



Triagem toxicológica de extrato de *Lippia microphylla* frente à *Artemia salina*

Toxicological screening of extract of *lippia microphylla* extract on *Artemia salina*



Gabrielle Guimarães Araújo¹  Nicole Silva Flor¹  Alice Joana Souza Vieira da Silva¹ 
Joelmir Lucena Veiga da Silva¹  Tharcia Kiara Beserra de Oliveira¹ 

¹ Faculdade de Medicina de Olinda. Olinda, Pernambuco, Brasil.

Resumo

Objetivo: Verificar a toxicidade aguda de extrato etanólico bruto das partes aéreas desta espécie vegetal frente a *Artemia salina*. **Métodos:** O extrato das partes aéreas da *Lippia microphylla*, nas concentrações de 1,0, 10,0, 100,0 e 1.000,0 µg/mL, foi utilizado nos ensaios de toxicidade aguda utilizando o microcrustáceo *Artemia salina* (n = 10), incubados por um período de 24 e 48 horas, realizados em triplicata. O número de náuplios mortos foram quantificados e a CL₅₀ foram calculadas por regressão não-linear. **Resultados:** O extrato da *Lippia microphylla* durante incubação por 24h promoveu toxicidade (p < 0,05) apenas na maior concentração do extrato (1.000 µg/mL). Já na exposição por 48h, mostrou CL₅₀ de 246,7 ± 27,85 µg/mL, apresentando toxicidade moderada. **Conclusão:** As folhas de *Lippia microphylla* possuem princípios ativos, os quais, provavelmente, não conseguem ser totalmente eliminados pelo metabolismo da *Artemia salina* durante 48h, causando-lhes toxicidade moderada.

Palavras-chave: Planta medicinal; Extrato vegetal; Toxicidade.

Autor correspondente:

Joelmir Lucena Veiga da Silva

E-mail:

joelmir.silva@fmo.edu.br

Fonte de financiamento:

não se aplica

Parecer CEP: não se aplica

Recebido em 07/11/2022

Aprovado em 24/04/2023

Como citar: Araújo GG, Flor NS, Silva AJSV, Silva JLV, Oliveira TKB. Triagem toxicológica de extratos de *Lippia microphylla* frente à *Artemia salina*. An. Fac. Med. Olinda. 2023;1(9):11. <https://doi.org/10.56102/afmo.2023.233>

Abstract

Objective: To verify the acute toxicity of crude ethanolic extract from aerial parts of this plant species against *Artemia salina*. **Methods:** The extract from aerial parts of *Lippia microphylla*, at concentrations of 1.0, 10.0, 100.0 and 1.000.0 µg/mL, was used in acute toxicity tests using the microcrustacean *Artemia salina* (n = 10), incubated for a period 24 and 48 hours, performed in triplicate. The number of dead nauplii were quantified and the LC₅₀ were calculated by non-linear regression. **Results:** The extract of *Lippia microphylla* promoted toxicity (p < 0.05) only in the most concentration (1.000 µg/mL) at during 24h of exposition. It showed toxicity in exposure for 48 hours (LC₅₀ = 246.7 ± 27.85 µg/mL), presenting moderate toxicity. **Conclusion:** *Lippia microphylla* aerial parts have active principles, which probably cannot be eliminated by *A. salina* metabolism for 48 hours, causing toxicity.

Keywords: Medicinal plant; Plant extract; Toxicity.

