

Toxicidade, atividade antimicrobiana e antioxidante das folhas de *Solanum paniculatum* metabolizadas pelo gafanhoto *Xileus discoideus***Toxicity, antimicrobial and antioxidant activity of *Solanum paniculatum* metabolized leaves by grasshopper *Xileus discoideus*****Juliana Maria da Conceição, Marcílio Wagner Fontes Silva, Clécio Souza Ramos**

Laboratório de Ecologia Química e Síntese, Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP: 52171-900 - Recife/PE, clecio.ufrpe@gmail.com

Resumo

O metabolismo de vegetais durante o processo digestivo de insetos pode alterar os constituintes químicos e potencial biológico dos tecidos metabolizados. Inserido neste contexto, o estudo foi direcionado para determinar possíveis mudanças do perfil químico e atividades das folhas de *Solanum paniculatum* metabolizadas pelo gafanhoto *Xileus discoideus*. As folhas metabolizadas mostraram maior toxicidade (CL_{50} 18,9 $\mu\text{g/mL}$), maior teor de fenólicos (78,03 mgEAG/g) e maior atividade antioxidante (CE_{50} 7,88) 48,80 quando comparadas com as folhas não metabolizadas com valores de 55,70 mgEAG/g, CE_{50} 48,80 e CL_{50} 45,7 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Houve também ativação da ação antimicrobiana, considerando que as folhas não metabolizadas não apresentaram atividades até a concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Os perfis químicos das folhas metabolizadas e não metabolizadas apresentaram diferenças quando comparados pela análise de CLAE.

Palavras-chave: *Xileus discoideus*; *Solanum paniculatum*; Atividade antimicrobiana, toxicidade; Atividade antioxidante; Metabolismo.

Abstract

The metabolism of plants during the digestive process of insects can alter the chemical constituents and biological potential of the metabolized tissues. Thus, the present work aimed to evaluate possible changes in the chemical profile and activity of the *Solanum paniculatum* metabolized leaves by grasshopper *Xileus discoideus*. The metabolized leaves showed greater toxicity (LC_{50} 18.9 $\mu\text{g/mL}$), higher phenolic content (78.03 mgGAE /g) and antioxidant activity (EC_{50} 7.88) 48.80 when compared to non-metabolized leaves with values of 55.70 mgGAE/g, EC_{50} 48.80 and LC_{50} 45.7 $\mu\text{g/mL}$, respectively. It was observed also activation of the antimicrobial action, whereas the non-metabolized leaves did not show any activity until the concentration of 1000 $\mu\text{g/mL}$. The chemical profiles of the metabolized and non-metabolized leaves showed differences when compared by the HPLC analysis.

Keywords: *Xileus discoideus*; *Solanum paniculatum*; Antimicrobial activity, toxicity; Antioxidant activity; Metabolism.

Introdução

Os metabólitos secundários de plantas possuem uma ampla atividade biológica e têm a função de defesa química contra inimigos naturais, principalmente contra os insetos [1-3]. Em contrapartida os insetos desenvolveram mecanismos para superar a defesa da planta, que inclui a biotransformação de fitotoxinas para suas formas menos tóxicas. Mudanças nos perfis químicos das folhas de plantas durante o processo digestivo de insetos podem alterar seu potencial biológico, potencializando diversas atividades das folhas como atividade antimicrobiana e antioxidante [4].

