Myracrodruon urundeuva urundeuva* e *Maclura tinctoria*. A avaliação da atividade biológica procurou definir o nível de toxicidade, expressa em uma concentração letal, em *Artemia salina* L. Para todos os extratos, observou-se uma toxicidade elevada, porque os valores definidos em g/mL residem na faixa definida na literatura como de alta letalidade, inferior a 80 mg/ml e as concentrações intermediárias entre 80 e 250 g/mL. Apresentado em ordem de maior toxicidade, os extratos de *M. tinctoria* (CL<sup>50</sup> 21mg/ mL), *T. diversifolia* (CL<sub>50</sub> 21 mg/mL), *N. oleander* (CL<sub>50</sub> 27,7 mg /mL) e *M. urundeuva* (CL<sub>50</sub> mg 39,38 / mL). Estes dados fornecem informações para o conhecimento das espécies de plantas para trabalhos futuros e na identificação de princípios ativos.

**Palavras-chave:** *Artemia salina*, extratos vegetais, toxicidade

### ABSTRACT

Obtaining drugs from secondary metabolites which are extracted from plants, as well as the development of pesticides, has aroused the interest of researchers. The Cerrado biome has one of biggest floras in the world, comprising of a vast biological diversity of plants. In the course of this work, plants that were collected in the Cerrado were assessed for potential phytotoxic and a biomonitoring, to: *Nerium oleander*, *Tithonia diversifolia*, and *Myracrodruon urundeuva* and *Maclura tinctoria*. The evaluation of biological activity sought to define the level of toxicity expressed in a lethal concentration (LC) of *Artemia salina* L. A high toxicity was observed in all extracts, this compared to the acceptable literature level, would be considered lethally high. Presented in order of levels of toxicity, extracts from *M. tinctoria* (LC<sub>50</sub> 21mg / mL), *T. diversifolia* (LC<sub>50</sub> 21 mg/ mL), *N. oleander* (LC<sub>50</sub> 27.7 mg/ mL) and *M. urundeuva* (LC<sub>50</sub> 39.38 mg/ mL). The data gathered regarding plants proved to be potentially informative for future research.

**Keywords:** *Artemia salina*, plant extracts, toxicity

### INTRODUCTION

A abordagem etnobotânica, ou seja, o estudo das plantas a partir de seu uso constitui um aparato útil na elaboração de estudos farmacológicos e fitoquímicos para definição dos potenciais medicinais e tóxicos (Vila Verde *et al.*, 2003).

A obtenção de fármacos a partir de metabólitos secundários de origem vegetal, bem como o desenvolvimento de fitofármacos, vem despertando grande interesse tanto nas pequenas como nas grandes indústrias

\* **Contato:** Allana M. Lacerda, Curso de Nutrição, Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), CEP: 79117-900, Campo Grande, MS, Brasil, e-mail: allanaa.ml@gmail.com

farmacêuticas. Assim, ganha destaque o estudo dos compostos bioativos presentes em extratos de plantas que possam ser executados nos laboratórios de fitoquímica

Neste trabalho, foi realizado um *screening* de plantas coletadas no Cerrado com intuito de conhecer seu potencial fitotóxico e servir de biomonitoramento nos estudos fitoquímicos e etnobotânicos frente à *Artemia salina* L. Ao se tratar das características das plantas, temos: *Nerium oleander* também denominada espirradeira ou flor de são José, é uma planta arbustiva, que atinge de 2 a 4 m de altura. As folhas têm forma de lança e as flores são vistosas, com cores variadas (brancas e rosas). Os frutos possuem sementes revestidas de pêlos. Todas as partes da planta são tóxicas, causando efeitos cardíacos e neurológicos. A intoxicação pode ocorrer por ingestão de partes do vegetal ou por água contaminada com flores ou folhas. Os sintomas são vômitos, dor abdominal, diarreia, distúrbios do equilíbrio, sonolência, taquicardia, parada cardíaca, coma e morte (Cit, 2009).

