

AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DAS FOLHAS DE CROTON HELIOTROPIIFOLIUS KUNTH (EUPHORBIAEAE)

Jennyfer Martins de Carvalho¹
José Anderson da Silva Gomes²
Maria Luísa Figueira de Oliveira³
Marcos Aurélio Santos da Costa⁴
Fernanda das Chagas Angelo Mendes Tenório⁵

RESUMO

Objetivo: Investigar o potencial toxicológico do extrato etanólico de folhas de *Croton heliotropiifolius* em *Artemia salina*. **Métodos:** As folhas foram obtidas a partir de árvore velame, do Município de Garanhuns, Pernambuco, Brasil. As folhas (10g) foram maceradas por 10 dias, em etanol (100ml) a temperatura ambiente e submetida a agitações esporádicas. Em seguida, a mistura foi filtrada e rotaevaporado até a evaporação total do solvente. Como parâmetro para averiguar a toxicidade foi observada a dose letal (DL50). Foram separados em 4 grupos amostrais de 10 indivíduos de *Artemia salina* e transferidos para 12 tubos de ensaio contendo concentrações 50 µg/ml, 500 µg/ml e 1000µg/ml de cada extrato, observando-se o seguinte protocolo: 1 grupo controle onde utilizamos apenas água marinha e 3 grupos testes, estes realizados em triplicata para cada concentração de cada composto. Após 24h e 48h de exposição os grupos testes foram observados a olho nu, com o intuito de avaliar quantitativamente a viabilidade dos náuplios em relação ao grau de letalidade dos extratos e comparar com o grupo controle. **Resultados:** O extrato nas concentrações de 50µg/ml (76,6%) e 500µg/ml (53,3%) demonstrou baixo nível de toxicidade, enquanto a concentração de 1000µg/ml atingiu uma taxa de 10% de sobrevivência das larvas. **Conclusões:** O extrato de etanólico de folhas de *C. heliotropiifolius* mostrou toxicidade moderada. Este estudo pode contribuir para o conhecimento da toxicidade desta espécie, e auxiliar na catalogação de informações sobre plantas utilizadas na medicina popular.

Palavras-chave: Velame, Extrato, Letalidade, Toxicidade e Fitoterápico.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa grande parte da América do Sul, com uma área de 8.514.877 km² que apresenta seis grandes Domínios Fitogeográficos: a Amazônia (ocupando 49,26% do território), o Cerrado (23,92%), a Mata Atlântica (13,04%), a Caatinga (9,92%), o Pampa (2,07%) e o Pantanal (1,76%) (IBGE, 2010). Apenas a Caatinga é exclusivamente brasileira. Em cada Domínio Fitogeográfico encontram-se diversas espécies de plantas, fungos e

¹ Graduando do Curso de Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Histologia e Embriologia, Recife- PE, jennah_martins@hotmail.com;

² Graduando do Curso de Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Histologia e Embriologia, Recife- PE, andy_silvacarte@outlook.com;

³ Graduando do Curso de Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Histologia e Embriologia, Recife- PE, malufigueira_2@outlook.com;

⁴ Mestrando em Morfotecnologia pela Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Histologia e Embriologia, Recife- PE, marcosxp17@gmail.com;

⁵ Professora orientadora: Bacharel em Ciências Biológicas, Doutora em Biociência Animal na área de reprodução humana, Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Histologia e Embriologia, Recife- PE, fcas14@hotmail.com.

animais, fazendo do Brasil um dos países mais ricos quanto a biodiversidade de espécies. Foi documentado no Brasil um total de 40.989 espécies de plantas e fungos, das quais 18.932 (46,2%) são endêmicas do país. A Caatinga, aparece em quarto lugar com 5.218 espécies de fungos e plantas (Forzza, 2010).

