

## INVESTIGAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DO EXTRATO DE *Syzygium cumini* (L.) Skeel EM CÉLULAS EUCARIÓTICAS HUMANAS

Tayná Ribeiro Monteiro de Figueiredo (1); Daliana Queiroga de Castro Gomes (2); Edja Maria Mele de Brito Costa (3); Ernani Canuto Figueirêdo Junior (4); Jozinete Vieira Pereira Marques (5)

Universidade Estadual da Paraíba – UEPB ([taynaribeirof@hotmail.com](mailto:taynaribeirof@hotmail.com))

Universidade Estadual da Paraíba – UEPB ([dqcgomes@hotmail.com](mailto:dqcgomes@hotmail.com))

Universidade Estadual da Paraíba – UEPB ([edjacosta@gmail.com](mailto:edjacosta@gmail.com))

Universidade Estadual da Paraíba – UEPB ([junior-pb16@hotmail.com](mailto:junior-pb16@hotmail.com))

Universidade Estadual da Paraíba – UEPB ([jozinetevieira@hotmail.com](mailto:jozinetevieira@hotmail.com))

**Resumo:** Investigar a atividade citotóxica do extrato bruto de folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeel (jambolão) em células eucarióticas humanas. Foi realizado um estudo laboratorial experimental *in vitro*. A espécie vegetal, folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeel, foram coletadas no mês agosto de 2015 na região do semiárido paraibano, zona rural do município de Campina Grande/PB. O exemplar de *Syzygium cumini* foi depositado na Coleção do Herbário Professor Lauro Pires Xavier do Departamento de Biologia Molecular da UFPB, João Pessoa/PB. Foi produzido extrato hidroalcoólico liofilizado das folhas de *S. Cumini* na proporção 200g planta moída para 1 litro de solução hidroalcoólica, na concentração de 70%. O método de extração utilizado para obtenção do extrato foi a maceração. Foi realizado ensaio de citotoxicidade do extrato em eritrócitos humanos obtidos do descarte de sangue do Laboratório de Análises Clínicas/UEPB. A hemólise foi quantificada através da leitura da absorbância por espectrofotometria, detectando-se também a respectiva intensidade da hemólise causada. Verificou-se que dentre as diferentes concentrações avaliadas do extrato liofilizado das folhas de *S. cumini*, o mesmo apresentou citotoxicidade equivalente a 7,21%, apenas na concentração de 500 µg/ml, não demonstrando hemólise para as demais concentrações avaliadas. Frente aos resultados encontrados, pôde-se afirmar que o extrato pode ser considerado um produto de baixa toxicidade. É importante que, mais análises sejam realizadas em relação a citotoxicidade do extrato frente a outros modelos experimentais.

Palavras-chave: *Syzygium*; Eritrócitos; Citotoxicidade.

### Introdução:

*Syzygium cumini* (L.) Skeels, espécie da família Myrtaceae, popularmente conhecida

por jambolão, azeitona, azeitona-roxa, oliva, manifesta-se como uma interessante alternativa terapêutica (MIGLIATO et al.,

2006). É conhecida por suas propriedades antidiarreica, anti-inflamatória, antidiabética, antimicrobiana e antioxidante. Muito utilizada pela população em forma de bochechos para o tratamento de afecções bucais e para tratar constipação, leucorreia e febre (COSTA et al., 2009; AGOSTINI-COSTA; SILVA, 2008).

Observa-se que, a maior parte dos fitoterápicos que são utilizados atualmente por automedicação ou por prescrição médica não tem o seu perfil tóxico bem conhecido (CAPASSO; IZZO et al., 2000; VEIGA JUNIOR; MELLO, 2008). Baseando-se nisso, pode-se afirmar que é de grande importância que durante a realização de estudos de prospecção de plantas medicinais e/ou seus extratos sejam realizadas investigações destinadas à avaliação de potenciais efeitos tóxicos, uma vez que alguns dentre os diversos constituintes biologicamente ativos presentes podem ser tóxicos para o organismo ou até mesmo conterem substâncias capazes de exercer atividades mutagênicas ou carcinogênicas. Desse modo, a realização de testes destinadas à detecção de possível atividade citotóxica constitui uma medida prioritária (BENIGNI, 2005).

