



Universidade Federal
de Campina Grande

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA

LAISLA RANGEL PEIXOTO

**DETERMINAÇÃO DA CL₅₀ DE FASES DOS EXTRATOS *Erythroxylum caatingae*
Plowman e *Erythroxylum revolutum* Mart COMO PARÂMETRO DE BIOATIVIDADE**

CUITÉ - PB

2014

LAISLA RANGEL PEIXOTO

**DETERMINAÇÃO DA CL₅₀ DE FASES DOS EXTRATOS *Erythroxylum caatingae*
Plowman e *Erythroxylum revolutum* Mart COMO PARÂMETRO DE BIOATIVIDADE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Farmácia da Universidade Federal de
Campina Grande, em cumprimento às
exigências para obtenção do título de
Farmacêutico Generalista.

Orientador: Prof. Dr Fernando de Sousa Oliveira

CUITÉ - PB

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Msc. Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

P379d Peixoto, Laisla Rangel.

Determinação da CL50 de fases dos extratos *Erythroxylum caatingae* Plowman e *Erythroxylum revelutum* Mart como parâmetro de bioatividade. / Laisla Rangel Peixoto. – Cuité: CES, 2014.

47 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2014.

Orientador: Fernando de Sousa Oliveira.

1. Artemia. 2. Toxicidade. 3. Erythroxylaceae. I. Título.

CDU 615.1

LAISLA RANGEL PEIXOTO

**DETERMINAÇÃO DA CL₅₀ DE FASES DOS EXTRATOS *Erythroxylum caatingae*
Plowman e *Erythroxylum revolutum* Mart COMO PARÂMETRO DE BIOATIVIDADE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Farmácia da Universidade Federal de
Campina Grande, em cumprimento às
exigências para obtenção do título de
Farmacêutico Generalista.

Aprovado em: ____/____/____

Prof. Dr. Fernando de Sousa Oliveira
Orientador (a)- UFCG/CES

Prof. Dr. Renner de Sousa Leite
UFCG/CES

Prof. Dra. Júlia Beatriz Pereira de Souza
UFCG/CES

Dedico...

A **toda minha família**, pelo incentivo, carinho, companheirismo e exemplo de amor que me deram. Obrigada por tudo.

Aos professores pelo simples fato de estarem dispostos a ensinar.

Ao orientador pela paciência demonstrada no decorrer do trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à **Deus**, pela presença em minha vida, sempre me guiou, e foi o grande responsável por esta conquista.

Aos meus pais, **Ricardo Peixoto e Aureny Rangel**, por sempre me apoiarem em todas as etapas da minha vida e pelo imenso amor que me deram! Sem vocês, este sonho não estaria sendo concretizado.

Às minhas queridas irmãs **Samantha, Samara e Larissa** pelo carinho e amizade ofertados à mim. Amo vocês!

Aos **meus tios, tias, primos e primas**, por sempre terem depositado confiança na minha carreira acadêmica.

Aos **meus amigos e colegas de turma**, por compartilhar, durante os cinco anos do curso, todos os momentos de alegria e dificuldades encontrados pelo caminho.

Ao meu orientador **Fernando de Sousa Oliveira** pelos ensinamentos, atenção, dedicação, incentivo e sabedoria que muito me auxiliou para conclusão deste Trabalho de Conclusão de Curso.

Ao professor **Steno Lacerda de Oliveira**, da Universidade Federal da Paraíba, pelo fornecimento dos extratos para a realização do trabalho.

Aos **professores do Curso de Farmácia da UFCG**, por terem compartilhado seus conhecimentos, pela dedicação, estímulo, apoio, ensinamentos e experiências transmitidos durante todo o curso.

A todos, muito obrigada!

"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes."

(Martin Luther King)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a bioatividade e/ou toxicidade de extratos e substâncias de *Erythroxyllum caatingae* e *Erythroxyllum revolutum*, visando sua utilização em estudos farmacológicos posteriores. Para isto, os testes de toxicidade foram realizados com o extrato metanólico da espécie *E. caatingae*, o extrato da fase aquosa básica de *E. caatingae* e o extrato de *Erythroxyllum revolutum*. Foi adotada a metodologia de Meyer e colaboradores (1982). A *Artemia salina* foi utilizada na forma de náuplios e cada concentração de extrato/substância foi testada em triplicata e repetida em pelo menos três experimentos. A concentração letal mediana (CL₅₀) foi analisada em regressão não-linear, com intervalo de confiança de 95%. Após a realização dos testes de toxicidade, observou-se que nos ensaios de *A. salina* em que se utilizou o extrato metanólico da espécie *E. caatingae* nas concentrações de 10, 20, 60, 120, 240, 480, 960 e 1920 µL, os resultados obtidos tiveram uma média de 0; 4,4; 8,8; 32,2; 56,6; 75,5; 83,3 e 98,9% de artemias mortas, respectivamente. Nos testes realizados com *A. salina* para o segundo extrato (fase aquosa básica da espécie *E. caatingae*), observou-se que as concentrações 60, 120, 240, 480, 960, 1920 e 3840 µL tiveram uma média de 0; 2,2; 5,5; 28,8; 35,5; 82,2 e 98,8% de artemias mortas, respectivamente. Nos ensaios de *A. salina* realizado com o extrato de *Erythroxyllum revolutum*, nas concentrações de 30, 60, 120, 240, 480, 960, 1920 e 3840 µL, os resultados obtidos tiveram uma média de 0; 3,3; 12,2; 34,4; 73,3; 83,3; 95,5 e 100% de artemias mortas. Os valores da CL₅₀ para os extratos metanólico e da fase aquosa da espécie *E. caatingae* e para o extrato bruto de *Erythroxyllum revolutum* foram de 203,7 (190,1 - 218,2) µg/mL, 1.074,0 (949,6 - 1.214,0) µg/mL e 308,1 (241,1 - 393,6) µg/mL, respectivamente. Dessa forma, conclui-se que existe uma dose tóxica do extrato *E.caatingae* e do *E. revolutum* para as *A. salinas*, bem como, uma relação diretamente proporcional entre a concentração do extrato e o índice de mortalidade das artemias. O extrato metanólico da espécie *E. caatingae* apresentou-se mais tóxico comparado ao extrato da fase aquosa desta espécie.

Palavras-chave: Artemia; Toxicidade; Erythroxyllaceae.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the bioactivity and / or toxicity of substances and extracts of *Erythroxylum caatingae* and *Erythroxylum revolutum*, for their use in subsequent pharmacological studies. For this, the toxicity tests were conducted with the methanol extract of the species *E. caatingae*, extract the basic aqueous phase *E. caatingae* and extract *Erythroxylum revolutum*. The method of Meyer et al (1982) was adopted. The *Artemia* was used as nauplii and concentration of each extract / substance was tested in triplicate and repeated at least three experiments. The median lethal concentration (LC50) was analyzed in non-linear regression, with a confidence interval of 95%. After completion of the toxicity tests, it was observed that in *A. salina* trials which used methanol extract of the *E. caatingae* at concentrations of 10, 20, 60, 120, 240, 480, 960 and 1920 μL , the results obtained had an average of 0; 4.4; 8.8; 32.2; 56.6; 75.5; 83.3 and 98.9% of dead artemias respectively. In tests conducted with the second to *A. salina* extract (aqueous basic phase of the *E. caatingae*), it was observed that concentrations 60, 120, 240, 480, 960, 1920, 3840 μL averaged 0; 2,2; 5,5; 28,8; 35,5; 82,2 and 98,8% of dead artemias respectively. In *A. salina* tests performed with the extract of *Erythroxylum revolutum*, at concentrations of 30, 60, 120, 240, 480, 960, 1920, 3840 μL , the results had an average of 0; 3,3; 12,2; 34,4; 73,3; 83,3; 95,5 and 100% of artemias dead. The LC50 value for methanol and aqueous phase species *E. caatingae* extracts and extract of *Erythroxylum revolutum* were 203.7 (190.1 to 218.2) mg / mL, 1,074.0 (949.6 - 1,214.0) / mL and 308,1 (241,1 - 393,6) $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively. Thus, it is concluded that there is a toxic dose of the extract *E.caatingae* and *E. revolutum* for saline A., as well as a directly proportional relationship between the concentration of the extract and the mortality rate of artemias. The methanol extract of the species *E. caatingae* presented more toxic compared to the aqueous extract of this species.

