

## AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE TRÊS PLANTAS MEDICINAIS FRENTE A *Artemia salina*

Hidekazu Bispo LEOPOLDINO<sup>1</sup>,  
Gilmar Aires da SILVA<sup>2</sup>.

**RESUMO:** Devido a crescente utilização de plantas medicinais, muitas vezes usadas sem conhecimento de sua atividade toxicológica e farmacológica e a falsa crença de que as mesmas não causam danos ao organismo o presente trabalho se propôs avaliar a toxicidade da *Lippia alba*, *Cymbopogon citratus* e *Rosmarinus officinalis* frente à *Artemia salina*, nas concentrações de 1000 ppm, 500 ppm e 100 ppm e buscou discutir a viabilidade do teste empregado. As espécies citadas foram coletadas na cidade de Ceres e Nova Glória em Goiás. Logo depois, as plantas foram secas em temperatura ambiente protegidas da luz durante sete dias, elas foram então trituradas e submetidas à maceração durante três dias, depois os extratos etanólicos foram secos em rotaevaporador, os quais foram diluídos nas respectivas concentrações. Em seguida, um mililitro dos extratos foi adicionado em cada tubo, para cada tubo foi transferido dez larvas, o teste foi feito em triplicata. Após vinte e quatro horas foram contadas o número de larvas mortas, posteriormente foi feito cálculo da CL50 por meio do programa GraphPad 5.0. Todos três extratos apresentaram atividade biológica sobre a *Artemia salina*, sendo classificados como moderadamente tóxicos e se faz necessários estudos para isolar os princípios ativos e verificar sinergismos entre os mesmos, sendo que este bioensaio se mostrou de baixo custo, rápido, não exigiu técnicas assépticas.

**Palavras-chave:** Plantas medicinais. Bioensaio. Toxicidade. *Artemia salina*.

### **EVALUATION OF TOXICITY OF THREE MEDICINAL PLANTS OF *Artemia salina***

**ABSTRACT:** Due to increasing use of herbal medicines, often used without knowledge of its pharmacological and toxicological activity and the false belief that they do not cause damage to the body this study proposes to evaluate the toxicity of *Lippia alba*, *Rosmarinus officinalis* and *Cymbopogon citratus* front to *Artemia salina*, at concentrations of 1000 ppm, 500 ppm and 100 ppm, and discusses the feasibility of the test employed. These species were collected in the city of Ceres and Nova Glória Goiás. Soon after, the plants were dried at room temperature protected from light for seven days, they were then crushed and submitted to percolation for three days after the ethanol extracts were dried on rotaevaporator, which were diluted in the respective concentrations. Then one milliliter of the extract was added to each tube, each with ten larvae test was done in triplicate. Twenty four hours were counted the number of dead larvae later calculation of LC50 was made using the GraphPad 5.0. All three extracts showed biological activity on *Artemia salina*, were classified as moderately toxic and makes necessary studies to isolate the active ingredients and check synergisms between them, and this bioassay proved inexpensive, fast, did not require aseptic techniques.

**Keywords:** Medicinal plants. Bioassay. Toxicity. *Artemia salina*.

## INTRODUÇÃO

<sup>1</sup> Acadêmico de Farmácia da Faculdade de Ceres

<sup>2</sup> Docente da Faculdade de Ceres

Mestre em Química dos Produtos Naturais – IQ/UFG

Av. Brasil, S/N, Qd. 13 Morada Verde Ceres - Go

Fone: (62) 3323-1040

e-mail: [gilmaraires@hotmail.com](mailto:gilmaraires@hotmail.com)

O ser humano acumula muitas informações derivadas de sua vida em sociedade fruto do ambiente que o cerca, isso permitirá a interação com o mesmo e garantirá sua sobrevivência. Nesse contexto podemos citar a vegetação, que esta sociedade esta próxima (VIGANÓ; VIGANÓ; CRUZ-SILVA, 2007).

A vegetação tem merecido destaque devido ao interesse da população e indústria farmacêutica pelas plantas medicinais (TURROLLA; NASCIMENTO, 2006). Em geral as plantas medicinais são utilizadas pela população na forma de chás obtidos de plantas frescas ou secas, já na indústria farmacêutica são usadas como matéria prima para extração, ou modelo para obtenção de princípios ativos e, sobretudo, para produção de tinturas, xaropes, chás, extratos fluidos e secos (ARAÚJO et al., 2006; SOUZA, 2007).

