

## **RENDIMENTO E ATIVIDADE CITOTÓXICA FRENTE A *Artemia salina* Leach DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Calypttranthes spp.* (MYRTACEAE)**

Rayza Helen Graciano dos Santos (1); Maíra Honorato de Moura Silva (2); Elys Karine Carvalho da Silva (3); Maria Tereza dos Santos Correia (4)

Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (rayzahelen@hotmail.com) (1); Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal (mairamhms@hotmail.com) (2); Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (elyskarinec@gmail.com) (3); Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (mtscorreia@gmail.com) (4).

**Resumo:** As plantas constituem fontes naturais de diversas substâncias e metabólitos secundários. Por estarem presentes em diversas partes das plantas, possuem o seu potencial farmacológico comprovado em estudos científicos, por serem de fácil extração e economicamente viáveis, os óleos essenciais têm assumido papel de destaque nas pesquisas em produtos naturais. Com isso, o objetivo deste trabalho foi realizar ensaios de citotoxicidade com o modelo do microcrustáceo *Artemia salina* Leach para determinar a concentração letal para 50% dos indivíduos (LC50  $\mu\text{g/mL}$ ). Para isso, foi extraído o óleo essencial de folhas de *Calypttranthes spp.*, coletadas no Parque Nacional Vale do Catimbau, Buíque-PE, por hidrodestilação durante 4 horas e em seguida testados em *Artemia salina* quanto a sua toxicidade com diluições seriadas (1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25  $\mu\text{g/ml}$ ) de soluções de água do mar com Tween 80. Sendo medida a concentração letal para 50% de mortalidade após 24 h de exposição às diferentes soluções. LC50 crônico e intervalos de confiança de 95% foram determinados usando o método probit 10, como medida de toxicidade do óleo. O óleo essencial foliar de *Calypttranthes spp.* apresentou LC50 de 29,21  $\mu\text{g/ml}$  que, caracterizando-se como um óleo de alta toxicidade.

**Palavras-chave:** Artemia; Bioatividade; Caatinga; Óleo essencial; Toxicidade.

### **INTRODUÇÃO**

As plantas constituem fontes naturais de diversas substâncias e metabólitos secundários. A riqueza destes compostos fundamenta a exploração das espécies vegetais desde a antiguidade, pois são capazes de conferir resistência ao ataque de pragas e de doenças. Com isso, as plantas se tornaram uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais, pode-se utilizar para a produção de inúmeros fármacos (WALL E WANI, 1996).

Entre as diversas espécies encontradas na caatinga, várias plantas são consideradas como medicamentosas de uso popular, pois diversos tecidos como folhas, cascas e raízes são comercializados em formas, muitas rudimentares, farmacêutica e pré-farmacêuticas em calçadas e ruas das principais cidades, bem como em mercados e feiras livres. O uso de plantas medicinais ainda é frequente, tanto no meio rural quanto no urbano, principalmente

por parte da população carente, que recorrem à vegetação nativa, em busca da cura para os problemas enfrentados (MOSCA; LOIOLA, 2009).

Dentre os agentes terapêuticos vegetais, os óleos essenciais constituem um grupo de substâncias líquidas, voláteis, responsáveis pelo odor aromático de diversas plantas (COSTA et al., 2008), a Caatinga apresenta-se como um bioma promissor para o estudo destas como possíveis fontes de moléculas com atividade farmacológica devido suas condições específicas de clima, solo, localização geográfica, exposição à luz solar e temperatura.

Este ecossistema apontado como rico em espécies endêmicas e bastante heterogêneo, corresponde a um habitat tipicamente ocupado por diversas espécies, dentre elas as da família Myrtaceae, apresentando algumas espécies endêmicas e muitas outras adaptadas a este bioma.

