

Avaliação toxicológica através do bioensaio com *Artemia Salina* Leach e determinação da fragilidade osmótica eritrocitária de espécimes vegetais pertencentes à Caatinga

Toxicological evaluation through bioassay with *Artemia Salina* Leach and determination of erythrocyte osmotic fragility of vegetable species belonging to Caatinga

DOI:10.34117/bjdv7n7-393

Recebimento dos originais: 16/06/2021

Aceitação para publicação: 16/07/2021

Elayne Rayane Diniz Melo

Graduanda em Farmácia, pela instituição Tabosa de almeida- ASCES-UNITA
Endereço: Avenida Portugal, 584, Universitários- Caruaru, Pernambuco, 55016-400.
E-mail: 2017106134@app.asces.edu.br

Juliana Gonçalves Silva

Graduanda em Farmácia, pela instituição Tabosa de almeida- ASCES-UNITA
Endereço: Avenida Portugal, 584, Universitários- Caruaru, Pernambuco, 55016-400.
E-mail: 2017107031@app.asces.edu.br

Eduarda Rodrigues do Nascimento

Graduanda em Farmácia, pela instituição Tabosa de almeida- ASCES-UNITA
Endereço: Avenida Portugal, 584, Universitários- Caruaru, Pernambuco, 55016-400.
E-mail: 2017207023@app.asces.edu.br

Giovanna Gabrielly Alves da Silva Fraga

Graduada em Farmácia, pela instituição Tabosa de almeida- ASCES-UNITA
Endereço: Avenida Portugal, 584, Universitários- Caruaru, Pernambuco, 55016-400.
E-mail: gabriellygiovanna28@gmail.com

Maria Laura Silva Santos

Graduanda em Farmácia, pela instituição Tabosa de almeida- ASCES-UNITA
Endereço: Avenida Portugal, 584, Universitários- Caruaru, Pernambuco, 55016-400.
E-mail: 2017207083@app.asces.edu.br

Patrícia Vieira de Assis

Graduanda em Farmácia, pela instituição Tabosa de almeida- ASCES-UNITA
Endereço: Avenida Portugal, 584, Universitários- Caruaru, Pernambuco, 55016-400.
E-mail: 2017207005@app.asces.edu.br

Sara Mirian Ferreira Silva

Graduanda em Odontologia, pela instituição Tabosa de almeida- ASCES-UNITA
Endereço: Avenida Portugal, 584, Universitários- Caruaru, Pernambuco, 55016-400.
E-mail: 2018202416@app.asces.edu.br

Risonildo Pereira Cordeiro

Graduado em Farmácia, pela Universidade Federal de Pernambuco- UFPE

Instituição Tabosa de Almeida-ASCES-UNITA

Endereço: Avenida Portugal, 584, Universitários- Caruaru, Pernambuco, 55016-400.

E-mail: risonildocordeiro@asc.es.edu.br

RESUMO

Introdução: O bioma caatinga apresenta uma vasta biodiversidade de espécimes vegetais que detém elevados indicativos que apontam um bom potencial terapêutico, no entanto, possuem um perfil toxicológico brevemente descrito na literatura atual. Diante disto, a finalidade do seguinte estudo é determinar a toxicidade aguda, através de bioensaios toxicológicos das plantas oriundas desse bioma e utilizadas na medicina popular. **Metodologia:** Exemplares de *Dipteryx odorata* (Aubl) Willd (Cumaru), *Alcea rósea* L. (Malva Rosa), *Codiaeum variegatum* L. (Cróton), *Operculina macrocarpa* (L.) Urb (Jalapão) e *Cynophalla hastata* (Jacq) J. Presl (Feijão Bravo), que foram coletados, identificados e produzidos seus extratos secos. A toxicidade foi avaliada a partir da análise de CL_{50} em ensaio agudo com *Artemia salina* L. e fragilidade osmótica eritrocitária. **Resultados e discussão:** A espécie *Operculina Macrocarpa* (L.) avaliada frente à *Artemia salina* Leach foi considerada com um potencial toxicológico mais proeminente, visto isso, classificada como praticamente tóxica. As demais espécies analisadas também apresentaram valores de CL_{50} abaixo dos parâmetros de toxicidade. Com exceção da *Cynophalla hastata* (Jacq) J. Presl., pois foram consideradas atóxicos por evidenciarem valores acima dos parâmetros. Já, na determinação da fragilidade osmótica eritrocitária as espécies em questão a *Geranium erodifolium* (L.) e *Operculina macrocarpa* (L.) Urb. apresentaram o maior percentual de hemólise. **Conclusão:** A relevante toxicidade apresentada por *Operculina macrocarpa* (L.) nas duas técnicas realizada neste estudo demonstra a necessidade da elaboração de outros bioensaios toxicológicos para que corroborem com o resultado encontrado.

Palavras-Chave: Toxicidade, Mortalidade, Plantas Medicinais.**ABSTRACT**

Introduction: The caatinga biome has a vast biodiversity of plant specimens that have high indications that point to a good therapeutic potential, however, they have a toxicological profile that has been briefly described in the current literature. Given this, the purpose of the following study is to determine the acute toxicity, through toxicological bioassays, of plants from this biome and used in folk medicine. **Methodology:** Specimens of *Dipteryx odorata* (Aubl) Willd (Cumaru), *Alcea rosea* L. (Malva Rosa), *Codiaeum variegatum* L. (Cróton), *Operculina macrocarpa* (L.) Urb (Jalapao) and *Cynophalla hastata* (Jacq) J. Presl (Feijão Bravo), which were collected, identified and produced their dry crude extracts. Toxicity was evaluated based on the analysis of LC_{50} in an acute assay with *Artemia salina* L. and erythrocyte osmotic fragility. **Results and discussion:** The species *Operculina Macrocarpa* (L.) evaluated against *Artemia salina* Leach was considered to have a more prominent toxicological potential, as it was classified as practically toxic. The other species analyzed also showed LC_{50} values below the toxicity parameters. With the exception of *Cynophalla hastata* (Jacq) J. Presl., as they were considered non-toxic because they showed values above the parameters. In the determination of erythrocyte osmotic fragility, the species in question *Geranium erodifolium* (L.) and *Operculina macrocarpa* (L.) Urb. presented the highest percentage of hemolysis. **Conclusion:** The relevant toxicity presented by *Operculina macrocarpa* (L.)