INTRODUÇÃO

O uso das plantas em diversas formas farmacêuticas vem sendo bastante empregado no tratamento e prevenção de doenças, desde que comprovados cientificamente.^{1,2,3} As plantas medicinais possuem diversas atividades biológicas, podendo-se citar atividades antifúngicas, antimicrobianas, anti-inflamatórias, antialérgicas, antitumorais, analgésicas, antioxidantes, entre outras.⁴ Além disso, as plantas utilizadas constituem um recurso natural, de baixo custo e, por vezes, cultivados pelos usuários dos serviços de saúde pública, o que as torna acessível e contribui para a adesão do tratamento, exercendo um papel fundamental frente ao processo de saúde-doença.⁵

Espécies *Lippia* spp. estão amplamente distribuídas no Brasil, com relevante importância medicinal em função das atividades terapêuticas. Muitas espécies de *Lippia* são utilizadas no tratamento de distúrbios respiratórios e gastrointestinais. Além disso, diversas atividades farmacológicas têm sido demonstradas em estudos com espécies deste gênero, a exemplo de atividades anticancerígenas, antirradicais, espasmolíticas, inibidoras da acetilcolinesterase, antibacterianas e eliminadoras de microrganismos patogênicos. Contudo, relatos sobre a toxicidade deste gênero são escassos.^{6,7,8} Já o extrato das partes aéreas de *Lippia microphylla* mostrou atividade relaxante *in vitro* sobre aorta e traqueia isoladas de rato.⁹

Estudos relacionados à eficácia dos extratos de plantas do gênero *Lippia* têm revelado bons resultados relacionados à constituição química do óleo essencial da *Lippia* e análise de sua propriedade antioxidante, sendo esse benefício relacionado à presença de timol e carvacrol, isômeros que têm sido apontados por alguns autores como moléculas promissoras no estudo de alternativas terapêuticas para infecções.¹⁰

Apesar dos diversos benefícios, algumas plantas podem causar reações adversas, afetando os aparelhos cardiovascular, respiratório, gastrointestinal, neurológico, pele e mucosas,

e em alguns casos, o óbito. Intoxicações graves em pacientes com fatores de risco, como os portadores de problemas cardiológicos, podem ser observadas quando na utilização de algumas plantas com baixa toxicidade.^{11,12} Esses efeitos adversos ocorrem tanto pelo uso isolado, de modo inadequado, uso crônico ou em associação com medicamentos convencionais ou até mesmo com outras plantas e fitoterápicos, tornando necessário a realização de estudos toxicológicos.¹³

Artemia salina (*A. salina*) é um pequeno invertebrado halofílico pertencente à família dos crustáceos que desempenham um papel importante nos ecossistemas de água salgada e marinhos. É muito valorizado por sua aplicação na detecção de toxicidade e é usado em áreas como ecologia, fisiologia, ecotoxicologia, aquicultura e genética. Além disso, o ensaio de letalidade da *Artemia* é veloz, conveniente e barato.^{14,15}

A ausência de estudos que comprovem ou relatem a toxicidade de *Lippia microphylla* Cham., estimulou verificar e comparar a toxicidade aguda do extrato das partes aéreas desta espécie vegetal frente a *Artemia salina*.

MÉTODOS

As folhas da *Lippia microphylla* foram maceradas em etanol (95%) e o extrato bruto obtido após a eliminação deste solvente em rotaevaporador. Este extrato foi cedido pelo Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba. Para preparação da solução do extrato a ser utilizado nos ensaios, o extrato bruto foi solubilizado com cremofor (0,1%) e diluído em água destilada para se obter a solução estoque (10 mg/mL). No momento da realização do experimento, eram diluídos em série a fim de se obter concentrações adequadas para os ensaios. Para a determinação da toxicidade aguda foi utilizado o método com *Artemia salina*.¹⁶

Uma quantidade de 0,3g de cistos de *A. salina* foi mantida em água marinha sintética (pH neutro) e incubada por 24-48h sob iluminação artificial e temperatura de 22°C, sem alimentação. Após a eclosão, 10 náuplios foram coletados (n = 10) para cada grupo: tubos de ensaio contendo a solução dos extratos (1,0; 10; 100 e 1.000 µg/mL); e o controle (salina). As preparações foram realizadas em triplicata. Após 24 e 48h foi realizada a leitura do número de sobreviventes e mortos. Consideram-se larvas mortas todas que não apresentavam qualquer movimento ativo em cerca de vinte segundos de observação. A determinação da concentração letal média (CL₅₀) do extrato 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 do extrato. Todos os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (x ± e.p.m.) e analisados estatisticamente empregando-se o teste-t, onde os valores de p < 0,05 foram considerados significantes e analisados pelo programa GraphPad Prism.

