

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE EXTRATOS BRUTOS DA ANADENANTHERA COLUBRINA (VELL.) BRENAN

Elys Karine Carvalho da Silva (1); Márcia Vanusa da Silva (2)

(1) Universidade Federal de Pernambuco, elyskarinec@gmail.com

(2) Universidade Federal de Pernambuco, marciavanusa@yahoo.com.br

Resumo: Os Estados do Nordeste apresentam uma vegetação característica de grande importância biológica e potencial econômico. A *Anadenanthera colubrina* é uma planta bastante usada na medicina popular como antidiarreico e no tratamento das infecções pulmonares. Mas a prática do uso de plantas medicinais pode se tornar perigosa quando realizada sem orientação, pois muitas podem apresentar difícil identificação, composição química variável e relativa toxicidade. Por isso, o presente trabalho teve como objetivo determinar o potencial citotóxico dos extratos de galhos da *Anadenanthera colubrina* (VELL.) Brenan por ensaios *in vitro* de atividade hemolítica. Os galhos da *Anadenanthera colubrina* foram coletados no Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco, Brasil. O sangue utilizado para o experimento foi obtido a partir da coleta de um voluntário saudável. São adicionados 0,4 mL dos extratos a 1,1 mL da suspensão de eritrócitos, após incubação de 60 min, os tubos são centrifugados e o sobrenadante é utilizado para medir a absorbância da hemoglobina liberada. O resultado foi expresso em relação à atividade do Triton X- 100 e do tampão fosfato-salina. No experimento foi observado a formação de precipitado de células, demonstrando que as amostras testadas não promoveram a hemólise dos eritrócitos em todas as concentrações testadas, o que foi comprovado com a leitura da absorbância. Com base nos resultados obtidos, os dois extratos demonstraram ser farmacologicamente promissores, sendo uma possível fonte de fitoterápico, pois não causaram hemólise, logo não apresentam citotoxicidade significativa neste parâmetro. Sugere-se mais testes afim de verificar a toxicidade aguda.

Palavras-chave: *Anadenanthera colubrina*, citotoxicidade, Atividade hemolítica.

Introdução

Com o intuito de comprovar o potencial biológico dos compostos metabolizados pelas plantas, vários estudos vêm sendo realizados, como por exemplo, com as espécies vegetais encontradas no Bioma Caatinga, que é exclusivamente brasileiro e representa uma importante fonte para a prospecção de biomoléculas que apresentam capacidade antioxidante e antimicrobiana, dentre outras.

A Caatinga é um bioma que ocupa cerca de 11% do território nacional, abrangendo os estados do Piauí, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Maranhão, Ceará, Alagoas, Sergipe, Bahia e norte de Minas Gerais, como mostra a figura 1 (MMA, 2015). Como uma formação vegetal altamente ameaçada, está envolvida pela ideia da improdutividade, segundo a qual seria uma fonte menor de recursos naturais. Essa ideia parece estar sempre relacionada às áreas áridas e semiáridas de todo o mundo (ALBUQUERQUE, 2002).

Albuquerque (2000) e Maia (2004) citam que estudos realizados em alguns Estados do Nordeste revelam que a vegetação da Caatinga possui diversas utilidades, além de apresentarem

(83) 3322.3222

contato@conadis.com.br

www.conadis.com.br

uma grande importância biológica; essa formação vegetal apresenta um considerável potencial econômico, com espécies que podem ser utilizadas como forrageiras, frutíferas, madeiras e de uso medicinais.

O uso de plantas medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças tem sido descrito por muitos povos desde os tempos mais remotos. Devido a esse uso, surgiram interesses comerciais e científicos e, por isso, tornou-se necessária a avaliação da eficácia e segurança dessas plantas (LOURENÇO et al., 2009).

Os vegetais superiores tanto quanto microrganismos podem ser usados de forma medicinal devido principalmente aos seus metabólitos secundários produzidos. Ainda é obscuro à comunidade científica o papel fisiológico de grande parte destes compostos, todavia é conhecido que alguns são responsáveis por características como odor, pungência e cor dos vegetais (LEICACH; CHLUDIL, 2014). É cada vez mais crescente a opinião de que produtos do metabolismo secundário são biossintetizados para promover a sobrevivência do indivíduo que os produz.

Os metabólitos secundários quimicamente podem ser agrupados em três grandes grupos: compostos polifenólicos, terpenos e alcalóides. Os polifenólicos são abundantes nas plantas, exercendo funções como pigmentação, proteção contra os raios ultravioleta, ação antioxidante, ação alelopática, defesa contra ataques microbiológicos e predadores (NACZK; SHAHIDI, 2006). Os terpenos compreendem uma diversificada classe de substâncias naturais que ocorrem em todas as plantas (SINGH; SHARMA, 2015). Dentro deste grupo estão os carotenos (C_{40}) que apresentam função essencial na pigmentação de flores e frutos. Os alcalóides são compostos orgânicos cíclicos que possuem um ou mais átomos de nitrogênio, excluindo aminoácidos, hormônios, ácidos nucleicos e peptídeos (KUETE, 2014).

