

## AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA AGUDA DE *POLYGALA* sp. CANDIDATA A PRODUTOS FITOTERAPÊUTICOS

**Danielle Figuerêdo da Silva<sup>1</sup>; Hugo Neves Brandão<sup>2</sup>; JoseLuiz Carneiro da Rocha<sup>3</sup>**

1. Bolsista FAPESB/UEFS, Graduada em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [danielle.figs@gmail.com](mailto:danielle.figs@gmail.com)
2. Orientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [hugohnb@gmail.com](mailto:hugohnb@gmail.com)
3. Mestrando em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana

**PALAVRAS-CHAVE:** Toxicologia, *P. boliviensis*, triagem fitoquímica, CLAE.

### INTRODUÇÃO

A família Polygalaceae possui 19 gêneros e cerca de 1.300 espécies descritas com ampla distribuição no mundo (MARQUES; PEIXOTO, 2007) sendo as regiões temperadas quentes e tropicais seus principais centros de diversidade (FURNESS, S. H.; STAFFORD, 1995). No Brasil, está representada por oito gêneros e cerca de 250 espécies, dos quais o gênero *Polygala* é o mais representativo, com cerca de 140 táxons (MARQUES; PASTORE, 2006).

Diversos estudos fitoquímicos realizados com a família Polygalaceae, detectaram saponinas, xantonas, derivados de pironas, cumarinas, ácidos graxos, fenóis e alcalóides. As espécies de *Polygala* caracterizam-se também pela presença de salicilato de metila, encontrado principalmente em suas raízes (COELHO; AGRA; BARACHO, 2008).

Espécies vegetais do gênero *Polygala* L. (Polygalaceae) são utilizadas tradicionalmente em muitas regiões do mundo, tendo atribuídas diferentes atividades biológicas, como expectorante, sedativa, antipsicótica, antifúngicas e analgésicas (LAPA, 2006). Desta forma, tal gama de atividades torna essa espécie fonte de interesse para desenvolvimentos de novos produtos fitoterapêuticos.

No Brasil, as plantas medicinais nativas são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas atividades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes. Além disso, os aspectos tóxicos das mesmas são muitas vezes desconhecidos ou ignorados. Contudo, a toxicidade de plantas medicinais é um problema sério de saúde pública. Os efeitos adversos dos fitomedicamentos, as possíveis adulterações e toxidez, bem como interações com outras drogas ocorrem comumente (QUEIROZ, 2008).

Com o aumento do uso de derivados de vegetais no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou uma série de normas para a regulamentação destes produtos. Dentre estas, estão inclusas técnicas para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos e cosméticos (BRASIL, 2004).

Neste contexto, atrelando à possibilidade do desenvolvimento de produtos fitoterapêuticos utilizando espécies de *Polygala*, nota-se a importância da realização de ensaios toxicológicos pré-clínicos, a fim de comprovar a segurança dos mesmos.

### METODOLOGIA

A coleta da espécie *Polygala boliviensis* foi realizada nos meses de agosto e setembro de 2010, pelo período da manhã, no Campus Universitário da Universidade Estadual de Feira de Santana e sua exsicata depositada no Herbário da mesma universidade, sendo identificada como 2687 J.F.B. Pastore.

O material vegetal foi seco em estufa a  $(45\pm 3)^{\circ}\text{C}$ , durante 15 dias, até peso constante. Após a secagem, o material foi moído e, posteriormente, colocado em erlenmeyer para extração por maceração. O material vegetal utilizado foi constituído de partes aéreas e raízes. Os filtrados obtidos durante a extração foram reunidos e concentrados em rotaevaporador sob pressão reduzida.

Para a padronização do extrato de *P. boliviensis* foi proposto, inicialmente, a identificação e posterior quantificação de salicilato de metila por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE). Essa etapa foi realizada com o auxílio do HPLC EZChrom Elite acoplado ao detector de arranjo de diodos, utilizando comprimento de onda na faixa de 210 a 400 nm e a aquisição cromatográfica definida em 236 nm, de acordo com a metodologia validada por Rocha (2009), com algumas modificações.

Entretanto, devido aos picos de baixa intensidade obtidos em CLAE, optou-se por realizar triagem fitoquímica qualitativa para estabelecer as classes de compostos químicos característicos da espécie. A triagem foi realizada com base na metodologia descrita por Matos (1997), utilizando uma série de reações colorimétricas e de precipitação, resultantes da adição ao extrato, de reagentes específicos para cada classe de metabólito secundário.