O estudo do metabolismo de compostos secundários de plantas por insetos é importante para entender como esses insetos podem superar as defesas químicas das plantas, bem como adaptar-se às plantas hospedeiras [5]. As larvas da borboleta *Heraclides brasiliensis* é especialista em folhas de *Piper umbellata* que acumulam como composto majoritário 4-nerolidilcatecol, um antioxidante e inseticida natural [6]. Essa adaptação pode ser associada com a capacidade das larvas da borboleta biotransformar o composto 4-nerolidilcatecol no seu ácido correspondente, que é menos tóxico e mais polar do que o composto inicial. Apesar de alguns grupos de pesquisa investigar essas interações, ainda há poucos relatos de estudos envolvendo metabolismo de plantas por insetos usando a dieta natural dos herbívoros [7-9]. Neste contexto, o presente estudo foi direcionado para avaliar possíveis mudanças nos constituintes químicos e das atividades biológicas do extrato bruto etanólico das folhas de *Solanum paniculatum* (Solanaceae) metabolizadas durante o processo digestivo do gafanhoto *Xileus discoideus* (Orthoptera: Romaleidae).

A espécie *X. discoideus* são gafanhotos de coloração marrom-amarelada. As fêmeas são maiores do que os machos, chegando a atingir 5 cm de comprimento, enquanto os machos chegam a 3 cm. É endêmica na América do Sul e tem o hábito de se alimentar de plantas da família Solanaceae, incluindo *S. paniculatum*. Esta espécie é conhecida como a "verdadeira jurubeba", sendo uma erva daninha neotropical de ocorrência muito comum no Brasil, Paraguai, Bolívia e Argentina. É comumente utilizada para fins culinários e na medicina popular para o tratamento de disfunções hepáticas e gástricas [10,11].

Experimental

Material vegetal e entomológico

As folhas de *S. paniculatum* e os gafanhotos *X. discoideus* foram coletados no fragmento de Mata Atlântica do campus da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), em Recife-PE. A identificação botânica foi realizada pelo Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA e uma exsicata foi depositada no Herbário Dárdano de Andrade Lima com o número 88503. O gafanhoto foi identificado pelo prof. Dr. Argus Vasconcelos de Almeida do Departamento de Biologia da UFRPE. Em cativeiro foram mantidos 10 gafanhotos com uma dieta exclusiva de folhas de *S. paniculatum* por 14 dias para a obtenção do material fecal (folhas metabolizadas), sendo as folhas trocadas a cada dois dias.

Obtenção dos extratos brutos

As folhas de *S. paniculatum* (53 g) e das folhas metabolizadas (7 g) foram secos em estufa por 48h a 40°C e em seguida foram triturados separadamente para obtenção dos extratos brutos. O material vegetal e entomológico seco e triturado separadamente foi submetido à extração exaustiva com etanol (4x de 125 mL) em maceração a frio por 48h. Ambos os materiais foram concentrados a vácuo a 40°C e obtendo-se os extratos etanólicos das folhas (3,8 g) e das folhas metabolizadas (0,8 g).

Análise por Cromatografia Líquida De Alta Eficiência (CLAE)

Os perfis químicos dos extratos brutos etanólicos das folhas de *S. paniculatum* e das folhas metabolizadas foram obtidos por CLAE: 2 mg de cada extrato foi previamente diluído em 1 mL de MeOH e tratado em cartucho de extração em fase sólida (SPE) de sílica de fase reversa C₁₈ (Sep-Pak) como etapa de pré-purificação. Em seguida, os extratos brutos foram analisados em um sistema de cromatografia acoplado a um detector na região do UV-Vis com de arranjo de diodos (CLAE-DAD) (Shimadzu LC10), sendo eluídos com H₂O:MeOH em gradiente de polaridade, iniciando com uma mistura de 3:7 por 5min e aumentando a 1:9 por 15 min, usando fluxo de 1mL/min e sendo 20µL o volume de injeção.

Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos das folhas de *Solanum paniculatum* e das folhas metabolizadas foi realizada usando os microrganismos *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium smegmatis* (Bactérias gram-positivas); *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*

(Bactérias gram-negativas), *Candida albicans* e *Malassezia fufur* (Fungos). Foi utilizado o método de difusão em disco [12]. A concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos brutos das folhas de *S. paniculatum* e das folhas metabolizadas foi determinada através do método de diluição em microplacas, conforme metodologia descrita previamente [13].