O eritrócito é um tipo de célula que contém alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados, oxigênio molecular e íons ferro no estado ligado. Por esta razão, espera-

se que eles sejam altamente vulneráveis à reações que envolvem radicais livres e podem ser muito suscetíveis a peroxidação dos lipídios de membrana e hemólise. Dessa forma, a avaliação do potencial citotóxico em eritrócitos humanos constitui um bom sistema que pode ser utilizado como um modelo experimental *in vitro* para investigar os efeitos tóxicos e protetores de uma grande variedade de substâncias (NIKI; YAMAMOTO et al., 1991).

Devido à facilidade do acesso as plantas medicinais e ao seu baixo custo, a fitoterapia abre um amplo leque para melhorar a qualidade de vida da população carente, no que diz respeito à cura de doenças e alívio da dor. Sendo assim, o interesse em plantas com propriedades terapêuticas tem crescido bastante, devido às perspectivas de isolar substâncias que apresentem eficácia significativa e menor índice de desvantagens quando levado em conta o custo-benefício (MELO; SANTOS et al., 2006).

Da mesma forma que muitas espécies de plantas medicinais são utilizadas na medicina popular para o tratamento de doenças, a maioria delas não foi suficientemente estudadas, e a presença de substâncias citotóxicas e/ou mutagênicas em sua composição ou decorrentes de seu metabolismo podem causar danos à saúde da população. Diante do exposto, os testes de

citotoxicidade podem fornecer dados mais consistentes e confiáveis sobre os reais riscos que determinadas plantas podem causar a saúde geral do indivíduo.

Com base nestas informações, o presente estudo teve como objetivo investigar a atividade citotóxica do extrato bruto de folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeel (jambolão) em células eucarióticas humanas, através de um estudo laboratorial experimental *in vitro*.

**Metodologia:** Foi realizado um estudo laboratorial experimental *in vitro*. O teste de citotoxicidade foi realizado no Laboratório de Análises Clínicas (LAC) da Universidade Estadual da Paraíba. A produção dos extratos foi realizado no Laboratório de Desenvolvimento de Medicamentos (LABDEM) da Universidade Estadual da Paraíba/UEPB, Campina Grande/PB.

Para a obtenção da espécie vegetal, folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeel, foram coletadas no mês agosto de 2015 na região do semiárido paraibano, Chácara Flor do Campo, zona rural do município de Campina Grande, estado da Paraíba, nordeste do Brasil, meso região da Borborema e micro região do Carriri Oriental. O exemplar *Syzygium cumini* (L.) Skeel foi depositado na Coleção do Herbário Professor Lauro Pires Xavier do

Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba, e identificado com o número de Voucher JPB 58.543, João Pessoa, Paraíba.

O material vegetal foi acondicionado em sacolas de papel e no dia seguinte processado. Foi realizada limpeza deste material, eliminando os espinhos e partes das folhas impregnadas por líquens ou matéria contaminante que poderiam interferir no padrão de qualidade da planta estudada.

As folhas foram submetidas à lavagem, e em seguida secagem em estufa de ar circulante (FANEM – Modelo 330/ 5) a 40°C, até a estabilização final do peso. Posteriormente foram moídas em moinho de facas (SOLAB – Modelo SL 30), com diâmetro da partícula de 10 mesh, cuja finalidade foi de aumentar a superfície de contato e facilitar a extração dos fitoconstituintes das partes da planta, quando submetidas à solução extratora.

Foi produzido extrato hidroalcoólico das folhas de *Syzygium cumini* na proporção 200g planta moída para 1 litro de solução hidroalcoólica, na concentração de 70%. O método de extração utilizado para obtenção dos extratos foi a maceração.

Os eritrócitos humanos (A, B, O) foram oriundos de sangue que não pode mais ser utilizado para transfusão (sangue a ser

descartado) do Laboratório de Análises Clínicas/UEPB.

