

## CONCENTRAÇÃO LETAL CL<sub>50</sub> DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE *TERMINALIA CATAPPA* EM GUARU, *PHALLOCEROS CAUDIMACULATUS*

Gustavo da Silva Claudiano<sup>1</sup>, Fabiana Pilarski<sup>1</sup>, Claudinei da Cruz<sup>1</sup>, Rogério Salvador<sup>2</sup>, Marco Antonio de Andrade Belo<sup>1</sup> e Flávio Ruas de Moraes<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UNESP Jaboticabal

<sup>2</sup> UENP Bandeirantes

Correspondência: Flávio Ruas de Moraes: fruasmoraes@gmail.com

**RESUMO:** Este ensaio foi realizado com o objetivo de determinar a concentração letal 50% (CL (I) 50-96h) do extrato aquoso de folhas secas da *Terminalia catappa*, uma planta com propriedades antifúngicas, bactericida e parasiticida. Devido à utilização crescente de fitoterápicos na aqüicultura, sua utilização é uma opção para o controle de enfermidades nos peixes. Os testes de toxicidade são importantes antes de se recomendar qualquer tipo de tratamento, uma vez que alguns produtos apresentam concentração terapêutica próxima da letal. Para a realização do experimento, foram utilizados 135 peixes da espécie guarus (*Phalloceros caudimaculatus*), expostos às concentrações crescentes de: 0,0; 50,0; 100,0; 150,0; 200,0; 250,0; 300,0 mL de solução estoque por litro de água. Os resultados foram calculados pelo método Trimmed Spearman Karber, demonstrando que a concentração letal 50% (CL (I) 50-96h) estimada, foi de 208,52 mL/L, apresentando limite inferior de 187,79 mL/L e superior de 231,54 mL/L. Observou-se alterações nos comportamentos dos organismos teste em concentrações acima de 250 mL/L e diminuição significativa dos níveis de oxigênio dissolvido e do pH. Concentrações abaixo de 250 mL/L a taxa de mortalidade é próxima a zero, sendo assim, o extrato aquoso demonstrou baixa toxicidade.

**Palavras-chave:** toxicidade; fitoterápico; *Phalloceros caudimaculatus*; *Terminalia catappa*

## LETHAL CONCENTRATION LC<sub>50</sub> OF AQUEOUS EXTRACT OF LEAVES OF *TERMINALIA CATAPPA* IN GUPPY, *PHALLOCEROS CAUDIMACULATUS*

**ABSTRACT:** This trial was conducted in order to determine the 50% lethal concentration (LC (I) 50-96h) of the aqueous extract of dried leaves of *Terminalia catappa*, a plant with antifungal, antibacterial and antiparasitic activity. Due to the increasing use of herbal medicines in aquaculture, its use is an option for controlling diseases in fish. Toxicity tests are important before recommending any treatment, since some products have therapeutic concentration close to lethal. To conduct the study used 135 fish species Guarus (*Phalloceros caudimaculatus*), exposed to increasing concentrations of: 0.0, 50.0, 100.0, 150.0, 200.0, 250.0, 300.0 mL of stock solution per liter of water. The results were calculated by the method Trimmed Spearman Karbo, demonstrating that the 50% lethal concentration (LC (I) 50-96h) estimated was 208.52 mL / L, with lower limit of 187.79 mL / L and higher 231.54 mL / L. Observed changes in behavior of the test organisms at concentrations above 250 mL / L decrease in the levels of dissolved oxygen and pH. Concentrations below 250 mL / L result in mortality rate near zero, so the aqueous extract shown low toxicity.

**Key Words:** toxicity; phitotherapy; *Phalloceros caudimaculatus*; *Terminalia catappa*

## INTRODUÇÃO

As enfermidades que acometem os peixes em cativeiro causam redução da produtividade, pois provocam atraso no crescimento dos animais e mortalidade (Winkaler *et al.*, 2005). Amparado nisso, diversos produtores utilizam inúmeras substâncias químicas para o controle de enfermidades. Porém, o uso indiscriminado de tais substâncias em pisciculturas resulta em poluição ambiental, contaminação dos peixes e de organismos não alvos envolvidos na cadeia alimentar aquática (Hatha *et al.*, 2005). Assim é crescente à necessidade de métodos alternativos para evitar o mau uso de produtos químicos e o uso de fitoterápicos surge como idéia adequada às necessidades (Pinto *et al.*, 2002). Tal fato é comprovado pela evidência de que hoje, cerca de 30% das drogas prescritas no mundo são obtidas direta ou indiretamente de plantas (Yunes *et al.*, 2001). Além disso, cerca de 50% das drogas desenvolvidas entre 1981 e 2002 são derivadas de produtos naturais, análogos, semi-sintéticos ou ainda compostos sintéticos baseados em produtos naturais (Koehn e Carter, 2005).