Keywords: Artemia; Toxicity; Erythroxylaceae.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>Artemia salina</i> Leach.....	20
Figura 2 - Principais constituintes do gênero <i>Erythroxyllum</i>	23
Figura 3 - Partes das folhas e flor de <i>Erythroxyllum caatingae</i> Plowman.....	24
Figura 4 - <i>Erythroxyllum revolutum</i>	26
Figura 5 - Incubadora com divisória contendo furos.....	29
Figura 6 - Parte recoberta do sistema contendo os cistos.....	31
Figura 7 - Incubadora sob exposição à luz.....	32

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - CL ₅₀ do extrato <i>Erythroxylum caatingae</i> - Fase aquosa.....	36
Gráfico 2 - CL ₅₀ do extrato <i>Erythroxylum caatingae</i> - Fase metanólica.....	37
Gráfico 3 - CL ₅₀ do extrato <i>Erythroxylum revolutum</i>	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados dos testes realizados com extrato metanólico da espécie <i>E. caatingae</i>	35
Tabela 2 - Resultados dos testes realizados com extrato fase aquosa da espécie <i>E. caatingae</i>	36
Tabela 3 - Resultados dos testes realizados com extrato da espécie <i>E. revolutum</i>	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
3.1 Bioatividade da planta.....	19
3.2 Ensaio com <i>Artemia salina</i>	20
3.3 Gênero <i>Erythroxylum</i>	22
3.3.1 <i>Erythroxylum caatingae</i>	23
3.3.2 <i>Erythroxylum revolutum</i>	25
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Local da pesquisa	28
4.2 <i>Artemia salina</i> Leach	28
4.3 Obtenção dos extratos e substâncias vegetais	28
4.4 Vidraria e acessórios.....	28
4.5 Aparato.....	29
4.5.1 <i>Incubadora</i>	29
5 METODOLOGIA.....	31
5.1 Análise estatística.....	33
6 RESULTADOS.....	35
6.1 Resultados obtidos com o extrato metanólico da espécie <i>E. caatingae</i>	35
6.2 Resultados obtidos com o extrato da espécie <i>E. caatingae</i> - Fase aquosa básica.....	37
6.3 Resultados obtidos com o extrato da espécie <i>Erythroxylum revolutum</i>	39
7 DISCUSSÃO	43
8 CONCLUSÃO.....	46
9 REFERÊNCIAS	

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais foram descobertas pelo homem por meio da procura por alimentos, e desde então, foram utilizadas empiricamente para o tratamento de patologias. Num primeiro momento, os medicamentos à base de plantas, em geral, eram utilizados oralmente na forma de pó, infusão (chá) ou decocto e, via tópica, na forma de preparações à base de água ou óleo para unguentos e cataplasmas (WAGNER; WISENAUER, 2006).

Desde a antiguidade, as plantas são utilizadas como fonte de medicamentos para o tratamento das enfermidades que acometem o homem, de modo a aumentar suas chances de sobrevivência através da melhoria da saúde (CARVALHO et al., 2010). A utilização de espécies vegetais com finalidade terapêutica para se prevenir, atenuar ou curar um estado patológico, é uma das mais antigas práticas aplicadas para fins medicinais (ROSSATO et al., 2012).

A natureza é a responsável pela produção da maioria das substâncias orgânicas conhecidas, sendo o reino vegetal responsável pela maior parcela da diversidade química conhecida e registrada na literatura. No século XIX, a química experimental permitiu a síntese laboratorial de novas substâncias orgânicas, desencadeando a produção acelerada de novos medicamentos. À medida que derivados mais puros e concentrados de plantas se tornavam disponíveis, priorizavam-se os fármacos sintéticos, passando-se a desconsiderar o papel importante dos extratos e substâncias de origem vegetal (VIEGA-JUNIOR, 2006).

Embora ocorra crescente consumo de produtos com síntese laboratorial, a utilização de medicamentos fitoterápicos tem aumentado consideravelmente nas últimas duas décadas, devido à sua fácil obtenção, baixo custo e grande tradição das plantas medicinais (FRANÇA et al., 2008).

Apesar da quantidade de plantas existentes no planeta, a maioria é desconhecida do ponto de vista científico, visto que apenas 5% foram estudadas fitoquimicamente, e uma porcentagem ainda menor foi avaliada sob os aspectos biológicos, incluindo o potencial farmacológico e toxicológico. Desta forma, este é um fator de incentivo ao estudo das plantas, visando sua utilização como fonte de recursos terapêuticos, uma vez que o reino vegetal representa um vasto celeiro de moléculas a serem descobertas (VEIGA-JÚNIOR, 2006).

A riqueza da diversidade vegetal brasileira contribuiu para que a utilização das plantas medicinais seja considerada uma área estratégica para o país, que contém cerca de 23% das espécies vegetais existentes em todo o planeta. Pesquisas demonstram que, no Brasil, mais de 90% da população já fez uso de alguma planta medicinal (BATALHA et al., 2007).

Devido à diversidade química estrutural de compostos bioativos obtidos de plantas, pesquisas são realizadas para uma melhor compreensão da aplicabilidade clínica das substâncias provenientes de produtos naturais (CHIWORORO, OJEWOLE, 2009).

A família Erythroxylaceae compreende aproximadamente 250 espécies distribuídas por apenas quatro gêneros: *Aneulophus*, *Nectaropetalum*, *Pinacopodium* e *Erythroxylum*. No Brasil, existem mais de 85 espécies do gênero *Erythroxylum*, entre elas *E.caatingae* e *E. revolutum* (OLIVEIRA, 2012; SANTOS et al., 2013; ZANOLARI et al., 2003). Os alcaloides tropânicos encontrados em algumas espécies vegetais destacam-se por desempenhar atividades farmacológicas como efeito analgésico, anestésico, anticolinérgico, antiemético, e anti-hipertensivo, entre outras atividades farmacológicas (GRYNKIEWICZ; GRADZIKOWSKA, 2008).

É importante ressaltar que existe uma necessidade constante de trabalhos que assegurem a utilização segura de extratos e substâncias de origem vegetal, já que produtos naturais também podem apresentar toxicidade relevante (HARVEY, 2007; PUPO, GALLO, 2007). Os estudos de toxicidade aguda, a exemplo da CL₅₀, que busca conhecer a concentração letal mediana, são reconhecidamente fundamentais nesse processo (OGA et al., 2008).

Para validação de plantas potencialmente terapêuticas são necessárias diversas investigações para estudar desde a relação medicina tradicional e popular; isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos; observação da estrutura/atividade e investigação farmacológica de extratos e/ou seus constituintes químicos isolados, até a operação de formulações para a produção de fitoterápicos (SANTOS et al., 2013).

Mediante a necessidade da realização de ensaios com procedimentos rápidos e simples utilizando espécies vegetais, pode-se ressaltar a importância de se buscar e avaliar compostos, assim como sua toxicidade, nas diversas ações farmacológicas. Isso implica em um desenvolvimento propício no estudo de plantas medicinais em meio aos seus efeitos farmacológicos, bem como suas ações toxicológicas, consistindo em um fator relevante no processo de desenvolvimento de novos fármacos de origem vegetal (HARVEY, 2007; PUPO, GALLO, 2007; SANTOS et al., 2013).

Diante do exposto, nota-se que existe uma necessidade de realizar estudos com o intuito de avaliar a bioatividade e/ou toxicidade de extratos e substâncias de *Erythroxylum caatingae* e *Erythroxylum revolutum*, visando sua utilização em estudos farmacológicos posteriores.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar a bioatividade e/ou toxicidade de extratos *Erythroxylum caatingae* e *Erythroxylum revolutum*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Contribuir para a avaliação da atividade biológica de *Erythroxylum caatingae* e *Erythroxylum revolutum*, visando sua utilização em estudos farmacológicos posteriores;
- Determinar a concentração letal 50% (CL₅₀) do extrato metanólico e do extrato da fase aquosa básica da espécie *Erythroxylum caatingae* como parâmetro de toxicidade, através do ensaio com *Artemia salina* Leach;
- Determinar a concentração letal 50% (CL₅₀) do extrato bruto da espécie *Erythroxylum revolutum* como parâmetro de toxicidade, através do ensaio com *Artemia salina* Leach.