Atualmente, o interesse e pesquisa de novas substâncias bioativas derivadas de produtos naturais está crescendo, fato atribuído à constante necessidade de tratamentos mais eficazes e acessíveis e de fácil obtenção (MEOT-DUROS et al., 2008; SILVA-CARVALHO et al., 2015), entre essas substâncias se encontram os óleos essenciais (OEs). A família Myrtaceae compreende cerca de 150 gêneros, com aproximadamente 3.600 espécies. No Brasil, a família abrange 23 gêneros e cerca de 1.000 espécies (SOBRAL et al., 2015) e é considerada uma das famílias mais importantes economicamente, ocupando a oitava posição em diversidade no Nordeste (SOBRAL; PROENÇA, 2006). Uma das características marcantes desta família é a presença em seus órgãos vegetativos e reprodutivos, de estruturas secretoras de óleos essenciais (CRONQUIST, 1981). Embora possuam muitos estudos de atividades e testes biológicos com espécies da família Myrtaceae, estudos com gênero *Calypttranthes* ainda são escassos, principalmente quando relacionados ao rendimento do óleo essencial e atividade biológicas.

Os compostos bioativos geralmente apresentam toxicidade, principalmente em altas doses. Desta forma, a avaliação do potencial tóxico em um organismo animal menos complexo pode ser usada para um monitoramento simples e rápido (MACIEL, 2002). O microcrustáceo *Artemia salina* Leach (Artemiidae) é um invertebrado de ecossistema aquático salino e marinho usado em ensaios laboratoriais de toxicidade e outras ações de estimativa de dose letal. São usados na avaliação toxicológica de extratos de plantas, bem como em óleos essenciais vegetais, por ser um teste rápido, eficiente, barato e que requer uma quantidade pequena de amostra.

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo a realizar ensaios de citotoxicidade de óleo essencial foliar de *Calypttranthes spp.* ocorrentes no Vale do Catimbau – Buíque/PE

(83) 3322.3222

contato@conadis.com.br

[www.conadis.com.br](http://www.conadis.com.br)

com o modelo do microcrustáceo *Artemia salina* Leach para determinar a concentração letal para 50% dos indivíduos (LC50 µg/mL). O microcrustáceo *Artemia salina* Leach (Artemiidae) é um invertebrado de ecossistema aquático salino e marinho usado em ensaios laboratoriais de toxicidade e outras ações de estimativa de dose letal.

## **METODOLOGIA**

- **Coleta do material**

As coletas das espécies de *Calypttranthes spp.* foram realizadas exclusivamente no perímetro da Caatinga (Vale do Catimbau, Buíque, PE) no mês de maio de 2018 (estação chuvosa). As coletas e observações de campo foram realizadas no Parque Nacional Vale do Catimbau, localizado a 285 Km do Recife. Fica situado entre o Agreste e o Sertão de Pernambuco, abrangendo terras do município de Buíque. O Parque é formado por elevações montanhosas de topo suave, encostas abruptas e vales abertos, distribuídos em aproximadamente 90.000 ha. Temperatura e precipitação médias anuais são de 25°C e 1.095,9 mm com maior pluviosidade entre abril a junho (SILVA; SCHLINDWEIN; RAMALHO, 2007).

Segundo o Ministério do Meio Ambiente (MMA) (2002), o PARNA do Catimbau é uma área de extrema importância para a conservação da biodiversidade. Do ponto de vista geomorfológico, o PARNA do Catimbau está inserido no Planalto da Borborema, apresentando relevo ondulado a fortemente ondulado, com altitudes variando de 650 a 1.000 m (CPRM 2005). Os solos são rasos a profundos, predominando Planossolo e Podzólico nas encostas e circundando a área serrana e Litólicos no topo das serras. O clima é do tipo tropical chuvoso, com verão seco (CPRM 2005).

- **Extração de óleos essenciais**

O óleo essencial de folhas de *Calypttranthes spp.* foi obtido em amostras de 100g de folhas frescas por hidrodestilação com água destilada, utilizando aparelho tipo Clevenger, por um período de quatro horas. Em seguida, o óleo foi coletado e seco com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e mantido em refrigerador (-5 °C) num frasco de vidro âmbar para os ensaios biológicos.

O rendimento do óleo essencial foi definido como o quociente do peso do óleo recolhido e o peso seco do material vegetal extraído (Equação 1) (SANTOS et al., 2014) e os

dados foram submetidos e os dados obtidos foram submetidos à análise estatística com teste de média (Teste de Tukey 5%).

