

IV SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXII Semana de Iniciação Científica

21 a 25 de outubro de 2019

Tema: "Desmonte da Pesquisa, Ciência e Tecnologia: repercussões e impactos tecnológicos, sociais e culturais"



AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO PROTEICO DAS SEMENTES DE *Bauhinia cheilantha* (BONG.) STEUD EM NÁUPLIOS DE *Artemia* SP.

Lidina Santos de Paiva¹, Eugebia Paula da Rocha², Francisco Nascimento Pereira Júnior³

RESUMO

Bauhinia cheilantha (Bong.) steud conhecida popularmente como mororó é encontrada na caatinga. É de grande importância farmacológica e medicinal sendo utilizada para o tratamento de doenças. Esse trabalho objetiva analisar a presença de proteínas tóxicas no extrato aquoso proteico das sementes da *B. cheilantha*, avaliando sua ação citotóxica contra o microcrustáceo *Artemia* sp. Para avaliar o efeito tóxico foi realizado o teste de letalidade contra artêmia a partir do extrato proteico produzido a partir das sementes da *B. cheilantha*. As proteínas solúveis foram extraídas em NaCl 0,15 M relação 1:10 (p/v), sob agitação constante durante 4 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, o extrato foi centrifugado a 10.000 x g a 4 °C durante 20 minutos e o sobrenadante foi coletado e filtrado em um papel de filtro, e o extrato total foi submetido à quantificação de proteínas pelo teste de Bradford e ao teste de toxicidade contra náuplios de *Artemia* sp. Os dados obtidos no teste de letalidade foram processados e os valores de CL₅₀ foram computados a partir da porcentagem de morte e logaritmo das concentrações por análise probit. O extrato proteico apresentou efeito tóxico frente ao náuplios de artêmia, sendo esta toxicidade reduzida quando passou por tratamento térmico, reforçando a ideia de que a toxicidade foi decorrente da presença de proteínas no extrato.

Palavras-chave: *Bauhinia cheilantha*. Teste de toxicidade. *Artemia* sp.

1 INTRODUÇÃO

Durante muitos anos as plantas medicinais vêm sendo utilizadas pela sociedade porque tem sido uma rica fonte para obter moléculas que podem ser exploradas para fins terapêuticos. *Bauhinia cheilantha*, conhecida popularmente como mororó ou pata-de-vaca, é encontrada em climas secos típicos da caatinga predominantemente no ambiente semiárido. Essa espécie possui grande importância econômica proveniente do seu potencial lenhoso sendo fonte de rendimentos para algumas comunidades além de seu uso farmacológico, e como

1 Universidade Federal do Cariri, Instituto de Formação de Educadores, email: lidinasp@gmail.com

2 Universidade Federal do Cariri, Instituto de Formação de Educadores, email: eugerbiorochabs@gmail.com

3 Universidade Federal do Cariri, Instituto de Formação de Educadores, email: francisco.pereira@ufca.edu.br

IV SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXII Semana de Iniciação Científica

21 a 25 de outubro de 2019

Tema: "Desmonte da Pesquisa, Ciência e Tecnologia: repercussões e impactos tecnológicos, sociais e culturais"



planta medicinal sendo utilizada para o tratamento de doenças inflamatórias, diabetes, distúrbios digestivos e reumatismo (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2005), nessa espécie foi comprovado cientificamente atividades antioxidantes, antinociceptiva e hipoglicemiante (LORENZI; MATOS, 2008).

Os ensaios de toxicidade têm por função avaliar a concentração e a potencialidade letal que o vegetal ou material estudado apresenta (FONSECA, 1991), com isso os testes de toxicidade são considerados como um bioensaio indicador em estudos e são desenvolvidos com a finalidade de analisar a ação tóxica em extratos vegetais (FORBES *et al.*, 1994).

A *Artemia* sp. é uma espécie de microcrustáceo, encontrado em águas salgadas. Esse microcrustáceo tem sido utilizado nas práticas laboratoriais como um bioindicador para testes de toxicidade (ABEL, 1989). Ela é aplicada em testes de toxicidade aguda por ser um teste rápido, eficaz e de sua facilidade de manuseio, por ser meio acessível de baixo custo e que requer uma pequena quantidade da amostra (CARVALHO, *et al.*, 2009). Diante do exposto e tendo em vista a importância de se analisar a toxicidade de plantas utilizadas com fins terapêuticos, este trabalho teve por objetivo analisar a toxicidade do extrato protéico de *B. cheilantha* frente o microcrustáceo *Artemia* sp.

2 OBJETIVO

Analisar a atividade citotóxica do extrato protéico de *B. cheilantha* frente *Artemia* sp, determinar a concentração de proteínas encontrada no extrato, testar a toxicidade das proteínas do extrato na presença de náuplios de *Artemia* sp.

