

Estudo da atividade hemolítica *in vitro* de *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae)

Study of the *in vitro* hemolytic activity of *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae)

Jéssica de Andrade Gomes Silva¹ , Gibbely Cavalcante da Silva² , Tainá Maria Santos da Silva³ , Maria Irene de Andrade Gomes Silva⁴ , Izabela Rangel Lima⁵ , José Adalberto da Silva Filho⁶ , Sônia Pereira Leite⁷ , Teresinha Gonçalves da Silva⁸ 

Durante muitos anos o uso das ervas medicinais foi baseado nos conhecimentos intuitivos do homem. Existe uma busca crescente por métodos *in vitro* comprometidos com a análise da capacidade tóxica de produtos utilizados na medicina popular. A espécie *Croton heliotropiifolius* Kunth vem sendo utilizada pela população no alívio da dor de estômago. Diante do seu potencial etnofarmacológico, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito tóxico *in vitro* da espécie, através da atividade hemolítica e pesquisa de saponinas. O ensaio qualitativo de hemólise foi realizado submetendo amostras de sangue de carneiro comercial ao extrato de *C. heliotropiifolius*, nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 mg/mL, seguido de centrifugação, a fim de avaliar visualmente a ocorrência de hemólise. Posteriormente, foi empregado o teste de identificação de saponinas por agitação mecânica do extrato diluído, sendo a formação de espuma permanente considerada como o identificação da presença deste composto. O extrato em estudo não apresentou ação hemolítica, nas condições testadas, bem como demonstrou ausência de saponinas. Portanto, sugere não ocasionar dano à membrana eritrocitária. No entanto, é válido ressaltar que este estudo fornece informações prévias, não dispensando a possibilidade de novas investigações.

Palavras-chave: Velame. Citotoxicidade. Hemácias. Metabólitos secundários. Saponinas.

For many years the use of medicinal herbs was based on humans' intuitive knowledge. There is a growing search for *in vitro* methods committed to the analysis of the toxic capacity of products used in popular medicine. The species *Croton heliotropiifolius* Kunth has been used by the population to relieve stomach pain. In view of its ethnopharmacological potential, the present study aimed to evaluate the toxic effect *in vitro* of the species, through hemolytic activity and saponin research. The qualitative hemolysis assay was performed by subjecting commercial sheep blood samples to the extract of *C. heliotropiifolius*, in concentrations of 100, 50, 25 and 12.5 mg/mL, followed by centrifugation, in order to visually assess the occurrence of hemolysis. Subsequently, the saponin identification test by mechanical stirring of the diluted extract was used, with the formation of permanent foam being considered as identification of the presence of this compound. The studied extract did not present hemolytic action, under the conditions tested, as well as showing absence of saponins. Therefore, it suggests not causing damage to the erythrocyte membrane. However, it is valid noting that this study provides prior information, not dispensing with the possibility of further investigations.

Keywords: Velame. Cytotoxicity. Red cells. Secondary metabolites. Saponin.

Autor Correspondente:

Jéssica de Andrade Gomes Silva

E-mail:

jessica.andrade.gs@gmail.com

Endereço: Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Departamento de Antibióticos. Campus Recife. Avenida Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária, Recife - PE.

Declaração de Interesses: Os autores certificam que não possuem implicação comercial ou associativa que represente conflito de interesses em relação ao manuscrito.

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Departamento de Antibióticos. Campus Recife.

² Centro Universitário Tabosa de Almeida - UNITA. Caruaru - PE

³ Instituto Aggeu Magalhães, Departamento de Entomologia. Fiocruz Pernambuco.

⁴ Universidade Federal da Paraíba. Cidade Universitária, s/n - Castelo Branco, João Pessoa - PB.

⁵ Universidade Federal de Pernambuco. Recife - PE.

⁶ Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil. Campus Recife.

⁷ Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia, Departamento de Histologia e Embriologia. Campus Recife.

⁸ Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Antibióticos. Campus Recife.

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 (1). A sabedoria popular a cerca das propriedades medicinais das plantas tem se acumulado durante séculos e esse conhecimento, por vezes, foi o único modo de tratamento usado por várias comunidades e grupos étnicos. A eficácia destes métodos é atribuída às observações populares que colaboram de forma intensa, para a disseminação das virtudes terapêuticas dos vegetais (2).

Com a investigação da toxicidade é possível determinar o potencial de novas substâncias e ver os produtos que causam 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 (3,4).

