

TRIAGEM TOXICOLÓGICA DE EXTRATOS DE *CINNAMOMUM STENOPHYLLUM* FRENTE À *ARTEMIA SALINA* LEACH

TOXICOLOGICAL SCREENING OF EXTRACTS FROM *CINNAMOMUM STENOPHYLLUM* ON *ARTEMIA SALINA* LEACH

Artur Danilo Novaes da Silva¹, Helder Carvalho Souza Lima Silva¹, Ricardo Prado Lyra¹, Bruno Lucêna de Lima¹, Daniela de Alencar Menezes¹, Gabriela Saraiva Dantas¹, Fabiana Lima Silva², Paulo Roberto, Hrihorowitsch Moreno³, Thárcia Kiara Beserra de Oliveira^{4,5}, Joelmir Lucena Veiga da Silva⁵

¹ Discente/Grupo de Pesquisa em Práticas Integrativas e Complementares/FMO, ² Docente/ Instituto de Ciências da Saúde/UNIP, ³ Docente/Instituto de Química/USP, ⁴ Docente/UNIFACISA, ⁵ Docente/Grupo de Pesquisa em Práticas Integrativas e Complementares/FMO.

RESUMO

Objetivo: Observar e comparar a toxicidade aguda de extratos das folhas (Csf) e do caule (Csc) de *Cinnamomum stenophyllum* em *Artemia salina*. **Métodos:** Os extratos Csf e Csc, nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 µg/mL, foram utilizados nos ensaios de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia salina*, sob exposição de 24 e 48 horas, realizados em triplicata. O número de náuplios mortos foi quantificado, e a CL50 foi calculada por regressão não linear. **Resultados:** O extrato Csf apresentou toxicidade apenas com a concentração de 1000 µg/mL em 48 horas ($p < 0,05$), sendo assim, a CL50 não foi determinada. Já o extrato Csc foi tóxico apenas na maior exposição, de 48 horas, mostrando CL50 de $8,7 \pm 0,7$ µg/mL, considerada uma alta toxicidade ($CL50 < 100$ µg/mL). **Conclusão:** As folhas e o caule de *Cinnamomum stenophyllum* possuem metabólitos ativos que levam toxicidade à *Artemia salina* quando em alta exposição, os quais, provavelmente são substâncias diferentes ou estão mais concentradas no caule. Estes resultados são os primeiros na literatura para a espécie estudada.

Palavras-chave: Planta medicinal; Extrato vegetal; Toxicidade

ABSTRACT

Objective: to observe and to compare the acute toxicity of the leaves (Csf) and stalk (Csc) extracts from *Cinnamomum stenophyllum* on brine shrimp *Artemia salina*. **Methods:** Csf and Csc extracts (1, 10, 100 and 1000 µg/mL) were evaluate the assay acute toxicity on *Artemia salina*, were add to the samples during 24 or 48 hours, performed at triplicate. The nauplii dead number were determined and LC50 was calculated by non-linear regression. **Results:** Csf extract presents toxicity only with 1000g/mL at 48hs ($P < 0.05$), thus the LC50 did not calculated. Csc was toxic only at 48hs ($LC50 = 8.7 \pm 0.7$ g/mL), regarded as high toxicity ($LC50 < 100$ g/mL). **Conclusion:** The leaf and stalk from *Cinnamomum stenophyllum* presents active metabolites that induced toxicity *Artemia salina* at high exposition, probably, are diferent substances or most concentrated on stalk. Those data are related for first time in literature.

Keywords: Medicinal plant; Vegetal extract; Toxicity

INTRODUÇÃO

A utilização da medicina tradicional e das plantas medicinais em países em desenvolvimento tem sido amplamente observada como base normativa para a manutenção da saúde.¹

Segundo dados do sistema de informação tóxico-farmacológico, a intoxicação por plantas medicinais é a segunda maior causa de morte por intoxicação em seres humanos. Existem vários fatores que levam a esse fato, como a falta de conhecimento

sobre o cultivo, a não identificação correta da planta, reações adversas, interação medicamentosa, concentração e frequência do uso do fitoterápico.²

O instrumento nacional de normatização desenvolvido para orientar e potencializar as iniciativas de saúde no Brasil foi a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde,³ contemplando inicialmente as áreas de Plantas Medicinais e Fitoterapia, Homeopatia, Medicina Tradicional Chinesa/Acupuntura e Medicina Antroposófica. Em uma área mais específica, foi elaborada

também a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.⁴

A família Lauraceae apresenta distribuição tropical e subtropical, com cerca de 52 gêneros e 2.500 a 3.500 espécies.⁵ No Brasil, a família está representada por 23 gêneros e 420 espécies.⁶ Do ponto de vista econômico, as Lauráceas formam um importante grupo, pois muitas de suas espécies fornecem óleos aromáticos e alcaloides usados na perfumaria e na indústria farmacêutica, tais como *Cinnamomum camphora* (cânfora) e a *Aniba rosaeodora* (pau-rosa); desta última se extrai o linalol, essência bastante empregada na indústria de cosméticos. São ainda produtoras de frutos comestíveis e condimentos, usados na dieta alimentar (*Persea americana* – abacate, *Laurus nobilis* – louro, e *Cinnamomum verum* – canela-da-china) e encontrados nas partes destas espécies.⁹

