AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE *IN VITRO*: APLICABILIDADE DO ENSAIO DE LETALIDADE FRENTE À *Artemia salina*.

TOXICITY EVALUATION *IN VITRO*: APPLICABILITY OF BRINE SHRIMP *Artemia salina* LETHALITY ASSAY

HIROTA, B. C. K.^{1*}; PAULA, C. S.¹; MIGUEL, O. G.²; MIGUEL, M. D.¹

¹Laboratório de Farmacotécnica, Departamento de Farmácia, UFPR, Curitiba-PR.

²Laboratório de Fitoquímica, Departamento de Farmácia, UFPR, Curitiba-PR.

Av. Prefeito Lothário Meissner, nº632, CEP 80210-170 – Jardim Botânico, Curitiba, Paraná, Brasil.

*e-mail para correspondência: beatriz_konopatzki@hotmail.com.

RESUMO:

Realizou-se uma pesquisa em duas bases de dados no período de 1992-2012, a qual teve como objetivo de busca o uso do ensaio de letalidade com *Artemia salina* em artigos científicos. Observou-se a frequência e a especificidade da área das publicações. Foram encontrados artigos em diversas categorias como química medicinal, farmacologia, ecotoxicidade e agronomia. Pode-se concluir que este ensaio é extremamente útil e versátil, uma vez que possui aplicabilidade em diversas áreas do conhecimento científico.

Palavras-chave: *Artemia salina*, citotoxicidade, ensaio bio guiado.

ABSTRACT:

We conducted a research in two databases in the period of 1992-2012, which aimed to search the using of brine shrimp lethality test in scientific articles. It was observed specificity and frequency of publications area. There were articles in various categories such as medicinal chemistry, pharmacology, ecotoxicity and agronomy. It can be concluded that this test is extremely useful and versatile, since it has applicability in many areas of scientific knowledge.

Keywords: *Artemia salina*, cytotoxicity, bio guided-assay.

1. INTRODUÇÃO

O ensaio de letalidade frente à *Artemia salina* é uma metodologia extensamente utilizada na linha de pesquisa de produtos naturais para avaliar o potencial tóxico de extratos e substâncias isoladas. Mesmo com o avanço tecnológico, esta técnica tem perdurado nas publicações científicas. Apesar de ser relativamente simples, este ensaio tem a capacidade de gerar informações de grande utilidade de forma rápida, econômica e com reprodutibilidade. Devido á estas características, esta

metodologia vem sendo empregada além da linha de pesquisa em produtos naturais, sendo observada sua aplicabilidade em áreas como síntese de medicamentos, farmacologia, neurologia, química, meio ambiente, ecologia, *screening* biológico e outros.

O objetivo deste trabalho é apresentar a aplicabilidade do ensaio de letalidade frente à *Artemia salina* por meio de um levantamento bibliográfico em bases de dados e destacar a importância deste na pesquisa científica. A técnica é rápida (24 horas), simples, de fácil domínio, acessível economicamente e utiliza pouca quantidade de amostra (2-20mg ou menos) (GUISALBERTI, 2008). De acordo com MEYER, et al. (1982), extratos de plantas que apresentam concentração letal média acima de 1000µg/mL não são considerados tóxicos (BEDNARCZUK, et al. 2010).

A especificidade de se trabalhar na pesquisa com extratos vegetais, frações e substâncias isoladas, requer alguns cuidados, dentre estes destaca-se a solubilidade da amostra, a qual pode ser otimizada pelo uso de DMSO (solvente) , Tween 80 (tensoativo) e polivinipirrolidona (polímero) . Este ensaio pode ser utilizado em pesquisas bioguiadas no isolamento de agentes antitumorais e pesticidas produzidos por plantas (GUISALBERTI, 2008). Outro aspecto importante é a quantidade de amostra disponível, uma vez que na maioria das vezes a pesquisa de produtos naturais trabalha com alíquotas mínimas.

2. MATERIAL E MÉTODO

Realizou-se um levantamento bibliográfico, com data entre 1992 e 2012, para a busca de artigos científicos, nos quais foi utilizado o ensaio de letalidade frente à *Artemia salina*. Para a pesquisa utilizou-se as duas bases de dados: ISI WEB OF SCIENCE e SCIELO Brasil. Na busca foram inseridos os descritores “*Artemia salina*” e “*brine shrimp*”. Não foram estipulados limites para idioma. O tipo de publicação de interesse para esta revisão ficou restrita aos artigos científicos. Estas bases de dados foram utilizadas para a localização de artigos nos quais foi empregada a metodologia anteriormente referida.

