

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE PLANTAS POR MEIO DO BIOENSAIO COM *ARTEMIA SALINA*

Rafael R.A. Silva^{1*}, Amauri G.Souza², Júlio O.F. Melo², Eric M.Garcia², Hosane T. Aparecida².

1. Estudante de IC da Universidade Federal de São João Del Rei – Campus Sete Lagoas

2. Pesquisadores da Universidade Federal de São João Del Rei – Campus Sete Lagoas

Resumo:

O consumo de plantas tanto pelo ser humano no ambiente de encontrar substâncias bioativas e terapêuticas quanto por outros animais como forma de alimentação é notório. No entanto, o uso indiscriminado pode ocasionar em diversas problemáticas para estes consumidores. Então, este trabalho visou avaliar o grau de toxicidade do extrato de plantas inseridas no bioma de Sete Lagoas, com a utilização do bioensaio da artemia salina. Foi possível verificar que houve maior toxicidade frente às artemias salinas, para as folhas de cagaita e pequi, quando combinado as variáveis de conservação natural e estação de floração. No espectro de massas destas folhas, foi possível identificar a presença de prováveis substâncias tóxicas, como os glicosídeos cianogênicos. Concluiu-se que o grau de toxicidade de extrato de plantas da cagaita e do pequi foi classificado como moderadamente tóxicas e que o teste do bioensaio com artemia salina se mostrou eficaz para um método alternativo de análise de toxicidade.

Palavras-chave: Toxicidade de plantas; Bioensaio com artemia salina; Caracterização por espectrometria de massas.

Apoio financeiro: Universidade Federal de São João Del Rei – Campus Sete Lagoas.

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: Universidade Federal de São João Del Rei – Campus Sete Lagoas.

Introdução:

A utilização das plantas medicinais, para tratamentos de doenças, é uma prática muito antiga, sendo encontrada ao longo da história em todas as populações mundiais e em diferentes grupos étnicos conhecidos. A partir deste uso popular foram encontrados diversos medicamentos utilizados na medicina tradicional, constituindo-se um importante recurso para a descoberta de novos fármacos, segundo Martins *et al* (2000).

De acordo com Calixto *et al* (2001), os estudos de plantas e de novas substâncias torna-se um balanço entre a atividade biológica *versus* a toxicidade, um parâmetro fundamental para verificar sua aplicabilidade na indústria alimentícia. O bioensaio com *Artemia salina* (BST – Brine Shrimp Test) serve tanto como indicador de toxicidade como de bioatividade de diversas substâncias químicas, inclusive para os extratos de plantas. Por fim, apresentam vantagens como: rapidez, praticidade, simplicidade, baixo custo, requer pouca quantidade de amostra, além de apresentar uma boa relação com testes *in vivo*, sugerindo que é um método útil e de confiança, segundo Parra *et al* (2001).

Gangin *et al* (1969) e Lorenzi *et al* (2008) estudaram a toxicidade de algumas plantas e estimaram que 5% do rebanho bovino brasileiro morrem anualmente em decorrência de intoxicação proveniente da ingestão de plantas tóxicas, assim para um rebanho de aproximadamente 160 milhões de cabeças, chega-se a um total de perdas de 800.000.

Os frutos da cagaita (*Eugenia dysenterica*) tem efeito laxante e as folhas antidiarreicas, segundo Carneiro *et al* (2014). No entanto o consumo indiscriminado dessas folhas por chá pode ter um efeito antagônico. Uma vez que estas podem apresentar toxinas naturais também encontradas em outros alimentos como, o glicoalcaloide encontrado em batatas e os glicosídeos cianogênicos encontrado na mandioca.

Portanto, diante do impacto do consumo das folhas de forma indiscriminada, tanto para o rebanho bovino quanto para o ser humano, se torna necessário avaliar o grau de toxicidade de extrato de plantas regionais, através do bioensaio com a artemia salina.

Metodologia:

Preparação dos extratos

Foram coletadas aproximadamente 200g de folhas de cagaita e pequi para cada estação

do ano e em cada uma das três árvores na proximidade da Universidade Federal de São João Del Rei-Campus do Campus de Sete Lagoas. O material vegetal foi seco por meio da utilização da estufa a 100°C até que se obtivesse a massa constante. As folhas foram moídas e submetidas à extração por éter etílico e etanol, na proporção de 8 gramas da folha por 50 mL do solvente. Em seguida foi retirado alíquotas de 3 mL do extrato, em triplicata, e retirado o solvente da amostra utilizando a capela em potência máxima por 24 horas. O extrato obtido foi recuperado com 2 mL de água, homogeneizado submetido ao ensaio de toxicidade.