FUNDAMENTAÇÃO
TEÓRICA

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 BIOATIVIDADE DE PLANTAS

Toda planta que possui alguma ação sobre outros seres vivos e cujo efeito pode se manifestar tanto pela sua presença em um ambiente quanto pelo uso direto de substâncias dela extraída, desde que mediante uma intenção ou consciência humana deste efeito, é considerada bioativa. De acordo com esse conceito, enquadram-se as plantas medicinais, as aromáticas, as condimentares, as inseticidas, os repelentes, as tóxicas e os alimentos funcionais/nutracêuticos (SCHIEDECK, 2006).

Plantas bioativas contém um ou mais princípio(s) ativo(s) que lhe conferem atividade terapêutica. Caso os princípios ativos não sejam conhecidos e, ainda assim, a planta apresente atividade medicinal satisfatória, ela pode ser utilizada desde que não apresente efeito tóxico. O conceito errôneo de que as plantas são medicamentos naturais e, portanto, livre de riscos e efeitos colaterais deve ser reavaliado. Assim como as plantas podem representar medicamentos poderosos e eficazes, o risco de intoxicação causado pelo uso indevido deve ser sempre levado em consideração (LORENZI; MATOS, 2011).

Diversas espécies de plantas bioativas de conhecido uso popular apresentam propriedades tóxicas, portanto deve-se ter cuidado na identificação correta das espécies no ato da aquisição e nas dosagens, para evitar riscos à saúde (AZEVEDO; MOURA, 2010).

De acordo com a toxicologia, toda substância pode ser considerada um agente tóxico, dependendo das condições de exposição, como a dose administrada ou absorvida, tempo e frequência de exposição (dose única ou múltipla) e via pela qual é administrada. A toxicidade de uma substância a um organismo vivo pode ser considerada como a capacidade de lhe causar algum desequilíbrio, um dano grave ou morte (BRANCO, 2009).

Os estudos de toxicidade aguda buscam conhecer a concentração ou dose letal mediana (CL₅₀ ou DL₅₀, respectivamente), ou seja, dose ou concentração capaz de causar mortalidade em 50% dos organismos em estudo. Entretanto, este parâmetro vem sofrendo várias críticas por alguns fatores, como, por exemplo, o alto número de animais usados e pelo fato do evento morte ser o pior de todos os efeitos tóxicos (OLIVI; ESPINDOLA, 2008).

A CL₅₀ é definida como a concentração de uma substância que causa a mortalidade de 50% de um grupo de organismos num determinado tempo de exposição, geralmente de 24 a 96 horas. O teste de CL₅₀ fornece informações rápidas sobre os efeitos da toxicidade de uma determinada substância em uma dada espécie e tem sido utilizado de forma intensa na

avaliação da qualidade da água e dos impactos ambientais (OLIVI; ESPINDOLA, 2008).

A letalidade de organismos simples tem sido utilizada para um rápido e relativamente simples monitoramento da resposta biológica, no qual existe apenas um parâmetro envolvido: morte ou vida. O ensaio de letalidade permite a avaliação da toxicidade geral e, portanto, é considerado importante como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica. Um dos animais que tem sido utilizado nesses bioensaios é uma espécie de crustáceo marinho, *Artemia salina* Leach. (CASTELLO, 2009).

3.2 ENSAIO COM ARTEMIA SALINA

Artemia salina, Crustacea ou Anostraca (Figura 1) é um microcrustáceo marinho, de tamanho e colorações variadas, que vão do rosa-pálido a avermelhado, branco ou esverdeado dependendo do seu tipo de alimentação; apresenta dimorfismo sexual e atinge a fase adulta em 20 dias (NASCIMENTO et al., 2008).

Figura 1. *Artemia salina* Leach



Fonte: <http://www.naturephoto-cz.com/brine-shrimp-photo-14579.html>

Dependendo dos diferentes parâmetros fisiológicos e bioquímicos do ambiente, as populações de *Artemia* se reproduzem sexualmente ou partenogeneticamente, libertando náuplios ou cistos. Esta espécie está adaptada a grandes mudanças ambientais, como variações abruptas de salinidade, de temperatura e de oxigênio dissolvido. Apresentam-se como excelente dieta alimentar para peixes e crustáceos no ambiente natural, devido a isso preferem habitar locais com difícil sobrevivência para outras espécies, como salinas que atingem temperaturas até 40°C e salinidade até 300 partes por mil, pois são menos predadas.

A *Artemia* é rica em proteínas, vitaminas (caroteno) e sais minerais, por isso é utilizada em larga escala em cultivo de camarões e peixes na fase larval, acelerando o crescimento dos animais, recuperando os indivíduos doentes, deixando-os mais sadios (NASCIMENTO et al., 2008).

Seu ciclo de vida tem início com a eclosão de cistos dormentes, os quais são embriões encapsulados metabolicamente inativos. Estes cistos podem ficar em estado de dormência por muitos anos, desde que fiquem em lugar seco, já que em contato com água salgada hidratam-se e reassumem seu desenvolvimento (BORTOLOTTI, 2007).

A *Artemia salina* é considerada um bom indicador de toxicidade devido ao seu reduzido e específico grau de tolerância a um determinado fator ambiental, de modo que apresente uma resposta nítida face a pequenas variações na qualidade do ambiente. Tem sido utilizada em testes de toxicidade devido à sua capacidade para formar cistos dormentes, fornecendo, desse modo, material biológico que pode ser armazenado durante longos períodos de tempo (superiores a seis meses) sem perda de viabilidade e sem necessidade de se manter culturas contínuas de organismos-teste, além de ser uma espécie de fácil manipulação (RUIZ et al., 2005).

O bioensaio utilizando suas larvas na forma de náuplios (Brine Shrimp Test – BST) é bastante utilizado, devido à simplicidade com que pode ser manuseado, a rapidez dos ensaios e o baixo custo favorece a sua utilização rotineira em diversos estudos, além do que, tais ensaios de letalidade são muito utilizados em análises preliminares de toxicidade geral. Além disso, o bioensaio com *A. salina* tem sido amplamente utilizado em laboratórios de pesquisa para determinação da toxicidade de extratos, frações e compostos isolados de plantas, uma vez que ele se apresenta como um método alternativo para a determinação da toxicidade considerando o alto custo e o sofrimento causado aos animais experimentais durante testes *in vivo* utilizando roedores (NASCIMENTO et al., 2008).

Os bioensaios podem ser utilizados para medir a atividade farmacológica de substâncias novas ou quimicamente indefinidas; medir a concentração de substâncias conhecidas; investigar a função de mediadores endógenos; avaliar a eficiência clínica de uma forma de tratamento ou ainda medir a toxicidade de uma substância e representam a primeira etapa de seleção de substâncias biologicamente ativas para testes mais elaborados *in vitro* e *in vivo*. E é definido como a estimativa da concentração ou potência de uma substância através da medida de uma resposta biológica produzida, servindo também como método de triagem para o posterior estudo fitoquímico de plantas medicinais (PEREIRA, 2006).

É importante ressaltar a importância de se avaliar o potencial tóxico de produtos

vegetais, principalmente através de ensaios biológicos simples, de modo a proporcionar resultados rápidos e confiáveis (LUNA et al., 2005).

3.3 GÊNERO *Erythroxylum*

A família Erythroxylaceae compreende quatro gêneros e cerca 240 espécies com distribuição pantropical, tendo seus principais centros de diversidade e endemismo na Venezuela, Brasil e Madagascar. A maioria das espécies pertence ao gênero *Erythroxylum* *P.Browne*, que apresenta distribuição ampla encontrado nos quatro continentes, principalmente na América tropical (OLIVEIRA, 2011).