De acordo com AMENI (2011) criou-se uma forte crença de que produtos naturais não causam risco à saúde, entretanto, sabe-se que plantas medicinais podem causar danos ao organismo.

Algumas plantas possuem substâncias potencialmente perigosas, que são agressivas, devendo ser usadas com cuidado e respeito aos efeitos tóxicos e a suas interações com fármacos. Temos vários exemplos de ações tóxicas e de reações adversas no organismo como: efeitos hepatotóxicos, nefrotoxicidade, citotóxico ou genotóxico, neurotoxicidade, antinutricionais e hipersensibilidade (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; CARVALHO, 2011).

Estas plantas são utilizadas sem conhecimento de suas propriedades farmacológicas e toxicológicas. Para seu uso de maneira racional deve-se avaliar a relação risco/benefício, através de análises laboratoriais da ação tóxica e farmacológica. Visto que somente os conhecimentos populares e tradicionais não são capazes de provarem a eficácia e segurança das plantas medicinais (FARIAS, et al., 2007).

Uma forma rápida e barata de teste de bioatividade em produtos naturais, é a exposição a *Artemia salina*, que é um microcrustáceo de água salgada que é utilizado como alimento para peixes (MCLAUGHLIN; CHANG; SMITH, 1991), aos extratos brutos da plantas para determinar a concentração letal mediana (CL50) (BEDNARCZUK et al., 2010).

Com o aumento do uso de plantas medicinais, também aumentou a preocupação com a toxicidade das mesmas, já que os efeitos tóxicos apresentados

devido ao uso inadequado, muitas vezes, são desconhecidos ou ignorados. As plantas podem apresentar toxicidade conforme seu uso, tempo de exposição, forma de preparo dentre outras maneiras. Portanto, toxicidade de planta medicinal constitui um problema de saúde pública, devido ter sido cada vez mais frequentes casos de intoxicação decorrente de plantas medicinais (AMARAL; SILVA, 2008). Segundo dados do Sistema Nacional de Informações Toxicológicas (SINITOX) no ano de 2010, no Brasil foram notificados 1132 casos de intoxicações humanas decorrentes do uso de plantas sendo que desses, 5 foram a óbito (SINITOX, 2010).

Assim sendo, o presente trabalho se propôs avaliar a toxicidade da *Lippia alba* (Erva-cidreira), *Cymbopogon citratus* (Capim Limão) e *Rosmarinus officinalis* (Alecrim) frente a *Artemia salina* nas concentrações 1000 ppm, 500 ppm e 100 ppm comparando os resultados encontrados experimentalmente com os existentes na literatura. E também buscou discutir a viabilidade do bioensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* (TAS), para determinar o (CL50).

## **METODOLOGIA**

Trata-se de um trabalho experimental com aspectos quantitativo, segundo descrito por MEYER et al., (1982) e MCLAUGHLIN; CHANG; SMITH (1991) com adaptações:

### **Materiais**

#### *Artemia salina*

Foram utilizados ovos de *Artemia salina* comprados em lojas de aquária e cultivados no Laboratório de Química Multiuso II da FACER – Faculdade de Ceres - GO.

#### Solução salina para eclosão dos ovos de *Artemia salina*

Foram utilizados sal marinho e água destilada, originando uma solução saturada de sal marinho.

#### *Material vegetal*

As espécies *Lippia alba*, *Cymbopogon citratus* e *Rosmarinus officinalis* foram coletadas nos municípios de Ceres e Nova Glória, estado de Goiás, em agosto de 2013. A identificação do material botânico foi realizada a partir de comparação com dados existentes na literatura.

## **Métodos**

### *Preparação dos extratos*

O material vegetal foi seco à temperatura ambiente protegido da luz e da umidade por 7 dias. Após a secagem, foi submetido à trituração com o auxílio de almofariz e pistilo, obtendo-se 1,61 g de *Lippia alba*, 1,40 g de *Cymbopogon citratus* e 1,45 g de *Rosmarinus officinalis*. Em seguida o material foi submetido à percolação com etanol (EtOH) a 95 INPM (Instituto Nacional de Pesos e Medidas) durante 3 dias. Em seguida o extrato foi filtrado e evaporado com o auxílio do rotaevaporador sob temperatura inferior a 40 °C até *secura total* dos extratos.

### *Diluição dos extratos*

Para cada uma das três plantas, foram feitas diluições dos extratos brutos etanólicos em água, obtendo-se as seguintes concentrações: 1000 ppm; 500 ppm e 100 ppm.

