

Estudo da toxicidade das folhas de *Cayaponia citrullifolia* (Griseb.) Cogn. (Cucurbitaceae).

Yara Cecília Monteiro Oliveira* (IC). Kaysson Rodrigues de Oliveira (IC). Plínio Lázaro Faleiro Naves (PQ). Geralda de Fátima Lemes (PQ); yaracmoqi@gmail.com.

Universidade Estadual de Goiás - Campus de Ciências Exatas e Tecnológicas. BR 153, Nº3105
Fazenda Barreiro do Meio- Campus Henrique Santillo- Anápolis. Caixa Postal 459, CEP 75132400.

As plantas medicinais se fazem desde a antiguidade um dos principais e mais eficientes recursos terapêuticos utilizados na medicina popular. Hoje, são uma das principais fontes fornecedoras dos mais importante compostos bioativos, utilizados como fitoterápicos na medicina moderna. As toxinas produzidas como forma de defesa pelas plantas elevam o interesse ao estudo de suas toxinas, sendo assim, estudos utilizando meios mais simples, rápidos e baratos, são muito importantes na rotina laboratorial. O bioensaio com os náuplios de *Artemia salina* se faz um dos ensaios mais importantes na determinação da toxicidade de extrato e fração obtidos de plantas medicinais. Pertencente a família Cucurbitaceae. O gênero *Cayaponia* se encontra amplamente distribuído no território brasileiro. Tal gênero é constituído por metabolitos secundários como flavonoides e cucurbitacinas, sendo as cucurbitacinas os compostos de maior interesse na maioria de suas espécies, devido a sua toxicidade e ao seu amplo espectro de atividades biológicas. A espécie *Cayaponia citrullifolia* faz parte deste gênero e é uma espécie ainda pouco estudada. A partir do estudo da toxicidade de suas folhas, se evidencia que nenhuma das amostras estudadas possui potencial tóxico contra os náuplios de *Artemia salina*, com valores de $CL_{50} > 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Palavras-chave: *Cayaponia citrullifolia*, Cucurbitaceae, *Cayaponia*, toxicidade, *Artemia salina*.

Introdução

É a natureza a principal fornecedora da maioria das substâncias orgânicas naturais conhecidas nos dias de hoje. Substâncias estas, com importante potencial farmacológico, que fazem com que diariamente pesquisadores de produtos naturais executem estudos químicos e biológicos do material em estudo, em busca de novas substâncias que possam ser utilizadas como protótipo para o desenvolvimento de novas drogas (CRAGG et al., 2005; PERVIN et al., 2016; SILVA; BOLZANI et al., 2002).

Pelo contexto histórico, as plantas são eficientes recursos terapêuticos. O fácil acesso resulta no uso indiscriminado de sua forma *in natura* pela população,

especial nos países em desenvolvimento. Porém, apesar de apresentarem efeitos benéficos, a grande variedade de constituintes químicos presentes nas plantas, podem agir de forma diferenciada no organismo humano, sendo muitas vezes tóxicos o suficiente para prejudicar ainda mais a saúde do indivíduo que as consomem. Para que isto seja evitado e as plantas medicinais possam ser utilizadas de forma mais eficaz e benéfica, estudos da eficácia terapêutica das mesmas devem ser realizados (BARRACA, 1999; JUNIOR, 2005; ZAGO et al, 2009).

Considerando que as plantas desenvolvem mecanismos de defesa contra patógenos (vírus, bactérias, fungos, insetos, etc) produzindo toxinas e adquirindo resistência a infecções, os ensaios de letalidade com micro-organismos permitem à avaliação da toxicidade geral da amostra. Por esta razão, testes de toxicidade *in vitro* são considerados bioensaios preliminares no estudo de extratos, frações e metabólitos secundários com potencial atividade biológica (MACIEL et al., 2002; SILVA; BOLZANI et al., 2002).

Um desses testes são realizados pelo ensaio de letalidade com *Artemia salina*, um microcrustáceo de vida aquática marinha que determina a partir da vida ou morte de seus náuplios a presença ou não de compostos bioativos tóxicos ou com compostos com resposta biológica. Este ensaio é considerado rápido, simples, de baixo custo, fácil manipulação (ASADUZZAMAN et al., 2015; SIQUEIRA et al., 2001).

