



Avaliação da atividade inibitória da formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* por metabólitos secundários de *Trichoderma* sp.

Ádrian Brito Bartolomeu^{1*} (PG); (PQ) Plínio Naves (PQ)²; Valdirene Monteiro Neves³

***adrianbbartolomeu@gmail.com**

Universidade Estadual de Goiás - Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnologias – Henrique Santillo, Endereço: Br 153 nº 3.105 – Anápolis – Goiás. Caixa Postal: 459. CEP: 75.1032-903.

Fungos são conhecidos por sua capacidade de produzir diversidades de metabólitos secundários conferindo a estes, propriedades para sua adaptação em ambientes diversificados. Espécies de *Trichoderma* compreende fungos filamentosos que produzem compostos com atividade antibiótica e, igualmente, um determinado antibiótico pode ser produzido por espécies de *Trichoderma*. E ainda, diferentes isolados da mesma espécie podem produzir compostos diferentes. Biofilmes constituem a forma mais importante de vida microbiana sendo matrizes biologicamente ativas de células e substâncias extracelulares associadas à superfícies sólidas consistido em bactérias fixadas em matriz polimérica orgânica. São de importância médica, por desencadearem mais de 80% das infecções microbianas no organismo, onde bactérias do gênero *Pseudomonas* facilmente formam biofilmes em materiais médicos como parafusos ortopédicos de aço inoxidável e titânio. Neste trabalho, foram avaliadas a toxicidade, inibição de metabólitos secundários de 11 espécies de *Trichoderma*. Assim, foram realizados ensaios de letalidade em *Artemia salina*, determinando CL₅₀ e cálculo da toxicidade dos metabólitos. Posteriormente, foram realizados os ensaios com *Pseudomonas aeruginosa* para análise da atividade inibitória da formação de biofilmes pelos metabólitos secundários. Os resultados obtidos foram úteis para a seleção de metabólitos secundários das espécies de *Trichoderma* mais eficientes ao ensaio de inibição da formação de biofilme por *p. aeruginosa*.

Palavras-chave: *Trichoderma* sp., Metabólitos secundários, Biofilme.

Introdução



Os fungos são alguns dos agentes que pertencem ao diverso grupo de micro-organismos que existem na terra, alguns destes podem ser encontrados no interior de plantas, durante toda ou parte de sua vida, e a partir disto são conhecidos como agentes endofíticos, que acabam por vivenciar um processo de simbiose com um determinado hospedeiro (SILVA, 2019). Aspectos relevantes sobre estes fungos é a sua capacidade de produzir alguns materiais como metabólitos secundários, que por vezes são visualizados como componentes com propriedades bioativas (FELBER et al., 2019; AFZAL et al., 2019).

Moreira (2013), sobre produtores de metabólitos secundários destaca os fungos *Trichoderma spp.* como agentes altamente eficientes na produção de metabólitos secundários, que em sua maioria apresentam bons resultados nas atividades antibacterianas e antifúngicas (PAPHITOU, 2013).

No que se refere aos biofilmes bacterianos, Crespo et al. (2018), relata as *P. aeruginosa* como produtoras exímias de biofilme, o que as tornam interessantes nos estudos onde há o intuito de investigar a atividade antibiofilme. Diante disto, este estudo objetiva realizar investigação sobre a atividade antibiofilme de metabólitos secundários frente a formação de biofilmes por bactérias *P. aeruginosa*.

Material e Métodos

Teste de letalidade em *Artemia salina*

Os ensaios foram confeccionados a partir da metodologia adaptada de Rahman et al. (2005) com algumas alterações. Foram utilizados 0,3 g de cistos de *Artemia salina*, eclodidos em água marinha sintética, preparada a partir da dissolução de 40g de sal marinho NaCl (sal marinho obtido comercialmente, em 1 litro de água destilada, acrescida de 6mg/L de extrato de levedura). Além disso, a solução permaneceu em aeração constante, com o uso de bomba para oxigenação de aquário. Após a incubação dos cistos em solução salina no artemilheiro, durante um período de 36 horas, em temperatura média de 25 a 30° C, e iluminação



constante, realizou-se a pesca dos náuplios, recém eclodidos.

Foram pescados 10 indivíduos em $100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de solução salina exposta ao metabólito, com auxílio de uma pipeta de $100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ e uma lupa do contador de colônias de bactérias digital estes transferidos para poços de uma microplaca poliestireno de 96 poços.

Para cada metabólito, foram confeccionadas as concentrações $1250 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, $625 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, $125 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ e $12,5 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, dissolvidos em solução salina, em triplicatas nas microplacas, diretamente nos poços que já haviam sido transferidos 10 náuplios em um volume de $100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. Os náuplios expostos aos metabólitos nas microplacas foram dispostas em bancada por 24 horas, sob iluminação e temperatura de 25° a 30°C , para posterior leitura. Como auxílio à visualização e leitura dos poços, utilizou-se o contador de colônias de bactérias digital, contabilizando nos poços indivíduos mortos e vivos

Foram incluídos no ensaio com a *Artemia* alguns poços somente com os indivíduos e a adição de concentrações de 100, 50, 25, 12,5 6,25 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de Dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_2$) e um controle com acetonitrila 50%. A partir dos dados, análises estatísticas, através do software *Rstudio* e ferramenta *Probit* foram determinadas as (CL50) dos metabólitos. O teste foi realizado em 3 réplicas para cada concentração, onde para cada uma foram testadas em 90 indivíduos. A realização do ensaio de letalidade com *Artemia salina*, realizada com 11 extratos de metabólitos secundários: 18, T00, 57, 46, B102, AB302, AM201, 27, AB107, S404 e ALL42.