Porém, a prática do uso de plantas medicinais pode se tornar perigosa quando realizada sem orientação, pois muitas plantas podem apresentar difícil identificação, composição química variável e relativa toxicidade (FÉLIX-SILVA et al., 2012). Uma das problemáticas envolvendo toxicidade de plantas é a hemólise. Para Paula et al. (2014) a hemólise refere-se à lise ou ruptura das membranas das hemácias permitindo a liberação da hemoglobina para o plasma, tendo como consequência a hemoglobinemia que pode levar a problemas sérios como hemoglobinúria.

Por causa disso, em laboratórios, o teste de hemólise *in vitro* vem sendo empregado rotineiramente em estudos de toxicidade de plantas medicinais, pois é considerado essencial como estudo preliminar de compostos com potenciais atividades biológicas (KALEGARI et al., 2011).

Deste modo, o presente trabalho tem como objetivo analisar a capacidade hemolítica em extratos aquoso e metanólico de galhos da planta *Anadenanthera colubrina*. Espécie coletada no Parque Nacional do Catimbau (PARNA do Catimbau), Pernambuco, Brasil, conhecido por ser uma área de preservação da Caatinga que apresenta plantas de diversas espécies com potencial para pesquisa de compostos bioativos, pois a descoberta de novos fármacos de origem natural é de grande interesse científico, ambiental, tecnológico e econômico para o país.

Metodologia

Coleta da amostra

Os galhos da *Anadenanthera colubrina* foram coletados no Parque Nacional do Catimbau (PARNA do Catimbau), Pernambuco, Brasil, em Julho de 2016. A sua identificação botânica foi realizada no Herbário do Instituto de Pesquisa Agrônômica de Pernambuco (IPAPE), onde o seu voucher (IPA 84.039) está depositado.

Preparação dos extratos

Para o preparo dos extratos metanólico e aquoso da *A. colubrina*, os galhos coletados ficaram por um período de sete dias secando a temperatura ambiente e em seguida, foram moídos para virar pó, de onde é possível fazer a extração. O processo de extração foi realizado misturando-se 10 g dos galhos moídos com 100 mL de metanol e de água, solventes responsáveis por fazer a extração metanólica e aquosa respectivamente em diferentes erlenmeyers. Os frascos foram submetidos à agitação por uma hora em um shaker, onde se formou um sobrenadante que foi filtrado em papel filtro, sendo isto o processo foi repetido por três vezes para ambos os solventes. O extrato metanólico adquirido foi colocado em balão de fundo redondo e submetido à destilação do solvente em um rotaevaporador sob pressão reduzida a uma temperatura média de 45°C com a finalidade de concentrar este extrato, obtendo rendimento de 29,5%. Já o extrato aquoso foi submetido à liofilização também para concentra-

lo e seu rendimento foi de 37,6%. O rendimento foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento: } \frac{\text{Peso da amostra} - \text{Peso do tubo} \times 100}{10}$$

Atividade hemolítica

O ensaio de atividade hemolítica foi realizado de acordo com Oliveira et al. (2012). O sangue utilizado para o experimento foi obtido a partir da coleta em tubo de citrato de um voluntário saudável e não fumante, após assinatura do documento de consentimento.

O tubo coletado foi centrifugado a 3000 rpm por 6 min. O plasma e a camada leucoplaquetária foram removidos e os eritrócitos restantes foram lavados por três vezes com tampão fosfato-salino e ressuspensos com a mesma solução. Cada eppendorf recebeu 1,1 mL da suspensão de eritrócitos e 0,4 mL dos extratos em concentrações de 2000 µg/mL; 1000 µg/mL; 500 µg/mL; 250 µg/mL; 125 µg/mL; 62,5 µg/mL; 31,25 µg/mL e 15,625 µg/mL.

O controle negativo continha apenas o tampão fosfato-salina e 1,1 mL de suspensão de eritrócitos e o controle positivo recebeu 0,4 mL de Triton X-100.

Após incubação de 60 min a temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados e o sobrenadante foi utilizado para medir a absorbância da hemoglobina liberada em um comprimento de onda de 540nm. O teste foi feito em triplicata.

A atividade hemolítica foi expressa qualitativamente em relação à atividade do Triton X-100 e do tampão fosfato-salina.