3. RESULTADOS

Na base de dados WEB OF SCIENCE foram encontrados inicialmente 477 artigos. Algumas categorias concentraram maior número de publicações. Estas foram Química Medicinal (97 artigos), Farmacologia/Farmácia (94), Biologia Marinha e de Água-doce (78), Ciência das Plantas (64), Biologia e Bioquímica Molecular (63), Toxicologia (37), Ciências do Meio Ambiente (30), Química Aplicada (28), Biotecnologia Aplicada à Microbiologia (26), Ciência e Tecnologia de Alimentos (26), Ecologia (19),

Química Multidisciplinar (17) dentre outros. Na base de dados SCIELO Brasil foram encontrados 32 artigos com o descritor "*Artemia salina*", e com o descritor "brine shrimp", 1 artigo.

4. DISCUSSÃO

Na categoria de química medicinal, o ensaio de letalidade foi utilizado para avaliação de toxicidade em substâncias obtidas de culturas de *Aspergillus versicolor*, um fungo endofítico isolado da alga marinha marrom *Sargassum thunbergii* (MIAO, et al. 2012). Este ensaio demonstrou-se extremamente útil na determinação do potencial tóxico de plantas utilizadas na medicina tradicional. Foi reportado o estudo da toxicidade de 341 espécies de plantas de uso popular no norte do Peru utilizando-se o teste de letalidade frente à *Artemia salina* (BUSSMANN, et al. 2011).

Na área de síntese, estudos reportam o uso deste teste para determinar citotoxicidade *in vitro* de substâncias sintetizadas (CHOHAN, et al. 2010) como compostos biologicamente ativos baseados em organometálicos (CHOHAN, 2009^a), complexos metálicos de sulfonamidas (CHOHAN, et al. 2009^b), alkoxycumarinas (TAKAISHI, et al. 2008), tetranortriterpenoides resultantes de modificação semissintética do nimbolide, molécula com atividade anticâncer (ANITHA, et al. 2007), heterociclos com nitrogênio (BADAWEY e KAPPE, 1997).

Pesquisas na área da ecotoxicologia utilizaram o teste de letalidade para verificação de toxinas produzidas por organismos marinhos, auxiliando na detecção de substâncias nocivas no ambiente (FRAZAO, MARTINS e VASCONCELOS, 2010). Yang e colaboradores (2001) empregaram o ensaio com *Artemia salina* como um fracionamento bio-guiado para isolar um composto bioativo das partes aéreas de *Impatiens balsamina* L., o qual apresentou atividade antimicrobiana.

Foi relatado que a concentração letal avaliada por esta metodologia, em extratos de plantas, pode ser útil na determinação de toxicidade oral aguda em ratos, pois foi verificada uma correlação significativa entre os resultados *in vitro* e *in vivo* (PARRA, et al. 2001). Outra aplicação descrita foi o uso do teste de letalidade para detectar fototoxicidade de cumarinas, o ensaio desenvolvido foi indicado para detectar simultaneamente toxicidade e fototoxicidade de amostras (OJALA, et al. 1999). Zani e colaboradores (1995) relatam a correlação entre os resultados do teste em *Artemia salina* e atividade anti-trypanosoma. As amostras que apresentaram CL50 menor que 100 ppm demonstraram quatro vezes mais ocorrência de atividade anti-trypanosoma que em ensaios sem a determinação de citotoxicidade anterior.

Na categoria de Farmacologia/Farmácia, foi observado que o uso do ensaio de letalidade com *Artemia salina* concentra-se na pesquisa de produtos naturais. Este acompanha os mais variados testes, como avaliação de atividade microbiana

(HOSSAIN, et al. 2004), moluscicida, larvicida (LUNA, et al. 2005), inseticida (UCHIDA, et al. 2005), citotoxicidade em células de câncer hepático humano (GARCEZ, et al. 2005), antifúngica (NINO, CORREA e MOSQUERA, 2006), anticonvulsivante (BAGHERI, et al. 2010), antioxidante (SARAIVA, et al. 2011) dentre outros.