Ensaio de inibição de biofilme com *Pseudomonas aeruginosa*

Após a seleção da toxicidade em *Artemia salina*, foram utilizados os metabólitos secundários *Trichoderma* denominados 18, T00 e 46 em concentrações de 1,5 a $3,5 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, baseado em um estudo de (ANWAR e IQBAL, 2017). Portanto, foram diluídos em caldo TSB – (Caldo de enriquecimento para qualquer microrganismo *Trypticase Soy Broth*) obtendo as concentrações finais, T00 = $1,5 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, do 18 = $1,85 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ e do 46 = $3,5 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$.

Para a realização dos ensaios de formação de biofilme as quantificações da



biomassa total dos biofilmes foram realizadas pelo método do cristal violeta conforme descrito por Stepanović et al. (2000) com algumas modificações.

Um total de 13 *Pseudomonas aeruginosa* foi avaliado, sendo 11 isolados clínicos gentilmente cedidos pela profa. Lilian Carneiro do Laboratório de Biotecnologia de Micro-organismos do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás e 2 cepas padrão do tipo *American Type Culture Collection* - *P. aeruginosa* ATCC 27853 e ATCC 9027 da coleção do Laboratório de Bioensaios da Universidade Estadual de Goiás - UEG.

As alíquotas dos micro-organismos foram reativadas em ágar cetrimide (Kasvi, Espanha) suplementado com 10% de glicerina PA (Synth, São Paulo, Brasil) a 35,5° C por 24 horas e o aspecto macroscópico das colônias e pureza das amostras foram checados antes do início dos testes. Após a incubação, três a cinco colônias típicas foram dissolvidas em solução fisiológica estéril (SFE 0,9%) e a turbidez da suspensão foi ajustada com a escala 0,5 de McFarland. Em seguida, 0,1 mL da suspensão foram transferidos para tubos com 9,9 mL de caldo triptona soja (TSB). A partir desta solução microbiana, 50 µL foram colocados em poços de uma microplaca de poliestireno de 96 poços com fundo plano contendo 50 µL dos compostos descritos como metabólitos secundários por poço, perfazendo um inóculo bacteriano inicial de $1,5 \times 10^5$ ufc por poço e a concentração de 0,5 mg.mL⁻¹, e a microplaca foi incubada a 35,5 °C por 24 horas.

Em seguida, foram realizadas leituras visuais das microplacas segundo Naves et al. (2008) com modificações. O caldo TSB foi retirado e os poços foram lavados duas vezes com 150 µL com SFE em lavadora automática de microplacas Aquari® (MA 615, Brasil) para a remoção das células não aderidas. Após isto, foram adicionados 150 µL do corante cristal violeta 1% nas placas por 10 minutos. Posteriormente, o corante foi desprezado e os poços lavados três vezes com 200 µL de água destilada, com o descarte do volume total e secagem das placas a 35,5 °C por 20 minutos em estufa. Em seguida foram adicionados 150 µL de etanol absoluto (Neon) em cada poço para a coloração das bactérias aderidas, a microplaca foi incubada durante 10 minutos a temperatura ambiente e foram realizadas as leituras



das densidades ópticas (DO) dos poços a 492 nm no espectrofotômetro de microplacas *BioTech Epoch™*. Foram realizadas triplicatas independentes com um total de 9 microplacas.

Para a análise de inibição de biofilme por metabólitos, realizou-se a comparação dos grupos tratados e não tratados e através da verificação das significâncias de diferenças, estabeleceu-se os valores determinavam a inibição ou não inibição da formação do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*. A significância das diferenças foi avaliada com o teste t de Student ($p \leq 0,05$). Todos os testes foram realizados em triplicatas independentes. Foram incluídos controles de viabilidade e de esterilidade para cada condição testada.

Resultados e Discussão

Em seguida abaixo na tabela 1, é possível verificar as análises estatísticas obtidas através do software *R studio* por meio da ferramenta *PROBIT*, que demonstrou as (CL_{50}) e o intervalo de confiança de cada um dos metabólitos secundários testados

Tabela 1. Avaliação de toxicidade em *Artemia Salina* de metabólitos secundários de fungos de espécies de *Trichoderma spp.*

Metabólitos secundário	CL_{50} $\mu\text{g.ml}^{-1}$	Intervalo de confiança 95%		Classificação de toxicidade (MEYER, 1982)
		Limite inferior $\mu\text{g.ml}^{-1}$	Limite superior $\mu\text{g.ml}^{-1}$	
18	67,53	35,46	114	Apresentou toxicidade
T00	12,12	3,32	22,26	Apresentou toxicidade
57	50,42	23,34	91,16	Apresentou toxicidade
46	NULO	NULO	NULO	NULO
B102	4,78	0,00391	1987	Apresentou toxicidade
AB302	NULO	NULO	NULO	NULO
AM201	626	220	6218	Apresentou toxicidade
27	83,14	43,31	141,12	Apresentou toxicidade
AB107	3692	1485	30063	Não apresentou toxicidade
S404	NULO	NULO	NULO	NULO
ALL42	NULO	NULO	NULO	NULO



Dicromato	24,28	19,60	30,02	-----
-----------	-------	-------	-------	-------

Fonte: Autoria própria.