Resultados e discussão

Nos experimentos realizados de acordo com o método descrito por Oliveira et al. (2012), atividade hemolítica foi expressa em relação com a atividade do Triton X-100, utilizado como padrão.

Os extratos aquoso e metanólico da *A. colubrina* não causaram hemólise nos eritrócitos, como observado na tabela 1 e comprovado pela figura 1 e 2, onde a ausência de hemólise dos dois extratos se compara a do controle negativo.

Tabela 1: Atividade hemolítica

Concentrações (mg/ml)	Extrato metanólico	Extrato aquoso	Triton X-100 (CP)	Solução salina (CN)
2000	+/-	-	+++	---
1000	-	-	+++	---
500	-	--	+++	---
250	-	---	+++	---
125	--	---	+++	---
62,5	---	---	+++	---

+++: Presença de hemólise; ---: Ausência de hemólise.

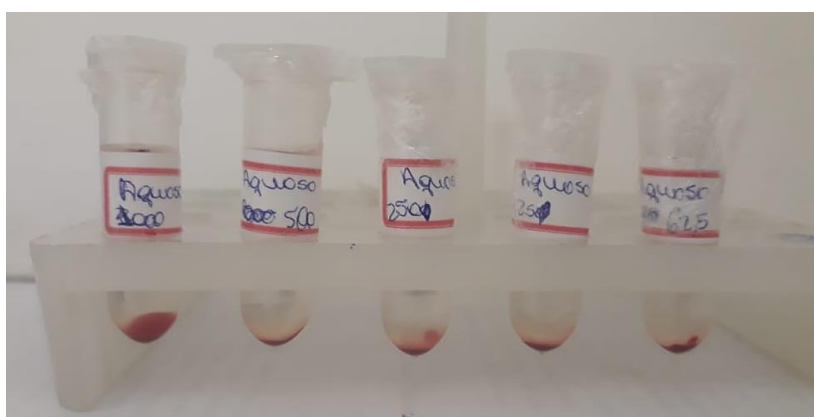


Figura 1: Atividade hemolítica do extrato aquoso.

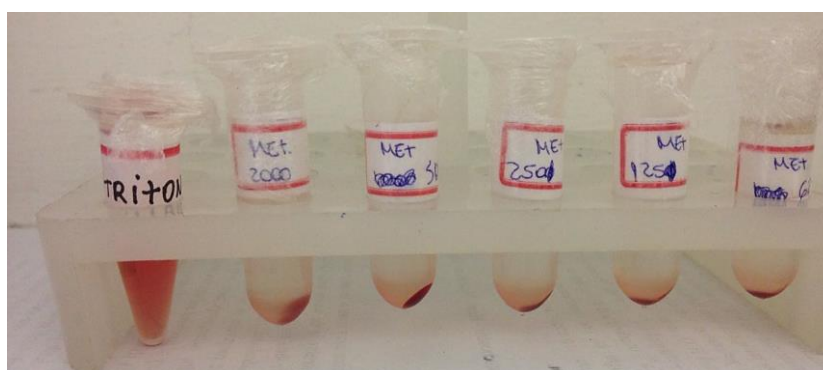


Figura 2: Atividade hemolítica do extrato metanólico em comparação com o Triton (primeiro eppendorf)

As plantas contêm princípios ativos responsáveis pelas propriedades terapêuticas a elas atribuídas, mas também, por reações adversas que podem aparecer em decorrência de uso indevido ou contado direto (CARVALHO et al., 2012).

Embora estudos fitoquímicos realizados anteriormente por nosso grupo demonstrem a presença de compostos possivelmente tóxicos nos extratos, como terpenos, alcalóides e taninos (KATO; AKISUE, 2002; LIMA et al, 2004; MONTEIRO et al 2006; FORTES; GUEDES, 2006; MOTA, 2006) o ensaio de toxicidade *in vitro* destes extratos não mostrou resultados condizentes com este fato, possivelmente por causa das concentrações destes metabólitos presentes nos extratos.

Dentre os metabólitos secundários conhecidamente relacionados à hemólise, os alcalóides, mesmo em pequenas quantidades, são substâncias naturalmente tóxicas (DEWICK, 2002). A saponinas, outro princípio-ativo tóxico, é capaz de interagir com a membrana dos eritrócitos e provocar hemólise (DEWICK, 2002) e os fenóis que podem oxidar a hemoglobina.

Ensaio de atividade hemolítica realizados por Colacite (2015) mostraram que a *A. colubrina* mostrou-se tóxica na maior concentração testada (4000 µg/mL), enquanto nas demais (2000 µg/mL, 1000µg/mL e 500 µg/mL) apresentou baixa toxicidade.

