



## **ENSAIO DE TOXICIDADE COM *Artemia salina* EXPOSTAS AO EXTRATO BRUTO DE BACUPARI**

**Telice Silva Costa<sup>1</sup> (IC); Brunna Emanuely Gonçalves Ferreira<sup>1</sup> (IC), Laís de Caldas Nascimento<sup>1</sup> (IC), \*Luanna Patrícia Borges<sup>1</sup> (IC) (luannapatriciaborges@gmail.com); Walter Dias Junior<sup>1</sup> (PQ)**

<sup>1</sup> Faculdade de Enfermagem - Universidade Estadual de Goiás – Unidade Universitária Ceres – Ceres, Goiás, Brasil.

Resumo: O mal uso de medicamentos e formas alternativas de tratamento de doenças, como o uso popular de plantas medicinais na tentativa de reestabelecer a saúde, pode se tornar um fator de adoecimento pela ingestão de doses desconhecidas. Dentre a grande variedade de plantas medicinais encontradas no Brasil, o bacupari (*Salacia elliptica*) é comumente usado como emagrecedor, antitumoral e no tratamento de diabetes mellitus. Assim, o objetivo desse trabalho foi encontrar as doses de ingestão seguras para o extrato vegetal de *S. elliptica* para entendermos melhor sobre o uso terapêutico e medicinal dessa planta e testar se ela não promove efeitos tóxicos nos náuplios de artêmias. As folhas foram coletadas, limpas, secas, trituradas e maceradas em etanol 95% para preparação do extrato bruto. Em seguida foi realizado o teste de dose limite partindo de 100mg/L e finalmente, o bioensaio em náuplios de *Artemia salina*, com 5 doses, que seguiram a proporção geométrica de duas vezes acima. Os resultados do teste de intoxicação com artêmias tratados com o extrato bruto de bacupari sugerem que o extrato parece apresentar baixa toxicidade para a dosagem de 3200mg/L, mas mais testes são necessários para se confirmar essa afirmativa.

Palavras chave: *Salacia elliptica*. Plantas medicinais. Toxicidade. Microcrustáceo.

### **Introdução**

O mal uso de medicamentos e formas alternativas de tratamento de doenças, como o uso popular de plantas medicinais, na tentativa de reestabelecer a saúde, torna-se um fator de adoecimento.

Dentre a grande variedade de plantas medicinais encontradas no Brasil, o Bacupari (*Salacia elliptica*) é conhecido popularmente como um agente de prevenção e tratamento de diabetes tipo I e na cicatrização de ferimentos, antitumoral, antioxidante e antibacteriano (SILVA, 2009).

A *Artemia salina* L. é um micro crustáceo da ordem Anostraca encontrado em águas salgadas, e desde 1956 é utilizado em experimentos laboratoriais como bioindicador de toxicidade, devido seu baixo custo, alta sensibilidade e fácil manuseio (CAVALCANTE et al., 2000). O ensaio de toxicidade com *Artemia salina* consiste em avaliar a toxicidade aguda do composto testado e por isso é fator determinante em bioensaios.





Do exposto acima, a realização desse trabalho justifica-se, pois o uso de plantas medicinais pode ser um grande aliado ao sistema de saúde, devido ao seu baixo custo e fácil acessibilidade. Porém, é necessário que se conheça o potencial tóxico das substâncias utilizadas.

