

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE *Croton heliotropiifolius* KUNTH (EUPHORBIACEAE)

SILVA, J.A.G¹; SILVA, G.C²; SILVA, T.M.S³; LIMA, I. R.⁴; LEITE, S.P.⁵

Universidade Federal de Pernambuco, jessica.andrade.gs@gmail.com

Resumo: Frequentemente encontrado na caatinga, brejo, restinga e cerrado brasileiro, o velame, *Croton heliotropiifolius* Kunth é popularmente conhecido por suas propriedades medicinais utilizada na dor de estômago, mal estar gástrico, vômitos, diarreia com sangue e para baixar a febre. Além das propriedades farmacológicas, seu óleo essencial apresenta atividade larvicida contra *Aedes aegypti*, assim como o extrato etanólico apresentou atividade inseticida considerável contra *Sitophilus zeamais*. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito citotóxico *in vitro* do velame, através do ensaio de fragilidade osmótica. O ensaio de hemólise foi realizado nas concentrações de 1000, 750, 500, 250, 100 e 50 µg/mL de extrato metanólico de folhas. O extrato em estudo apresentou baixa ação hemolítica. Desta forma, é provável que não haja dano à membrana eritrocitária.

Palavras-chave: Velame, fragilidade osmótica, hemólise.

Introdução: Durante muito tempo o uso das ervas medicinais foi baseado nos conhecimentos intuitivos do homem, que no decorrer da história, aprendeu a diferenciar a ação benéfica da ação tóxica, assim possibilitando o uso terapêutico (LEITE, 2008).

Com a investigação da toxicidade é possível determinar o potencial de novas substâncias e produtos causarem danos. Dessa forma, testes que avaliam a ação tóxica são utilizados para classificar substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade, além da toxicocinética e a relação dose resposta (PURCHASE et al., 1998; BLAAUBOER, 2003).

Muitos testes comprometidos com a análise de agentes tóxicos utilizam animais de laboratório. Entretanto, existe uma busca crescente por métodos *in vitro* que não utilizem animais em sua execução (HARBELL et al., 1997).

A determinação da atividade citotóxica de um fitoterápico constitui uma medida prioritária, uma vez que vários compostos químicos podem ser capazes de causar efeitos tóxicos. Os eritrócitos são células bastante utilizadas para estudos de citotoxicidade *in vitro*, devido, principalmente, ao fácil acesso e grande disponibilidade, permitindo a avaliação do efeito tóxico ou protetor de princípios ativos sobre a membrana celular. Após a exposição ao produto teste, à ocorrência ou não de hemólise pode ser diretamente

correlacionada com sua citotoxicidade e utilizada como primeiro passo da triagem toxicológica *in vitro* (SCHIAR et al., 2007).

O teste de fragilidade osmótica de eritrócito tem por objetivo mensurar a resistência dos glóbulos vermelhos à hemólise, frente a extratos de plantas da caatinga (RODRIGUES, 2009; SANT'ANA, 2001).

Croton heliotropiifolius Kunth constitui uma espécie endêmica do Nordeste Brasileiro, popularmente conhecida como “velame”, “velaminho” e “velame-de-cheiro” devido aos seus minúsculos pêlos. Pode ser encontrada com frequência na vegetação da Caatinga, mas também ocorre em brejos, restingas e cerrados (RANDAU et al., 2001).

Com base na medicina popular, a espécie vem sendo utilizada para dor de estômago, mal estar gástrico, vômitos, diarreia com sangue e para baixar a febre (RANDAU et al., 2001). O óleo essencial demonstrou relevante atividade larvicida contra *Aedes aegypti* (DORIA et al., 2010), assim como o extrato etanólico apresentou atividade inseticida considerável contra *Sitophilus zeamais* (SILVA et al., 2012).

Tendo em vista que poucos estudos foram realizados a fim de melhorar o entendimento das atividades biológicas e a

capacidade tóxica de *Croton heliotropiifolius* Kunth, nosso trabalho visou avaliar este potencial no extrato metanólico desta espécie, através do ensaio *in vitro* de fragilidade osmótica em eritrócitos, teste capaz de promover uma avaliação preliminar da toxicidade de plantas.

Metodologia:

Obtenção e preparação do material vegetal

As folhas foram obtidas a partir de árvore de velame (*C. heliotropiifolius* – Euphorbiaceae), na área urbana do Município de Garanhuns, Pernambuco, Brasil. Preparou-se uma exsiccata, a qual foi depositada no Herbário Dárdano de Andrade Lima, do Instituto Agrônomo de Pesquisa (IPA), sob número de tomo 90440 e identificada por um botânico da instituição. As mesmas foram coletadas em julho de 2015.