Como não há relatos na literatura de estudos com *Cinnamomum stenophyllum*, decidiu-se iniciar pesquisas verificando e comparando a toxicidade aguda de extratos etanólicos brutos das folhas (Csf) e do caule (Csc) dessa espécie vegetal no microcrustáceo de *Artemia salina*.

MÉTODOS

As folhas e o caule de *Cinnamomum stenophyllum* foram macerados em etanol (95%), e os extratos obtidos após a eliminação desse solvente em rotaevaporador a 60o C. Esses extratos foram cedidos pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Para preparação das soluções dos extratos a serem utilizados nos ensaios, eles foram solubilizados com cremofor (0,1%) e diluídos em água destilada (2,5 mg/mL). No momento da realização dos experimentos, foram diluídos em série, a fim de se obter concentrações adequadas.⁷ A espécie *Cinnamomum stenophyllum* (Meisn.) Vattimo-Gil é conhecida popularmente como “canela-vassoura” e ocorre nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Paraná.^{6,8} As propriedades adstringente, carminativa, purificadora de sangue, digestiva, antisséptica, antifúngica, antiviral, antibacteriana, antioxidante, anti-inflamatória, imunomoduladora, hipolipidêmica e hipoglicemiante foram relatadas para extratos de espécies do gênero *Cinnamomum*.⁹ Vários compostos químicos, como aldeídos, acetatos, alcoóis, terpineos, flavonoides, alcaloides, antraquinonas, cumarinas, fenóis, saponinas, taninos, ácido carboxílico, hidrocarbonos, espatulenol, ácidos graxos, butanolí-

dos, lignanas, esteroides, propenoides e campferol são usados para os ensaios.

Para a determinação da toxicidade aguda, foi utilizado o método com *Artemia salina*.¹⁰ Uma quantidade de 0,3 g de cistos de *A. salina* foi mantida em água marinha sintética e incubada por 24 a 36 horas, sob iluminação artificial e temperatura de 22°C. Após a eclosão, 10 náuplios foram coletados e incubados em tubos de ensaio contendo a solução dos extratos (1, 10, 100 e 1000 µg/mL) e o controle (salina). Após 24 e 48 horas, foi realizada a leitura do número de sobreviventes e mortos. Consideraram-se larvas mortas todas que não apresentavam qualquer movimento ativo em cerca de vinte segundos de observação. A determinação da concentração letal média (CL50) dos extratos foi obtida por regressão não linear do número de náuplios viáveis para cada concentração do extrato. O ensaio foi realizado em triplicata para cada concentração dos extratos.

Todos os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média ($X \pm EPM$) e analisados estatisticamente empregando-se o teste-t, em que os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes e analisados pelo programa GraphPad Prism.

RESULTADOS/DISCUSSÃO

A fim de conhecer possíveis atividades tóxicas de produtos vegetais, ensaios utilizando microcrustáceo *A. salina* são largamente aplicados para um conhecimento prévio e segurança terapêutica. Por se tratar de um animal de fácil manutenção em condições de laboratório e de ampla distribuição, tem sido largamente utilizado em testes de toxicidade.^{11,12} A ausência de citotoxicidade de extratos testados em *A. salina* indica que a planta é bem tolerada pelo sistema biológico.

A incubação do extrato Csf nas concentrações utilizadas durante 24 horas não diminuiu a viabilidade do microcrustáceo de *A. salina* quando comparado ao controle, mostrando não apresentar toxicidade (Figura 1A). No entanto, quando o extrato Csf foi incubado nas amostras por 48 horas (Figura 1B), apenas a maior concentração (1000 µg/mL) foi capaz de diminuir significativamente a viabilidade. Esses resultados mostram que o caule de *C. stenophyllum* possui princípios ativos que, quando concentrados, provavelmente não conseguem ser totalmente eliminados pelo metabolismo da *A. salina*, causando-lhes toxicidade.

