

## AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DE EXTRATO AQUOSO DO BULBO DE *Crinum erubescens* EM RATOS WISTAR

Pedro Paulo Marcelino Neto<sup>1</sup>; Jeymesson Raphael Cardoso Vieira<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Ciências Biológicas Licenciatura – CCB – UFPE ; E-mail: pedro.paulo87@hotmail.com , <sup>2</sup>Docente/pesquisador do Depto de Histologia e Embriologia – CCB – UFPE. E-mail: jeymesson@gmail.com

**Sumário:** *Crinum erubescens* (Amaryllidaceae) conhecida como Açucena da Água ou Cebola Cecém é uma espécie de planta rústica encontrada nos manguezais e margens de lagos e rios, zonas de elevada produtividade biológica, e é utilizada na medicina popular no tratamento contra malária e infecções inflamatórias. O presente estudo objetivou investigar a toxicidade aguda de extrato aquoso do bulbo de *C. erubescens* em ratos wistar. A coleta do material vegetal foi realizada na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), localizada na cidade do Recife. O material foi submetido a um *screening* fitoquímico onde foram evidenciados protocolos extrativos de identificação de moléculas majoritárias presentes em bulbo. A avaliação da toxicidade aguda do extrato aquoso seguiu o modelo da “Toxicidade Aguda de Classe” baseado no Guia da OECD 423, 2001. No *screening* fitoquímico do extrato de *C. erubescens* foram identificados a presença de alcaloides, açúcares e proteínas e ausência de taninos, triterpenos, cumarinas, flavonoides e saponinas. A DL<sub>50</sub> foi estimada entre 5000-∞ mg/Kg p.c. Contudo, o extrato aquoso do bulbo de *C. erubescens* não apresentou toxicidade aguda, sendo classificado na categoria 5 de toxicidade segundo o Sistema Harmonizado Globalmente para a Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS).

**Palavras-chave:** *Crinum erubescens*; *screening* fitoquímico; toxicidade aguda.

### INTRODUÇÃO

*Crinum erubescens*, popularmente conhecida como açucena-do-brejo, açucena-da-água, crino-cor-de-rosa ou cebola-cecém é uma herbácea nativa de várzeas úmidas da América tropical, incluindo também África do Sul e Ásia Tropical. De folhas largas e grandes, produz flores perfumadas de cor branca e vinho que se formam durante o verão. É considerada uma planta rústica, que gosta de umidade, por isso é encontrada em regiões baixas e úmidas, em locais próximos a lagos e fontes. A reprodução é feita por divisão de bulbilhos que nascem grudados nos bulbos, no outono. Plantas quando ingeridas na forma de chá ou ingeridas “*in natura*” podem causar efeitos adversos como cardíacos, alérgicos, hormonais, irritantes e purgativos, em seres humanos ou animais. A ingestão excessiva de algumas plantas pode causar problemas à saúde. (NEWALL et al., 2002). O conhecimento inadequado da dosagem, da parte da planta empregada e das propriedades terapêuticas das plantas medicinais podem acarretar sérios riscos e provocar danos irreversíveis à saúde (ALMEIDA et al., 2013). Para serem comercializados e utilizados de forma segura os produtos à base de plantas, precisa-se provar que possuem padrões aceitáveis de qualidade, segurança e eficácia (ARGENTA et al., 2011). A avaliação da toxicidade é realizada com o objetivo de determinar o potencial de novas substâncias e produtos causar danos à saúde humana. Testes que avaliam a toxicidade sistêmica aguda são utilizados para classificar e apropriadamente rotular substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade como estabelecido pela legislação (OLIVEIRA, 2008).

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Coleta do Material Vegetal

A espécie *C. erubescens* foi coletada na Universidade Federal de Pernambuco (Brasil). Uma exsicata do material botânico foi depositada no acervo do Herbário do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) devidamente enumerada e catalogada. O material destinado aos protocolos fitoquímicos foi devidamente acondicionado em saco plástico, procedendo seu encaminhamento ao Departamento de Histologia e Embriologia/UFPE para serem realizados os procedimentos extrativos.

### Processamento do Bulbo de *Crinum erubescens*

Os extratos para a análise fitoquímica e toxicológica foram preparados através do tritramento de 1,240 Kg do bulbo de *C. erubescens*. O extrato foi realizado por infusão com solventes de polaridade crescente: hexano, acetato de etila, metanol e água à 80° por 15 minutos. O resíduo sólido foi removido através de filtração simples usando papel de filtro. Os extratos que possuíam solventes orgânicos em sua composição foram devidamente rotaevaporados no Departamento de Biofísica e Radiologia/UFPE e o extrato aquoso foi liofilizado no Departamento de Engenharia Química/UFPE.