Os estudos na categoria de agronomia que empregaram o teste de letalidade compreendem pesquisas de atividade pesticida (SPINDLER e SPINDLERBARTH, 1994) e atividade alelopática (EL-SHEEKH, KHAIRY e EL-SHENODY, 2010; de LIMA, et al. 2011).

Devido ao custo acessível e amplo espectro de aplicação deste ensaio, inúmeras áreas de pesquisa vêm estudando outras formas de utilizá-lo, na categoria de neurociências observou-se a indicação do ensaio em avaliação de toxicidade de compostos psicoativos (SCHOTT, et al. 2006^a) e no desenvolvimento de inibidores da acetilcolinesterase (SCHOTT, et al. 2006^b).

5. CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos pelo presente levantamento, conclui-se que as informações geradas por meio de ensaios de toxicidade utilizando *Artemia salina*, perpassam desde o potencial tóxico de plantas, sua possível bioatividade, *screening* biológico, até etapas precursoras de pesquisas *in vivo*. Este ensaio possui grande aplicabilidade frente à pesquisa científica voltada à atividade citotóxica, gera poucos resíduos ao meio ambiente, possui segurança, eficiência, reprodutibilidade e baixo custo.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação Araucária, ao Programa REUNI e à CAPES pelo suporte financeiro.

7. REFERÊNCIAS

ANITHA, G.; RAJ, J.; KRISHNAN, V.; NARASIMHAN, S.; SOLOMON, K.; RAJAN, S. Semi-synthetic modification of nimbolide to 6-homodesacetylnimbin and 6-desacetylnimbin and their cytotoxic studies. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 9, n. 1, p. 73-78, 2007.

BADAWAY, E.; KAPPE, T. Potential antineoplastics. Synthesis and cytotoxicity of certain 4-chloro-3-(2-chloroethyl)-2-methylquinolines and related derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v 32, n. 10, p. 815-822, 1997.

BAGHERI, S.; SAHEBKAR, A.; GOHARI, A.; SAEIDNIA, S.; MALMIR, M.; IRANSHAHI, M. Evaluation of cytotoxicity and anticonvulsant activity of some Iranian medicinal *Ferula* species. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 3, p. 242-246, 2010.

BEDNARCZUK, V.; VERDAM, M.; MIGUEL, M.; MIGUEL, O. G. Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v. 11, n.2, p. 43-50, 2010.

BUSSMANN, R.; MALCA, G.; GLENN, A.; SHARON, D.; NILSEN, B.; PARRIS, B.; et al. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern. **Journal of Ethnopharmacology**, v 137, n. 1, p. 121-140, 2011.

CHOHAN, Z. Synthesis of organometallic-based biologically active compounds: In vitro antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of some sulfonamide incorporated ferrocenes. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 1, p. 169-175, 2009^a.

CHOHAN, Z.; SUMRRA, S.; YOUSOUFI, M.; HADDA, T. Metal based biologically active compounds: Design, synthesis, and antibacterial/antifungal/cytotoxic properties of triazole-derived Schiff bases and their oxovanadium(IV) complexes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 2739-2747, 2010.

CHOHAN, Z.; SUPURAN, C.; BEN HADDA, T.; NASIM, F.; KHAN, K. Metal based isatin-derived sulfonamides: Their synthesis, characterization, coordination behavior and biological activity. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 24. n. 3, p. 859-870, 2009^b.

de LIMA, C. P.; CUNICO, M. M.; TREVISAN, R. R.; PHILIPPSEN, A. F.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. Efeito alelopático e toxicidade frente à *Artemia salina* Leach dos extratos do fruto de *Euterpe edulis* Martius. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 2, p.331-336, 2011.

EL-SHEEKH, M.; KHAIRY, H.; EL-SHENODY, R. Allelopathic effects of cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Kutzing on the growth and photosynthetic pigments of some algal species. **Allelopathy Journal**, v. 26, n. 2, p. 275-289, 2010.

FRAZAO, B.; MARTINS, R.; VASCONCELOS, V. Are Known Cyanotoxins Involved in the Toxicity of Picoplanktonic and Filamentous North Atlantic Marine Cyanobacteria? **Marine Drugs**, v. 8, n. 6, p. 1908-1919, 2010.