A nomenclatura da espécie de interesse passou de *C. Rhamnifolius* a *C. heliotropiifolius* Kunth (Govaerts, 2000). A espécie *Croton heliotropiifolius* Kunth, popularmente conhecida como “velame”, “velaminho” e “velame-de-cheiro” devido aos seus minúsculos pelos, é endêmica no Nordeste Brasileiro e pode ser encontrados com frequência na vegetação da Caatinga, brejos, restingas e cerrados. Estudos voltados para o *C. heliotropiifolius* constataram a presença predominante de alcalóides, polifenóis e compostos redutores, sendo referido como útil no alívio da dor de estômago, na disenteria e antitérmico (Randau, 2004). O bioensaio com *Artemia salina* é usado como um bom indicador de toxicidade de substâncias químicas, incluindo extratos de plantas vegetais. Possui vantagens como rapidez, praticidade, simplicidade, baixo custo e também usa uma pequena quantidade de amostra, mantendo uma boa relação com testes in vivo, sugerindo que é um método confiável. Os ensaios de letalidade são amplamente utilizados no teste de toxicológico e pode ser obtida a concentração mediana (LC50) que e a dosagem necessária para causar morte em 50% de uma amostra em estudo. Portanto, este estudo procurou investigar o potencial toxicológico do extrato etanólico de folhas de *Croton heliotropiifolius* sobre *Artemia salina*.

2. METODOLOGIA

2.1. Material vegetal

As folhas foram obtidas a partir de árvore de velame (*C. heliotropiifolius* – Euphorbiaceae), na área urbana do Município de Garanhuns, Pernambuco, Brasil. Preparou-se uma exsicata, a qual foi depositada no Herbário Dárdano de Andrade Lima, do Instituto Agrônomo de Pesquisa (IPA), sob número de tombo 90440 e identificada por um botânico da instituição.

O extrato bruto seco foi feito de acordo com o método de maceração descrito por Cechinel (1998). As folhas (10g) foram maceradas por 10 dias, em etanol (100ml) a temperatura ambiente e submetida a agitações esporádicas. Depois deste período, a mistura foi filtrada e rotaevaporada até a evaporação total do solvente.

2.2. Determinação da toxicidade frente a *A. salina* Leach

Ensaios de letalidade, empregando como bioindicador a *Artemia salina* L. permitem realizar a avaliação da toxicidade envolvendo apenas um parâmetro: vida ou morte, sendo considerado como ensaio preliminar na identificação de compostos bioativos de baixo custo e fácil manuseio (Cavalcante, 2000). Nesta perspectiva, para a obtenção de larvas de *A. salina*, cistos deste material biológico foram adquiridos pelo Laboratório Cancerologia Experimental, localizado no biotério do Departamento de Antibióticos da UFPE e induzidos à eclosão por imersão em água do mar (pH 7) e temperatura ambiente, e postos em recipiente iluminado com luz artificial (60 W), por um período correspondente a 24 horas. Decorridas 24 horas, as larvas eclodidas foram avaliadas com base na motricidade e desta forma foi possível utilizar nos ensaios de toxicidade uma população homogênea, com relação ao seu desenvolvimento, a qual foi transferida com o auxílio de uma pipeta de vidro de 5 ml para um béquer de 300 ml. Posteriormente os espécimes foram coletados com auxílio de uma Pipeta Pasteur plástica de 3 ml, transferidos para uma Placa Petri de onde foram separados em 4 grupos amostrais de 10 indivíduos e transferidos respectivamente para 12 tubos de ensaio contendo concentrações 50 µg/ml, 500 µg/ml e 1000µg/ml de cada extrato, observando-se o seguinte protocolo: 1 grupo controle onde utilizamos apenas água marinha, o qual foi usado não apenas para comparação com os grupos testes, mas também para se ter certeza de que ocorrendo mortalidade de náuplios de *A. salina*, a mesma seria resultante da toxicidade aos compostos e não devido à falta de alimentação (Carballo, 2002) e 2 grupos testes, estes realizados em triplicata para cada concentração de cada composto. Além disso, cada extrato foi testado três vezes por concentração do composto (Vanhaecke, 1981). Após 24h e 48h de exposição os grupos testes foram observados a olho nu, com o intuito de avaliar quantitativamente a viabilidade dos náuplios em relação ao grau de letalidade dos extratos e comparar com o grupo controle.

