

ATIVIDADE CITOTÓXICA DE ÓLEO ESSENCIAL FOLIAR DE *Croton grewoides* BAILL. (EUPHORBIACEAE)

Maíra H. M. S. (1); Divanize B. S. B. (2); Rayza H. G. S. (3); Antônio F. M. O. (4)

(Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, e-mail: mairamhms@hotmail.com (1); Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica, e-mail: divabarros7@gmail.com (2); Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, e-mail: rayzahelen@hotmail.com (3); Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, e-mail: afmoliveira@gmail.com (4)

Resumo: O crescente interesse por novos produtos naturais que possam agir como fármacos, faz da Caatinga uma região de interesse devido sua grande biodiversidade. Os óleos essenciais (OE) são frações voláteis naturais que conferem os aromas percebidos em algumas espécies vegetais que tem despertado um interesse considerável para utilização médica por todo mundo em virtude de sua complexa composição e seus efeitos farmacológicos que os tornam potenciais fontes para o desenvolvimento de novas drogas. Com isso, o objetivo deste trabalho foi realizar ensaios de citotoxicidade com o OE foliar de *Croton grewoides* sobre o modelo do microcrustáceo *Artemia salina* Leach para determinar a concentração letal para 50% dos indivíduos (LC50 $\mu\text{g/mL}$). Para isso, foi extraído óleos essencial de folhas de *Croton grewoides*, coletados no Parque Nacional Vale do Catimbau, Buíque-PE, por hidrodestilação durante 3 horas e em seguida testados em *Artemia salina* quanto a sua toxicidade com diluições seriadas (1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 $\mu\text{g/ml}$) de soluções de água do mar com Tween 80. Sendo medida a concentração letal para 50% de mortalidade após 24 h de exposição às diferentes soluções. LC50 crônico e intervalos de confiança de 95% foram determinados usando o método probit 10, como medida de toxicidade do óleo. *C. grewoides* apresentou LC50 de 1787 $\mu\text{g/ml}$, caracterizando-se como um óleo de toxicidade baixa ou ausente, o que o torna excelente fonte de investigação de outras atividades biológicas para usos terapêuticos.

Palavras-chave: Artemia, Bioatividade, Caatinga, Citotoxicidade, Óleos voláteis.

INTRODUÇÃO

As plantas constituem fontes naturais de diversas substâncias e metabólitos secundários. A riqueza destes compostos fundamenta a exploração das espécies vegetais desde a antiguidade, pois são capazes de conferir

resistência ao ataque de pragas e de doenças. Com isso, as plantas se tornaram uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais, pode-se utilizar para a produção de inúmeros fármacos (WALL E WANI, 1996). Embora haja utilização de um grande número de espécies pela medicina tradicional, o uso de fitoterápicos e princípios ativos vegetais pela indústria farmacológica ainda é bastante deficitária.

O Brasil, devido sua extensão territorial, possui uma grande variedade de ecossistemas, sendo a Caatinga uma região rica em biodiversidade, com sua flora ainda pouco explorada nesse sentido. Nos últimos anos a caatinga tem sido alvo de atividades de bioprospecção, visando maior conhecimento sobre as espécies nativas e a bioconservação desse importante bioma do Brasil.

Este ecossistema apontado como rico em espécies endêmicas e bastante heterogêneo, corresponde a um habitat tipicamente ocupado pelas Euphorbiaceae, uma das famílias botânicas que melhor representa a Caatinga, apresentando grande número de espécies endêmicas.

Dentre os gêneros dessa família destaca-se o *Croton* L. por ser o segundo maior e mais diverso gênero das Euphorbiaceae, com cerca de 1.200 espécies, principalmente distribuídas nas Índias Ocidentais e América do Sul com algumas na América do Norte (WEBSTER, 1994), África e Madagascar (WEBSTER, 1993). Suas espécies são árvores, arbustos, ervas e lianas que ocorrem na maioria dos ecossistemas tropicais (SECCO, 1992; SECCO, 2008). No Brasil ocorrem cerca de 316 espécies e 6 variedades, sendo 252 endêmicas (CORDEIRO *et al.*, 2016), levando o país à categoria de mais diverso do gênero. O Nordeste brasileiro revela alta diversidade no gênero, possuindo cerca de 85 espécies, destas, 69 ocorrem na caatinga e 31 espécies em Pernambuco (SILVA; SALES; CARNEIRO-TORRES, 2010).

As espécies de *Croton*, por estarem em habitats principalmente com condições extremas como a Caatinga, apresentam uma diversidade química de compostos secundário muito grande, com óleos essenciais e constituintes ativos como terpenóides, flavonóides e alcalóides, sendo com frequência utilizada na medicina popular (COSTA *et al.*, 2008).

