



## TRIAGEM FITOQUÍMICA PRELIMINAR DAS RAÍZES DE *BROMELIA ANTIACANTHA* BERTOL E AÇÃO TOXICOLÓGICA UTILIZANDO MICROCRUSTÁCEOS DE *ARTEMIA SALINA*

IANKA SILVA LEMOS; REGINEIDE XAVIER SANTOS

### RESUMO

As plantas produzem diversos metabólitos secundários que, frequentemente, são relacionados com a adaptação das plantas aos seus ambientes. A *Bromelia antiacantha* Bertol é uma bromeliácea, algumas vezes utilizada pela população como medicamento para tratar de diversas enfermidades. A utilização de testes fitoquímicos colorimétricos visa identificar qualitativamente os metabólitos secundários presentes no material analisado. Sabendo da riqueza de metabólitos secundários da família Bromeliaceae, fez-se indispensável a realização de pesquisa com a espécie *B. antiacantha* Bertol. Os objetivos deste estudo foi realizar uma triagem fitoquímica preliminar em raízes de *B. antiacantha* e verificar a sua ação toxicológica utilizando microcrustáceos (*Artemia salina*) como organismos-teste. As raízes foram coletadas na zona rural do município de Poções - BA. O perfil farmacognóstico foi realizado através de testes de precipitação e colorimétrico e o bioensaio toxicológico foram utilizados cistos de *A. salina* que foram adquiridos em loja especializada em produtos para aquário, com o extrato bruto da raiz da planta. As análises estatísticas foram feitas por meio de testes de normalidade. A atividade de toxicidade analisada foi positiva com valor de CL50 15,6 µg/mL (CL50 < 80 µg/mL), indicando alta taxa de toxicidade e os testes fitoquímicos realizados revelaram a presença de alcaloides, taninos, flavonoides, esteroides e saponinas. Levando em consideração que os estudos mais vistos na literatura tratam das folhas e frutos e, tendo em vista que não há estudos sobre a bioprospecção da raiz da espécie em questão, os resultados demonstram o potencial da espécie, sendo esse trabalho relevante para novos estudos com a espécie *Bromelia antiacantha* Bertol, vislumbrando suas aplicações biológicas e farmacológicas.

**Palavras-chave:** metabólitos secundários; bromeliaceae; letalidade; bioprospecção.

### 1 INTRODUÇÃO

A fitoterapia visa o estudo das funções terapêuticas proporcionadas por plantas e vegetais, com o intuito de prevenir e tratar diversas doenças. Tais plantas com cunhos medicinais, são importantes para a manutenção e aporte em situações de saúde social (TOMAZZONI *et al.*, 2006). Para o seu desenvolvimento, enquanto crescimento, reprodução e até mesmo mecanismos de defesa, as plantas produzem substâncias naturais. Compostos esses, que ocasionam efeitos no corpo humano. Uma dessas plantas, é a *Bromelia antiacantha* Bertol, que é uma bromeliácea endêmica das regiões sul e sudeste do Brasil (LORENZI & MATOS, 2008). Sendo utilizada pela população nativa como medicamentos, empregando seu uso para tratamentos anti-helmínticos, antitussígenos e até de cálculos renais (REITZ, 1983).

Para Finêncio e Mininel (2019), a fitoquímica tem como propósito identificar os componentes químicos das plantas, além das suas propriedades biológicas, sendo de extrema importância para o desenvolvimento fitoterápico. Os testes fitoquímicos visam a verificação dos componentes na planta, com objetivos terapêuticos (SILVA, BIZERRA e FERNANDES, 2018).

Com esse intuito, a avaliação da toxicidade dos extratos alcoólicos é imprescindível para que não haja riscos à saúde dos indivíduos que irão utilizá-lo. Bednarczuk *et al.* (2010) elucidam que os testes toxicológicos *in vitro* são uma excelente opção para diminuir custos e obter respostas rápidas na triagem de material vegetal que possa vir a ter efeitos tóxicos à saúde. Contudo, para que tenha algo mais assertivo sobre os produtos químicos, utiliza-se fitoquímicos colorimétricos, que identificam qualitativamente os metabólitos secundários presentes no material analisado, tais como alcaloides, cumarinas, saponinas, compostos fenólicos, taninos e flavonoides (BARBOSA *et al.*, 2004).

