

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS ORGÂNICOS DE *Pityrocarpa moniliformis*

Tamiris Alves Rocha<sup>1</sup>; Danielle Feijó de Moura; Dayane de Melo Barros; Silvio Assis de Oliveira Ferreira; Maria Tereza dos Santos Correia

1- Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, tamialvesinsl@gmail.com

**Resumo:** A *Pityrocarpa moniliformis* é uma espécie endêmica da caatinga, bastante utilizada pela comunidade local para fins terapêuticos. Apesar de ser usada na medicina tradicional, os estudos que caracterizam esta espécie quanto as suas atividades biológicas são escassos, mas alguns estudos têm demonstrado propriedades biológicas como atividade antimicrobiana e antioxidante. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade hemolítica *in vitro* dos extratos orgânicos das folhas de *P. moniliformes*. As folhas de *P. moniliformes* foram coletadas no Parque Nacional do Catimbá, em Buíque, Pernambuco. Os extratos foram obtidos em aparelho soxhlet seguindo a série eluotrópica utilizando os solventes ciclohexano, acetato de etila e metanol. A atividade hemolítica foi realizada com eritrócitos humanos obtidos por punção venosa e colocados em tubos heparinizados de voluntários saudáveis, com consentimento informado por escrito do indivíduo doador espontâneo. Os extratos orgânicos de *P. moniliformis* não apresentou ação hemolítica visto que não foi observada formação de hemólise em nenhuma das concentrações dos extratos testados (125, 250 e 500 µg/mL). O extrato hexânico foi o que apresentou % de hemólise maior em relação aos extratos de acetato de etila e metanólico na concentração de 500 µg/mL. Este teste torna-se necessário para verificar a segurança e eficácia do uso da espécie vegetal. Além disso, a ausência da atividade hemolítica em eritrócitos sugere que esta planta possui um potencial biológico promissor, podendo ser útil em futuras preparações farmacológicas.

**Palavras-chave:** atividade antioxidante; caatinga; plantas medicinais.

### Introdução

As espécies vegetais produzem uma grande variedade de substâncias químicas que podem apresentar diversas atividades biológicas e constituem ainda hoje um recurso terapêutico relevante para uma parcela significativa da população mundial que, não tem acesso aos medicamentos industrializados (TÔRRES et al., 2005). No uso popular, muitas dessas espécies são utilizadas sem que haja estudos toxicológicos, que segundo o conhecimento da comunidade no qual a planta por apresentar origem natural, provavelmente não acarreta riscos à saúde, reforça ainda mais a necessidade de extrema preocupação com relação ao seu uso. Algumas dessas espécies possuem estudos químicos e/ou farmacológicos oferecendo suporte para a sua utilização, outras são empregadas baseadas apenas em conhecimento empírico ou tradicional (SIMÕES et al., 2001). Diante dessas informações faz-se necessária a implementação dos estudos toxicológicos com as plantas, garantindo a segurança no uso das mesmas.

Um dos modelos experimentais *in vitro* utilizados para analisar os efeitos tóxicos de plantas é o ensaio com eritrócitos, que tem a finalidade de investigar a ação tóxica e protetora de uma grande variedade de substâncias. O eritrócito é um tipo de célula que possui altas concentrações de ácidos graxos polinsaturados, oxigênio molecular e íons ferro no estado ligado (NIKI et al., 1991), fazendo com que sua membrana celular fique muito vulnerável a reações envolvendo radicais livres e que também fique muito susceptível a hemólise (BRANDÃO et al., 2006).

A detecção da atividade citotóxica é uma das medidas primordiais, visto que vários compostos químicos podem ter a capacidade de causar efeitos tóxicos e modificar a informação genética contida no DNA. Portanto, a obtenção de dados sobre a toxicidade desses agentes deve ser assegurada por experimentos que forneçam, com uma razoável margem de segurança, indicações sobre os riscos envolvidos na sua utilização (BENIGNI, 2005). A avaliação citotóxica através da quantificação da hemólise é um modelo simples para estudar o efeito tóxico ou protetor de uma grande variedade de substâncias ou situações que são associadas ao estresse oxidativo (LEXIS et al., 2006).

