

**EFEITO DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE PLANTAS DA FAMÍLIA
VERBENACEAE EM EMBRIÕES DE *DANIO RERIO*.**

**ALICE DA SILVA GONÇALVES^{1,2*}, RODRIGO PATERA BARCELOS³, NESSANA
DARTORA^{2,4}, SUZYMEIRE BARONI^{2,5}**

1 Introdução

A definição de planta medicinal se dá através da utilização desta como fins medicinais, buscando seus atributos benéficos, com fácil aquisição e baixo custo (TAUFNER; FERRAÇO; RIBEIRO, 2006). Acredita-se que o uso de plantas medicinais para o auxílio na cura de diversas doenças é uma técnica utilizada há muito tempo por grande parte da população. De acordo com Almeida (2011), um dos registros mais antigos é o Pen Ts'ao, datado 2800 a.C., escrito pelo herborista chinês Shen Numg.

Uma das famílias botânicas relacionadas ao uso medicinal é a Verbenaceae que no Brasil se encontram 47 gêneros distribuídos em 407 espécies, desde ervas perenes, arbustos até subarbustos. Além disso, dentre seus gêneros destaca-se o *Aloysia*, com espécies nativas do Rio Grande do Sul. No uso popular, suas atribuições estão relacionadas ao tratamento de asma, resfriado, febre, cólica, diarreia, indigestão, insônia e ansiedade. Porém, há poucos estudos quanto ao potencial citotóxico e genotóxico em eucariotos (MONTANARI et al; 2011).

Dentre as espécies do gênero *Aloysia*, destaca-se as espécies *Aloysia gratissima*, *Aloysia citriodora* e *Aloysia virgata*, de fácil acesso e uso popular na região missioneira do Rio Grande do Sul. Seus nomes populares variam regionalmente, contudo, os mais conhecidos são “alfazema-do-Brasil” para *A. gratissima*, “cidró” e “erva-Luísa” para *A. citriodora* e “mutre” para *A. virgata*.

A utilização de diferentes modelos animais vem sendo realizada na pesquisa científica como alternativa ao uso de mamíferos e o *Danio rerio* (zebrafish), vem sendo explorado em

1 Graduanda, UFFS *campus* Cerro Largo, contato: alice.goncalves@estudante.uffs.edu.br

2 Grupo de Pesquisa: Biociências

3 Mestre, UFFS *campus* Cerro Largo

4 Doutora, UFFS *campus* Cerro Largo

5 Doutora, UFFS *campus* Cerro Largo, **Orientadora.**

diversas áreas de estudo. Segundo Lieschke e Currie (2007), as vantagens do uso do zebrafish são a fertilização e desenvolvimento exclusivamente externos, alta taxa de fecundidade, desenvolvimento rápido e ovos relativamente grandes e transparentes. O uso de embriões dessa espécie apresenta vantagens em relação ao uso de indivíduos adultos, dentre elas, a agilidade do teste, que é realizado em 96 horas pós-fertilização. O teste de toxicidade aguda em embriões dessa espécie é projetado para a avaliação dos efeitos toxicológicos de vários compostos, nas primeiras 96 horas pós-fertilização (ISMAIL, 2017; LAHNSTEINER, 2008).

Desta forma, esse trabalho propõe avaliar através de embriões a toxicidade de extratos vegetais.

2 Objetivos

Determinar a toxicidade e potencial interferência dos extratos das folhas da família Verbenaceae nos processos celulares dos embriões de *Danio rerio*; estabelecer o método de obtenção de embriões no Laboratório de Genética - *campus* Cerro Largo; propondo modificações; utilizar extratos aquoso e etanólico em diferentes concentrações, obtidos através das folhas da família Verbenaceae, cedidos gentilmente pela Dr^a Nessana Dartora do Laboratório de Bioquímica do *campus* Cerro Largo.

3 Metodologia

As concentrações dos extratos das folhas utilizadas para os experimentos estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1. Extratos de *A. gratissima*, *A. citadora* e *A. virgata* e as devidas concentrações que serão testadas em embriões de *Danio rerio*.

Extratos	Concentrações		
Etanólico	1 mg/ml	2 mg/ml	10 mg/ml
Aquoso	1 mg/ml	2 mg/ml	10 mg/ml

Fonte: Elaborado pelos autores (2020)

O protocolo aplicado é o *Fish Embryo Acute Toxicity Test (FET)*, com modificações (OECD, 2013). Um grupo de 6 casais foi separado um dia antes do experimento para acasalamento e posterior obtenção dos embriões, que depois foram separados e divididos em viáveis e não viáveis. Os ovos recém fertilizados foram expostos no extrato que se deseja estudar, alocados em placas do tipo Elisa, com 24 poços de 2,5 mL cada. Além disso, a cada

24 horas, foram realizadas até quatro observações com auxílio de estereó microscópio, registrando como indicadores de letalidade os seguintes parâmetros: coagulação de ovos fertilizados, falta de formação de somitos, falta de descolamento da cauda do saco vitelínico e ausência de batimentos cardíacos.