Obtenção do extrato metanólico

O extrato bruto seco foi feito de acordo com o método de maceração descrito por Filho, Yunes (1998). As folhas (10g) foram maceradas por 10 dias, em metanol (100ml) a temperatura ambiente e submetida a agitações esporádicas. Depois deste período, a mistura foi filtrada e o filtrado resultante

foi rotaevaporado até a evaporação total do solvente.

Ensaio de Fragilidade Osmótica

A técnica de fragilidade osmótica realizada, baseou-se na metodologia descrito por Darcie e Lewis (1975). Foi distribuído 5mL de solução salina NaCl 0,9% em 7 tubos. No tubo 0, foi adicionado 25 µL de sangue de carneiro e encubado por 30'. Os tubos seguintes, de 1 a 6 receberam as respectivas concentrações do extrato em análise: 1000µg/ mL; 750 µg/ mL; 500 µg/ mL; 250 µg/ mL; 100 µg/ mL; e 50 µg/ mL. Em seguida, cada tubo recebeu 25 µL de sangue de carneiro e forma encubados por 30'. Após esse período, as amostras foram submetidas à centrifugação a força de 3 500 G durante 15'. Em seguida, o sobrenadante foi lido no espectrofotômetro bioplus com comprimento de onda 540nm, para obter a absorbância resultante. Os ensaios foram realizados em duplicata. O Percentual de hemólise baseou-se na fórmula:

$$\% = \frac{Ab. \cdot 100\%}{1,32}$$

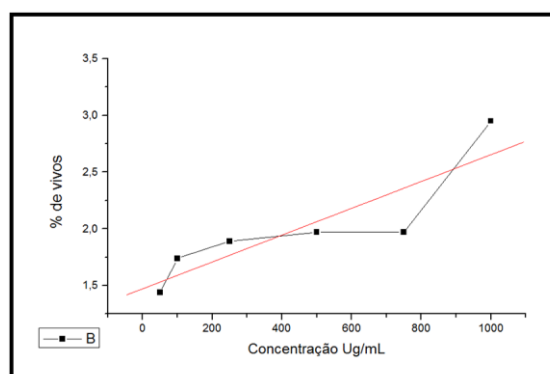
Resultados

Os resultados do ensaio de fragilidade osmótica encontram-se expostos na tabela 1 e no gráfico 1.

Tabela1. Absorbância Média e Percentual de hemólise do extrato de *C. heliotropiifolius*

Concentrações	Absorbância média	Percentual de hemólise (%)
1000 µg/mL	0,039	2,95
750 µg/mL	0,026	1,97
500 µg/mL	0,026	1,97
250 µg/mL	0,025	1,89
100 µg/mL	0,023	1,74
50 µg/mL	0,019	1,44

Gáfico1. Percentual de hemólise do extrato de *C. heliotropiifolius*



Discussão: A toxicidade de alguns metabólitos secundários presentes nos vegetais é bastante relatada (SILVA et al, 2012). Segundo Dewick (2002), os alcalóides, mesmo em baixas concentrações, são substâncias naturalmente, tóxicas. As saponinas triterpênicas são compostos naturais também associados à toxicidade, devido a

sua capacidade de produzir hemólise. O seu efeito hemolítico é resultante da capacidade de interação com os elementos da membrana celular das hemácias, especialmente com as moléculas de colesterol, acarretando uma deformação na membrana e como consequência, causa o extravasamento do conteúdo intracelular ((DEWICK, 2002; GLAUERT et al., 1967; KARABALIEV et al., 2003).

A ação hemolítica dos diferentes compostos tóxicos é atribuído a vários mecanismos inespecíficos. Como por exemplo, os compostos surfactantes, que produzem seu efeito hemolítico por meio da solubilização da membrana plasmática do eritrócito, ou pela lise osmótica, que promove alterações na permeabilidade da membrana plasmática da hemácia (APARICIO et al., 2005). Em contrapartida, os compostos xenobióticos reduzidos, como os compostos fenólicos, são capazes de promover hemólise por meio da oxidação da hemoglobina, formando metemoglobulina (BUKOWSKA et al., 2004).

O ensaio de toxicidade *in vitro* desta planta evidenciou baixa atividade hemolítica no extrato metanólico de folhas. Visto que, a maior concentração de 1000µg/ml apresentou lise em apenas 2,95% das hemácias diante dos parâmetros

e condições testadas, considerando que o percentual normal de hemólise é inferior a 1,32. Entretanto, tal resultado, não exclui a existência de citotoxicidade, uma vez que maiores concentrações de extrato ainda não foram testadas e poucos estudos com a espécie são encontrados na literatura.