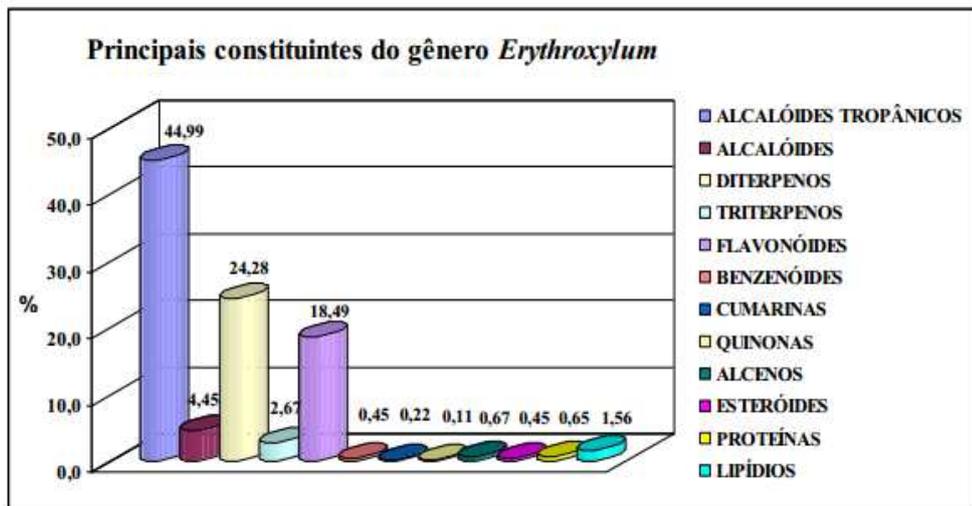
O gênero *Erythroxylum* é o mais estudado. Este é quimicamente caracterizado pela presença, em grande quantidade, de alcalóides tropânicos e, em menor proporção, de alcalóides pirrolidínicos. Dentre os alcalóides tropânicos, destaca-se a cocaína, um alcaloide natural produzido por *E. coca*, que foi empregado como anestésico local em pequenas cirurgias (LOIOLA, 2007; ZUANAZZI, 2001).

Com cerca de 230 espécies, é o único representado na região Neotropical, onde aproximadamente 187 espécies são exclusivas, tendo como principal centro de diversidade e endemismo a América do Sul, especialmente o Brasil e a Venezuela. Nesses locais, são utilizadas em práticas etnomedicinais, apresentando propriedades antiinflamatória, antibacteriana, tônica e estimulante para o fígado, afecções renais e vesiculares. Além disso, é usado como um poderoso diurético e no tratamento de doenças venéreas, distúrbios musculares e respiratórios, tais como bronquite, pneumonia, tuberculose e asma (PLOWMAN; HENSOLD, 2004).

Mesmo com o potencial confirmado, esse gênero tem sido pouco investigado e pesquisado. A literatura científica já quantifica mais de 250 espécies do gênero *Erythroxylum* registradas, entretanto menos de 70 dessas espécies foram estudadas pela ciência. As populares cocas, a cocaína e suas variedades são as mais conhecidas e estudadas devido à presença de alcalóides em suas folhas (GARCIA et al., 2005).

O levantamento bibliográfico realizado no NAPRALERT (Natural Products ALERT, banco de dados da Universidade de Illinois) mostrou que das 230 espécies existentes no gênero *Erythroxylum*, apenas 61 tiveram sua composição química estudada, resultando no isolamento e caracterização de 449 compostos. As classes de maior ocorrência no gênero são os alcalóides tropânicos, terpenóides e flavonóides (Figura 2).

Figura 2. Principais constituintes do gênero *Erythroxylum*



Fonte: http://www.livrosgratis.com.br/arquivos_livros/cp100736.pdf

De acordo com Zuanazzi et al. (2001), o interesse pelo gênero intensificou-se no século XIX, após a descoberta das atividades farmacológicas apresentadas pelas folhas de *Erythroxylum coca* Lam., que secularmente eram empregadas pelos indígenas da região andina da América do Sul. Quimicamente, o gênero caracteriza-se pela presença de alcalóides do grupo tropano, dentre os quais destaca-se a cocaína, um alcalóide natural produzido por *E. coca*, que foi empregado como anestésico local em pequenas cirurgias (ALAGILLE et al., 2005).

Da *Erythroxylum coca* é extraído a cocaína, seu mecanismo de ação no sistema nervoso central é muito semelhante ao das anfetaminas, mas a cocaína atua ainda sobre um terceiro neurotransmissor, a serotonina, além de atuar na noradrenalina e na dopamina. A cocaína apresenta, também, propriedades de anestésico local que independe de sua atuação no cérebro. Essa era, no passado, uma das indicações de uso médico da substância, hoje obsoleto (OLIVEIRA, 2011).

3.3.1 *Erythroxylum caatingae*

A *Erythroxylum caatingae*, popularmente conhecida como Fruta-de-pombo ou rompegibão (Figura 3), possui distribuição restrita ao Nordeste do Brasil, sendo registrada nos

estados da Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte (PLOWMAN; HENSOLD, 2004).

As características botânicas da *Erythroxylum caatingae* são a presença de arbusto e/ou arvoretas medindo até 3,0 metros de altura, com ramos jovens não patentes, castanho-avermelhados e com poucas lenticelas, e ramos maduros enegrecidos, com maior densidade de lenticelas. Sua folha é discolor, com pecíolo de 6-8 mm de comprimento, cilíndricos, pouco maiores que as estípulas. A lâmina possui cerca de 31-57×21-25 mm, é membranácea, quando jovem, e cartácea na maturidade, obovada a oblonga, com ápice arredondado a retuso, base cuneada e margem plana. As flores possuem 4,0-6,0 mm de comprimento, sendo pediceladas. Os lobos do cálice apresentam cerca de 1,0-1,5×0,9-1,0 mm, triangulares. A pétala possui 1,7-2,2 mm de comprimento, é esbranquiçada e ovada, com tubo estaminal de 0,9-1,2 mm de comprimento, menor que os lobos do cálice. Tais características morfológicas são importantes para a identificação minuciosa da espécie, e a partir disso, as possíveis investigações bioquímicas e farmacológicas são conduzidas (LOIOLA, et al., 2007).

Figura 3. Partes das folhas e flor de *Erythroxylum caatingae* Plowman



Fonte: http://www.cpgrnsa.univasf.edu.br/uploads/7/8/9/0/7890742/dissertao_completa_-_verso_final.pdf

Quanto a sua atividade bioativa, recentemente foi observado que o extrato bruto da folha de *Erythroxylum caatingae*, assim como o alcaloide obtido deste vegetal apresentou atividade antimicrobiana e antitumoral (AGUIAR et al., 2012). Além disso, o extrato bruto de *Erythroxylum caatingae* desencadeou relaxamento da musculatura lisa de útero e traqueia de

roedores (SANTOS et al., 2013; SILVA et al., 2010). Tais resultados ratificaram a potencial aplicabilidade de vegetais do gênero *Erythroxylum* no tratamento de doenças venéreas, amenorreia e hemorragias genitais e afecções respiratórias (GONZÁLEZ-GUEVARA et al., 2006; SILVA et al., 2001).

O estudo realizado Santos et al. (2013) investigou a ação do extrato metanólico obtido das partes aéreas das espécies *E. caatingae*, *E. subrotundum* e *E. revolutum* em músculo liso isolado de traquéia de cobaia.

Aguiar et al. (2012) mostrou que o extrato metanólico do caule de *E. caatingae* e todas as frações testadas, com exceção da fração hexânica, apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e fungos.

Outro estudo realizado por Oliveira et al. (2011) avaliou as atividades citotóxicas do extrato metanólico do caule de *E. caatingae* frente a uma linhagem de células de cancro humanas (HEp-2, NCI-H292 e KB), bem como o efeito antitumoral do extrato metanólico frente a células tumorais de sarcoma, em ratos.

3.3.2 *Erythroxylum revolutum*

A *Erythroxylum revolutum*, popularmente conhecida como Fruta-de-pombo, Fruta-de-Juriti ou Araçá-brabo, é uma espécie exclusiva do Brasil, com distribuição restrita à região Nordeste, sendo encontrada em áreas do semi-árido (caatinga) nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Pernambuco, Piauí e Sergipe. Na Paraíba, a *E. revolutum* está registrada em apenas duas coletas em áreas de caatinga, constituindo-se em uma nova citação para o estado (LOIOLA et al., 2007).

