



**CENTRO
UNIVERSITÁRIO**

Centro Universitário FAG

MARIANA FORTE

**ANÁLISE TOXICOLÓGICA DOS EXTRATOS DE *Plantago major* e *Eucalyptus globulus*
FRENTE AO CRUSTÁCEO *ARTEMIA SALINA***

**CASCADEL
2021**

MARIANA FORTE

**ANÁLISE TOXICOLÓGICA DOS EXTRATOS DE *Plantago major* e *Eucalyptus globulus*
FRENTE AO CRUSTÁCEO *ARTEMIA SALINA***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Centro Universitário da
Fundação Assis Gurgacz, Curso de
Farmácia.

Prof. Orientador: Ana Claudia C. S. Reis.

CASCADEL
2021

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DA FUNDAÇÃO ASSIS
GURGACZ**

MARIANA FORTE

ANÁLISE TOXICOLÓGICA DOS EXTRATOS DE *Plantago major* e *Eucalyptus globulus* FRENTE AO CRUSTÁCEO *ARTEMIA SALINA*

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao Curso de Farmácia, do Centro Universitário da Fundação Assis Gurgacz-FAG, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia, sob a orientação da professora Ana Claudia C. S. Reis, tendo sido _____ com nota _____ na data de 18 de junho de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Ana Claudia C. S. Reis
Orientador

Avaliador 1

Avaliador 2

Cascavel/PR, 18 de Junho de 2021.

SUMÁRIO

REVISÃO DE LITERATURA.....	4
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	9
ARTIGO.....	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
ANEXOS.....	21
ANEXO I: NORMAS DA REVISTA CIENTÍFICA.....	21
ANEXO II: RELATÓRIO DOC X WEB.....	25

REVISÃO DE LITERATURA

Plantas medicinais

A utilização de plantas no tratamento, cura e prevenção de enfermidades é uma das mais antigas formas de prática medicinal na antiguidade, tão antiga como a própria espécie humana. Apesar de a medicina ter evoluído muito desde a metade do século XX, existem barreiras como acesso aos hospitais e obtenção de exames e medicamentos pelas populações carentes. Por esses motivos e também devido a tradição de uso de plantas medicinais, a utilização em países em desenvolvimento fica cada vez maior (JUNIOR, 2005).

Segundo Pimpão (2007), além do uso de plantas na medicina popular com finalidades terapêuticas, é importante mencionar que as mesmas têm contribuído com o passar do tempo, para a aquisição de diversos fármacos que são utilizados até hoje. Um exemplo disso é a morfina.

No planeta, há entre 250-500 mil espécies de plantas, em que apenas 5% das mesmas têm sido estudadas fitoquimicamente, sendo então a grande maioria desconhecida em ponto de vista científico (PIMPÃO, 2007). Logo, não pode se ter certeza da toxicidade de todas elas.

A intoxicação por plantas possuem distribuição e intensidade visivelmente regionais, e embora não ocupem uma posição de destaque em atendimentos à intoxicação, é necessária a atenção, pois diversas plantas tóxicas são de uso ornamental. Em adultos, as principais causas são provocadas por uso inadequado de fitoterápicos e chás. Também há casos de uso de plantas alucinógenas e abortivas (HERNANDEZ et al., 2017).

Segundo Hernandez (2017) a toxicidade de uma planta varia de acordo com as condições em que cresce. Algumas podem ser venenosas durante a vida toda, outras quando frutificam. E também, algumas partes da planta podem ser mais tóxicas do que outras. Quando houver suspeita de intoxicação por planta, aconselha-se a coleta de uma amostra da mesma e levar junto com o paciente ao serviço de saúde, pois os nomes populares podem variar de acordo com cada região.

Segundo Campos (2016) há uma percepção na população em que a utilização de plantas para o tratamento de doenças é natural, seguro, barato e eficaz. No entanto, na alimentação e no uso terapêutico, deve-se utilizar somente plantas seguras, conhecidas e devidamente identificadas (COLOMBO et al., 2010)

Os testes de toxicidade são elaborados tendo como objetivo prever os efeitos de substâncias tóxicas e examinar a toxicidade relativa das substâncias que são preeminentes na avaliação do ambiente (BAROSA 2003). Os estudos de toxicidade aguda (curto prazo) têm como objetivo caracterizar a relação dose/resposta ao valor estimado de DL50, sendo o

parâmetro que apresenta a probabilidade estatística de uma única dose causar, em 50% dos animais, um efeito letal (PONTE, 2003). É importante lembrar que os testes de toxicidade aguda e a DL50 não são a mesma coisa. A função dos testes é analisar todas as consequências toxicológicas de uma manifestação de curta duração. Já a DL50 é apenas um dos parâmetros que pode resultar de um teste devidamente planejado (MOREIRA, 1993).

As pesquisas realizadas no Brasil para avaliar o uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos ainda estão em fase inicial, assim como o comércio dos mesmos. A maior parte dessa comercialização ocorre em farmácias e lojas de produtos naturais. Algumas vezes, inclusive, essas plantas são aplicadas para uso medicinal diferente dos utilizados pelos silvícolas (JUNIOR, 2005).

Em países desenvolvidos como Estados Unidos e em alguns lugares da Europa existem mais controle em relação ao registro e comercialização de produtos obtidos de plantas. Esses países possuem normas mais inflexíveis para o controle de qualidade e a certificação de preparações vegetais (JUNIOR, 2005).

Substituir os testes toxicológicos em animais por outras alternativas têm ganhado visão, devido ao custo dos animais e pelo sofrimento gerado aos mesmos por conta dos testes (PARRA, 2001). E, também, a busca por ensaios com procedimentos acessíveis e rápidos vem crescendo, adentrando então os testes com *Artemia Salina*.

Artemia salina

A *Artemia Salina* é uma espécie invertebrada de microcrustáceo da ordem *Anostraca*, encontrada na fauna de águas salgadas, utilizada como um alimento vivo para peixes. (CARVALHO et al., 2008). O ensaio de letalidade frente à mesma é uma metodologia muito utilizada na linha de pesquisa de produtos naturais avaliando o potencial tóxico de extratos isolados (HIROTA 2012). Essa espécie é utilizada como um bioindicador.

Segundo Hirota (2012) apesar de ser um ensaio muito simples, o mesmo tem a capacidade de gerar informações úteis de uma forma rápida e econômica. Este ensaio caracteriza-se além da rapidez e por possuir baixo custo por não exigir técnicas assépticas.

Vários laboratórios de produtos naturais possuem ensaios biológicos simples em suas metodologias, com o intuito de monitorar e selecionar o estudo fitoquímico de extratos de plantas na busca por substâncias bioativas. Nesses ensaios encontra-se a toxicidade sobre *Artemia salina* (PIMPÃO, 2007).