Posteriormente, realizou-se o teste de letalidade frente à *Artemia salina* para avaliar a toxicidade *in vitro* do extrato obtido. O teste de atividade citotóxica foi baseado no método desenvolvido por Meyer (1982) e adaptado por Serrano (1996). Neste teste, os *naupliis* recém-eclodidos foram colocados em contato com o extrato, em cinco concentrações diferentes, e incubados por 24 horas. Após esse período foram contados os *naupliis* sobreviventes para a determinação da DL<sub>50</sub>. Os *naupliis* foram considerados mortos caso não exibissem nenhum movimento durante dez segundos de observação. Todo o teste foi realizado em triplicata.

O teste de toxidade aguda foi realizado com base na regulamentação da ANVISA para tal tipo de teste, disposta na RE 90/04, de 18 de março de 2004. Foram utilizados camundongos adultos, de ambos os sexos, sendo que cada grupo foi composto por 6 machos e 6 fêmeas. O primeiro grupo com animais submetidos à substância-teste, enquanto que o segundo grupo sendo o controle. Os animais foram submetidos a uma dose única de 5000 mg/kg, sendo esta a dose máxima preconizada em estudos desse tipo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Interpretando as informações obtidas CLAE, como tempo de retenção de 14,65 minutos e espectros de absorção no ultravioleta com comprimento de onda máximo de 237 e 303 nm e, comparando com dados do padrão, que mostram tempo de retenção de 15,56 minutos e espectros de absorção no ultravioleta com comprimento de onda máximo de 237 e 303 nm, pôde-se atribuir que o pico cromatográfico obtido na análise do extrato de *P. boliviensis*, trata-se do salicilato de metila. A diferença no tempo de retenção do composto, presente na amostra, comparado ao padrão pode ser devido ao fenômeno conhecido como efeito matriz, no qual este tempo pode ser modificado devido à presença de outras substâncias na amostra, por se tratar de um extrato vegetal.

Entretanto, no cromatograma foi possível observar que o pico referente ao salicilato de metila apresentou pequena amplitude, o que dificultou sua quantificação, mesmo com o aumento da concentração da amostra. É provável que o teor do salicilato de metila esteja abaixo do limite de quantificação do CLAE utilizado. Além disso, a produção desse composto pode estar relacionada a diversos fatores como sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, entre outros (GOOBO-NETO; LOPES, 2007). Outro fator significativo é que por se tratar de extrato constituído de partes totais da espécie vegetal, isso resultaria em diminuição da concentração do salicilato de metila, visto que dados obtidos na literatura indicam maior concentração deste salicilato nas raízes, do que em suas partes aéreas.

Os resultados obtidos, através da análise por CLAE, permitiram observar que esta metodologia não foi adequada para a padronização do extrato. Entretanto, a análise cromatográfica é válida, pois permitiu a obtenção do “fingerprint” do extrato em estudo, possibilitando a definição de perfil cromatográfico.

Em seguida, buscando padronizar o extrato, realizou-se triagem fitoquímica. Tal procedimento permitiu identificar a presença de alcalóides, através do surgimento de precipitado após a adição do reagente de Dragerdorff; cumarinas, devido à visualização de fluorescência azulada quando observado em câmara de UV após alcalinização do extrato; esteróides e terpenóides, evidenciado pelo aparecimento de coloração verde após adição do reagente de Liebermann-Burchard; saponinas, devido à observação de espuma permanente após agitação do extrato aquoso; taninos, comprovado através da formação de precipitado quando adicionados ao extrato hidroalcoólico acetato de chumbo 10% e acetato de cobre 3%; fenóis, através da reação com cloreto férrico 2%, na qual se observou mudança de coloração; e flavonóides, evidenciado pelo aparecimento de coloração avermelhada na reação de Shinoda, assim como pela coloração amarela intensa adquirida na reação de hidróxidos alcalinos.

A maioria dos estudos relacionam a presença dos metabólitos secundários encontrados em espécies de *Polygala* com algumas atividades biológicas, mostrando a relevância do conhecimento, mesmo que qualitativo, da presença destes compostos. Neste contexto, a triagem fitoquímica permitiu definir algumas das classes de metabólitos presentes no extrato metanólico de *P. boliviensis*, podendo estas ter correlação tanto com atividade farmacológica, como toxicológica.

Na investigação da citotoxicidade do extrato de *Polygala boliviensis*, foi realizado o teste nas concentrações de 50, 200, 250, 400, 500 e 1000 µg/mL. Com os resultados obtidos foi possível plotar um gráfico e calcular a DL<sub>50</sub> através da equação obtida no mesmo, sendo encontrado o valor de 207,09 µg/mL.

O teste de letalidade da *Artemia salina* é um primeiro indicativo da toxicidade do extrato testado. De acordo com Parra e colaboradores (2001), este é um método simples na pesquisa de produtos naturais que possui correlação com testes de toxicidade aguda *in vivo*. Nesse sentido, observa-se que extrato metanólico de *P. boliviensis* apresentou baixo valor de DL<sub>50</sub>, sugerindo uma significativa toxicidade do extrato.