Um exemplo de espécie pouco estudada, porém, utilizada popularmente para fins medicinais é a *Pityrocarpa moniliformis*, que possui poucos relatos sobre sua caracterização físico-química, biológica, segurança e eficácia. A *Pityrocarpa moniliformis* é uma planta arbórea do Nordeste do Brasil, ocorrendo disjunta em florestas secas da região de Sucre (Venezuela). Por ser uma planta endêmica da caatinga, que apresenta várias espécies vegetais com grande potencial terapêutico e farmacológico (MELO et al., 2010; COSTA et al., 2017; MALAFAIA et al., 2017; VIEIRA et al., 2017) e ser uma espécie ainda pouco explorada, há a necessidade de estudos mais profundos acerca de suas atividades biológicas. Estudos recentes revelaram um potencial antioxidante significativo, como também atividade antimicrobiana promissora (DA SILVA et al., 2011; SILVA, 2013; TRENTIN et al., 2015).

Tendo em vista que poucos estudos foram realizados a fim de melhor o entendimento das atividades biológicas e o efeito tóxico causado pela *P. moniliformis*, este trabalho visou avaliar o ação tóxica dos extratos orgânicos desta espécie através do ensaio *in vitro* de atividade hemolítica de eritrócitos. Além disto, o estudo serviu para julgar a viabilidade de uso do teste de ação hemolítica e sua aplicação para avaliação preliminar da toxicidade de plantas.

## **Metodologia**

As folhas de *P. moniliformis* foram coletadas no Parque Nacional do Catimbáu, em Buíque, Pernambuco. O material foi levado à estufa de circulação de ar forçado (40-45°C) por um período de três a quatro dias. As amostras também foram identificadas conforme as técnicas taxonômicas habituais e depositado no Herbário IPA, do Instituto Agrônomo de Pernambuco. O material vegetal foi processado em moinho de bancada e submetidos a extração em aparelho de Soxhlet seguindo a ordem eluotrópica dos solventes: ciclohexano, acetato de etila e metanol. As amostras foram rotaevaporadas e deixadas em temperatura ambiente para secagem completa do solvente. Todos os extratos obtidos foram armazenados a -20 °C para análises adicionais. Para os ensaios de atividade hemolítica *in vitro* foram utilizados 5mL de sangue obtidos por punção venosa e colocado em tubos heparinizados de voluntários saudáveis, com consentimento informado por escrito do indivíduo doador espontâneo. Os eritrócitos humanos foram isolados por centrifugação (1500 rpm, 10 min a 4 °C) e lavados três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS; pH 7,4). Cada tubo recebeu 1,1 mL de suspensão de eritrócitos (1%) e 0,4 mL de várias concentrações dos extratos (125, 250 e 500 µg/mL). Os controles foram apenas solventes (negativo) e Triton X-100 (positivo). Após 60 min de incubação as células foram centrifugadas e a absorvência do sobrenadante foi registrada a 540 nm. A atividade hemolítica foi expressa pela fórmula seguinte: atividade hemolítica (%) =  $(A_a - A_s) \times 100 / (A_c - A_s)$ , onde:  $A_a$ =absorbância da amostra;  $A_s$ =absorbância do solvente;  $A_c$  = absorbância do controle positivo.

## Resultados e Discussão

No ensaio hemolítico, os extratos orgânicos obtidos de *P. moniliformis* não apresentou ação hemolítica visto que não foi observada formação de hemólise em nenhuma das concentrações dos extratos testados (menos de 10% na concentração mais alta testada - 500 µg/mL) (Figura 1), permanecendo límpida a solução de soro fisiológico após a centrifugação, ou seja, as hemácias permaneceram íntegras no fundo dos tubos, com a formação de um precipitado, sem que tenha havido a lise das células. O extrato hexânico foi o que apresentou % de hemólise maior em relação aos extratos de acetato de etila e metanólico na concentração de 500 µg/mL.

Um resultado similar foi encontrado no experimento realizado por Silva e Lima (2010), no qual o efeito hemolítico dos extratos do Juazeiro foi avaliado em cultura de eritrócitos de camundongos (2%), em que foi

encontrada a ausência de atividade hemolítica dos extratos brutos e subfrações das cascas e folhas em concentrações abaixo de 200 µg/mL.