Equação 1 – Rendimento de óleo essencial:

$$\frac{PO}{PS} \times 100$$

- **Teste de letalidade em *Artemia salina***

Óleo essencial foliar de *Calypttranthes spp.* foi avaliado em um teste para letalidade com larvas de *Artemia salina*. Toxicidade do óleo essencial (OE) foi testado usando uma diluição seriada de 1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 µg/ml de soluções de água do mar com Tween 80. Dez náuplios foram usados em cada teste e sobreviventes contados após 24 h. Três repetições foram utilizadas para cada concentração, sendo também uma série paralela de testes conduzidos com o branco controle. A concentração letal para 50% de mortalidade após 24 h de exposição, LC50 crônico e intervalos de confiança de 95% foram determinados usando o método probit 10, como medida de toxicidade do óleo ou frações.

Doses letais do óleo essencial foram determinadas usando o programa GraphPad Prism de software LC50, com base na análise probit de Finney método (FINNEY, 1971).

A toxicidade foi medida em termos de CL50 (letal concentração de 50% de metanauplios) e de acordo para Dolabela (1997):

LC50 <80 µg/mL, foi considerado altamente tóxico;  
entre 80 µg/mL e 250 µg/mL, moderadamente tóxico;  
LC50 > 250 µg/mL, baixa toxicidade ou não tóxico.

Óleos e extratos que não mostram 50% de mortalidade em qualquer das concentrações testadas foram considerados não tóxico.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

*Calypttranthes spp.* apresentou um rendimento percentual médio de óleo essencial (OE) foliar de 0,32715 % ± 0,053 na estação chuvosa (Figura 1). Corrêa et al. (1972) estudou rendimentos de espécies do gênero *Calypttranthes* ocorrentes na Amazônia, onde,

*Calypttranthes spruceana* Berg obteve um rendimento de 1,7% e outra espécie de *Calypttranthes* que não foi identificada obteve um rendimento de 2,2%, este mesmo rendimento de 2,2% foi encontrado no estudo de Chaves et al. (2007) em *Calypttranthes* sp., também coletada na Amazônia. Essas diferenças quantitativas observadas podem ser devidas à região de cultivo, condições edafoclimáticas e ano em que a espécie foi coletada, além de sofrer influência do método de extração que foi utilizado.

<i>Calypttranthes</i> spp.			
Extração	Peso do óleo (g)	Peso seco (g)	Rendimento (%)
1	0,378	100	0,378
2	0,3021	100	0,3021
4	0,3633	100	0,3633
5	0,2652	100	0,2652
Média			0,32715
D.P			0,0528

**Figura 1:** Rendimento do óleo essencial foliar de *Calypttranthes* spp.

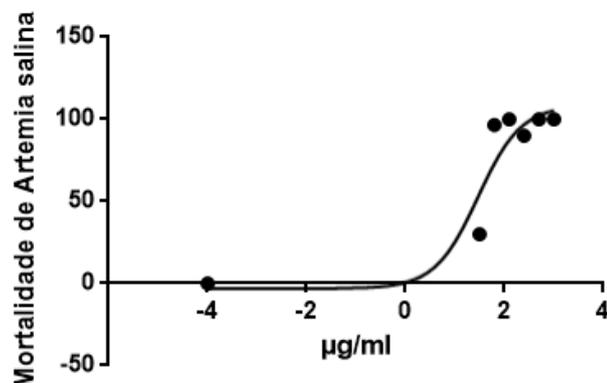
Estudos de toxicidade utilizando *Artemia salina* foram sugeridos em muitos compostos com atividade biológica para determinar sua potencial aplicação terapêutica (PARRA et al., 2001).

O óleo essencial de *Calypttranthes* spp. foi testado quanto a sua toxicidade sobre *Artemia salina* para determinar a concentração letal para 50% dos indivíduos (LC50 µg/mL) e apresentou LC50 de 29,21 µg/ml que, de acordo com Ramos et al. (2009), caracteriza-se como um óleo de alta toxicidade (Figura 2).