### Análise Fitoquímica

Para o *Screening* fitoquímico foi realizada a investigação de carboidratos e proteínas, alcaloides, taninos, triterpenos, cumarinas, flavonoides e saponinas. Os testes fitoquímicos foram realizados no Departamento de Biofísica e Radiologia/UFPE.

### Análise de Carboidratos e Proteínas

A análise dos carboidratos foi baseada no método Molisch, o qual consiste na mistura de 2 gotas de naftol ao composto, seguido da agitação do tubo e o acréscimo de 1 ml de ácido sulfúrico sem agitação. Após 5 minutos, se houverem glicídios no extrato, forma-se um composto de cor violeta em diferentes tonalidades dependendo da quantidade de carboidratos. Foi utilizado a glicose como controle positivo para este teste. Para a análise das proteínas foi usado o método Bradford que se baseia na utilização do corante Coomassie G-250. É dissolvido 100 mg de azul de Coomassie G-250 em 50 ml de etanol e adicionado ácido fosfórico 85%. A solução é misturada até a homogeneização e depois acrescenta-se água deionizada. O resultado é obtido através do espectrofotômetro e a concentração por uma curva de calibração utilizando albumina de soro bovino.

### Cromatografia de Camada Delgada CCD

A análise do extrato aquoso do bulbo de *C. erubescens* foi realizada através de cromatografia em camada delgada (CCD) para a detecção de flavonoides e cumarinas utilizando placas de gel de sílica com sistema de desenvolvimento e hidróxido de potássio como revelador. Para os demais metabólitos analisados foram trabalhadas diversas reações, como a reação de Liebermann-Burchard para evidenciar esteroides (anidrido acético e ácido sulfúrico), reação de Keller-Killiani para fenóis usando cloreto férrico como padrão, assim como o reagente Dragendorff para alcaloides, conforme os resultados evidenciam na Tabela 1.

## Ensaio Toxicológico

Foram utilizados 9 Ratos Wistar fêmeas, com idade de 40 dias, pesando em média 230g. Os animais foram divididos em 3 grupos com 3 animais, grupo controle que recebeu solução salina (C1), grupo tratado com 2.000 mg/Kg de extrato aquoso de *C. erubescens* (C2), e grupo tratado com 300 mg/Kg do mesmo extrato (C3). Para estabelecer a DL<sub>50</sub> (dose letal mediana) foi utilizada a metodologia de acordo com Acute Toxic Class Method (OECD, 2001) para teste de dose aguda tóxica (Guideline 423). Este roteiro da OECD estabelece 4 níveis de dose ( 5 mg/Kg, 50 mg/Kg, 300 mg/Kg e 2.000 mg/Kg). Foi utilizada a dose inicial de 300 mg/Kg. Após a administração da substância, por gavagem, as ratas foram observadas durante os primeiros 30, 60, 120, 180 e 240 minutos. Depois a cada 24 horas até completar 14 dias, realizando uma análise clínica dos sintomas produzidos pela administração da substância teste como: alterações na pele, olhos, mucosas, aparelho respiratório, aparelho circulatório, sistema nervoso autônomo, sistema nervoso central, e atividade somatomotora. O grupo controle recebeu por gavagem 0,2 ml/kg de solução salina.

## RESULTADOS

### Estudo Fitoquímico

A verificação de carboidratos no extrato de *C. erubescens* e nos seus precipitados foi realizada pelo teste de Molish e demonstrou a presença de glicídios em todas as amostras. No teste é possível observar um anel de cor violeta com maior intensidade para o grupo P II indicando, possivelmente, uma maior quantidade de carboidratos, comparado aos outros, para este grupo. Os resultados da análise de proteínas pelo método de Bradford demonstraram que aproximadamente 14 % do extrato aquoso de *C. erubescens* é constituído por proteínas e que a maior parte (94 %) destas está presente no grupo P I. Os resultados do estudo fitoquímico do extrato aquoso da *C. erubescens* mostraram a presença de alcalóides, e a ausência de flavonoides, taninos triterpenos, cumarinas, e saponinas conforme (Tabela 1).