3 METODOLOGIA

As sementes de *Bauhinia cheilantha* utilizadas no teste foram coletadas de plantas encontradas no campus da Universidade Federal do Cariri - UFCAR em Juazeiro do Norte – CE. As sementes foram descascadas e trituradas em um moinho até atingir um pó fino. As proteínas solúveis foram extraídas em uma solução de NaCl 0,15 M na relação 1:10 (p/v), com agitação contínua por 4 horas a temperatura ambiente. Em seguida, o extrato foi centrifugado a 10.000 x g a 4 °C por 20 minutos e o sobrenadante foi coletado e filtrado em um papel filtro (Whatman).

A concentração de proteínas solúveis utilizadas no extrato foi determinada pelo método de Bradford (1976). Foram transferidos 100 µL de amostra para um tubo de ensaio e adicionados 2,5 ml do reagente de Bradford. Deixou-se a mistura em repouso no período de 1 hora, após foi feita leitura da absorbância a 595 nm em um espectrofotômetro de luz visível (VIS LBK NOVASPEC II, PHARMACIA). A concentração de proteínas solúveis foi calculada empregando albumina sérica bovina como padrão.

Os cistos de *Artemia* sp. foram submetidos à eclosão sob temperatura controlada, iluminação e em ambiente ventilado, com propósito de analisar a ação citotóxica do extrato das sementes de *B. cheilantha*, como relatado a

IV SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXII Semana de Iniciação Científica

21 a 25 de outubro de 2019

Tema: "Desmonte da Pesquisa, Ciência e Tecnologia: repercussões e impactos tecnológicos, sociais e culturais"



seguir: foram pesados 20 mg de cistos de artêmia, depositado em um recipiente de PVC contendo 200 mL de água do mar artificial logo após incubados ao longo de 48 h, tempo necessário para desenvolvimentos dos náuplios para o teste de toxicidade. Sendo assim preparada uma solução do extrato de *B. cheilantha* tendo concentração de 200 µg/mL de proteínas em água do mar artificial.

Em uma placa de limbro de 24 poços depositou-se uma alíquota do extrato com a finalidade de atingir as concentrações finais de 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL. Em seguida, acrescentou-se mais uma quantidade de alíquota da solução artificial sendo incluso 10 amostras de náuplios, obtendo 2 mL de solução por poço, o controle foi avaliado da mesma maneira, água do mar artificial e 10 exemplares de náuplios com volume 2 mL, mas sem o extrato. As condições testadas com as condições de controle foram comparadas após 24h, o teste foi realizado em triplicatas para cada condição (RIOS, 2010).

Para Determinações da CL₅₀, após um tempo de 24 h, as informações encontradas no teste de letalidade foram executadas em um software simples, Microsoft® Office Excel 2013, quanto aos valores de CL₅₀ foram avaliados a partir do percentual de artêmias mortas e logaritmo das concentrações por análise probit, como descrito por Finney (1971).

4 RESULTADOS

Para calcular a concentração das proteínas presentes na solução do extrato total, foi efetuado o teste de quantificação de proteínas de Bradford. Numa determinada solução a dosagem de proteínas irá permitir a quantificação da concentração.

O ensaio de Bradford tem em sua base o azul brilhante de *Coomassie*, é o recurso mais utilizado para dosagem de proteínas totais, com faixa de identificação entre 20 e 2000 µg mL⁻¹, e utiliza a albumina do soro bovino (BSA) como padrão. O reativo azul brilhante de *Coomassie* modifica a absorvância de 465 nm para 595 nm ocasionando uma mudança concreta na pigmentação, primeiramente castanha, em sentido de tons de azuis, de acordo com a concentração de proteínas. A análise da absorvância apresenta sensibilidade a partir de 1 µg de proteína e é efetuada em espectrofotômetro ou leitor de microplacas, onde a intensidade da coloração é correspondente a quantidade protéica da amostra. (BRADFORD, 1976).

Baseado nas informações da curva de calibração obtida foi possível saber a dosagem de proteínas solúveis do extrato das sementes de *B. cheilantha* utilizadas no estudo, sendo determinada uma concentração de proteínas solúveis de 9,95 mg/mL de proteínas para o extrato total. O extrato total de proteínas solúveis mostrou-se tóxico contra náuplios de *Artemia* sp. após 24 horas do início do experimento, verificando-se morte parcial das *Artemias* sp. apresentando uma CL₅₀ de 23,2 µg/mL, um valor de potencial alto de toxicidade. Segundo os critérios de (CLARKSON et al., 2004), é considerado altamente tóxicos os extratos com CL 50 de 0 - 100 µg/mL.

IV SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

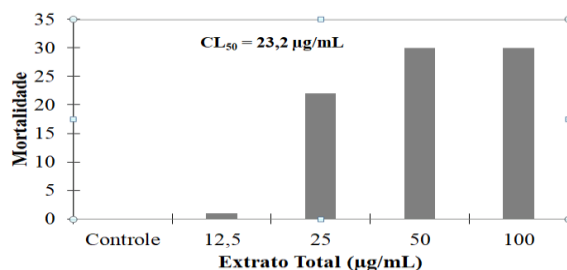
XXII Semana de Iniciação Científica

21 a 25 de outubro de 2019

Tema: "Desmonte da Pesquisa, Ciência e Tecnologia: repercussões e impactos tecnológicos, sociais e culturais"



Figura1 – Efeito tóxico do extrato total de *Bauhinia cheilantha* em diferentes concentrações contra *Artemia* sp.

