

Toxicidade de acetofenonas isoladas de espécies de *Croton* frente à *Artemia salina* L.

Francisca L. L. de Aguiar¹, Hélcio S. dos Santos², Antonio A.S. Silva³, Selene M. de Moraes⁴, Raquel O.S. Fontenelle⁵

¹Mestranda em Recursos Naturais/UECE; ²Professor do Curso de Química/UVA; ³Doutorando em Farmacologia/UFC; ⁴Professora titular/Departamento de Química/UECE; ⁵Centro de Ciências Agrárias; Professora Orientadora/UVA.

RESUMO

As plantas constituem-se uma importante fonte de compostos biologicamente ativos, que podem ser utilizadas como fonte de medicamentos para várias doenças. No entanto, esses compostos podem resultar em efeitos altamente tóxicos, por isso é fundamental conhecer o potencial toxicológico dessas substâncias. Diante disso, o presente trabalho se propõe em avaliar a toxicidade de compostos isolados de espécies de *Croton*, frente à *Artemia salina* L. Ambos os compostos apresentaram toxicidade significativa, confirmando seu potencial biológico podendo ser utilizados principalmente como agente antitumoral.

Palavras-Chave: *Toxicidade. Acetofenonas. Artemia salina* L.

INTRODUÇÃO

A maioria das plantas produzem muitos compostos biologicamente ativos como parte normal de seu crescimento e desenvolvimento ou em resposta ao ataque de patógenos ou às condições de stress. Dentre esses compostos destacam-se os antimicrobianos, antifúngicos e antioxidantes¹. No entanto, o uso de produtos naturais também pode resultar em efeitos tóxicos evidenciando a necessidade de compreender os efeitos biológicos de compostos naturais².

Artemia spp., (Artemiidae), também conhecida como a larva do camarão salmoura, é um microcrustáceo zooplânctônico que vive nas águas salgadas de praticamente todos os ambientes marinhos da Terra³.

Fig 1. Macho adulto do microcrustáceo *Artemia salina* L.



Fonte: Warren⁴

Os cistos de *Artemia salina* L. podem ser armazenados em ambiente seco e sob condições anaeróbicas por no mínimo seis meses sem perder a viabilidade⁵. Esses cistos são encontrados em lojas de animais como comida de peixes tropicais, por um preço considerado razoavelmente barato. Por se tratar de um animal de fácil cultivo (facilidade na obtenção de seus cistos) e de ampla distribuição, *Artemia* sp. tem sido largamente utilizada em testes de toxicidade⁶.

Além disso, este ensaio é considerado um método seguro, prático, econômico e de rápida implementação para determinar a toxicidade dos compostos de produtos naturais⁷, sendo um método importante para investigações preliminares de toxicidade para triagem de extratos de plantas utilizados na medicina popular e para indicação de uma grande variedade de compostos biologicamente ativos nesses extratos⁸.

É amplamente utilizada por ter demonstrado boa correlação com várias atividades biológicas como atividade antitumoral, atividade contra *Trypanosoma cruzi*, atividade antibacteriana e antifúngica. Em geral, extratos com alta toxicidade para *Artemia salina* (DL50 < 200 ug/mL) apresentam alto potencial para essas atividades⁹. Vários produtos naturais foram testados através deste ensaio, mostrando uma relação significativa. Parra et al.¹⁰ mostraram que este ensaio evita o uso desnecessário de animais em laboratórios, pois os valores de CL50 e DL50 mostrar uma boa relação com os testes *in vivo*, com uma taxa de $r = 0,85$. O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade dos compostos 2-Hidroxi-3,4,6-Trimetoxiacetofenona e da 2-hidroxi-4,6-trimetoxiacetofenona, isolados de *Croton anisodontus* e *Croton nepetaefolius*, respectivamente, frente à *Artemia Salina* L.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios de toxicidade foram realizados conforme metodologia proposta por Meyer et al.¹¹, onde foram preparadas diluições seriadas a partir de 20mg das amostras, com clorofórmio (CHCl₃) para obtenção das concentrações finais de 1000, 100, 10 ppm. Foi utilizado também um controle negativo contendo apenas 100 µl de DMSO e 4,9 mL de água do mar.

