



TOXICIDADE DE EXTRATOS DE PLANTAS EM *Daphnias magna*

Daniela R. **Silva**¹; Claudio M. **Jonsson**²; Marta C. **de Assis**³; Sonia C. N. **Queiroz**⁴

Nº 16403

RESUMO: O controle de pragas nas culturas agrícolas é uma necessidade para aumentar a produtividade e diminuir perdas econômicas. No entanto, as soluções convencionais para evitar a disseminação dessas pragas, consistem na utilização de pesticidas sintéticos. Devido aos potenciais riscos destas substâncias à saúde humana e ao meio ambiente, há necessidade de buscar alternativas que sejam eficazes, ecologicamente adequadas e que não ofereçam danos aos seres vivos. Assim, o presente trabalho relata os resultados das avaliações das atividades de extratos vegetais, resultantes da extração sequencial com os solventes *n*-hexano, diclorometano, metanol e água, contra o microcrustáceo *Daphnia magna*. O bioensaio foi selecionado a fim de avaliar a toxicidade desses extratos e também pode servir como uma premissa para sua aplicação como um bioinseticida. Para isso, foram feitas réplicas em 12 poços de placas “multiwell plate”, sendo 24 organismos-teste por placa. Como resultados, os extratos vegetais extraídos com hexano e diclorometano mostraram ser mais eficientes na imobilidade dos invertebrados, ou seja, são mais bioativos.

Palavras-chaves: *Daphnia magna*; inseticidas; extratos vegetais.

1 Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Engenharia Química, Esamc, Campinas-SP; daniirodriguesilva@gmail.com.

2 Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP, Dr. em Biologia Funcional e Molecular.

3 Pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP, Dra em Botânica.

4 Orientadora: Pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP, Dra em Química Analítica, sonia.queiroz@embrapa.br.



ABSTRACT – *Pest control in agriculture is a need to increase productivity and reduce economic losses. However, conventional solutions to prevent the spread of these pests, consist in the use of synthetic pesticides. Due to the potential risks to human health and the environment of these substances, there is a need to search for alternatives that are effective, environmentally appropriate and not have harm for living beings. The present paper reports the results of evaluations of plant extracts activities resulting from the sequential extraction with n-hexane solvents, dichloromethane, methanol and water, against *Daphnia magna*, a microcrustacean. The bioassay was selected to evaluate the toxicity of these extracts and can also serve as a premise for its application as a biopesticide. For this, replicas were made in 12 "multiwell plate", with 24 test organisms per plate. As a result, the plant extracts extracted with hexane and dichloromethane showed be more effective in invertebrate immobility, in other words, are more bioactive.*

Keywords: *Daphnia magna*; insecticides; plant extract.

1 INTRODUÇÃO

O controle de pragas, como insetos, nas culturas agrícolas é uma necessidade em termos produtivos e econômicos. No entanto, as soluções convencionais para evitar a disseminação dessas pragas, consistem na utilização de pesticidas sintéticos, como os organofosforados e piretróides (FONTES, 1995). Esses compostos por sua vez representam alta periculosidade não apenas a saúde humana como também aos ecossistemas e às cadeias alimentares. Em vista disso, estudos têm sido realizados de modo a propor uma alternativa eficaz e ecologicamente adequada. Esses estudos consistem na investigação de extratos vegetais que possuam potencial biativo em relação aos insetos de modo a eliminá-los, sem causar impactos negativos ao meio ambiente e aos seres humanos.

Para isso, plantas de diferentes famílias têm sido pesquisadas e submetidas à extrações de seus compostos químicos de modo a serem utilizados em bioensaios laboratoriais.

Foram utilizadas plantas das famílias Asteraceae (*Vernonanthura westiniana* (Less.) H. Rob., *Leptostelma maxima* D.Don., *Chrysanthemum anethifolium* Brouss. Ex Willd, *Mikania* sp., *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray, e *Vernonia* sp.), Amaranthaceae (*Gomphrena celosioides* Mart.), Verbenaceae (*Lantana camara* L.) e Lamiaceae (*Clerodendrum thomsonae* Balf.). Essas



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

plantas em sua maioria apresentam atividades antimicrobianas e também são empregadas na medicina popular.

O uso do microcrustáceo de água doce *Daphnia magna* em bioensaios reside em que estes organismos têm disponibilidade anual e ocorrência ubíqua. Muitas pesquisas descrevem uma maior sensibilidade de *D.magna*, quando comparada aos demais invertebrados aquáticos (ADEMA, 1978).

