

Estudo químico e letalidade frente à *Artemia salina* de frações do extrato hexânico de *Polygala boliviensis*

Lara Amanda Rodrigues de Oliveira¹; Hugo Neves Brandão²; Danielle Figuerêdo da Silva³; Verena Alves da Silva⁴

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduanda em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail:

lara.amanda@live.com

2. Orientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: hugo@uefs.br

3. Doutoranda do PPG/RGV, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: danielle.figs@gmail.com

4. Graduanda em Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, e-mail: veca_alves@hotmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Atividades biológicas. Cromatografia. *Polygala boliviensis*.

INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são produtoras de compostos ativos, oriundos do metabolismo secundário celular, em que estes metabólitos são desenvolvidos tanto em situações de estresse enfrentadas pelos vegetais, quanto na disseminação da espécie no meio-ambiente. Estas substâncias ativas são responsáveis pela atividade farmacológica apresentada no organismo humano que as plantas medicinais possuem, de forma que, no Brasil, desperta o interesse de pesquisadores e da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novos fármacos, devido a vasta biodiversidade brasileira (Cechinel Filho; Yunes, 1998).

No processo de purificação de extratos e frações vegetais, as técnicas de separação têm importante função, como exemplo, pode-se destacar a cromatografia em coluna clássica (CCC) e a Cromatografia em Camada Delgada (CCD), sendo fundamentais no processo de investigativo da composição química de plantas medicinais (Oliveira *et al.*, 2002; Monteiro, 2012).

Diferentes testes podem ser aplicados para avaliar a toxicidade de um vegetal. Nesse contexto, destaca-se a *Artemia salina* que é um microcrustáceo da ordem Anostraca, e de acordo com Bueno & Piovezan (2015), funciona como um bioindicador da toxicidade do ambiente, quando aplicada na identificação de repostas biológicas, resulta na morte ou na vida deste organismo.

Sendo a *P.boliviensis* uma espécie nativa do semiárido baiano, cujo gênero possui importância medicinal e que apresenta poucos estudos acerca de sua composição, fazem-se necessários testes que a avaliem sob o ponto de vista químico e biológico. Tendo em vista a alta letalidade frente *A. salina* apresentada pelo extrato hexânico, observada em estudos prévios, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a letalidade de frações semipurificadas, obtidas através de técnicas cromatográficas, bem como a obtenção de compostos isolados obtidos através das mesmas.

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA

A espécie *P. boliviensis* foi coletada em julho de 2013, no *campus* da Universidade Estadual de Feira de Santana e identificada pelo botânico José Floriano Bârea Pastore através da comparação do material coletado com a exsicata depositada no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS), identificada como HUEFS 168956. Os extratos vegetais foram elaborados, de forma que, para a obtenção do extrato bruto, o material seco e pulverizado foi submetido à maceração em metanol (MeOH) através de cinco extrações consecutivas no intervalo de 72h cada.

Posteriormente, a solução foi concentrada em rotaevaporador acoplado a bomba a vácuo sob temperatura constante de 60°C para eliminação do solvente orgânico

(Moreira; Terrones; Souza, 2008). Submeteu-se o extrato bruto ao processo de partição líquido-líquido com solventes de polaridades crescentes, hexano, clorofórmio e acetato de etila, tendo em vista a semipurificação das substâncias através das suas polaridades, sendo o extrato hexânico o objeto de estudo para o desenvolvimento das atividades (Cechinel Filho, Yunes, 1998).

As frações semipurificadas foram obtidas empregando Cromatografia em Coluna Clássica (CCC). O processo de separação foi avaliado através de Cromatografia em Camada Delgada, sendo as amostras analisadas em câmara com lâmpada Ultravioleta nos comprimentos de onda de 365 e 254nm e/ou câmara com iodo, unindo as frações que possuem semelhanças.