**Tabela 1.** Screening fitoquímico de extrato aquoso de folhas de *Crinum erubescens* por infusão

COMPOSTOS QUÍMICOS	RHIZOPHORA (FOLHAS)
Alcalóides	+
Taninos	-
Triterpenos	-
Cumarinas	-
Flavonóides	-
Saponinas	-

\* (+) Presente (-) Ausente

### Estudo Toxicológico

Após a administração da substância, pelo método de gavagem, o grupo tratado (C2), não apresentou nenhuma alteração nos parâmetros comportamentais. No grupo controle (C1), que recebeu solução salina, também não houve alterações comportamentais. Sendo assim, 100% dos animais sobreviveram.

## DISCUSSÃO

Segundo estudos, os extratos aquosos das folhas dessa espécie contém compostos químicos que possuem propriedades farmacológicas descritas como antiinflamatórias (MARRERO et al.,2006), antitumorais (LIU et al.,2007), antimalárica (LIKHITWITAYAWUID et al.,1993) e antivirais (HWANG et al.,2008). A avaliação de toxicidade subcrônica é uma metodologia amplamente empregada para verificar e classificar substâncias quanto à sua capacidade de provocar danos agudos aos organismos vivos, em altas doses, especialmente injúrias anátomo-patológicas e letalidade, e podem oferecer contribuição para estabelecer parâmetros de segurança, juntamente com outros dados de toxicidade, para a saúde humana (VALADARES, 2006; ZATTA *et al.*, 2009).

### CONCLUSÕES

Os constituintes químicos identificados no extrato aquoso de folhas da espécie *Crinum erubescens* foram alcaloides, açúcares e proteínas. A DL<sub>50</sub> do extrato aquoso de *Crinum erubescens* foi estimada entre 5000-∞ mg/Kg p.c. O extrato aquoso do bulbo de *C. erubescens* não apresentou toxicidade aguda, sendo classificado na categoria 5 de toxicidade segundo o Sistema Harmonizado Globalmente para a Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS).

### AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal de Pernambuco, aos Departamentos de Histologia e Embriologia, ao Departamento de Fisiologia/CCD/UFPE e ao CNPq.

### REFERÊNCIAS

- ARGENTA, S.C.; ARGENTA, L.C.; GIACOMELLI, S.R.; CEZAROTTO, V.S. **Plantas medicinais: cultura popular versus ciência**. Vivências: Revista Eletrônica de Extensão da URI, v.7, n.12: p.51-60, 2011.
- CASTRO, D.L.L. **Aspectos toxicológicos das plantas medicinais utilizadas no Brasil: Um enfoque qualitativo no Distrito Federal**. 2006. 63 f. Dissertação – Curso de Especialização em Qualidade em Alimentos, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.
- BRITO, A.S. **Manual de Ensaio Toxicológicos in vivo**, Ed. Unicamp, Campinas, 1996. 122 p.
- TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO E.S. **Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, vol. 42, n. 2, abr./jun., 2006.
- CUNHA, L.C.; MELO, D.C.A.; PEREIRA, M.E.; MELO, D.S.; PARENTE, L.L.; SILVA, M.A.C.; CONCEIÇÃO, E.C.; GONZAGA, L.Q.S. **Avaliação da toxicidade aguda do extrato aquoso de *Apeiba tibourbou* Aubl (Tiliceae), em camundongos e ratos**. Rev. Ciênc. Farm. Apl., v. 34, n. 3, p. 357- 362, 2013.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. **Guidelines for the Testing of Chemicals**, OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development; 2001.
- TCHAMADEU, M.C.; DZEUFLET, P.D.D.; NANA, P.; KOUAMBOU NOUGA, C.C.; NGUEGUIM TSOFAK, F.; ALLARD J.; BLAES SIAGAT, N.R.; ZAPFACK, L.;

GIROLAMI, J.P.; TACK, I.; KAMTCHOUING, P.; DIMO, T. **Acute and sub-chronic oral toxicity studies of an aqueous stem bark extract of *Pterocarpus soyauxii* Taub (Papilionaceae) in rodents.** *J Ethnopharmacol.* 2011;133(2):329-35. DOI: 10.1016/j.jep.2010.09.035.

VALADARES, M.C. **Avaliação de Toxicidade Aguda: Estratégias Após a “Era do Teste DL50”.** *Rev Eletr Farm.* 2006;3(2):93-8.

VEIGA J.V.F.; PINTO A.C. **Química Nova** 2002, 25, 273.