RESULTADOS

A citotoxicidade da *Lippia microphylla*, nas diferentes diluições no grupo com extrato da planta e no grupo com salina, está apresentada na Figura 1, por 24h (Fig. 1 A) e 48h (Fig. 1B). Observou-se que na incubação durante 24h, apenas a maior concentração do extrato (1000 µg/mL) induziu morte de maneira significativa ($p < 0,05$) quando comparado com o controle. Sendo assim, a CL_{50} não foi determinada, uma vez que a variável observada não teve um relação concentração-reposta em pelo menos duas concentrações distintas (maior a concentração, maior o efeito). Já na incubação com 48h (Fig. 1B), as concentrações de 10 e 1.000 µg/mL do extrato foram tóxicas para *A. Salina*, quando comparado ao grupo controle. Assim, a CL_{50} foi calculada e apresentou valor de $246,7 \pm 27,85$ µg/mL, o que representa toxicidade moderada ($100 < CL_{50} \leq 500$ µg/mL).

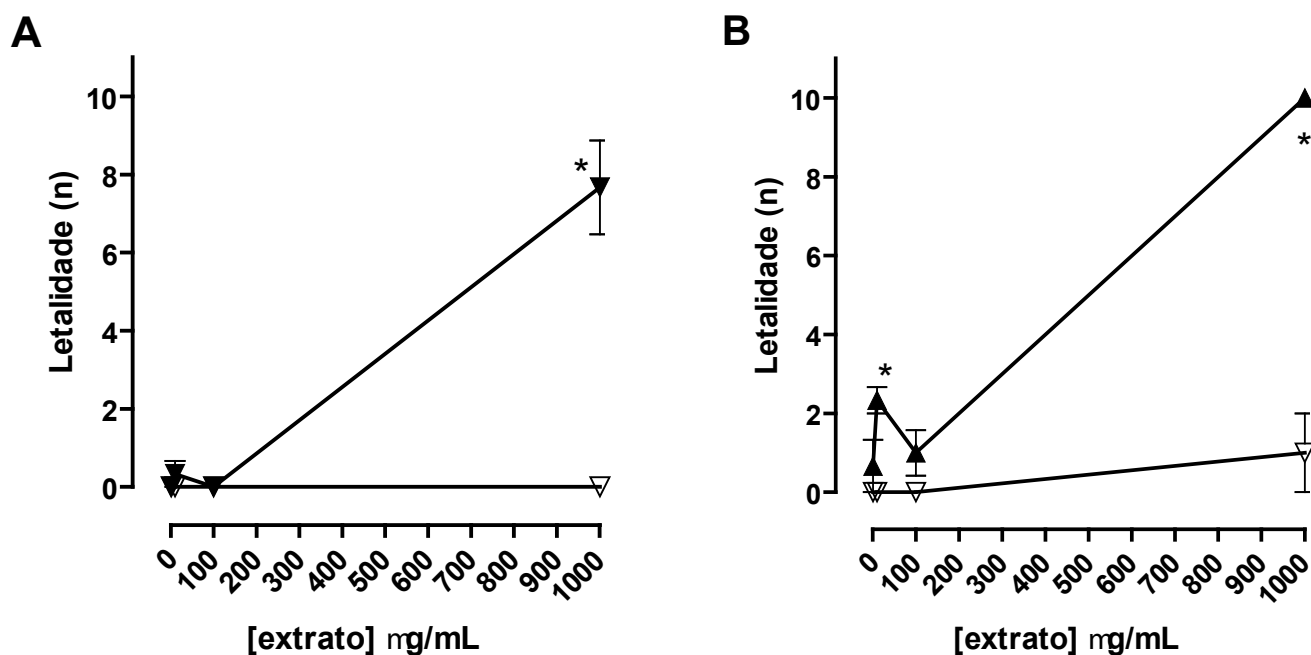


Figura 1 – Efeito da presença (q) e ausência (s) do extrato bruto de *L. microphylla* frente à *Artemia salina*, durante 24h (A) e 48h (B), n = 10. * Os traçados correspondem as curvas concentração-resposta e as barras verticais representam o erro padrão da média. ** $p < 0,05$, Teste t (extrato vs. controle).

DISCUSSÃO

Esse bioensaio é amplamente utilizado no meio científico por ser rápido, fácil e barato. Com base na dose por unidade de superfície corporal, os efeitos tóxicos no homem estão consideravelmente nos mesmos limites que os observados nos animais de laboratório, sendo possível descobrir possíveis riscos nos humanos.¹⁷

As espécies de *Lippia* são uma fonte de substâncias bioativas notáveis com potencial econômico para as comunidades locais. Especificamente, *L. microphylla* é uma espécie endêmica pouco explorada na vegetação brasileira. No entanto, possui grandes propriedades medicinais que ganha atenção da comunidade científica. Apesar do interesse pelos cientistas, observamos poucos estudos relacionado a sua toxicidade. Produtos naturais, principalmente plantas medicinais, persistem como uma importante fonte de novos agentes contra doenças infecciosas, doenças cardiovasculares, câncer e imunomodulação.¹⁸ Tornando importante os estudos toxicológicos.