3. DESENVOLVIMENTO

O uso de plantas como estratégia medicinal está presente na humanidade desde os tempos mais remotos (Veiga Junior, Pinto, Maciel, 2005). Em 1990, 65-80% dos países em desenvolvimento se utilizavam principalmente de fitoterápicos para o tratamento de doenças (Maciel, 2002; Veiga Junior, Pinto, Maciel, 2005). Os grandes pontos comerciais são farmácias e lojas de produtos naturais. Grande parte destas plantas é utilizada de acordo com o conhecimento popular, sem nenhuma comprovação científica a cerca de sua eficácia ou

riscos que pode oferecer à saúde do indivíduo que faz seu uso de maneira indiscriminada (Veiga Junior, Pinto, Maciel, 2005).

No Brasil, a utilização de plantas nativas das regiões para o tratamento de enfermidades. A grande questão em se tratando de plantas que não são estudadas cientificamente é quanto a seguridade do seu uso para o consumidor, a maior parte dos usos de ervas medicinais tem risco baixo, mas se não se conhecem os compostos presentes em determinado extrato ou óleo essencial, este pode ser um risco a quem o consome.

O gênero *Croton* é o segundo maior da família Euphorbiaceae s.s e pertence à subfamília Crotonoideae (Lima, Pirani, 2008). Abrangendo um grupo de aproximadamente 1200 espécies distribuídas de forma pantropical, estando mais presente no continente americano (Berry, 2005). No Brasil, há cerca de 350 espécies deste gênero (Berry, 2005).

Espécies do gênero *Croton* tem sido avaliadas como potenciais estratégias terapêuticas para tratamento de doenças. A exemplo a espécie *Croton cajucara* da qual são utilizadas as folhas e as cascas do caule para o tratamento de diarreia, problemas estomacais, hepatites; no estado do Pará é comercializado o pó das folhas, o óleo essencial dos quais foram realizados e estudos e comprovados os efeitos hipoglicemiantes e hipolipêmicos (Maciel, 2001).

Croton heliotropiifolius kunth é uma planta da família Euphorbiaceae, que está presente desde o Panamá até o Brasil (Silva, 2010). Neste último estando localizado em grande parte da região Nordeste e chegando até o estado de Minas Gerais no Sudeste (Silva, 2010). Seu predomínio é na vegetação da Caatinga, em florestas serranas, restingas e no cerrado.

O velame é utilizado pela sabedoria popular em infusões no tratamento para dores de estômago e perda de peso. Seu óleo essencial e seus compostos metanólicos possuem atividades antioxidantes e antimicrobianas (Alencar, 2017; Brito, 2018). Estudos anteriores demonstram que esta planta possui atividade bactericida em algumas cepas de *Escherichia coli* e *Shiguella flexneri*, bactérias comumente associadas a distúrbios gastrointestinais (Alencar, 2017).

O óleo essencial da *C. heliotropiifolius* possui como agentes antibacterianos e larvicidas de acordo com estudos recentes (Angelico, 2014; Dória, 2010). A composição química desse óleo pode variar de acordo com as condições do solo e do clima do ambiente onde foi coletada. Na região de Ambroso na Bahia a sua composição foi de E-caricofileno, γ -uruoleno e viridifloreno (Araújo, 2017), enquanto em Pernambuco, a espécie possuía β -cariofileno, espatulenol e germacreno B (Neves e Camara, 2012) como principais compostos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora se tenha observado 62,3% da sobrevivência das amostras, conforme dados apresentados nas tabelas 1, não significa dizer que os testes foram totalmente conclusivos quanto à toxicidade, visto que não foram realizados testes prolongados ou crônicos os quais pudessem avaliar efeitos fisiológicos com comprometimento maior de órgãos ou do sistema reprodutor. Os parâmetros analisados nos ensaios apenas contemplam o estudo da toxicidade aguda.