Dentre estas plantas, destaca-se a *Terminalia catappa*, com propriedades antioxidantes (Scalbert, 1991), anti-HIV da transcriptase reversa (Scalbert, 1991), hepatoprotetora (Lin e Lin 2001) e antiinflamatória (Fan *et al.*, 2004). Para a piscicultura, o extrato aquoso das folhas secas de *Terminalia catappa*, mostrou-se eficaz no controle de parasitos metazoários e protozoários (Claudio *et al.*, 2009).

Para que a *T. catappa*, e outros xenobióticos sejam utilizados com finalidade terapêutica, é fundamental avaliar a toxicidade, já que alguns produtos apresentam concentração terapêutica próxima da letal (Fajer Avila

*et al.* 2003). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi de determinar a concentração letal média do extrato aquoso de folhas secas de *Terminalia catappa* para o guaru (*Phalloceros caudimaculatus*).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material Biológico

O material botânico e biológico foi coletado na Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, SP onde foram conduzidos os experimentos de toxicidade aguda e de sensibilidade de organismos-teste. Os exemplares de guarus (*Phalloceros caudimaculatus*), utilizados nos experimentos, foram provenientes de criação no mesmo campus.

Para determinação da toxicidade aguda do extrato aquoso de *T. catappa*, os peixes foram aclimatados por dez dias, de acordo com recomendações do IBAMA (1987). A aclimação foi realizada em sala de bioensaio, em caixa de água de 250 L de água, com sistema de aeração contínuo. Neste período, os animais foram alimentados com ração comercial contendo 23% de proteína, a cada 24 horas. As condições ambientais permaneceram dentro dos valores recomendados para o bem estar dos peixes (IBAMA, 1987).

### Obtenção e fracionamento do extrato aquoso das folhas secas

Para obtenção do extrato aquoso de *Terminalia Catappa*, as folhas foram secas à temperatura ambiente para perda inicial da umidade, que foi complementada em estufa a 50 °C até obter-se o teor padrão de umidade de 20%. As folhas então foram moídas em moinho de grão.

Foi preparada uma solução estoque de *Terminalia catappa*, contendo 20 gramas de folhas secas e moídas por litro de água. A suspensão foi homogeneizada com auxílio de

bastão de vidro, permanecendo em repouso por 24 horas. Após este período, a suspensão foi filtrada em pano tipo perfix®, e a partir dessa solução foram obtidas as soluções testes, em béqueres de vidro de um litro. Em seguida foram preparados volumes conhecidos do extrato aquoso das folhas secas de *T. catappa* completando-se o restante com água para o teste preliminar e o definitivo.

### Concentração letal 50% (CL (I) 50-96h)

Para o teste preliminar de toxicidade aguda, foram utilizados 30 guarus (*Phalloceros caudimaculatus*), com peso médio  $80 \pm 50$  gramas, distribuídos aleatoriamente em seis aquários (n= 5). Os animais foram expostos às concentrações crescentes: 0,0; 100,0; 150,0; 200,0; 250,0; 300,0 ml/solução estoque por litro de água. Neste teste, foram determinados os intervalos de concentração que causaram zero e 100% de mortalidade, e os intervalos obtidos foram utilizados para a montagem dos testes definitivos (IBAMA, 1987).

Na estimativa da concentração letal 50% do extrato aquoso de folhas secas de *T. catappa*, foram utilizados 105 animais, com peso médio de  $0,60 \pm 0,40$  g, distribuídos aleatoriamente em 21 aquários, com capacidade para 30 litros de água, cinco animais por aquário, três repetições por tratamento. As concentrações avaliadas foram: 0,0; 50,0; 100,0; 150,0; 200,0; 250,0; 300,0 mL de solução estoque por litro de água. Em todo os ensaios, foi mantida a densidade máxima de um g/L de água, conforme a metodologia CETESB (1999).

Durante o período de exposição (96h), os peixes foram mantidos sem alimentação e em sistema estático, sem substituição e sifonagem de água. Diariamente foram determinados a temperatura da água com termômetro de bulbo (40 a 58 C°) a concentração de

oxigênio dissolvido (OD) com oxímetro YSI-Mod.55 (4,6 a 1,06 mg L<sup>-1</sup>), o potencial hidrogeniônico (pH) com peagâmetro Corning (8,3 a 6,3) e a condutividade elétrica (CE) com condutivímetro Corning (200 µS cm<sup>-1</sup>).

Os valores permaneceram na faixa recomendada pelo Ibama (1987) e Usepa (2002). Durante o período de exposição, diariamente os peixes foram clinicamente examinados quanto a alterações de comportamento, surgimento de lesões externas e mortalidade.

