



Estudo fitoquímico preliminar e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de extrato obtido de frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill (*Solanaceae*)

Araújo, M.G.F.1*, Cunha, W.R.2; Veneziani, R.C.S.2

¹Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista

²Núcleo de Pesquisas em Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade de Franca

Recebido 18/05/2010 / Aceito 09/08/2010

RESUMO

Neste trabalho, avaliou-se o perfil fitoquímico e a toxicidade preliminar frente a larvas de *Artemia salina* do extrato etanólico de frutos de *Solanum lycocarpum*. O extrato foi submetido à análise fitoquímica preliminar para identificação das principais classes de metabolitos secundários presentes e testado frente a larvas de *A. salina* para obtenção das concentrações letais médias (CL50%). Os testes fitoquímicos demonstraram a presença de fenóis, taninos, saponinas, alcalóides e esteroides livres. O extrato foi fracionado em diferentes solventes para a avaliação da toxicidade frente à *A. salina*, apresentando considerável citotoxicidade na fração hidroalcoólica (CL50% = 285,546 µg/mL).

Palavras-chave: *Solanum lycocarpum*, *Artemia salina*, triagem fitoquímica preliminar.

INTRODUÇÃO

Contando com muitos representantes no Cerrado brasileiro, a família Solanaceae está incluída na subclasse Asteridae, da ordem Solanales (Cronquist, 1981; Judd et al., 2007), e é uma das maiores e mais complexas dentre as Angiospermas, com 92 gêneros e cerca de 2.300 espécies. Na América do Sul, encontra-se um dos principais centros de diversidade e endemismo do mundo (Hunziker, 2001). O gênero *Solanum* L. é o maior e mais complexo da família Solanaceae (Silva et al., 2003), conhecido por possuir uma variedade de atividades biológicas, incluindo atividade antifúngica, moluscida, teratogênica e embriotóxica (Esteves-Souza et al., 2002). As saponinas de caráter básico, pertencentes ao grupo dos alcalóides esteroidais

glicosilados, são características do gênero *Solanum* (Simões et al., 2004). Além dos alcalóides, os compostos fenólicos constituem um dos grupos de substâncias frequentes em espécies desse gênero (Silva et al., 2003; Araújo et al., 2010).

A espécie vegetal *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill., popularmente conhecida como lobeira ou fruta-do-lobo, é típica do Cerrado brasileiro e seus frutos são usados popularmente para diminuição de níveis de glicose e colesterol (Cruz, 1982, Dall'Agnol & Von Poser, 2000; Oliveira Jr. et al., 2003, Yoshikawa et al., 2007). Acredita-se que seu nome vulgar se deva ao fato de se constituir um alimento consumido pelo lobo-guará. A fruta-do-lobo, quando verde, é constituída de polpa bastante firme, de coloração branca, mas quando o fruto se torna totalmente maduro, a polpa passa a apresentar uma coloração amarelada, macia, adocicada e extremamente aromática (Oliveira Jr. et al. 2004). Uma preparação medicinal obtida com frutos de *S. lycocarpum* vem sendo comercializada e consiste no sedimento de frutos verdes em solução aquosa até formação de um fino granulado, conhecido como polvilho-de-lobeira (Dall'Agnol & Von Poser, 2000; Schwarz et al., 2007).

O método de análise com *Artemia salina* é proposto como um simples bioensaio para pesquisa preliminar de atividade de produtos naturais. Por esse método, é possível determinar a concentração letal 50% (CL50%) de componentes ativos e extratos em um meio salino. A atividade do teste é manifestada pela toxicidade de componentes ativos, frações ou extrato de produtos naturais frente ao organismo marinho *A. salina*. Esse simples organismo pode ser usado como um monitor conveniente para a citotoxicidade de produtos, além de ser um método rápido, seguro e acessível (Meyer, 1982; McLaughlin, 1998). O ensaio permite a avaliação da toxicidade geral e, portanto, é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica. Neste estudo, buscou-se avaliar qualitativamente o perfil químico da espécie vegetal em estudo e determinar a toxicidade de frações obtidas a partir do extrato de *S. lycocarpum* frente à *A. salina*.

Autor correspondente: Marcelo Gonzaga de Freitas Araújo - Rod. Araraquara-Jau, km1 - CEP.14801-902 - Araraquara - SP - tel.:55 16 33016955 - e-mail: mgfaraujo@yahoo.com.br,

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e identificação do material vegetal

Foram coletados frutos de *S. lycocarpum* verdes, encontrados em arbustos nativos da região de Monte Santo de Minas (MG) no mês de junho de 2002. Uma exsicata foi identificada pela Profa. Dra. Ângela Borges Martins (Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da UNICAMP) e depositada no herbário da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) sob o número UEC 44834.