Sendo assim, o mais vasto gênero da família Cucurbitaceae, o gênero *Cayaponia*, com aproximadamente 60 espécies, é conhecido principalmente pela importância terapêutica de suas espécies (GOMES; PIRANI, 2000; NEE, 2007). Como a espécie *Cayaponia tayuya* (Vell.) Cogn, uma das primeiras plantas a serem registradas na Farmacopeia Brasileira I, como droga oficial. (ESCANDELL et al., 2006; KONOSHIMA et al., 1995).

A atividade citotóxica de tal espécie, resultou a partir de pesquisas, no isolamento dos compostos bioativos chamados de cucurbitacinas, triterpenóides tetracíclicos altamente oxigenados, encontrados na maioria das espécies da família Cucurbitaceae e de seus gêneros. O grande interesse pelas cucurbitacinas está relacionado principalmente a sua toxicidade e ao amplo espectro de atividades biológicas, tais como: citotóxica, antitumoral, anti-inflamatória, antifertilizante, antimicrobiana, e curativa (ARRUDA-GATTI et al., 2003; VALENTE, 2004).

Portanto, a espécie *C. citrullifolia* uma planta trepadeira, pertencente ao gênero *Cayaponia* foi selecionada para a realização do presente projeto, já que apesar de poucos estudos até o momento, o potencial farmacológico de seu gênero, ressalta a importância e relevância do estudo biológico de suas espécies.

Material e Métodos

Para a realização do bioensaio e solubilização das amostras de extrato bruto etanólico e frações hidrometanólica e acetato de etila, o meio de cultivo empregado foi uma solução de água marinha artificial preparada do dissolução do sal marinho em água destilada (40 g.L^{-1}), suplementado com extrato de leveduras (6 mg.L^{-1}) e esterilizado em autoclave. O pH foi ajustado a 8,5 com solução de Na_2CO_3 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$.

Em um funil de separação foram adicionados 500 mL de água marinha e 80 mg dos cistos de *A. salina*. Para o crescimento dos náuplios de *A. salina*, o sistema foi deixado em incubação por 36 horas a temperatura ambiente, com iluminação natural e oxigenação constante realizada com auxílio de uma bomba de ar de aquário.

O bioensaio foi realizado em microplaca de poliestireno estéril de 96 poços. Os náuplios foram distribuídos na placa com o auxílio de uma micropipeta, padronizando um total de 10 ± 1 de indivíduos em cada poço. Em seguida, foram adicionadas 100 μL de amostras nas concentrações de 2000, 1000, 400, 200, 80 e 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O sistema foi incubado por um período de 24 horas. Após este período, contou-se a quantidade de larvas mortas ou imobilizadas. Como controle de solvente, usou-se água salina com 5 % de DMSO e 10 náuplios de *A. salina*, no controle de viabilidade (água marinha e os náuplios de *A. salina*) e controle de técnica, foram usadas soluções de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ nas concentrações de 50,00; 25,00; 12,50 e 6,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, mais os náuplios de *A. salina*.

O ensaio foi realizado em triplicada e de maneira independente, o que permitiu determinar a toxicidade a partir do cálculo da CL_{50} , ou concentração letal de 50% da população de microcrustáceo. Tal valor foi determinado pelo método gráfico para dose-resposta, obtido no programa *Statplus 2009 professional (AnalystSoft)*, a partir da regressão linear obtida da correlação entre a porcentagem de indivíduos mortos e a concentração da amostra-teste.

A classificação do nível de toxicidade da amostra foi realizado segundo Nguta e colaboradores (2012), os quais consideram a toxicidade como alta para valores de CL_{50} até $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, como moderada para CL_{50} entre 100 e $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, baixa toxicidade para CL_{50} entre 500 e $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e não tóxico acima de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Resultados e Discussão

A avaliação do grau de toxicidade do extrato bruto e das frações hidrometanólica e acetato de etila, foi realizada utilizando-se como critério, a contagem da quantidade de larvas mortas, após 24 h, do contato das larvas com as amostras em várias concentrações.

A toxicidade foi expressa pelo valor da concentração letal media, CL_{50} , adotando-se a classificação do nível de toxicidade das amostras, frente aos náuplios de *A. salina*, proposto por Nguta e colaboradores (2011), os valores de CL_{50} obtidos neste bioensaio para o extrato bruto etanólico e frações hidrometanólica e acetato de etila, estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1- Valores de CL_{50} e grau de toxicidade obtidas no bioensaio com *A. salina*.

