

Valores de DL₅₀ em peixes e no rato tratados com pó de raízes de *Derris* spp e suas implicações ecotoxicológicas¹

U.C.P. Mascaro², L.A. Rodrigues², J.K. Bastos², E. Santos³ e J.P. Chaves da Costa⁴

ABSTRACT.- Mascaro U.C.P., Rodrigues L.A., Bastos J. K., Santos E. & Costa J.P.C. 1998. [LD₅₀ in fish and rat produced by powdered roots of *Derris* spp and ecotoxicological implications.] Valores de DL₅₀ em peixes e no rato tratados com pó de raízes de *Derris* spp e suas implicações ecotoxicológicas. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 18(2):53-56. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, Via do Café s/n, Ribeirão Preto, SP 14040-903, Brazil.

True "timbós" from the Brazilian Amazon region, plants belonging to the genus *Derris* of the Leguminosae family, have there considerable importance, because they contain rotenoids which are toxic to fish and mammals. The aim of the study was to establish the lethal doses (LD₅₀) for three phylogenetical different species of fish and also for the rat. The lethal dose for *Collosoma macropomum* (tambaqui) was 2.6 mg/ml, for *Oreochromis niloticus* (tilápia) 4.8 mg/ml, for *Plecostomus* sp (cascudo) 14.2 mg/ml and for *Rattus norvegicus* 100 mg/kg. The large differences between the lethal doses for the fish and the one for the rat are possibly due to different barrier tissues against the action of rotenoids in the mammal when given orally.

INDEX TERMS: *Derris* spp, "timbó", roots, toxicology, fish, rat.

RESUMO.- Os "timbós verdadeiros" (plantas do gênero *Derris*), originários da Amazônia Brasileira, tem demonstrado importância crescente por produzirem uma classe de compostos flavonoídicos relacionados à rotenona, que possuem atividade tóxica para peixes e mamíferos. Neste estudo foi determinado a dose letal 50% (DL₅₀) do extrato alcoólico do pó de *Derris* spp para três espécies de peixes filogeneticamente diferentes e um mamífero roedor (rato). As DL₅₀ de 2,6 microgramas/ml para *Collosoma macropomum* (tambaqui), 4,8 microgramas/ml para *Oreochromis niloticus* (tilápia), 14,2 microgramas/ml para *Plecostomus* sp (cascudo) e DL₅₀ de 100,0 mg/kg para *Rattus norvegicus* (rato) denotam acentuadas diferenças entre os valores de DL₅₀, principalmente entre os peixes e o rato. Isto possivelmente é devido a fatores farmacocinéticos que se relacionam com as diferentes barreiras

teciduais encontradas pelos rotenóides quando administrados pela via oral em mamíferos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Derris* spp, "timbó", raízes, peixe, rato.

INTRODUÇÃO

Os timbós verdadeiros, plantas pertencentes ao gênero *Derris*, são os mais eficazes dentre um conjunto muito vasto de vegetais ictiotóxicos (Pires 1973, Aragão & Vale 1973). Três espécies do gênero *Derris* (urucu, nicou e elíptica) biosintetizam, pela via do metabolismo secundário, os compostos flavonoídicos rotenóides representados pela rotenona, toxiferol, deguelina e tefrosina (Mors 1973). A rotenona é o mais estudado destes princípios e o mais potente deles, causando a morte dos animais fundamentalmente através da inibição da cadeia respiratória mitocondrial, revelando-se os peixes altamente susceptíveis. É interessante assinalar o fato dos peixes envenenados pelos princípios ativos dessas plantas citadas se prestarem ao consumo, sem que sua carne ofereça risco algum de intoxicação alimentar ao consumidor. Essa peculiaridade, mais o fato desses vegetais possuírem atividade praguicida, proporcionaram seu uso na agricultura e pecuária (Costa et al. 1989, Johnson et al. 1990, Rossi et al. 1988). Possuem também emprego como agentes químicos controladores de organismos indesejáveis para a aquicultura,

¹Aceito para publicação em 4 de fevereiro de 1998.

²Depto Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, Via do Café s/n, Ribeirão Preto, SP 14040-903. (Correspondência para U.C.P. Mascaro)

³Depto Morfologia e Fisiologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp-Campus de Jaboticabal, Rodov. Carlos Tonanni Km 5, Jaboticabal, SP 14870-000.

⁴Embrapa-Centro de Pesquisa Agrícola do Trópico Úmido (CPATU), Belém, PA 66090-900.

uso esse que está sendo difundido por vários países (Howard 1988, Scarnecchia 1988, Reinertaen et al. 1987, Matlock et al. 1982, Negherbon, 1959).