Obtenção do extrato

Os frutos foram cortados em cubos e submetidos à secagem em estufa de ar circulante, a uma temperatura de 60°C, durante 72 horas e, em seguida, pulverizados em moinho de facas originando 1,7 kg de pó. O pó assim obtido foi macerado durante uma semana utilizando-se 3,5 litros de solução etanólica (80%). Ao término desse período, o material foi filtrado em papel de filtro e concentrado em evaporador rotativo. O procedimento foi repetido outras quatro vezes. Ao final de todo o processo, conseguiu-se um total de 235,3g de extrato etanólico.

Análise fitoquímica preliminar

O extrato foi submetido à triagem fitoquímica preliminar para detecção das principais classes de metabólitos secundários através de reações químicas que resultam no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado, característico para cada classe de substâncias (Matos, 1997, Simões et al., 2004).

Ensaio toxicológico frente à *A. salina*

O extrato etanólico dos frutos de *S. lycocarpum* foi submetido à partição com solventes de polaridade crescente. Para isso, 5g de extrato foi ressuscitado em 150 mL de solução etanólica (80%) e extraído três vezes com 100 mL de hexano. Separada a fração hexânica, a fase hidroalcoólica foi novamente extraída três vezes com 100 mL de diclorometano. Obtida a fração diclorometânica, procedeu-se nova extração da fase hidroalcoólica, com três porções com 100 mL de acetato de etila. Ao final do procedimento de partição, os solventes foram evaporados em evaporador rotativo e obtidas quatro frações, a saber: frações hidroalcoólica (4,1 g), acetato de etila (62 mg), diclorometânica (41 mg) e hexânica (46 mg). Tais frações foram então submetidas ao bioensaio toxicológico frente à *A. salina*.

A avaliação da toxicidade frente à *A. salina* foi realizada segundo metodologia descrita por McLaughlin (1998). Inicialmente, foram preparados dois litros de solução de sal marinho em água mineral não clorada (30 g/L) para incubação dos ovos de *A. salina* (10 mg), que foram exposto à luz artificial (lâmpada incandescente de 60 watts) durante 48 horas para que houvesse a eclosão das

larvas. Para efetuar o ensaio, foram colocados, em triplicata, dez exemplares de náuplios em poços contendo 5 mL de solução salina, com frações em hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica, dissolvidas em solução de dimetilsulfóxido 1%, nas concentrações de 1000, 100, 10 e 1 µg/mL, respectivamente. Um grupo controle também foi preparado nas mesmas condições sem a presença das frações. Os poços foram mantidos sob luz artificial e temperatura ambiente por um período de 24 horas. Após esse período, foi realizada a contagem do número de náuplios sobreviventes do grupo controle e dos grupos expostos às frações.

Análise estatística

Com os valores obtidos, estimou-se a CL50% através do método de Análise de Probitos, com 95% de intervalo de confiança, utilizando-se o programa EPA probit analysis program, versão 1.5.

RESULTADOS

A triagem fitoquímica preliminar do extrato etanólico de frutos de *S. lycocarpum* revelou a presença de compostos fenólicos, principalmente taninos, e também alcalóides, esteróides livres e saponinas (Tabela 1).

Tabela 1. Análise fitoquímica preliminar no extrato etanólico de frutos de *S. lycocarpum*

Classe de metabólitos	Resultado
Fenóis	+
Taninos	+
Flavonoides	-
Antraquinonas	-
Alcalóides	+
Esteróides	+
Saponinas	+
Resinas	-

+ Presença; - Ausência.

A Tabela 2 apresenta o número de óbitos de *A. salina* ocorridos na presença das diferentes concentrações das frações testadas. Uma vez que o programa de análise de probitos (EPA probit analysis program, versão 1.5.) não admite o *input* de dados em triplicata, o número de óbitos para cada concentração foi considerado em conjunto, referindo-se então a um total de 30 indivíduos expostos.

Tabela 2. Número de óbitos de *A. salina* frente às frações testadas e suas respectivas concentrações.

Concentração (µg/mL)	Hexano	Diclorometano	Acetato de etila	Hidroalcoólica	Controle
1	0	0	0	0	0
10	0	0	0	5	0
100	0	0	7	10	0
1000	4	5	21	20	0

Não houve óbitos no grupo controle; foram expostos 30 indivíduos em cada concentração.