As plantas medicinais apresentam em sua composição princípios ativos responsáveis pelas propriedades terapêuticas a elas atribuídas. Apesar disso, reações adversas podem aparecer em decorrência de uso indevido ou contado direto com a mesma.

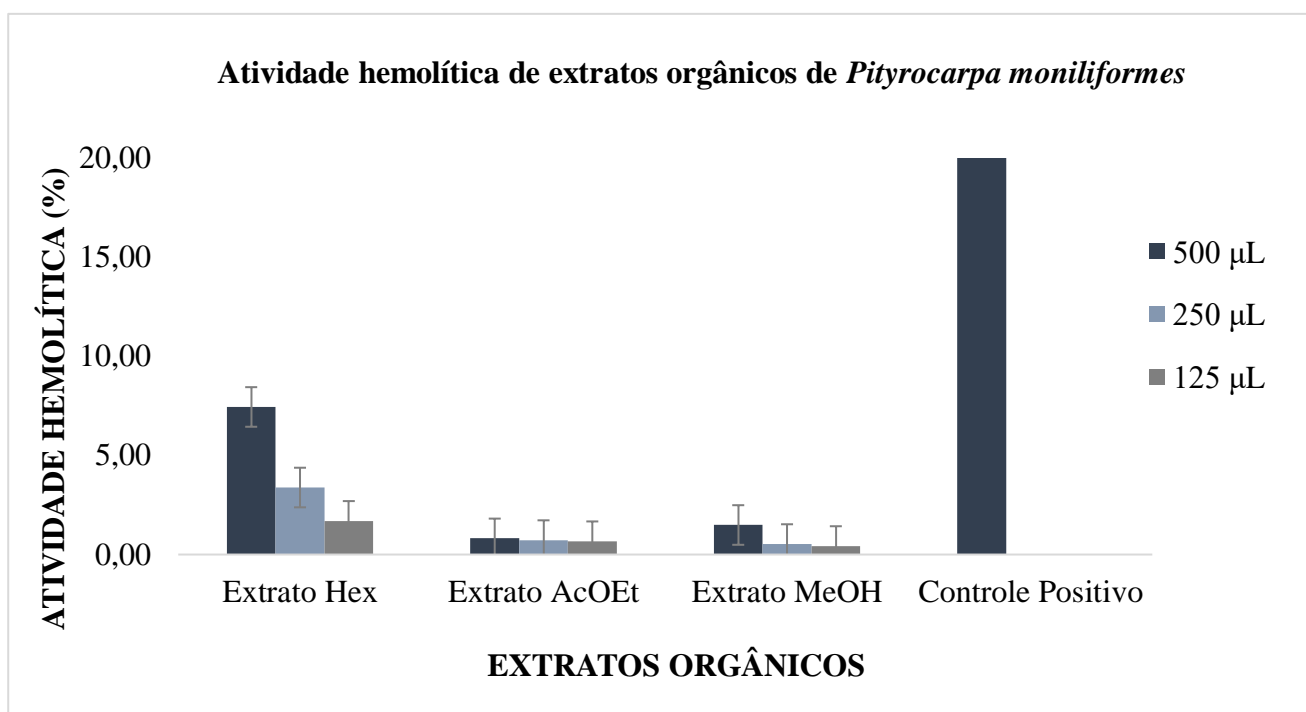


Figura 1- Atividade hemolítica dos extratos orgânicos das folhas de *P. moniliformis*.

O efeito tóxico de alguns produtos naturais já é bem conhecido. Dewick (2002) afirma que os alcalóides, mesmo em pequenas quantidades, são substâncias naturalmente, tóxicas. Da mesma forma, a habilidade dos taninos, de interagir com proteínas e outras macromoléculas lhe conferem atividades tóxicas e aglutinantes (SILVA, 1999; MONTEIRO et al., 2005).

Outro grupo de compostos naturais associado a toxicidade são as saponinas triterpênicas que possui alta capacidade de produzir hemólise. Esse efeito é resultante da sua capacidade de interagir com os componentes da membrana celular dos eritrócitos, principalmente com as moléculas de colesterol, induzindo uma deformação na membrana com consequente extravasamento do conteúdo intracelular (DEWICK, 2002; GLAUERT et al., 1967; KARABALIEV et al., 2003).