Alguns aspectos de natureza estrutural desses princípios ativos foram amplamente descritos relacionando a sua estrutura química com as propriedades fármaco-toxicológicas e ecotoxicológicas (Dawson & Allen 1988, Lapa et al. 1973). Dentre essas características podemos citar sua pequena persistência no meio ambiente e a não ocorrência de efeitos sistêmicos detectáveis quando administrados por via oral em aves e mamíferos (IBAMA 1988). Com base nesses fatos, propusemo-nos a avaliar os efeitos tóxicos produzidos pelos princípios ativos extraídos de plantas do gênero *Derris*, popularmente conhecidas como timbós verdadeiros (Pires 1973). Este estudo foi programado com o objetivo de definir a sensibilidade de diferentes espécies de peixes de diferentes níveis filogenéticos e de interesse zootécnico pelos rotenoides (Howard 1988), afim de se estabelecerem as bases para uma aplicação adequada no controle químico de organismos aquáticos predadores e/ou parasitas das referidas espécies (Johnson et al. 1988). Para tanto determinamos as DL₅₀ em três espécies de peixes filogeneticamente diferenciadas, duas das quais autóctones e conhecidas popularmente como cascudo (*Plecostomus* sp) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) e uma terceira espécie a tilápia (*Oreochromis niloticus*) já perfeitamente aclimatada à região neotropical.

Ensaiou-se também a DL₅₀ do extrato alcoólico do pó das raízes do timbó em um mamífero, pois na maioria das vezes, as águas utilizadas em aquicultura são posteriormente drenadas para regiões ocupadas por rebanhos de interesse comercial, bem como de populações humanas que se utilizam para a bebida ou usos domésticos de rotina.

O emprego destes princípios ativos no manejo controlador em aquicultura está bastante difundido na Europa, Estados Unidos e Austrália, onde as interações ecotoxicológicas decorrentes das suas aplicações foram amplamente estudadas (Balcavage & Mattoon 1967, Scarnecchia 1988, Matlock et al. 1982, Reinertaen et al. 1987, Johnson et al. 1988).

O estudo da natureza química dessas substâncias está ganhando ênfase pois, elas emergem como promissores agentes praguicidas bastante desejáveis sob o ponto de vista ecotoxicológico (Rossi et al. 1988); pois possuem pequena persistência no ambiente resultante de degradação físico-química (fotossensibilidade e susceptibilidade à oxidação) (Howard 1988).

MATERIAL E MÉTODOS

O pó obtido das raízes secas de plantas do gênero *Derris* provenientes do banco de germoplasma de timbós da região amazônica na Embrapa-CEPATU, Belém (PA), constituiu o material de ensaio.

Os ensaios de ictiotoxicidade foram efetuados utilizando-se três espécies de peixes no estágio juvenil fornecidas pelo Setor de Piscicultura do Departamento de Produção Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (Unesp). As espécies selecionadas foram *Oreochromis niloticus* (tilápia), *Colossoma macropomum* (tambaqui) e *Plecostomus* sp (cascudo).

Os peixes foram retirados de tanques de alevinagem e após um período de adaptação de 72 horas em aquários coletivos (por espécie),

os mesmos foram submetidos aos testes de ictiotoxicidade. Para tanto, foram transferidos para os aquários teste. Foram feitos cinco tratamentos comparados, com oito repetições para cada espécie. Os aquários usados para estes tratamentos estavam equipados com aeradores e mantidos no laboratório de Toxicologia e Farmacologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAVJ/Unesp. Nesses aquários foi mantida uma relação massa/massa de 1g de peixe /1000ml de água. A água destes aquários foi submetida a controle físico-químico (IBAMA. 1988) para este tipo de teste. Usamos neste ensaio o pó obtido das raízes de *Derris* spp com padrão granulométrico tamis 16 contendo um teor de rotenona de 5%, determinado por método cromatográfico em camada delgada, executado no Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. Os tratamentos foram efetuados como indicados no Quadro 1, onde relacionamos diferentes concentrações do pó das raízes de *Derris* spp aplicado na água dos aquários (os números expressam microgramas de pó por mililitro de água contida nos aquários-teste). Nos aquários controle mantivemos apenas a água padronizada.

As DL₅₀ foram expressas pelas concentrações do pó que produziram 50% de mortes e de seus intervalos de confiança em 24 horas de observação, embora investigado um período curto, mantiveram-se os sobreviventes dos tratamentos e os grupos controle por 14 dias sob observação.

A toxicidade em 24 horas para ratos (*Rattus norvegicus*), foi ensaiada com o extrato etanólico a 37,5% de rotenona, no Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. Este extrato foi obtido quantificado e veiculado em polipropilenoglicol/etanol 1/1 no mesmo Departamento. Usaram-se sempre concentrações diferentes veiculadas e adequadas num mesmo volume, de modo que os animais recebessem por via oral sob sonda gástrica 1ml de volume da solução para cada 200g de peso corporal. As concentrações do extrato, foram adequadas para manter-se sempre esta proporção. O Quadro 2 mostra as concentrações do extrato etanólico de raízes de *Derris* spp expressas em ml/kg de peso corporal.