As características botânicas da *E. revolutum* (Figura 4) são a presença de arbusto e/ou arvoreta medindo 0,8-3 metros de altura, com ramos não patentes, estriados longitudinalmente, cinéreos, densamente revestidos por lenticelas amareladas ou alvas, elípticas. Sua pétala mede cerca de 3,0-4,0×1,2-1,5 mm, é amarelada a branca, oblonga e côncava. O tubo estaminal possui 1,0–1,2×1,2–1,5 mm, e é do mesmo tamanho ou menor que os lobos do cálice. Suas flores brevistilas possuem estames de 3,0–3,5 mm de comprimento, com anteras elípticas de 0,6-0,7×0,4-0,5 mm e estiletes livres de 1,2-2,0 mm. Suas flores são longistilas, com estames opositissépalos de 1,9-2,1 mm comprimento, com alternissépalos de 2,6-3,1 mm, anteras elípticas de 0,4-0,5× 0,4–0,5 mm, ovário obovóide medindo de 1,2-1,4×1,0-1,2 mm, estiletes livres com 5,0-6,0 mm. (LOIOLA, et al., 2007).

Figura 4. *Erythroxylum revolutum*



Fonte: http://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?enlarge=0000+0000+0404+0392

Em um estudo com da fase hexânica de *Erythroxylum revolutum* foram isolados seis diterpenos: ent-cauran-16-eno, 13-hidroxi-8(17),14-labdadieno (Manool), ent-caur-16-en-3 β -ol, 3-oxo-13-hidroxi- 8(17),14-labdadieno, 3,13,19-trihidroxi-8(17),14-labdadieno e ent-cauran-16 β , 17-diol. O isolamento e identificação destes compostos contribuem para os conhecimentos da quimiotaxonomia do gênero *Erythroxylum* (OLIVEIRA, 2012).

Estudos que envolvem a avaliação da bioatividade/toxicidade de espécies vegetais contribuem na apresentação das propriedades de plantas consideradas medicinais, bem como, na formação de recursos humanos para a comunidade científica e a população em geral, justificando o desenvolvimento de trabalhos como este.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DA PESQUISA

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande – Campus Cuité.

4.2 *Artemia salina* Leach

Os cistos de *Artemia salina* foram provenientes do Laboratório de Ensaio Toxicológicos (LABETOX) da Universidade Federal da Paraíba. Esses foram armazenados sob refrigeração a 5° C até a execução dos experimentos.

As larvas de *Artemia salina* foram utilizadas na forma de náuplio para determinação da Concentração Letal Média (CL₅₀) como parâmetro de avaliação da atividade toxicológica (LOPES et al., 2002).

4.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS VEGETAIS

Os extratos de *Erythroxylum caatingae* e *Erythroxylum revolutum* foram obtidos e cordialmente cedidos pelo Prof. Steno Lacerda de Oliveira do Laboratório de Farmacognosia da Unidade Acadêmica de Saúde - CES/UFCG.

4.4 VIDRARIA E ACESSÓRIOS

- ✓ Balão volumétrico de 1 L;
- ✓ Balões volumétricos de 5 mL;
- ✓ Bastão de vidro;
- ✓ Béquers de 250 mL;
- ✓ Espátulas;
- ✓ Funil;
- ✓ Galeria para tubos de ensaio;
- ✓ Luminária com lâmpada de 40W;
- ✓ Pipetas volumétricas (2 - 1000 µL);

- ✓ Pipetas de Pasteur com pêsca;
- ✓ Tubos de ensaio de 10 mL;
- ✓ Vidro de relógio.

4.5 APARATO

4.5.1 Incubadora

A incubadora para eclosão dos cistos de *Artemia salina* consistiu de um recipiente retangular de vidro com uma divisória contendo furos de aproximadamente 0,02 cm de espessura, distribuídos uniformemente (Figura 5).

Figura 5. Incubadora com divisória contendo furos



Fonte: Arquivo do autor

METODOLOGIA

5 METODOLOGIA

O bioensaio com *A. salina* é baseado na técnica descrita por Meyer e colaboradores (1982). Após a escolha e preparação do extrato, procedeu-se a implantação e padronização da metodologia com *A. salina* no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande – Campus Cuité.

Os testes de toxicidade foram realizados com três tipos de extratos. Primeiramente, foi utilizado o extrato metanólico da espécie *E. caatingae*. De início, preparou-se a solução salina oriunda da solubilização de 19,5g de sal marinho (Marinex®) em 0,5 litros de água destilada, e, em seguida, mediu-se o pH da solução utilizando um pHmetro digital, obtendo uma solução com pH dentro da faixa limite ideal para eclosão dos cistos, compreendido entre 8,0 à 8,5. Dessa forma, foi realizado o ensaio e, posteriormente, os cistos de *A. salina* foram colocados na incubadora, junto com a solução salina, em um dos lados do recipiente. A parte do sistema contendo os cistos foi recoberta com papel alumínio, para que as larvas, após a eclosão dos cistos, fossem atraídas pela luz do outro lado do sistema, forçando-as a atravessar à divisória (Figura 6).

Figura 6. Parte recoberta do sistema contendo os cistos



Fonte: Arquivo do autor

Após 24 horas, em temperaturas compreendidas entre 22° C – 29° C e sob iluminação de uma lâmpada incandescente (40 W), os cistos eclodiram (Figura 7). Em um béquer mediu-se 0,02 g do extrato metanólico da *E. caatingae*, que foi dissolvido em 20 µL de Cremofor®,

(solvente) e 5 mL da solução salina, obtendo-se a solução mãe. Onde sua concentração utilizada foi de 0,004 g/mL, obtida através da $C = m/v$, onde, $C = 0,02g / 0,02 + 5$. Em seguida, em tubos de ensaio, foram adicionados 10, 20, 60, 120, 240, 480, 960 e 1920 μL da solução mãe e 5 mL da solução salina. Em cada tubo foi adicionado 10 artemias que foram coletadas com auxílio de uma pipeta de Pasteur. Cada concentração foi testada em triplicata e repetida em pelo menos três experimentos.

Figura 7. Incubadora sob exposição à luz



Fonte: Arquivo do autor

O conjunto permaneceu em incubação sob luz artificial por 24h e, posteriormente, foi realizada a contagem do número de larvas vivas e mortas, para determinação da CL_{50} (concentração que produz 50 % de letalidade).

O segundo extrato utilizado foi a fase aquosa básica da espécie *E. caatingae*. Seu emprego seguiu as mesmas etapas listadas para o primeiro extrato, entretanto não houve necessidade de dissolvê-lo em Cremofor[®], devido à sua fácil solubilização com a solução salina (água destilada + sal marinho). Além disso, as concentrações da solução mãe adicionadas aos tubos de ensaio foram 60, 120, 240, 480, 960, 1920 e 3840 μL .

O terceiro extrato utilizado foi o *Erythroxylum revolutum*, que também seguiu as

mesmas etapas listadas para os outros extratos. Como o extrato metanólico *E. caatingae*, houve a necessidade de dissolvê-lo em 20 μL de Cremofor[®], (solvente), para ser obtida a solução mãe. As concentrações da solução mãe adicionadas aos tubos de ensaio foram 30, 60, 120, 240, 480, 960, 1920 e 3840 μL .

5.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores de CL_{50} foram calculados através da expressão dos resultados como uma porcentagem dos controles, e determinados graficamente a partir das curvas concentração-resposta por regressão não-linear com intervalo de confiança de 95%, utilizando-se o programa “Graph Pad Prism” 4.04.