### Material e Métodos

As folhas de uma árvore de bacupari localizada no município de Ceres/GO, foram coletadas, lavadas e secas até estabilização da massa foliar e posteriormente trituradas e maceradas em etanol 95% por três semanas para obtenção do extrato bruto etanólico. A evaporação do solvente foi feita em evaporador rotativo para concentração do extrato bruto etanólico, que posteriormente foi diluído em solução aquosa salina 3,5% para o teste de toxicidade com náuplios de *Artemia salina*. Os cistos de *A. salina* foram colocados para eclosão em um artemilheiro (funil de separação de 250mL) com uma solução salina padronizada (3,5% sal marinho adquirido em loja especializada em aquários marinhos, água destilada, pH entre 8 e 9, e 0,006mg de extrato de levedura), com aeração e iluminação direta de 40W contínua, e temperatura mantida entre 26 a 30°C, até eclosão dos náuplios (aproximadamente 24 h) de acordo com as recomendações de Clemente et al. (2019). O ensaio de toxicidade foi realizado de acordo com o recomendado pelo Teste 202: *Daphnia* sp, Acute Immobilization Test (OECD, 2004). Os náuplios com as soluções de tratamento foram alojados em placas de Elisa com 96 poços de 400µL com 10 crustáceos/poço, sendo 6 repetições/tratamento, e a imobilidade/mortalidade avaliada em 24 e 48h após início da exposição (OECD, 2004) comparativamente com um controle negativo (salina 3,5%) e controle positivo (Dicromato de Potássio 0,0014M – 0,4mg/mL).

Os parâmetros físico-químicos da água como temperatura, pH e Oxigênio dissolvido foram aferidos no início e no final do experimento, tendo como condições iniciais mínimas temperatura de 23±1°C, pH de 6-9, e O<sub>2</sub> de 5mg/L.

### Resultados e Discussão

O resultado do teste de dose limite mostrou que o extrato hidroetanólico de folhas de bacupari (*Salacia elíptica*) na dose de 100mg/L não promoveu nos náuplios imobilidade ou mortalidade. Isso significa que a dose tóxica está acima desse valor, e, portanto, utilizamos para o teste de toxicidade as doses de 100, 200, 400, 800, 1600 e 3200mg/L de extrato bruto de bacupari.





A Figura 1 ilustra os valores de Oxigênio dissolvido ( $O_2$  mg/L) e do pH do meio de incubação dos náuplios de artêmias. A concentração de  $O_2$  dissolvido na água foi realizada por meio de kits colorimétricos para dosagens em água de aquário. Os níveis de oxigênio dissolvido no meio, mesmo quando apresentaram baixos valores (6,0 mg/dL) ainda estavam dentro das exigências desse gás para a manutenção dos microcrustáceos, o qual deve estar sempre acima de 5,0mg/L (TOMELIM, 2014).

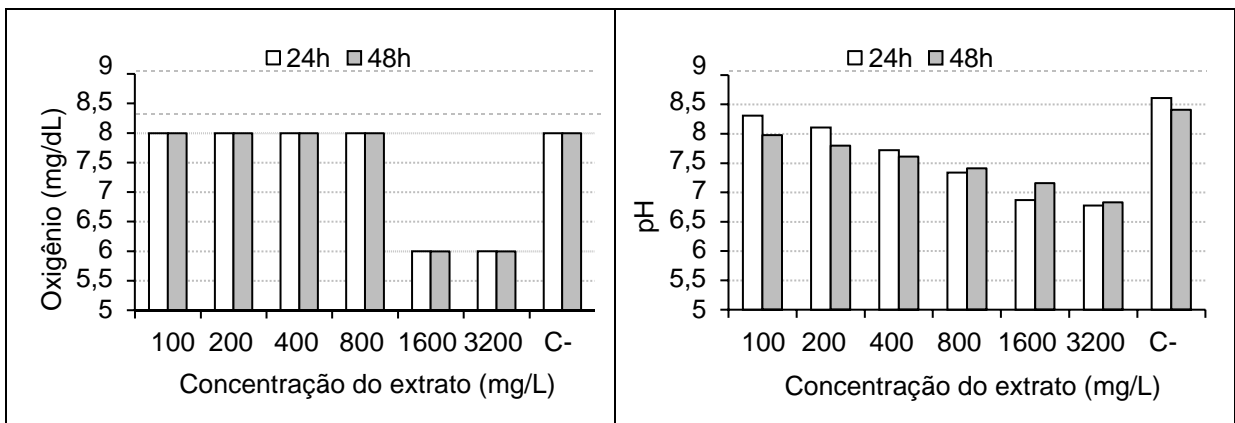


Figura 1: Concentração de oxigênio ( $O_2$ ) dissolvido (mg/dL) e Potencial hidrogênio-iônico (pH) no meio de incubação dos náuplios (salina 3,5% + extrato bruto de bacupari em diferentes concentrações) e controle negativo (C-: salina 3,5%) em 24h e 48h de incubação.