A atividade hemolítica das saponinas faz parte do sistema de proteção do vegetal contra ataques de predadores (insetos, vírus, fungos e

bactérias) (BRUNETON, 1999). A ação antimicrobiana atribuída a várias plantas, muitas vezes, está relacionada à presença de tais compostos (LACAILLE-DUBOIS; WAGNER, 1996).

Em laboratórios, o teste de hemólise *in vitro* vem sendo empregado rotineiramente em estudos de toxicidade de plantas medicinais e de interesse pecuário mostrando-se positivo, sobretudo, a espécies que apresentam saponinas em sua constituição (PEQUENO; SOTO-BLANCO, 2006).

A realização deste teste torna-se necessário, pois a hemólise é caracterizada pela ruptura do eritrócito com liberação de hemoglobina e a hemoglobina livre no plasma é prejudicial à saúde causando sérios danos em órgãos vitais tais como fígado, rins e coração, sendo necessário dessa maneira a observação da referida atividade (CARVALHO et al., 2007). Sendo assim, estes resultados se mostraram bastante significativos para a utilização desta planta que revelaram um potencial antioxidante significativo, como também atividade antimicrobiana promissora (DA SILVA et al., 2011; DA SILVA, 2013; TRENTIN et al., 2015)

Embora estudos fitoquímicos demonstrem a presença de alguns compostos tóxicos como saponinas e taninos em extratos de *P. moniliformis* (DA SILVA, 2013), o ensaio de toxicidade *in vitro* desta planta não evidenciou a atividade hemolítica dos seus extratos. Visto que, em nenhuma das concentrações testadas, 500 a 125 µg/ml, os extratos de *P. moniliformis* não causaram danos à membrana do eritrócito, isto é bastante relevante, visto que os eritrócitos têm um papel importante no transporte de gases (O<sub>2</sub> E CO<sub>2</sub>) e também no controle da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) no organismo (IGNARO, et al., 1999). Entretanto tal resultado, não exclui a existência de uma ação tóxica, uma vez que maiores concentrações dos extratos ainda não foram testadas e poucos estudos com a espécie são encontrados na literatura.

## **Conclusões**

Os extratos orgânicos de *Pityrocarpa moniliformis* não apresentaram atividade hemolítica *in vitro* nas concentrações de 500, 250 e 125 µg/ml. Desta forma, os resultados negativos obtidos nesse trabalho se tornam interessantes, pois confirmam que esta planta apresenta um potencial biológico promissor, podendo ser útil em futuras preparações farmacológicas. No entanto, testes adicionais são necessários para avaliar a atividade hemolítica com concentrações mais elevadas dos

extratos orgânicos.

### **Agradecimentos**

Os autores expressam agradecimento à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco- FACEPE pelo auxílio financeiro para a execução deste trabalho.

### **Referências**

BRANDÃO, R.; LARA, F.S.; PAGLIOSA, L.B.; SOARES, F.A.; ROCHA, J.B.T.; NOGUEIRA, C.W.; FARINA, M. Hemolytic effects of sodium selenite and mercuric chloride in human blood. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 28, p. 397-407, 2006.

BRUNETON, J. Triterpenes and Steroids. In: BRUNETON, J. **Pharmacognosy, Phytochemistry**, Medicinal Plants. Londres: Intercept Ltd, v.2, cap. X, p. 661-719, 1999.

CARVALHO et al. Efeito da bomba de infusão de soluções sobre os graus de hemólise em concentrados de hemácias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. V.29, n. 2. 149-152, 2007.

COSTA, M. D. C. M. F. D.; SILVA, A. G. D.; SILVA, A. P. S. D.; LIMA, V. L. M.; BEZERRA-SILVA, P. C.; ROCHA, S. K. L. D.; NAVARRO, D. M. D. A. F.; CORREIA, M. T. D. S.; NAPOLEÃO, T. H.; SILVA, M. V. D.; PAIVA, P. M. G. Essential Oils from Leaves of Medicinal Plants of Brazilian Flora: Chemical Composition and Activity against Candida Species. **Medicines (Basel)**. 4, 1-27, 2017.