### **Avaliação do potencial hemolítico em eritrócitos humanos**

Uma amostra de sangue humano foi misturado com NaCl 0,9% na proporção de 1:1 e centrifugada a 2500 rpm durante 5 minutos para obtenção dos eritrócitos. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes e o sedimento da última centrifugação foi ressuspensão em NaCl 0,9% para obter uma suspensão a 0,5% de sangue. A amostra do extrato bruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeel em diferentes concentrações (500µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL e 31,25 µg/mL), numa proporção de 1:1 (extrato e eritrócitos) foi adicionada à 2 mL da suspensão de eritrócitos para um volume final de 4 mL. Neste estudo foi utilizado como controle negativo solução salina a 0,9% (0% de hemólise) e como controle positivo uma suspensão de eritrócitos acrescida de líquido de Turk (100% de hemólise). Em seguida, as amostras foram incubadas por 1 hora à  $22 \pm 2$  °C sob agitação lenta e constante (100 rpm). Decorrido este tempo a amostra foi centrifugada a 2500rpm durante 5 minutos e a hemólise foi quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 540nm (RANGEL; MALPEZZI et al., 1997). Os experimentos foram realizados em

triplicata. Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.).

A visualização da hemólise foi classificada como: - (0% de hemólise), + (até 25% de hemólise), ++ (até 50% de hemólise), +++ (até 75% de hemólise) e ++++ (100% de hemólise). Essa leitura foi realizada, seguindo método descrito por Desoti et al. (2011), com adaptações, um espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm, (Shimadzu® UV mini – 1240) utilizando-se como branco, o extrato mais a solução salina 0,9% nas respectivas concentrações, para confirmar os resultados da leitura visual.

**Resultados:** A tabela 1 apresenta os resultados da atividade citotóxica do extrato de *S. cumini* em células eucarióticas humanas. Tabela 1. Ensaio de citotoxicidade: leitura visual da hemólise das suspensões de hemácias testadas com extrato liofilizado de *S. cumini*.

<b>Concentrações</b>	<b>Absorbância</b>	<b>Intensidade de hemólise</b>
500µg/mL	0,306	+
250 µg/mL	0,036	-
125 µg/mL	0,044	-
62,5 µg/mL	0,032	-
31,25 µg/mL	0,047	-
<b>Líquido de Turk (controle positivo)</b>	2,094	++++

Utilizou-se como referência: – (0% de hemólise), +(até 25% de hemólise) ++ (50% de hemólise), +++ (75% de hemólise) e ++++ (100% de hemólise), Schulz et al., (2005).

**Discussão:** Nesta pesquisa o extrato liofilizado de *S. cumini* L. Skeel apresentou uma citotoxicidade equivalente a 7,21% em relação ao controle positivo, na concentração de 500 µg/mL (tabela 1), mostrando-se como a única que apresentou citotoxicidade, ou seja, capaz de hemolisar 7,21% de uma suspensão a 5% de eritrócitos, sendo considerado um produto de baixa toxicidade. No entanto, nas concentrações de 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL e 31,25 µg/mL, o extrato teve 0% de hemólise.

De acordo com a classificação sugerida por Schulz et al., (2005) da percentagem de hemólise (0% de hemólise, até 25% de hemólise, 50% de hemólise, 75% de hemólise e 100% de hemólise). Nesta pesquisa observou-se que, *S. cumini* apresentou citotoxicidade baixa na maior concentração (500µg/mL) e não citotóxico nas demais concentrações (250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL e 31,25 µg/mL).

Esse teste foi realizado com o objetivo de verificar a atividade citotóxica do extrato de *S. cumini* em cinco concentrações, baseando-se em estudo anterior, onde a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato foi igual a 125 µg/mL sobre *Candida albicans*. Assim, neste estudo foram

utilizados duas concentrações supra CIM (500 µg/mL e 250 µg/mL) e duas sub CIM (62,5 µg/mL e 31,25 µg/mL). Aligiannis et al. (2001) consideram que determinado extrato de interesse microbiológico tenha atividade nas concentrações de até 1600 µg/mL; CIM's superiores a esta última, o extrato é considerado inativo. Desse modo, nesta pesquisa, a escolha dessas concentrações esteve dentro da faixa proposta por esses autores. Portanto, na concentração que o extrato apresentou atividade antifúngica, a citotoxicidade tem pouco significado clínico, sendo aceitável para o uso.