Outro espécime estudado, a *Tithonia diversifolia* popularmente chamada de girassol-mexicano, é usada na medicina folclórica no tratamento de dores de garganta, problemas de estômago, indigestão e no fígado, contém compostos bioativos que possuem atividade anti-inflamatória, antidiarreica, antiamebíica e atividade espasmolítica (Fiocruz, 2009).

Sobre a *Myracrodruon urundeuva* conhecida como aroeira, tem referência de grande importância econômica ressaltada sob vários aspectos como aproveitamento da madeira. A casca é muito utilizada em curtumes; os seus extratos farmacológicos têm eficácia comprovada no tratamento de úlceras estomacais e suas folhas quando maduras servem de alimentação para o gado (Cit, 2009).

Já a *Maclura tinctoria* conhecida como amora brava, além de ser usada pelas comunidades rurais para tratar o Diabetes, é usada também como remédio para o combate de outras enfermidades relacionadas à dor (Embrapa, 2009).

O ensaio de letalidade, utilizando como bioindicador a *Artemia salina* L. permite realizar a avaliação da toxicidade envolvendo apenas um parâmetro: vida ou morte, sendo, então, considerado como ensaio preliminar na identificação de compostos bioativos de baixo custo e fácil manuseio (Cavalcante *et al.*, 2000).

## MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais vegetais utilizados no presente estudo foram obtidos em dois locais do município de Campo Grande, MS, Brasil. As espécies *Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud. (Moraceae) (CGMS 25355), *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Anacardiaceae) (CGMS 25728) e *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (Asteraceae) (CGMS 25729) foram coletados na reserva da Embrapa-CNPq e identificados pelo botânico Dr. Arnildo Pott, os exemplares estão depositados no herbário da UFMS e a espécie *Nerium oleander* L. (CGMS 7125) foi coletado num fragmento de Cerrado do Campus Agrárias da Uniderp/Anhanguera e identificado pela botânica Eloty Justina Dias Scheleder e o exemplar está depositada no herbário da Uniderp/Anhanguera.

Todos os materiais, após a coleta, foram separados em galhos e folhas e colocados para secar em estufa de circulação de ar à 40°C. Após a secagem, os materiais botânicos foram triturados e colocados para extrair em maceração estática em etanol. O extrato bruto etanólico de folhas e de galhos, foram filtrados e secos por rotaevaporação.

A avaliação da atividade biológica observada para os testes buscou avaliar o nível de toxicidade expresso como a Concentração Letal Média ou CL<sub>50</sub> relativa aos valores em µg do produto capaz de provocar a morte de 50% dos indivíduos em uma população.

Foi utilizado para este trabalho, larvas do 2º estágio, obtidas de cistos de *A. salina* L. eclodidos em água do mar artificial (solução salina) após um período de 48 horas decorrente, sob a iluminação parcial.

Os testes preliminares foram realizados em várias concentrações descritas a seguir: 100, 10, 1 e 0,1 µg/mL a partir de uma solução estoque de 500 µg/mL, na qual é preparada, adicionando-se 0,015g da amostra do extrato em um volume final de 30 mL de água do mar a 1% de DMSO. Em cada concentração, foram utilizadas 10 larvas e os testes foram realizados em quadruplicatas, tendo como controle branco (água desclorada) e negativo (rotenona), em tubos de ensaio com capacidade de 10 mL contendo um volume final de cinco mililitros.

Em todos os testes, as larvas foram deixadas em contato com as soluções de extratos durante 24 horas. Em seguida, foi determinado o número de mortos e sobreviventes e realizada a contabilização percentual dos indivíduos mortos, os dados expressos em percentual de mortalidade, também foram expresso como Taxa de Toxicidade à *A. salina* L. (TAS).

Os extratos ativos, ou seja, que promoverem a mortalidade maior que 30% durante os testes preliminares na concentração de 100 µg/mL então submetidas ao teste apurado, onde o número de larvas será de 10 por tubo. Todo o teste foi realizado em quadruplicatas e as concentrações foram preparadas de forma a obter a menor dosagem letal. No teste apurado, a solução estoque foi preparada na concentração igual ao teste preliminar, porém, as concentrações testadas variaram diferentemente para cada extrato.