in the two techniques performed in this study demonstrates the need for the development of other toxicological bioassays to corroborate the results found.

keywords: Toxicity, Mortality, Medicinal Plants.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais, particularmente da flora para finalidades medicinais, está presente na humanidade desde os tempos mais antigos. Indícios da utilização de plantas medicinais foram encontrados nas civilizações mais antigas, sendo considerada uma das práticas milenares empregadas pelo homem para cura, prevenção e tratamento de enfermidades, servindo como importante fonte de compostos biologicamente ativos (FIRMO et al., 2011). Diversas plantas medicinais já tiveram sua eficácia e segurança comprovadas cientificamente, o que possibilita sua utilização frequente como um recurso terapêutico benéfico e indispensável à humanidade (REBOUÇAS, 2009).

A caatinga caracteriza-se por ser o quarto maior bioma brasileiro, ocupando aproximadamente 11% do território nacional, presente em todos os estados da região nordeste (BRASIL, 2014). Apesar do mesmo estar condicionado há escassez hídrica, apresenta grande riqueza tanto da fauna, quanto da flora, que em sua grande parte são espécies endêmicas. Junto a esta biodiversidade a caatinga detém de inúmeros recursos terapêuticos, no entanto, somente nas últimas três décadas é que ela vem sendo estudada, constatando-se sua relevância a partir do conhecimento da sua alta diversidade além de suas potencialidades terapêuticas (TROVÃO et al., 2004).

O uso de plantas medicinais faz parte da prática da medicina popular, constituindo um conjunto de saberes internalizados provenientes de muitas gerações, especialmente pela tradição oral. Diante dessa abordagem, é possível constatar o grande interesse por plantas terapêuticas, tanto no âmbito nacional como no internacional, pois estas apresentam um potencial terapêutico e econômico, visado especialmente pelas indústrias farmacêuticas que realizam as prospecções de novos produtos (MORGAN, 1995; ALBUQUERQUE, 1997; MAIOLI et al., 2007)

Com o passar dos anos viu-se a necessidade da compreensão desses recursos com o intuito de entender melhor suas características terapêuticas, bem como seu potencial toxicológico, surgindo assim a fitoterapia. Segundo a Secretaria de Vigilância Sanitária, em sua portaria nº 6 de 31 de janeiro de 1995, fitoterápico é “todo medicamento

tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário.”

Para determinação toxicológica diversas técnicas podem ser adotadas, no entanto é frequente a utilização do bioensaio com camarão de salmoura (*Artemia salina* Leach) um crustáceo da ordem Anostraca que vive em lagos de água salgada e salinas de todo o mundo. O ensaio de toxicidade aguda com *Artemia salina* é um teste rápido, de baixo custo, eficiente e que requer uma pequena quantidade de amostra (2 – 20 mg). Por mais simples que seja, é descrito na literatura desde 1982 sendo bem aceita na comunidade científica até os dias atuais, que em razão da simplicidade de manuseio e baixo custo favorece seu uso em diversos estudos. (Siqueira et al., 1998).

Além deste, também foi escolhido como parâmetro toxicológico o teste de fragilidade osmótica de eritrócitos (FOE) que tem por objetivo medir a variação da resistência dos glóbulos vermelhos à hemólise, quando essas células eram expostas à ação de determinadas amostras. (RODRIGUES, 2009; SANT’ANA, 2001). O teste é também é simples e de baixo custo além de ser bem aceito. Foi baseado na técnica descrita por Darcie e Lewis (1975) que é consagrada e utilizada desde então.

O presente estudo teve como objetivo determinar o potencial toxicológico de espécies vegetais selecionadas da Caatinga, para contribuir com os estudos acerca do bioma da caatinga trazendo resultados que possam servir como base para futuros estudos que venham a beneficiar a população através de novos recursos terapêuticos, garantindo sempre a segurança dos usuários da medicina popular em geral.

2 METODOLOGIA

O estudo foi conduzido de acordo com um delineamento laboratorial experimental, utilizando o bioensaio com *Artemia salina* L. juntamente com a Fragilidade Osmótica Eritrocitária, para determinação da toxicidade dos extratos bruto seco das espécies da família Euphorbiaceae *Croton heliotropiifolius* Kunth (Croton); *Cynophalla hastata* (Jacq.) J. Presl (Feijão bravo), da família Capparaceae; *Dipteryx odorata* (Aublet.) Willd (Cumaru), da família fabaceae; *Geranium erodifolium* (L.) (Malva rosa) da família da Geraniaceae, por fim, *Operculina macrocarpa* (L.) Urb. (Jalapão) da família Convolvulaceae.

Coleta e identificação do material

Os materiais vegetais utilizados para obtenção dos extratos foram coletados na região agreste do estado de Pernambuco, no período de janeiro a dezembro de 2015. A identificação do material foi realizada pela pesquisadora Rita de Cássia Araújo Pereira, pesquisadora do Instituto Pernambucano de Agronomia (IPA). As espécies foram depositadas no HERBÁRIO DÁRDANO DE ANDRADE-LIMA, do IPA (Instituto Pernambucano de Agronomia) da cidade do Recife, Pernambuco, com os respectivos números de registros: , *Croton heliotropiifolius* Kunth (*Croton*) - 89670, *Cynophalla hastata* (Jacq.) J. Presl - 91545, *Dipteryx odorata* (Aublet.) Willd - 91192, *Geranium erodifolium* (L.) – 91193 e *Operculina macrocarpa* (L.) Urb. – 91174.