Sobre os controles utilizados para a viabilidade do ensaio, a acetonitrila 50% e os poços que continham apenas solução salina, demonstraram total ausência de mortes, ou seja, nenhum padrão contaminação ou toxicidade, o controle de técnica com dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) obteve (CL50) de 24,28 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$.

Portanto, observou-se que os metabólitos secundários *Trichoderma sp.*18, T00, 57, B102, AM201 e 27, apresentaram toxicidade relevante, com a demonstraram CL50 inferiores a 1000 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Já no que se refere a não presença de toxicidade o composto AB107 com a (CL50) igual a 3692 ultrapassa o limite de acordo com Meyer et al.(1982) Nos metabólitos 46, AB302, S404 e ALL42, não foi possível estabelecer a CL50, devido aos valores de mortes não apresentaram variações estatísticas, o que impossibilitou a elucidação de um resultado por meio do *R studio*.

Resultados semelhantes ao deste estudo, foram elucidadas em atividade toxicologia de extratos de *Trichoderma asperellum* dl34, *T. citrinoviride* cf27 e *T. harzianum* R5 em *Artemia Salina*, onde foram isolados 18 compostos de *T. asperellum* os diterpenóide (TA1) e (TA2) que apresentaram CL50 = 12,0 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ e 38,2 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, a partir do fungo *T. citrinoviride* cf27 cerca de 23 composto também foram destacados, destes um norditerpenóide (TC2) demonstrou CL50 = 65,5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, por fim dos 14 compostos investigados de *T. harzianum* R5, o terpenóide (TH1) resultou em uma CL50= 68,6 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (LIANG, 2016).

Avaliação da atividade antibacteriana por inibição de biofilme de metabólitos secundários frente a *pseudomonas aeruginosa*

Para a verificação de atividade antibacteriana de metabólitos secundários por meio do ensaio de formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosas*, os isolados 18, TOO e 46 foram empregados em teste. E como padrão comparativo a tabela a seguir apresentam o índice e a categoria de formação de biofilme das *P. aeruginosas*, sem a exposição a nenhum composto.



Tabela 2- Índice e categoria de formação de biofilme de *P. aeruginosa*.

Cepas	DO492nm		Categoria de Formação Biofilme
	MED	DP	
Pa3	0,142	0,069	Moderada
Pa 5	0,356	0,109	Forte
Pa 6	0,394	0,082	Forte
Pa 10	0,256	0,067	Forte
Pa 11	0,142	0,018	Moderada
Pa 13	0,192	0,063	Moderada
Pa 20	1,077	0,442	Forte
Pa 22	0,166	0,068	Moderada
Pa 23	0,265	0,072	Forte
Pa 28	1,676	1,153	Forte
Pa 29	0,983	0,731	Forte
Pa 27853	0,246	0,103	Forte
Pa 9027	0,170	0,051	Forte
CNI	0,061	0,011	-

Legenda: **Pa** = *Pseudomonas aeruginosa*; **ATCC** = American type culture collection; **DO_{492nm}** = Densidade óptica a 492 nanômetros; **MED** = Média **DP** = desvio padrão; **CNI** = Controle não inoculado.

Das 13 cepas bacterianas, nove foram classificadas como formadoras fortes de biofilme (69,2%), quatro foram classificadas como moderadas (30,7%) e nenhuma foi classificada como fraca. Em seguida a tabela 3 abaixo, representa os resultados referentes a produção de biofilme sob o efeito dos extratos metabólitos secundários 18, T00 e 46, estes resultados foram organizados (tabulados) e calculados o seus DP (Desvio Padrão) e suas MED (Médias).

Tabela 3 – Resultados da formação de biofilme na presença de metabólitos secundários

Cepas	18		T00		46		CV		p		
	MED	DP	MED	DP	MED	DP	MED	DP	18 vs CV	T00 vs CV	46vs CV
Pa 3	0,137	0,020	0,099	0,013	0,136	0,067	0,142	0,069	0,467	0,107	0,296
Pa 5	0,255	0,071	0,250	0,061	0,166	0,055	0,356	0,109	0,759	0,695	0,274
Pa 6	0,186	0,047	0,279	0,094	0,268	0,055	0,394	0,082	0,002	0,181	0,082
Pa 10	0,179	0,043	0,168	0,064	0,181	0,044	0,256	0,067	0,257	0,001	0,021
Pa 11	0,386	0,061	1,152	0,200	0,358	0,079	0,142	0,018	0,015	0,002	0,011
Pa 13	0,514	0,052	0,760	0,237	0,922	0,159	0,192	0,063	0,076	0,077	0,022



Pa 20	0,345	0,032	0,249	0,081	1,641	0,512	1,077	0,442	0,095	0,017	0,016
Pa 22	0,170	0,041	0,131	0,034	0,100	0,023	0,166	0,068	0,335	0,806	0,083
Pa 23	0,191	0,061	0,148	0,075	0,133	0,043	0,265	0,072	0,283	0,111	0,028
Pa 28	1,897	0,453	2,968	0,181	2,627	0,331	1,676	1,153	0,018	0,002	0,008
Pa 29	0,585	0,162	0,946	0,296	1,166	0,466	0,983	0,731	0,034	0,021	0,030
Pa 85	0,233	0,054	0,232	0,071	0,199	0,088	0,246	0,103	0,521	0,222	0,678
Pa 90	0,119	0,023	0,090	0,013	0,141	0,065	0,170	0,051	0,852	0,003	0,027
CNI	0,140	0,026	0,137	0,038	0,142	0,056	0,061	0,011	-	-	-

Legenda: Pa (*Pseudomonas Aeruginosas*); 18/T00/46 = Metabólitos secundários; CV = Controle de Viabilidade (Bactéria sem composto); CNI = Controle Não Inoculado (Apenas TSB); p = significância da diferença.