Os ratos foram submetidos aos mesmos critérios de observação para os efeitos de letalidade usados anteriormente para os peixes. Os resultados obtidos tanto para os peixes quanto para os ratos foram estatisticamente tratados pelo método do PROBITOS.

Quadro 1. Experimentos com pó de raízes de *Derris* spp em peixes (expressos em microgramas de pó por mililitro de água nos aquários)

Cascudo	Controle	8,52	11,06	14,2	18,26	23,74
Tilápia	Controle	2,48	3,40	4,80	6,72	9,41
Tambaqui	Controle	1,30	1,84	2,60	3,64	5,10

Quadro 2. Delineamento das concentrações do extrato etanólico de raízes de *Derris* spp, administrados aos ratos por sonda gástrica (expressas em g/kg de peso corporal)

Controle	41,00	63,96	100,00	156,00	243,00
----------	-------	-------	--------	--------	--------

RESULTADOS

Os peixes tratados apresentaram desorientação, executando movimentos de rotação em torno do grande eixo corpóreo, aumento do trabalho das nadadeiras e opérculos, um comportamento de busca de ar atmosférico (muito comum em

Quadro 3. Letalidade (aguda - 24 horas) das concentrações do pó de *Derris* spp adicionadas na água dos aquários (em microgramas por mililitro)

	Controle	8,40	10,92	14,20	18,46	23,99
Cascudo vivos	8	7	6	4	2	1
mortos	0	1	2	4	6	7
Tilápia vivos	8	8	6	5	1	0
mortos	0	0	2	3	7	8
Tambaqui vivos	8	7	7	4	2	1
mortos	0	1	1	4	7	

Quadro 4. Letalidade (aguda - 24 horas) de concentrações de pó de *Derris* spp, administrados em ratos por sonda gástrica (expressas em mg/kg de peso corporal)

Ratos	Controle	41,00	63,96	100,00	156,00	243,00
vivos	8	7	6	5	1	0
mortos	0	1	2	3	7	8

ambientes pobres em oxigênio) e no caso particular das tilápias, também se observou mudança brusca de coloração e eriçamento da nadadeira dorsal.

O Quadro 3 mostra os resultados de letalidade nos peixes tratados com o pó de *Derris* spp em microgramas/ml.

Quanto aos ratos, a sintomatologia apresentada era de cianose generalizada e movimentos respiratórios que sugeriam asfixia. As mortes nas concentrações maiores ocorriam em poucos minutos. A partir de 200mg/kg de peso corporal a mortalidade atingia valores de 100%.

O Quadro 4 mostra os resultados de letalidade do extrato etanólico do pó de *Derris* spp nos ratos tratados, em mg/kg de peso corporal, administrados por via oral (com uso de sonda gástrica).

DISCUSSÃO

O pó industrial de *Derris* spp com um teor aproximado de 5% de rotenona apresentou atividade ictiotóxica para as três espécies de peixes ensaiadas. Entretanto, existe uma grande diferença de sensibilidade entre elas e a magnitude dessas diferenças entre as DL₅₀ variou de 2,6 microgramas/ml para o tambaqui (*C. macropomum*), 4,8 microgramas/ml para tilápia (*O. niloticus*) alcançando o valor de 14,20 microgramas/ml para o cascudo (*Plecostomus* sp). Isto sugere que a maior sensibilidade tenha origem farmacocinética, pois os peixes mais evoluídos como o tambaqui tem provavelmente maior atividade metabólica devendo absorver mais droga do meio circundante para a luz dos capilares branquiais, na mesma unidade de tempo utilizado para as trocas respiratórias.

A via branquial pela qual os peixes provavelmente se intoxicam, facilitaria os efeitos sistêmicos dos rotenóides, fato que por si só justifica a evidente diferença com a DL₅₀ pela via oral em mamíferos (que é da ordem de 100,0 mg/kg de

peso corporal em ratos). Outro fato a ser mencionado é o de que o consumo de peixes intoxicados pelos rotenóides, cujo hábito está incorporado há séculos na cultura indígena da região Amazônica, não oferece qualquer risco de intoxicação. A este propósito torna-se óbvio admitir o fundamental papel das barreiras teciduais como responsáveis pela evidente diferença entre a DL₅₀ via oral para mamíferos com as três espécies de peixes. Reforçando esta hipótese podemos citar que a DL₅₀ intraperitoneal da rotenona em cobaias é da ordem de 15,00 mg/kg de peso corporal (Negherbon 1959).

Finalmente, a sintomatologia apresentada pelos animais tratados foi coerente com a ação tóxica dos rotenóides, que é a inibição da cadeia respiratória mitocondrial (Gutman et al. 1970).