Ensaaios com microcrustáceos, tal como com a *Artemia salina*, têm sido considerados como uma ferramenta útil e efetiva na triagem preliminar de substâncias inseticidas originárias de fontes naturais (SAMRI et al. 2015). Segundo SANCHEZ-BAYO (2012), os artrópodes aquáticos são altamente sensíveis a todas as classes de inseticidas porque possuem características fisiológicas em comum com os insetos-alvo.

Devido à sensibilidade em baixas concentrações de agentes químicos, *D. magna* tem sido utilizado como um importante bioindicador de qualidade e níveis de toxicidade no ambiente aquático (OECD, 1984). Este organismo demonstra maior sensibilidade frente á diversos agentes químicos, comparativamente à *A. salina*, amplamente usada na avaliação de compostos bioativos extraídos de plantas e microrganismos (CALLEJA et al., 1994). O objetivo do trabalho em questão foi analisar a potência de extratos vegetais na população de *D.magna*, para assim avaliar o potencial tóxico que esses compostos poderiam ter sobre sistemas biológicos de outros artrópodes. O uso de dafnideos neste estudo se deve à íntima ligação genômica desse grupo em relação aos insetos, comprovando que ambos os grupos descendem de um ancestral comum (COLBOURNE et al., 2011; BOORE et al, 1998).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Foram coletadas folhas e flores dentre 9 espécies de plantas em diversos locais do estado de São Paulo. São elas: *Vernonanthura westiniana* (Less.) H. Rob., *Leptostelma maxima* D.Don., *Chrysanthemum anethifolium* Brouss. Ex Willd, *Mikania* sp., *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray., *Vernonia* sp., *Gomphrena celosioides* Mart., *Lantana camara* L. e *Clerodendrum thomsonae* Balf.

O material foi seco em estufa de secagem com circulação de ar forçado a 30°C por sete dias. Posteriormente, as plantas foram moídas em moinho de facas no Laboratório de Resíduos e Contaminantes.



2.2 Extração

Pesou-se em um erlenmeyer uma massa de 25g de amostra que foi submetida à extração sequencial com os seguintes solventes: n-hexano, diclorometano, metanol e água. O volume de cada solvente foi de 150 mL. Sob agitação constante, cada etapa da extração permaneceu cerca de 24h. Após o período de extração com cada solvente, foi executada a filtração a vácuo com funil de Büchner e papel filtro. Os solventes foram evaporados sob pressão reduzida e à temperatura de 25°C em um rotaevaporador. Os extratos hexânicos, diclorometânicos e metanólicos foram secos com o auxílio de fluxo de nitrogênio e o extrato aquoso de um liofilizador (após ser congelado).

2.3 Material teste

Extratos hexânicos, diclorometânicos, metanólicos e aquosos, obtidos após a extração sequencial.

2.4 Preparo para bioensaio de toxicidade aguda com *Daphnia magna*

Foram pesados 37 mg de cada extrato em um béquer e foi adicionando 1 mL do solvente correspondente a cada extração para ressuspender a amostra. Após a dissolução pipetou-se uma alíquota de 0,16 mL da amostra e realizou-se a evaporação total do solvente. Na sequência foi adicionado 0,6 mL de uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO, 1000 mg/ 20 L) como adjuvante de solubilidade. A solução-teste contendo o extrato foi preparada com água reconstituída de cultivo de daphnias perfazendo um volume total de 60 mL. Essa solução-teste foi utilizada para realização dos testes de toxicidade aguda em *Daphnia magna*.

2.5 Organismos Teste

D. magna: foram cultivadas em aquários de dimensões iguais a 40 x 25 x 15 cm, com água reconstituída com características físico-químicas: pH 7,6, condutividade 0,37 mS.cm e dureza total 111,2 mg de CaCO₃.L⁻¹. A água reconstituída foi trocada nos aquários duas vezes por semana. Os invertebrados foram mantidos em sala climatizada sob temperatura controlada a 20 ± 2°C, luminosidade de ~1000 luz, com alimentação diária de algas da espécie *Pseudokirchneriella subcapitata*. Para os testes utilizaram-se organismos com tempo de vida inferior a 24 horas, indivíduos denominados neonatos.



2.5.1 Delineamento experimental

Foram preparados 4 extratos de cada planta na concentração de 100 mg.L⁻¹, com a concentração de DMSO em cada concentração-teste de 0,5 g. L⁻¹. Concomitantemente preparou-se soluções isentas do material-teste na mesma concentração de DMSO (controle). Posteriormente neonatos de *D. magna* foram submetidos às soluções-teste e controle.