O método de análise com esse crustáceo é dito como um simples bioensaio preliminar de toxicidade de componentes ativos através do organismo marinho, assim tornando possível

determinar a DL50 de extratos e componentes ativos em meio salino. A *Artemia salina*, através de um método seguro e acessível, pode também ser utilizado como monitor para a citotoxicidade de produtos (MEYER, 1982).

Logo, o teste mais adequado para avaliar a toxicidade aguda de extratos vegetais e a bioatividade de substâncias químicas é o teste de *Artemia salina*.

Eucalyptus globulus

A espécie *Eucalyptus globulus* pertence à família Myrtaceae, nativa da Austrália e Tasmânia. No Brasil, é conhecido popularmente como eucalipto, eucalipto-comum e eucalipto-limão (RODRIGUES, 2018). O material vegetal de interesse farmacológico são as partes aéreas da planta, como folhas, flores, frutos e também as cascas do caule. Essa espécie se caracteriza por ser uma árvore de grande porte. E além do seu óleo essencial, grande parte dos derivados vegetais da espécie são os extratos alcoólicos, aquosos e hidroalcoólicos. (Ministério da Saúde, 2015).

O óleo essencial do *E. globulus* tem como principal constituinte o monoterpeno chamado eucaliptol (1,8-cineol). A porcentagem encontrada no óleo varia entre 14,55 a 95,61%, dependendo da parte da planta que for utilizada, o método de extração, local e também a época que foi coletada (RODRIGUES, 2018).

O Eucalipto é utilizado para diversas enfermidades, como alívio de dores de garganta, tosse e calafrios, suas folhas pelo corpo diminuem a febre, seu óleo essencial tem ação antibiótica, anti-viral e anti-fúngica. E, também, é utilizado como um anti-séptico muito eficaz (RIGOTTI, 2012).

A respeito de sua toxicidade, o eucalipto apresenta boa tolerabilidade em doses recomendadas, porém em doses mais altas pode acarretar náusea, vômito, gastroenterites, hematúria e até neurotoxicidade (PAULO, 2009).

Plantago major

A espécie *Plantago major* pertence à família Plantaginácea e é facilmente encontrada em quase todo território americano (RODRIGUEZ, 1996). Segundo a OMS, suas folhas possuem ácido oleanólico, ácido cítrico, mucilagem, taninos, saponinos, aucubina, óleo essencial e vitaminas A, C e K.

É uma planta de aproximadamente 15cm de altura com flores pequenas marrom-esverdeadas e com folhas em forma de rosetas. Para a obtenção de seu extrato diferentes

métodos podem ser empregados, como maceração, decocção, infusão, percolação em Soxhlet e extração em banho de ultrassom (Ministério da Saúde, 2014)

Ela é utilizada como antiinflamatório e para neutralizar toxinas. Pode também ser usada para tratar feridas, diarreia, infecções na bexiga e até mesmo para tratar úlceras no estômago (RIGOTTI, 2012).

Em 1999, Lagarto Parra e colaboradores avaliaram o potencial tóxico da *P. major* em um estudo *in vitro* frente a *Artemia salina*. O teste foi realizado com a tintura da planta contendo 49% de teor alcoólico. A DL50 foi estimada após a contagem das larvas vivas. As concentrações de 10, 100 e 1000 mcg/mL da tintura causaram a mortalidade, respectivamente, de 5,7; 9,3 e 10, sendo 10 correspondendo a 100% da mortalidade. Assim, o resultado encontrado para a DL50 foi de 4,74 mcg/mL (Ministério da Saúde, 2014).

REFERÊNCIAS

BAROSA, J., FERREIRA, A., FONSECA, B. e SOUZA, I. **Teste de toxicidade de cobre para *Artemia salina* – Poluição e ecotoxicologia marinha.** Novembro, 2003.

BRASIL, ANVISA. Ministério da Saúde. **Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) No 10, de 9 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências.** Brasília: ANVISA; 2010.

CAMPOS, S.C, SILVA, C.G, CAMPANA, P.R.V, ALMEIDA, V.L. – **Toxicidade de espécies vegetais.** 2016.

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

FOWLER, J. S. L.; RUTTY, D. A. **Methodological aspects of acute toxicity testing partuculary LD50 determinations present use in development of new drugs.** Acta Pharmacol., v. 52, p. 20-30, 1983.

HERNANDEZ, Edna et al. - **Manual de Toxicologia Clínica: Orientações para assistência e vigilância das intoxicações agudas.** São Paulo, 2017.

JUNIOR, Valdir, PINTO, Angelo. – **Plantas Medicinais: Cura Segura?** Quim. Nova, Vol. 28, nº 3, 2005.

MEYER, B. N. **Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents.** Planta Med., v. 45, 1982.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Monografia da espécie *Plantago major* L. (TANCHAGEM).** 2014.

MOREIRA, Eduardo, SALES, Liana, BAUTISTA, Ana. **Avaliação da Toxicidade Aguda (DL50): Proposta para Harmonização dos Protocolos Adotados no Brasil. Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, [S.l.], v. 3, dec. 1993.**

PAULO, Patrícia, DINIZ, Margareth, MEDEIROS, Isac, MORAIS, Liana, ANDRADE, Fábila, SANTOS, Hosana - **Ensaio clínico toxicológico, fase I, de um fitoterápico composto (*Schinus terebinthifolius* Raddi, *Plectranthus amboinicus* Lour e *Eucalyptus globulus* Labill).** Revista Brasileira de Farmacognosia. João Pessoa, 2009.

PARRA, Lagarto, YHBRA, Silva, SARDIÑAS, Guerra, BUELA, Iglesias: **Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts.** Phytomedicine, Vol 8(5), pp. 395-400, 2001.

PIMPÃO, Roberta – **Estudo Fitoquímico da espécie vegetal *Salvia officinalis*.** Florianópolis, 2007.

PONTE, Francisca. **Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápicos à Base de Mel de Abelha, Própolis e Extratos de *Mikania glomerata*, *Eucalyptus globulus* ou da associação *Zingiber officinale* E *Allium sativum* em Roedores.** Recife, 2003

RIGOTTI, Marcelo. **Plantas Medicinais Nativas e Exóticas.** 2a Ed. Botucatu – São Paulo, 2012.

RODRIGUES, Leandro. - **Toxicidade do Odor de Óleos Essenciais de *Eucalyptus globulus* e *Corymbia citriodora* Sobre o Carrapato *Rhipicephalus microplus*.** Nova Odessa, 2018.

RODRIGUEZ, Maria, PÉREZ-SAAD, Hector - ***Plantago major* L. (Llanten) y Epilepsia I. Efecto de las Decocciones de Hojas y Raices Sobre el Foco Penicilínico en Ratas Curarizadas.** Instituto de Neurologia y Neurocirugía. Revista Cubana PLANT MED 1(1): 34-36, 1996.