Teste de Toxicidade									
	1			2			3		
[µg/ml]	vivos	mortos	mortalidade	vivos	mortos	mortalidade	vivos	mortos	mortalidade
<b>1000</b>	0	9	100	0	6	100	0	10	100
<b>500</b>	0	10	100	0	10	100	0	9	100
<b>250</b>	1	9	90	2	8	80	0	7	100
<b>125</b>	0	10	100	0	10	100	0	8	100
<b>62,5</b>	1	9	90	0	9	100	0	9	100
<b>31,25</b>	7	0	0	9	0	0	1	9	90
<b>CT</b>	10	0	0	10	0	0	10	0	0
<b>CA</b>	10	0	0	10	0	0	10	0	0

**Figura 2:** Teste de toxicidade do óleo essencial de *Calypttranthes* spp. frente a *Artemia salina*.  
(83) 3322.3222

A partir da curva obtida pelo GraphPad Prism podemos observar que a letalidade das larvas é diretamente proporcional a concentração do óleo essencial testada (Figura 3). Ou seja, a medida que aumenta a concentração, aumenta a letalidade das *Artemias*.



**Figura 3:** Taxa de mortalidade de *Artemia salina* frente ao óleo essencial de *Calypttranthes spp.*

Quanto menor o valor de LC50 mais tóxico é o composto frente a um organismo-teste, e maior é sua atividade citotóxica, sugerindo maior potencial como antitumoral. Embora possuam trabalhos com o gênero *Calypttranthes* com suas frações de extratos testadas quanto sua toxicidade utilizando *Artemia salina* como modelo (CONRADO et al., 2011), estudos com os óleos essenciais deste gênero são escassos. Na literatura não há relatos de testes do óleo essencial da espécie para toxicidade em nenhum modelo animal, apenas em células tumorais.

## CONCLUSÃO

O óleo essencial de *Calypttranthes spp.* demonstrou ser farmacologicamente promissor, sendo uma possível fonte de substâncias biologicamente ativa com propriedades tóxicas, apresentando alta toxicidade de acordo com o LC50 calculado por meio do teste de toxicidade utilizando *Artemia salina* como modelo.

Com isso, é necessário que haja um cuidado e orientação da população quanto ao uso dessa espécie, pois seu uso em altas concentrações pode ser prejudicial. Sugere-se mais testes afim de verificar a toxicidade aguda e o seu real potencial antitumoral, uma vez esse ensaio de

toxicidade pode ter uma boa correlação com atividade citotóxica em alguns tumores humanos (McLAUGHLIN et al., 1998).

Espécies do gênero *Calyptranthes* coletadas na Amazônia possuem um maior rendimento do seu óleo essencial foliar, quando comparada a coletada na Caatinga (Vale do Catimbau – Buíque/PE) no presente estudo, sugerindo com isto, que esta espécie possa produzir mais óleo essencial em suas folhas quando estão em condições edafoclimáticas favoráveis de Mata Atlântica.

## **AGRADECIMENTOS**

A CAPES por conceder a bolsa de estudos para pesquisa do mestrado e ao Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica - LEAF pelo suporte na execução do experimento.

## **REFERÊNCIAS**

COE, F. G., PARIKH, D. M.; JOHNSON, C. A. Alkaloid presence and brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay of medicinal species of eastern Nicaragua, *Pharmaceutical Biology*, 48: 439-445, 2010. DOI: 10.3109/13880200903168015.

CONRADO, G. G.; GUILHON-SIMPLICIO, F.; PINHEIRO, C. C. S. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO EXTRATO DICLOROMETANO DE *Calyptranthes spruceana* Berg. (Myrtaceae). In: 51º Congresso Brasileiro de Química – Meio Ambiente e Energia, São Luís – MA, 2011. Disponível em: <http://www.abq.org.br/cbq/2011/trabalhos/7/7-122-10914.htm>. Acesso em: 24 de setembro de 2018.