DA SILVA, L.C.N.; SILVA-JÚNIOR, C.A.; SOUZA, R.M.; MACEDO, A.J.; SILVA, M.V.; CORREIA, M.T.S. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. **Food and Chemical Toxicology**, 49, 2222–2228, 2011.

DA SILVA, M. F. S. Estudo Químico e Avaliação da Atividade Antibacteriana de *Pityrocarpa moniliformis* (BENTH) LUCKON & R. W. JOBSON (Fabaceae), Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em

Recursos Naturais do Semiárido da Universidade Federal do Vale do São Francisco,  
**Mestrado em Recursos Naturais Do Semiárido**, Petrolina-Pe. 147p. 2013.

DEWICK, P.M. Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach. **John Wiley & Sons LTD**, 2° ed., p.291-300, 2002.

GLAUERT, A.M.; DINGLE, J.T.; LUCY, J.A. Action of saponin on biological cell membranes. **Nature**, v.196, p.952-955, 1962.

IGNARO, L. J.; CIRINO, G. CASINI, A.; NAPOLI, C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: in overview. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 34, p.879-886, 1999.

KARABALIEV, M.; KOCHEV, V. Interaction of solid supported thin lipid films with saponin. **Sensors and Actuators B**, v.88, p.101-105, 2003.

LACAILLE-DUBOIS, M.A.; WAGNER. H. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. **Phytomedicine**, v.2, p. 363-386, 1996.

LEXIS, L.A.; FASSETT, R.G.; COOMBES, J.S.  $\alpha$ -Tocopherol and  $\alpha$ -lipoic acid enhance the erythrocyte antioxidant defence in cyclosporine A treated rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 98, p. 68-73, 2006.

MALAFAIA, C. B., JARDELINO, A. C. S., SILVA, A. G., DE SOUZA, E. B., MACEDO, A. J., CORREIA, M. T. D. S, SILVA, M. V. Effects of Caatinga Plant Extracts in Planktonic Growth and Biofilm Formation in *Ralstonia solanacearum*. **Microb Ecol.**, 2017.

MELO, A. F. de; FRANÇA, D. S. de; SILVA, R. F. da; OLIVEIRA, E. do N.; ARRUDA, L. V. de; FREITAS, R.; ALVES, C. A. B. Caracterização e diversidade fitossociológica da Serra da Jurema, Guarabira-PB. **XVI Encontro Nacional dos Geógrafos: AGB**, Porto Alegre, 2010.

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; NETO, E.M.F. L.; ARAÚJO, E.L.; ALBUQUERQUE M.M. & AMORIM E.L.C. The effects of seasonal climate changes in the Caatinga on tannin levels in *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. and *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, n.3, p.338-344, 2006.

NIKI, E.; YAMAMOTO, Y.; KOMURO, E.; SATO, K. Membrane damage due to lipid oxidation. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, p. S201-S205, 1991.

PEQUENO, N. F. & SOTO-BLANCO, B. Toxicidade in vitro de plantas tóxicas: avaliação do teste de ação hemolítica. **Acta Scientia e Veterinariae**, v.34, n.1, p.45-48, 2006.

SILVA, T. S. S. Estudo de tratabilidade físico-química com uso de taninos vegetais em água de abastecimento e de esgoto. **Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Saúde Pública**, Fundação Oswaldo Cruz, p.10-17, 1999.

SIMÕES, C.M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L. APETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora Universidade/ UFRGS/ Ed. Da UFSC, 2001.

TÔRRES, A.R. et al. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.4, p.373-380, 2005.

TRENTIN, D.S., Silva, D.B., Frasson, A.P., Rzhepishevskaya, O., Da Silva M.V., Pulcini, E. De L., James, G., Soares, G.V., Tasca, T., Ramstedt, M., Giordani, R.B., Lopes, N.P., Macedo, A.J. Natural Green coating inhibits adhesion of clinically important bacteria. **Sci Rep**. 5, 1-10, 2015.

VIEIRA, P. DE B.; FEIJÓ SILVA, N.L.; SILVA, D. B.; LOPES, N. P.; DA SILVA, A. G.; DA SILVA, M. V.; BASTIDA, J.; MACEDO, A. J.; TASCA, T. The Caatinga endemic *Manilkara rufula* possesses remarkable activity against *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. **Exp Parasitol.**, 173, 18-28, 2017.