### *Solução salina para cultivo das larvas de Artemia salina*

Em um béquer de 500 mL, foi preparada uma solução salina contendo 17,98 g de sal marinho e 500 mL de água destilada. Após ser homogeneizada com um bastão de vidro, a solução foi aerada com a ajuda de uma bomba de vácuo durante 30 minutos. Foram incubados 50 mg de cistos de *Artemia salina* durante 48 horas.

### *Bioensaio de toxicidade para as larvas de Artemia salina*

Utilizou-se a metodologia descrita por MEYER et al., (1982) com adaptações. Com o auxílio de duas pipetas automáticas, uma de 200 µL, e outra de 1000 µL (1 mL), foram transferidas 10 larvas para cada tubo de ensaio, o volume foi então completado para 9 mL de solução salina, e logo após foi adicionado 1 mL dos extratos em cada tubo de ensaio. O teste foi feito em triplicata para cada extrato

bruto e suas diluições. Além disso, foi realizado o controle negativo (branco), neste tubo de ensaio foi adicionado apenas 10 larvas em 10 mL de solução salina, sem adicionar o extrato.

### *Contagem das larvas*

Após 24 horas em contato com a solução dos extratos, foi feita a contagem do número de larvas vivas e os dados foram tabulados.

### Análise estatística dos resultados

O CL50 dos extratos das folhas das três espécies foi determinada utilizando o programa GraphPadPrism 5.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo CAZARIN et al., (2004) existem vários fatores que interferem na toxicidade, entre estes temos a concentração da amostra testada. A tabela 1 mostra o (CL50) sobre a *Artemia salina* e o número de mortes em diferentes concentrações para cada planta medicinal.

Os extratos apresentaram atividade biológica frente a *Artemia salina* em todas as concentrações testadas. Sendo que o maior percentual de morte foi observado nas concentrações maiores de 500 ppm e 1000 ppm, enquanto que na menor concentração de 100 ppm o percentual de mortes foi menor. Pode-se observar que os extratos nas concentrações mais altas provocaram uma grande mortalidade para *A. salina*.

Tabela 1. Valores de CL50 calculados para os extratos de *Lippia alba*, *Cymbopogon citratus* e *Rosmarinus officinalis*, e o número de mortes em diferentes concentrações.

Plantas Medicinais	Número de mortes (%)			CL50 (ppm)
	100 ppm	500 ppm	1000 ppm	
<i>Rosmarinus officinalis</i>	40	70	75	378,76
<i>Cymbopogon citratus</i>	50	60	75	394,44
<i>Lippia alba</i>	30	55	76	459,69

De acordo com MEYER, et al. (1982) possui uma relação entre o grau de toxicidade e o CL50, para extratos vegetais sobre a *Artemia salina*, quando for

encontrado valores acima de 1000 µg/mL que equivale a 1000 ppm e não houver morte maior que 50%, estes são considerados atóxicos.

Portanto a *Lippia alba*, *Cymbopogon citratus* e *Rosmarinus officinalis* são tóxicas, pois o número de morte na concentração de 1000 ppm foi superior a 50%. Observa-se que na concentração de 500 ppm o número de mortes foi superior a 50%, o que demonstra a toxicidade mesmo em concentrações menores. Já o número significativo de mortes na concentração de 100 ppm pode ser não necessariamente a concentração que ocasionou, mas devido outros fatores como temperatura, sujidades nas vidrarias entre outros.

Em geral, extratos com alta toxicidade para *Artemia salina* apresentam (CL50 < 200 µg/mL), com toxicidade moderada apresentam (CL50 > 200 µg/mL e < 500 µg/mL), toxicidade leve quando apresentam (CL50 ≥ 500 µg/mL e ≤1000 µg/mL), e são considerados atóxicos quando apresentam (CL50 > 1000 µg/mL) (BUSSMANN et al., 2011; COSTA et al., 2009).

Dessa forma, todos três extratos vegetais testados apresentaram toxicidade moderada sobre a *Artemia salina*.

Apesar de não existir relatos na literatura sobre intoxicações decorrentes do uso dessas três plantas medicinais, existem plantas potencialmente tóxicas, com sua atividade tóxica demonstrada na literatura como a *Dieffenbachia picta* (Comigo-ninguém-pode), quando ingerida qualquer parte da planta ocorre irritação acentuada da mucosa da boca, a língua e gengiva ficam edemaciadas e apresentam sintomas como náuseas, vômitos, salivação aumentada e edema de glote (OLIVEIRA, 2003).