ARTIGO

ANÁLISE TOXICOLÓGICA DOS EXTRATOS DE *Plantago major* e *Eucalyptus globulus* FRENTE AO CRUSTÁCEO *Artemia salina*FORTE, Mariana¹
REIS, Ana Claudia²

RESUMO

Ao longo dos anos diversos procedimentos clínicos tradicionais utilizando plantas medicinais foram registrados. A fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais, contribuíram para sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento. A pesquisa tem como objetivo identificar possível atividade tóxica frente aos crustáceos da *Artemia salina*, que é um teste simples e rápido utilizado para delimitar a toxicidade de componentes ativos, sendo possível estabelecer a dose letal média (DL50) por ser um organismo vivo. Foram realizados testes in vitro para avaliar a toxicidade dos extratos de *Eucalyptus globulus* e *Plantago major* frente à *Artemia salina*. Os extratos alcoólicos das folhas das mesmas resultaram em uma possível toxicidade, pois os resultados encontrados foram abaixo de 1000 ppm. Os resultados mostraram valores altos, 488 ppm e 346 respectivamente, indicando uma possível toxicidade baixa.

PALAVRAS-CHAVE: *Artemia*. Toxicologia. *Eucalyptus globulus*. *Plantago major*

TOXICOLOGICAL ANALYSIS OF *Plantago major* AND *Eucalyptus globulus* FACIN THE ARTEMIA SALINA CRUSTACEAN

ABSTRACT

Over the years, several traditional clinical procedures using medicinal plants have been registered. The easy obtainment and the great tradition of using medicinal plants contributed to their use by populations in developing countries. The research aims to identify possible toxic activity against the *Artemia salina* crustaceans, which is a simple and fast test used to delimit the toxicity of active components, being possible to establish the average lethal dose (LD50) for being a living organism. In vitro tests were carried out to evaluate the toxicity of *Eucalyptus globulus* and *Plantago major* extracts against *Artemia salina*. The alcoholic extracts from their leaves resulted in a possible toxicity, as the results found were below 1000 ppm. The results showed high values, 488 ppm and 346 respectively, indicating a possible low toxicity.

KEYWORDS: *Artemia*. Toxicology. *Eucalyptus globulus*. *Plantago major*

1. INTRODUÇÃO

A busca por plantas medicinais e fitoterápicos aumentou consideravelmente nos últimos anos, sendo também uma das mais antigas formas de prática medicinal, podendo ser usados para mal-estares do cotidiano, como por exemplo, em forma de chás e também como matéria-prima para síntese de substâncias bioativas. Porém, a grande maioria dos fitoterápicos que são utilizados por automedicação ou por prescrição médica não possui o seu perfil tóxico bem conhecido.

Ao longo dos anos diversos procedimentos clínicos tradicionais utilizando plantas medicinais foram registrados. Mesmo com a evolução da medicina alopática, existem dificuldade na sua utilização pela população carente, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares à obtenção de exames e medicamentos. Estes motivos, junto com a fácil obtenção e a grande tradição

do uso de plantas medicinais, contribuem para sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento (JUNIOR, 2005).

As folhas de *Plantago major*, popularmente conhecidas como tanchagem ou tansagem, são empregadas na medicina tradicional para tratamento de feridas, resfriados, dor de dente, tabagismo, gengivite, problemas de voz e garganta, rouquidão, acne, entre outros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Eucalyptus globulus, o popular eucalipto, é utilizado na medicina para o combate de gripes, resfriados e principalmente para o tratamento de bronquite, asma e outras doenças respiratórias. O mesmo possui atividade no aparelho respiratório devido ao seu óleo essencial. Em casos raros, tem como efeito adverso náusea, vômito e diarreia (BRASIL, 2010).

O estudo da toxicidade aguda tem como propósito caracterizar a relação dose/resposta que conduz ao valor estimado da DL50. Este fator que representa a probabilidade estatística de uma dose causar efeito letal em 50 % dos animais de uma população é válido para identificar a toxicidade relativa de uma substância (FOWLER; RUTTY, 1983).

Sendo assim, a pesquisa tem como objetivo identificar possível atividade tóxica frente aos crustáceos da *Artemia salina*, que é um teste simples e rápido utilizado para delimitar a toxicidade de componentes ativos, sendo possível estabelecer a dose letal média (DL50) por ser um organismo vivo (MEYER, 1982).

2.METODOLOGIA

Material vegetal

Bioensaios *in vitro* foram realizados no Laboratório de Química do Centro Universitário Assis Gurgacz, campus Cascavel/Pr. Primeiramente as plantas *Eucalyptus globulus* e *Plantago major* foram obtidas no comércio da Cidade de Cascavel PR já secas e trituradas. Foram mantidas em sacos plásticos até o início das atividades.

Obtenção dos extratos

As extrações convencionais com Etanol foram realizadas no Laboratório do Centro Universitário Assis Gurgacz, campus Cascavel – PR. Inicialmente 30g das plantas foram pesadas em frasco erlenmeyer e acrescentado 150mL do solvente. Após 24 horas filtrou-se a mistura a fim de separar a torta do extrato solubilizado no solvente. Nesta etapa foram acrescentados mais 150mL do solvente puro à torta. Decorridas mais 48 horas a mistura foi novamente filtrada e mais 150mL do solvente puro foram acrescentados à torta. Após 72 horas filtrou-se novamente a mistura obtendo-se

450mL no total. Por ultimo, os extratos foram submetidos a evaporação do solvente em temperatura ambiente por 14 dias.

Rendimento da extração

Para calcular o rendimento da extração, utilizou-se a seguinte equação:

$$R(\%) = \frac{m_{extrato}}{m_{planta}} \times 100$$

Onde $M_{extrato}$ é a massa total de extrato obtida e M_{planta} é a massa de planta utilizada para obtenção do extrato.

Teste de toxicidade frente a Artemia salina

Foi calculado a DL50, sabendo que é a dose letal média que mata 50% dos animais de um lote utilizado para experimento. Para a OMS, apenas substâncias que apresentam valores de DL50 abaixo de 1000 ppm em *Artemia salina* são consideradas tóxicas (MEYER, 1982).

Os cistos de *Artemia salina* utilizados nos experimentos foram adquiridos em uma loja agropecuária também em Cascavel - PR, sendo armazenados até a execução do experimento.

As diluições do extrato foram feitas pelo método de diluições aritméticas em solução aquosa a 3% de sal marinho sintético, com o pH de 7,32. O experimento foi realizado em duplicata, nas concentrações de 1000, 100 e 10 ppm.