Obtenção dos extratos

Cada material vegetal foi seco à sombra, durante o período de 24h, em seguida colocados em estufa à 40°C durante uma semana, sendo posteriormente reduzido a pó. Destes materiais, foram utilizados 3 kg para cada extração com solução hidroalcoólica a 99,3% (v/v). Após o período de 7 dias consecutivos em processo de maceração foram obtidos por filtração os extratos brutos fluidos de cada espécie vegetal. O filtrado foi colocado em evaporador rotativo à 40°C, para obtenção dos extratos brutos secos, porém os extratos não chegaram à secura total, sendo necessário um procedimento adicional, que foi levar os extratos para o dessecador. Após 15 dias no dessecador foram obtidos os extratos brutos secos.

Preparação das amostras e ensaio toxicológico com *Artemia salina* Leach

Os metanúplios de *Artemia salina* L. foram obtidos a partir da incubação de 50 mg / 5 mL em água marinha a pH = 8. Esse processo foi desenvolvido em recipiente plástico, com divisória perfurada uniformemente, para facilitar a separação das larvas de seus respectivos resíduos de ovos. O recipiente de eclosão foi mantido sob temperatura ambiente e iluminação artificial (lâmpada de 40W) durante 48h. A parte do sistema contendo os cistos foi coberta por papel alumínio, para que os organismos, ao eclodirem, migrassem para a região do sistema com maior incidência de luz (fototropismo). Essa etapa é determinante para obtenção de organismos em estágio de sensibilidade adequado para a realização do bioensaio.

Para o teste, os extratos foram solubilizados com Tween 80 a 5% em 5 mL de água marinha a pH = 8. Foram preparadas triplicatas das concentrações de 1000 µg/mL;

750 µg/mL; 500 µg/mL; 250 µg/mL; 100 µg/mL; e 50 µg/mL para cada extrato. Foi preparado também um controle em triplicata contendo apenas água do mar e *Artemia salina* L.

Após a eclosão, cerca de 10 a 13 larvas de *Artemia salina* L., em estágio de desenvolvimento metanúplios foram expostas as diferentes concentrações dos extratos, assim como tubos controles contendo apenas água marinha. As amostras em teste foram armazenadas sob iluminação artificial e temperatura ambiente durante 24 horas. Após esse período, realizou-se a contagem de animais vivos e mortos expostos a cada extrato. Foram considerados vivos os organismos que apresentaram movimento quando observados próximos à fonte luminosa durante dez segundos.

Preparação das amostras e ensaio toxicológico de Fragilidade osmótica eritrocitária

Para realização do teste foi utilizado o extrato bruto seco dos espécimes em questão, no qual, foram usados 50 mg juntamente com 2 mL de soro fisiológico 0,9% (solvente) adicionado com auxílio de uma pipeta graduada, a substância foi dissolvida e transferida para o balão volumétrico completando o volume final de 5 mL com o solvente já usado, sendo importante tampar e homogeneizar a solução. O teste foi realizado em duplicata, no qual foi retirado das soluções de 500, 375, 125, 50, e 25 µL que foram levadas para os tubos de ensaio que comportavam 5 mL de soro fisiológico e obtinham as concentrações devidas que correspondiam a 1000, 750, 500, 250, 100 e 50 µg/mL para cada extrato, posteriormente, foram adicionados 25 µg de sangue de carneiro nos tubos.

Para verificação da toxicidade dos extratos diante do sangue de carneiro, as amostras nos tubos foram levadas para centrífuga em uma força de 3500 rpm por 15 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante apresentou determinada quantidade de hemoglobina que é proporcional a lise do número de hemácias que foi causada. O sobrenadante foi lido em um espectrofotômetro bioplus com filtro 545 nm e assim foram determinados os valores de absorbâncias contidos em cada amostra. A obtenção da curva do percentual de fragilidade osmótica se baseia no valor de absorbância da hemoglobina do sobrenadante multiplicado pelo percentual total e dividido pelo valor de absorbância médio da hemólise completa dos eritrócitos.

Análise estatística

Os percentuais de organismos vivos foram obtidos a partir da média aritmética do número de larvas vivas da triplicata de cada concentração e proporcionalmente

comparados ao número de larvas vivas da solução controle, o percentual de hemólise foi dado a partir das diferentes concentrações testadas. Os resultados obtidos foram plotados no aplicativo estatístico Microcal Origin 4.1®, obtendo-se o gráfico com eixos de concentração ($\mu\text{g/mL}$) por percentual de animais vivos (% de vivos). As Concentrações Letais médias CL_{50} , foram obtidas pelo cálculo dos parâmetros de reta a e b, de acordo com a equação: $y = a + b.x$. A Toxicidade para *Artemia salina* (TAS) de uma amostra é determinada quando o valor de x obtido corresponde a $TAS > 1000 \mu\text{g/mL}$.

As informações obtidas serão calculadas por técnicas estatísticas descritivas através de distribuições absolutas, percentuais de medidas e técnicas de estatísticas inferenciais (Teste qui-quadrado e/ou Exato de Fischer). O software a ser utilizado será o Microsoft® Office Excel 2013 e Microcal Origin® 4.1.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos testados no bioensaio com *Artemia salina* Leach apresentaram valores de CL_{50} abaixo de $1000 \mu\text{g/mL}$, no qual, o jalapão demonstrou potencial toxicológico mais acentuado com $CL_{50} 346,622 \mu\text{g/mL}$, bem como os demais mostrando-se praticamente tóxicos, com exceção da espécie *Cynophalla hastata* (Jacq.) J. Presl . que apontou 1.745,141 o qual demonstrou uma baixa toxicidade, visto que o valor determinante do potencial tóxico é próximo de zero. As demais espécies testadas foram consideradas atóxicas, de acordo com os valores apresentados na Tabela 1:

Na Determinação da Fragilidade Osmótica eritrocitária realizada com as espécies em questão a *Geranium erodifolium* (L.) e *Operculina macrocarpa* (L.) Urb. apresentaram o maior percentual de hemólise, respectivamente com 25,61% e 29,32%. As demais espécies apresentaram moderado potencial tóxico, de acordo com os valores apresentados na Tabela 2.