Atividade citotóxica

Os extratos brutos etanoicos das folhas de *S. paniculatum* e das folhas metabolizadas foram testados frente ao microcrustáceo *Artemia salina* seguindo a metodologia previamente relatada [14]. Os cistos de *A. salina* (10 mg) foram incubados em água do mar artificial sob aeração efetiva e iluminação artificial de 30 watts por 24 horas para que houvesse a eclosão das larvas (metanúplios). Soluções dos extratos foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e solução aquosa de sal marinho em concentrações variando entre 125 - 500 µg/mL. Para o bioensaio, 10 metanúplios foram transferidos para tubos de ensaio contendo 5 mL de cada uma das soluções a serem testadas. Um grupo controle foi preparado contendo apenas os solventes (DMSO e solução de sal) e as larvas de *A. salina*. Os ensaios foram realizados em triplicata. A contagem do número de larvas mortas foi realizada após 24 horas.

Teor de fenólicos totais

O teor de fenólicos totais dos extratos etanólicos das folhas e das folhas metabolizadas foi determinado empregando-se o ácido gálico como composto fenólico padrão como descrito previamente [15]. A equação da curva de calibração do ácido gálico foi: $y = 0,1141x - 0,1301$, com o coeficiente de correlação de $r^2 = 0,998$, onde x é a concentração do ácido gálico e y é a absorbância a 760 nm.

Avaliação da atividade sequestradora do cátion radical $ABTS^{•+}$

A atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre estável $ABTS^{•+}$ (ácido 2,2'-azinobis-[3-etilbenzotiazolina-6sulfônico]) foi determinada conforme a metodologia descrita previamente utilizando o Trolox como padrão positivo [16]. O cátion radical $ABTS^{•+}$ foi preparado pela mistura de uma solução de ABTS com soluções de persulfato de potássio de em concentrações finais de 7 mM e 140 mM. A solução foi mantida ao abrigo da luz à temperatura ambiente durante um período de 12-16 h antes do uso. Posteriormente a solução de $ABTS^{•+}$ foi diluída com etanol até obter uma solução com absorbância (A) de $0,7 \pm 0,05$ no comprimento de onda de 734 nm, em UV-VIS. Através de uma triagem preliminar, quantidades apropriadas de $ABTS^{•+}$ foram adicionadas às amostras a fim de obter concentrações finais que irão variar de 5 a 100 µg/mL para o extrato de fezes e de 2,5 µg/mL a 50 µg/mL para o extrato de folhas. Cada concentração foi testada em triplicata. Em seguida,

as soluções foram agitadas e, após 10 minutos, a absorbância das amostras e do padrão foram medidas em um espectrofotômetro de UV-Visível em comprimento de onda de 734 nm. Os resultados foram expressos em $CE_{50} \pm DP$, que representa a concentração da amostra necessária para obter a metade da atividade sequestradora dos radicais $ABTS^{\cdot+}$. Sendo utilizado o Trolox como composto padrão.

Resultados e discussões

Atividade antimicrobiana

Os resultados das atividades e de toxicidade para o extrato etanólico das folhas metabolizadas de *S. paniculatum* pelo gafanhoto *X. discoideus* (EFMSPX) foram surpreendentes quando comparado aos das folhas de *S. paniculatum* não metabolizadas (EFSP). O EFSP não apresentou halo de inibição pelo método de difusão em disco frente aos microrganismos *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida Albicans*, *Malassezia furfur*, enquanto o EFMSPX só não apresentou halo de inibição para bactérias gram-positiva *M. smegmatis* (Tabela 1). O EFMSPX apresentou maior atividade para a bactéria *S. aureus* e o fungo *M. furfur* com halo de inibição de 25 mm.