Fonte: Autoria Própria.

Para a análise dos resultados da formação do biofilme na presença dos metabólitos secundários, foram comparados as média (MD) do grupo não tratado (CV) com os resultados médios do 18, T00 e 46. A significância das diferenças (p) foram avaliadas com o teste t de Student ($p \leq 0,05$).

De acordo com os resultados obtidos dos tratamentos das cepas de *P. aeruginosas*, com extratos de metabólitos secundários, o composto 18 na concentração de ($1,85 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) inibiu a de formação de biofilme perante as cepas Pa6, Pa20 e Pa29, já o T00 na concentração de ($1,50 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) demonstrou inibição da formação de biofilme as cepas Pa10, Pa29 e Pa90, e por fim o 46 na concentração ($3,5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) inibiu a formação de biofilme das cepas Pa10 e Pa90, ambas as cepas consideradas fortes produtoras de biofilme.

Dawande et al. (2019), também se propuseram a investigar fungos endofíticos em prol de verificar as possibilidades da existência de atividade antibiofilme destes agentes contra *P. aeruginosas*, como resultado observou-se que em uma concentração máxima de $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ de extrato de *Trichoderma sp.* houve uma inibição de 33,06% da formação de biofilme das bactérias.



Considerações Finais

Dos 11 metabólitos que participaram da triagem em *Artemia salina*, apenas o AB107 não apresentou nenhuma toxicidade, sobre os metabólitos 46, AB302, S404 e ALL42 não foi possível estabelecer uma CL50 através do software *Rstudio*. Além disso, de todos os compostos o B102 foi o que apresentou maior toxicidade com CL50 de 4,7 µg.ml⁻¹.

O ensaio de letalidade em *Artemia*, foi interessante para a seleção de quais os metabólitos seriam mais apropriados para a efetivação do ensaio de inibição de biofilme. Onde os metabólitos 18, T00 e 46 apresentaram significativa inibição à biofilmes formados por *p. aeruginosa*, ambas cepas com classificação de fortes formadoras de biofilme.

Agradecimentos

Agradeço a Universidade Estadual de Goiás e aos colegas de laboratório, Amanda Côrrea, Aline Fernandes, Milena Agra e Julliane Chaves e Tayná Ribeiro.

Referências

AFZAL, M.; KHAN, Q. M.; SESSITSCH, A. Endophytic bacteria: Prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants. **Chemosphere**, v. 17, p. 232-242, 2014. Citado em 2019.

ANWAR, Jawad; IQBAL, Zafar. Effect of Growth Conditions on Antibacterial Activity of *Trichoderma harzianum* against Selected Pathogenic Bacteria. **Sarhad Journal of Agriculture**, v. 33, n. 4, 2017.



DAWANDE, A. Y; GAJBHIYE, N. D; CHARDE, V. N; BANGINWAR, Y. S; Avaliação de isolados fúngicos endofíticos quanto à sua atividade antibiofilme em *Pseudomonas Aeruginosa*. **Rev. Internacional de Pesquisa Científica em Ciências Biológicas**. Vol. 6. Pp. 81-89. 2019.

FELBER, AC et al. Produção de endoglucanase por fungos endofíticos isolados de *Vitis labrusca* L. com casca de amendoim e serragem como substratos. **Bioscience Journal**, v.35, n.3, p.933-940, 2019.

LIANG, X. **Estudo sobre metabólitos secundários e atividades biológicas de três cepas marinhas de Trichoderma**. Pequim. Universidade da Academia Chinesa de Ciências, 2016.

NAVES, P.; PRADO, G.; HUELVES, L.; GRACIA, M; RUIZ, V.; BLANCO, J; DAHBI, G.; BLANCO, M.; PONTE, M.C.; SORIANO, F. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia Coli* strains. **Microbial. Pathog.**, v.45, p. 86-91, 2008.

RAHMAN, A.-; CHOUDHARY, M. I.; THOMSON, W. J. **Bioassay Techniques for Drug Development**. Singapore: Taylor & Francis e-Library, p. 240. 2005.

SILVA, I. P. da. Fungos endofíticos: fonte alternativa a metabólitos secundários de plantas. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.18; p. 2014-2019.

Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., & Svabic-Vlahovic, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of microbiological methods**, 40(2), 175–179. 2000.