Devido aos méritos de uma baixa toxicidade do extrato aquoso e ainda uma eficiência de extração superior, é possível afirmar que ele oferece uma melhor escolha na obtenção de extratos antioxidantes quando comparado ao metanol.

Conclusão

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que os extratos metanólico e aquoso dos galhos da *Anadenanthera colubrina* não causaram hemólise, logo não apresentam citotoxicidade significativa neste parâmetro.

Além disso, o extrato aquoso oferece uma melhor escolha na obtenção de extratos quando comparado ao metanol.

São importantes mais estudos para garantir que os extratos não apresentam toxicidade em outros parâmetros ou em maiores concentrações.

Referências bibliográficas

ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. *Acta Botanica Brasílica*, v. 16, n. 3, p. 273-85, 2002.

ALBUQUERQUE, U. P. A etnobotânica no nordeste brasileiro. In: CAVALCANTI, T. B. E.; WALTER, B. M. T. Tópicos atuais em Botânica. Brasília: EMBRAPA, São Paulo. Sociedade Botânica do Brasil, p. 241-249, 2000.

CARVALHO, D. F. Estudo do potencial antioxidante in vitro e in vivo do extrato aquoso das folhas de *Centratherum punctatum* ssp *punctatum* cass. (Asteraceae). Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Bioquímica e Farmacologia, UFPI, 2012.

COLACITE, J. Triagem fitoquímica, análise antimicrobiana e citotóxica e dos extratos das plantas: *Schinus terebinthifolia*, *Maytenus ilicifolia* REISSEK, *Tabebuia avellaneda*, *Anadenanthera colubrina* (Vell.) BRENAN. *Revista Saúde e Pesquisa*, v. 8, n. 3, p. 509-516, set./dez, 2015.

FÉLIX-SILVA, J.; TOMAZ, I. M.; SILVA, M. G.; SANTOS, K. S. C. R.; SILVA JÚNIOR, A. A.; CARVALHO, M. C. R. D.; SOARES, L. A. L.; FERNANDES PEDROSA, M. F. Identificação botânica e química de espécies vegetais de uso popular no Rio Grande do Norte, Brasil. *Rev. Bras. Plantas Med., Botucatu*, v. 14, n. 3, p. 548-555, 2012.

KALEGARI, M.; MIGUEL, M. D.; DIAS, J. F. G.; LORDELLO, A. L. L.; MIYAZAKI, C. M. S.; ZANIN, S. M. W.; VERDAM, M. C. S.; MIGUEL, O. G. Phytochemical constituents and preliminary toxicity evaluation of leaves from *Rourea induta* Planch (Connaraceae). *Brazilian J Pharmaceutical Sci.*, v. 47, n. 3, p. 635-642, 2011.

KUETE, V. Health effects of alkaloids from african medicinal plants. In: KUETE, V. (Ed.). *Toxicological Survey of African Medicinal Plants*. [s.l]: Elsevier. cap. 21, p. 611-633, 2014.

LEICACH, S. R.; CHLUDIL, H. D. Plant secondary metabolites: Structure-activity relationships in human health prevention and treatment of common diseases. *Studies in Natural Products Chemistry*. v. 42(1), p. 267-304, 2014.

LOURENÇO, A. C. S.; MIGUEL, L. K.; GUARIDO, K. L.; SENSIATE, L. A.; SALLES, M. J. S. Óleo de copaíba (*Copaifera langsdorfii* Desf.) em padrões reprodutivos de camundongos

(83) 3322.3222

contato@conadis.com.br

www.conadis.com.br

e no desenvolvimento embriofetal. Rev. Bras. Plant. Med., Botucatu, v.11, n.4, p.407-413, 2009.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). Secretaria de biodiversidade e florestas. Diretoria de conservação da biodiversidade. Caatinga. Brasília, DF, 2015. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>>.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. J. Pharm. Biomed. Anal. v. 41(5), p. 1523-1542, 2006.

OLIVEIRA, Y.L.C; SILVA, L.C.; SILVA, A .G.; MACEDO, A.J.; ARAUJO, J.M.; CORREIA, M.T.S.; SILVA, M.V.; Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. A. Howard (Combretaceae: combretoideae). The Scientific World Journal, 2012.

PAULA, C. S.; CANTELI, V. C. D.; VERDAM, M. C. S.; KALEGARI, M.; CAMPOS, R.; HIROTA, B. C. K.; MIGUEL, O. G. M.; MIGUEL, M. D. Atividade antioxidante e toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas das folhas e cascas do caule de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.). Cabrera. Rev. Bras. Plan. Med., Campinas, v.16, n.2, p.189-195, 2014.

SINGH, B.; SHARMA, R. A. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. 3 Biotch., v. 5, n. 2, p. 129-151, abr., 2015.