Tabela 1. Halo de inibição em mm para as amostras dos EFMSPX e EFSP

		EFSP	EFMSPX
Bactérias Gram-positivas	<i>B. subtilis</i>	0	20
	<i>S. aureus</i>	0	25
	<i>M. smegmatis</i>	0	0
Bactérias Gram-negativas	<i>E. coli</i>	0	12
	<i>P. aeruginosa</i>	0	16
Fungos	<i>C. Albicans</i>	0	16
	<i>M. furfur</i>	0	25

As CMI das amostras de EFMSPX com halos de inibição superiores a 15 mm para as bactérias *B. subtilis*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* foram determinadas e apresentaram valores de 125, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$. As amostras de **EFSP** não apresentaram atividade até a concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ testada (Tabela 2).

Tabela 2. Valores das CMI em $\mu\text{g/mL}$ as amostras dos EFMSPX e EFSP

		EFSP	EFMSPX
Bactérias Gram-positivas	<i>S. aureus</i>	>1000	1000
	<i>B. subtilis</i>	>1000	125
Bactérias Gram-negativas	<i>P. aeruginosa</i>	>1000	500

Atividade citotóxica

A toxicidade dos EFSP e EFMSPX foi avaliada frente à *Artemia salina*, sendo que os dois extratos apresentaram alta toxicidade com valores de CL_{50} de 45,7 e 18,9 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, conforme o critério de classificação toxicidade previamente estabelecido [17], no qual: $CL_{50} < 80 \mu\text{g/mL}$, alta; entre 80 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$ moderada; e $CL_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$ baixa. A toxicidade das folhas metabolizadas (EFMSPX) foi duas vezes maior do que a toxicidade das folhas não metabolizadas (EFSP).

Determinação do teor de fenólicos totais

O teor de fenólicos totais do EFMSPX e EFSP foi de $78,0 \pm 0,79 \text{ mgEAG/g}$ e $55,7 \pm 0,43 \text{ mgEAG/g}$, respectivamente. Ao comparar os resultados obtidos, observa-se um maior teor de fenólicos para o EFMSPX (Tabela 3).

Tabela 3. Teor de fenólicos totais dos extratos brutos das folhas de *S. paniculatum* e da amostrais fecais

Extratos	Teor de Fenólicos mgEAG/g
EFSP	$55,70 \pm 0,43 \text{ mgEAG/g}$
EFMSPX	$78,03 \pm 0,79 \text{ mgEAG/g}$

A atividade antioxidante está associada ao conteúdo de fenol presente nas plantas, embora diversos outros constituintes, tais como carotenos também apresentam forte atividade antioxidante [18]. Diversos trabalhos indicam a capacidade antioxidante dos metabólitos secundários presentes em solanáceas; em especial, nos seus extratos polares. O teor de ácidos hidrocínânicos presentes em extratos de *Solanum melongena* foi determinado, sendo encontrado como componente majoritário, o ácido clorogênico [19]. Diversos compostos fenólicos foram identificados em Solanaceae, tais como rutina, naringenina, ácido clorogênio e ácido caféico [20], aos quais têm sido atribuídos parcialmente a sua atividade antioxidante.

Atividade sequestradora frente ao cátion radical $ABTS^{+}$

A atividade de sequestro dos radicais livres por $ABTS^{+}$ apresentaram valores de $CE_{50} 7,88 \pm 0,76 \mu\text{g/mL}$ para o extrato das fezes e de $48,80 \pm 1,55 \mu\text{g/mL}$ para o EFSP (Tabela 4). Foi observada

uma correlação entre o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante obtida por ABTS^{•+}. Percebe-se pelos resultados que o EFMSPX apresentou CE₅₀ menor que o EFSP indicando uma potencialização da atividade antioxidante. Isso implica que parte dos resultados da atividade sequestradora pode ser atribuída ao conteúdo de fenólicos presentes nas amostras.