Os dados de mortalidade obtidos através de três ensaios, cada um com quatro réplicas para cada concentração e seus respectivos controles branco ou negativo foram submetidos ao programa Polo-PC que utiliza o método de Probit e a análise foi estabelecida pelas faixas de correlação de 0,90; 0,95 e 0,99 definindo então os valores das concentrações letais para 10%, 50% e 90% da população exposta a cada ensaio e os respectivos intervalos de confiança estabelecendo assim os valores de CL<sub>10</sub>, CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

É comum o uso de *A. salina* L. para avaliação de citotoxicidade em estudos de extratos de plantas indicadas pela medicina popular, seja para as concentrações usuais como para o monitoramento dos fracionamentos cromatográficos nos estudos fitoquímicos.

A ausência de citotoxicidade dos extratos testados frente à *A. salina* é um indicador de que a planta ou seus órgãos podem ser bem tolerados frente ao sistema biológico. Entretanto, por ser um teste preliminar que considera apenas o padrão de mortalidade aguda em estudos mais detalhados para a avaliação da toxicidade dos extratos bioativos faz-se necessário empregar outros modelos *in vitro* e *in vivo* (Stefanello *et al.*, 2006).

Devido a sua simplicidade e baixo custo, esta técnica é amplamente utilizada para a avaliação prévia de extratos de plantas e/ou substâncias com atividades farmacológicas, por ter como fundamento teórico, o retardo do ciclo celular normal devido às alterações do processo mitótico, que pode ser relacionado com o processo de citotoxicidade e indicativo de substâncias com potencial antitumoral (Siqueira *et al.*, 1998).

Ao realizar estudos, compararam extratos de produtos marinhos com o ensaio de letalidade em larvas de *A. salina* e quanto à citotoxicidade, em duas linhagens de células humanas. Segundo os autores, os resultados apresentam uma boa correlação, tal como já estabelecido nos estudos de McLaughlin (1991). Propondo a utilização deste bioensaio como teste para produtos naturais com potencial atividade farmacológica.

No presente estudo em todos os extratos brutos etanólicos das folhas das diversas espécies testadas, foi observado uma elevada toxicidade, sendo os valores de em  $\mu\text{g/mL}$  mais significativos para a *M. tinctoria*, seguido por *T. diversifolia*, *N. oleander* e *M. urundeava*. Embora os valores da  $\text{CL}_{50}$  para o extrato bruto etanólico das folhas de *Myracrodruon urundeava* tenham apresentado valores maiores em comparação aos demais resultados, Tabela 1.

Ao comparar ao referencial de literatura no qual está definido como padrões de letalidade por Pereira e Castro (2007), todos os extratos são de elevada toxicidade para os extratos de plantas, uma vez que é citada pela literatura como tóxica, as concentrações cuja  $\text{CL}_{50}$  seja menor que 80  $\mu\text{g/mL}$  e como dosagem intermediária as concentrações entre 80 a 250  $\mu\text{g/mL}$ .

Estes valores tornam-se ainda mais letais se comparados ao padrão da Organização Mundial de Saúde (OMS), são consideradas tóxicas, substâncias que apresentam valores de  $\text{DL}_{50}$  abaixo de 1.000  $\mu\text{g/mL}$  em *A. salina*. (Lima *et al.*, 2009).

Em estudos sobre o uso de plantas para o controle da esquistossomose, foi utilizado o biomonitoramento com *A. salina*, uma vez que a baixa toxicidade pode ser considerada uma característica importante na utilização de extratos vegetais em ambientes naturais para o controle da população de caramujos. Excetuando-se o extrato hexânico da *E. acutangula* ( $\text{CL}_{50}$  470  $\mu\text{g/mL}$ ) os demais extratos apresentaram  $\text{CL}_{50} > 10^3$   $\mu\text{g/mL}$  (Ruiz *et al.*, 2005)

Outra referência da literatura, mostra que estudar diferentes extratos da espécie *Solanum* foram considerados inativos, aqueles onde a concentração tóxica residuiu na faixa acima de 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Os extratos mais ativos se concentraram na faixa de  $\text{CL}_{50} = 107,3$   $\mu\text{g/mL}$  para o extrato das raízes de *S. asterophorum*,  $\text{CL}_{50} = 295,2$   $\mu\text{g/mL}$  para o extrato das folhas de *S. torvum* definido no trabalho, é comum nesta espécie a presença de alcalóides, saponinas e saponinas (Silva *et al.*, 2007).