Trabalho semelhante com *Croton grewioides* Baill, espécie do mesmo gênero do velame, foi feito por Laranjeira et al. (2010), e em sua pesquisa, os autores afirmam que a citotoxicidade do extrato não está relacionada ao dano da membrana, podendo essa atividade estar relacionada a apoptose.

Conclusão: O extrato metanólico de *C. heliotropifolius* apresentou baixa atividade hemolítica *in vitro* nas concentrações testadas. Desta forma, é provável que não haja dano à membrana eritrocitária.

Portanto, estudos futuros devem ser realizados com extratos em concentração maiores, bem como testar diferentes metodologias.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia-UFPE, pelo fornecimento da infraestrutura e pelo material vegetal usado para os estudos citotóxico, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

Referências:

- APARICIO R.M., GARCÍA-CELMA M.J., VINARDELL M.P. & MITJANS M. 2005. *In vitro* studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 39: 1063-1067.
- BUKOWSKA B. & KOWALSKA S. 2004. Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. *Toxicology Letters*. 152: 73-84.
- DACIE J.V.; LEWIS S.M. Practical Hematology. 5th Edition. *Churchill Livingstone*. London. 629 pp. 1975.
- DEWICK, P.M. (2002). Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach. *John Wiley & Sons LTD*, 2º ed., p.291-300.
- DORIA, G.A.A., SILVA, W.J., CARVALHO, G.A., ALVES, P.B., CAVALCANTI, S.C.H., 2010. A study of the larvicidal activity of two *Croton* species from northeastern Brazil against *Aedes aegypti*. *Pharm. Biol.* 48, 615–620.
- FILHO, V.C. & YUNES, R. A. (1998). Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. *Química nova*, v.21, n.1.
- GLAUERT, A.M.; DINGLE, J.T.; LUCY, J.A. Action of saponin on biological cell HARBELL J.W., KOONTZ S.W., LEWIS R.W., LOVELL D. & ACOSTA D. 1997. Cell cytotoxicity assays. *Food and Chemical Toxicology*.35: 79-126.
- KARABALIEV, M.; KOCHEV, V. Interaction of solid supported thin lipid films with saponin. *Sensors and Actuators B*, v.88, p.101-105, 2003.
- LARANJEIRA, LUANA, CARLSON CARVALHO, FERNANDA MOTA, LARISSA ARAÚJO, JACIANA AGUIAR, MARIA RODRIGUES, JOSEAN TAVARES, MARIA AGRA, MARCELO SILVA, TERESINHA SILVA. (2010). Avaliação Da Atividade Hemolítica Do Extrato Etanólico De *Croton grewoides* Baill. *X Jornada De Ensino, Pesquisa E Extensão – Jepex*. Ufrpe: Recife, 18-22 Outubro.
- LEITE, J.P.V. Desenvolvimento da Fitoterapia. In.: *Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas*. São Paulo: Atheneu. Capítulo 1, p. 3-20, 2008.
- membranes. *Nature*, v.196, p.952-955, 1962.
- PURCHASE, et al., 1998 PURCHASE, I. F.; BOTHAM, P. A.; BRUNER, L. H.;

FLINT, O. P.; FRAZIER, J. M.; STOKES, W. S. Workshop overview: scientific and regulatory challenges for the reduction, refinement, and replacement of animals in toxicity testing. *Toxicological Sciences*. v.43, n.2, p.86-101, 1998.

RANDAU, K. P. Estudo farmacognóstico (farmacobotânico e farmacoquímico) e atividade biológica do *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax e Haffm. (Euphorbiaceae). 2001. 143p. *Dissertação* (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco. Recife- PE.

RODRIGUEZ JA, HIRUMA-LIMA CA, SOUZA-BRITO AR 2004. Antiulcer activity and subacute toxicity of transdehydrocrotonin from *Croton cajucara*. *Hum Exp Toxicol* 23: 455-461.

SCHIAR, V. P. P. et al. Screening of potentially toxic chalcogens in erythrocytes. *Toxicology in Vitro*, v. 21, p.139-145, 2007.

SILVA, L.B., TORRES, E.B., SILVA, K.F., SOUZA, J.S.N., LOPES, M.S., ANDRADE, L.H., XAVIER, Z.F., 2012. Toxicity of ethanolic extract of *Croton heliotropiifolius* in weevil populations of

stored maize grains. *J. Entomol.* 9, 413–421.