4 Resultados e Discussão

Os primeiros experimentos apresentaram vários problemas que exigiram modificações no protocolo FET. O primeiro problema com o estabelecimento do protocolo foi a adequação da concentração da substância indicada como controle positivo 3,4 Dicloroanilina a 4%. Essa concentração se mostrou altamente tóxica matando todos os embriões em 24 h. Foram feitas novas tentativas com 1%, 0,5%, 0,2% e 0,1% de 3,4-Dicloroanilina. A concentração ideal foi de 0,1% que ofereceu 20% de embriões viáveis em 96 h.

Outro fator que o protocolo necessitou de adequação foi o número de casais para acasalamento. O protocolo FET propõe dois machos para uma fêmea, mas não houveram sucessos na reprodução com essa proporção. Após várias tentativas, a melhor proporção foi de dois machos para duas fêmeas.

Outra variável do FET é o uso de água reconstituída para manter os embriões em controle negativo. Os resultados não foram promissores com o uso dessa água, ocorrendo morte dos embriões que não chegaram ao final das 96 horas de tratamento. Dessa forma, foram realizados testes com água do aquário, água sem cloro e água destilada para encontrar o melhor meio para o grupo controle negativo.

Após essas modificações foram feitos testes com dois extratos da *Aloysia gratissima* e *Aloysia virgata*, extrato aquoso e etanólico. Os resultados preliminares mostraram a morte de todos os embriões em 24 horas para ambos os extratos de ambas as espécies nas concentrações de 2 mg/mL e 10 mg/mL. Trabalhos realizados com extratos de folhas de espécies do mesmo gênero, também indicaram efeito antiproliferativo em células meristemáticas de *Allium cepa*, bem como diminuição de viabilidade celular em culturas de células tumorais (SALAMA et al. 2021; HISTER et al. 2009). O único extrato que possibilitou 15% de sobrevivência dos embriões, depois de 96 horas de exposição, foi o extrato de *Aloysia virgata* em 1 mg/mL.

5 Conclusão

O protocolo FET apresentou variáveis que não permitiram repetibilidade, necessitando

adequações. Os extratos em concentrações mais altas apresentaram potencial toxicológico para embriões.

Referências Bibliográficas

CEOLIN, Teila; HECK, Rita Maria; BARBIERI, Rosa Lía; SOUZA, Andrieli Daiane Zdanski de; RODRIGUES, Walter Fagundes; VANINI, Marisa. Plantas medicinais utilizadas como calmantes por agricultores ecológicos da região sul do Rio Grande do Sul, Brasil.

Revista de Enfermagem Ufpe On Line, [S.L.], v. 3, n. 4, p. 1034, 20 set. 2009.

HISTER, C. A. L.; LAUGHINGHOUSE, H. D.; DA SILVA, C. B. DO CANTO DOROW, T. S.; TEDESCO, S. B. Evaluation of the Antiproliferative Effect of Infusions and Essential Oil of *Aloysia gratissima*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 12, n. 24, p. 1581-1584, 2009.

LIESCHKE, Graham J.; CURRIE, Peter D.. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nature Reviews Genetics**, [S.L.], v. 8, n. 5, p. 353-367, maio 2007. Springer Science and Business Media.

MONTANARI, Ricardo M; A BARBOSA, Luiz C.; DEMUNER, Antonio J; SILVA, Cleber J; CARVALHO, Larissa s; ANDRADE, Nélio J. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from verbenaceae species: alternative sources of (e)-caryophyllene and germacrene-d. **Química Nova**, [S.L.], v. 34, n. 9, p. 1550-1555, set. 2011.

OECD. Diretriz para ensaio de produtos químicos. **Test N236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET)**. Organisation for Economic Co-operation and Development. 2013.

SALAMA, Y.; JARADAT, N.; HATTORI, K.; HEISSING, B. Aloysia Citrodora Essential Oil Inhibits Melanoma Cell Growth and Migration by Targeting HB-EGF-EGFR Signaling. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 15, 2021.

TAUFNER, Caroline F; FERRAÇO, Eliane B; RIBEIRO, Luci F. Uso de plantas medicinais como alternativa fitoterápica nas unidades de saúde pública de Santa Teresa e Marilândia, ES. **Natureza Online**, Espírito Santo, v. 1, n. 4, p. 30-39. 2006.

Palavras-chave: Plantas; plantas medicinais; embriões; *Danio rerio*.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES – 2021-0217.

Financiamento: Bolsa IC/UFFS.