Os ovos de *Artemia salina* foram colocados para eclosão na solução salina, por 48 horas, sob iluminação constante por meio do circuito de lâmpada (figura 1). Após a eclosão dos ovos, cerca de 10 larvas de *Artemia salina* foram transferidas com pipetas Pasteur para cada tubo de ensaio, contendo os extratos de ambas as plantas diluídas separadamente, sendo 1000 ppm, 100 ppm e 10 ppm. Um teste em branco foi realizado em triplicata contendo apenas a solução salina e as larvas dos microcrustáceos. Todo material para realização do teste foi previamente lavado para descontaminação.

FIGURA 1- solução salina para eclosão dos ovos de *Artemia Salina*.



FONTE: autor.

3.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

No planeta, há entre 250-500 mil espécies de plantas, em que apenas 5% das mesmas têm sido estudadas fitoquimicamente, sendo então a grande maioria desconhecida em ponto de vista científico (PIMPÃO, 2007). Logo, não pode se ter certeza da toxicidade de todas elas.

A intoxicação por plantas possui distribuição e intensidade visivelmente regionais, e embora não ocupem uma posição de destaque em atendimentos à intoxicação, é necessária a atenção, pois diversas plantas tóxicas são de uso ornamental. Em adultos, as principais causas são provocadas por uso inadequado de fitoterápicos e chás. Também há casos de uso de plantas alucinógenas e abortivas (HERNANDEZ et al., 2017).

Segundo Hernandez (2017) a toxicidade de uma planta varia de acordo com as condições em que cresce. Algumas podem ser venenosas durante a vida toda, outras quando frutificam. E também, algumas partes da planta podem ser mais tóxicas do que outras. Quando houver suspeita de intoxicação por planta, aconselha-se a coleta de uma amostra da mesma e levar junto com o paciente ao serviço de saúde, pois os nomes populares podem variar de acordo com cada região.

Segundo Campos (2016) há uma percepção na população em que a utilização de plantas para o tratamento de doenças é natural, seguro, barato e eficaz. No entanto, na alimentação e no uso terapêutico, deve-se utilizar somente plantas seguras, conhecidas e devidamente identificadas (COLOMBO et al., 2010)

Os testes de toxicidade são elaborados tendo como objetivo prever os efeitos de substâncias tóxicas e examinar a toxicidade relativa das substâncias que são preeminentes na avaliação do ambiente (BAROSA 2003). Os estudos de toxicidade aguda (curto prazo) têm como objetivo caracterizar a relação dose/resposta ao valor estimado de DL50, sendo o parâmetro que apresenta a probabilidade estatística de uma única dose causar, em 50% dos animais, um efeito letal (PONTE, 2003). É importante lembrar que os testes de toxicidade aguda e a DL50 não são a mesma coisa. A função dos testes é analisar todas as consequências toxicológicas de uma manifestação de curta duração. Já a DL50 é apenas um dos parâmetros que pode resultar de um teste devidamente planejado (MOREIRA, 1993).

As pesquisas realizadas no Brasil para avaliar o uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos ainda estão em fase inicial, assim como o comércio dos mesmos. A maior parte dessa comercialização ocorre em farmácias e lojas de produtos naturais. Algumas vezes, inclusive, essas plantas são aplicadas para uso medicinal diferente dos utilizados pelos silvícolas (JUNIOR, 2005).

Em países desenvolvidos como Estados Unidos e em alguns lugares da Europa existem mais controle em relação ao registro e comercialização de produtos obtidos de plantas. Esses países possuem normas mais inflexíveis para o controle de qualidade e a certificação de preparações vegetais (JUNIOR, 2005).

Substituir os testes toxicológicos em animais por outras alternativas têm ganhado visão, devido ao custo dos animais e pelo sofrimento gerado aos mesmos por conta dos testes (PARRA, 2001). E, também, a busca por ensaios com procedimentos acessíveis e rápidos vem crescendo, adentrando então os testes com *Artemia Salina*.

Artemia salina

A *Artemia salina* é uma espécie invertebrada de microcrustáceo da ordem *Anostraca*, encontrada na fauna de águas salgadas, utilizada como um alimento vivo para peixes. (CARVALHO et al., 2008). O ensaio de letalidade frente à mesma é uma metodologia muito utilizada na linha de pesquisa de produtos naturais avaliando o potencial tóxico de extratos isolados (HIROTA 2012). Essa espécie é utilizada como um bioindicador.

Segundo Hirota (2012) apesar de ser um ensaio muito simples, o mesmo tem a capacidade de gerar informações úteis de uma forma rápida e econômica. Este ensaio caracteriza-se além da rapidez e por possuir baixo custo por não exigir técnicas assépticas.

Vários laboratórios de produtos naturais possuem ensaios biológicos simples em suas metodologias, com o intuito de monitorar e selecionar o estudo fitoquímico de extratos de plantas na

busca por substâncias bioativas. Nesses ensaios encontra-se a toxicidade sobre *Artemia salina* (PIMPÃO, 2007).

O método de análise com esse crustáceo é dito como um simples bioensaio preliminar de toxicidade de componentes ativos através do organismo marinho, assim tornando possível determinar a DL50 de extratos e componentes ativos em meio salino. A *Artemia salina*, através de um método seguro e acessível, pode também ser utilizado como monitor para a citotoxicidade de produtos (MEYER, 1982).

Logo, o teste mais adequado para avaliar a toxicidade aguda de extratos vegetais e a bioatividade de substâncias químicas é o teste de *Artemia salina*.

Eucalyptus globulus

A espécie *Eucalyptus globulus* pertence à família Myrtaceae, nativa da Austrália e Tasmânia. No Brasil, é conhecido popularmente como eucalipto, eucalipto-comum e eucalipto-limão (RODRIGUES, 2018). O material vegetal de interesse farmacológico são as partes aéreas da planta, como folhas, flores, frutos e também as cascas do caule. Essa espécie se caracteriza por ser uma árvore de grande porte. E além do seu óleo essencial, grande parte dos derivados vegetais da espécie são os extratos alcoólicos, aquosos e hidroalcoólicos. (Ministério da Saúde, 2015).

O óleo essencial do *E. globulus* tem como principal constituinte o monoterpeno chamado eucaliptol (1,8-cineol). A porcentagem encontrada no óleo varia entre 14,55 a 95,61%, dependendo da parte da planta que for utilizada, o método de extração, local e também a época que foi coletada (RODRIGUES, 2018).

O Eucalipto é utilizado para diversas enfermidades, como alívio de dores de garganta, tosse e calafrios, suas folhas pelo corpo diminuem a febre, seu óleo essencial tem ação antibiótica, anti-viral e anti-fúngica. E, também, é utilizado como um anti-séptico muito eficaz (RIGOTTI, 2012).

A respeito de sua toxicidade, o eucalipto apresenta boa tolerabilidade em doses recomendadas, porém em doses mais altas pode acarretar náusea, vômito, gastroenterites, hematúria e até neurotoxicidade (PAULO, 2009).