O teste toxicológico utilizou o microcrustáceo *A. salina*, que habita o ambiente de água salgada e tem capacidade de produzir cistos e náuplios. Estes cistos são facilmente encontrados na internet e em lojas de animais, sendo acessíveis e de baixo custo (MOREIRA, 2013). Para os testes toxicológicos, de acordo com Abel (1989), esta espécie tem se mostrado uma ótima bioindicadora, tendo em vista o seu nível de tolerância quando posto em ambientes diversos, demonstrando respostas satisfatórias com relação às qualidades dos ambientes escolhidos (*apud* MAIA *et al.*, 2015). É de relevância ressaltar que a análise do extrato etanólico de raízes da espécie *Bromelia antiacantha* ainda não havia sido realizada anteriormente, sendo este, o primeiro trabalho acerca do tema.

Dessa forma, o objetivo do trabalho foi realizar uma triagem fitoquímica preliminar em raízes de *B. antiacantha* e verificar a sua ação toxicológica utilizando microcrustáceos (*Artemia salina*) como organismos-teste.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

A espécime de *B. antiacantha* foi coletada em uma área de transição entre a Caatinga e a Mata Atlântica, conhecida como mata-de-cipó, na zona rural do município de Poções - BA.

De todo o material coletado, as raízes foram separadas e submetidas à secagem em estufa durante uma semana. A raiz da *B. antiacantha* foi triturada e submetida à extração com álcool etílico PA. Após a filtragem, o material foi concentrado sob pressão reduzida a aproximadamente 50°C, utilizando um evaporador rotativo.

O perfil farmacognóstico do extrato bruto (EER) foi realizado através de testes de precipitação e colorimétrico, conforme a metodologia de Silva *et al.* (2010). A amostra EER foi analisada para os metabólitos, alcaloides, cumarinas, flavonoides, triterpenos, esteroides, saponinas, taninos e fenóis.

Para detecção de alcaloides utilizou-se 2 mg de extrato seco (EER) em 5mL de solução de ácido clorídrico (HCl) a 5%, logo após, separou-se 4 parcelas de 1mL em quatro tubos de ensaio, sendo que um ficou como controle, e nos outros foram adicionadas gotas dos seguintes reagentes: Bouchardat, Mayer e Bertrand. A cumarina foi analisada utilizando 2 mg do extrato dissolvido em 1 mL de água destilada. A amostra foi gotejada em um pedaço de papel filtro, seguida de 2 gotas da solução hidróxido de potássio (KOH) 10%, em seguida, a amostra foi submetida à luz UV 365nm. Já para os flavonoides foram dissolvidos 2 mg em 1 mL de água destilada, adicionado no tubo de ensaio, seguido de 2 gotas de solução neutra de cloreto férrico (FeCl<sub>3</sub>) 5%.

Triterpenos e esteroides foram investigados através do reagente de Liebermann-Burchard, na qual 3 mg do extrato foi dissolvido em 5 mL de clorofórmio. Em seguida,

filtrou-se a solução clorofórmica gota a gota em um funil com algodão coberto com alguns decigramas de sulfato de sódio anidro. No tubo de ensaio, foi adicionado 2 mL da solução, e 1 mL de anidrido acético e houve a agitação do tubo de ensaio, no qual, foi colocado 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado e, novamente, houve a agitação suave, para observar se houve desenvolvimento de cores. Em sequência a este teste, foi utilizado 3 mL de solução clorofórmica e acrescentado 10 mL de água destilada, ambos no tubo de ensaio, em seguida, foi agitado o tubo por 2 minutos para observar se havia presença de espumas, ou seja, de saponinas. Por fim, para verificar a presença de taninos e fenois foram analisadas na dissolução de 2 mg de extrato seco em 5 mL de água destilada, em seguida foi adicionado 2 gotas de solução alcoólica de Cloreto de Ferro ( $\text{FeCl}_3$ ) a 1%.