Plantas do gênero *Baccharis*, conhecidas popularmente por carquejas, os extratos em clorofórmio e em metanol de folhas da espécie *B. pseudotenuifolia*, foram submetidos ao bioensaio de toxicidade sobre *A. salina* (TAS), sendo que ambos foram considerados ativos (TAS < 1000 ppm). A maior atividade concentrou-se no extrato clorofórmico (TAS = 115 ppm), o qual é indicativo da presença de um importante componente citotóxico na fração clorofórmica. A realização do bioensaio com os compostos isolados demonstrou que o ácido oleanólico (TAS = 85 ppm) pode ser o princípio ativo responsável pela atividade do extrato clorofórmico nesta espécie (Moreira *et al.*, 2000).

Embora não exista uma definição de ação, as substâncias com elevada toxicidade frente à *A. salina* também podem ser correlacionadas com outros mecanismos biocidas, como antifúngicos e pesticidas (Lhullier *et al.*, 2006; Utyama *et al.*, 2007).

Tabela 1. Cálculo das Concentrações Letais (CL) em  $\mu\text{g/mL}$  dos extratos testados

Espécie Vegetal	$\text{CL}_{10}$	$\text{CL}_{50}$	$\text{CL}_{90}$	Nº. de registro
<i>N. oleander</i>	5,5 $\mu\text{g/mL}$ up = 7,3 $\mu\text{g/mL}$ low = 3,7 $\mu\text{g/mL}$	27,7 $\mu\text{g/mL}$ up = 29,5 $\mu\text{g/mL}$ low = 25,9 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$ up = 51,8 $\mu\text{g/mL}$ low = 48,2 $\mu\text{g/mL}$	CGMS 7125
<i>T. diversifolia</i>	5,37 $\mu\text{g/mL}$ up = 6,9 $\mu\text{g/mL}$ low = 3,84 $\mu\text{g/mL}$	26,85 $\mu\text{g/mL}$ up = 28,38 $\mu\text{g/mL}$ low = 25,32 $\mu\text{g/mL}$	48,34 $\mu\text{g/mL}$ up = 49,87 $\mu\text{g/mL}$ low = 46,81 $\mu\text{g/mL}$	CGMS 25729
<i>M. tinctoria</i>	4,2 $\mu\text{g/mL}$ up = 5,31 $\mu\text{g/mL}$ low = 3,09 $\mu\text{g/mL}$	21,00 $\mu\text{g/mL}$ up = 22,11 $\mu\text{g/mL}$ low = 19,89 $\mu\text{g/mL}$	37,80 $\mu\text{g/mL}$ up = 38,91 $\mu\text{g/mL}$ low = 36,69 $\mu\text{g/mL}$	CGMS 25355
<i>M. urundeava</i>	7,82 $\mu\text{g/mL}$ up = 9,72 $\mu\text{g/mL}$ low = 5,94 $\mu\text{g/mL}$	39,38 $\mu\text{g/mL}$ up = 41,24 $\mu\text{g/mL}$ low = 37,52 $\mu\text{g/mL}$	70,87 $\mu\text{g/mL}$ up = 72,73 $\mu\text{g/mL}$ low = 69,01 $\mu\text{g/mL}$	CGMS 25728

## CONCLUSÃO

Diversos trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina*, com atividades como antifúngicas, viruscidas, antimicrobianas, parasiticidas e tripanossomicidas. Nesse estudo, foi realizada a avaliação da atividade biológica analisando o nível de toxicidade frente à *Artemia salina* L. expresso pelas Concentrações Letais (10,50,90).