### Análise Estatística

Os valores da (CL (I) 50-96h) foram calculados pelo método "trimmed sperman Karber (Hamilton et al., 1977).

## RESULTADOS

A equação linear, que representa a relação concentração-resposta do extrato aquoso das folhas secas da *T. catappa*, está apresentada na Figura 1.

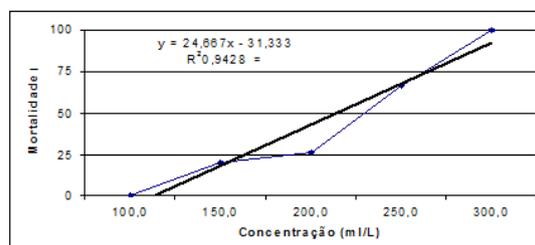


Figura 1 – Equação linear, valor de R e representação da relação concentração-resposta na determinação da concentração letal 50% (CL (I) 50-96h) extrato aquoso das folhas secas da *T. catappa*.

O valor estimado da CL<sub>50(96h)</sub> do extrato aquoso de folhas de *T. catappa* para guaru (*Phalloceros caudimaculatus*) foi de 208,52 mL/L, apresentando limite inferior de 187,79 mL/L e superior de 231,54 mL/L. Após 24 horas de exposição do produto, nas concentrações acima de 200 mL/L, os animais apresentaram-se letárgicos, distribuídos na superfície da coluna de água e com aumento dos movimentos operculares.

Após 96 horas de exposição foram observadas diferenças no número de mortalidade em relação às

concentrações que os animais foram expostos. Nas concentrações 50,0 e 100,0 mL/L solução estoque não foram observadas mortalidades, diferentemente do que ocorreu na concentração 300,0 mL/L solução estoque, onde verificou-se 100% de mortalidade (Tabela 2).

Tabela 2 – Teste de sensibilidade aguda do extrato de *T. catappa* em guarus

Concentração (mg/L)	Tanino - guaru C150					Total	%
	Número acumulado de organismos mortos						
	24h	48h	72h	96h			
0	0	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0	0	0
150	1	0	0	2	3	20	
200	0	2	0	2	4	26,7	
250	5	4	0	1	10	66,7	
300	13	1	1	0	15	100	

Da análise das variáveis físico-químicas da água mensuradas na sala de bioensaio, verificou-se diminuição significativa da concentração de oxigênio dissolvido e, em menor proporção, do pH, na medida em que se aumenta a concentração do extrato da folha (Tabela 3).

Tabela 3 – Variáveis dos parâmetros físico-químicos da água dos aquários.

Concentrações (ml/L)	0	50	100	150	200	250	300
Temperatura (°C)	23	22,8	22	22,8	22,3	22,7	22,9
Condutividade (µS)	177,7	186	189	206	208	250	276
Oxigênio dissolvido (ml/L)	4,6	3,82	2,04	1,24	1,16	1,06	1
pH	8,34	7,48	7,29	7,13	6,6	6,4	6,3

## DISCUSSÃO

Os valores estimados para a CL<sub>50(96h)</sub> do extrato aquoso de folhas secas de *T. catappa* foi de 208,52 ml/L para guaru (*Phalloceros caudimaculatus*), apresentaram baixa toxicidade, uma vez que foram menores do que de outros fitoterápicos de importância medicinal, também considerados seguros como a cúrcuma, *Curcuma longa* L., testado em caramujos com valor estimado de CL<sub>50</sub> igual a 319,82 µg/mL, (Silva Filho *et al.*, 2009) ou do extrato aquoso de folhas de nim, *Azadirachta indica*, CL<sub>50(96h)</sub> de 2,74g.L<sup>-1</sup> para *O. niloticus* (Winkaler *et al.*, 2005), para *Labeo rohita*, *Catla*

*catla* e *Cirrhinus mrigala* foram, respectivamente, de 2,36, 2,04 e 2,78mg.L<sup>-1</sup> (Das *et al.*, 2002).

Não foram encontrados na literatura valores para a CL 50% do extrato aquoso das folhas secas da *T. catappa* para outras espécies. Entretanto, estudos toxicológicos do principio ativo, o tanino, mostraram que seu extrato bruto etanólico em coelhos, ratos e cobaias, apresentam baixa toxicidade, de acordo com as normas para produtos vegetais, observando-se, ainda, em testes de campo, sua degradação a partir da quarta semana (Silva *et al.*, 2003).

