

DL50 DE EXTRATOS VEGETAIS DE *EUGENIA CATHARINENSIS* EM EMBRIÕES DE *GALLUS SP*

DL50 OF *EUGENIA CATHARINENSIS* VEGETABLE EXTRACTS IN *GALLUS SP* EMBRYOS

Sheila Wayszceyk^{1*}; Debora Delwing Dal Magro¹, Micheli Debiasi Alberton³;
Claudia Almeida C Albuquerque².

¹ Departamento de Medicina, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, SC, Brasil.

² Departamento de Ciências Naturais, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, SC, Brasil.

³ Departamento de Química, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, SC, Brasil.

* Autor correspondente: Rua Antônio da Veiga, 140, Blumenau, SC, Brasil. CEP 89030-903,
Fone (47) 3321-0200, sheilaw@furb.br.

RESUMO

O conhecimento da biodiversidade vegetal, além de ser considerada uma fonte de modelos químicos para a síntese de novas moléculas, também deve ser incentivado como um recurso natural com possível atividade farmacológica. Ao longo do desenvolvimento embrionário, os sistemas orgânicos estão sujeitos à ação de fatores exógenos e endógenos que podem interferir na expressão do padrão estrutural e funcional da espécie animal. Neste estudo foi avaliado a DL50 dos extratos vegetais (hidroalcoólico, diclorometano e acetato de etila) de *Eugenia catharinensis* em embriões de *Gallus domesticus*. Os resultados preliminares demonstram elevada mortalidade (100%) dos extratos vegetais acetato de etila e diclorometano, enquanto o hidroalcoólico se mostrou menos tóxico (cerca de 30%) aos embriões. A partir destes dados iniciais, o extrato hidroalcoólico será avaliado isoladamente, determinando-se outras análises bioquímicas ou morfológicas.

Palavras-Chave: embriotoxicidade; embrião; dose letal; extratos vegetais; desenvolvimento.

ABSTRACT

Knowledge of plant biodiversity, besides being considered a source of chemical models for the synthesis of new molecules, should also be encouraged as a natural resource with possible pharmacological activity. Throughout embryonic development, organic systems are subject to the action of exogenous and endogenous factors that may interfere with the expression of the structural and functional pattern of the animal species. In this study, we evaluated the LD50 of plant extracts (hydroalcoholic, dichloromethane and ethyl acetate) of *Eugenia catharinensis* in *Gallus domesticus* embryos. Preliminary results show high mortality (100%) of plant extracts ethyl acetate and dichloromethane, while hydroalcoholic was less toxic (about 30%) to embryos. From these initial data, the hydroalcoholic extract will be evaluated separately, determining other biochemical or morphological analyzes.

Keywords: embryotoxicity; embryo; lethal dose; plant extracts; development.

INTRODUÇÃO

Diversas espécies da família Myrtaceae são utilizadas popularmente, como a *Eugenia uniflora*, que tem finalidade antirreumática, antidiabética, adstringente, analgésica, hipoglicemiante, diurética e reguladora do sistema digestório (KIRTIKAR; BASU, 2006; SERAFIN et al., 2007; SAHA et al., 2013). Dentre os compostos já identificados nas espécies da família Myrtaceae, temos os taninos, flavonoides, ácidos, triterpenos, sesquiterpenos e saponinas (SERAFIN et al., 2007; NERI-NUMA et al., 2013). Flavonoides e compostos fenólicos já foram isolados de espécies do gênero *Eugenia* (TIMBOLA et al., 2002; KUSKOSKI et al., 2003; EINBOND et al., 2004). Dentre as atividades biológicas dos flavonoides, a antioxidante é a mais estudada. Esta atividade está ligada a uma combinação de suas excelentes propriedades quelantes de ferro e sequestradoras de radicais livres, além da inibição de muitos outros sistemas que participam de processos pró-oxidantes, sendo também capazes de ativar sistemas antioxidantes endógenos (TRUEBA, 2003).