RESULTADOS

6 RESULTADOS

6.1 Resultados obtidos com o extrato metanólico da espécie *E. caatingae*

Após a conversão da concentração do extrato metanólico da espécie *E. caatingae*, obteve-se as concentrações de 8, 16, 48, 96, 192, 384, 768, 1536 $\mu\text{g/ mL}$, como é descrito abaixo:

$$1- C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$0,004 \text{ g/mL} \times 10 \mu\text{g} = C_2 \times 5 \text{ mL}$$

$$C_2 = 8 \mu\text{g/ mL}$$

$$2- C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$0,004 \text{ g/mL} \times 20 \mu\text{g} = C_2 \times 5 \text{ mL}$$

$$C_2 = 16 \mu\text{g/ mL}$$

$$3- C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$0,004 \text{ g/mL} \times 60 \mu\text{g} = C_2 \times 5 \text{ mL}$$

$$C_2 = 48 \mu\text{g/ mL}$$

$$4- C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$0,004 \text{ g/mL} \times 120 \mu\text{g} = C_2 \times 5 \text{ mL}$$

$$C_2 = 96 \mu\text{g/ mL}$$

$$5- C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$0,004 \text{ g/mL} \times 240 \mu\text{g} = C_2 \times 5 \text{ mL}$$

$$C_2 = 192 \mu\text{g/ mL}$$

$$6- C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$0,004 \text{ g/mL} \times 480 \mu\text{g} = C_2 \times 5 \text{ mL}$$

$$C_2 = 384 \mu\text{g/ mL}$$

$$7- C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$0,004 \text{ g/mL} \times 960 \text{ } \mu\text{g} = C2 \times 5 \text{ mL}$$

$$C2 = 768 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$8- C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$0,004 \text{ g/mL} \times 1920 \text{ } \mu\text{g} = C2 \times 5 \text{ mL}$$

$$C2 = 1536 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Observou-se que nos ensaios de *A. salina* em que se utilizou o extrato metanólico da espécie *E. caatingae* os resultados obtidos tiveram uma média de de 0; 4,4; 8,8; 32,2; 56,6; 75,5; 83,3 e 98,9% de artemias mortas, respectivamente, como mostra a Tabela 1, representada abaixo:

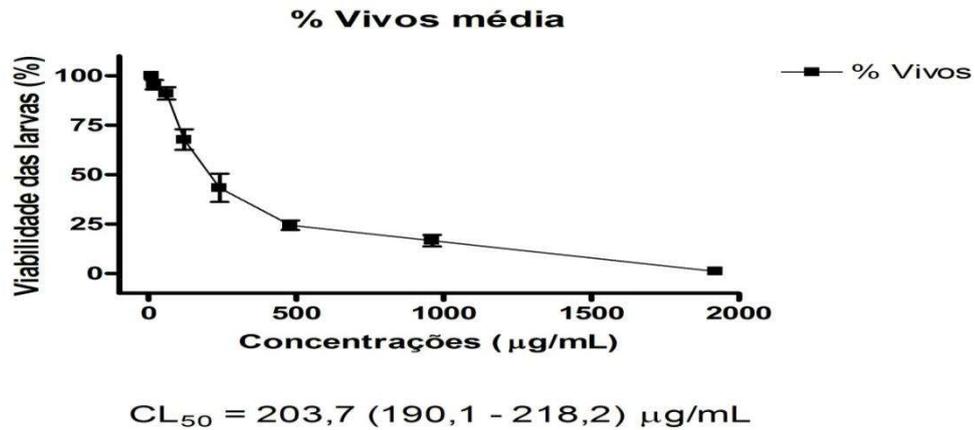
Tabela 1 - Resultados dos testes realizados com extrato metanólico da espécie *E. caatingae*

CONCENTRAÇÕES	Artemias	Artemias	% de Art.	% de Art.
	vivas	mortas	vivas	Mortas
Controle	450	0	100%	0%
8 $\mu\text{g/mL}$	90	0	100%	0%
16 $\mu\text{g/mL}$	86	4	95,55 %	4,44 %
48 $\mu\text{g/mL}$	82	8	91,11 %	8,88 %
96 $\mu\text{g/mL}$	61	29	67,77 %	32,22 %
192 $\mu\text{g/mL}$	39	51	43,33 %	56,66 %
384 $\mu\text{g/mL}$	22	68	24,44 %	75,55 %
768 $\mu\text{g/mL}$	15	75	16,66 %	83,33 %
1536 $\mu\text{g/mL}$	1	89	1,11 %	98,98 %

O valor de CL_{50} foi calculado através da expressão dos resultados como uma porcentagem dos controles, e determinado graficamente a partir da curva de concentração-resposta por regressão não-linear com intervalo de confiança de 95%.

O valor da CL_{50} do extrato metanólico da espécie *E. caatingae* foi de 203,7 (190,1 - 218,2) $\mu\text{g/mL}$, como representado no Gráfico 1.

Gráfico 1- CL₅₀ do extrato *Erythroxyllum caatingae* - Fase metanólica



6.2 Resultados obtidos com o extrato da espécie *E. caatingae* - Fase aquosa básica

Nos testes realizados com *A. salina* para o segundo extrato (fase aquosa básica da espécie *E. caatingae*), após a conversão da concentração do extrato, obteve-se as concentrações de 48, 96, 192, 384, 768, 1536, 3072 µg/ mL, como mostra abaixo:

$$1- C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$0,004 \text{ g/mL} \times 60 \text{ } \mu\text{g} = C2 \times 5 \text{ mL}$$

$$C2 = 48 \text{ } \mu\text{g/ mL}$$

$$2- C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$0,004 \text{ g/mL} \times 120 \text{ } \mu\text{g} = C2 \times 5 \text{ mL}$$

$$C2 = 96 \text{ } \mu\text{g/ mL}$$

$$3- C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$0,004 \text{ g/mL} \times 240 \text{ } \mu\text{g} = C2 \times 5 \text{ mL}$$

$$C2 = 192 \text{ } \mu\text{g/ mL}$$

$$4- C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$0,004 \text{ g/mL} \times 480 \text{ } \mu\text{g} = C2 \times 5 \text{ mL}$$

$$C2 = 384 \text{ } \mu\text{g/ mL}$$

$$5- C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$0,004 \text{ g/mL} \times 960 \mu\text{g} = C2 \times 5 \text{ mL}$$

$$C2 = 768 \mu\text{g/mL}$$

$$6- C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$0,004 \text{ g/mL} \times 1920 \mu\text{g} = C2 \times 5 \text{ mL}$$

$$C2 = 1536 \mu\text{g/mL}$$

$$7- C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$0,004 \text{ g/mL} \times 3840 \mu\text{g} = C2 \times 5 \text{ mL}$$

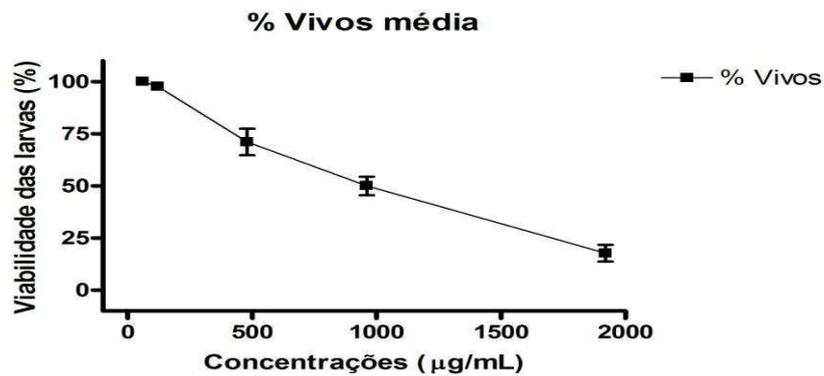
$$C2 = 3072 \mu\text{g/mL}$$

Os resultados obtidos tiveram uma média de 0; 2,2; 5,5; 28,8; 35,5; 82,2 e 98,8% de artemais mortas, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados dos testes realizados com extrato da fase aquosa da espécie *E. caatingae*

CONCENTRAÇÕES	Artemias vivas	Artemias mortas	% de Art. vivas	% de Art. mortas
CONTROLE	630	0	100%	0 %
48 µg/mL	90	0	100%	0%
96 µg/mL	88	2	97,77%	2, 23%
192 µg/mL	85	5	94,44%	5,56%
384 µg/mL	64	26	71,11%	28,89%
768 µg/mL	58	32	64,44%	35,56%
1536 µg/mL	16	74	17,77%	82,23%
3072 µg/mL	1	89	1,11%	98,89%

O valor da CL_{50} do extrato fase aquosa da espécie *E. caatingae* foi de 1.074,0 (949,6 - 1.214,0) µg/mL, como mostra o Gráfico 2.