Os organismos foram distribuídos em placas de poliestireno tipo “multiwell plate” abrangendo 12 poços em um volume total de 4 mL de solução-teste. O bioensaio foi realizado em réplicas de 12 poços para cada concentração de extrato de planta avaliada, no qual cada um dos poços continha 2 organismos-teste, perfazendo, assim um total de 24 organismos por concentração-teste.

Os microcrustáceos foram submetidos às condições mencionadas previamente de luminosidade e temperatura e foram alimentados na primeira hora do experimento, sendo essa a única alimentação durante a fase de exposição aos extratos.

Transcorrido os períodos de 24 e 48h foi avaliada a imobilidade dos organismos-teste em cada unidade experimental para comparação perante o controle.

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados dos efeitos de diferentes extratos sobre a mobilidade de *Daphnia magna*. Os experimentos foram realizados com 9 plantas, com 4 extratos de cada planta, originados da extração sequencial com os respectivos solventes. De 36 extratos testados, em 7 deles se constatou alta bioatividade quanto à imobilidade de *D. magna* em relação ao controle. Observou-se imobilidade entre 79% a 100% dos organismos-teste após 48h.

Tabela 1. Número de organismos móveis de *D. magna* após 48 h de exposição a diferentes extratos de plantas com potencial inseticida (N = 24).

Plantas	Controle	Hexano	Diclorometano	Metanol	Aquoso
<i>Leptostelma maxima</i> D.Don.,	24	22	22	21	23
<i>Vernonanthura westiniana</i> (Less.) H. Rob.	23	22	24	20	23
<i>Gomphrena celosioides</i> Mart.	22	3	12	12	21
<i>Lantana câmara</i> L.	22	5	22	21	22
<i>Clerodendrum thomsonae</i> Balf.	24	0	0	17	23



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

<i>Mikania sp.</i>	20	1	13	22	23
<i>Chrysanthemum anethifolium</i> <i>Brouss. Ex Willd</i>	20	24	21	23	22
<i>Thitonia Diversifolia</i> (Hemsl.) Gray.	22	21	0	24	19
<i>Vernonia sp.</i>	20	11	0	18	22

Na Tabela 2, avaliamos que o extrato hexânico *Gomphrena celosioides* Mart., obteve imobilidade de 33% em 24h, pouco considerável, mas em contrapartida após 48h imobilizou 87% dos organismos-teste.

A planta *Clerodendrum thomsonae* Balf. apresentou dois extratos com um satisfatório percentual de imobilidade, uma característica distinta das outras plantas que apresentaram somente um extrato com atividade. Sendo 79% de imobilidade no extrato hexânico e 95% no extrato diclorometânico em 24h, respectivamente após 48h os organismos encontravam-se 100% imóveis.

Lantana camara L. extraída com hexano imobilizou 45% dos organismos em 24h e 79% após 48h.

O extrato hexânico da planta *Mikania sp.* expôs um bom resultado nas primeiras 24h, com 83% dos organismos imóveis atingindo o percentual de 95% em 48h.

A *Thitonia diversifolia* (Hemsl.) Gray obteve imobilidade nos microcrustáceos com o extrato diclorometânico. Sendo 79% em 24h e concluiu o período de 48h com 100% de imobilidade nos invertebrados.

Por fim, o sétimo extrato que se detectou imobilidade foi o diclorometânico da planta *Vernonia sp.*, que expôs um eficiente resultado nas primeiras 24h com 83% dos organismos imóveis e em 48h completou 100% de imobilidade nos organismos-teste.



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

Tabela 2. Avaliação detalhada das 6 plantas de maior atividade com o número de organismos móveis de *D. magna* no período de 24h à 48h. O número inicial (0h) foi de 2 organismos por réplica.

Réplicas	Controle		G.Celuzinoides		C.thomsonae		C.thomsonae		L.camara		Mikania		T.diversifolia		Vernonia	
	24h	48h	hexano	hexano	hexano	hexano	DCM	DCM	hexano	hexano	hexano	hexano	DCM	DCM	DCM	DCM
1	8	8	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
2	8	8	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
3	8	8	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
4	8	8	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0
5	8	8	2	1	2	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0
6	8	8	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	8	8	2	0	0	0	0	0	2	1	0	0	1	0	0	0
8	7	7	1	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	1	0
9	8	8	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
10	8	8	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	8	8	2	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
12	8	8	1	0	0	0	0	0	2	1	1	0	1	0	1	0

Portanto, para ambos os tempos de exposição os resultados mostraram atividade biológica em relação ao controle. No entanto observou-se no período de 24h uma variação percentual de imobilidade dos organismos-teste de 33% a 100%. Contudo os extratos das plantas *Clerodendrum thomsonae* Balf., *Vernonia sp.*, *Thitonia diversifolia* (Hemsl.) Gray no período final do bioensaio, ou seja, após 48h, apresentou 100% de atividade, imobilizando o número total de organismos-teste, o que demonstrou a existência de uma forte evidência da presença de compostos bioativos que podem ter ação inseticida.