REALIZAÇÃO

PRG
Pró-Reitoria de
Graduação

PRP
Pró-Reitoria de
Pesquisa e
Pós-Graduação

PRE
Pró-Reitoria de
Extensão e
Assuntos Estudantis



Universidade
Estadual de Goiás



Avaliação da toxicidade de nanopartículas pelo ensaio de letalidade com *Artemia salina*

Aline Fernandes Barcelos (Pesquisadora)*¹, Tayná Ribeiro Jacinto (Iniciação Científica)¹, João Salviano Simões Chagas da Silva (Iniciação Científica)¹, Charles Lima Ribeiro (Pesquisador)², Plínio Lázaro Faleiro Naves (Pesquisador)¹, Luciana Rebelo Guilherme (Pesquisadora)¹

E-mail: fernandesbaline@gmail.com

¹ Universidade Estadual de Goiás – UEG. ² Universidade Evangélica de Goiás – UniEvangélica.

Resumo: A resistência bacteriana aos antibióticos é um problema de saúde pública preocupante e a procura por materiais que contenham propriedades antimicrobianas e que não apresentem toxicidade ao ser humano é um desafio. O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade de nanopartículas Fe₃O₄, Ag e Fe₃O₄/Ag pelo ensaio de letalidade com *Artemia salina*. Neste estudo foram avaliadas as atividades biológicas das três nanopartículas quanto a sua toxicidade (CL₅₀) em *Artemia salina*. Os resultados sugeriram que as nanopartículas não apresentaram toxicidade com CL₅₀ na concentração máxima testada de 20,5 µg mL⁻¹ em testes utilizando microplacas de 96 poços. Assim, o nanocompósito sintetizado demonstrou baixa toxicidade na triagem com *A. Salina*.

Palavras-chave: Bioensaios. Nanocompósito. Triagem.

Introdução

O teste de letalidade com *Artemia salina* foi proposto em 1956, por Michael, Thompson e Abramovitz e aprimorado em 1981 por Vanhaeche e colaboradores. No entanto, seu reconhecimento como teste preliminar para validação toxicológica veio com Meyer em 1982, quando avaliou a toxicidade de extratos brutos de plantas da família *Euphorbiaceae* (LHULLIER; ANTUNES HORTA; FALKENBERG, 2006; PISUTTHANAN et al., 2004).

Artemia salina é um pequeno invertebrado halofílico pertencente à classe Crustáceo e subclasse Braquiopoda, que vive em água salgada e desempenha papel



importante nos ecossistemas aquáticos e marinhos. Seu ciclo de vida compreende os estágios de cisto, náuplios, metanáuplios, pré-adultos e adultos. A *Artemia salina* é muito valorizada por sua aplicação na detecção de toxicidade usando náuplios eclodidos (ensaio de letalidade). O ensaio de letalidade com *Artemia salina* é rápido, conveniente e de baixo custo, por isso é amplamente empregado em pesquisa e toxicologia aplicada (NTUNGWE N. et al., 2020).

O teste de letalidade com *Artemia salina* tem um bom relacionamento com outros ensaios laboratoriais. A fim de ampliar os estudos, este trabalho buscou avaliar a toxicidade das nanopartículas Fe_3O_4 , Ag e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ag}$ através do ensaio de letalidade com *Artemia salina*.

Material e Métodos

Foi utilizado o método descrito por Molina-Salinas e Said-Fernández (2006) com pequenas modificações para determinar a toxicidade dos compostos pelo ensaio de letalidade de *Artemia salina*. A água marinha artificial (AMA) foi preparada com a dissolução de sal marinho (36 g L^{-1}) e extrato de levedura (6 g L^{-1}) em água destilada. A solução foi autoclavada e o pH medido foi 8,5, como esperado, de acordo com a metodologia, se o pH estiver abaixo do ideal, deve ser ajustado utilizando solução de 1M de Na_2CO_3 .

Posteriormente, 0,3 g de cistos de *Artemia salina* foram incubados em 500 mL de AMA por um período de 36 h, aproximadamente 25°C , ao abrigo da luz e com oxigenação constante. As larvas foram atraídas com luz, pipetadas com pipeta de Pasteur e transferidas para uma placa de Petri a fim de se selecionar os náuplios dos cistos não eclodidos. Dez náuplios foram selecionados em 100 μL de AMA fresco e foram transferidos para os poços de uma microplaca com as concentrações dos nanocompósitos a serem testadas, 20,5, 10,25, 5,125, 2,562 e 1,281 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



As microplacas foram incubadas por um período de 24 h e após este período, foi realizada a contagem do número de náuplios mortos por poço. Posteriormente os náuplios móveis (vivos) foram inativados com 100µL de dicromato por 15 minutos e número total de náuplios foi determinado. Os valores obtidos foram analisados através de análise de Probit utilizando o *software* R para cálculo da CL₅₀.

Resultados e Discussão

Os testes de letalidade de *Artemia salina* em microdiluição não mostraram toxicidade das nanopartículas contra o microcrustáceo. No bioensaio realizado não foi observada CL₅₀ nas concentrações testadas o que indica que o composto não apresentou toxicidade, pois sua dose letal é superior à maior concentração avaliada (20,5 µg mL⁻¹). O fator limitante desta concentração foi o fato de que a nanopartícula de prata possui concentração máxima de 100 µg mL⁻¹ e houve precipitação das nanopartículas em água marinha artificial (AMA), dificultando o teste com concentrações superiores a máxima testada em testes de microdiluição. Cada teste das nanopartículas foi realizado em 3 repetições.