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 (5). Laboratorialmente, o ensaio de hemólise *in vitro* vem sendo utilizado rotineiramente em estudos de toxicidade de plantas medicinais e de utilidade pecuária, exibindo-se positivo, principalmente, a espécies que apresentam saponinas em sua composição (6). *Croton heliotropiifolius* Kunth constitui uma espécie endêmica do Nordeste Brasileiro, popularmente conhecida como “velame”, “velaminho” e “velame-de-cheiro” devido aos seus minúsculos pelos. Pode ser encontrada com frequência na vegetação da Caatinga, mas também ocorre em brejos, restingas e cerrados (7). 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 (7). O óleo essencial demonstrou relevante atividade larvicida contra *Aedes aegypti* (8), assim como o extrato etanólico apresentou atividade inseticida considerável contra *Sitophilus zeamais* (9). Também existe o relato na literatura de alta toxicidade da espécie *C. heliotropiifolius* frente a *Artemia Salina* (10). 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 o potencial hemolítico do extrato metanólico desta espécie, através do ensaio *in vitro* da atividade hemolítica em eritrócitos de carneiro e pesquisar o metabólito saponina no extrato, com o propósito de promover uma avaliação preliminar da toxicidade da planta.

METODOLOGIA

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 exsicata, a qual foi identificada e depositada no Herbário Dárdano de Andrade Lima, do Instituto Agrônomo de Pesquisa (IPA), sob número de catálogo 90440. 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 (11). 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 qualitativo da atividade hemolítica

O ensaio qualitativo da atividade hemolítica do extrato metanólico seco de *C. heliotropiifolius* foi feito segundo descrito por Diniz (12) com algumas adaptações.

As amostras de sangue de carneiro (Laborclin®) foram submetidas à exposição ao extrato, durante 60 minutos à temperatura ambiente nas diferentes concentrações de 100 mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml e 12,5 mg/ml diluídas em solução isotônica de cloreto de sódio (0,9%). Em seguida, o sangue foi centrifugado (2500 rpm) e o conteúdo sobrenadante foi avaliado qualitativamente pela tonalidade avermelhada (hemólise). Foi atribuído “cruzes” à intensidade de hemólise, onde uma cruz (+) indica ligeira hemólise, duas cruzes (++) hemólise significativa e três cruzes (+++) indicam hemólise intensa.

O controle negativo foi realizado com solução isotônica de cloreto de sódio (0,9%) e o controle positivo com água destilada, e seguiu os mesmos procedimentos executados com as amostras teste. O ensaio foi realizado em triplicata.

Identificação genérica saponinas

A atividade biológica mais comum referida ao metabólito secundário saponina, é a tendência de produzir hemólise. Sendo assim, a presença deste metabólito foi pesquisada.

Para a identificação de saponinas, foi empregado o teste por agitação mecânica do extrato diluído (13). A formação de espuma persistente por 15 minutos foi considerada como pesquisa de saponinas positiva (14).

RESULTADOS

Ensaio qualitativo *in vitro* da capacidade hemolítica

O extrato de *C. heliotropiifolius* não apresentou atividade hemolítica visto que não foi observada hemólise aparente em nenhuma das concentrações do extrato testadas. A solução de soro fisiológico manteve-se límpida após a centrifugação, ou seja, as hemácias permaneceram íntegras no fundo dos tubos, com a formação de um precipitado, sem que tenha ocorrido a lise das células. A Tabela 1 mostra os resultados encontrado.

Tabela 1 - Atividade hemolítica de concentrações decrescentes de extrato de *C. heliotropiifolius* Kunth.

Agente Hemolítico	Hemólise
Água destilada - Controle	+++
Positivo	
Solução fisiológica de NaCl -	
0,9 %	
100 mg/mL	-
50 mg/mL	-
25 mg/mL	-
12,5 mg/mL	-

Legenda: (-) ausência de hemólise, (+) ligeira hemólise, (++) hemólise significativa, (+++) hemólise intensa.

Pesquisa de saponinas

A pesquisa de saponinas no extrato *C. heliotropiifolius* foi negativa, não havendo a formação de espuma persistente por 15 minutos.

DISCUSSÃO

A ação hemolítica dos diferentes compostos tóxicos é atribuída a vários mecanismos inespecíficos. Como por exemplo, os compostos surfactantes, que produzem seu efeito hemolítico por meio da solubilização da membrana plasmática ou pela lise osmótica, que promove alterações na permeabilidade da membrana plasmática da hemácia (15). Os compostos xenobióticos reduzidos, como os compostos fenólicos, são capazes de promover hemólise por meio da oxidação da hemoglobina, formando metemoglobulina (3). Os alcaloides, mesmo em baixas concentrações, são substâncias naturalmente tóxicas (14). As saponinas são compostos também associados à toxicidade por seu potencial de produzir hemólise, através 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 (14,16,17). Nosso ensaio de toxicidade *in vitro* não evidenciou atividade hemolítica no extrato. Visto que, em nenhuma das concentrações testadas ocorreu lise a membrana dos eritrócitos. A ausência de citotoxicidade também foi referida contra as linhagens adenocarcinoma de mama humano (MCF-7), carcinoma de laringe humano (hep-2), carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano (NCI-H292) (18). Entretanto, tal resultado não exclui a existência de citotoxicidade, uma vez que maiores concentrações do extrato ainda não foram testadas e poucos trabalhos com a espécie são encontrados na literatura. Estudo com extrato de *Croton grewoides* Baill, espécie do mesmo gênero do *C. heliotropiifolius*, demonstrou que sua citotoxicidade não está relacionada ao dano da membrana, podendo essa estar relacionada a capacidade de induzir apoptose (19). A investigação de saponinas foi negativa nas folhas do material vegetal estudado, o que também é relatado em outras espécies do gênero, como no *Croton linearifolius* (9). No entanto, estudos fitoquímicos demonstram no *C. heliotropiifolius* a presença de outros compostos tóxicos, como os alcaloides (7).