Tabela 1: CL_{50} Concentração Letal média do extrato bruto seco das espécies vegetais estudadas

FAMÍLIA BOTÂNICA	ESPÉCIE VEGETAL	NOME POPULAR	CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Euphorbiaceae	<i>Croton heliotropiifolius</i> Kunth	Velame	637,298
Capparaceae	<i>Cynophalla hastata</i> (Jacq.) J. Presl	Feijão bravo	1.745,141
Fabaceae	<i>Dipteryx odorata</i> (Aublet.) Willd	Cumarú	632,505
Geraniaceae	<i>Geranium erodifolium</i> (L.)	Malva Rosa	700,966
Convolvulaceae	<i>Operculina macrocarpa</i> (L.) Urb.	Jalapão	346,622

Nome científico das espécies da caatinga utilizadas no estudo de toxicidade com *Artemia salina* L. e respectivo valor numérico de CL_{50} em microgramas por mililitro ($\mu\text{g/mL}$).

Tabela 2: Fragilidade Osmótica Eritrocitária do extrato bruto seco das espécies vegetais estudadas.

FAMÍLIA BOTÂNICA	ESPÉCIE VEGETAL	NOME POPULAR	µg/mL
Euphorbiaceae	Croton heliotropiifolius Kunth	Velame	2,95%
Capparaceae	Cynophalla hastata (Jacq.) J. Presl	Feijão bravo	4,31%
Fabaceae	Dipteryx odorata (Aublet.) Willd	Cumaru	1,89%
Geraniaceae	Geranium erodifolium (L.)	Malva Rosa	25,61%
Convolvulaceae	Operculina macrocarpa (L.) Urb.	Jalapão	29,32%

Nome científico das espécies da caatinga utilizadas no estudo de toxicidade com Fragilidade Osmótica Eritrocitária (FOE) e respectivo valor numérico em microgramas por mililitro (µg/mL).

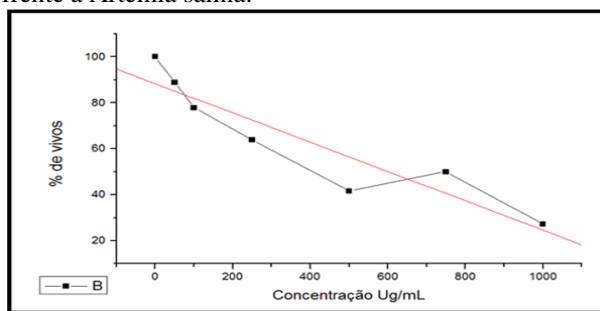
• ANÁLISE DO CROTON HELIOTROPIIFOLIUS KUNTH.

Avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina* Leach (Figura 3).

O extrato do *Croton Heliotropiifolius kunth* comumente conhecido como velame foi submetido a avaliação de toxicidade com a *Artemia salina* Leach. Após ser observados em ensaios in vivo, os valores obtidos revelaram que o extrato da espécie é moderadamente tóxico. O resultado alcançado foi determinado por meio da CL50 de 637,298 possibilitando classificar *Cróton* como uma planta relativamente tóxica. Além disso, esta análise mostrou que os microcrustáceos apresentaram movimentos semelhantes com a do controle, excetuando-se as concentrações de 750 µg/mL e 1000 µg/mL que demonstraram movimentação lenta.

Ao analisar o estudo de Da Silva (2020) é possível corroborar as informações supracitadas, no qual o extrato etanólico da casca do caule de *Croton heliotropiifolius* foi testado nas concentrações de 50, 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL e foram submetidas ao teste de *A. salina*. O extrato etanólico da casca do caule de *Croton heliotropiifolius* apresentou um rendimento de 8%. O mesmo mostrou uma CL50 de 396,6 µg/ml classificada como toxicidade moderada. Desta forma, este estudo contribui para o aprofundamento dos conhecimentos relativo à composição química e toxicidade desta espécie.

Figura 3: Curva de concentração – Resposta da toxicidade aguda do extrato bruto seco das cascas de *Croton Heliotropiifolius* Kunth frente a *Artemia salina*.



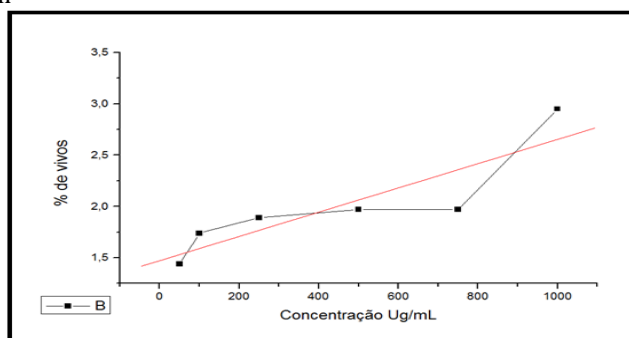
Percentual de larvas de *A. salina* L. vivas de acordo com as concentrações do extrato bruto seco das cascas de *Croton Heliotropiifolius* Kunth .

Avaliação de toxicidade frente à Fragilidade osmótica eritrocitária (Figura 4).

Na avaliação do Cróton, para determinação da FOE foi utilizado o extrato bruto seco da casca da espécie. Foi calculado a média aritmética dos valores da duplicata de cada concentração para obter-se a média de absorvância, os valores obtidos do experimento apresentaram hemólise de apenas 2,95% na maior concentração, a de 1000 µg/mL. Apresentando baixa toxicidade, considerando que o percentual normal de hemólise é inferior a 1,32%.

Segundo os resultados que obteve Silva (2017) na realização do ensaio de fragilidade osmótica o ensaio de fragilidade osmótica apresentou baixa atividade hemolítica e a morfologia dos eritrócitos manteve-se preservada. O que pode ser considerado um efeito fisiologicamente positivo, uma vez que não houve aparente perturbação na membrana celular eritrocitária.

Figura 4: Curva de concentração – Resposta da toxicidade aguda do extrato bruto seco das cascas de *Croton Heliotropiifolius* Kunth



Percentual de lise das hemácias de acordo com as concentrações do extrato bruto seco das cascas de *Heliotropiifolius* Kunth (Cróton).