Plantago major

A espécie *Plantago major* pertence à família Plantaginácea e é facilmente encontrada em quase todo território americano (RODRIGUEZ, 1996). Segundo a OMS, suas folhas possuem ácido oleanólico, ácido cítrico, mucilagem, taninos, saponinos, aucubina, óleo essencial e vitaminas A, C e K.

É uma planta de aproximadamente 15cm de altura com flores pequenas marrom-esverdeadas e com folhas em forma de rosetas. Para a obtenção de seu extrato diferentes métodos podem ser empregados, como maceração, decocção, infusão, percolação em Soxhlet e extração em banho de ultrassom (Ministério da Saúde, 2014).

Ela é utilizada como antiinflamatório e para neutralizar toxinas. Pode também ser usada para tratar feridas, diarreia, infecções na bexiga e até mesmo para tratar úlceras no estômago (RIGOTTI, 2012).

Em 1999, Lagarto Parra e colaboradores avaliaram o potencial tóxico da *P. major* em um estudo *in vitro* frente a *Artemia salina*. O teste foi realizado com a tintura da planta contendo 49% de teor alcoólico. A DL50 foi estimada após a contagem das larvas vivas. As concentrações de 10, 100 e 1000 ppm da tintura causaram a mortalidade, respectivamente, de 5,7; 9,3 e 10, sendo 10 correspondendo a 100% da mortalidade. Assim, o resultado encontrado para a DL50 foi de 4,74 mcg/mL (Ministério da Saúde, 2014).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Rendimento da extração

Após a evaporação do solvente utilizado, realizou-se o cálculo de rendimento dos extratos obtidos por extração convencional. Sendo que, o rendimento de uma extração relaciona a quantidade de extrato final obtido pela quantidade de matéria-prima utilizada.

Tabela 1. Rendimento das extrações por método convencional

Matéria-prima	Solvente	Rendimento (%)
<i>Eucalyptus globulus</i>	Etanol	27,55
<i>Plantago major</i>	Etanol	29,27

FONTE: autor.

O rendimento de uma extração é importante para se comparar a quantidade de compostos que são extraídos em solventes polares e apolares. Neste caso foi utilizado apenas o solvente polar (etanol) obtendo a porcentagem de 27% do *Eucalyptus globulus* e 29% do *Plantago major*. Essas porcentagens, por serem uma extração a frio geralmente possuem um rendimento mais baixo (PALAVICINI, 2019).

Artemia salina

O teste mais adequado para avaliar a toxicidade aguda de extratos de plantas é o teste de *Artemia salina*. O uso deste microcrustáceo é amplamente utilizado em experimentos laboratoriais por apresentar uma resposta evidente às variações da qualidade ambiental. Através da letalidade da *Artemia salina* pode-se identificar respostas biológicas, sendo possível determinar a concentração letal de uma determinada substância ou extrato. Em vista disso, o presente trabalho utilizou testes frente à *Artemia salina*, como um método alternativo ao uso de animais de laboratório, para avaliação da toxicidade de extratos vegetais (NUNES et al., 2008).

Uma das vantagens desse bioensaio é a determinação da DL50 através do método de análise de probitos, com 95% de intervalo de confiança. Os valores calculados de DL50 estão representados na Tabela 2. O cálculo foi obtido pelo emprego da seguinte fórmula:

$$DL_{50} = \frac{DF - \sum(A.B)}{n}$$

Onde DF é a dose mínima capaz de matar todos os animais, A a diferença entre duas doses, B animais mortos entre duas doses consecutivas e n o número total de animais por lote.

Tabela 2. Valores de DL50 para os extratos.

Extrato	DL50 (ppm)
<i>Eucalyptus globulus</i>	488,527
<i>Plantago major</i>	346,766

FONTE: autor.

Segundo informativo divulgado eletronicamente pelo governo do estado do Paraná, pela secretaria de saúde do estado, sob autoria de Lauro Augusto Caetano Leite, a DL50 estabelece parâmetros toxicológicos para segurança de produtos farmacêuticos, químicos e alimentícios, sendo que, a DL50 é uma dose letal média que mata 50% dos animais de um lote utilizado experimentalmente.

De acordo com a análise deste bioensaio, o extrato etanólico apresenta uma possível toxicidade frente a *Artemia salina*, sendo que a DL50 foi inferior a 1000 ppm. Para a OMS, são consideradas tóxicas as substâncias que apresentam valores de DL50 abaixo de 1000 ppm em *Artemia salina* (MEYER et al., 1982).

Os resultados deste bioensaio tornam-se essenciais, já que o *Eucalyptus globulus* utilizado para diversas enfermidades, como alívio de dores de garganta, tosses e calafrios, suas folhas pelo corpo diminuem a febre, seu óleo essencial tem ação antibiótica, anti-viral e anti-fúngica. E, também, é utilizado como um anti-séptico (RIGOTTI, 2012).

Já o *Plantago major* é utilizado como antiinflamatório e para neutralizar toxinas. Pode também ser usada para tratar feridas, diarreia, infecções na bexiga e até mesmo para tratar úlceras no estômago (RIGOTTI, 2012).

Estudos realizados por Lagarto Parra e colaboradores determinou a DL50 da tintura das folhas de *Plantago major* contendo 49% do teor alcoólico *in vitro* frente a *Artemia salina* tendo o valor encontrado de DL50 de 4,74 µg/mL. A mesma tintura foi avaliada por metodologia *in vivo*, administrando-a em camundongos albinos. A DL50, após 24 horas do início do tratamento, foi de 182,54 mg/kg. Foi estabelecida boa correlação entre os resultados *in vitro* e *in vivo*.

A DL50 é um teste simples de bancada utilizado para avaliar “dose letal média de uma substância expressa o grau de toxicidade aguda”, sendo necessário testes mais específicos para garantir a não toxicidade do fruto, especialmente o grau de toxicidade crônico (LEITE, [s.d.]).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os extratos alcoólicos das folhas de *Eucalyptus globulus* e *Plantago major* analisados frente ao crustáceo *Artemia salina* resultaram em uma possível toxicidade, pois os resultados encontrados foram abaixo de 1000 ppm. Os resultados mostraram valores altos, 488 ppm e 346 respectivamente, indicando uma possível toxicidade baixa.

A condução do teste de toxicidade com *Artemia salina* é relevante para pesquisa, uma vez que, existem poucos relatos na literatura sobre a toxicidade de ambas as plantas, dessa forma, os resultados podem servir de base para novos experimentos garantindo a segurança no consumo das mesmas.

6.REFERÊNCIAS

BAROSA, J., FERREIRA, A., FONSECA, B. e SOUZA, I. **Teste de toxicidade de cobre para *Artemia salina* – Poluição e ecotoxicologia marinha.** Novembro, 2003.

BRASIL, ANVISA. Ministério da Saúde. **Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) No 10, de 9 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências.** Brasília: ANVISA; 2010.