GARCEZ, F.; GARCEZ, W.; MARTINS, M.; MATOS, M.; GUTERRES, Z.; MANTOVANI, M.; et al. Cytotoxic and genotoxic butanolides and Lignans from *Aiouea trinervis*. **Planta Medica**, v. 71, n. 10, p. 923-927, 2005.

GUISALBERTI, E. L. (2008). Detection and isolation of bioactive natural products. In: S. M. COLEGATE, & R. J. MOLYNEUX, **Bioactive natural products: detection, isolation and structural determination**. (2 ed. ed.). NW: CRC Press.

HOSSAIN, M.; EASMIN, S.; ISLAM, M.; RASHID, M. Novel thiocyanato complexes with potent cytotoxic and antimicrobial properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 12, p. 1519-1525, 2004.

LUNA, J.; DOS SANTOS, A.; DE LIMA, M.; DE OMENA, M.; DE MENDONCA, F.; BIEBER, L.; et al. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 199-206, 2005.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MIAO, F. P.; LI, X. D.; LIU, X. H.; CICHEWICZ, R. H.; JI, N. Y. Secondary Metabolites from an *Algicolous Aspergillus versicolor* Strain. **Marine Drugs**, v. 10, n. 1, p. 131-139, 2012.

NINO, J.; CORREA, Y.; MOSQUERA, O. Antibacterial, antifungal, and cytotoxic activities of 11 Solanaceae plants from Colombian biodiversity. **Pharmaceutical Biology**, v. 44, n. 1, p. 14-18, 2006.

OJALA, T.; VUORELA, P.; KIVIRANTA, J.; VUORELA, H.; HILTUNEN, R. A bioassay using *Artemia salina* for detecting phototoxicity of plant coumarins. **Planta Medica**, v. 65, n. 8, p. 715-718, 1999.

PARRA, A.; YHEBRA, R.; SARDINAS, I.; 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 acutotoxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001.

SARAIVA, A.; CASTRO, R.; CORDEIRO, R.; SOBRINHO, T.; CASTRO, V.; AMORIM, E.; et al. In vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial and toxicity properties of extracts

of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 14, p. 1724-1731, 2011.

SCHOTT, K.; JACUPOVIC, N.; STRANSKY, E.; KOHLER, N.; LASKE, C.; BARTELS, M.; et al. Toxicity assessment of several neuroleptics and antidepressants using the brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay. **Neurology Psychiatry and Brains Research**, v. 13, n. 3, p. 143-144, 2006^a.

SCHOTT, K.; STRANSKY, E.; ALES, S.; BATRA, A.; RICHARTZ, E.; KOHLER, N.; et al. Cholinesterases in human serum and *Artemia salina*: a possible test organism for cholinesterase inhibitors. **Neurology Psychiatry and Brain Research**, v. 13, n. 3, p. 137-140, 2006^b.

SPINDLER, K.; SPINDLERBARTH, M. Inhibition of Chitinolytic Enzymes from *Streptomyces-Griseus* (Bacteria), *Artemia-Salina* (Crustacea), and A Cell-Line from *Chironomus-Tentans* (Insecta) by Allosamidin and Isoallosamidin. **Pesticide Science**, v. 40, n. 2, p. 113-120, 1994.

TAKAISHI, K.; IZUMI, M.; BABA, N.; KAWAZU, K.; NAKAJIMA, S. Synthesis and biological evaluation of alkoxycoumarins as novel nematicidal constituents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 20, p. 5614-5617, 2008.

UCHIDA, R.; IMASATO, R.; YAMAGUCHI, Y.; MASUMA, R.; SHIOMI, K.; TOMODA, H.; et al. New sesquicillins, insecticidal antibiotics produced by *Albophoma* sp. **Journal of Antibiotics**, v. 58, n. 6, p. 397-404, 2005.

YANG, X.; SUMMERHURST, D.; KOVAL, S.; FICKER, C.; SMITH, M.; BERNARDS, M. Isolation of an antimicrobial compound from *Impatiens balsamina* L. using bioassay-guided fractionation. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 8, p. 676-680, 2011.

ZANI, C.; CHAVES, P.; QUEIROZ, R.; DE OLIVEIRA, A.; CARDOSO, J.; ANJOS, A.; et al. Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-Trypanosoma cruzi activity. **Phytomedicine**, v. 2, n. 1, p. 47-50, 1995.