Por estarem presentes em diversas partes das plantas, possuem o seu potencial farmacológico comprovado em estudos científicos, por serem de fácil extração e economicamente viáveis, os óleos essenciais têm assumido papel de destaque nas pesquisas em produtos naturais.

Os compostos bioativos geralmente apresentam toxicidade, principalmente em altas doses. Desta forma, a avaliação do potencial tóxico em um organismo animal menos complexo pode ser usada para um monitoramento simples e rápido (MACIEL, 2002). O microcrustáceo *Artemia salina* Leach (Artemiidae) é um invertebrado de ecossistema aquático salino e marinho usado em ensaios laboratoriais de toxicidade e outras ações de estimativa de dose letal. São usados na avaliação toxicológica de extratos de plantas, bem como em óleos essenciais vegetais, por ser um teste rápido, eficiente, barato e que requer uma quantidade pequena de amostra.

Croton grewoides é arbusto e subarbusto e desenvolve-se em substratos terrícolas. Não é endêmica do Brasil, está presente geograficamente em Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piuí, Rio Grande do Norte, Sergipe e Minas Gerais, ocupando o domínio fitogeográfico da Caatinga. Conhecido popularmente como canelinha e alecrim-de-cabocla, é sinônimo heterotípico de *Croton zehntneri* Pax & K.Hoffm. e homotípico de *Croton glycosmeus* Müll.Arg. e *Oxydectes grewoides* (Baill.) Kuntze. (CORDEIRO *et al.*, 2016).

Com isso, o objetivo deste trabalho foi realizar ensaios de citotoxicidade de óleo essencial foliar de *Croton grewoides* com o modelo do microcrustáceo *Artemia salina* Leach para determinar a concentração letal para 50% dos indivíduos (LC50 µg/mL).

METODOLOGIA

*** Área de coleta**

As coletas das espécies de *Croton* L. foram realizadas exclusivamente no perímetro da Caatinga (Vale do Catimbau, Buíque, PE).

As coletas e observações de campo foram realizadas no Parque Nacional Vale do Catimbau, localizado a 285 Km do Recife. Fica situado entre o Agreste e o Sertão de Pernambuco, abrangendo terras do município de Buíque e estendendo-se por áreas semi-áridas de Tupanatinga, Inajá e Ibimirim, já em plena Microrregião do Sertão do Moxotó.

O Parque é formado por elevações montanhosas de topo suave, encostas abruptas e vales abertos, distribuídos em aproximadamente 90.000 ha. Temperatura e precipitação médias anuais são de 25°C e 1.095,9 mm com maior pluviosidade entre abril a junho (SILVA; SCHLINDWEIN; RAMALHO, 2007).

Segundo o Ministério do Meio Ambiente (MMA) (2002), o PARNA do Catimbau é uma área de extrema importância para a conservação da biodiversidade. Do ponto de vista geomorfológico, o PARNA do Catimbau está

inserido no Planalto da Borborema, apresentando relevo ondulado a fortemente ondulado, com altitudes variando de 650 a 1.000 m (CPRM 2005). Os solos são rasos a profundos, predominando Planossolo e Podzólico nas encostas e circundando a área serrana e Litólicos no topo das serras. O clima é do tipo tropical chuvoso, com verão seco (CPRM 2005).

* Coleta do material botânico

A coleta foi realizada durante a estação seca do ano de 2016, onde folhas de *Croton grewoides* foram coletadas de uma mesma população. Sendo voucher depositado no Herbário UFP da Universidade Federal de Pernambuco sob o número 82.887.

* Extração de óleos essenciais

Os óleos essenciais de folhas de *Croton grewioide* foram obtidos por hidrodestilação com água destilada, utilizando aparelho tipo Clevenger, por um período de três horas para cada planta (PEREIRA *et al.*, 2011). Em seguida, o óleo foi coletado e seco com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e mantido em refrigerador (-5 °C) num frasco de vidro âmbar para os ensaios biológicos.

O rendimento do óleo essencial foi definido como o quociente do peso do óleo recolhido e o peso seco do material vegetal extraído (SANTOS *et al.*, 2014) e os dados foram submetidos à Análise de Variância- ANOVA (one way) utilizando o teste a posteriori de Tukey no Minitab 2016, adotando o nível de significância de 0,05 de probabilidade.

* Teste de letalidade em *Artemia salina*

Óleo essencial foliar de *Croton grewioide* foi avaliado em um teste para letalidade a larvas de *Artemia salina*. Toxicidade do óleo essencial (OE) foi testado usando uma diluição seriada de 1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 µg/ml de soluções de água do mar com Tween 80. Dez náuplios foram usados em cada teste e sobreviventes contados após 24 h. Três repetições foram utilizados para cada concentração, sendo também uma série paralela de testes conduzidos com o branco controle. A concentração letal para 50% de mortalidade após 24 h de exposição, LC50 crônico e intervalos de confiança de 95% foram determinados usando o método probit 10, como medida de toxicidade do óleo ou frações.