CAMPOS, S.C, SILVA, C.G, CAMPANA, P.R.V, ALMEIDA, V.L. – **Toxicidade de espécies vegetais.** 2016.

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

FOWLER, J. S. L.; RUTTY, D. A. **Methodological aspects of acute toxicity testing particularly LD50 determinations present use in development of new drugs.** Acta Pharmacol., v. 52, p. 20-30, 1983.

HERNANDEZ, Edna et al. - **Manual de Toxicologia Clínica: Orientações para assistência e vigilância das intoxicações agudas.** São Paulo, 2017.

JUNIOR, Valdir, PINTO, Angelo. – **Plantas Medicinais: Cura Segura?** Quim. Nova, Vol. 28, nº 3, 2005.

Lagarto Parra A, Silva Yhebra R, Guerra Sardiñas I, Iglesias Buela L. **Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts.** Phytomedicine. 2001;8(5):395-400.

LEITE, L. A. C. **Fundamentos de toxicologia.**

MEYER, B. N. **Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents.** Planta Med., v. 45, 1982.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Monografia da espécie *Plantago major* L. (TANCHAGEM).** 2014.

MOREIRA, Eduardo, SALES, Liana, BAUTISTA, Ana. **Avaliação da Toxicidade Aguda (DL50): Proposta para Harmonização dos Protocolos Adotados no Brasil.** Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, [S.l.], v. 3, dec. 1993.

NUNES, X. P. et al . **Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de Mimosa paraibana Barneby (Mimosaceae).** Rev. bras. farmacogn., João Pessoa, v. 18, p. 718-723, dez. 2008.

OLIVEIRA, George, NUNES, Jefferson. **Avaliação Toxicológica da Planta *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae) Sobre o Micro-crustáceo *Artemia salina* Leach.** Depto. de Ciências Biológicas, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia- IFPI. VII Connepi, 2012.

PALAVICINI, Sandra. **Perfil Fitoquímico, Atividades Antioxidantes e Antimicrobiana e Toxicidade dos Extratos de Sementes de Tansagem (*Plantago major* e *Plantago tomentosa*).** Erechim, 2019

PAULO, Patrícia, DINIZ, Margareth, MEDEIROS, Isac, MORAIS, Liana, ANDRADE, Fábila, SANTOS, Hosana - **Ensaio clínico toxicológico, fase I, de um fitoterápico composto (*Schinus terebinthifolius* Raddi, *Plectranthus amboinicus* Lour e *Eucalyptus globulus* Labill).** Revista Brasileira de Farmacognosia. João Pessoa, 2009.

PARRA, Lagarto, YHBRA, Silva, SARDIÑAS, Guerra, BUELA, Iglesias: **Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts.** Phytomedicine, Vol 8(5), pp. 395-400, 2001.

PIMPÃO, Roberta – **Estudo Fitoquímico da espécie vegetal *Salvia officinalis*.** Florianópolis, 2007.

PONTE, Francisca. **Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápicos à Base de Mel de Abelha, Própolis e Extratos de *Mikania glomerata*, *Eucalyptus globulus* ou da associação *Zingiber officinale* E *Allium sativum* em Roedores.** Recife, 2003

RIGOTTI, Marcelo. **Plantas Medicinais Nativas e Exóticas.** 2a Ed. Botucatu – São Paulo, 2012.

RODRIGUES, Leandro. - **Toxicidade do Odor de Óleos Essenciais de *Eucalyptus globulus* e *Corymbia citriodora* Sobre o Carrapato *Rhipicephalus microplus*.** Nova Odessa, 2018.

RODRIGUEZ, Maria, PÉREZ-SAAD, Hector - ***Plantago major* L. (Llanten) y Epilepsia I. Efecto de las Decocciones de Hojas y Raíces Sobre el Foco Penicilínico en Ratas Curarizadas.** Instituto de Neurología y Neurocirugía. Revista Cubana PLANT MED 1(1): 34-36, 1996.

NORMAS DA REVISTA

Revista Thêma et Scientia

DIRETRIZES PARA AUTORES

Orientações Gerais

O artigo deve ser redigido em português;

Deverá possuir Título, Resumo e Palavras-chave em Português e em Língua Estrangeira;

Com no máximo de cinco autores, já contando o orientador;

1 NORMAS GRÁFICAS PARA ARTIGO

Deve ser escrito no formato Word, digitado em papel A4 (tamanho 21 cm x 29,70 cm), com margens superiores de 3 cm, esquerda, direita e inferior de 2 cm, paginados, parágrafo justificado com recuo de 1 cm na primeira linha, fonte Times New Roman, tamanho 12, espaçamento 1,5 em todo o corpo do artigo (o *template* já apresenta todas essas configurações);

O resumo, autoria, credenciais dos autores, citações diretas superiores a 3 (três) linhas, ilustrações e tabelas que devem obedecer às normas gráficas para citação da ABNT e serem formatados com espaço entre linhas simples e fonte 10 (o *template* já apresenta todas essas configurações).

2 ELEMENTOS PRÉ-TEXTUAIS

Título e subtítulo do trabalho: deve constar no topo da página, em letras maiúsculas, centralizado, fonte Times New Roman, tamanho 12 e em negrito. Após o título, deixar uma linha em branco seguido do restante do trabalho;

Nome dos autores: autor principal seguido de co-autores. Autor e co-autores devem obedecer a sequência, Sobrenome (todas maiúsculas) seguido dos pré-nomes (Minúsculo). Exemplo: SILVA, João de Abreu;

Credenciais dos autores: Qualificação do(s) autor(es) e e-mail para contato que deve ser incluído no rodapé da página;

Resumo: deve-se deixar uma linha em branco para iniciar seu conteúdo em único parágrafo. Elemento obrigatório, constituído de uma sequência de frases concisas e objetivas e não de uma simples enumeração de tópicos, contendo, no mínimo 100 e, no máximo, 250 palavras;

Palavras-chave: Após o resumo, escrever o termo Palavras-chave em fonte 8, Times New Roman. Em seguida listar no mínimo 3 (três) e no máximo 5 (cinco) palavras-chave, separadas por ponto. Essas devem identificar a área do artigo e sintetizar sua temática;

Deve-se pular uma linha e fazer o mesmo para Título, Resumo e Palavras-Chave em Língua Estrangeira, todos com fonte Times New Roman 10.