Os dados da Tabela 2, quando analisados segundo o método de Finney (1971), resultaram nos valores de CL50% constantes da Tabela 3. Cabe mencionar que não foram calculados os valores para as frações em hexano e

em diclorometano, pois o método de análise de probitos requer óbito de larvas em, pelo menos, duas concentrações.

Tabela 3. CL50% das frações testadas e respectivos intervalos de confiança de 95%.

Fração	CL50% (µg/mL)	Intervalo de confiança	
		Limite inferior	Limite superior
Hexano*	-	-	-
Diclorometano*	-	-	-
Acetato de etila	393,088	227,771	771,599
Hidroalcoólico	285,546	131,084	860,331

*Não calculado, pois o método de análise de probitos requer resposta (óbitos) em, pelo menos, duas concentrações.

DISCUSSÃO

A metodologia descrita por Matos (1997) não permite identificar a presença de glicoalcalóides no extrato etanólico dos frutos de *S. lycocarpum*, visto que os alcalóides esteroidais glicosilados são muito polares para que possam ser extraídos com solução éter-clorofórmio, conforme descreve a técnica. Após a identificação de saponinas no extrato e baseando-se na informação de que o gênero *Solanum* é caracterizado pela presença de saponinas de caráter básico pertencentes ao grupo de alcalóides esteroidais glicosilados (Simões et al., 2004), o extrato foi submetido à hidrólise ácida através da adição de excesso de ácido clorídrico e aquecimento sob refluxo por 6 horas, com intuito de promover a separação da porção heterosídica da molécula, tornando possível a extração da aglicona alcaloídica esteroidal utilizando a solução éter-clorofórmio. Esse procedimento permitiu visualizar reação positiva no teste de alcalóides e de esteróides, o que sugere a presença de alcalóides esteroidais e seus glicosídeos no extrato em estudo. Segundo literatura, os glicoalcalóides solamargina e solasonina pertencem ao grupo de alcalóides esteroidais glicosilados, cuja aglicona corresponde ao composto solasodina, e são característicos do gênero *Solanum* (Weissenberg, 2001; Maruo et al., 2003; Simões et al., 2004; Yoshikawa et al., 2007; Nakamura et al., 2008).

Schwarz et al. (2007) verificaram que o conteúdo de alcalóides presente nos frutos de *S. lycocarpum* foi de 1.85% e, dentre esses, 0.06% corresponde a solamargina e 0.09% a solasonina. Recentemente, Nakamura et al. (2008) isolaram cinco novas saponinas esteroidais dos frutos de *S. lycocarpum*. Especialmente nas áreas relacionadas com a ciência dos alimentos, toxicologia, e farmacologia, os glicoalcalóides esteroidais e suas agliconas têm recebido atenção especial. A solasodina é uma potencial matéria-prima como protótipo na produção de medicamentos esteróides, assim como os seus triglicosídeos solasonina e solamargina (Chen & Miller, 2001; Eanes et al., 2008).

Diversos ensaios biológicos simples têm sido desenvolvidos no intuito de serem utilizados no monitoramento de extratos vegetais, dentre esses, a toxicidade sobre *A. salina*, que é um bioensaio rápido e conveniente como “screening” prévio no monitoramento de extratos de plantas. O primeiro trabalho relativo ao

uso de *A. salina* em bioensaios foi publicado em 1956 e, a partir daí, inúmeros artigos têm sido reportados na literatura em estudos ambientais, utilizando produtos e toxinas naturais, além de extratos de plantas (Cavalcante et al., 2000). Muitos laboratórios de Produtos Naturais têm inserido esse ensaio biológico dentro de suas rotinas de isolamento, purificação e elucidação estrutural, no intuito de selecionar e monitorar o estudo fitoquímico de extratos de plantas na procura de substâncias bioativas (Siqueira et al., 1998). As frações ou substâncias ativas são, posteriormente, testadas em ensaios de citotoxicidade, obtendo-se uma boa correlação. Nascimento et al. (2008) realizaram estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente à *A. salina* com três espécies do gênero *Phyllanthus*, obtidos em diferentes locais de coleta, e, dessa forma, puderam concluir que esse bioensaio pode servir como um monitoramento, visto que, em função do local de coleta, a atividade biológica pode ser diferente.