Porém, dentro desta realidade surgem preocupações acerca do uso popular e tradicional sem avaliação toxicológica dos recursos vegetais, sendo apenas o uso empírico insuficiente para validar eticamente as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006; DE FÁTIMA AGRA; DE FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007; AGRA et al., 2008). As reações adversas provenientes do uso de plantas ou extratos vegetais podem ser decorrentes de seus componentes, contaminantes ou de sua preparação (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). Estes efeitos podem também ocorrer por substâncias isoladas de plantas, como diversos compostos orgânicos, produtos do metabolismo primário e secundário, e que podem exercer efeitos benéficos ou maléficos sobre o organismo. Para assegurar o uso das plantas, é imprescindível a realização de testes de eficácia, segurança e qualidade, utilizando-se métodos para a obtenção de informações toxicológicas pré-clínicas através de pesquisas *in vitro* e *in vivo* (ZÖLLNER; SCHWARZ, 2013). No entanto, tais estudos de toxicidade de plantas medicinais são pouco realizados (VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005; CLEFF et al., 2008).

Buscando avaliar a toxicidade de extratos vegetais, foram escolhidos três principais extratos de *Eugenia catharinensis* (hidroalcoólico, diclorometano e acetato de etila) para calcularmos a DL50 em embriões de galinha.

MATERIAIS E MÉTODOS

Na presente análise, foram testados os efeitos dos extratos hidroalcoólico, diclorometano e acetato de etila em ovos embrionados de *Gallus domesticus in vivo* (CEUA:05/2017). Os ovos foram incubados pelo período de 7 dias a 37°C em incubadora com umidade controlada (55%), sendo avaliada a viabilidade embrionária diariamente através de uma abertura na parede lateral da casca do ovo, local onde eram administrados 50µL de cada concentração dos extratos vegetais estudados. Foram utilizados seis ovos embrionados para cada concentração testada (0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, e 6.4 µg/g do extrato hidroalcoólico, diclorometano e acetato de etila). Durante a preparação das concentrações, foi utilizado o Tween 80 nas maiores doses testadas. O tratamento foi realizado em E3 e analisados após uma semana em E9, de acordo com Hamburger e Hamilton (1993). Durante este período, foram mantidas as aberturas das cascas dos ovos, protegidas com fita adesiva transparente atóxica.

Após a administração das concentrações, era realizada a observação diária até o fim do experimento para verificar a mortalidade embrionária. Nos ovos não viáveis (morte embrionária), ou ao final

de sete dias, era realizada a eutanásia para análise morfológica externa do embrião (aspecto geral) e, após, os embriões eram coletados de forma asséptica, fixando-os em formol 10%. Para a determinação da DL50, foi contabilizado o número de animais eventualmente mortos para a determinação da dose responsável pela morte de 50% dos animais experimentais (DL50), com limite de confiança de 95%, segundo o método de Litchfield e Wilcoxon (1949), no qual se conta o número de animais mortos para cada grupo e se calcula o percentual.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ensaio para determinação do grau de toxicidade através da investigação da dose letal 50% (DL50), apresentado pelos extratos vegetais hidroalcoólicos, diclorometano e acetato de etila de *Eugenia catharinensis*, houveram mortes de embriões conforme Tabela I. Os dados revelaram uma elevada taxa de mortalidade nos embriões do grupo acetato de etila e diclorometano. A elevada toxicidade destes extratos pode estar relacionada à preparação da dose de tratamento em que os extratos foram emulsionados em Tween 80 para facilitar a entrada da substância nas células dos tecidos dos embriões. Tween é um tensoativo não iônico, pouco tóxico para membranas biológicas (REGE; KAO; POLLI, 2002), constituído por ésteres de ácidos graxos de polioxietileno sorbitol. Esta substância é utilizada como detergente, aumentando a permeabilidade das membranas biológicas, e com isso a velocidade de transporte através da membrana (AZMIN et al., 1985; REGE; KAO; POLLI, 2002). Neste sentido, os ésteres de ácidos graxos de polioxietileno sorbitol pode provocar alterações morfológicas na estrutura da membrana das células embrionárias, podendo, nas doses mais altas, atuar toxicamente. Embriões de *Gallus domesticus* têm sido amplamente usados para avaliar a embriotoxicidade de produtos químicos (SHEPARD, 1976). Uma das formas de avaliação se refere às análises de várias substâncias, cujos produtos químicos afetam diretamente o embrião, e tanto com mortes como a observação de malformações, que desta forma podem ser monitoradas e melhor estudadas (DOMOWICZ et al., 2011).