Quanto ao teste de toxicidade aguda não foram observadas mortes em nenhum grupo, o que pode ser relacionado com a via de administração do extrato, já que a via tópica normalmente está associada a efeitos locais e não sistêmicos, pois a cobertura de queratina torna difícil a penetração da droga através da pele intacta. Contudo, alguns animais submetidos à substância-teste apresentaram irritação nas primeiras quatro horas de observação, podendo tal fato estar relacionado à presença de substâncias alergênicas.

Entretanto, nem todos os parâmetros relacionados ao teste de toxicidade aguda foram avaliados, a exemplo da diferença de peso dos animais, lesões macroscópicas de órgãos e parâmetros bioquímicos, visto que os animais ainda se encontram em período de observação.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma vez que a literatura não menciona nenhum estudo fitoquímico e atividade toxicológica de *Polygala boliviensis*, este trabalho fornece contribuição inédita acerca desta espécie.

A triagem fitoquímica indicou a presença de diferentes compostos, permitindo traçar o perfil do extrato metanólico de *P. boliviensis*. Esta, juntamente com a análise por CLAE, auxiliou na padronização do mesmo.

O teste de atividade citotóxica frente à *Artemia salina* mostrou resultado interessante, considerando que o valor de DL<sub>50</sub> encontrado permite classificar o extrato como medianamente ativo. Desta forma, pôde-se analisar previamente a ação tóxica do extrato, para que depois fossem realizados os testes utilizando animais.

O teste de toxicidade aguda realizado com camundongos está em andamento, mas os resultados atuais apontam baixa toxicidade do extrato quando utilizado topicamente,

indicando então um resultado positivo, visto que algumas espécies de *Polygala* são usadas topicamente para alívio da dor.

Contudo, para análise mais detalhada da toxicidade de *P. boliviensis*, é interessante a realização de outros ensaios toxicológicos *in vivo*. É importante também efetuar estudo fitoquímico mais detalhado, buscando o isolamento e identificação de possíveis substâncias tóxicas presentes nesta espécie vegetal.

## REFERÊNCIAS

1. BRASIL, Ministério da Saúde Resolução, Agência Nacional de Vigilância Sanitária RE Nº 90, de 16 de março de 2004. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, 2004.
2. COELHO, V. P. M.; AGRA, M. F.; BARACHO, G. S. Flora da Paraíba, Brasil: *Polygala* L. (Polygalaceae). **Acta botânica brasílica**, 22(1), p. 225-239, 2008.
3. FURNESS, S H.; STAFFORD, P. J. The Northwest European Pollen Flora, 55 Polygalaceae. **Review of Palaeobotany and Palynology**, 88, p. 61-82, 1995.
4. GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, abr. 2007.
5. LAPA, F. R. **Avaliação da Atividade Antinociceptiva, Antiinflamatória e Protetora Gástrica do Extrato Hidroalcoólico Bruto da *Polygala paniculata* L.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2006.
6. MARQUES, M. C. M.; PASTORE, J. F. B. Duas espécies novas de *Polygala* L. (Polygalaceae) para o Brasil. **Rodriguésia**, 57, p. 99-102, 2006.
7. MARQUES, M. C. M.; PEIXOTO, A. L. Estudo taxonômico de *Polygala* subgênero *Ligustrina* (Chodat) Paiva (Polygalaceae). **Rodriguésia**, 58(1), p. 95-146, 2007.
8. MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. Fortaleza: Edições UFC, p: 45-64, 1997.
9. MEYER, B. N et al. Brine Shrimp: A convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Medicinal Plant Research**, v. 45, p. 31 -34. 1982.
10. PARRA, A. L. et al. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium letal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**. Issue 8, p. 395-400, 2001.
11. QUEIROZ, M. B .R. **Desenvolvimento e estudo da estabilidade de gel com extrato de *Matricaria Recutita* (L.) e avaliação da atividade inflamatória tópica comparada com gel de diclofenaco sódico**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, Brasília –DF, Brasil, 2008.
12. ROCHA, J. L. C. **Validação de Metodologia Analítica para Quantificação de Salicilato de Metila por CLAE-DAD em *Polygala decumbens* (Polygalaceae) Ocorrente na Caatinga**. Monografia de Graduação, Universidade Estadual de Feira de Santana, Brasil, 2009.
13. SERRANO, C.; ORTEGA, T.; VILLAR, A. Biological activity of traditional medicines from Spain and Guatemala. *Artemia salina* bioassay: A revision. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 118 – 120. 1996.
14. SERRANO, C.; ORTEGA, T.; VILLAR, A. Biological activity of traditional medicines from Spain and Guatemala. *Artemia salina* bioassay: A revision. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 118 – 120. 1996.