Estudo semelhante foi realizado por Rodrigues (2013) para avaliar a atividade hemolisante do óleo essencial de folhas de *S. cumini* sobre eritrócitos humanos. O resultado de citotoxicidade revelou 11,3% de hemólise na maior concentração testada (800 µg/mL). Comparando-se ao atual estudo, provavelmente na concentração da CIM (125 µg/mL) o extrato seria praticamente atóxico no estudo de Rodrigues (2013), da mesma forma que aconteceu neste estudo, representando menos de 25% de hemólise na concentração de 500 µg/mL.

Turatti (2008) verificou a citotoxicidade de *S. cumini* e observou que o índice de morte celular IC<sub>50</sub> ocorreu na concentração de 400,0 µg/mL do extrato de frutos secos de *S. cumini*. Dessa forma,

comparando-se a atual pesquisa, frutos de *S. cumini* é mais citotóxico conforme metodologia empregada por Turatti (2008) do que as folhas como foi descrito no atual ensaio (500 µg/mL), no entanto em uma concentração menor, foi capaz de provocar morte celular de 50% na população dos organismos testados, favorecendo assim o uso de folhas de *S. cumini*, com maior segurança.

**Conclusão:** Pode-se concluir que, o extrato liofilizado de folhas de *S. cumini* pode ser bem tolerado frente ao sistema biológico quando utilizado com fim antimicrobiano sobre microrganismos da cavidade bucal, visto que apresentou baixa toxicidade sobre eritrócitos na maior concentração analisada (500 µg/ml), não causando atividade hemolítica nas demais concentrações. No entanto, sugere-se a realização de mais investigações complementares para validação de outros parâmetros para validação do seu uso.

#### Referências:

- AGOSTINI-COSTA, T.S.; SILVA, D.B. **Jambolão: a cor da saúde**. 2008. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2008\\_1/Jambolao/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2008_1/Jambolao/index.htm)>. Acesso em: 28/04/2016.
- ALIGIANNIS, N. *et al.* Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 4168-4170, 2001.
- BENIGNI, R. Structure-activity relationship studies of chemical mutagenesis and carcinogenesis: mechanistic investigations and prediction approaches. **Chem. Rev.**, v. 105, n. 5, p. 1767-800, 2005.
- CAPASSO, R. *et al.* Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v. 71, n. 1 p. 558-565, 2000.
- COSTA, A.C.B.P. *et al.* Atividade antifúngica dos extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* Linn e *Syzygium cumini* Linn. sobre cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 38, n. 2, p. 111-116, mar./abr. 2009.
- DESOTI, V.C. *et al.* Triagem fitoquímica e avaliação das atividades Antimicrobiana e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do paraná. **Arquivo de Ciências da Saúde da UNIPAR**, Umuarama, v. 15, n. 1, p. 3-13, jan./abr. 2011.
- MIGLIATO, K.F. *et al.* A o farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.25, p.310-304, 2006.
- MELO, A.F.M.D. *et al.* Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Anacardium occidentale* L. sobre espécies de *Streptococcus*. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 16, p. 202-205, 2006.
- NIKI, E. *et al.* Membrane damage due to lipid oxidation. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, n. 1, p. 2015-2055, 1991.
- RANGEL, M. *et al.* Hemolytic activity em in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon**, v. 35, n. 2, p. 305-309, 1997.
- RODRIGUES, K.A.F. Determina o das atividades Anti-Leishmania, Citotóxica e de Parâmetros de Ativa o de Macrófagos dos  leos Essenciais das Folhas de *Eugenia uniflora* L. e *Syzygium cumini* (L.) Skeels. 2013. 150 f. Disserta o de Mestrado

(Ciências da Saúde) - Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Piauí, 2013.

TURATTI, K.F.M. *Syzygium cumini* (L.) skeels: avaliação da qualidade, estudo morfo-anatômico, estudo da atividade antimicrobiana, conservante, genotóxica, mutagênica, citotóxica e incorporação em formulações cosméticas para uso tópico. Araraquara. 2008. 184 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêutica, Araraquara, SP, 2008.

SCHULZ, D. et al. Citotoxicidade do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* frente a hemácias de carneiro e células vero. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 16, n. 2, 2005.

VEIGA JÚNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova**, v. 28, P. 519-528, 2005.