• **ANÁLISE DA CYNOPHALLA HASTATA (JACQ.) J. PRESL**

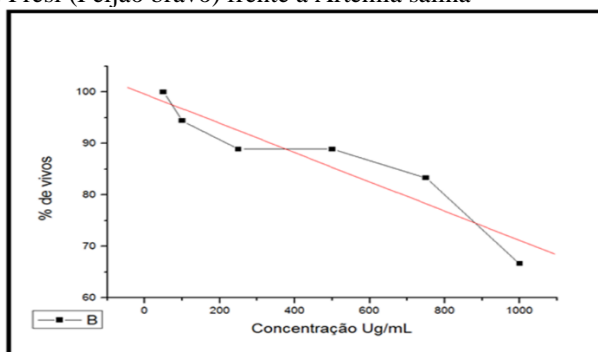
Avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina* Leach (Figura 5).

O extrato de *Cynophalla hastata* (Jacq.) J. Presl (Feijão bravo) foi obtido a partir das folhas de sua espécie. Na avaliação de toxicidade frente à *Artemia salina* Leach., observou-se um percentual de vivos considerável de 67% à concentração de 1000 µg/mL. A esquematização do gráfico e a determinação dos parâmetros a e b, para a obtenção do valor da Concentração Letal Média resultou em um valor de $CL_{50} = 1.745,1415$ µg/mL.

Os animais expostos às concentrações mais altas do extrato da planta 500 µg/mL e 1000 µg/mL não apresentaram movimento retardatório em relação ao controle, quando observadas em fonte luminosa durante dez segundos, não havendo alterações comportamentais referentes às altas concentrações do extrato. A Figura X apresenta o gráfico com o percentual de mortalidade diretamente proporcional ao aumento da concentração do extrato.

Ao observar o único estudo acerca da espécie até o momento, realizado por Cordeiro (2017), os resultados da determinação da CL_{50} da planta mostraram que os extratos são atóxicos nas concentrações testadas, pode-se concluir que diante os valores alcançados no gráfico a espécie em questão não possui toxicidade relevante frente a *Artemia salina* nas condições e concentrações testadas.

Figura 5: Curva de concentração – Resposta da toxicidade aguda do extrato bruto seco das folhas de *Cynophalla hastata* (Jacq.) J. Presl (Feijão bravo) frente a *Artemia salina*



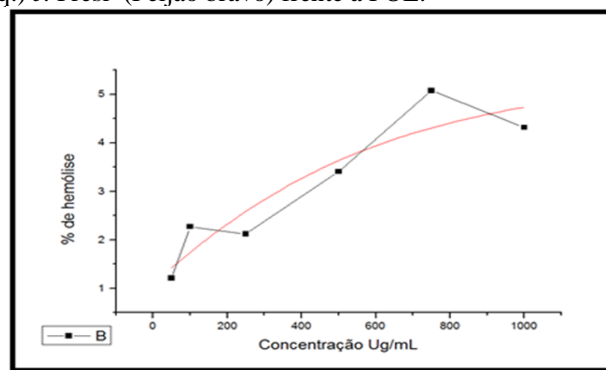
Percentual de larvas de *A. salina* L. vivas de acordo com as concentrações do extrato bruto seco das folhas de *Cynophalla hastata* (Jacq.) J. Presl (Feijão bravo).

Avaliação de toxicidade frente à Fragilidade osmótica eritrocitária (Figura 6).

Para determinação da Fragilidade osmótica eritrocitária foi utilizado o extrato bruto seco da casca da *Cynophalla hastata* (Jacq.) J. Presl, popularmente chamado de Feijão bravo. Para a realização da técnica calculou-se a média aritmética dos valores da duplicata de cada concentração para obter-se a média de absorbância, os valores

alcançados no experimento apresentaram hemólise de 4,31% na maior concentração, a de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Apresentando moderado percentual de lise das hemácias diante dos parâmetros e condições testadas. Ao comparar com os resultados de Cordeiro (2017) foi visto que o extrato da casca promove considerável hemólise nas células sanguíneas e os extratos das folhas e da casca apresentaram atividades antimicrobianas positivas nas principais bactérias causadoras de infecção hospitalar como *staphylococcus aureus*, *streptococcus agalactie* e *pseudomonas aeruginosa*.

Figura 6: Curva de concentração – Resposta da toxicidade aguda do extrato bruto seco das cascas de *Cynophalla hastata* (Jacq.) J. Presl (Feijão bravo) frente a FOE.



Percentual de larvas de *A. salina* L. vivas de acordo com as concentrações do extrato bruto seco das folhas de *Cynophalla hastata* (Jacq.) J. Presl . (Feijão bravo).

• ANÁLISE DA DIPTERYX ODORATA (AUBLET.) WILLD

Avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina* Leach (Figura 7).

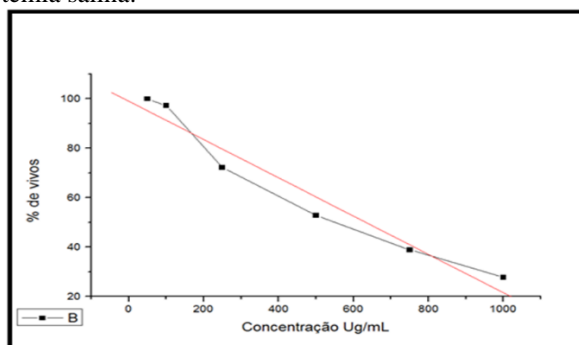
No bioensaio com o extrato bruto seco de *Dipteryx odorata* (Aublet.) Willd (Cumaru), percebeu-se que as larvas expostas às concentrações mais altas 750 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$ demonstram movimentos mais lentos divergindo-se do controle. Entretanto, os que foram submetidos às concentrações mais baixas apresentam movimentos semelhantes ao do padrão. O resultado da função obtida a partir dos parâmetros a e b apresentou valor numérico de 632,505 $\mu\text{g/mL}$, o que corresponde ao valor de CL_{50} .