Diluição dos extratos

Foi diluído o extrato para a concentração de 10⁻³ usando a técnica de diluição seriada. Esta concentração foi definida com base na concentração letal média 50% (CL50%) para as artemias salinas após 48 horas de incubação.

Solução salina pra cultivo das larvas de *Artemia Salina*

Foi preparado uma solução salina contendo 30,00 g/L de sal marinho, pois na sua composição é verificado a ausência de iodo, que é tóxico para as artemias salinas.

Bioensaio de toxicidade para as larvas de *Artemia salina*

Utilizou a metodologia descrita Meyer, *et al* (1982). Foram transferidos 10 larvas para tubos de ensaio contendo solução salina e o extrato diluído de diferentes amostras. Após 48 horas foi feito a contagem dos microcrustáceos mortos.

Caracterização por Espectrometria de Massas com Ionização Electrospray

Utilizou a Espectrometria de Massas com Ionização electrospray para caracterização dos compostos presentes na folha da cagaita. Com a vazão de 30uL de Metanol e 15uL de Nitrogenio para o arraste das amostras. Para a Ionização Electrospray a amostra foi submetido a 40 volts a 215°C.

Variáveis de análise do projeto.

Foram realizados 5 variáveis: Tempo de extração do solvente (24horas e 48horas);

Estação do ano da coleta das folhas (Pré-floração, Floração e Pós-Floração); Localização da árvore (3 árvores distintas); Tipo de solvente (Eter Dimetílico e Álcool Etilíco) e Tipo de conservação (Estado natural e estado seco).

Resultados e Discussão:

Determinação da dose letal

A diluição ideal para as duas folhas, cagaita e pequi, para a realização do bioensaio com artemia salina, foi a de aproximadamente 480 µg/mL de extrato bruto, devido a proximidade com a letalidade de 50% das artemias após 48 horas de inoculação.

Avaliação da toxicidade

Para a variável de localização, tanto para a cagaita quanto para o pequi, apresentaram maior toxicidade, frente a artemia salina, para aquelas árvores situadas dentro da universidade, tendo um alcance de mortalidade de até 69%. Isto pode ser justificado, através das diferentes composições do solo em que cada árvore está submetida.

Para a variável solvente, a cagaita apresentou maior toxicidade, frente a artemia salina, quando foi utilizado o solvente apolar. Já para o pequi, a maior toxicidade frente a artemia salina foi quando utilizado o solvente polar. Isto é justificável através da presença de possíveis substâncias de caráter apolar e polar nas respectivas folhas.

Para a variável conservação, tanto para a cagaita quanto para o pequi, apresentaram maior toxicidade, frente a artemia salina, quando utilizado a folha de forma natural, sem processo de aquecimento, tendo um alcance de mortalidade de até 59%. Isto pode ser justificado, através eliminação de substâncias possivelmente tóxicas com baixo ponto de ebulição.

Para a variável tempo de extração, do solvente em contato com as folhas, tanto para a cagaita quanto para o pequi, apresentaram maior toxicidade, frente a artemia salina, quando utilizado 48 horas de extração, isso se deve a um maior tempo de saturação do solvente com substâncias possivelmente tóxicas, tendo um alcance de mortalidade de até 60%.

Para a variável estação do ano, tanto para a cagaita quanto para o pequi, apresentaram maior toxicidade, frente a artemia salina, quando coletado as folhas na estação de floração, tendo um alcance de mortalidade de até 56,70%. Sendo justificado, devido a produção de metabolites da planta durante a produção do fruto.

Segundo (Bussmann *et al.* 2004), tanto para extratos etanólicos, quanto aquosos com valores de CL_{50} menores que 249 $\mu\text{g/mL}$ apresentam alta toxicidade, CL_{50} entre 250 e 499 $\mu\text{g/mL}$ apresentam toxicidade moderada, CL_{50} entre 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ apresentam leve toxicidade, e CL_{50} acima de 1000 $\mu\text{g/mL}$ são considerados atóxicos.

De acordo com (Nguta *et al.* 2011), tanto extratos orgânicos, quanto extratos aquosos com valores de CL_{50} menores que 100 $\mu\text{g/ml}$ apresentam alta toxicidade, CL_{50} entre 100 e 500 $\mu\text{g/ml}$ apresentam toxicidade moderada, CL_{50} entre de 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ apresentam fraca toxicidade e CL_{50} acima de 1000 $\mu\text{g/mL}$ são considerados atóxicos (não tóxicos).

Dessa forma, tanto para as amostras com extratos aquosos quanto para extratos etanólicos e extratos orgânicos, as folhas de cagaita apresentaram a classificação de toxicidade moderada. Devido à concentração de 480 $\mu\text{g/mL}$ do extrato bruto em ensaios que obteve a CL_{50} . Assim as amostras estão em conformidade com outros trabalhos da literatura, situadas entre os valores definidos por Bussmann *et al.* 2004 e Nguta *et al.* 2011.