CONCLUSÕES

As condições experimentais que determinaram a execução do presente trabalho, levaram a resultados que permitem as seguintes conclusões:

1. As diferenças de sensibilidade ao composto tóxico estudado (quando comparados peixes e mamíferos), sugerem que a menor susceptibilidade encontrada nos mamíferos (intoxicados experimentalmente pela via oral) se deve à fenômenos farmacocinéticos determinados pela existência de eficazes barreiras teciduais gástricas, que dificultam a ocorrência de concentrações plasmáticas capazes de produzirem efeitos sistêmicos tóxicos significativos.

2. Os variados graus de sensibilidade aos rotenóides apresentados pelas diferentes espécies de peixes ensaiados, sugerem que esta variação, embora também seja de origem farmacocinética, se deve as diferenças de atividade metabólica entre as espécies de peixes estudadas. As espécies mais evoluídas filogeneticamente, possuem maior atividade metabólica e absorvem mais rotenóides do meio ao fazerem as trocas respiratórias. Os resultados de ictiotoxicidade corroboram plenamente tal resultado.

3. O presente trabalho oferece resultados que permitem formar subsídios para o estabelecimento de índices terapêuticos para futuras aplicações medicamentosas destes rotenóides no controle de alguns parasitas que comprometem a saúde animal e humana.

REFERÊNCIAS

- Aragão J. A. & Valle J. R. 1973. Ictiotoxicidade de timbós dos gêneros *Serjania*, *Derris* e *Tephrosia*. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 25(7):12-14.
- Balcavage W.X. & Matoon J. R. 1967. Effect of rotenone on the alcohol dehydrogenase of yeast mitochondria. *Nature* 215:166-168.
- Costa C. N. B., Carvalho L. O. D. M., Dutra, S. & Pimentel E. S. 1989. Uso do timbó Urucu (*Derris urucu*) no controle do piolho (*Haematopinus tuberculatus*) em bubalinos. *Boletim de Pesquisa* 78, IBAMA, Brasília.
- Dawson V. K. & Allen J. L. 1988. Liquid chromatographic determination of rotenone in fish, crayfish, mussels and sediments. *J. Assoc. Anal. Chem.* 71(6):1094-1096.
- Gutman M., Mayr M. & Singer T. P. 1970. Effect of ATP on the redox cycle of respiratory chain-linked DPNH Dehydrogenase and the localization of coupling Site I. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 41: 40-44.
- Howard R. K. 1988. The structure of a nearshore fish community of western

- Australia: diet patterns and the habitat role of limestone reefs. *Environ. Biology of Fishes* 24(2):93-104.
- IBAMA 1988. Manual para Avaliação da Ecotoxicidade de Agentes Químicos. Brasília.
- Johnson B. M., Stein, R. A. & Carline R. F. 1988. Use of a quadrat rotenone technique and bioenergetics modeling to evaluate prey availability to stocked piscivores. *Am. Fisheries Soc.* 117:127-141.
- Johnson P. W., Plant J. W., Boray J. C., Blunt S. C. & Nicholis P. J. 1990. The prevalence of itchmite, *Psorergates ovis*, among sheep flocks with a history of fleece derangement. *Aust. Vet. J.* 67:117-120.
- Lapa A.J., Teixeira J. R., Soucar C. & Valle J. R. 1973. The pharmacology of timbós, toxic plants used to fish. Sessão Integrada - Plantas ictiotóxicas (timbós). *Ciência e Cultura*, São Paulo, 26(7):49-51.
- Matlock G. C., Weaver J. E. & Green A. W. 1982. Sampling reashore estuarine fishes with rotenone. *Am. Fisheries Soc.* 111:326-331.
- Mors W. B. 1973. Plantas ictiotóxicas: aspectos químicos (timbós). *Ciência e Cultura*, São Paulo, 26(7):52-55.
- Negherbon W. O. 1959. Handbook of Toxicology. Insecticides. Vol. 3. Saunders, Philadelphia.
- Pires J. M. 1973. Plantas ictiotóxicas, aspectos da Botânica Sistemática. Sessão Integrada (timbós). *Ciência e Cultura*, São Paulo, 26(7):56-61.
- Reinertaen H., Jensen A. Koksvik J. I. & Olsen Y. 1987. Effects of fish removal on the limnetic ecosystem of an eutrophic lake. *J. Fish Aquat. Sci.* 47:166-173.
- Rossi M., Fule P. Z. & Taylor M. R. 1988. Conformational flexibility in the molecular structure of Rotenone, a naturally occurring insecticide. *Bioorg. Chem.* 16:376-387.
- Scarnecchia D. L. 1988. Evaluation of fish eradication and game-fish restocking in a central Iowa pond. *J. Iowa Acad. Sci.* 95 (2):55-59.