Quando comparado aos valores de referência de toxicidade frente à *Artemia salina* sendo eles, valores numericamente abaixo de 1000 $\mu\text{g/mL}$ pode-se afirmar que nas condições testadas, o extrato bruto seco analisado evidencia-se como potencialmente tóxico aos microcrustáceos. Não sendo possível observar alterações comportamentais significativas da espécie em nenhuma das concentrações durante o período de exposição ao extrato no bioensaio.

Ao analisar o estudo realizado por Almeida (2006), foi possível observar que a mesma adotou uma metodologia diferente da adotada nesse trabalho, a mesma seguiu a

metodologia proposta por Mc Laughlin, ao realizar os testes de citotoxicidade foi encontrada a dificuldade em solubilizar o bergapteno. Das moléculas analisadas, a mais ativa foi o psoraleno, pois a concentração de 50 µg/mL foi suficiente para matar totalmente as artemias, portanto este teste deverá ser repetido em menores concentrações a fim de calcular a DL50, desta forma, os testes de citotoxicidade frente às larvas de *Artemia salina* foram inconclusivos e precisam ser refeitos para mais conclusões.

Figura 7: Curva de concentração – resposta da toxicidade aguda do extrato bruto seco de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd frente a *Artemia salina*.



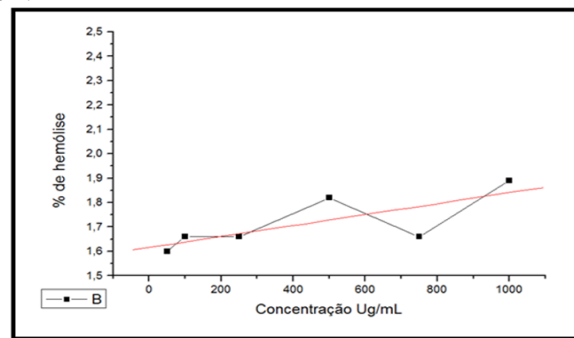
Percentual de larvas de *A. salina* L. vivas de acordo com as concentrações do extrato bruto seco de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd.

Avaliação de toxicidade frente à Fragilidade osmótica eritrocitária (Figura 8).

Na avaliação do Cumaru, para determinação da FOE foi utilizado o extrato bruto seco da espécie. Calculou-se a média aritmética dos valores da duplicata de cada concentração para obter-se a média de absorvância, os valores obtidos o experimento apresentou hemólise de apenas 1,89% na maior concentração, a de 1000 µg/mL. Apresentando baixo percentual de lise das hemácias diante dos parâmetros e condições testadas.

Ao consultar a literatura, foi possível encontrar o estudo de Alves (2015) que avalia o potencial citotóxico das cumarinas e relata a fragilidade osmótica de eritrócitos humanos, no qual foram capazes de induzir hemólise em eritrócitos humanos pertencentes aos três tipos sanguíneos do sistema ABO, entretanto em porcentagens muito baixas, desta forma, a composição química predominante na espécie não é capaz de modificar a fragilidade osmótica da membrana dos eritrócitos humanos.

Figura 8: Curva de concentração – resposta da toxicidade aguda do extrato bruto seco de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd frente a FOE.



Percentual de lise das hemácias de acordo com as concentrações do extrato bruto seco das cascas de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd frente a FOE.

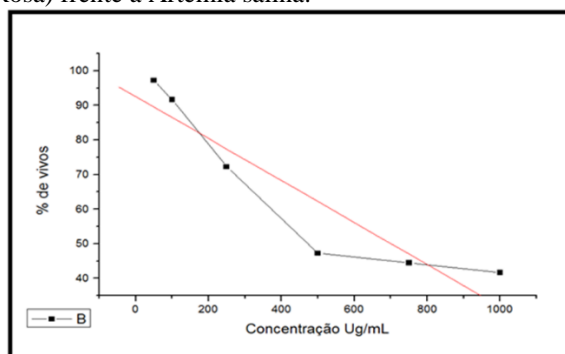
• ANÁLISE DA *GERANIUM ERODIFOLIUM* (L.)

Avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina* Leach (Figura 9).

No bioensaio com o extrato bruto seco da *Geranium erodifolium* L., *Malva Rosa*, observa-se que os animais expostos as concentrações mais altas 750 µg/mL e 1000 µg/mL demonstram movimentos parecidos com a do controle. O resultado da função obtida a partir dos parâmetros a e b apresentou valor numérico de 700,966 µg/mL, o que corresponde ao valor de CL₅₀. Quando comparado aos valores de referência de toxicidade frente à *Artemia salina*, pode-se afirmar que nas condições testadas o extrato bruto seco apresentou-se com potencial tóxico aos microcrustáceos.

Não se observou alterações comportamentais significativas da espécie em nenhuma das concentrações durante o período de exposição ao extrato no bioensaio. Recentemente Paixão et al., (2017) também realizaram um bioensaio toxicológico utilizando os mesmos microcrustáceos, no qual, o extrato da *G. erodifolium* é considerado moderadamente tóxico. O estudo ainda aborda que, no bioensaio da concentração letal, o número de larvas mortas foi proporcional ao aumento da concentração (PAIXÃO et al., 2017), possibilitando, assim, o potencial tóxico ameno.

Figura 9: Curva de concentração – resposta da toxicidade aguda do extrato bruto seco de *Geranium erodifolium* (L.) (Malva Rosa) frente a *Artemia salina*.



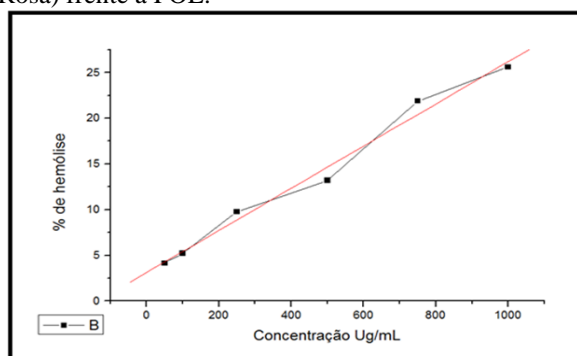
Percentual de larvas de *A. salina* L. vivas de acordo com as concentrações do extrato bruto seco de *Geranium erodifolium* (L.) (Malva Rosa) frente a *Artemia salina*.