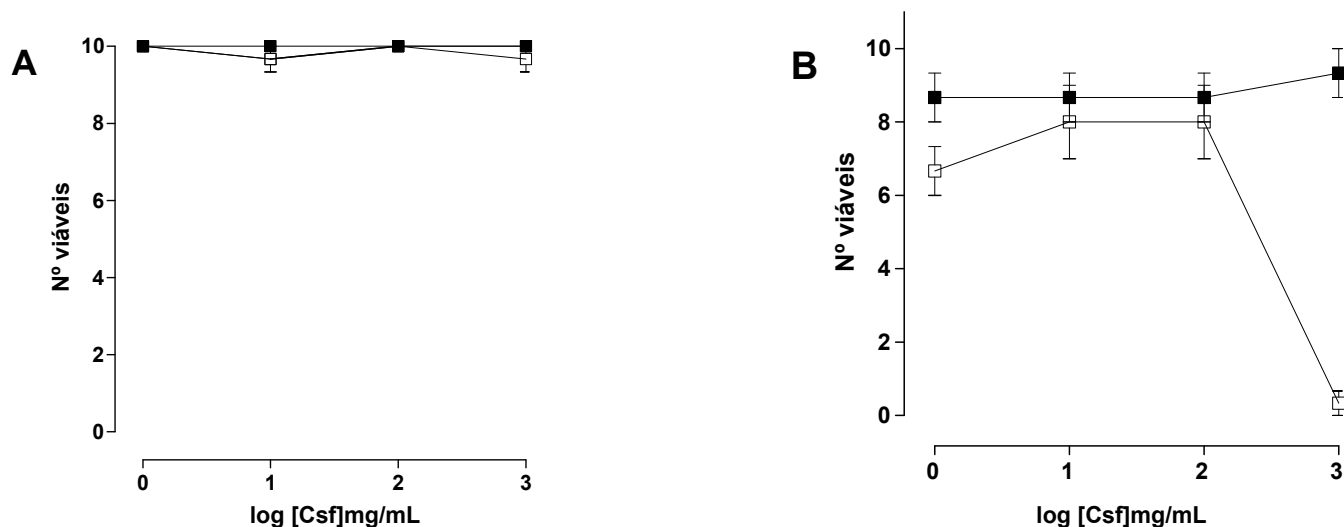


Figura 1. Viabilidade de *Artemia salina* na ausência (■) ou presença do extrato Csf (□) durante a exposição por 24 horas (A) ou 48 horas (B).

Nos ensaios utilizando o extrato Csc (Figura 2), apenas na maior exposição (48 horas), este extrato foi capaz de induzir morte das artemias (Figura 2B), apresentando uma CL50 de $8,7 \pm 0,7$ g/mL, sendo considerada uma alta toxicidade ($CL50 < 100 \mu\text{g/mL}$).¹⁰ Esta toxicidade foi maior do que aquela apresentada por extratos das folhas e da casca de *C. travancoricum*, *C. walaiwarensense*, *C. wightii*, *C. verum*, *C. sulphuratum*, *C. riparium* e *C. perrottetii* em ensaio com *Artemia salina*.¹³ A significativa toxicidade observada pelo extrato Csc deve ser considerado como uma característica interessante para utilizar

esse extrato vegetal para futuros estudos de citotoxicidade.¹⁴ O fato de a toxicidade mais significativa no extrato do caule ao invés de no extrato das folhas de *C. stenophyllum* sugere que metabólitos ativos responsáveis por este dano são diferentes daqueles encontrados nas folhas ou estão mais concentrados no caule. Resultados semelhantes também foram encontrados para extrato da casca, sendo mais ativos do que extrato das folhas de *C. travancoricum*, *C. walaiwarensense*, *C. wightii*, *C. verum*, *C. sulphuratum*, *C. riparium* e *C. perrottetii*.¹³