An et al. (2019) avaliaram os potenciais efeitos tóxicos de nanopartículas de prata em náuplios de *Artemia salina* sob a diretriz ISO TS 20787. Os náuplios foram expostos às concentrações 0 (controle), 0,39, 1,56, 6,25, 25 e 100 mg/L por 24h, 48h e 72h. Os resultados indicaram baixa taxa de imobilização dos náuplios no prazo de 24h, mas o tempo de 72h aumentou significativamente a taxa de imobilização dos náuplios de forma dependente da concentração. Assim, os resultados indicaram que no período de 24h, a concentração máxima testada não foi suficiente para imobilizar os náuplios.

O teste de letalidade de *Artemia salina* possui boa correlação com outros testes mais complexos na determinação de várias atividades, tais como: antifúngicas,



antivirais e antimicrobianas, além de ser um teste de baixo custo e de fácil interpretação. Esse teste está sendo amplamente empregado na triagem da atividade biológica de vários compostos com possíveis potenciais de bioatividade (KRISHNARAJU et al., 2005; LUNA et al., 2005; PISUTTHANAN et al., 2004).

Considerações Finais

Os resultados encontrados no ensaio de letalidade com *Artemia salina* permitem inferir que as nanopartículas têm baixa toxicidade na triagem com *A. Salina* na concentração máxima testada de $20,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Nesse sentido, as nanopartículas testadas podem ser seguras do ponto de vista da toxicidade, permitindo o emprego medicinal das nanopartículas.

Agradecimentos

UEG (bolsa de pós-graduação Stricto Sensu – Nível mestrado), PPG – CAPS, QMMOL – UEG, LabBio – UEG.

Referências

AN, H. J. et al. Comparative toxicity of silver nanoparticles (AgNPs) and silver nanowires (AgNWs) on saltwater microcrustacean, *Artemia salina*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 218, p. 62–69, 1 abr. 2019.

KRISHNARAJU, A. V et al. Assessment of Bioactivity of Indian Medicinal Plants Using



IX Congresso de Ensino,
Pesquisa e Extensão da UEG



Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality Assay †. **International Journal of Applied Science and Engineering**, v. 3, n. 2, p. 125–134, 2005.

LHULLIER, C.; ANTUNES HORTA, P.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 16(2): 158-163, Abr./Jun. 2006.

LUNA, J. 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, 28 fev. 2005.

MOLINA-SALINAS, G. M.; SAID-FERNÁNDEZ, S. A MODIFIED MICROPLATE CYTOTOXICITY ASSAY WITH BRINE SHRIMP LARVAE (*Artemia salina*). **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 633–638, 2006.

NTUNGWE N, E. et al. *Artemia* species: An Important Tool to Screen General Toxicity Samples. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, n. 24, p. 2892–2908, 6 abr. 2020.

PISUTTHANAN, S. et al. Brine Shrimp Lethality Activity of Thai Medicinal Plants in the Family Meliaceae Naresuan. **University Journal**. 2004; 12(2): 13-18.

REALIZAÇÃO

PRG
Pró-Reitoria de
Graduação

PRP
Pró-Reitoria de
Pesquisa e
Pós-Graduação

PRE
Pró-Reitoria de
Extensão e
Assuntos Estudantis



Universidade
Estadual de Goiás



Triagem da toxicidade de frações de casca do caule de *Strychnos pseudoquina* com o ensaio de letalidade de *Artemia salina*

Julliane Chaves Arruda^{1*} (PG), Plínio Lázaro Faleiro Naves² (PQ), Antônio Carlos Severo Menezes³ (PQ) *jullianearruda@gmail.com

Universidade Estadual de Goiás, Br 153, Quadra Área, Km 99, Zona Rural, Anápolis -GO.

Resumo: A fitoterapia é uma prática bastante empregada pela população, algumas plantas apresentam a capacidade de produzir metabólitos secundários, o que confere a elas propriedades terapêuticas, assim como toxicidade. Portanto, é necessário realizar estudos toxicológicos para atestar a segurança na utilização dessas plantas e neste contexto, o ensaio com *Artemia salina* representa uma importante estratégia para a triagem das atividades biológicas, uma vez que o microcrustáceo é classificado como um bioindicador graças ao seu particular e reduzido grau de tolerância a fatores ambientais estressantes. O teste é bastante utilizado para a verificação de toxicidade, principalmente pelo seu baixo custo e facilidade de realização. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade toxicidade das frações acetato de etila e metanólica, extraídas de cascas do caule de *Strychnos pseudoquina* através do ensaio com *Artemia salina*. Os testes mostraram que a fração acetato de etila (FEA) obteve concentração letal 50% (CL₅₀) de 0,74 mg.mL⁻¹ configurando a esta fração um baixo grau de toxicidade, já a fração metanólica (FEM) não apresentou toxicidade já que não obteve valor de CL₅₀ para as concentrações testadas.

Palavras-chave: Estudos toxicológicos. plantas medicinais. bioindicador. atividade citotóxica.



Introdução

As plantas medicinais são utilizadas pela população de forma fitoterapêutica e preventiva desde as antigas civilizações, hábito da medicina tradicional que segue em prática principalmente em países em desenvolvimento, e essa importância terapêutica intensifica o desenvolvimento de pesquisas para produção de novos fármacos (AMPARO et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2020).

Ainda que as plantas apresentem numerosas aplicações conhecidas no uso terapêutico, na grande maioria das vezes o ser humano desconhece a possibilidade delas apresentarem graus de toxicidade tanto para ele próprio quanto para os animais (SENIGALIA et al., 2020).