Fingerprint das folhas por espectrometria de massas

Foi realizado o fringerprint da folha de pequi que apresentou um dos maiores índices de mortalidade frente a artemia salina, quando submetido a variáveis da estação da coleta, floração, e da conservação da folha, natural (Figura 1). Assim, é possível notar a presença de uma substancia potencialmente toxica de relação massa/carga 871,55. Pois, no espectro da amostra 176, não foi possível identificar esta substância, tendo como diferenciação da amostra 86, somente a variável de estação da coleta, pré-floração, (Figura 2).

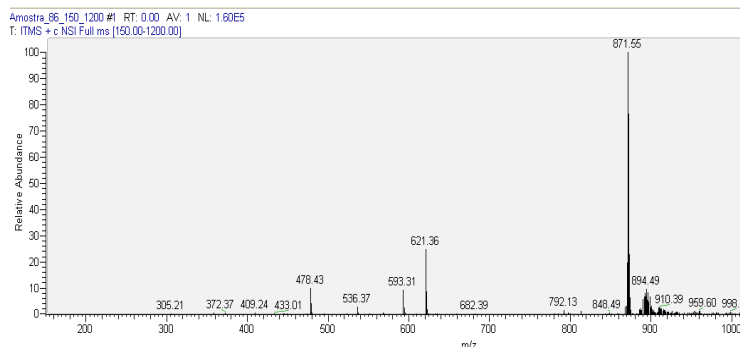


Figura 1 - Espectro da amostra 86.

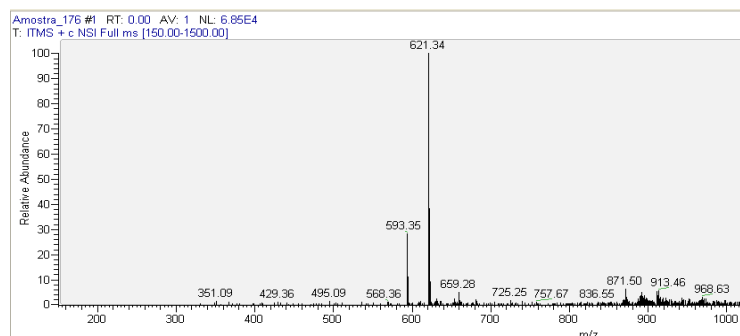


Figura 2 - Espectro da amostra 176.

Conclusões:

Conclui-se que a extração das substâncias presentes nas folhas se mostrou toxica, frente à artemia, com uma dose de letalidade de 100% quando utilizado o extrato sem diluição. O teste do bioensaio com artemia salina se mostrou eficaz para um método alternativo de toxicidade. O grau de toxicidade de extrato de plantas de cagaita e do pequi foi classificado como moderadamente toxicas, segundo Nguta *et al.*, (2011). O consumo do chá sem o aquecimento apropriado, até 100°C, pode ser de caráter tóxico para o ser humano dependendo da concentração e da quantidade a ser consumido.

Referências bibliográficas

1. Bussmann R.W. 2004. Ethnobotany and Biodiversity and Conservation. <http://www.olorien.org/rbussmann/academcCV.php>. Acesso em: 05 dez. 2010.
2. Calixto, J. B., Medicamentos Fitoterápicos In: Yunes, R. A. e Calixto, J. B. (orgs.) Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna Chapecó: Argos. 297-315, 2001.
3. Carneiro, F.M; Silva, M.J.P; Borges, L.L; Albernaz, L.C; Costa, J.D.P. 2014. Tendência dos estudos com plantas medicinais no Brasil. Revista Sapiência,

ISSN: 2238-3565.

4. Gangin, M. A. H.; Maravalhas, N. Ocorrência de alcaloides no gênero *Palicourea*. Anais XX Congresso Nacional de Botânica, Goiânia-GO, p. 91 - 105, 1969.
5. Lonrezi, H. Plantas Daninhas do Brasil terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 4. ed, Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008,. 580p.
6. Martins, E.R.; Castro, D.M.; Castellani, D.C.; Dias, J.E. 2000. Plantas medicinais. Viçosa: Editora UFV.
7. Meyer, N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica*, v. 45, [s.n.], p. 31, 1982.
8. Nguta, J.M. *et al.* Biological screening of kenya medicinal plants using *Artemia salina* L.(Artemiidae). *Pharmacologyonline*, v.2, p.458-78, 2011.
9. Parra, A. L; Yhebra, R. S; Sardiñas, I.G; Buela, L.I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acutetoxicity of plant extracts. *Phytomedicine.*, v. 8(5), p. 395-400, 2001.