O biomonitoramento, com esse microcrustáceo, fez com que realizássemos testes preliminares e apurados. Nos extratos testados, foi observada uma elevada toxicidade, então a atividade guiada das amostras propicia informações para a classificação etnobotânica e o conhecimento das espécies vegetais para os futuros trabalhos, auxiliam na correlação entre a medicina popular e identificação dos princípios ativos.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao FUNDECT e CPP, CNPq e MCT pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

Alves TMA, Silva AF, Brandão M, Grandi TSM, Smânia EFA, Smânia JRA, Zani CL. Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 95(3): 326-328, 2000.

Brunini MA, Macedo NB, Coelho CV, Siqueira GF. Caracterização física e química de acerolas provenientes de diferentes regiões de cultivo. *Rev. Bras. Frut.* 26(3): 486-489, 2004.

Cavalcante MF, Oliveira MCC, Velandia RJ, Echevarria AA. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. *Quím. Nova.* 23(1): 20-22, 2000.

CIT - Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande de Sul. Características do *Neium Oleander*. Disponível em: < [http://www.cit.rs.gov.br/v2/nova/?p=p\\_133](http://www.cit.rs.gov.br/v2/nova/?p=p_133) >. Acesso em: 29 set. 2009.

Consoli RA, Mendes NM, Pereira JP, Santos BS, Lamounier MA. Influência de diversos derivados de vegetais na sobrevivência das larvas de *Aedes fluviatilis* (Lutz) (Diptera: Culicidae) em laboratório. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 83:87-93, 1989.

Embrapa – Agroindústria de Alimentos. Características da amora brava. Disponível em: < [www.embrapa.com.br](http://www.embrapa.com.br) >. Acesso em: 26 set. 2009.

Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz: Características do girassol-mexicano Disponível em <<http://www.fiocruz.br/sinitox/espírradeira.htm>>. Acesso em: 26 set. 2009.

Lhullier C, Horta PA, Falkenberg M. Avaliação de extratos de macroalgas bêmicas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 16(2): 158-163, 2006

Lima JM, Silva CA, Rosa MB, Santos JB, Oliveira TG, Silva MB. Prospecção fitoquímica de *Sonchus oleraceus* e sua toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina*. *Planta Daninha*, Viçosa-MG. 27(1): 7-11, 2009.

Mclaughlin JM. Crown gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractionation. In: K Hostettmann, *Assays for Bioactivity*. Academic Press., p. 2-32. San Diego, 1991.

Montanher ABP, Pizzolatti MG, Brighente IMC. Monitoramento dos extratos brutos de espécies de *Polygala* (Polygalaceae) utilizando *Artemia salina*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 13: 66-68, 2003.

Probits: Polo (Nº registro 97355947870655352).

Ruiz ALTG, Magalhães EG, Magalhães AF, Faria AD, Amaral MCE, Serrano DR, Zanotti-Magalhães EM, Magalhães LA. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.* 15(2): 98-102, 2005.

Silva TMS, Nascimento RJB, Batista MM, Agra MF, Camara CA. Brine shrimp bioassay of some species of *Solanum* from Northeastern Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.* 17(1): 35-38, 2007.

Siqueira JM, Bomm NFG, Garcez WS, Boaventura MD. Estudo fitoquímico de *Unonapsi lindomani*-Annonaceae, biomonitoramento pelo ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* Leach. *Quím. Nova.* 21 (5): 557-559, 1998.

Stefanello MEA, Salvador MJ, Ito MY, Macari PAT. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochnatia polymorpha* ssp *floccosa*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 16 (4): 525-530, 2006.

Utyama IKA, Andrade D, Watanabe E, Pimenta FC, Ito IY. Determinação da atividade antibacteriana e toxicidade do ácido acético e vinagres branco e tinto. *Rev. Eletr. Farm.* 4(2): 202-207, 2007.

Vila Verde GM, Paula JR, Caneiro DM. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossâmedes/GO. *Rev. Bras. Farmacogn.* 13(2): 64-66, 2003.