3 TEXTO PRINCIPAL

O trabalho deve conter:

1 INTRODUÇÃO

2 METODOLOGIA

3 REFERENCIAL TEÓRICO OU REVISÃO DE LITERATURA

4 ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

REFERÊNCIAS

4 ORIENTAÇÕES PARA ELABORAÇÃO DA INTRODUÇÃO

A introdução do artigo deve conter elementos essenciais a uma plena compreensão do texto. Sugere-se que os autores iniciem o texto com uma breve CONTEXTUALIZAÇÃO do assunto e após apresentem o PROBLEMA que será investigado, os OBJETIVOS, bem como, a JUSTIFICATIVA. Ao final da introdução recomenda-se que seja realizada uma apresentação sucinta da estrutura geral do artigo de modo a permitir que o leitor compreenda como o assunto será abordado a partir de então. Sendo o artigo um ensaio teórico, na introdução o autor deverá informar que se trata de um ensaio teórico/pesquisa bibliográfica.

5 ORIENTAÇÕES PARA ELABORAÇÃO DO REFERENCIAL TEÓRICO OU REVISÃO DE LITERATURA

O referencial teórico ou revisão de literatura deveria contemplar: (a) eixos teóricos essenciais para elucidar o problema de pesquisa; (b) base conceitual a compreensão dos processos subjacentes à situação problema; (c) evolução do tema; (d) conceituação; e (e) revisão dos estudos empíricos relacionados ao tema investigado.

6 ORIENTAÇÕES SOBRE AS CITAÇÕES (gerais)

Transcrição literal do texto (citações diretas) de outro(s) autor(es) com até TRÊS (3) linhas deverão ser escritas normalmente dentro do texto, entre aspas, e com indicação da fonte em sistema Autor/Data.

As citações indiretas (parafraseadas) aparecem em forma normal textual e sem aspas. A fonte de onde foi retirada a informação deverá ser indicada sem o número de página.

7 ILUSTRAÇÕES

De acordo com a ABNT NBR 14724:2011, qualquer que seja o tipo de ilustração, sua identificação aparece na parte superior, precedida da palavra designativa (desenho, esquema, fluxograma, fotografia, gráfico, mapa, organograma, planta, quadro, retrato, figura, imagem, entre outros), seguida de seu número de ordem de ocorrência no texto, em algarismos arábicos, travessão e do respectivo título. Após a ilustração, na parte inferior, indicar a fonte consultada (elemento obrigatório), mesmo que seja produção do próprio autor, legenda, notas e outras informações necessárias à sua compreensão (se houver). A ilustração deve ser citada no texto e inserida o mais próximo do trecho a que se refere.

8 FORMATAÇÃO DE TÍTULOS E SUBTÍTULOS DAS SEÇÕES

Devem ter numeração progressiva, conforme ABNT NBR6024:2012, e alinhamento à margem esquerda, sem utilizar ponto, hífen, travessão ou qualquer outro sinal após o indicativo da seção ou de seu título.

Exemplo de formatação das seções/títulos:

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 SUBITEM DO REFERENCIAL TEÓRICO (SE HOUVER)

2.1.1 Tópico do subitem (se houver)

3 METODOLOGIA

3.1 SUBITEM DA METODOLOGIA (SE HOUVER)

3.1.1 Tópico do subitem (se houver)

9 REFERÊNCIAS

Devem observar as regras da ABNT NBR 6023/2002. São apresentadas em ordem alfabética, espaço entrelinhas simples, alinhamento esquerdo e letra tamanho 10, separadas por uma linha em branco entre cada obra. Atenção: Listar somente as obras efetivamente citadas no artigo.

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; caso contrário, deve-se justificar em "Comentários ao editor".
2. O arquivo da submissão está em formato Microsoft Word.
3. URLs para as referências foram informadas quando possível.
4. O texto está em espaço 1,5; usa uma fonte Times New Roman 12; as figuras e tabelas estão inseridas no texto, não no final do documento na forma de anexos.
5. O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em Diretrizes para Autores, na página Sobre a Revista.
6. Em caso de submissão a uma seção com avaliação pelos pares (ex.: artigos), as instruções disponíveis em Assegurando a avaliação pelos pares cega foram seguidas.

Título: análise toxicológica dos extratos de plantago major

Data: 07/06/2021 14:58

Usuário: Mariana Forte

Email: naninhaforte@hotmail.com

Autenticidade em relação a INTERNETAutenticidade Calculada: **95 %**

Autenticidade Total: 95 %

Ocorrência de Links

Ocorrência	Fragmento
2%	https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422005000300026
1%	https://pt.slideshare.net/hallisonb/ensaio-toxicologia
1%	https://siteantigo.portaleducacao.com.br/conteudo/artigos/farmacia/estudos-de-toxicidade-aguda/28367

Texto Pesquisado**1. Introdução**

A busca por plantas medicinais e fitoterápicos aumentou consideravelmente nos últimos anos, sendo também uma das mais antigas formas de prática medicinal, podendo ser usados para mal-estares do cotidiano, como por exemplo, em forma de chás e também como matéria-prima para síntese de substâncias bioativas. Porém, a grande maioria dos fitoterápicos que são utilizados por automedicação ou por prescrição médica não possui o seu perfil tóxico bem conhecido.

Ao longo dos anos diversos procedimentos clínicos tradicionais utilizando plantas medicinais foram registrados. Mesmo com a evolução da medicina alopática, existem dificuldade na sua utilização pela população carente, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares à obtenção de exames e medicamentos. Estes motivos, junto com a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais, contribuem para sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento (JUNIOR, 2005).

As folhas de *Plantago major*, popularmente conhecidas como tanchagem ou tansagem, são empregadas na medicina tradicional para tratamento de feridas, resfriados, dor de dente, tabagismo, gengivite, problemas de voz e garganta, rouquidão, acne, entre outros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Eucalyptus globulus, o popular eucalipto, é utilizado na medicina para o combate de gripes, resfriados e principalmente para o tratamento de bronquite, asma, e outras doenças respiratórias. O mesmo possui atividade no aparelho respiratório devido ao seu óleo essencial. Em casos raros, tem como efeito adverso náusea, vômito e diarreia (BRASIL, 2010).

O estudo da toxicidade aguda tem como propósito caracterizar a relação dose/resposta que conduz ao valor estimado da DL50. Este fator que representa a probabilidade estatística de uma dose causar efeito letal em 50 % dos animais de uma população é válido para identificar a toxicidade relativa de uma substância (FOWLER; RUTTY, 1983).

Sendo assim, a pesquisa tem como objetivo identificar possível atividade tóxica frente aos crustáceos da *Artemia salina*, que é um teste simples e rápido utilizado para delimitar a toxicidade de componentes ativos, sendo possível estabelecer a dose letal média (DL50) por ser um organismo vivo (MEYER, 1982).

2. Metodologia

Material vegetal

Bioensaios in vitro foram realizados no Laboratório de Química do Centro Universitário Assis Gurgacz, campus Cascavel/Pr. Primeiramente as plantas *Eucalyptus globulus* e *Plantago major* foram obtidas no comércio da Cidade de Cascavel PR já secas e trituradas. Foram mantidas em sacos plásticos até o início das atividades.