Por outro lado, o aumento crescente da concentração do extrato bruto de bacupari no meio de incubação, proporcionou um decréscimo no pH, promovendo a acidificação do ambiente. Isso mostra que as maiores doses promoveram uma queda de até 1,8 pontos em média no valor de pH. Para uma boa sobrevivência da *A. salina* o pH do meio ambiente deve-se estar entre 6 a 10 (LEWAN et al., 1992). Em geral, as artêmias são muito resistentes ao pH, sobrevivendo inclusive, em meio ácido.

A mortalidade dos náuplios incubados em diferentes concentrações de extrato bruto de bacupari aumenta somente na dosagem de 3200mg/L no período de 48h de incubação ( $p < 0,05$ ), atingindo valores de 13,7% (Figura 2).

Uma vez que os valores de pH para as doses de 1600mg/L (6,87) e de 3200mg/L (6,78) são praticamente iguais ( $p > 0,05$ ), acreditamos que a acidificação do meio e o tempo de incubação pode ser o responsável pelo aumento em 13,7% na mortalidade dos náuplios, para a maior dosagem do extrato. Isso nos mostra que pode ser necessário promover um tamponamento do meio de incubação para eliminar o efeito do pH na





mortalidade dos náuplios, principalmente para as doses acima de 1600mg/L de extrato bruto de bacupari.

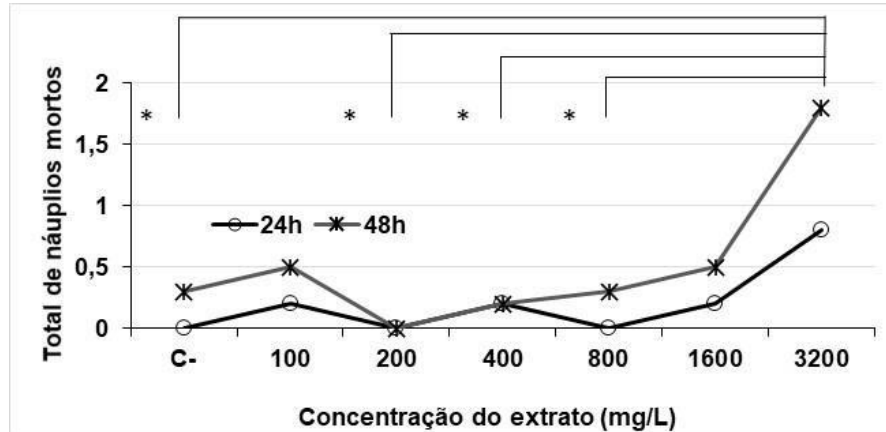


Figura 2: Número médio de náuplios mortos nas 6 repetições de acordo com o meio de incubação de (salina 3,5% + extrato bruto de bacupari em diferentes concentrações) e controle negativo (C-: salina 3,5%) em 24h e 48h de incubação. \* ( $p < 0,05$  versus 3200mg/L para 48h). Controle positivo ( $K_2Cr_2O_7$  0,001M) apresentou 100% de mortalidade em 48h.

Oda e colaboradores (2015) afirmam que a administração oral de 400mg/Kg/91 dias de extrato de *Salacia reticulata* não promove intoxicação de roedores. Flammang et al. (2007) também testou a toxicidade de extrato da *Salacia oblonga* em concentrações dietéticas de até 2.500mg/Kg/dia por um período 90 dias, e também não encontrou nenhum efeito tóxico. Esses estudos parecem mostrar a baixa toxicidade dos extratos de diferentes tipos de plantas do gênero *Salacia*, e os nossos resultados de intoxicação de artêmias com extrato bruto de *Salacia elliptica*, aparentemente demonstrou uma baixa toxicidade apenas na dosagem mais alta 3.200mg/L.