Os resultados mostraram que a dose de 0,05 µg/g extrato hidroalcoólico foi responsável por 33,3% das mortes, enquanto os extratos de diclorometanos provocaram o óbito de 50% e de acetato de etila obteve 66,7% dos óbitos. Pode-se ainda verificar, entre os embriões analisados, alterações no padrão de desenvolvimento embrionário, de acordo com o estágio do desenvolvimento.

Tabela I - Taxa de mortalidade e determinação da DL50 dos embriões de *G. domesticus*.

Dose (µg/g)	Extratos de <i>Eugenia catharinensis</i>		
	Hidroalcoólico	Diclorometano	Acetato de etila
0,05	33,3	50,0	66,7
0,1	33,3	66,7	83,3
0,2	33,3	66,7	100,0
0,4	50,0	66,7	100,0
0,8	83,3	83,3	100,0
1,6	83,3	83,3	100,0
3,2	100,0	100,0	100,0
4	100,0	100,0	100,0

Fonte: Compilação dos autores.

Os embriões mortos, frequentemente, exibiam múltiplas malformações. Havia, em média, mais de duas malformações por embrião morto. As malformações em alguns órgãos vitais poderiam estar relacionadas com a mortalidade do embrião. A maioria das mortes ocorreu em embriões entre os estágios E4 e E5. A Tabela II relaciona as principais alterações morfológicas.

Tabela II - Análise qualitativa dos achados morfológicos observados nos embriões de *Gallus domesticus* tratados com os extratos vegetais.

Extratos	Características morfológicas (membros, mandíbula e tóraco-abdominal)	%
Extrato Hidroalcoólico	membros presentes, sem desenvolvimento mandibular e abertura tóraco-abdominal	15
Extrato Diclorometano	membros presentes, sem desenvolvimento mandibular e abertura tóraco-abdominal	42
Extrato Acetato de Etila	membros presentes, sem desenvolvimento mandibular e abertura tóraco-abdominal	43

Fonte: Compilação dos autores.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, foram descritos alguns parâmetros de embriotoxicidade que podem ser importantes para trabalhos futuros com os extratos de *E. catharinensis*. A observação dos embriões e a determinação da DL 50 de embriões tratados com várias doses dos extratos hidroalcoólico, diclorometano e a acetato de etila, demonstraram que compostos vegetais podem ser tóxicos para embriões dependendo da dose e do veículo, como verificado por Heinz *et al.* (2009), e foi demonstrado que a fração hidroalcoólica foi a menos tóxica para embriões de aves, servindo de base para testes futuros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRA, M. D. F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 472–508, 2008. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbfar/a/fC7snvLkwzFsMv3mfVRGNc/?lang=en>>. Acesso em: 17 jun. 2021.
- AZMIN, M. N. et al. The effect of non-ionic surfactant vesicle (niosome) entrapment on the absorption and distribution of methotrexate in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 37, n. 4, p. 237–242, 1985. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2860220/>>. Acesso em: 30 jun. 2021.
- CLEFF, M. B. et al. Toxicidade pré-clínica em doses repetidas do óleo essencial do *Origanum vulgare* L. (Orégano) em ratas Wistar. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 5, p. 704–709, 2008. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/230813682_Toxicidade_Pre-Clinica_em_Doses_Repetidas_do_Oleo_Essencial_do_Origanum_vulgare_L_Oregano_em_Ratas_Wistar>. Acesso em: 21 jun. 2021.
- DE FÁTIMA AGRA, M.; DE FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114–140, 2007. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbfar/a/mK3xKRWQ5tK6WHBKJKGGpxD/?lang=en>>. Acesso em: 20 jun. 2021.
- DOMOWICZ, M. S. et al. Astrocyte precursor response to embryonic brain injury. **Brain Research**, v. 1389, p. 35–49, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21396923/>>. Acesso em: 1 jul. 2021.