Tabela 4. Atividade sequestradora frente ao cátion radical ABTS^{•+}

Extratos	CE ₅₀ (ABTS) µg/mL
EFSP	48,80 ± 1,55
EFMSPX	7,88 ± 0,76

Perfil Químico

A atividade antimicrobiana, antioxidante, toxicidade e conteúdo fenólico das folhas de *S. paniculatum* foram modificados, após metabolização das folhas pelo gafanhoto sugerindo que houve alteração no perfil químico das folhas metabolizadas. O perfil químico obtido por CLAE indicou diferenças nos cromatogramas dos EFMSPX e EFSP, sugerindo uma biotransformação de um dos constituintes químicos das folhas durante o processo digestivo do gafanhoto (Figura 1).

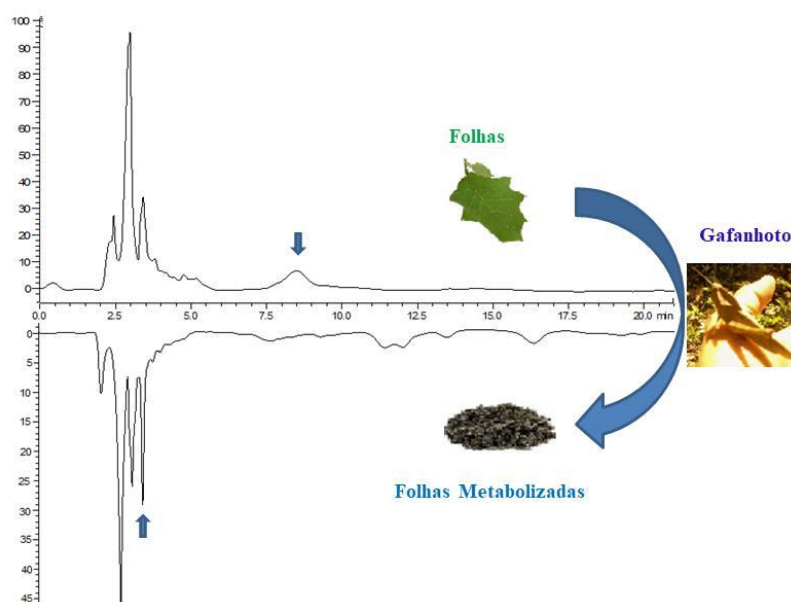


Figura 1: Perfis cromatográficos dos extratos das folhas metabolizadas (EFMSPX) e não metabolizadas (EFSP) de *S. paniculatum* obtidos por CLAE.

Considerações Finais

Em sumário, as folhas de *S. paniculatum* sofrem mudanças químicas e biológicas quando metabolizadas pelo o gafanhoto *X. discoideus*. Atividade antioxidante e a toxicidade das folhas são potencializadas. Há ativação da ação antimicrobiana, considerando que as folhas não metabolizadas não apresentaram atividades até a concentração de 1000 µg/mL.

Agradecimento

Agradecemos ao prof. Dr. Argus Vasconcelos de Almeida do Departamento de Biologia da UFRPE pela identificação do gafanhoto.