Alves et al. (2000) avaliaram a toxicidade de extratos de 60 plantas do cerrado brasileiro frente à *A. salina* em que se incluíam os extratos em diclorometano e diclorometano/metanol (1:1) obtidos de *S. lycocarpum*. Entretanto, os valores de CL50% encontrados não estão relatados, pois os autores desconsideraram valores superiores a 100 µg/mL. Já Meyer et al. (1982) consideraram significativo valores menores que 1000 µg/mL, como os encontrados para as frações em acetato de etila e hidroalcoólica (393,088 µg/mL e 285,546 µg/mL respectivamente). Dessa forma, pode-se inferir que as frações em acetato de etila e hidroalcoólica de *S. lycocarpum* apresentaram resultados que são passíveis de futuras investigações acerca da atividade biológica desse vegetal. Os resultados encontrados sugerem ainda, em nível especulativo, que a considerável toxicidade encontrada na fração hidroalcoólica (285,546 µg/mL) possa estar relacionada com presença de glicoalcalóides esteroidais. Almeida et al. (2010) avaliaram o potencial mutagênico *in vitro* do glicoalcalóide solamargina, que, em baixas concentrações, apresentou efeito mutagênico. A presença desses alcalóides em frutos de *S. lycocarpum* e sua similaridade estrutural com muitos hormônios esteroidais estimularam a realização de muitos trabalhos, descrevendo investigações acerca de possíveis efeitos tóxicos relacionados ao sistema reprodutivo (Maruo et al., 2003; Schwarz et al., 2005; Schwarz et al., 2007).

Através da análise fitoquímica preliminar, foi possível identificar classes de metabólitos secundários de interesse farmacológico presente no extrato em estudo. A constatação de alcalóides esteroidais na caracterização química do extrato está de acordo com investigações prévias, que relatam a presença de glicoalcalóides esteroidais em espécies do gênero *Solanum*. A modificação realizada no teste para identificação de esteróides e alcalóides mostrou um ponto ineficaz da metodologia clássica descrita por Matos (1997) no tocante à detecção de alcalóides esteroidais glicosilados no extrato analisado. De forma complementar aos estudos fitoquímicos, a associação do bioensaio de toxicidade sobre *A. salina* mostrou relevância no intuito de monitorar a pesquisa desse extrato vegetal, principalmente favorecido pela simplicidade com que pode ser manuseado, pela rapidez dos ensaios e pelo baixo custo. A toxicidade apresentada

pelas frações hidroalcoólica e de acetato de etila torna-se importante no direcionamento para isolamento e identificação de compostos presentes nessas frações ativas e para caracterização da atividade biológica dessa planta medicinal.

ABSTRACT

Phytochemical screening and toxicological bioassay with brine shrimp larvae (Artemia salina Leach) of an extract obtained from fruits of Solanum lycocarpum A. St-Hill

The phytochemical profile of ethanolic extract of *Solanum lycocarpum* fruits was analyzed and preliminary toxicity tests were performed against brine shrimp larvae. The extract was subjected to preliminary phytochemical analysis to identify the main classes of secondary metabolites and tested against the larvae of *A. salina* to obtain the median lethal concentrations (LC50%). The phytochemical tests showed the presence of phenols, tannins, saponins, alkaloids and free steroids. The extract was fractionated with various solvents for toxicity testing against the larvae and the hydroalcoholic fraction showed considerable cytotoxicity (CL50% = 285.546 g/mL).