A taxa de mortalidade observada com o aumento das concentrações do extrato aquoso das folhas secas de *T. catappa*, pode ser explicada pela diminuição significativa da concentração de oxigênio dissolvido e, em menor proporção, do pH. A diminuição da concentração de oxigênio dissolvido e as conseqüentes alterações comportamentais dos animais submetidos à exposição ao extrato acima de 200 mL/L, podem ser atribuídas à degradação da matéria orgânica originária da planta, que demanda a utilização de oxigênio dissolvido (Derisio, 2000; Macedo, 2000). Além disso, o ácido tânico pode atuar na hidrólise da glicose, com conseqüente aumento do metabolismo dos animais expostos, aumentando o consumo do oxigênio, como observado por Adachi *et al.* (1987) em ratos, ou, pode ser decorrente do excesso de extrato na água que se acumularia nas brânquias, dificultando a respiração.

Após 96 horas de exposição ao extrato aquoso das folhas secas da *T. catappa*, foi observado, que em concentrações abaixo de 250 mL/L a taxa de mortalidade é próxima à zero. Assim, o extrato aquoso apresentou baixa toxicidade para guarus.

## CONCLUSÃO

Este trabalho constatou que a concentração letal 50% (CL (I) 50-96h) do extrato aquoso das folhas secas da *T. catappa* para o peixe da espécie guaru (*Phalloceros caudimaculatus*) foi de 208,52 mL/L, apresentando limite inferior de 187,79 mL/L e limite superior de 231,54 mL/L.

Após 96 horas de exposição ao extrato aquoso das folhas secas de *T. catappa*, foi observado que em concentrações abaixo de 250 mL/L a taxa de mortalidade é próxima à zero, apresentando baixa toxicidade para guarus.

## REFERÊNCIAS

- ADACHI H.; KONISHI K.; TORIIZUKA K. *et al.* The in vitro effects of tannic acid on rat liver mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.35, p.1176-1182, 1987.
- CLAUDIANO, G.S.; DIAS NETO J.; SAKABE R. *et al.* Eficácia do extrato aquoso de "*Terminalia catappa*" em juvenis de tambaqui parasitados por monogenéticos e protozoários. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.10, n.3, 625-636, 2009.
- DAS, B. K.; MUKHERJEE, S. C.; MURJANI, O. Acute toxicity of neem (*Azadirachta indica*) in Indian major carps. **Journal of Aquaculture in the Tropics**, v.17, n.11, p.23-33, 2002.
- DERÍSIO, J. C. **Introdução ao controle de poluição ambiental**. 2, Ed. São Paulo: Signus, 2000.
- FAN, Y.M.; XU, L.Z. ; GAO, J. *et al.* Phytochemical and antiinflammatory studies on *Terminalia catappa*. **Fitoterapia**, v.75, p.253-260, 2004.
- FAJER-AVILA, E.J.; PARRA, A.; AGUILAR-ZARET, G. *et al.* Toxicity of formalin to bullseye puffer fish (*Sphoeroids annulatus Jenyns*, 1843) and effectiveness to control ectoparasites. **Aquaculture**, v. 223, n. 1-4, p. 41-50, 2003.
- HATHA, M.; VIVEKANANDHAN, A.A.; JOICE, G. J. *et al.* Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish. **International Journal of Food Microbiology**, v.98, n.2, p.131-134, 2005.
- KOEHN, F.E.; CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. **National Review of Drug Discovery**, v.4, n.3, p.206-20, 2005.
- LIN.C. H.S.U; LIN.C. Antioxidant and free radical scavenging effects of the tannins of *Terminalia catappa* L. **Bioorganic Medicine and Chemistry**, v.2, p.1529, 2001.
- MACEDO, J.A.B. **Introdução a Química Ambiental. - Química e meio ambiente e sociedade**, 2a ed., Editora O Locutor: Belo Horizonte-MG, 2002.
- PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI V.S. *et al.* Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, supl. 1, p.45-61, 2002.
- SCALBERT A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v.30, n.12, p.3875-3883, 1991.
- SILVA FILHO, C. R. M.; SOUZA, A. G.; CONCEIÇÃO, M.M. *et al.* Avaliação da bioatividade dos extratos de cúrcuma (*Curcuma longa* L., *Zingiberaceae*) em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.4, p.919-923, 2009.
- SILVA, I.G.; GUIMARÃES, V.P.; LIMA C.G. *et al.* Efeito larvívica e toxicológico do extrato bruto etanólico da casca do caule de *Magonia pubescens* sobre *Aedes aegypti* (*Diptera, Culicidae*) em criadouros artificiais. **Revista de Patologia Tropical**, v.32, n.1, p.73-86, 2003.
- WINKALER, E.U.; MACHADO NETO J. G.; MARTINEZ C. B. R. Toxicidade e efeitos do extrato aquoso de folhas secas de nim (*Azadirachta indica*) em parâmetros fisiológicos de tilápias do Nilo. **Anais do ZOOTEC'2005**, 24 a 27 de maio de 2005 – Campo Grande-MS.
- YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v.24, n.1, p.147-152, 2001.