### Considerações Finais

Testes de toxicidade utilizando *Artemia salina* são confiáveis, práticos, baratos e rápidos, sendo uma eficiente metodologia que permite avaliação da toxicidade aguda letal, tornando-se um ensaio alternativo para utilização de animais, permitindo os pesquisadores a respeitar os 3R's (Redução, Refinamento e Substituição).

O extrato bruto hidroetanólico de bacupari (*Salacia elliptica*) acidifica o meio (salina 3,5%) em uma relação direta (maior dose, maior acidificação).

A concentração de 3200mg/L de extrato bruto de *Salacia elliptica* proporcionou uma mortalidade de 13,7% das larvas de microcrustáceos, demonstrando baixa toxicidade. Frente a todos os resultados, percebe-se a importância de mais testes e estudos complementares.





## Agradecimentos

Agradecemos ao Programa de Bolsas de Iniciação Científica PIVIC/UEG Edital nº 034/2020 e ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Toxicológica da Unidade Universitária da UEG de Ceres.

## Referências

CAVALCANTE, M.F.; OLIVEIRA, M.C.C.; VELANDIA, J.R.; ECHEVAERRIA, A.; Síntese de 1,3,5-Triazinas Substituídas e Avaliação da Toxicidade frente a *Artemia salina* Leach-2000. **Sociedade Brasileira de Química - Química Nova**. Disponível em: <[http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe\\_artigo.asp?id=1401](http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=1401)> Acesso em: 24/05/2020

CLEMENTE, R.C; PERREIRA, R. J; NACIMENTO, G.N.L. Avaliação do potencial toxicológico de bacabas-de-leque (*Oenocarpus distichus* Mart.) por ensaios de fragilidade osmótica eritrocitária, *Artemia salina* e em raiz de *Allium cepa*. **Braz. J. of Develop.**, Curitiba, v.5, n.10, p.19170-19183. 2019. Disponível em: <<http://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/3768>> Acesso em: 23/05/2020

FLAMMANG, A.M.; EREXSON, G.; MIRWALD, J.M.; HENWOOD, S.M. Toxicological and cytogenetic assessment of a *Salacia oblonga* extract in a rat subchronic study. **Food and Chemical Toxicology**. 45 p. 1954–1962. 2007. Disponível em: <<https://sci-hub.se/10.1016/j.fct.2007.04.013>> Acesso em: 04/11/2021

LEWAN L.; ANDERSSON, M.; GOMEZ, P. M. The Use of *Artemia Salina* in Toxicity Testing. **Ninth Scandinavian Cell Toxicology Congress 2**. ATLA 20, 297- 301, 1992. Disponível em: <<https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1177/026119299202000222>> Acesso em: 04/11/2021.

ODA, Y.; YUASA, A.; UEDA F.; KAKINUMA, C. A subchronic oral toxicity study of *Salacia reticulata* extract powder in rats. Page 1 of 31, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214750015300214?via%3Dihub>> Acesso em: 04/11/2021.

OECD (2004), **Test No. 202: *Daphnia sp. Acute Immobilisation Test***, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069947-en>. ISSN: 20745761. Disponível em: <[https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-202-daphnia-sp\\_acuteimmobilisation-test\\_9789264069947-en](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-202-daphnia-sp_acuteimmobilisation-test_9789264069947-en)> Acesso em: 25/03/2020.

SILVA, G.A. Constituintes químicos do caule e raiz de *Salacia elliptica* (Mart.) Peyr. 2009. 58 f. Dissertação (Mestrado em Educação em Química) - **Universidade Federal de Goiás**, Goiânia, 2009. Disponível em: <<https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tde/1060>> Acesso em: 22/05/2020.

TOMELIM, E. Utilização de *Artemia sp.* enriquecida para alimentação de pós-larvas de bijupirá (*rachycentron canadum*). (Monografia em Tecnologia em Aquicultura) - **Universidade Federal do Paraná**. 2014. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/57185/TOMELIM.%20EVANDRO%20-%20TCC.pdf?sequence=1&isAllowed=y>> Acesso em: 04/11/2021.