Referências

- [1] NASCIMENTO, J. C., JESUS, H. O., SANTOS, T. G., PEREIRA, D. M. N., MACEDO, G. E. L. Voláteis e atividade larvicida em *Achyrocline satureioides* coletada em Cairu-BA. Exatas Online, 0 (2019) 59-70.
- [2] TEIXEIRA, M. G., ALVARENGA, E. S., PIMENTEL, M. F., PICANÇO, M. C. Synthesis and Insecticidal Activity of Lactones Derived from Furan-2(5H)-one. J. Braz. Chem. Soc., 26 (2015) 2279-2289.
- [3] VIEGAS JUNIOR, Cláudio. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. Quím. Nova, 26 (2003) 390-400.
- [4] RAMOS, C. S. PAZ, A. J. L. N., SILVA, T. M. G., SILVA, T. M. S., Potentialization of antioxidant activity of *Piper umbellata* (Piperaceae) leaves after their metabolism in *Heraclides brasiliensis* larvae (Lepidoptera: Papilionidae). African J. Phar. Pharmacol., 6 (2012) 3299-3301.
- [5] MELLO, M. O., SILVA-FILHO, M. C. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. Braz. J. Plant Physiol., 14 (2002) 71-81.
- [6] RAMOS, C. S. SOUZA, L.d., KATO, M.J, BATISTA, Ronan. Biotransformation of 4-nerolidylcatechol by *Heraclides brasiliensis* (Lepidoptera: Papilionidae) reduces the toxicity of *Piper umbellata* (Piperaceae). Chemoecology 58 (2012) 39-45.
- [7] RAMOS, C. S., WAGNER, M.,; MORAES, M. M., ALMEIDA, A. V., VANIN, S. A. ; KATO, M. J. Metabolization of Insecticidal Amides from Leaves of *Piper tuberculatum* by *Heraclides hectorides* and *Naupactus bipes*. J. Braz. Chem. Soc., 31 (2020) 724-730.
- [8] RAMOS, C. S., KATO, M. J. . Hydrolysis of Methyl Benzoate from *Piper arboreum* by *Naupactus bipes* Beetle. J. Braz. Chem. Soc., 20 (2009) 560-563.
- [9] RAMOS, C. S., KATO, M. J. Metabolism of neolignans from *P. regnellii* (Piperaceae) in the beetle *Naupactus bipes* (Coleoptera: Curculionidae). Chemoecology., 23 (2013) 143-148.
- [10] VIEIRA JUNIOR, G. M., DA ROCHA, C. Q., DE SOUZA, R. T., HIRUMA-LIMA, C. A., VILEGAS, W. New steroidal saponins and antiulcer activity from *Solanum paniculatum* L. Food Chemistry, 186 (2015) 160-167.

- [11] ANTUNES, R. S., GARCIA, L. F., SOMERSET, V. S., DE SOUZA, G. E., LOPES, F. M. The use of a polyphenoloxidase biosensor obtained from the fruit of jurubeba (*Solanum paniculatum* L.) in the determination of paracetamol and other phenolic drugs. *Biosensors*, 8 (2018) 1-36.
- [12] AYRES, M. C. C., BRANDÃO, M. S., VIEIRA-JÚNIOR, G. M., MENOR, J. C. A. S., SILVA, H. B., SOARES, M. J. S. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 18 (2008) 90-7.
- [13] ARASHIRO, M. P., ZIROLDO, D. F., YAMAGUCHI, M. U., SARTOR, C. F. P., PATRONI, S. M. S., D'OLIVEIRA, P. S., CORTEZ, L. E. R. Cultivo consorciado entre *Achillea millefolium* e *Rosmarinus officinalis* e seu efeito no rendimento do óleo essencial, biomassa e atividade antimicrobiana. *Rev. Saúde e Pesquisa*, 4 (2011) 373-380.
- [14] 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 Med.*, 45(1982) 31-4.
- [15] C. KAUR, H.C. KAPOOR. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 37 (2002) 153-161.
- [16] RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M. AND RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.*, 26 (1999) 1231-1237.
- [17] Dolabela, M.F. (1997) Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti *Trypanossoma cruzi* de extratos vegetais, produtos naturais e substancias sintéticas. Dissertação (Mestrado), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG, Belo Horizonte, 128 p.
- [18] VELIOGLU, Y.S., MAZZA, L., GAO, B.D. OOMAH. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food Chem.*, 46:4113-4117.
- [19] WHITAKER, B.D., STOMMEL, J.R. Distribution of Hydroxycinnamic Acid Conjugates in Fruit of Commercial Eggplant (*Solanum melongena* L.) Cultivars. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (2003) 3448-3454.
- [20] HELMJA, K., VAHER, M., GORBATSOVA, J., KALJURAND, M. Characterization of bioactive compounds contained in vegetables of the Solanaceae family by capillary electrophoresis. *Proc. Estonian Acad. Sci. Chem.*, 56 (2007). 172-186.