A espécie de *Lippia* no nosso estudo demonstrou resultados para moderada toxicidade, o que revela a não capacidade do microcrustáceo em realizar metabolização/detoxificação de princípios ativos, potencialmente tóxicos, em duas concentrações num período de 48h, como também na de 1.000 µg/mL em 24h. A literatura aponta que existem vários fatores que interferem na toxicidade, entre estes temos a concentração da amostra testada.¹⁹ Resultados semelhantes aos encontrados neste estudo foram obtidos com o extrato do caule *Pimenta pseudocaryophyllus*, que mostrou toxicidade sobre *A. salina*, após a incubação com 48h.¹⁸ Já um estudo de toxicidade *in vivo* com o mesmo extrato de *Lippia microphylla* não demonstrou toxicidade em camundongos.²⁰

O mesmo método foi utilizado em um estudo toxicológico das folhas de *Myosotis sylvatica*, e extratos das folhas (Csf) e do caule (Csc) de *Cinnamomum stenophyllum* frente à *Artemia salina*, que obtiveram, respectivamente CL₅₀ de 38,1 µg/mL, Csf com CL₅₀ indeterminada, e Csc com CL₅₀ de 8,7 ± 0,7 µg/mL, podendo ser *Myosotis sylvatica* classificadas como potencialmente tóxicas e Csc como alta toxicidade (CL < 100 µg/mL).²¹⁻²²

Os resultados obtidos nesse estudo corroboram também com aqueles encontrados em estudo realizado com o intuito de avaliar a toxicidade da *Lippia alba*, *Cymbopogon citratus* e *Rosmarinus officinalis* frente à *Artemia salina*, nas concentrações de 1000 ppm, 500 ppm e 100 ppm, onde todos os três extratos testados apresentaram atividade biológica e foi concluído que todos são tóxicos se usados em concentrações altas.²³

Também foram encontrados resultados semelhantes em estudo que avaliou os possíveis efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos das folhas da *Lippia sidoides* em diferentes concentrações sobre o ciclo celular da *Allium cepa*, onde o efeito citotóxico foi constatado pela presença da diminuição da divisão celular por meio da análise em microscópio óptico após coloração e fixação do tecido.²⁴