Foram utilizados 0,5 mL de cada amostra e adicionados a todos os tubos de ensaio 1,0 mL de água do mar e 50 µL de dimetilsulfóxido. Os tubos foram colocados em sonificador por 10 min. e o volume do tubo foi completado com água do mar para 5 mL. Com auxílio de uma pipeta graduada, foram transferidas 10 náuplios com 48 horas de eclosão para cada tubo de ensaio contendo 5mL de cada uma das soluções testadas. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Os tubos são incubados e após 24 h em contato com a suspensão das amostras, realizou-se a contagem do número de microcrustáceos mortos e foi calculada a percentagem de mortalidade. Os

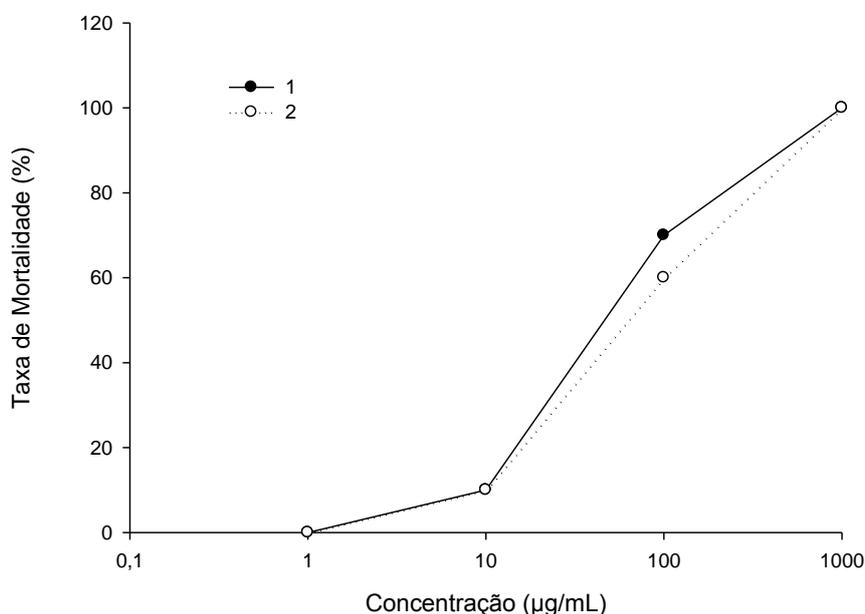
resultados obtidos foram tabulados e submetidos à análise de Probit no software estatístico SPSS® for Windows 10.0, obtendo-se o valor da DL_{50} , com intervalo de confiança a 95%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ensaio de letalidade permite a avaliação da toxicidade geral e, portanto é considerado um ensaio preliminar no estudo de compostos com potencial antimicrobiano, Estudos relatam que a *Artemia sp.* é utilizado para determinar toxicidade de produtos naturais e químicos, considerando que estas larvas apresentam sensibilidade a substâncias tóxicas¹².

Os compostos 2-Hidroxi-3,4,6-Trimetoxiacetofenona e 2-hidroxi-4,6-dimetoxiacetofenona submetidos ao teste de toxicidade com *Artemia sp.*, apresentaram, CL_{50} de $46,22 \mu\text{g.mL}^{-1}$ com intervalo de confiança de 29,22-73,37 e CL_{50} de $75,55 \mu\text{g.mL}^{-1}$ com intervalo de 46,55-125,47, respectivamente. Podemos observar que ambos os compostos apresentaram-se bioativos, sendo que o primeiro mostrou maior toxicidade que o segundo composto, pois requereu uma menor concentração para causar a mortalidade de 50% da população.

Fig 2. Taxa de mortalidade de *Artemia salina* L. em função da dose de 2-hidroxi-4,6-trimetoxiacetofenona (1) e 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona (2).



Meyer et al.¹¹ estabeleceram uma relação entre o grau de toxicidade e a concentração letal média (CL_{50}), apresentada por substâncias de plantas sobre larvas de *A. salina* L., desde então, considera-se que quando são verificados valores de $CL_{50} < 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, estes, são considerados bioativos.

Toxicidade semelhante foi obtida por Silva e colaboradores¹³, ao avaliar a letalidade de deri-

vados do ácido LC₅₀ 75.48 µg.mL⁻¹ (46.54 - 124.97). A atividade desse composto foi avaliada frente à promastigotas, causadores de leishmaniose e mostraram eficácia nos testes, com valores de EC₅₀ semelhantes aos fármacos utilizados atualmente no tratamento dessas doenças.

Em estudos prévios foram avaliados as propriedades antifúngicas dos compostos contra dermatófitos. Os compostos apresentaram atividade contra cepas de *Microsporum canis* e *Trichophyton rubrum*. Apesar da importante atividade frente esses micro-organismos a toxicidade observada contra *Artemia salina* L. desencoraja o uso destes compostos para produção de antifúngicos de uso oral. Uma alternativa para sua utilização como antifúngicos seria o uso de preparações tópicas, uma vez que *T. rubrum* e *M. canis*, são micro-organismos causadores de lesões cutâneas.