Avaliação de toxicidade frente à Fragilidade osmótica eritrocitária (Figura 10).

Na avaliação da Malva Rosa, para determinação da FOE foi utilizado o extrato bruto seco da espécie. Foi calculado a média aritmética dos valores da duplicata de cada concentração para obter-se a média de absorbância, os valores obtidos o experimento apresentou hemólise de 25,61% na maior concentração, a de 1000 µg/mL. Apresentando moderado percentual de lise das hemácias diante dos parâmetros e condições testadas.

Em estudos recentes elaborados por Paixão et al., (2017) utilizando esta técnica, o extrato bruto seco da *Geranium erodifolium* (L.) (Malva Rosa) mostrou um pequeno percentual de lise das hemácias, corroborando com os resultados obtidos nesta avaliação.

Figura 10: Curva de concentração – resposta da toxicidade aguda do extrato bruto seco de *Geranium erodifolium* (L.) (Malva Rosa) frente a FOE.



Percentual de lise das hemácias de acordo com as concentrações do extrato bruto seco de *Geranium erodifolium* (L.) (Malva Rosa).

• ANÁLISE DA OPERCULINA MACROCARPA (L.) URB.

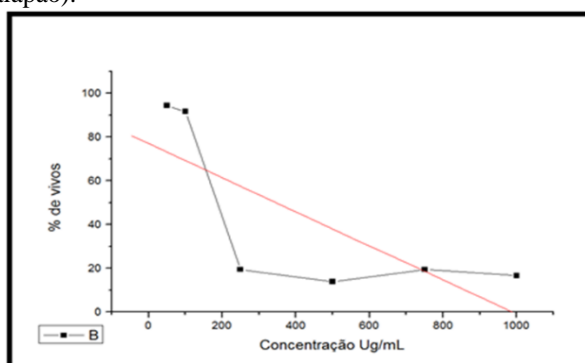
Avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina* Leach (Figura 11).

O extrato da *Operculina macrocarpa* (L.) Urb., popularmente conhecido como Jalapão foi submetido a avaliação de toxicidade utilizando a *Artemia salina* Leach. Após

ser analisado em ensaios in vivo, os valores alcançados apresentaram uma toxicidade relevante. O resultado obtido foi determinado através da CL50 de 346,622 permitindo classificar o jalapão como uma planta tóxica. A esquematização da Figura X, apresenta o percentual de vivos em função da concentração.

Ao analisar o estudo de Luna (2005), pode-se observar diferentes técnicas para determinação da toxicidade de algumas espécies, com isto, verificaram um potencial tóxico nos extratos dos tubérculos da mesma, indicando a necessidade do desenvolvimento de novas pesquisas acerca de plantas nativas da caatinga.

Figura 11: Curva de concentração – Resposta da toxicidade aguda do extrato bruto seco de *Operculina macrocarpa* (L.) Urb. (Jalapão).

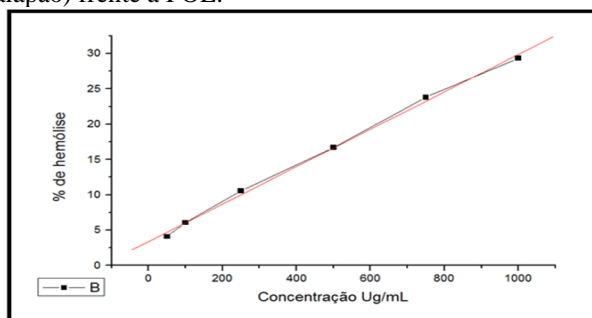


Percentual de larvas de *A. salina* L. vivas de acordo com as concentrações do extrato bruto seco de *Operculina macrocarpa* (L.) Urb. (Jalapão).

Avaliação de toxicidade frente à Fragilidade osmótica eritrocitária (Figura 12).

No estudo com o Jalapão, para determinação da FOE foi utilizado o extrato bruto seco da espécie. Foi calculado a média aritmética dos valores da duplicata de cada concentração para obter-se a média de absorvância, os valores obtidos o experimento apresentou hemólise de 29,32% na maior concentração, a de 1000 µg/mL. Apresentando moderado percentual de lise das hemácias diante dos parâmetros e condições testadas, apesar dos esforços para encontrar algum dado comparativo, não foi possível localizar uma literatura correspondente a pesquisa em questão, sugerindo a necessidade de novos estudos acerca da espécie.

Figura 12: Curva de concentração – resposta da toxicidade aguda do extrato bruto seco de *Operculina macrocarpa* (L.) Urb. (Jalapão) frente a FOE.



Percentual de lise das hemácias de acordo com as concentrações do extrato bruto seco de *Operculina macrocarpa* (L.) Urb. (Jalapão).

4 CONCLUSÃO

Os ensaios de toxicidade frente aos microcrustáceos de *Artemia salina* Leach e a fragilidade osmótica eritrocitária dos extratos vegetais pertencentes a Caatinga demonstraram que a espécie *Cynophalla hastata* (Jacq.) J. é atóxica, corroborando com os resultados de toxicidade aguda descritos na literatura.

As demais espécies utilizadas nos testes apresentaram-se como moderadamente tóxica, com exceção da *Operculina macrocarpa* (L.) Urb, na qual, foi evidenciado um potencial tóxico mais acentuado, uma vez que sua CL_{50} procedeu em 346,6222 µg/mL. Os resultados alcançados na determinação da fragilidade osmótica eritrocitária também respaldam o da *A. Salina*, visto que, *Geranium erodifolium* (L.) e *Operculina macrocarpa* (L.) Urb. (Jalapão) apresentaram um maior percentual de hemólise respectivamente com 25,61% e 29,32%, entretanto as outras espécies em avaliação demonstram-se moderadamente tóxica.