Para o experimento foram utilizados cistos de *Artemia salina* que foram adquiridos em loja especializada em produtos para aquário. Para obtenção das condições desejadas à eclosão dos cistos de *A. salina*, a água salina foi preparada com 1L de água destilada, 23 g de sal e 0,7 g de bicarbonato de sódio. A solução salina foi previamente aerada durante 30 minutos e então realizada a incubação de aproximadamente 100 mg de cistos de *A. salina* por 48 horas em béquer, onde durante esse período os cistos foram mantidos em iluminação artificial, sendo realizado o controle de temperatura para manter a variação máxima entre 25 a 30°C.

O bioensaio de toxicidade frente à *A. salina* foi realizado segundo a metodologia proposta por Meyer *et al* (1982) com algumas adaptações, as quais os náuplios foram transferidos em quantidade de 10 indivíduos para cada tubo de ensaio, com volume final de 10mL da solução salina previamente preparada em diferentes concentrações (1000; 100; 10 e 1µg/mL), do extrato (EER). Todas as concentrações foram realizadas em triplicatas. Para o controle negativo foi utilizado apenas a solução salina e o dicromato de potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) 1% foi utilizado como padrão de avaliação de toxicidade. Os náuplios de *A. salina* ficaram sob exposição por 24 horas sob iluminação artificial (10 W). Decorrido esse período de contato, os sobreviventes foram contados com o auxílio de lupas, na análise foram consideradas larvas mortas todas que não apresentavam qualquer movimento ativo em cerca de dez segundos de observação.

Posteriormente, através do número de náuplios mortos, calculou-se a concentração letal média (CL50). A classificação do extrato foi baseada nos critérios de Meyer *et al.*, (1982) e Krishnaraju *et al.* (2005). Já as análises estatísticas foram realizadas por meio de testes de normalidade e comparadas pelo teste de Tukey e Dunnett ( $p < 0,05$ ) para a presença de normalidade. As tabelas foram elaboradas utilizando os softwares Excel e Word.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através do ensaio fitoquímico colorimétrico foi possível verificar a presença de alguns metabólitos secundários presentes do extrato etanólico bruto das raízes de *B. antiacantha*. No estudo colorimétrico para detectar alcaloides, utilizando o reagente de Bertrand, foi possível observar a formação de precipitado, confirmando sua presença. Contudo, quando feito o teste com os reagentes de Mayer e Bouchardat, não foi possível verificar a presença do mesmo. No entanto, Fabri e Costa (2012), evidenciam que o extrato de folhas e frutos desse vegetal possui como fitoconstituente os alcaloides.

Para o teste de detecção das cumarinas, houve a diluição do extrato com água destilada e adição de Hidróxido de Potássio (KOH)10% exposto à luz UV 365 nm, não havendo a apresentação de fluorescência, o que sugere o resultado negativo para cumarina. Contudo, Rodrigues *et al.* (2021), evidenciam a presença de cumarinas no extrato dos frutos de *B. antiacantha*. Já com relação aos testes para identificar triterpenos e esteroides, foi utilizado o reagente Liebermann-Burchard, que apresentou coloração azul evanescente, indicando que há esteroides e não há triterpenos. Entretanto, além da presença de esteroides, os autores já

citados informam a presença de cumarinas e triterpenos no extrato dos frutos desta bromélia.

Para detecção de flavonoides foi utilizado o extrato dissolvido em água destilada, com acréscimo de Cloreto de Ferro (FeCl<sub>3</sub>)5%, foi detectada a sua presença. Outros estudos (MANETTI *et al.*, 2010; RODRIGUES, *et al.* 2021) demonstram que tanto no extrato de folhas quanto frutos é possível observar a presença dos flavonoides. As saponinas também demonstraram-se presentes após a agitação, durante dois minutos, do extrato dissolvido em clorofórmio com água destilada. Ao estudar o extrato aquoso dos frutos e folhas, Manetti *et al.* (2010) confirmam a presença de saponinas.