- EINBOND, L. S. et al. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**, v. 84, n. 1, p. 23–28, 2004. Disponível em: <<https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.489.3434&rep=rep1&type=pdf>>. Acesso em: 27 jun. 2021.
- HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of morphology**, v. 88, n. 1, p. 231–272, 1993. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1304821/>>. Acesso em: 14 jun. 2021.
- HEINZ, G. H. et al. Species differences in the sensitivity of avian embryos to methylmercury. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 56, n. 1, p. 129–138, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18421496/>>. Acesso em: 19 jun. 2021.
- KIRTIKAR, K. R.; BASU, B. D. **Indian Medicinal Plants**. India: M/s Bishen Singh Mahendra Pal Singh, 2006.
- KUSKOSKI, E. M. et al. Characterization of anthocyanins from the fruits of Baguagçu (*Eugenia umbelliflora* Berg). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 18, p. 5450–5454, 2003. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf030014z>>. Acesso em: 1 jul. 2021.
- LITCHFIELD, J. T.; WILCOXON, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 96, n. 2, p. 99–113, 1949. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18152921/>>. Acesso em: 27 jun. 2021.
- NERI-NUMA, I. A. et al. Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of araçá-boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh - Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest. **Food Research International**, v. 50, n. 1, p. 70–76, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996912003912>>. Acesso em: 2 jul. 2021.
- REGE, B. D.; KAO, J. P. Y.; POLLI, J. E. Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 4–5, p. 237–246, 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12208453/>>. Acesso em: 19 jun. 2021.
- SAHA, S. et al. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activities of extract and fractions of *Eugenia jambolana* root bark and isolation of phytoconstituents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 4, p. 651–661, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0102695X13700826>>. Acesso em: 28 jun. 2021.
- SERAFIN, C. et al. Avaliação do potencial antimicrobiano de *Plinia glomerata* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 578–582, 2007. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbfar/a/QkjQcgFQMDHBhscjhsPXHr/?format=pdf&lang=pt>>. Acesso em: 25 jun. 2021.
- SHEPARD, T. H. **A Catalog of Teratogenic Agents**. 2. ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1976.
- TIMBOLA, A. K. et al. A new flavonol from leaves of *Eugenia jambolana*. **Fitoterapia**, v. 73, n. 2, p. 174–176, 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11978436/>>. Acesso em: 29 jun. 2021.
- TRUEBA, G. P. Los flavonoides: Antioxidantes o prooxidantes. **Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas**, v. 22, n. 1, p. 48–57, 2003. Disponível em: <<http://scielo.sld.cu/pdf/ibi/v22n1/ibi07103.pdf>>. Acesso em: 25 jun. 2021.
- TUROLLA, M. S. dos R.; NASCIMENTO, E. de S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 289–306, 2006.

Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbcf/a/Jtb4HWgGG7zPtpyw9zDmKts/abstract/?lang=pt>>. Acesso em: 23 jun. 2021.

VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/qn/a/CHhqMPvgfDyKcv9XD3HSBsc/?lang=pt>>. Acesso em: 16 jun. 2021.

ZÖLLNER, T.; SCHWARZ, M. Herbal reference standards: Applications, definitions and regulatory requirements. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 1, p. 1–21, 2013. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbfar/a/qH5NzbbkrTwRsYgWG9YSx6z/abstract/?lang=en>>. Acesso em: 4 jul. 2021.