COSTA, MARCO ANTÔNIO C.; JESUS, JOSÉ G.; FARIAS, JOÃO G.; NOGUEIRA, JOÃO CARLOS M.; OLIVEIRA, ANDRÉ LUIZ R.; FERRI, PEDRO HENRIQUE. Variação estacional do óleo essencial em arnica (*Lychnofora ericoides* Mart.). *Revista de Biologia Neotropical*, 5: 53-65, 2008.

CRONQUIST, A. An Integrated System of Classification of Flowering Plants, Columbia University: New York, 1981.

DOLABELA, M. F. Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti-*Trypanosoma cruzi* de extratos vegetais, produtos naturais e substancias sintéticas. Dissertação de Mestrado - UFMG, Belo Horizonte, 1997.

FINNEY, D. Em probit analysis; 3a ed., Cambridge University Press: Cambridge, 1971.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, J. V.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. Química Nova, 25: 429, 2002.

MCLAUGHLIN, J.L.; ROGERS, L.L.; ANDERSON, J.E. The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals, Drug Information Journal 32: 513-524, 1998.

MEOT-DUROS, L.; LE FLOCH, G.; MAGNÉ, C. Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities of halophytic species, J. Ethnopharmacol, 116: 258–262, 2008.

MOSCA, V.M.; LOIOLA, M.I.B. Uso popular de plantas medicinais no Rio Grande do Norte, nordeste do Brasil. Revista Caatinga, 22: 225-234, 2009.

MOSHI, M. J.; VAN DEN BEUKELB, C. J. P.; HAMZAC, O. J. M.; MBWAMBOA, Z. H.; NONDOA, R. O. S.; MASIMBAA, P. J.; MATEED, M. I. N.; KAPINGUA, M. C.; MIKXF, F.; VERWEIJE, P. E.; VAN DER VEM, A. J. A. M. Brine shrimp toxicity evaluation of some tanzanian plants used traditionally for the treatment of fungal infections. African Journal of Traditional. CAM, 4: 219 - 225, 2007.

PARRA, A. L.; SILVA, Y. R. AND IGLESIA, B. L. Acute and subacute toxicity (28 days) of a mixture of ursolic acid and oleanolic acid obtained from *Bouvardia ternifolia* in mice. Phytomedicine 8: 395, 2001.

RAMOS, S. C. S.; OLIVEIRA, J. C. S.; CÂMARA, C. A. G.; CASTELAR, I.; CARVALHO, A. F. F. U.; LIMA-FILHO, J. V. Antibacterial and cytotoxic properties of some plant crude extracts used in Northeastern folk medicine. Rev. bras. farmacogn. [online], 19: 376-381, 2009.

SANTOS, G. K. N.; DUTRA, K. A.; LIRA, C. S.; LIMA, B. N.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; MARANHÃO, C. A.; BRANDÃO, S. S. F.; NAVARRO, D. M. A. F. Effects of *Croton rhamnifolioides* Essential Oil on *Aedes aegypti* Oviposition, Larval Toxicity and Trypsin Activity. *Molecules*, 19: 16573-16587. DOI: 10.3390/molecules191016573, 2014.

SILVA, M., SCHLINDWEIN, C.; RAMALHO, M. Padrão De Forrageio de *Xylocopa* (*Neoxylocopa*) *Ordinaria* (Hymenoptera, Apidae) Em Ambiente De Caatinga, Vale Do Catimbau-Pernambuco. In: VIII Congresso de Ecologia do Brasil, Caxambu – MG. Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil. Minas Gerais, 2007.

SILVA-CARVALHO, R.; BALTAZAR, F.; ALMEIDA-AGUIAR, C. Propolis: a complex natural product with a plethora of biological activities that can Be explored for drug development, *Evid.-Based Complement. Alternat. Med.*, 1:29, 2015.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB171>. Acesso em: 03 de novembro de 2018.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.E.B. *Siphoneugena delicata* (Myrtaceae), a new species from the Montane Atlantic Forests of Southeastern Brazil. *Novon* 16: 530-532, 2006.

WALL, M. E; WANI, M. C. Camptothecin and taxol. From discovery to clinic. *Journal for Ethnopharmacology*, 51: 239-254. 1996.