Doses letais do óleo essencial foram determinadas usando o programa Prisma de software

LC50, com base na análise probit de Finney método (FINNEY, 1971).

A toxicidade foi medida em termos de CL50 (letal concentração de 50% de metanauplios) e de acordo para Dolabela (1997): LC50 <80 µg / mL, foi considerado altamente tóxico; entre 80 µg / mL e 250 µg / mL, moderadamente tóxico; LC50 > 250 µg / mL, baixa toxicidade ou não tóxico. Extratos que não mostram 50% de mortalidade em qualquer das concentrações testadas foram considerados não tóxico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Croton grewioide apresentou um rendimento percentual médio de óleo essencial (OE) foliar de $3.40 \pm 0,45$ na estação seca.

Estudos de toxicidade utilizando *Artemia salina* foram sugeridos em muitos compostos com atividade biológica para determinar sua potencial aplicação terapêutica (PARRA *et al.*, 2001).

O OE de *C. grewioides* foi testado quanto a sua toxicidade sobre *Artemia salina* para determinar a concentração letal para 50% dos indivíduos (LC50 µg/mL) e apresentou LC50 de 1787 µg/mL que, de acordo com Ramos *et al.* (2009), caracteriza-se como um óleo de baixa ou toxicidade ausente. O que corroborou com a toxicidade apresentada pelo OE de *C. argyrophyloides*, que teve um LC50 de 275µg/ml, mostrando-se pouco ou não tóxico para o teste com *Artemia salina* (FRANÇA-NETO, 2014). Já o OE de *C. zehntneri* apresentou alta toxicidade utilizando *A. salina*, com LC50 de 4.54 ± 0.21 µg/ml (ANDRADE *et al.*, 2015).

Os representantes do gênero *Croton* L. costumam apresentar-se como ervas ou arbustos, que são utilizadas simplesmente como bebidas na forma de chás, sendo reconhecidos tanto por suas propriedades medicinais, quanto tóxicas. As espécies que compõe esse gênero são geralmente odoríferas e contém um látex cáustico que é responsável por causar dermatite e que pode ser venenoso. A toxicidade do gênero está associada à presença de diterpenóides (HOEHNE, 1935; RODRÍGUEZ, HIRUMA-LIMA E BRITO, 2004)

Várias espécies de *Croton* L. tiveram seus extratos brutos, bem como suas frações testadas quanto sua toxicidade utilizando *Artemia salina* como modelo (FRANSSSEN *et al.*, 1997; RAMOS *et al.*, 2009; MEDINA *et al.*, 2009; DA COSTA *et al.*, 2010; CAMPOS *et al.*, 2015; PRAVEEN *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2017), porém poucos estudos apresentam resultados da toxicidade dos óleos essenciais deste gênero (FRANÇA-NETO, 2014; ANDRADE *et al.*, 2015).

CONCLUSÕES

Com este trabalho foi possível concluir que, o objetivo do trabalho foi atingido, encontrando uma toxicidade baixa ou ausente. Em paralelo o alto rendimento de óleo essencial obtido, atendeu às expectativas e corroborou com a hipótese de ser uma boa espécie nativa para uso com função terapêutica, pois somada às outras atividades biológicas já comprovadas na literatura, como atividade antimicrobiana e antioxidante, torna-se uma boa candidata com um excelente potencial bioativo, podendo ser investigado quanto a sua capacidade antitumoral.

REFERÊNCIAS

ANDRADE *et al.* Isolation, characterization and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activity of estragole, obtained from the essential oil of *Croton zehntneri* (Euphorbiaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências** (2015) 87(1): 173-182.

CAMPOS *et al.* Biological Screening of Select Puerto Rican Plants for Cytotoxic and Antitumor Activities. **P R Health Sci J.** 2015; 34(1): 25–30.

CORDEIRO, I., SECCO, R.,CARDIEL, J.M.,STEINMANN, V.,CARUZO, M.B.R.,RIINA, R.,LIMA, L.R. DE,MAYA-L., C.A.,BERRY, P.,CARNEIRO-TORRES, D.S.,O.L.M. SILVA,SALES, M.F.D.,SILVA, M.J.DA,SODRÉ, R.C.,MARTINS, M.L.L.PSCHEIDT, A.C.,ATHIÊ-SOUZA, S.M.,MELO, A.L.D.,OLIVEIRA, L.S.D.,PAULA-SOUZA, J.,SILVA, R.A.P. 2016. Euphorbiaceae in lista de espécies da flora do brasil. Jardim botânico do rio de janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/fb113>>. acesso em: 18 Jan. 2016

COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; PEREIRA, C. K. B.; DE SOUZA, E. O.; CALDAS, G. F. R.; SILVA, M. R.; SANTOS, N. K. A.; MOTA, M. L.; DOS SANTOS, P. F. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade Estragol). **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy** 18(4): 583-586, Out./Dez. 2008

DA COSTA *et al.* Biological screening of araripe basin medicinal plants using *Artemia salina*

Leach and pathogenic bacteria. **Pharmacognosy Magazine**. Oct-Dec 2010. Vol 6, Issue 24

DOLABELA, M. F. 1997. Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti-*Tripanossoma cruzi* de extratos vegetais, produtos naturais e substancias sintéticas. Dissertação de Mestrado - UFMG, Belo Horizonte, 128p.

FINNEY, D. 1971. Em probit analysis; 3a ed., Cambridge University Press: Cambridge.

FRANÇA-NETO *et al.* Essential oil of *Croton argyrophyloides*: toxicological aspects and vasorelaxant activity in rats. **Natural product communications**. October 2012. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/233534418>>

FRANSSEN *et al.* In Vivo and In Vitro Antiplasmodial Activities of Some Plants Traditionally Used in Guatemala against Malaria. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Vol. 41, No. 7, p. 1500–1503, July 1997.

HOEHNE, F. C. Plantas e substâncias vegetais tóxicas. **Graficars**: São Paulo, 1935.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, J. V.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, 2002, 25, 429.

PARRA, A. L.; SILVA, Y. R. AND IGLESIA, B. L. 2001. Acute and subacute toxicity (28 days) of a mixture of ursolic acid and oleanolic acid obtained from *Bouvardia ternifolia* in mice. **Phytomedicine** 8: 395.

PEREIRA, A. Q.; CHAVES, F. C. M.; PINTO, S. C.; LEITÃO, S. G.; BIZZO, H. R. Isolation and Identification of cis-7-Hydroxycalamenene from the Essential Oil of *Croton cajucara* Benth. **J. Essent. Oil Res.**, 23, 20–23. 2011.

PRAVEEN *et al.* Toxicological Testing Of Barks From *Croton rhamnifolioides* (Euphorbiaceae). **Int J Pharm Pharm Sci**, Vol 7, Issue 4, 408-410, 2015.

RAMOS *et al.*, Antibacterial and cytotoxic properties of some plant crude extracts used in Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 19(2A): 376-381, Abr./Jun. 2009.

RODRÍGUEZ, J. A.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. S. Antiulcer activity and subacute toxicity of trans-dehydrocrotonin from

Croton cajucara. **Human & experimental toxicology**, 2004, 23, 455.

SANTOS, G. K. N.; DUTRA, K. A.; LIRA, C. S.; LIMA, B. N.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; MARANHÃO, C. A.; BRANDÃO, S. S. F.; NAVARRO, D. M. A. F. Effects of *Croton rhamnifolioides* Essential Oil on *Aedes aegypti* Oviposition, Larval Toxicity and Trypsin Activity. **Molecules**, 19, 16573-16587; doi:10.3390/molecules191016573, 2014.

SECCO, R.S. Notas sobre as lianas do gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae). **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Sér. Bot.** 1992, 8, 265–281.

SECCO, R.S. Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) na Amazônia brasileira: um ensaio taxonômico, 1st ed.; **Museu Paraense Emílio Goeldi**: Belém, Brazil, 2008; pp. 119–123.

SILVA *et al.* Screening Fitoquímico e Avaliação da Toxicidade de *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae) frente à *Artemia salina* Leach. **Rev. Virtual Quim.** Vol 9, No. 3, 2017.

SILVA, J. S.; SALES, M. F.; GOMES, A. P. S.; CARNEIRO-TORRES, D. S. Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta bot. bras.** 24(2): 441-453. 2010.

SILVA, M., SCHLINDWEIN, C.; RAMALHO, M. (2007). Padrão De Forrageio de *Xylocopa* (Neoxylocopa) *Ordinaria* (Hymenoptera, Apidae) Em Ambiente De Caatinga, Vale Do Catimbau-Pernambuco. In: VIII Congresso de Ecologia do Brasil, Caxambu – MG. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**. Minas Gerais, (2007).

WALL, M. E, WANI, M. C. Camptothecin and taxol. From discovery to clinic. **Journal for Ethnopharmacology**, v. 51, p. 239-254. 1996.

WEBSTER, G.L. Synopsis of the genera and suprageneric tax of Euphorbiaceae. **Ann. Mo. Bot. Gard.** 1994, 81, 33–144.

WEBSTER, G.L. A provisional synopsis of the section of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). **Taxon** 1993, 42, 793–823.