## CONCLUSÃO

Portanto todos os três extratos testados apresenta atividade biológica e os mesmos são tóxicos se usados em concentrações altas. Faz-se necessários estudos para isolar os princípios ativos e verificar sinergismos entre os mesmos. O uso deste bioensaio para avaliar a toxicidade de produtos naturais se mostrou de baixo custo, rápido, não exigiu técnicas assépticas e apresentou resultados relevantes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, E.A.; SILVA, R.M.G.; Avaliação da toxicidade aguda de angico (*Anadenantherafalcata*), pau-santo (*Kilmeyeracoreacea*), aroeira (*Pyrostegiavenusta*), por meio do bioensaio com *Artemia salina*. **Perquirêre-Revista Eletrônica da Pesquisa** –ISSN 1806-6399, Edição 5, Ano 5, jun 2008.

AMENI, A.Z. **Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos de extrato fluido de Casearinasyuvestris, em ratos Wistas**. 2011. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ARAUJO, A.A.S.; MERCURI, L.P.; SEIXAS, S.R.S.; STORPIRTIS, S.; MATOS, J.R. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo-SP, vol.42, n.2, pp. 269-277, 2006.

BEDNARCZUK, V. O. et al. Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.11, n. 2, p.44, jul/dez. 2010.

BUSSMANN, R. W. et al. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. **Journal o fethnopharmacology**, [s.l.], v. 137, p. 121-140, 2011.

CARVALHO, L. S. Alterações clínicas e histológicas decorrentes de neurointoxicação por plantas medicinais. 2011. In: **SEMINÁRIOS APLICADOS**, Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2011. Disponível em: <[http://portais.ufg.br/uploads/67/original\\_Seminario2011\\_Luciana\\_Carvalho\\_1c.pdf](http://portais.ufg.br/uploads/67/original_Seminario2011_Luciana_Carvalho_1c.pdf)>. Acesso em: 05 abr. 2013.

CAZARIN, C. C. K. et al. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. vol. 40 n. 3 São Paulo Julho/Setembro. 2004.

COSTA, E.S.S.; DOLABELA, M.F.; PÓVOA, M.M.; OLIVEIRA, D.J.; MULLER, A.H. Estudos farmacognósticos, fitoquímicos, atividade antiplasmódica e toxicidade em *Artemia salina* de extrato etanólico de folhas de *Montrichardialinifera* (Arruda) Schott, Araceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol.19, n. 4, pp. 834-838, João Pessoa-PB, 2009.

FARIAS, E.M.F.G.; SILVA, A.C.P; SOUZA, I.A.; ALBUQUERQUE, J.F.C.; CHIAPPETA, A.A.; SENA, K.X.F.R. Avaliação da toxicidade aguda do extrato metanólico de folhas de *LippiasidoidesCham.* (Verbenaceae) In. CONGRESSO

BRASILEIRO DE QUÍMICA, 2007, Natal, RN. **Anais** Natal: Sociedade Brasileira de Química. 2007. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2007/trabalhos/7/7-600-750.htm>>. Acesso em: 16 mar. 2013.

MCLAUGHLIN, J.L.; CHANG, C-J.; SMITH, D.L. In ***Studies in Natural Products Chemistry***, vol. 9, Ed. Atta-ur-Rahman, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam 1991, pp. 383-409.

MEYER, N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v. 45, [s.n.], pp. 31, 1982.

OLIVEIRA, F. **Fundamentos de farmacobotânica**. Editora Atheneu, ed 2, São Paulo, 2003.

SINITOX, Casos, Óbitos e Letalidade de Intoxicação Humana por Agente e por Região. Brasil, 2010. Disponível em: <[http://www.fiocruz.br/sinitox\\_novo/media/b3.pdf](http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/media/b3.pdf)>. Acesso em: 02 Abril. 2013.

SOUZA, C.R.F. **Produção de extratos secos padronizados de plantas medicinais brasileiras: estudo da viabilidade técnica e econômica do processo em leite de jorro**. 2007. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêutica, Universidade de São Paulo, São Paulo.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Farmacêutica**, vol.42, n.2, pp. 289-306, São Paulo-SP, 2006.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**, vol. 28, n. 3, pp. 519-528, 2005.

VIGANÓ, J.; VIGANÓ, J.A.; CRUZ-SILVA, C.T.A. Utilização de plantas medicinais pela população da região urbana de três barras do Paraná. **Acta Scientiarum. Health Science**, vol. 29, n. 1, pp. 51-58, Maringá-PR, 2007.