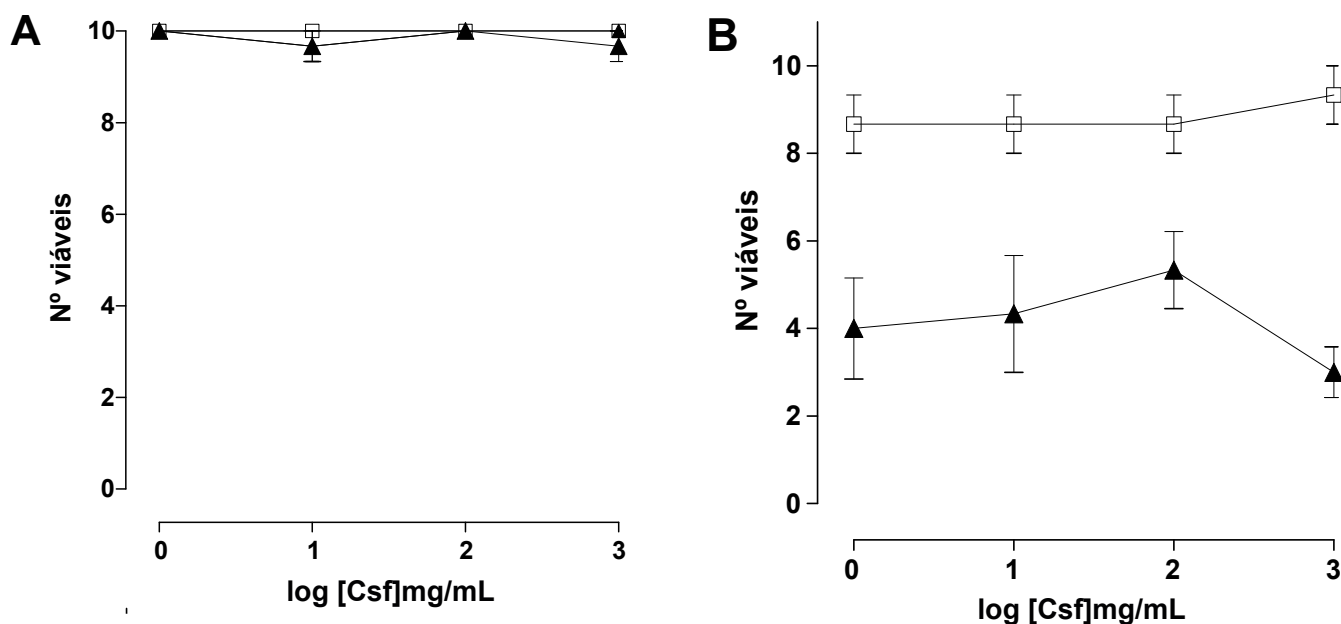


Figura 2. Viabilidade de *Artemia salina* na ausência (□) ou presença do extrato Csc (▲) durante a exposição por 24 horas (A) ou 48 horas (B).

CONCLUSÃO

As folhas e o caule de *Cinnamomum stenophyllum* possuem metabólitos ativos que levam toxicidade à *Artemia salina* quando em exposição prolongada. Sendo os compostos responsáveis por esse dano, provavelmente, diferentes ou mais concentrados no caule. Esses dados são os primeiros relatados para essa espécie vegetal.

AGRADECIMENTO

Agradecemos o apoio técnico concedido por Rayane Rodrigues Angelo Viana na realização dos experimentos no Laboratório de Práticas Funcionais II da Faculdade de Medicina de Olinda.

REFERÊNCIAS

1. Organização Das Nações Unidas Para A Educação, A Ciência E A Cultura (Unesco). Culture and Health: Orientation Texts: World Decade for Cultural Development 1988-1997, Document CLT/DEC/PRO. Paris, 1996;129.
2. Silveira PF, Bandeira MA, Arrais PSD. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. Rev Bras Farmacogn 2008;18(4):618-26.
3. Ministério da Saúde. Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC BRASIL) no Sistema Único de Saúde. D.O.U. Poder Executivo, Brasília, 04 mai. 2006a.
4. Presidência da República. Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. D.O.U. Poder Executivo, Brasília, 2006b.
5. Rohwer JG, Lauraceae. In: Kubitzki K, Rohwer JG, Bittrich V. (eds.). The families and genera of vascular plants 1993. Springer-Verlag, Berlin. Pp. 366-91.
6. Quinet A, Baitello JB, Moraes PLR, Lauraceae. In: Forzza RC, et al. (eds.). Lista de espécies da flora do Brasil. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2011/FB084232>>.
7. Santos S, Alves M. Flora da Usina São José, Igarassu, Pernambuco: Lauraceae. Rodriguésia 2012; 63(3):689-703.
8. Andrade TOD. Inventário e análise da arborização viária da Estância Turística de Campos do Jordão, SP. Monografia [graduação]. Piracicaba, SP: Universidade de São Paulo, 2002.
9. Kumar S, Kumari R, Mishra S. Pharmacological properties and their medicinal uses of *Cinnamomum*: a review. J Pharm and Pharmacol. 2019; 71:1735-61.
10. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, MacLaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Plantas Medicinais 1982; 45:31-34.
11. Amarante CB, Müller AH, Póvoa MM, Dolabela MF. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmodica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). Acta Amaz 2011;41(3):431-4.
12. Pimentel MF, Silva Junior FCG, Santaella ST, Lotufo LVC. O Uso de *Artemia* sp. como Organismo-Teste para Avaliação da Toxicidade das Águas Residuárias do Beneficiamento da Castanha de Caju Antes e Após Tratamento em Reator Biológico Experimental. J Braz Soc Ecotoxicol 2011; 6(1):15-22.
13. Maridass M. Evaluation of Brine Shrimp Lethality of *Cinnamomum* Species. Ethnobot Leaflets. 2008;12:772-5.
14. Barth EF, Pinto LS, Dileli P, Biavatti DC, Silva YL, Bor-tolucci W, et al. Biological screening of extracts from leaf and stem bark of *Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae). Braz J Biol. 2018; 78(4):601-8.