De acordo com Haas et al. (2014), alguns testes realizados com a *Mikania lalvigata*, mostraram ação inseticida significativa contra insetos. Em testes realizados com o microcrustáceo *Artemia salina*, o extrato etanólico de folhas e galhos de *T. diversifolia*, demonstrou a presença de compostos bioativos (LACERDA et al. 2011). Há uma escassez de dados em relação à atividade inseticida das demais plantas utilizadas nesse experimento. Isso porque as pesquisas com extratos vegetais até então desenvolvidas, enfatizam sua utilização medicinal. Há alguns trabalhos sobre a ação inseticida que não foram concluídos ou estão em andamento.



4 CONCLUSÃO

Foi constatada toxicidade para os organismos-teste avaliados, os extratos diclorometânicos das plantas *Clerodendrum thomsonae* Balf., *Thitonia diversifolia* (Hemsl.), *Vernonia Sp.* e o hexânico de *Clerodendrum thomsonae* Balf foram os que apresentaram 100% de atividade após 48h do bioensaio, expondo assim o potencial dos extratos para o uso como bioinseticida.

Após o experimento evidenciar a atividade com *Daphnias magna*, o próximo passo será isolar e identificar os compostos bioativos que não foram avaliados.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pela bolsa concedida, aos pesquisadores Dr. Claudio Martin Jonsson e Dra. Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz pela orientação e acompanhamento nas atividades exercidas e por todos os esclarecimentos concedidos.

6 REFERÊNCIAS

ADEMA, D. M . M . Daphnia magna as a test animal in acute and chronic toxicity tests. **Hydrobiologia**, Netherlands, v. 59, n. 2, p.125-134, 6 jan. 1978.

BOORE, J.L.; LAVROV, D.V.; BROWN, W.M. Gene translocation links insects and crustaceans. **Nature**, v. 392, p. 667-668, 1998.

CALLEJA, M.C.; PERSOONE, G.; GELADI, P. Comparative acute toxicity of the first 50 multicentre evaluation of *in vitro* cytotoxicity chemicals to aquatic non-vertebrates. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, 26: 69-78, 1994.

COLBOURNE, J. K.; PFRENDER, M. E.; GILBERT, D.; THOMAS, W. K.; TUCKER, A.; OAKLEY, T. H. The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex*. **Science**, v. 331, n. 6017, p. 555-561, 2011.

FONTES, L. R. Cupins em áreas urbanas. In: BERTI FILHO, E.; FONTES, L.R. (Ed.) Alguns aspectos atuais da biologia e controle de cupins. Piracicaba: **FEALQ**, 1995. p. 57-75.

HAAS, Jucelaine et al. Efeito de extratos aquosos vegetais sobre a lagarta-do-cartucho. **Arq. Inst. Biol.**, [s.l.], v. 81, n. 1, p.79-82, mar. 2014.

LACERDA, A. M.; MODOLO, A. K.; MATIAS, R. C.; PISTORI, H.; YANO, M.; ROEL, A. R.; PORTO, K. R. A. Screening de plantas com potencial fitotóxico. **Revista Brasileira de Farmácia** v. 92, n. 4, p. 352-355, 2011.



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

OECD. Guidelines for testing of chemicals. *Daphnia* sp., acute immobilisation test and reproduction test, n. 202. Part I - 24 h EC50 acute immobilisation test. **Organisation for Economic Co-operation and Development**, Paris, 1984.

SÁNCHEZ-BAYO, F (2012) Insecticides mode of action in relation to their toxicity to non-target organisms. **J Environment Analytic Toxicol** S4:002. doi: 10.4172/2161-0525.S4-002.

SAMRI, S. E.; BAZ, M., JAMJARI, A.; ABOUSSAID, S. E. M.; BARAKATE, M. Preliminary assessment of insecticidal activity of Moroccan actinobacteria isolates against mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*). **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 10, p. 859-866, 2015.