Estudo com o objetivo de avaliar a toxicidade aguda de óleos essenciais frente à *Artemia salina* demonstrou que todos os óleos essenciais testados manifestaram uma toxicidade aguda elevada a baixas dosagens. Alguns desses óleos que apresentaram alta letalidade incluíram espécies de *Lippia*, foram eles o *Cymbopogon citratus* (CL₅₀ = 1.212 µg/ml) > *Lippia rotundifolia* (CL₅₀ = 1.256 µg/ml) > *Lippia organoides* (CL₅₀ = 1.267 µg/ml) > *Cymbopogon citratus* Lemon-Grass (CL₅₀ = 1.284 µg/ml).²⁵

CONCLUSÃO

Estes resultados sugerem que as partes aéreas de *Lippia microphylla* possuem princípios ativos, os quais, provavelmente, não conseguem ser totalmente eliminados pelo metabolismo da *A. salina* de uma maneira geral em 48h e 24h (na maior concentração estudada), causando-lhes toxicidade moderada.

Logo, a toxicidade observada por esse extrato vegetal deve ser considerada uma característica relevante para a utilização do mesmo em estudos de citotoxicidade, com o objetivo de trazer evidências mais robustas acerca de suas propriedades e efeitos.

Diferentes condições ambientais podem influenciar os efeitos de agentes tóxicos nos microcrustáceos, com isso esses achados sugerem a realização de novos testes para segurança no uso da espécie no desenvolvimento de novos estudos, bem como para o desenvolvimento de ensaios clínicos especializados e consumo da população.

CONFLITO DE INTERESSES

Nada a declarar.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

GGA, NSF e AJSVS: elaboração e redação do manuscrito. **TKBO:** concepção, elaboração e redação do artigo. **JLVS:** análise dos dados e redação final do manuscrito. Todos os autores revisaram e aprovaram a versão final do manuscrito.

REFERÊNCIAS

1. Teixeira, JPS, Macedo, APV, Cândido GS, Magalhães JKA, Silva MW, Nunes HML, Lima VS, Silva GC. Perfil epidemiológico dos casos de intoxicação por plantas medicinais no Brasil de 2012 a 2016. *Brazilian Journal of Development* 2020;6(10):82199–82209.
2. Silva MG, Furtado MM, Osório AT, Morais ICP, Amaral MPM, Coêlho AG, Arcanjo DDR. The importance of toxicity tests for development and phytotherapy registration, *Research, Society and Development* 2021;10(12).
3. Melo DB, Macedo LM, Almeida IO, Pereira TRS, Silva TM, Leal MMT, Melo GA, Santana LLB. Intoxicação por plantas no Brasil: uma abordagem cienciométrica. *Brazilian Journal of Development* 2021;7(4):40919–40937.
4. Rocha LPB, Alves JV, Aguiar IF, Silva FH, Silva RL, Arruda LG, Nascimento EJ, Barbosa BVD, Amorim LC, Silva PM, Silva MV. Use of medicinal plants: History and relevance. *Research, Society and Development* 2021;10(10).
5. Rodrigues TA, Neto JL, Carvalho TAR, Barbosa ME, Guedes JC, Carvalho AV. A valorização das plantas medicinais como alternativa à saúde: um estudo etnobotânico. *Revista Ibero-Americana de*