Em razão da produção de metabólitos secundários, as plantas medicinais podem apresentar toxicidade que por meio do consumo ou simplesmente o contato podem ocasionar alterações patológicas no organismo. Na última avaliação feita pelo Sistema Nacional de Informações Toxicológicas, no ano de 2017, foram registrados no Brasil 821 casos de intoxicação humana, e 71 de intoxicação animal ocasionados por plantas (OLIVEIRA et al., 2020; FIOCRUZ, 2022).

Em consequência disso, é de extrema importância a realização de estudos e ensaios toxicológicos clínicos e não clínicos para avaliação de critérios de segurança. Esses ensaios toxicológicos não clínicos são fundamentais no processo de triagem do estudo de uma planta, e podem ser realizados tanto testes in vivo quanto in vitro. Inúmeros são os ensaios aplicados, como o modelo experimental de *Artemia salina*, uma técnica in vitro (OLIVEIRA et al., 2020).

Uma espécie de microcrustáceo marinha, frequentemente empregada pela simplicidade de manuseio, além do baixo custo, favorecendo sua utilização em



inúmeros estudos. *Artemia salina* é classificado como um bioindicador graças ao seu particular e reduzido grau de tolerância a um determinado fator ambiental, de forma que apresenta resposta bastante evidente frente a pequenas alterações na qualidade do ambiente (SENIGALIA et al., 2020).

Deste modo, é possível estabelecer por ensaios de toxicidade aguda, a Concentração Letal para 50% da população teste (CL_{50}) dos grupos bioativos presentes nos extratos vegetais. Em alguns casos, o teste de letalidade é tido como fundamental, um bioensaio preliminar na avaliação de compostos que apresentam potencial atividade biológica, reconhecido pela comunidade científica em geral (LIMA et al., 2019).

Com base no exposto, e percebemos a necessidade de se conhecer todos os riscos que uma planta medicinal pode oferecer a saúde, o presente trabalho teve como objetivo, avaliar a toxicidade de frações extraídas da *Strychnos pseudoquina* empregando o bioensaio com *Artemia salina*.

Material e Métodos

As cascas do caule de *Strychnos pseudoquina* foram coletadas do cerrado brasileiro, no município de Niquelândia no estado de Goiás e o reconhecimento foi feito pela professora Dr^a. Mirley Luciene dos Santos. A exsicata foi registrada sob o número de tombo HUEG 14494.

A coleta foi realizada em 06 de março de 2021, sob temperatura de 27 °C. As coordenadas de localização desse procedimento são: latitude - 14° 23' 33.5" S e longitude - 47° 55' 37.8" W. O acesso de cadastro no Sistema Nacional de Gestão



do Patrimônio Genético Sisgen, foi efetuado sob o número A36DDE3, no dia 11 de maio de 2022.

Subsequentemente a coleta, o material botânico (1.157,60 g) foi submetido ao processo de secagem em estufa a 45 °C, com circulação de ar por 24 horas, e posteriormente triturado em moinho de facas. Esse material pulverizado foi então submetido à extração, por maceração a frio com etanol a 96% por três dias. Em seguida foi realizado o processo de remaceração com renovação do líquido extrator a cada 24 horas.

Todo o extrato obtido foi posteriormente filtrado e direcionado para um evaporador rotativo. O extrato bruto obtido foi fracionado por meio de filtração a vácuo com a incorporação de celulose microcristalina D, com os seguintes solventes por ordem de polaridade: hexano, acetato de etila e metanol. Após o processo de coleta, obtenção e extração, as frações de acetato de etila (FEA) e metanólica (FEM) foram avaliadas.

A água marinha suplementada (AMS) foi preparada com a dissolução de 36 g de sal marinho e 6 mg de extrato de levedura, em água destilada, em seguida essa dissolução foi submetida a esterilização por autoclavação, e o pH foi ajustado para 8,5 com 0,1 M de Na_2CO_3 .

Em seguida, 0,3 g de cistos de *Artemia salina* foram incubados em 500 mL de AMS por 36 horas em estufa, ao abrigo de luz, a 25 °C com oxigenação constante. Posteriormente, os náuplios foram atraídos por fonte de luz, pipetados e transferidos para uma placa de petri com 5 mL de AMS renovada.

Para avaliação de toxicidade das frações, 60 mg de cada uma foram dissolvidos em um mililitro de dimetilsulfóxido (DMSO, Synth, Brasil) e em seguida, foi realizada diluição para os testes em microplacas de poliestireno de 96 poço de fundo plano. Foram adicionados em cada poço 10 náuplios com 100 μL de AMS e



100 μL das frações FEA e FEM dissolvidos em AMS nas concentrações de 0,3; 0,15; 0,07; 0,03; 0,015 mg.mL^{-1} .

Foi realizado controle de execução de técnica com dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), para isso foram adicionados 10 náuplios com 100 μL de AMS em cada poço, e em seguida adicionados 100 μL da dissolução de dicromato de potássio nas concentrações de 0,25; 0,125 e 0,0625 mg.mL^{-1} .

Posteriormente as placas foram incubadas na estufa a uma temperatura de 25 °C por 24 horas. Após o período de incubação foi contado o número de náuplios mortos em cada poço. Em seguida foi realizada a inativação das artêmias sobreviventes com dicromato de potássio (0,25) para contagem total de náuplios em cada poço e o cálculo da CL_{50} , com a função Probit do *software* R.