Avaliou-se a letalidade das frações através do teste de *Artemia salina* Leach, descrita por Meyer *et al.* (1982) e adaptado por Serrano (1996), sendo preparadas cinco concentrações distintas, variando de 5 a 130µg/mL, em triplicata, das frações semipurificadas. Os ovos do microcrustáceo foram incubados por 48 horas, em aquário de vidro com água do mar artificial, dividido em dois compartimentos, utilizando-se isopor com pequenos orifícios para conectar ambos os lados e bomba comum de aquário para realizar a oxigenação da água. A parte maior foi iluminada com o auxílio de uma lâmpada incandescente e a outra parte mantida no escuro (Figura 1a).

Foram utilizados 50µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para auxiliar na solubilização das amostras. Assim, após o período de incubação, dez *nauplii* recém-eclodidos foram colocados em contato com as frações, sendo completando o volume de 5mL com água marinha. Após 24h sob iluminação artificial (Figura 1b), realizou-se a contagem dos *nauplii* sobreviventes para a determinação da Concentração Letal média (CL₅₀). Como controle negativo utilizou-se apenas água do mar artificial e DMSO na mesma quantidade que as amostras.



Figura 1: Etapas do teste de letalidade frente à *Artemia salina*. **A** - Aquário com ovos incubados; **B** - *nauplii* em contato com as amostras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A CCC do extrato hexânico de *P. boliviensis* resultou em 90 frações no total. Estas frações, foram unidas através de CCD, resultando o total de 32 frações. Logo, foram submetidas ao teste de letalidade frente à *Artemia salina* as frações que obtiveram massa suficiente para a viabilização do referido teste e determinação das CL₅₀ das mesmas, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 – CL₅₀ das frações semipurificadas do extrato hexânico de *P. boliviensis*

Frações semipurificadas	Equação da reta	(R)	CL ₅₀ (µg/mL)
FHPB04	y = 0,540x + 9,518	0,997	74,966
FHPB05	y = 0,421x + 24,384	0,999	60,846
FHPB06	y = 0,595x + 18,396	0,998	53,116
FHPB07	y = 0,584x + 19,312	0,996	52,548

FHPB08	$y = 0,607x + 21,617$	0,998	46,759
FHPB09	$y = 0,621x + 25,203$	0,998	39,931
FHPB10	$y = 0,593x + 14,294$	0,996	60,212
FHPB11	$y = 0,476x + 13,166$	0,996	77,382
FHPB13	$y = 0,580x + 0,161$	0,995	85,929
FHPB21	$y = 0,508x - 1,278$	0,997	95,909

Segundo Nguta *et al.* (2011), em relação à toxicidade, são considerados com elevada atividade os extratos ou frações orgânicas que apresentem $CL_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$, de atividade moderada as amostras cuja CL_{50} esteja entre 100 e $500 \mu\text{g/mL}$, de baixa atividade quando apresentada entre 500 e $1000 \mu\text{g/mL}$, e sem atividade tóxica quando $CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$. De forma geral, as frações testadas de *P. boliviensis* apresentam elevada atividade, sendo a fração 09 possui a maior destas com $CL_{50} 39,931 \mu\text{g/mL}$.

Outras espécies de *Polygala* apresentam resultados promissores na avaliação da letalidade frente a *Artemia salina*. Pizzolatti *et al.* (2008) apontaram que a fração hexânica, clorofórmio e acetato de *P. sabulosa* pode ser comparada ao fármaco benznidazol frente ao tratamento de formas epimastigotas de *T. cruzi*, exercendo ação tripanocida.

Montanher, Pizzolatti & Brighente (2002) avaliaram ainda a letalidade frente ao microcrustáceo com o extrato bruto da *P. paniculata*, e este não apresentou significância para a bioatividade, possuindo CL_{50} superior a 1000 ppm. Todavia, Missau *et al.* (2007) no mesmo teste utilizaram compostos isolados desta espécie, sendo estes a Rutina, Xantona (1), Xantona (2), Febalosina, Aurapteno e Spinasterol, que exibiram elevada atividade frente ao microcrustáceo, em que todos possuíram valores de CL_{50} inferiores a $100 \mu\text{g/mL}$.