Obtenção dos extratos

As extrações convencionais com Etanol foram realizadas no Laboratório do Centro Universitário Assis Gurgacz, campus Cascavel – PR. Inicialmente 30g das plantas foram pesadas em frasco erlenmeyer e acrescentado 150mL do solvente. Após 24 horas filtrou-se a mistura a fim de separar a torta do extrato solubilizado no solvente. Nesta etapa foram acrescentados mais 150mL do solvente puro à torta. Decorridas mais 48 horas a mistura foi novamente filtrada e mais 150mL do solvente puro foram acrescentados à torta. Após 72 horas filtrou-se novamente a mistura obtendo-se 450mL no total.

Rendimento da extração

Para calcular o rendimento da extração, utilizou-se a seguinte equação:

$$R(\%) = \frac{m \text{ extrato}}{m \text{ planta}} \times 100$$

Onde M extrato é a massa total de extrato obtida e M planta é a massa de planta utilizada para obtenção do extrato.

Teste de toxicidade frente a *Artemia salina*

Foi calculado a DL50, sabendo que é a dose letal média que mata 50% dos animais de um lote utilizado para experimento. Para a OMS, apenas substâncias que apresentam valores de DL50 abaixo de 1000 ppm em *Artemia salina* são consideradas tóxicas (MEYER, 1982).

Os cistos de *Artemia salina* utilizados nos experimentos foram adquiridos em uma loja agropecuária também em Cascavel - PR, sendo armazenados até a execução do experimento.

As diluições do extrato foram feitas pelo método de diluições aritméticas em solução aquosa a 3% de sal marinho sintético, com o pH de 7,32. O experimento foi realizado em duplicata, nas concentrações de 1000, 100 e 10 ppm.

Os ovos de *Artemia salina* foram colocados para eclosão na solução salina, por 48 horas, sob iluminação constante por meio do circuito de lâmpada (figura 1). Após a eclosão dos ovos, cerca de 10 larvas de *Artemia salina* foram transferidas com pipetas Pasteur para cada tubo de ensaio, contendo os extratos de ambas as plantas diluídas separadamente, sendo 1000 ppm, 100 ppm e 10 ppm. Um teste em branco foi realizado em triplicata contendo apenas a solução salina e as larvas dos microcrustáceos. Todo material para realização do teste foram previamente lavados para descontaminação.

3. Resultados e Discussão

Rendimento da extração

Após a evaporação do solvente utilizado, realizou-se o cálculo de rendimento dos extratos obtidos por extração convencional. Sendo que, o rendimento de uma extração relaciona a quantidade de extrato final obtido pela quantidade de matéria-prima utilizada.

Tabela 1. Rendimento das extrações por método convencional

Matéria-prima	
Solvente	
Rendimento (%)	
Eucalyptus globulus	
Etanol	
27,55	
Plantago major	
Etanol	
29,27	

Artemia salina

O teste mais adequado para avaliar a toxicidade aguda de extratos de plantas é o teste de Artemia salina. O uso deste microcrustáceo é amplamente utilizado em experimentos laboratoriais por apresentar uma resposta evidente às variações da qualidade ambiental. Através da letalidade da Artemia salina pode-se identificar respostas biológicas, sendo possível determinar a concentração letal de uma determinada substância ou extrato. Em vista disso, o presente trabalho utilizou testes frente à Artemia salina, como um método alternativo ao uso de animais de laboratório, para avaliação da toxicidade de extratos vegetais (NUNES et al., 2008).

Uma das vantagens desse bioensaio é a determinação da DL50 através do método **de análise de probitos, com 95% de** intervalo de confiança. Os valores calculados de DL50 estão representados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores de DL50 para os extratos

Extrato	
DL50 (ppm)	
Eucalyptus globulus	
488,527	
Plantago major	
346,766	

Segundo informativo divulgado eletronicamente pelo governo do estado do Paraná, pela secretaria de saúde do estado, sob autoria de Lauro Augusto Caetano Leite, a DL50 estabelece parâmetros toxicológicos para segurança de produtos farmacêuticos, químicos e alimentícios, sendo que, a DL50 é uma dose letal média que mata 50% dos animais de um lote utilizado experimentalmente.

De acordo com a análise deste bioensaio, o extrato etanólico apresentam uma possível **toxicidade frente a Artemia salina**, sendo que a DL50 foram inferiores a 1000 ppm. Para a OMS, são consideradas tóxicas as substâncias **que apresentam valores de DL50 abaixo de 1000 ppm em Artemia salina (MEYER et al., 1982)**.

Os resultados deste bioensaio tornam-se essenciais, já que o Eucalyptus globulus utilizado para diversas enfermidades, como alívio de dores de garganta, tosse e calafrios, suas folhas pelo corpo diminuem a febre, seu óleo essencial tem ação antibiótica, anti-viral e anti-fúngica. E, também, é utilizado como um anti-séptico (RIGOTTI, 2012).

Testes desenvolvidos por Oliveira e Nunes, 2012, obtiveram resultados de DL50 após 24 horas de exposição do extrato aquoso do Eucalyptus globulus frente a Artemia salina

igual a 7799 µg/mL, sendo maior que 1000 ppm.

Já o *Plantago major* é utilizado como antiinflamatório e para neutralizar toxinas. Pode também ser usada para tratar feridas, diarreia, infecções na bexiga e até mesmo para tratar úlceras no estômago (RIGOTTI, 2012).

Estudos realizados por Lagarto Parra e colaboradores determinou a DL50 da tintura das folhas de *Plantago major* contendo 49% do teor alcoólico in vitro frente a *Artemia salina* tendo o valor encontrado de DL50 de 4,74 µg/mL. A mesma tintura foi avaliada por metodologia in vivo, administrando-a em camundongos albinos. A DL50, após 24 horas do início do tratamento, foi de 182,54 mg/kg. Foi estabelecida boa correlação entre os resultados in vitro e in vivo.

A DL50 é um teste simples de bancada utilizado para avaliar “dose letal média de uma substância expressa o grau de toxicidade aguda”, sendo necessário testes mais específicos para garantir a não toxicidade do fruto, especialmente o grau de toxicidade crônico (LEITE, [s.d.]).

4. Considerações finais

Os extratos alcoólicos das folhas de *Eucalyptus globulus* e *Plantago major* analisados frente ao crustáceo *Artemia salina* resultaram em uma possível toxicidade, pois os resultados encontrados foram abaixo de 1000 ppm. Os resultados mostraram valores altos, 488 ppm e 346 respectivamente, indicando uma possível toxicidade baixa.

A condução do teste de toxicidade com *Artemia salina*, é relevante para pesquisa, uma vez que, existem poucos relatos na literatura sobre a toxicidade de ambas as plantas, dessa forma, os resultados podem servir de base para novos experimentos garantindo a segurança no consumo das mesmas.