Keywords: *Solanum lycocarpum*, *Artemia salina*, phytochemical screening

REFERÊNCIAS

- Almeida AE, Cardoso CRP, Almeida DV, Moreira RRD, Silva M, Varanda EA. Mutagenic activity of glycoalkaloids from *Solanum palinacanthum* Dunal (Solanaceae) found in the Brazilian cerrado. *Lat Am J Pharm.* 2010; 29(1):122-6.
- Alves TMA, Silva AF, Brandão M, Grandi TSM, Smânia EFA, Júnior AS, Zani CL. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95(3): 367-73.
- Araújo MGF, Galeane MC, Castro AD, Salgado HRN, Almeida AE, Cunha WR, Veneziani RCS, Moreira RRD. Pharmacognostical evaluation of fruits of *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill. (Solanaceae). *Phcog J.* 2010; 2(9): 247-52.
- Cavalcante MF, Oliveira MCC, Velandia JR, Echevarria A. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. *Quim Nova* 2000; 23(1): 20-2.
- Chen Z, Miller AR. Steroidal alkaloids in Solanaceous vegetable crops. *Hortic Rev* 2001; 25:171-96.
- Cronquist A. An integrate system of classification of flowering plants. New York: Columbia University Press; 1981. 1262p.
- Cruz GL. Dicionário de Plantas Úteis no Brasil. 2 ed, Rio de Janeiro: Civilização Brasileira; 1982. 599p.
- Dall'Agnol R, Von Poser GL. The use of complex polysaccharides in the management of metabolic diseases: the case of *Solanum lycocarpum* fruits. *J Ethnopharmacol.* 2000; 71:337-41.
- Eanes RC, Tek N, Kirsoy O, Frary A, Doganlar S, Almeida AE. Development of practical HPLC methods for the separation and determination of eggplant steroidal glycoalkaloids and their aglycones. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2008; 31:984-1000.
- Esteves-Souza A, Silva TMS, Alves CCF, Carvalho MG, Braz-Filho R, Echevarria A. Cytotoxic activities against ehrlich carcinoma and human K562 leukaemia of alkaloids and flavonoid from two *Solanum* species. *J Braz Chem Soc.* 2002; 13(6):838-42.
- Finney DJ. Probit Analysis. 3ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1971. p.76-80
- Hunziker AT. The genera of Solanaceae. Ruggell: A.R.G. Gantner Verlag K.G; 2001. 500p.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. Plant Systematics: A phylogenetic approach. 3 ed. Massachusetts.; Sinauer Associates, 2007. 565p.
- Matos FJ. Introdução à fitoquímica experimental. 2.ed. Fortaleza: Edições UFC; 1997. 141p.
- Maruo VM, Bernardi MM, Spinosa HS. Toxicological evaluations of long-term consumption of *Solanum lycocarpum* St. Hill fruits in male and female adult rats. *Phytomedicine* 2003; 10(1):48-52.
- McLaughlin JL. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Inf J.* 1998; 32:513-24
- Meyer BN. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 1982; 45:31-4.
- Nakamura S, Hongo M, Sugimoto S, Matsuda H, Yoshikawa M. Steroidal saponins and pseudoalkaloid oligoglycoside from Brazilian natural medicine, "fruta do lobo" (fruit of *Solanum lycocarpum*). *Phytochemistry* 2008; 69:1565-72.
- Nascimento JE, Melo AFM, Lima e Silva TC, Veras Filho J, Santos EM, Albuquerque UP, Amorim ELC. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2008; 29(2):145-50.
- Oliveira Jr EN, Santos CD, Abreu CMP, Corrêa AD, Santos JZL. Análise nutricional da fruta-do-lobo (*Solanum lycocarpum* St. Hill.) durante o amadurecimento. *Ciênc Agrotec.* 2003; 27(4):846-51.
- Oliveira Jr EN, Santos CD, Abreu CMP, Corrêa AD, Santos JZL. Alterações pós-colheita da fruta-de-lobo (*Solanum lycocarpum* St. Hill.) durante o amadurecimento: Análises físico-químicas, químicas e enzimáticas. *Rev Bras Frutic.* 2004; 26(3):410-3.

Schwarz A, Felipe EC, Bernardi MM, Spinosa HS. Impaired female sexual behavior of rat offspring exposed to *Solanum lycocarpum* unripe fruits during gestation and lactation: lack of hormonal and fertility alterations. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005; 81(4):928-34.

Schwarz A, Pinto E, Haraguchi M, Oliveira CA, Bernardi MM, Spinosa HD. Phytochemical study of *Solanum lycocarpum* (St. Hil) unripe fruit and its effects on rat gestation. *Phytother Res.* 2007; 21:1025-8.

Silva TMS, Carvalho MG, Braz-Filho R, Agra MF. Ocorrência de flavonas, flavonóis e seus glicosídeos em espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae). *Quím Nova* 2003; 26:517-22.

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia, da planta ao medicamento.* 5 ed Florianópolis: Ed. UFRGS: 2004. 821p.

Siqueira JM, Bomm MD, Pereira NFG, Garcez WS, Boaventura MAD. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* – Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. *Quím Nova* 1998; 21(5):557-9.

Weissenberg M. Isolation of solasodine and other steroidal alkaloids and sapogenins by direct hydrolysis-extraction of *Solanum* plants or glycosides therefrom. *Phytochemistry* 2001;58:501–8.

Yoshikawa M, Nakamura S, Ozaki K, Kumahara A, Morikawa T, Matsuda H. Structures of steroidal alkaloid oligoglycosides, robeneosides A and B, and antidiabetogenic constituents from the Brazilian medicinal plant *Solanum lycocarpum*. *J Nat Prod* 2007; 70:210-4.