Em razão disso, faz-se necessário a realização de novos ensaios toxicológicos para melhor elucidação da toxicidade relatada da *Operculina macrocarpa* (L.) Urb. (Jalapão) neste trabalho, com a finalidade de validar, cada vez mais, o seu uso na medicina popular e na elaboração de futuros medicamentos fitoterápicos.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro Universitário Tabosa de Almeida (ASCES-UNITA) pela colaboração à pesquisa, ao professor Risonildo Cordeiro pelo acolhimento e ao nosso eterno orientador Arquimedes Melo (in memoriam) que sempre foi um grande incentivador da pesquisa. Por fim, a todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indiretamente com o trabalho.

REFERÊNCIAS

- 1 JUIZ, P. J. L.; ALVES, R. J. C.; BARROS, T. F. Uso de produtos naturais como coadjuvante no tratamento da doença periodontal. *Rev. Bras. Farmacogn.* 20(1): jan. /mar, 2010.
- 2 REBOUÇAS, F.S. Cultivo in vitro de plantas medicinais: *Ocimum basilicum* L. e *Cissampelos* L. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Curso Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Área de concentração Fitotecnia. Cruz das Almas, 2009.
- 3 FIRMO, W.C.A. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. *Caderno de Pesquisa, São Luís*, v. 18, n. especial, p.90-95, 2011.
- 4 ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.16 (Supl.) p. 678-689, 2006
- 5 Ministério da Saúde; Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 26/2014 – Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Brasília (Brasil): Ministério da Saúde; 2014.
- 6 TROVÃO, D. M. B. M. Fitossociologia e aspectos ecofisiológicos do componente lenhoso em fragmento de caatinga na sub-bacia hidrográfica do rio Bodocongó – PB. 2004. Tese de Doutorado. (Doutorado em Recursos Naturais/ UFCG).108p
- Ministério da Saúde; Conselho Nacional de Saúde. Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Brasília (Brasil): Ministério da Saúde; 2006.
- 8 MORGAN, G. R. Geographic Dynamics and Ethnobotany. In: **Ethnobotany: Evolution of a Discipline**. Dioscorides Press. p. 250-257, 1995
- 9 ALBUQUERQUE, U. P. Etnobotânica: uma aproximação teórica e epistemológica. **Revista Brasileira de Farmacologia**. v. 78, n. 3, p. 60-64, 1997
- 10 MAIOLI-AZEVEDO V.; FONSECA- KRUEL V. S. Plantas medicinais e ritualísticas vendidas em feiras livres no município do Rio de Janeiro, Brasil: estudo de caso nas zonas Norte e Sul. **Acta bot. bras**, V. 21, n. 2. 263-275. 2007.
- 11 Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, Mclaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med**, v. 45, n.31, 1982.
- 12 Nascimento JE, Melo AFM, Lima E Silva TC, Veras Filho J, Santos EM, Albuquerque UP, et al. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.** v.29, n. 2, p. 145-150,2008.
- 13 Barros JD, Souza Filho S, Castro V, Torres VM, Higino JS, Melo AFM. Estudo toxicológico pré-clínico agudo e determinação da CL50 do extrato bruto seco das folhas da *Vitex agnus castus* linn. **Rev. Eletronica Farm.** v.7, n. 3, p. 62-71,2010.

- 14 Cavalcante MF, Oliveira MCC, Velandia JR, Echevarria A. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nov.** v. 23, p. 20-22,2001
- 15 Rodrigues E, Duarte-Almeida JM, Pires JM. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos caboclos do Parque Nacional do Jaú (AM) como potenciais analgésicas. Parte I. **Rev. Bras. Farmacogn.** v.20, n. 6, p. 981-991,2010.
- 16 DACIE J. V, LEWIS S. M. Practical Hematology. 5th Edition. Churchill Livingstone. London. 629 pp. 1975
- 17 RL Fabri, DS De Sá, APO Pereira, E. Scio, DS Pimenta e LM Chedier, “Antimicrobial, antioxidant and cytotoxicity potencial of *Manihot multifida* (L.) Crantz (Euphorbiaceae),” *Anais da Academia Brasileira de Ciências* , vol. 87, n. 1, pp. 303–311, 2015.
- 18 MEDEIROS, Josimar Araújo de. Reabilitação de áreas em processo de desertificação no semiárido norterriograndense com a faveleira: espécie-chave cultural do bioma caatinga. 2017. 151f. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.
- 19 DA SILVA, Willams Alves et al. Perfil fitoquímico e avaliação toxicológica *Croton Heliotropiifolius* frente à *Artemia Salina* Leach. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 4, p. 10580-10590, 2020.
- 20 SILVA, Jéssica de Andrade Gomes. **Investigação fitoquímica e biológica de folhas do *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco,2017.
- 21 CORDEIRO, Beatriz de Araújo. Avaliação antimicrobiana e análise toxicológica a partir do extrato bruto seco das folhas e da casca de feijão-bravo (*cynophalla hastata* (jacq.) J. Presl), 2017.
- 22 DE ALMEIDA, GISELLE VIANA. Modificação estrutural e avaliação da citotoxicidade frente a larvas de artemia salina de furocumarinas isoladas de *brosimum gaudichaudii*, 2006.
- 23 ALVES, Ruhama Estevam et al. Investigação dos efeitos antibacteriano e citotóxico de cumarinas, 2015.
- 24 PAIXÃO, Y. D. L.; ALMEIDA, T. S. ; SILVA, J. K. ; SILVA, J. R. G. ; MELO, A. F. M. ; CORDEIRO, R. P. . Determinação da fragilidade osmótica eritrocitária e da CL50 do extrato bruto seco de *Geranium erodifolium* L. (Malva-rosa). In: VIII Simpósio Ibero-americano de Plantas Medicinais e III Simpósio Ibero-americano de Investigação em Câncer, 2016, Itajaí. Resumos do VIII Simpósio Ibero-americano de Plantas Medicinais (VIII SIPM) e III Simpósio Ibero-americano de Investigação em Câncer (III SIIC). Brasília: Infarma - Ciências Farmacêuticas, 2016. v. 29. p. 676.
- 25 LUNA, J. de S. et al. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 199-206, 2005.