Gráfico 2 - CL₅₀ do extrato *Erythroxylum caatingae* - Fase aquosa

CL₅₀ = 1.074,0 (949,6 - 1.214,0) µg/mL

6.3 Resultados obtidos com o extrato de *Erythroxylum revolutum*

Nos ensaios de A. salina realizado com o extrato bruto de *Erythroxylum revolutum*, utilizou as concentrações, após a conversão da concentração do extrato, obteve-se as concentrações de 24, 48, 96, 192, 384, 768, 1536, 3072 µg/ mL, como mostra abaixo:

$$1- C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$0,004 \text{ g/mL} \times 30 \text{ } \mu\text{g} = C2 \times 5 \text{ mL}$$

$$C2 = 24 \text{ } \mu\text{g/ mL}$$

$$2- C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$0,004 \text{ g/mL} \times 60 \text{ } \mu\text{g} = C2 \times 5 \text{ mL}$$

$$C2 = 48 \text{ } \mu\text{g/ mL}$$

$$3- C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$0,004 \text{ g/mL} \times 120 \text{ } \mu\text{g} = C2 \times 5 \text{ mL}$$

$$C2 = 96 \text{ } \mu\text{g/ mL}$$

$$4- C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$0,004 \text{ g/mL} \times 240 \text{ } \mu\text{g} = C2 \times 5 \text{ mL}$$

$$C2 = 192 \text{ } \mu\text{g/ mL}$$

$$5- C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$0,004 \text{ g/mL} \times 480 \mu\text{g} = C2 \times 5 \text{ mL}$$

$$C2 = 384 \mu\text{g/mL}$$

$$6- C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$0,004 \text{ g/mL} \times 960 \mu\text{g} = C2 \times 5 \text{ mL}$$

$$C2 = 768 \mu\text{g/mL}$$

$$7- C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$0,004 \text{ g/mL} \times 1920 \mu\text{g} = C2 \times 5 \text{ mL}$$

$$C2 = 1536 \mu\text{g/mL}$$

$$8- C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$0,004 \text{ g/mL} \times 3840 \mu\text{g} = C2 \times 5 \text{ mL}$$

$$C2 = 3072 \mu\text{g/mL}$$

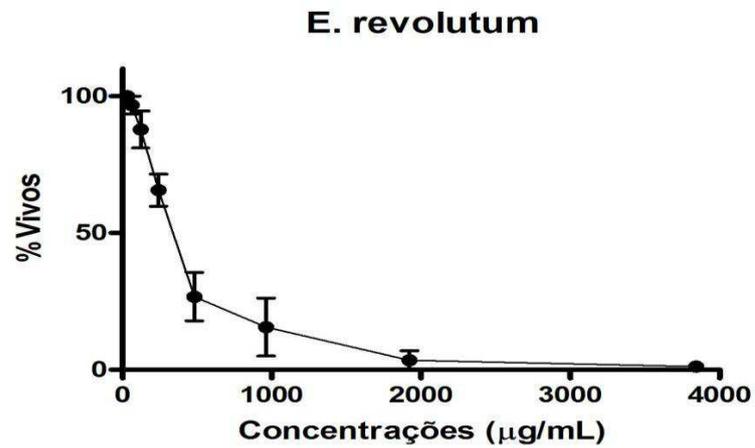
Os resultados obtidos tiveram uma média de 0; 3,3; 12,2; 34,4; 73,3; 83,3; 95,5 e 100% de artemias mortas, respectivamente, como mostra a Tabela 3 abaixo.

Tabela 3- Resultados dos testes realizados com o extrato bruto *Erythroxyllum revolutum*

CONCENTRAÇÕES	Artemias	Artemias	% de Art.	% de
	vivas	mortas	vivas	Art. mortas
CONTROLE	630	0	100%	0 %
24 µg/mL	90	0	100%	0%
48 µg/mL	87	3	96,66%	3,34%
96 µg/mL	79	11	87,77%	12,22%
192 µg/mL	59	31	65,55%	34,44%
384 µg/mL	24	66	26,67%	73,33%
768 µg/mL	15	75	16,66%	83,33%
1536 µg/mL	4	86	4,44%	95,55%
3072 µg/mL	0	90	0%	100%

O valor da CL_{50} do extrato bruto *Erythroxyllum revolutum* foi de 308,1 (241,1 - 393,6) $\mu\text{g/mL}$, como mostra o Gráfico 3.

Gráfico 3 - CL_{50} do extrato bruto *Erythroxyllum revolutum*



$CL_{50} = 308,1 (241,1 - 393,6) \mu\text{g/mL}$

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

Apesar de haver registros recentes sobre o potencial terapêutico de plantas pertencentes ao gênero *Erythroxylum*, não existem, na literatura, estudos utilizando bioensaios com *Artemia salinas* empregando os extratos *E. caatingae* e *E. revolutum* para determinação da CL₅₀ (AGUIAR et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2011; SANTOS et al., 2013).

As plantas medicinais são utilizadas como recurso terapêutico desde os primórdios da humanidade. Em muitos países, os produtos de origem vegetal são uma das poucas formas que a população dispõe para tratar suas enfermidades (CARVALHO et al., 2010; FRANÇA et al., 2008; ROSSATO et al., 2012).

Apesar da grande diversidade de plantas existentes no Brasil, a maioria ainda é desconhecida fitoquimicamente e poucas foram avaliadas sob os aspectos biológicos. Dessa forma, avaliar a bioatividade/toxicidade de espécies vegetais, na perspectiva de apresentar a comunidade científica e a população em geral, as propriedades de plantas consideradas medicinais, mostra-se como uma ferramenta fundamental no estudo da Fitoterapia (CHIWORORO, OJEWOLE, 2009; HARVEY, 2007; PUPO, GALLO, 2007; VEIGA-JÚNIOR, 2005).

O gênero *Erythroxylum* é um dos mais estudados por possui constituintes químicos com amplo espectro de atividade farmacológica, em algumas de suas espécies (GARCIA, 2005; GRYNKIEWICZ, GRADZIKOWSKA, 2008; LOIOLA, 2007; PLOWMAN, HENSOLD, 2004; ZUANAZZI, 2001).

No presente estudo, utilizamos bioensaios com *Artemia salina* Leach para determinação da toxicidade de extratos de *Erythroxylum caatingae* e *Erythroxylum revolutum*. É consenso na literatura que uma forma de complementar os estudos fitoquímicos é associá-los a bioensaios simples, no intuito de selecionar e monitorar a pesquisa de extratos de plantas na procura de plantas bioativas (BAROSA et al., 2003; CASTELLO-BRANCO, 2009; LUNA et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2008; PARRA et al., 2001).

Em conformidade com a literatura, a determinação da CL₅₀, que foi realizada neste trabalho por meio do uso de metanúplios de *Artemia salina* Leach, fornece um indicativo do nível de toxicidade de uma determinada substância. As curvas de toxicidade obtidas apresentaram o comportamento sigmóide típico das curvas “dose – resposta” (Concentração - Viabilidade das larvas), permitindo o ajuste das mesmas e o cálculo dos valores de concentração letal – 50% (CL₅₀) para os diferentes extratos testados (CASTELLO-BRANCO, 2009; OGA et al., 2008).

A determinação da CL_{50} que é realizada por meio do uso de metanúplios de *Artemia salina* Leach, fornece um indicativo do nível de toxicidade de uma determinada substância. A literatura refere-se que uma CL_{50} inferior a 1.000 $\mu\text{g/mL}$, apresenta um potencial toxicidade para os organismos que possam ser expostos a ela (BARROS et al., 2010). Dessa forma, os resultados encontrados nesta pesquisa revelam que o extrato de metanólico da espécie *E. caatingae* foi considerado o mais tóxico, por apresentar um valor da CL_{50} de 203,7 $\mu\text{g/mL}$.

O estudo realizado por Martínez-Hormaza et al. (2006), que visava determinar a citotoxicidade de extratos de *Erythroxylum confusum* Britt, mediante o método da *Artemia salina* Leach, mostrou que a espécie estudada pode ser considerada com baixa toxicidade, uma vez que o valor médio de CL_{50} se manteve abaixo de 640 $\mu\text{g/ml}$. Este resultado foi diferente do encontrado nesta pesquisa, que concluiu que existe uma dose tóxica do extrato *E. caatingae* e do *E. revolutum* para as *A. salinas*.

Com relação à polaridade, a literatura afirma que produtos naturais mais polares são considerados frequentemente possuidores de maior bioatividade. Entretanto, não se pode fazer uma relação entre bioatividade e toxicidade, pois produtos que apresentam toxicidade ainda podem ser considerados bioativos (OLIVEIRA et al., 2011).

Assim como em outras pesquisas, esse trabalho permitiu avaliar a bioatividade/toxicidade de extratos de *E. caatingae* e *E. revolutum* através de uma metodologia simples e confiável, proporcionando mais segurança em estudos farmacológicos posteriores (AGUIAR et al., 2012; GONZÁLEZ-GUEVARA et al., 2006; GRYNKIEWICZ, GRADZIKOWSKA, 2008; OLIVEIRA et al., 2011; SANTOS et al., 2013; SILVA et al., 2001; SILVA et al., 2010; OLIVEIRA, 2012).