Os fenois totais e os taninos foram testados com o reagente FeCl<sub>3</sub> 1%, e foi detectado uma coloração verde, confirmando a presença de taninos catéquicos e ausência de fenois. O resultado alcançado manifestou a predominância do tanino, demonstrando-se positivo. Todavia, estudos (MANETTI *et al.*, 2010; SANTOS *et al.* 2009) relacionados às folhas e frutos da espécie, confirmam a presença de fenois totais e dos taninos em *B. antiacantha*.

O ensaio toxicológico em *A. salina* foi testado utilizando quatro concentrações de EER diferentes (0,001; 0,01; 0,1; 1 mg/mL), e o número de náuplios mortos em cada exposição está representado a seguir (Tabela 1).

Tabela 1 - Resposta da toxicidade do extrato fruto de *B. antiacantha* frente a *Artemia salina* após 24h de exposição

Extrato	Concentração	Náuplios expostos (triplicata)	Náuplios mortos	
			$\bar{x}$	S
EER	0,001 mg/mL	10	1,67	1,53
EER	0,01 mg/mL	10	2,00	2,00
EER	0,1 mg/mL	10	5,67	0,58
EER	1 mg/mL	10	10	0,00
CN	Água salina	10	0	0,00
CP	Dicromato de Potássio 1% (K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> )	10	10	0,00

( $\bar{x}$ ): Média; (s): Desvio padrão; EER: Extrato etanólico da raiz; (CN): Controle negativo; (CP): Controle positivo

Na tabela é possível notar que, no controle positivo, o qual foi utilizado o K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> eliminou todos os dez náuplios que foram expostos, enquanto que no controle negativo o índice de mortalidade foi equivalente a zero, devido aos microcrustáceos estarem expostos em meio favorável ao seu desenvolvimento. Dentre as concentrações de EER, o tratamento com 1 mg/mL foi o que apresentou maior número de mortalidade, uma vez que houve letalidade dos espécimes em todas as triplicatas. De acordo com a Tabela 2, pode ser observado que o CL<sub>50</sub> do EER apresentou valor equivalente a 15,6 µg/mL.

Tabela 2 – Índice de mortalidade e toxicidade do microcrustáceo *A. salina* após exposição em extrato de *B. antiacantha*

Produto	% Mortalidade				C	CL <sub>50</sub>	Atividade
	1000 µg/mL (%)	100 µg/mL (%)	10 µg/mL (%)	1 µg/mL (%)			
EER	100	57	20	17	0	15,6	Alta toxicidade

(C): Controle negativo; (CL<sub>50</sub>): Concentração letal média

A classificação proposta por Meyer *et al.* (1982) relata que os valores de  $CL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$  são considerados tóxicos, enquanto valores de  $CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$  são equivalentes a não tóxicos. Numa proposta de classificação mais detalhada, Krishnaraju *et al.* (2005) propõem que,  $CL_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$  (Baixa toxicidade),  $CL_{50} < 250 \mu\text{g/mL}$  (Toxicidade moderada) e  $CL_{50} < 80 \mu\text{g/mL}$  (Alta toxicidade). Portanto, analisando o  $CL_{50}$  do EER, é possível observar que este possui uma alta toxicidade.

Um estudo com os extratos alcoólico e metanólico dos frutos e folhas, respectivamente, demonstraram valores de  $CL_{50}$  a 618,3, 362,1 e 275,9  $\mu\text{g/mL}$ , o que sugere atividade citotóxica moderada-fraca (MANETTI *et al.*, 2010). Outro estudo, posterior ao de Manetti, faz correlação com o mesmo, tendo em vista que foram utilizadas partes da planta como fruto e folha para os extratos metanólicos, partição em hexano e partição em diclorometano. Dessa forma, o  $CL_{50}$  apresenta citotoxicidade de 53,9; 112,4 e 241,6  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, evidenciando que estas plantas possuem atividade citotóxica moderada-fraca (FABRI e COSTA, 2012). Portanto, é notório que estes resultados corroboram com a pesquisa em questão, tendo em vista que as plantas analisadas também se mostraram tóxicas, no entanto, menos que a *B. antiacantha*.