Amostra	$CL_{50} (\mu\text{g.mL}^{-1}) +$ Dp	Grau de toxicidade (Nguta et al., 2011)
Extrato bruto	> 2.000	Não tóxico
Fração hidrometanólica	> 2.000	Não tóxico
Fração acetato de etila	$1.511,94 \pm 118,20$	Não tóxico
$K_2Cr_2O_7$	$25,83 \pm 0,63$	Tóxico

A partir dos resultados obtidos de CL_{50} para as amostras estudadas neste bioensaio, se determina que todas as amostras apresentam $CL_{50} > 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo consideradas portanto não tóxicas. Isto demonstra que se a espécie *C. citrullifolia* apresentar algum tipo de ação tóxica, tal ação estará ligada a presença de compostos bioativos em outras de suas frações ou em outra parte da planta não estudada neste trabalho.

Considerações Finais

A partir dos estudos realizados para a determinação da toxicidade das amostras de extrato bruto etanólico e frações hidrometanólica e acetato de etila, c, ambas as amostras e todas as suas concentrações demonstraram toxicidade contra os náuplios de *A. salina*, com $CL_{50} > 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Agradecimentos

Agradecimentos a UEG-CCET por possibilitar o desenvolvimento do projeto a partir de apoio técnico, a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação.

Referências

ARRUDA-GATTI, I. C., VENTURA, M. U. Iscas contendo cucurbitacinas para o manejo de *Diabrotica* ssp. Cucurbitocin containing baits for *Diabrotica* ssp. management. **Semina**, v. 24, n. 2, p. 331-336, jul./ dez. 2003.

ASADUZZAMAN. RANA, S., HASAN, S. M. R., HOSSAIN, M., DAS, N. Cytotoxic (brine shrimp lethality bioassay) and antioxidant investigation of *Barringtonia acutangula* (L.). **International Journal of Pharma Sciences and Research**, v. 6, n. 8. Aug, 2015.

BARRACA, SÉRGIO ANTONIO. Manejo e produção de plantas medicinais aromáticas. **USP**, pp. 2-9. Julho, 1999.

CRAGG. G. M., NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, 100, 72, 2005.

ESCANDELL, J. M.; RECIO, M. C.; MÁÑEZ, S. et al. Dihydrocucurbitacin B, isolated from *Cayaponia tayuya*, reduces damage in adjuvant-induced arthritis. **European Journal of Pharmacology**, v. 532, p. 145-154, 2006.

GOMES-KLEIN, V. L.; PIRANI J. P. Estudo taxonômico de *Cayaponia* Silva Manso (Cucurbitaceae) no Brasil. São Paulo: USP, 2000, 289p. Tese (Doutorado em Botânica), Universidade Estadual de São Paulo, 2000.

JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. P. M. Plantas Medicinais: Cura Segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, 529-528, 2005.

KONOSHIMA, T.; TAKASAKI, M.; KOZUKA, M.; NAGAO, T.; OKABE, H.; IRINO, N.; NAKASUMI, T.; TOKUDA, H.; NISHINO, H. Inhibitory effects of cucurbitane triterpenoids on Epstein-Barr virus activation and two-stage carcinogenesis of skin tumor. II. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 18, n. 2, p. 284-287, 1995.

MACIEL, Maria Aparecida. Et al, Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quím. Nova [online]**. vol.25, n.3, pp. 429-438. 2002.

NEE, M. Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: *Cucurbitaceae*. **Rodriguésia**, n. 58, p. 703-707, 2007.

NGUTA, J. M.; MBARIA, J. M.; GAKUYA, D. W.; GATHUMBI, P. K.; KABASA, J. D.; KIAMA, S. G. Biological screening of Kenyan medicinal plants using *Artemia Salina* L. (Artemiidae). **Pharmacologyonline**, 14 (2): 358-361, 2012.

SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; PINTO, A. C.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, v. 24, supl. 1, 45-61, 2002.

SIQUEIRA, J. M.; ZIMINIANI, M. G. Estudo fitoquímico das cascas do caule de *Duguetia glabriuscula* - annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, vol. 24, n. 2, p. 185-187, 2001.

ZAGO, J. A. A.; USHIMARU, P. I.; BARBOSA, L. N.; JUNIOR, A. F. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.4, p. 828-833, 2009.

VALENTE, L. M. M. Cucurbitacinas e suas principais características estruturais. **Química Nova**. v. 27, n. 6, p. 944-948, 2004.