CONCLUSÃO

8 CONCLUSÃO

Os resultados oriundos da presente pesquisa possibilitaram concluir que:

- Existe uma dose tóxica do extrato *E.caatingae* e do *E. revolutum* para as *A. salinas*, bem como, uma relação diretamente proporcional entre a concentração do extrato e o índice de mortalidade das artemias.
- Os valores da CL_{50} para os extratos metanólico e da fase aquosa da espécie *E. caatingae* e para o extrato bruto de *Erythroxylum revolutum* foram de 203,7 (190,1 - 218,2) $\mu\text{g/mL}$, 1.074,0 (949,6 - 1.214,0) $\mu\text{g/mL}$ e 308,1 (241,1 - 393,6) $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.
- O extrato de metanólico da espécie *E. caatingae* apresentou-se mais tóxico.
- Foi possível observar que existe uma bioatividade e/ou toxicidade de extratos *Erythroxylum caatingae* e *Erythroxylum revolutum*

REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

- AGUIAR, L.C.G.G.; BARROS, R.F.M. Plantas medicinais cultivadas em quintais de comunidades rurais no domínio do cerrado piauiense (Município de Demerval Lobão, Piauí, Brasil). **Rev. bras. plantas med.**, v.14, n.3, p.419-434, 2012.
- ALAGILLE, D. et al. Functionalization at position 3 of the phenyl ring of the potent mGluR5 noncompetitive antagonists MPEP. **Bioorg Med Chem Lett**, v.15, n.4, p.945-949, 2005.
- AZEVEDO, C.D.; MOURA, M.A. **Cultivo de Plantas Mediciniais** – Guia Prático. Niterói: Programa Rio Rural. Manual Técnico, 2010. 20p.
- BARROS, J.D. et al. Estudo toxicológico pré-clínico agudo e determinação da cl50 do extrato bruto seco das folhas da *Vitex agnus castus linn.* **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 7, n. 3, p.62-71, 2010.
- BATALHA, M. O. et al. **Complexo agroindustrial de plantas medicinais e aromáticas no Estado de São Paulo**: Diagnóstico e proposição de ações e melhoria da eficiência e da competitividade. Sumário Executivo do projeto. São Carlos: UFSCAR/ UNESP/ SEBRAE, 2002. 57p.
- BORTOLOTTI, T. **Avaliação da atividade tóxica e genotóxica de percolados do aterro sanitário de Sombrio-SC, utilizando Artemia sp. e Allium cepa L.** 2007. 79 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, 2007.
- BRANCO, A.C.S.C. **Avaliação de toxicidade crônica pré-clínica de *Foeniculum vulgare* Mill.** 2009. 136f. Tese (Programa de pós-graduação em produtos naturais e sintéticos bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2009.
- CARVALHO, M.C.G. et al. **Evidências para o uso de Indigo naturalis no tratamento da psoríase tipo placa: uma revisão sistemática.** Natureza on line, v. 8, n. 3, p. 127-131, 2010
- CASTELLO, A. C. S. **Avaliação da toxicidade crônica pré-clínica de *Foeniculumvulgare*mill.** 2009. 136f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2009.
- CHIWORORO W.D.; OJEWOLE J.A. Spasmolytic effect of Psidium guajava Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extract on rat isolated uterine horns. . **J Smooth Muscle Res**, v.45, n.1, p.31-38, 2009.
- CHUNG, M-C.; SILVA, A. T. A.; CASTRO, L. F.; GÜIDO, R. V. C.; NASSUTE, J. C.; FERREIRA, E. I. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. **Rev Bras Cienc. Farmac**, v. 41, n. 2,p.155-179, 2005.
- FRANÇA, I. S. X.; SOUZA, J. A.; BAPTISTA, R. S.; BRITTO, V. R. S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Rev. Bras. Enferm**, v.61, p. 201-208, 2008.

GARCÍA, K. G. et al.. Género *Erythroxylum*: Análisis de la Información Científica. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 24, n. 2, p.284-90, 2005.

GRAFF, S. **Fundamentos de toxicologia clínica**. 1. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2006. 157p.

GRYNKIEWICZ, G.; GADZIKOWSKA, M. **Tropane alkaloids as medicinally useful natural products and their synthetic derivatives as new drugs**. **Acta Pol Pharm – Drug Res.**, v.60,p. 439-463 , 2008.

HARVEY, A. Natural products as a screening resource. **Curr Opin Chem Biol**, v. 11, n.5, p. 480–484, 2007.

LOIOLA, M. I. B. et al. Flora da Paraíba, Brasil: Erythroxylaceae. **Acta Bot. Bras.**, v. 21, p. 473-487, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. **As Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas** – 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008. 544p. Reimpresso em março de 2011 com algumas correções e revisão ortográfica.

LUNA, J.S et al. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **J Ethnopharmacol**, v. 97, n.2, p.199-206, 2005.

NASCIMENTO, J. E. et al. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larva de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 29, n.2, p. 145-150, 2008.

NASCIMENTO, G.C. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antitumoral e citotoxicidade in vitro de *Erythroxylum deciduum* (Erythroxylaceae) . 2008. 86f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Moleculares) - Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, GO, 2008.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. **O. Fundamentos de toxicologia**. 3. Ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 677p.

OLIVEIRA, S. L. et al. Tropene Alkaloids from *Erythroxylum caatingae* Plowman. **Chem Biod**, v. 8, p. 155-165, 2011.

OLIVEIRA, S.L.. **Fitoquímica de espécies de *Erythroxylum* do semiárido: isolamento e determinação estrutural de alcaloides tropânicos, flavanoides e diterpenos**.2012. 191f. Tese (Programa de pós-graduação em produtos naturais e sintéticos bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2012.

OLIVI, P; ESPINDOLA, E.L.G. A toxicidade em Ambientes Aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Quim. Nov**, v.31, n7, p.1820-1830,2008.

PARRA, A. L. et al. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral. **Phytomedicine.**, v. 8, n.5, p. 395-400, 2001.

- PEREIRA, A. de C. **Prospecção fitoquímica de *Unxia kubitzkii* H.ROB., e estudo da atividade citotóxica utilizando *Artemia salina* Leach, 1819.** Rio de Janeiro, Universidade Castelo Branco. Curso de Ciências Biológicas. 2006.
- PLOWMAN, T. C. Erythroxylaceae Kunth. In: W. D. Stevens et al., (Eds.). Flora de Nicaragua. Monographs Systematic Botany. **MOBOT**. v. 85, p. 834-838, 2004.
- PUPO, M.T.; GALLO, M. B. C. Biologia Química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Quím. Nova**, v. 30, n. 6, p. 1446-1455, 2007.
- ROSSATO, A. et al. **Fitoterapia racional: aspectos taxonômicos, agroecológicos, etnobotânicos e terapêuticos.** v.1 - Florianópolis: DIOESC, 2012. 211p.
- RUIZ, A.L.T.G. et al. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). **Rev Bras Farmacogn.**, v.15, n.2 , p.98-102, 2005.
- SANTOS, E.B. et al. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. **Rev Bras Farmacognosia**, v. 19, n. 1, p. 321-324, 2013.
- SILVEIRA, P. F. et al. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Rev Bras Farmacognosia**, v.18, n. 4 p. 618-626, 2008.
- SINGLA, A. K.; GARG, A.; AGGARWAL, D. Paclitaxel and its formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 235, p. 179–192, 2002.
- SCHIEDECK, G. **Jornal da Ciências. Plantas bioativas.** 20 de abril de 2006. Disponível em: <http://www.jornaldaciencia.org.br/Detail.jsp?id=36931>.
- VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Quím. Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2006.
- WAGNER H, WISENAUER, M. **Fitoterapia: Fitofármacos, farmacologia e aplicações clínicas.** 2. ed. São Paulo: Pharmabooks. 2006. 424p.
- ZANOLARI, B. et al. Tropane alkaloids from the bark of *Erythroxylum vacciniifolium*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 497-502, 2003.
- ZUANAZZI, J. A. S. et al. Alkaloids of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) species from Southern Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, n. 8, p. 819-825, 2001.