

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}, SUZIMEYRE BARONI^{2,5}

1 Introdução

O uso de plantas para fins medicinais acompanha a sociedade na sua história. A contribuição da construção dos sistemas de Medicina Tradicional que estão dispersos pelo mundo se deu através de povos antigos como Egípcios, Gregos, Hindus, Persas e mais recentemente os povos da América Pré-colombiana, estes utilizavam amplamente os recursos terapêuticos das plantas (Rocha *et.al*, 2015).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2002), grande parte da população de países em desenvolvimento utiliza plantas medicinais ou preparações destas. Dentre as famílias botânicas utilizadas, destaca-se a Verbenaceae, que no Brasil são registrados 15 gêneros distribuídos em aproximadamente 290 espécies (BFG 2018). Além disso, dentre seus gêneros, predomina-se o *Aloysia*, com espécies nativas do Rio Grande do Sul. Dentre as espécies do gênero *Aloysia*, destaca-se as espécies *Aloysia gratíssima*, *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. gratíssima*, “cidró” e “erva-Luísa” para *A. citriodora* e “mutre” para *A. virgata*. No uso popular, ambas as espécies são usadas para tratar doenças relacionadas ao sistema respiratório, nervoso central, com o efeito “calmante” e digestivo (CEOLIN *et al.*, 2009). Porém, há poucos estudos quanto ao potencial citotóxico e genotóxico em eucariotos (MONTANARI *et al*; 2011).

Outrossim, diferentes modelos animais vêm sendo utilizados na pesquisa científica como alternativa ao uso de mamíferos e o *Danio rerio* (zebrafish), vem sendo explorado em diversas áreas de estudo. A criação de zebrafish, destaca-se pelo espaço menor ocupado e baixo custo de manutenção diários comparada à de camundongos (ZORZETTO; GUIMARÃES, 2013). Além disso, as vantagens do uso do zebrafish estão atreladas a fertilização e desenvolvimento exclusivamente externos, alta taxa de fecundidade, desenvolvimento rápido e

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, **Orientadora.**

ovos relativamente grandes e transparentes (LIESCHKE; CURRIE, 2007). Ademais, o uso de embriões dessa espécie apresenta vantagens em relação ao uso de indivíduos adultos, dentre elas, a agilidade do teste. 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).

Dessa maneira, este trabalho propõe avaliar a toxicidade de extratos vegetais através de ensaios embrionários utilizando o modelo zebrafish.

2 Objetivos

Determinar a toxicidade e a 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 no *campus* Cerro Largo; propondo modificações no método Fish Embryo Acute Test (FET); realizar testes com os extratos aquoso e etanólico em diferentes concentrações, obtidos através das folhas da família Verbenaceae.

3 Metodologia

Os extratos das folhas das plantas foram cedidos gentilmente pela Dr^a Nessana Dartora do Laboratório de Bioquímica do *campus* Cerro Largo. Além disso, as concentrações dos extratos utilizados para os experimentos estão dispostas na Tabela 1.

Tabela 1. Extratos de *A. gratíssima*, *A. citriodora* 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). Dessa forma, foram separados seis casais um dia antes do experimento para acasalamento e posterior obtenção dos embriões, após isso, selecionou-se os viáveis e descartou-se os não viáveis. Os ovos recém-fertilizados foram expostos ao extrato que se deseja estudar, alocados em placas do tipo Elisa, com 24 poços de 2,5 mL cada. Outrossim, a cada 24 horas, foram realizadas até quatro observações com auxílio de estereomicroscópio, 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

Algumas modificações foram realizadas no protocolo FET, como 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 horas. Através disso, foram feitas novas tentativas com 1 %, 0,5 %, 0,2 % e 0,1 % de 3,4-Dicloroanilina. A concentração ideal ficou em 0,1 %, que ofereceu 20% de embriões viáveis nas 96 h de exposição.

Após as modificações, foram realizados testes com os extratos de todas as espécies, tanto aquoso como etanólico. Os extratos etanólicos em todas as concentrações levaram a coagulação de todos os embriões em 24 horas evidenciando que compostos, presentes no extrato etanólico, apresentam potencial tóxico o suficiente para impedir as rotas de embriogênese. Estudos realizados por Montanari et al. (2011) com *A. virgata* apontam efeitos bactericidas contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, atividades semelhantes também foram encontradas em *A. gratíssima* por Souza e Wiest (2007), para bactérias relacionadas a casos de pneumonias e outros quadros respiratórios em humanos e animais.

Os extratos que possibilitaram análise dos embriões durante as 96 horas de exposição, foram os extratos aquosos de *Aloysia virgata* e *Aloysia citriodora*, na concentração de 1 mg/mL, conforme exposto na tabela 2. Os dados obtidos ainda serão submetidos a testes estatísticos para termos maiores evidências dos danos que os extratos provocaram nesse organismo.

Tabela 2. Porcentagens de sobrevivência de embriões nos extratos aquosos 1mg/mL de *Aloysia virgata* e *Aloysia Citriodora*.

Nome científico	Sobrevivência
<i>Aloysia virgata</i>	15 %
<i>Aloysia Citriodora</i>	35 %

Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

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).

5 Conclusão

O protocolo FET apresentou variáveis para nosso teste que necessitou de algumas adequações no processo de execução. Os extratos das três espécies em concentrações mais altas apresentaram potencial toxicológico para embriões.

Referências Bibliográficas

- BFG (The Brazil Flora Group). Brazilian Flora 2020: Innovation and collaboration to meet Target 1 of the Global Strategy for Plant Conservation (GSPC). **Rodriguésia**, v. 69, n. 4, p. 1513-1527, 2018.
- CEOLIN, T. *et al.* Plantas medicinais utilizadas como calmantes por agricultores ecológicos da região sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista de Enfermagem Ufpe On Line**, v. 3, n. 4, p. 253-260, 2009.
- ISMAIL, H.F. *et al.* Comparative study of herbal plants on the phenolic and flavonoid content, antioxidant activities and toxicity on cells and zebrafish embryo. **Journal Of Traditional And Complementary Medicine**, v. 7, n. 4, p. 452-465, 2017.
- LAHNSTEINER, F. The Sensitivity and Reproducibility of the Zebrafish (*Danio rerio*) Embryo Test for the Screening of Waste Water Quality and for Testing the Toxicity of Chemicals. **Atla**, v. 28, p. 299-311, 2008.
- LIESCHKE, G. J.; CURRIE, P. D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 5, p. 353-367, maio 2007. Springer Science and Business Media.
- MONTANARI, R.M. *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from verbenaceae species: alternative sources of (e)-caryophyllene and germacrene-d. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1550-1555, 2011.
- OECD. Diretriz para ensaio de produtos químicos. Test N236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET). Organisation for Economic Co-operation and Development. 2013.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005**. 2002.
- ROCHA, F.A.G. *et al.* O uso terapêutico da flora na história mundial. **Holos**, v. 1, p. 49-61, 2015.

SALAMA, Y. *et al.* 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.

SOUZA, A.A.; WIEST, J.M. Atividade anti-bacteriana de Aloysia gratissima (Gill et Hook) Tronc. (garupa, erva santa), usada na medicina tradicional no Rio Grande do Sul – Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, p. 23-29. 2007.

ZORZETTO, R.; GUIMARÃES, M. Um peixe modelo. **Pesquisa FAPESP**, n. 209, 2013.

Palavras-chave: Plantas medicinais; ensaios embrionários; Zebrafish.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES-2022-0181.

Financiamento: Bolsa IC/UFFS.