Desta forma, pode-se inferir que o fracionamento é importante na análise da bioatividade de uma espécie, visto que, quando há a presença de outros componentes, estes podem estar em concentração superior e/ou agir de forma antagônica. Logo, as frações semipurificadas de *P. boliviensis*, utilizadas para a avaliação da %LAS, separadas por diferença de polaridade, tendem a apresentar características estruturais comuns, e podem atuar sinergicamente, justificando a alta letalidade apresentada.

Foram realizadas três outras CCCs, partindo de frações obtidas anteriormente, sendo estas as FHPB17, FHPB19 e FHPB20, com o intuito de isolamento de componentes, as respectivas massas podem ser observadas na tabela 2, assim como o número resultante de frações de cada uma destas.

Tabela 2 – Informações das CCCs das Frações 17,19 e 20

Frações	Massa (g)	Nº de frações resultantes
FHPB17	1,4099	80
FHPB19	1,5643	91
FHPB20	2,2044	85

Algumas das frações oriundas das colunas realizadas com a FHPB17 indicaram resultados promissores, devido à apresentação de precipitados. Como exemplo, tem-se o pó cristalino branco da Fração 49 e os cristais da Fração 55, conforme observado na Figura 2. Todavia, é necessário dar continuidade ao processo de purificação dos precipitados para posterior identificação de suas estruturas químicas.



Figura 2: Precipitados oriundos da coluna F17. **A-** Fração 49; **B-** Fração 51.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processo de separação permitiu que houvesse a obtenção tanto de compostos isolados, quanto de frações semipurificadas. Os compostos isolados após processos de purificação e identificação, podem agregar informações no âmbito químico da espécie. As frações semipurificadas, por sua vez, foram essenciais para a realização dos testes descritos, em que cada fração se apresentou de uma forma, isto devido à composição singular destas. No teste de letalidade frente à *Artemia salina* foram fornecidos dados importantes, uma vez que as amostras do extrato hexânico apresentaram elevada atividade tóxica para os *nauplii*.

REFERÊNCIAS

- BUENO, A.C.; PIOVEZAN M. 2015. Bioensaio toxicológico utilizando *Artemia salina*: fatores envolvidos em sua eficácia. Instituto Federal de Santa Catarina, Trabalho de Conclusão de Curso.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. 1998. Estratégias Para a Obtenção de Compostos Farmacologicamente Ativos a Partir de Plantas Medicinais. Conceitos Sobre Modificação Estrutural Para Otimização Da Atividade. *Química Nova* 21(1): 99-105.
- MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIN, J.L. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Medicinal Plant Research* 45(5): 31–34.
- MISSAU, F. C.; MORESCO, H. H.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZOLATTI, M. G. (2007). Avaliação dos extratos e compostos isolados de *Polygala paniculata* através de testes antioxidantes e toxicidade frente à *Artemia salina*. In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, 2p.
- MONTEIRO, E.G. 2012. Estudo comparativo entre metodologias de cromatografia planar para controle radioquímico de radiofármacos de tecnécio -99m. Universidade de São Paulo, Dissertação.
- MONTANHER, A. B. P.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. (2002). An application of the brine shrimp bioassay for general screening of Brazilian medicinal plants. *Acta Farmaceutica Bonaerense* 21(3): 175–178.
- NGUTA, J. M.; MBARIA, J. M.; GAKUYA, D. W.; GATHUMBI, P. K.; KABASA, J. D.; KIAMA, S. G. (2011). Biological screening of Kenyan Medicinal Plants using *Artemia Salina* L. (Artemiidae). *Pharmacology Online* 2(1): 458–478.
- OLIVEIRA, E. L.; FREITAS, P.C.; GUEDES, M.L.S.; VELOZO, E.S. (2002). Estudo fitoquímico de *Zanthoxylum stelligerum* (Turcz). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 12(1): 29–30.
- SERRANO, C.; ORTEGA, T.; VILLAR, A.M. (1996). Biological activity of traditional medicines from Spain and Guatemala. *Artemia salia* bioassay: A revision. *Phytotherapy Research* 10(1): 118-120.