Tabela 1 – Potencial toxicológico do extrato etanólico de folhas de *C. Heliotropiifolius* em *A. salina*.

Extratos	Concentração ($\mu\text{g/ml}$)			Viabilidade (%)
	50	500	1000	
Controle	27	27	27	90
Extrato	23/76,6%	16,63%	3,10%	62,3

Fonte: Dados da pesquisa (2017)

O resultado a atividade toxicológica de extrato etanólico de folhas de *C. heliotropiifolius* nas concentrações de 50 $\mu\text{g/ml}$ (76,6%) e 500 $\mu\text{g/ml}$ (53,3%) demonstrou baixo nível de toxicidade, enquanto a concentração de 1000 $\mu\text{g/ml}$ atingiu uma taxa de 90% de letalidade das larvas, quando comparada com o controle apresentou sobrevivência 100% A salina. Corroborando com nossos dados, Silva (2016) demonstrou que o extrato metanólico de folhas de *C. heliotropiifolius*, frente *A. salina* mostrou moderada toxicidade, revelando a necessidade de aprofundar o estudo desta espécie.

O bioensaio de letalidade sobre a *Artemia salina* é considerado um ensaio biológico utilizado abrangentemente por ser rápido, confiável, de baixo custo sendo relacionado com várias atividades biológicas (Vanhaecke, 1981).

Nossos resultados demonstraram que a mortalidade das larvas no bioensaio de toxicidade com extrato de *C. heliotropiifolius* sobre *A. salina* apresentou variação entre as diferentes concentrações (50 a 1000 $\mu\text{g/mL}$). Sendo considerada de baixa toxicidade, por ter sua CL50 a partir da concentração de 500 mg/mL , de acordo com o protocolo de Meyer (1982). Para Amarante (2011), a DL50 é considerada de baixa toxicidade quando superior a

500 µg mL, sendo moderada para DL50 entre 100 a 500 µg mL e muito tóxico quando a DL50 foi inferior 100 µg mL.

Em Costa et al., 2008, foi realizado teste de toxicidade com *Croton zehntneri*, espécie do mesmo gênero da utilizada neste trabalho, no bioensaio do extrato de *C. zehntneri* sobre *A. salina* foi obtido CL50 menor que 1000 µg/mL. O resultado obtido de *C. heliotropiifolius* colabora com estudos relacionados com toxicidade de Croton (Costa, 2008).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato de etanólico de folhas de *C. heliotropiifolius* mostrou toxicidade moderada, revelando a necessidade de novos estudos para que o conhecimento sobre esta planta, amplamente utilizado pela população, possa ser expandido.

6. REFERÊNCIAS

1. AMARANTE, C. B., MÜLLER, A.H., PÓVOA, M. M., DOLABELA, M. F. **Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*).** Acta Amazonica. V 41 n 3, p 431 – 434, 2011.
2. ANGÉLICO, E. C. et al. **Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils and Crotons varieties modulator in the Brazilians Northeast semiarid.** African Journal of Plant Science, v. 8, n. 7, p. 392-397, 2014.
3. ARAÚJO, F. M. et al. **Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Croton heliotropiifolius* Kunth from Amargosa, Bahia, Brazil.** Industrial Crops And Products, [s.l.], v. 105, p.203-206, out. 2017
4. BERRY, P. E. et al. **Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonaeae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and trnL-trnF DNA sequence data.** American Journal of Botany, v. 92, n. 9, p. 1520-1534, 2005.
5. BRITO, S. S. da S. et al. ***Croton argyrophyllus* Kunth and *Croton heliotropiifolius* Kunth: Phytochemical characterization and bioactive properties.** Industrial Crops And Products, [s.l.], v. 113, p.308-315, mar. 2018.
6. COSTA, J. G. M., RODRIGUES, F. F. G., ANGÉLICO, E. C. **Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol).** Revista Brasileira de Farmacognósia. V 18, n 4, Out/Dez, 2008.