Resultados e Discussão

O microcrustáceo *Artemia salina* é comumente utilizado em ensaios de toxicidade aguda para estudo preliminar de atividade biológica de extratos e frações oriundos de produtos naturais. Esse simples organismo pode ser empregado como um adequado monitor para citotoxicidade de produtos, além de ser um método ágil, fácil e sensível a substâncias tóxicas (MERINO et al., 2015).

Este bioensaio utiliza a CL_{50} (Concentração letal 50 %) como parâmetro de análise da atividade biológica. Ensaios de letalidade são amplamente aplicados em testes toxicológicos, a fim de obter a concentração necessária para causar a morte de 50% dos microcrustáceos nas amostras estudadas (DIAS et al., 2017; MERINO et al., 2015).



Os valores de CL_{50} encontrados em nosso estudo, estão expostos na tabela

1.

Tabela 1: Concentração Letal (CL_{50}) das frações para *Artemia salina* e classificação do nível de toxicidade

Frações testadas	CL_{50} (mg.mL ⁻¹)	95% CL
FEA	0,74	0,37 -1,15
FEM	-	-

Legenda: FEA: Fração acetato de etila;
FEM: Fração metanólica.

A fração FEA apresentou CL_{50} de 0,74 mg.mL⁻¹, por outro lado, nos testes com a fração FEM, não foi detectada mortalidade em nenhuma das concentrações testadas, sugerindo que o valor de CL_{50} é maior que o valor máximo testado. Amostras com valores de CL_{50} menores que 100 µg.mL⁻¹ são apontadas como extremamente tóxicas, valores entre 100 e 500 µg.mL⁻¹ são tidas como moderadamente tóxicas e valores entre 500 e 1000 µg.mL⁻¹ configuram uma baixa toxicidade (AMARANTE et al., 2011).

Dessa forma a fração FEA apresentou uma baixa toxicidade, já que obteve valor de CL_{50} entre 500 e 1000 µg.mL⁻¹, já a fração FEM que não apresentou CL_{50} , para as concentrações testadas, mostra que o composto não manifestou toxicidade neste estudo.



Considerações Finais

A triagem das frações obtidas de casca do caule de *Strychnos pseudoquina* demonstrou que a fração metanólica apresentou baixa toxicidade e que a fração metanólica não foi tóxica para *A. salina* o que pode representar baixo grau de toxicidade e uma certa segurança no emprego medicinal dessa planta. Entretanto, estudos adicionais são necessários para explorar o potencial da *Strychnos pseudoquina* e para o desenvolvimento de formulações terapêuticas desta planta.

Agradecimentos

Agradeço a toda equipe do laboratório de bioensaios pelo apoio e todo conhecimento compartilhado durante o desenvolvimento dos testes, em especial as colegas Milena Agra, Aline Fernandes, Tayná Ribeiro, Ádrian Bartolomeu.



Referências

AMARANTE, C. B. D.; 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, p. 431-434, 2011.

AMPARO, T. R.; BRAGA, V. C. C.; SEIBERT, J. B.; SOUZA, G. D.; TEIXEIRA, L. F. M. Métodos para avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de plantas medicinais: a necessidade da padronização. **Infarma**, v. 30, n. 1, p. 50-9, 2018.

OLIVEIRA, M. C. B.; CRUZ, C. K. S.; ROCHA, G. M. M.; BRITO, M. G. A.; OLIVEIRA, G. A. L. et al. Toxicidade e atividade antibacteriana de plantas medicinais utilizadas no tratamento de doenças respiratórias: revisão integrativa. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 9, p. e244997169-e244997169, 2020.

DIAS, G. T.; LIMA, C. M. B. L.; LIRA, A. B.; RAMALHO, J. A.; OLIVEIRA, K. M.; DINIZ, M. F. F. M. Toxicidade do extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides*. **Acta Brasiliensis**, v. 1, n. 1, p. 8-12, 2017.

Fundação Oswaldo Cruz. Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde. **Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas**. Dados de intoxicação [Internet]. Fundação Oswaldo Cruz [acessado em 03 set. 2022]. Disponível em: https://sinitox.icict.fiocruz.br/sites/sinitox.icict.fiocruz.br/files//Brasil4_1.pdf

SENIGALIA, R. L. C.; FERREIRA, A. L. S.; KRATZ, D.; COELHO, M. D. F. B.; SANTOS, A. S. R. M.; CASTRO, D. A. Toxicidade de extratos vegetais de plantas do cerrado de uso medicinal. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 55308-55317, 2020.

LIMA, M. F. F.; SILVA, J. W. S. A.; SILVA, J. K.; MOURA, A. H. N.; LOPES, R. L. F.; CORDEIRO, B. A.; MELO, A. F. M. Avaliação toxicológica através do bioensaio com *Artemia salina* Leach de espécimes vegetais pertencentes à caatinga. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 6, p. 5950-5963, 2019.

MERINO, F. J. Z.; OLIVEIRA, V. B.; PAULA, C. S.; CANSIAN, F. C.; SOUZA, A. M.; ZUCHETTO, M.; MIGUEL, O. G. Análise fitoquímica, potencial antioxidante e toxicidade do extrato bruto etanólico e das frações da espécie *Senecio westermanii* Dusén frente à *Artemia salina*. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 17, p. 1031-1040, 2015.