- Ciências Ambientais 2020;11(1).
6. Jesus CO de, Pereira SLA. Potencial de *Lippia microphylla* cham. (verbenaceae) como tratamento alternativo para acantocefalose no tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Brazilian Journal of Development* 2020;6(2):6293–6305.
 7. Silva MCC, Souza ILL, Vasconcelos LHC, Ferreira PB, Araujo LCC, Sampaio RS, Tavares JF, Silva BA, Cavalcante FA. Essential oil from *Lippia microphylla* Cham. modulates nitric oxide pathway and calcium influx to exert a tocolytic effect in rat uterus. *Natural Product Research* 2021;35(6):1046-1051.
 8. Oliveira GA, Pereira JC, Martins IRR, Correia AC, Travassos R, Silva M, Souza ILL, Tavares JF, Paredes-Gamero EJ, Silva BA. Spasmolytic activity of essential oil from *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) is mediated by modulation of Ca²⁺ signaling on animal and cellular models. *Research, Society and Development* 2021;10(7).
 9. Antunes ROG, Silva APS, Silva ACS, Oliveira PR, Tavares JF, Nouailhetas VLA, Silva JLV. Relaxant effects of *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) on isolated rat aorta and trachea. *Pharmacologyonline* 2012; 2:82-86.
 10. Silva MM. Estudo da composição Química do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. em três anos diferentes e atividade antioxidante. 2015. 69p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Roraima, Roraima, 2014.
 11. Góes ACC, Silva LSL, Castro NJC. Uso de plantas medicinais e fitoterápicos: saberes e atos na atenção primária à saúde. *Revista de Atenção à Saúde* 2019;27(59).
 12. Gonçalves JQ, Morais ICO. Uso terapêutico de plantas medicinais e efeitos adversos. *Mostra Científica da Farmácia* 2018;5(1).
 13. Pedroso RS, Andrade G, Pires RH. Medicinal plants: an approach to rational and safe use. *Revista de Saúde Coletiva* 2021;31(2).
 14. Gonçalves RN, Gonçalves JRNS, Buffon MCM, Negrelle RRB, Rattmann YD. Plantas medicinais na Atenção Primária à Saúde: riscos, toxicidade e potencial para interação medicamentosa. *Revista APS*, 2022;25(1):120-153.
 15. Ntungwe NE, Domínguez-Martín, Roberto A, Tavares J, Isca VMS, Pereira P, Cebola M-J, Rijo P. Artemia species: An Important Tool to Screen General Toxicity Samples. *Current Pharmaceutical Design*, 2020;26:2892-2908.
 16. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, Maclaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Plantas Medicinai*s 1982;45:31-34.
 17. Amaral, FMM. Avaliação da qualidade de drogas vegetais avaliadas em São Luiz/Maranhão. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. Maringá.2007;13(1):27-30.
 18. Menezes DA, Silva ADN, Dantas GS, Silva HCSL, Lyra RP, Lima BL, Silva FL, Moreno PRH, Oliveira TKB, Silva JLV. Triagem toxicológica de extratos de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum frente à *Artemia salina* Leach. *Anais da Faculdade de Medicina de Olinda*, 2019;1(3):12-15.

19. Cazarin KCC, Corrêa LC, Zambroni FAD. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 2004;40(3).
20. Silva JLV, Sá AND, Santos JRB, Tavares JF. Evaluation of the oral acute toxicity of *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) on mice. In: XXII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2012.
21. Batista NY. Avaliação da toxicidade do extrato aquoso e óleo essencial *Myrcia sylvatica* (G.Mey.) DC. frente a *Artemia salina*. Reunião Anual Da Sociedade Brasileira Para O Progresso Da Ciência (SPBC), 2010;62.
22. Silva AD, Silva H, LYRA RP, Menezes DA, Dantas GS, Silva FL, Moreno PR, Oliveira TK, Silva JL. Triagem toxicológica de extratos de *Cinnamomum stenophyllum* frente à *Artemia salina* Leach. *An Fac Med Olinda, Recife*, 2019;2(2):11
23. Silva GA, Hidekazu BL. Avaliação da toxicidade de três plantas medicinais frente à *Artemia salina*. 2014. 8p. Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Farmácia, Faculdade Evangélica de Ceres, Goiás, 2014.
24. Terceiro DAJM, Oliveira MAS. Avaliação da toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do infuso das folhas de *Lippia sidoides* (Verbenaceae). *Revista Ciência E Estudos Acadêmicos De Medicina*, 2020;1(12):1-7.
25. Valdés NV, Martins ER, Fonseca FSA. Toxicological effect of essential oils of plants against *Artemia salina*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 2019; 21:261-268.