7. CECHINEL, F. V., YUNES, R. A. **Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade.** Quím. Nova, V 21, n 1, p 99-105, Feb, 1998.
8. DE ALENCAR FILHO, J. M. T. et al. **Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from leaves of *Croton heliotropiifolius* in different seasons of the year.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 27, n. 4, p. 440-444, 2017.
9. DÓRIA, G. A. A. et al. **A study of the larvicidal activity of two *Croton* species from northeastern Brazil against *Aedes aegypti*.** Pharmaceutical biology, v. 48, n. 6, p. 615-620, 2010.
10. FORZZA, R. C., et al. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro, V 1, 2010.
11. GOVAERTS, R., FRODIN, D. G., RADCLIFFE-SMITH, A. **World Checklist and Bibliography of *Euphorbiaceae* (and *Pandaceae*).** The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens Kew. V 1-4, p 1-1622, 2000.
12. LIMA, L. R. de; PIRANI, J. R.. **Taxonomic revision of *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll. Arg.) Pax (*Euphorbiaceae* ss).** Biota Neotropica, v. 8, n. 2, p. 0-0, 2008.
13. LHULLIER, C., HORTA, P. A., FALKENBERG, M. **Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*.** Revista Brasileira de Farmacognósia. V 16, n 2, Abr/Jun, 2006.
14. LOPES, W. B., MORONI, F. T., BRANDEBURGO, M. I. H., HAMAGUCHI, A. **Developing an alternative method to the use of laboratory animals for toxicity evaluation of plant extracts.** Revista Eletrônica Hor Científico. V 1, p 1-11, 2002.
15. MACIEL, M. A. M. et al. **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares.** Química nova, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
16. MEYER, B. N., FERRIGNI, N. R., PUTNAM, J. E., JACOBSEN, L. B., NICHOLS, D. E., MCLAUGHLIN, J. L. **Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents.** Planta Med. V 45, p 31-34, 1982.
17. RANDAU, K. P., FLORÊNCIO, D. C., FERREIRA, C. P., XAVIER, H. S. **Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (*Euphorbiaceae*).** Revista Brasileira de Farmacognósia, V. 14, n. 2, p 89-96, 2004.

18. RUIZ, A. L. T. G., et al. **Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (*Cyperaceae*).** Revista Brasileira de Farmacognósia. V 15, n 2, abr/jun, 2005.
19. SÁTIRO, L. N., ROQUE, N. **A família *Euphorbiaceae* nas caatingas arenosas do médio Rio São Francisco, BA, Brasil.** Acta Botânica Brasilica, V 22, p 99-118, 2008.
20. SILVA, J. S., SALES, F., CARNEIRO-TORRES, D. S. **O gênero *Croton* (*euphorbiaceae*) na Microrregião do Vale do Ipanema, Pernambuco, Brasil.** Rodriguésia, V 4, p 879-901, 2009.
21. SILVA, J. A. G. et al. **Atividade tóxica in vitro de *Croton heliotropiifolius* Kunth (*Euphorbiaceae*).** Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável, [s.l.], v. 13, n. 1, p.112-115, 1 jan. 2018. Grupo Verde de Agroecologia e Abelhas.
22. SILVA, J. S. et al. **Sinopse das espécies de *Croton* L.(*Euphorbiaceae*) no estado de Pernambuco, Brasil.** Acta Botanica Brasilica, v. 24, n. 2, p. 441-453, 2010
23. VANHAECKE, P., PERSOONE, G., CLAUS C., SORGELOOS, P. **Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*.** Ecotoxicology and Environmental Safety, V 5, p 382-387, 1981.
24. VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A M.. **Plantas medicinais: cura segura?.** Química Nova, [s.l.], v. 28, n. 3, p.519-528, jun. 2005.