McLaughlin et al.¹⁴ relatam que esse ensaio tem boa correlação com atividade citotóxica em alguns tumores humanos sólidos. Os mesmos autores observaram que os valores de ED₅₀ obtidos para a citotoxicidade eram 0,1% dos valores de LC₅₀ encontrado nos testes com *Artemia salina* L., sugerindo que este ensaio pode ser utilizado como uma primeira análise do potencial citotóxico de novos compostos. Diante disso, os compostos estudados merecem destaque, sugerindo uma possível ação citotóxica e igualmente ação antitumoral.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O teste de toxicidade mostrou que estas substâncias possuem toxicidade ativa, sugerindo a utilização desses compostos para várias atividades biológicas, como antifúngica, antileishmania e antitumoral. No entanto, são necessários outros estudos para comprovar a viabilidade desses compostos frente essas atividades bem como comprovar a segurança toxicológica das mesmas.

AGRADECIMENTOS

Ao laboratório de Química de Produtos Naturais (LPQN) da UECE, Laboratório de Microbiologia e Parasitologia da UVA (LABIMIC) pelo suporte técnico e a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SGARIGLIA, A. M. *et al.* Isolation of antibacterial components from infusion of *Caesalpinia paraguariensis* bark. A bio-guided phytochemical study. **Food Chem.**, v. 126, n. 2, p. 395-404, 2011.
2. LIMA, F. R. M. *et al.* Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **J.Ethnopharmacol.**, v. 105, n.1/2, p.137-147, 2006.

3. GRINEVICIUS, V. M. A. de S. Avaliação da remediação de efluentes de uma indústria têxtil utilizando bioindicadores e biomarcadores. **Dissertação (Mestrado)** - Universidade Federal De Santa Catarina, Florianópolis, 179 f., 2006.
4. WARREN. Disponível em <<http://www.warrenphotographic.co.uk/04850-brine-shrimp-adult-male>>. Acesso em: 08 set. 2014.
5. CALOW, P. **Handbook of ecotoxicology**, v.01, Blackwell, Oxford, UK, 1993.
6. PIMENTEL, M.F. Análise ecotoxicológica do efluente da indústria de beneficiamento da castanha de caju antes e após tratamento em reator aeróbio inoculado com fungos. **Dissertação (mestrado)** – Universidade Estadual do Ceará, Ciências Marinhas Tropicais, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2008
7. BARBOSA, T.P., JUNIOR, C.G.L., SILVA, F.P.L., LOPES, H.M., FIGUEIREDO, L.R.F., SOUSA, S.C.O., BATISTA, G.N., SILVA, T.G., SILVA, T.M.S., OLIVEIRA, M.R., VASCONCELOS, M.L.A.A.,. Improved synthesis of seven aromatic Bayliss Hillman adducts (BHA): evaluation against *Artemia salina* Leach. and *Leishmania chagasi*. **Eur. J. Med. Chem.** 44, 1726–1730, 2009.
8. QUIGNARD, E.L.J.; POHLIT, A.M.; NUNOMURA, S.M.; PINTO, A.C.S.; SANTOS, E.V.M.; MORAIS, S.K.R.; ALECRIM, A.M.; PEDROS, A.C.S.; CYRINO, B.R.B.; MELO, C.S.; FINNEY, E.K.; GOMES, E.O.; SOUZA, K.S.; OLIVEIRA, LCP, DON, LC, SILVA, LFR, QUEIROZ, MMA, HENRIQUE, MC, SANTOS, M.; PINTO, O.S.; SILVA, S.G. Screening of plants found in Amazonas state for lethality towards brine shrimp. **Acta Amazonica**, 33(1):93-104, 2003.
9. DOLABELA, M.F. Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti Trypanossoma cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas. **Dissertação (Mestrado)**. Minas Gerais, 130p., 1997.
10. PARRA, A. L; YHEBRA, R. S; SARDIÑAS, I.G; BUELA, L.I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**. v. 8(5), p. 395-400, 2001.
11. MEYER, B.N; FERRIGINI, N.R; PUTNAN, J.E; JACOBSEN, L.B; NICHOLS, D.E; MCLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plants constituents. **Planta Med** 45:31, 1982.
12. KRISHNARAJUA, V.A.; RAOA, T.V.N.; SUNDARARAJAUA, D.; VANISREEB, M.; TSAYB, H.S.; SUBBARAJAUA, G.V. Assessment of bioactivity of Indian medicinal Plants using Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality assay. **International Journal of Applied Science and Engineering**, v.3(2): p.125-34, 2005.
13. SILVA, A. A. S. Atividade leishmanicida de triterpenos isolados de *Musa paradisiaca* e do ácido anacárdico e derivados contra *Leishmania infantum chagasi*/Antonio Adailson de Sousa Silva. **Dissertação (mestrado)** – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2013.
14. McLAUGHLIN, J.L. Crown gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractions. In: Dey P.M, Harbone J.B (ed.) **Methods in Plant Biochemistry**. New York: Academic Press, p.1-32, 1991.