#### 4 CONCLUSÃO

Os metabólitos secundários mais encontrados nas raízes de *B. antiacantha* foram os alcaloides, taninos catéquicos, flavonoides, esteroides e saponinas. Vale salientar que a família Bromeliaceae, apresenta pouco estudos do seu potencial químico, mas com uma quantidade considerável de metabólitos secundários identificados. Com relação aos testes utilizando o microcrustáceo *A. salina*, percebeu-se que o extrato testado possui alta toxicidade, sendo que o  $CL_{50}$  é equivalente a 15,6  $\mu\text{g/mL}$ . Diante do exposto acima, faz-se necessário a realização de outros bioensaios toxicológicos e a identificação dos metabólitos secundários encontrados na raiz de *B. antiacantha*.

Com isso, a partir das análises é possível concluir que não existem estudos que abordem sobre o perfil fitoquímico das raízes da espécie nem seu grau de toxicidade, sendo este o primeiro e de grande relevância para a comunidade científica.

#### REFERÊNCIAS

- BARBOSA, W. L. R., *et al.* Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. **Revista Científica da UFPA**, 4, 2004.
- BEDNARCZUK, V. O. *et al.* Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, [S.l.], v. 11, n. 2, dez. 2010.
- FABRI, L. R; COSTA, J. A. B. M. Perfil farmacognóstico e avaliação das atividades citotóxica e antibacteriana de *Bromelia Antiacantha* Bertol. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 9, n. 2, 2012.
- FINÊNCIO, B. M; MININEL, F. J. Abordagem fitoquímica e análise cromatográfica das folhas de *Bauhinia variegata* L. **Intraciência**. Faculdade do Guarujá, 2019.
- LORENZI, H.E; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. São Paulo: Nova Odessa-**Instituto Plantarum**, 2008.
- MAIA, A. B. *et al.* Testes de toxicidade com *Artemia salina* e sua importância no controle de parâmetros ambientais. **II Colóquio de Estudos Ambientais do Bioma Caatinga**. IFSC,

Santa Catarina, 2015.

MANETTI, M. L. *et al.* Avaliação da atividade hemolítica de *Bromelia antiacantha* BERTOL. (BROMELIACEAE). **Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR**. Paraná, v. 14, n. 1, p. 43-47, 2010.

MANETTI, L. M *et al.* Avaliação das atividades antimicrobiana, citotóxica, moluscicida e antioxidante de *Bromelia antiacantha* Bertol: (Bromeliaceae). **Rev. bras. plantas med**; 12(4): 406-413, 2010.

MOREIRA, L. A. O. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* Leach. de extratos de duas espécies da família Melastomataceae. **Instituto Federal de Goiás**. Curso de Licenciatura em Química. Anápolis, 2013.

REITZ, R. Bromeliáceas e a malária - bromélia endêmica. In: REITZ, R. (Ed.). **Flora ilustrada catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1983.

RODRIGUES, K. F. *et al.* Phytochemical profile and biological activities of *Bromelia antiacantha* extracts. **Braz J Biol**. 2022.

SANTOS, V. N. C. *et al.* Ripe fruits of *Bromelia antiacantha*: investigations on the chemical and bioactivity profile. **Revista Brasileira De Farmacognosia**, 19(2a), 358–365. 2009.

SILVA, F. A; BIZERRA, A. M. C; FERNANDES, P. R. D. Testes fitoquímicos em extratos orgânicos de *Bixa orellana* L. (urucum). **Holos**, 2018.

TOMAZZONI, M. I., NEGRELLE, R. R. B., CENTA, M. L.. (2006). Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêuta. **Texto & Contexto - Enferm** [Internet], Florianópolis, 2006; 15(1), 115–121.