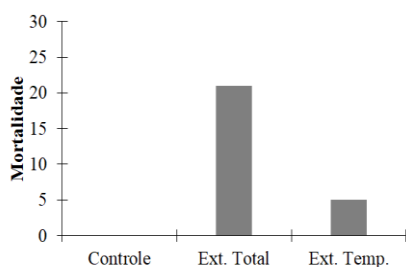


Fonte: Elaborado pela autora.

Observou-se que em alguns trabalhos com extrato de plantas contra artêmias apresentaram resultados diferentes, Batista (2017) efetuando teste com o extrato total *Turnera ulmifolia* não comprovou atividade tóxica contra náuplios de *Artemia* sp., ocorrendo 100% de sobrevivência dos náuplios de *Artemia* sp. não sendo possível calcular CL_{50} .

Após avaliar Efeito tóxico do extrato total de *B. cheilantha* em diferentes concentrações contra *Artemia* sp. a concentração do extrato foi submetida a desnaturação térmica a 100 °C para analisar se a toxicidade tem o mesmo resultado ou a proteína perde o efeito, após 24 horas foi feita a contagem novamente do número de náuplios de artêmias mortos e os resultados obtidos estão mostrados na Figura 2 abaixo.

Figura 1 – Avaliação da temperatura no efeito tóxico do extrato total de *Bauhinia cheilantha* contra *Artemia* sp.



Fonte: Elaborado pela autora.

O número de náuplios mortos diminuiu à medida que o extrato total de proteínas das sementes da *B. cheilantha* foram submetidos à desnaturação térmica a 100 °C durante 1 h, provocando um decréscimo da letalidade em cerca de 76% como podemos observar na Figura 2. Isso deve acontecer devido as proteínas, após passarem por temperaturas elevadas, sofrerem o processo de desnaturação e perdem seus efeitos e atividades biológicas (CAMPESE, 2004).

6 CONCLUSÃO

IV SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXII Semana de Iniciação Científica

21 a 25 de outubro de 2019

Tema: "Desmonte da Pesquisa, Ciência e Tecnologia: repercussões e impactos tecnológicos, sociais e culturais"



Bauhinia cheilantha apresentou extrato protéico com alto teor de toxicidade diante dos náuplios de artêmias, quando submetidos ao tratamento térmico pode-se observar uma diminuição no número morte de artêmias. Apresentou em seu extrato proteico atividade toxica.

A atividade toxicológica de proteínas do extrato das sementes da *B. cheilantha*, apresentou resultados positivos, visto que essa pesquisa foi um dos primeiros a apresentar resultados tóxicos com essa espécie. Novos trabalhos são necessários a fim de analisar outras atividades biológicas dessa semente.

7 REFERENCIA

ABEL, P.D. **Water Pollution Biology**. Ellis Horwood Ltd, Publishers, Chichester, 1989.
ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C.; SILVA, A. C. O. Use of plant resources in a seasonal dry forest (Northeastern Brazil). **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 1, p. 27-38, 2005.

BATISTA, M.A.F **Monografia Avaliação da atividade antimicrobiana, modulatória e citotóxica do decocto de *turnera ulmifolia* l**. Universidade Federal do Cariri Instituto de Formação de Educadores Curso de Licenciatura Interdisciplinar em Ciências Naturais e Matemática (2017).

BRADFORD, M.M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding**. Anal. Biochem, 1976.

CARVALHO, C. A. de. et al. Cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus* miers-Bignoniaceae): Estudo fitoquímico etoxicológico envolvendo *Artemis salina*. **Revista Eletrônica de Farmácia** Vol 6(1), 51-58, 2009.

CAMPESE, G.M., **Extração e Recuperação da Bromelina em Sistemas de Duas Fases Aquosas PEG4000 – POLICAJU**. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia Química, Unicamp, Campinas, 2004.

CLARKSON, C., Maharaj, V.J., Crouch, N.R., Grace, O.M., Pillay, P., Matsabisa, M. G., Bhagwandin, N., Smith, P.J., Folb, P.I., 2004. **In vitro antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalized in South Africa**. **J Ethnopharm.** 92, 177-191.

FONSECA, AL. **A biologia das espécies *Daphnia laevis*, *Ceriodaphnia dubi silvestris* (Crustacea, Cladocera) e *Poecilia reticulata* (Piscis, Poeciledae) e o comportamento destes em testes de toxicidade aquática com efluente industriais**. Dissertação de Mestrado em Hidráulica e Saneamento. USP São Carlos 1991.

FORBES, V. E.; FORBES, T. L. **Ecotoxicology in theory and practice**. Londres: Chapman and Hall, 1994. 247 p

LORENZI, H.; MATOS, F. J. de A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e exóticas**. 2.ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. 544 p.

RIOS D.A.M. **ENSAIO DE TOXICIDADE COM *Artemia salina* DO HIDROLATO DE LARANJA** Ciências Biológicas / Ecologia / Ecologia, 2010.