

Avaliação da bioatividade do extrato e frações das folhas de *Esenbeckia pumila* Pohl. (Rutaceae) utilizando o teste de letalidade contra *Artemia salina*

Marianna C. Silva^{1*}(IC), Geane Karla G. F. Duarte¹(PG), Renato G. Santos¹(PG), Danielly de S. e Silva¹(IC), Plínio L. F. Naves, Antônio C. S. Menezes¹(PQ), *mariana_carrilho10@hotmail.com

¹Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás (CCTE-UEG). Br 153, Nº 3105 Fazenda Barreiro do Meio, caixa postal 459, CEP: 75.132-903, Anápolis-GO.

Resumo: Estudos realizados com algumas espécies do gênero botânico *Esenbeckia* apontam para diversas atividades biológicas, tais como: anticolinesterásica, antibacteriana, antimalárica e antitumoral. Contudo, não foram relatados na literatura estudos de bioatividade da espécie *Esenbeckia pumila* Pohl. Sendo assim, este trabalho visou traçar o perfil de toxicidade do extrato bruto etanólico e frações das folhas dessa espécie em bioensaio com *Artemia salina*. Este ensaio pautou-se em adaptações da metodologia sugerida por Molina-Salinas e Said-Fernández (2006), no qual soluções do extrato e das frações, em diferentes concentrações (2000, 1000, 500, 250, 125 e 62,5 µg.mL⁻¹) foram adicionadas a microplaca de 96 poços contendo náuplios (10±1) do microcrustáceo, sendo inclusos controles de viabilidade (água salina, DMSO e K₂Cr₂O₇). Após 24 horas, os indivíduos mortos foram contados e o cálculo da CL₅₀ foi realizado pelo método *Probit*, no programa *Statistic* 2010. Ao término do ensaio, verificou-se que três amostras apresentaram toxicidade alta contra *A. salina*, sendo que dentre as duas restantes, uma apresentou toxicidade moderada, enquanto a outra foi atóxica.

Palavras-chave: *Esenbeckia pumila* Pohl, Rutacea. Toxicidade. *Artemia salina*.

Introdução

A utilização dos recursos naturais pela humanidade tem sido primordial para sua sobrevivência ao longo dos anos, sobretudo no que se refere às suas aplicações medicinais, como por exemplo, pela utilização de plantas (fitoquímicos) no tratamento de inúmeros tipos de enfermidades (ATANASOV et al., 2015).

O avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais foi influenciado devido à grande diversidade da flora existente no planeta, sendo que, dentre 250-500 mil espécies de plantas apenas 5% delas têm sido estudadas fitoquimicamente (FILHO,1998), o que reforça ainda mais a necessidade de realização de inúmeros outros estudos, tanto fitoquímicos quanto biológicos.

Em relação ao bioma Cerrado, este possui uma das mais ricas floras dentre as savanas mundiais com mais de 6000 espécies, abrange uma vasta extensão territorial, e se destaca pela elevada biodiversidade (FELFILI e FELFILI, 2001). Dentre esta variedade de plantas, tem-se a família Rutaceae, que possui aproximadamente 150 gêneros com cerca de 1500 espécies (PIRANI, 1982 *Apud* SILVA e PAOLI, 2006), entre as quais encontra-se a espécie *Esenbeckia pumila* Pohl, que não apresenta muitos estudos científicos relatados na literatura.

Tendo em vista o escasso número de estudos da espécie *Esenbeckia pumila* e a contínua necessidade do estudo do potencial fitoquímico e biológico de plantas, especialmente do Cerrado, objetivou-se com este trabalho avaliar a toxicidade do extrato bruto etanólico e frações das folhas de *E. pumila* contra *Artemia Salina* Leach.

Material e Métodos

Coleta do material botânico

3100 g das folhas da espécie *Esenbeckia pumila* Pohl (Rutaceae) (**Figura 1**) foram coletadas no Câmpus de Ciências Exatas e Tecnológicas Anápolis - GO, Br 153 nº 3105, Fazenda Barreiro do Meio, em maio de 2015, segundo as coordenadas geográficas: latitude 16°22'48 sul e longitude 48°56'40 oeste. A espécie foi identificada pela Prof^a. Dr^a. Mirley Luciene dos Santos, sendo sua exsicata depositada no Herbário da Universidade Estadual de Goiás sob o número de tombo 10883.

Figura 1. *Esenbeckia pumila* Pohl.



Fonte: dados da pesquisa.

Preparação do extrato bruto

As folhas de *E. pumila* foram secas em estufa (MA035 – Marconi) com circulação de ar a 45°C durante 48 horas, pulverizadas em moinho Willey (tipo cróton MA-580) e armazenadas em erlenmeyers de dois litros. Após, o material pulverizado foi submetido a extrações com etanol 96% a frio (MATOS, 2009). Em seguida, o solvente foi evaporado em rotoevaporador (TECNAL-120) com pressão reduzida, à temperatura aproximada de 40°C, obtendo-se o extrato bruto etanólico (EPFE).