CONCLUSÃO

O extrato metanólico de folhas de *Croton heliotropiifolius* não apresentou atividade hemolítica *in vitro* nas concentrações testadas, bem como não foi identificado à presença de saponinas. Desta forma, é provável que não haja dano à membrana eritrocitária. Portanto, estes resultados motivam futuras investigações com concentração maiores e diferentes metodologias.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) e ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

REFERÊNCIAS

- (1) LEITE, J. P. V. **Desenvolvimento da Fitoterapia**. In.: Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas. São Paulo: Atheneu. Capítulo 1, p. 3-20, 2008.
- (2) MACIEL, M. A. M.; PINTO, A.C.; VEIGA JUNIRO, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25: 429-438. 2002.
- (3) BLAAUBOUER, Bas J. Biokinetic and toxicodynamic modelling and its role in toxicological research and risk assessment. **Alternatives to laboratory animals: ATLA**, v. 31, n. 3, p. 277-281, 2002.
- (4) PUCHARSE, 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**, 43(2), 86-101. 1998.
- (5) HARBELL, W.; KOONTZ, S.W.; LEWIS, R.W.; LOVELL D.; ACOSTA D. Cell cytotoxicity assays. **Food and Chemical Toxicology**.35: 79-126. 1997.
- (6) 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.
- (7) RANDAU, K.P. 2001. **Estudo farmacognóstico (farmacobotânico e farmacológico) 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, 2001.
- (8) DORIA, G.A.A.; SILVA, W.J.; CARVALHO, G.A.; ALVES, P.B.; CAVALCANTI, S.C.H. A study of the larvicidal activity of two *Croton* species from northeastern Brazil against *Aedes aegypti*. **Pharmaceutical biology** 48, 615–620. 2010.

- (9) SILVA, L. B.; TORRES, E. B.; SILVA, K. F.; SOUZA, J. S. N.; LOPES, M. S.; ANDRADE, L. H.; XAVIER, Z. F. Toxicity of ethanolic extract of *Croton heliotropiifolius* in weevil populations of stored maize grains. **Journal of Entomology**, 6, 413-421.2012.
- (10) SILVA, J. A. G.; LIMA, I. R.; SANTANA, M. A. N.; SILVA, T. M. S.; SILVA, M. I. D. A. G.; LEITE, S. P. Screening Fitoquímico e Avaliação da Toxicidade de *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae) frente à *Artemia salina* Leach. **Revista Virtual de Química**, 9(3). 2017.
- (11) CECINEL, FILHO, V; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.
- (12) DINIZ, L.R.L. **Efeito das saponinas triterpênicas isoladas de raízes da *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke sobre a função renal**. 2006. 253p Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2006.
- (13) SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; MELO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª edição. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora UFSC, 2004.
- (14) DEWICK, P.M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. John Wiley & Sons, 2002.
- (15) APARICIO, R.M.; GARCÍA-CELMA M.J.; VINARDELL M.P.; MITJANS M. In vitro studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 39: 1063-1067. 2005.
- (16) GLAUERT, A.M.; DINGLE, J.T.; LUCY, J.A. Action of saponin on biological cell membranes. **Nature**, v.196, p.952-955, 1962.
- (17) KARABALIEV, M.; KOICHEV, V. Interaction of solid supported thin lipid films with saponin. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.88, p.101-105, 2003.
- (18) SILVA, J. A. G.; SILVA, G. C.; FARIAS, S, M. G.; SILVA, V. F.; SANTOS A., J.; SILVA, T. G.; LEITE, S. P. Physicochemical characteristics and cytotoxic effect of the methanolic extract of *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 11(28), 321-326. 2017.
- (19) LARANJEIRAS, L.; CARVALHO, C.; MOTA, F.; ARAÚJO, L.; AGUIAR, J.; RODRIGUES, M.; SILVA, T. Avaliação da atividade hemolítica do extrato etanólico de *Croton grewoides* Baill. **X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão–JEPEX**. 2010.

Recebido: 18 de janeiro de 2017

Aprovado: 27 de outubro de 2021



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.