Fracionamento do extrato bruto

O fracionamento do extrato bruto etanólico foi realizado por meio de incorporação com celulose microcristalina D, a qual sofreu filtração à vácuo em um funil de Buchner por meio do uso de solventes por ordem de polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. O fracionamento resultou nas frações de hexano (EPFEH), diclorometano (EPFED), acetato de etila (EPFEA) e metanol (EPFEM).

Teste de letalidade contra *Artemia salina* Leach

O ensaio foi realizado segundo a metodologia de Molina-Salinas e Said-Fernández (2006) com algumas adaptações. Foi empregado o meio de água marinha sintética preparado com a dissolução de sal marinho (40 g.L⁻¹) em água destilada, suplementado com extrato de leveduras (6 mg.L⁻¹) e esterilizado em autoclave. O pH foi ajustado a 8,5 com solução de Na₂CO₃ 0,1 mol.L⁻¹.

Cem miligramas dos cistos foram incubados por 36 horas em 1 L do meio com iluminação natural, temperatura ambiente (20-25°C) e oxigenação constante, a fim de promover a eclosão dos cistos e liberação dos náuplios. Após a eclosão, os náuplios foram atraídos por fonte de luz, pipetados e transferidos para uma placa de Petri com 10 mL de meio fresco, para que então fossem transferidos para microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços. Os inóculos foram padronizados com 10±1 náuplios por cada poço.

O extrato das folhas de *Esenbeckia pumila* e suas frações foram solubilizados em solução salina e DMSO (dimetilsulfóxido) nas concentrações de 2000, 1000, 500, 250, 125 e 62,5 µg.mL⁻¹ e em seguida foram adicionados aos poços das microplacas. Foram incluídos controles de viabilidade e de letalidade utilizando

diluições de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, água salina e DMSO 2,5% (concentração máxima obtida após diluição seriada dos extratos). Todos os ensaios foram realizados em triplicatas independentes.

O cálculo das CL_{50} foi realizado pela contagem de náuplios mortos e vivos após 24h de exposição aos compostos ($20\text{-}25^\circ\text{C}$) pelo método gráfico para dose-resposta – *Probit*, no programa *Statplus®* versão 5.7.8 – 2014 *professional* (*AnalystSoft*), a partir da regressão linear obtida da relação entre a porcentagem de náuplios mortos e a concentração do extrato.

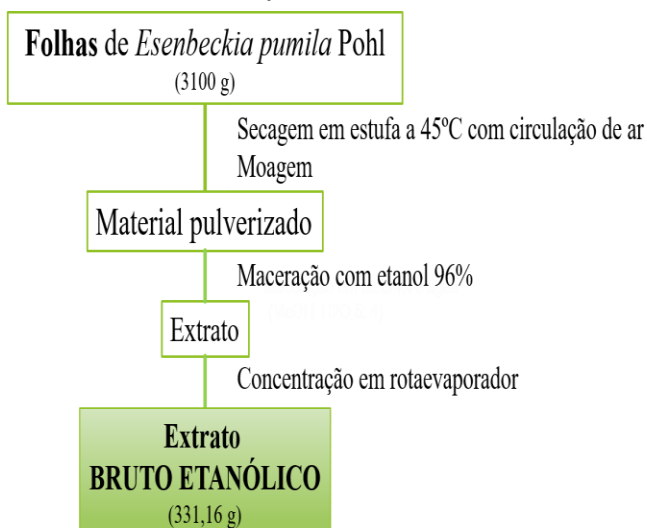
Para a classificação do nível de toxicidade, foi utilizado o critério proposto por Nguta et al. (2011). Os autores consideram toxicidade forte para compostos com valores de CL_{50} de até $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, toxicidade moderada para CL_{50} entre 100 e $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, toxicidade baixa para CL_{50} entre $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e não tóxico para valores acima de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Resultados e Discussão

Preparação do extrato bruto e fracionamento

Para obtenção do extrato bruto etanólico foram coletadas 3100 g de folhas frescas de *Esenbeckia pumila* Pohl, que após lavadas, secas e pulverizadas, devido à perda de umidade, resultaram em massa final de 1280 g. Este material após sucessivas extrações a frio com etanol 96% e posterior rotoevaporação resultou na obtenção de 331,16 g de extrato bruto etanólico (**Figura 2**).

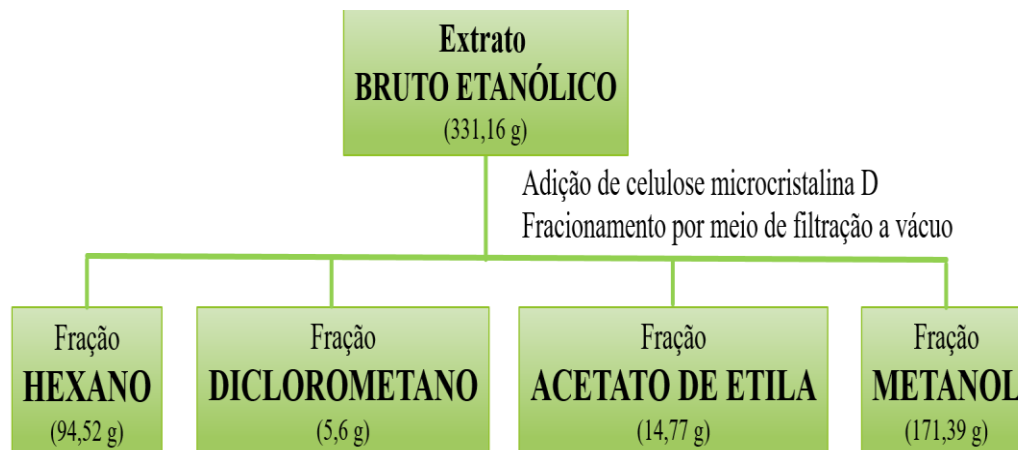
Figura 2. Representação esquemática do processo de obtenção do extrato bruto das folhas de *E. pumila* Pohl.



Fonte: dados da pesquisa.

A partir do fracionamento do extrato bruto, obteve-se 94,52 g de EPFEH, 5,6 g de EPFED, 14,77 g de EPFEA e 171,39 g de EPFEM (**Figura 3**). Tanto o extrato bruto quanto as frações foram submetidos ao teste de letalidade contra *Artemia salina* Leach.

Figura 3. Esquema do processo de fracionamento do extrato bruto etanólico.



Fonte: dados da pesquisa

Teste de letalidade contra *Artemia salina* Leach

Segundo classificação proposta por Nguta et al. (2002), amostras com valores de $CL_{50} < 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentam alta toxicidade; $100 \mu\text{g.mL}^{-1} < CL_{50} < 500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, toxicidade moderada; $500 \mu\text{g.mL}^{-1} < CL_{50} < 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, toxicidade fraca; e $CL_{50} > 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, não apresentam toxicidade.

O extrato bruto etanólico apresentou resultados de $CL_{50} = 64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e as frações apresentaram os seguintes resultados: hexano, $CL_{50} = 149 \mu\text{g.mL}^{-1}$; diclorometano $CL_{50} = 57 \mu\text{g.mL}^{-1}$; acetato de etila, $CL_{50} = 65 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e metanol, $CL_{50} = 1618 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Tais resultados encontram-se melhor elucidados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Resultados dos ensaios com *Artemia salina*.

Amostras	$CL_{50} (\mu\text{g.mL}^{-1})^*$	Toxicidade
Extrato Bruto Etanólico	64	Alta
Fração Hexano	149	Moderada
Fração Diclorometano	57	Alta
Fração Acetato de Etila	65	Alta
Fração Metanol	1618	Nenhuma

Legenda: CL_{50} = Concentração Letal Média

Considerações Finais

Resultados que apontam alta ou moderada toxicidade em *Artemia salina* têm demonstrado correlação com várias atividades biológicas (antitumoral, antimicrobiana, antiparasitária, entre outras), sugerindo o grande potencial de bioatividade do extrato bruto etanólico e das frações hexano, diclorometano e acetato de etila, o que reforça a necessidade de se realizar novos testes biomonitorados, além do isolamento e identificação de potenciais substâncias bioativas.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Universidade Estadual de Goiás pelo apoio financeiro, e ao Programa de Bolsa e Incentivo à Pesquisa e Produção Científica (PROBIP-UEG).

Referências

ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E.; LINDER, T.; WAWROSCH, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E. H.; ROLLINGER, J. M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J. M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M. D.; KOPP, B.; BAUER, R.; DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n.8, p. 1582-1614, 2015.

FELFILI, M. C.; FELFILI, J. M. Diversidade alfa e beta no cerrado sensu stricto da Chapada Pratinha. **Acta Botanica Brasilica**, v.15, n.2, p. 243-254, 2001.

FILHO, V.C.; YUNES R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v.21, n.1, p. 99-105, 1998.

MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 3ed. Fortaleza: UFC, 2009. 150p.

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.

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**, v.14, n. 2, p.358-361, 2011.

PIRANI, J. R. **A ordem Rutales na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil**. 1982. 244p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Departamento de Botânica, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SILVA, L. L.; PAOLI, A. A. S. Morfologia e anatomia da semente e *Esenbeckia grandiflora* Mart. Sedds (Rutaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.2, 2006.