

## AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E POTENCIAL TOXICOLÓGICO DO CAULE DE *Calotropis procera* (Apocynaceae)

Amanda Justino Costa<sup>1</sup>; Camila de Albuquerque Montenegro<sup>2</sup>; Micheline de Azevedo Lima<sup>3</sup>; Ivana Maria Fechine<sup>4</sup>

(1) Universidade Estadual da Paraíba, amandajustinocosta@gmail.com; (1) Universidade Federal de Campina Grande, camontenegro2502@gmail.com; (3) Universidade Federal da Paraíba, michelinealima@hotmail.com; (4) Universidade Estadual da Paraíba, ivana.fechine@gmail.com.

**Resumo:** Estudos realizados anteriormente com a planta *Calotropis procera* (Apocynaceae), conhecida popularmente como “algodão de seda” demonstraram propriedades antitussígena, anti-inflamatória no modelo de edema de pata induzido por carragenina, ação protetora da mucosa gástrica em úlceras causadas por ácido acetilsalicílico e etanol e ainda atividade antiproliferativa de células tumorais. As plantas contêm princípios ativos responsáveis pelas propriedades terapêuticas a elas atribuídas. Para estudos de citotoxicidade *in vitro*, os eritrócitos são células muito utilizadas, devido, principalmente, ao fácil acesso e grande disponibilidade, permitindo a investigação do efeito tóxico ou protetor de princípios ativos sobre a membrana celular. O objetivo deste trabalho foi realizar o estudo fitoquímico da espécie *C. procera* e avaliar o potencial citotóxico e citoprotetor do Extrato Etanólico Bruto (EEB) e da Fração Clorofórmica do caule desta através do teste de atividade hemolítica e antihemolítica, respectivamente, em eritrócitos humanos dos tipos A, B e O. Com a realização do *screening* fitoquímico foi possível identificar a presença de duas classes de metabólitos secundários: flavonoides e esteroides no EEB do caule de *C. procera*. Em relação ao estudo da avaliação da citotoxicidade, pode-se afirmar que o EEB e a fração clorofórmica do caule *C. procera*, apenas na concentração de 10 µg/mL não foi capaz de causar a lise estatisticamente significativa nos eritrócitos para os três tipos sanguíneos (ABO), nas demais concentrações foi verificada atividade hemolítica. Contudo, esta mesma concentração (10 µg/mL), não apresentou atividade antihemolítica, ou seja, não protegeu os eritrócitos ABO do estresse osmótico promovido pelo meio hipotônico (solução NaCl 0,24 %).

**Palavras-chave:** Algodão de seda; citotoxicidade; *screening* fitoquímico.

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o país com a maior biodiversidade vegetal do mundo, possuindo duas das maiores variedades do planeta, a Floresta Amazônica e a Floresta Atlântica apresentando um valioso arsenal a ser estudado. Deste modo, inúmeras plantas medicinais são utilizadas por grande parte de nossa população, na forma de fitoterápicos, nutracêuticos ou alimentos. Podendo também ser usadas na extração de matérias-primas como extratos, óleos essenciais, substâncias químicas puras, que podem servir de modelos para obtenção de análogos, no preparo de moléculas semi-sintéticas (SOEJARTO, 1996; CARVALHO, 2008).

Nesse contexto, a espécie vegetal *Calotropis procera* Ait. R. Br., conhecida popularmente como “ciúme”, “ciumeira” ou “algodão de seda”, é um arbusto selvagem pertencente à família Apocynaceae, originária da África, Índia e Pérsia, e se destaca por possuir hoje uma ampla distribuição geográfica, disseminando-se com muita facilidade por regiões áridas e semi-áridas por apresentar sementes aladas envoltas por uma plumagem facilitando seu transporte pelo vento, o que favorece sua ocorrência na região Nordeste do Brasil (JOLY, 1997; SOUTO et al., 2008).

Informações advindas da medicina popular são importantes, no intuito de nortear o estudo fitoquímico. No entanto, é válido ressaltar que nem todas as plantas medicinais de uso tradicional foram investigadas, levando a uma busca incansável do conhecimento dos seus compostos ativos, o que reforça ainda mais a necessidade destes testes, bem como a avaliação da toxicidade das diversas espécies vegetais encontradas na natureza.

Deste modo, faz-se necessário realizar estudos toxicológicos para determinação de parâmetros de segurança que não são observados durante o uso popular dos derivados de plantas medicinais, ajudando a decidir se uma nova substância deve ser adotada ou não para uso clínico (SARAIVA et al., 2012).

*C. procera* foi escolhida para este estudo devido à facilidade de coleta, bem como pela escassez na literatura de estudos fitoquímicos dessa espécie. De modo que o objetivo deste trabalho foi realizar o estudo fitoquímico da espécie *C. procera* (Apocynaceae) e avaliar o potencial citotóxico e citoprotetor do extrato etanólico bruto e da fração clorofórmica do caule desta através do teste de atividade hemolítica e anti-hemolítica, respectivamente, em eritrócitos humanos dos tipos A, B e O.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 Coleta e preparo do material vegetal

O material botânico (caule) de *C. procera*, foi coletada na zona litornea do município de Cabedelo - PB (S 7°02'29.9"/ W 34°50'23.6"). Uma exsicata encontra-se depositada no Herbário Lauro Pires Xavier da Universidade Federal da Paraíba sob a inscrição (JPB 58031).

### 2.2 Preparação do extrato etanólico bruto do caule de *C. procera*

Pesou-se aproximadamente 500g do pó seco obtido da moagem do caule, o qual foi submetido ao processo de maceração exaustiva em etanol a 70%. Em seguida realizou-se a filtração e evaporação do solvente, obtendo-se um peso seco de 146,17g do extrato etanólico bruto (EEB).

### 2.3 *Screening* fitoquímico qualitativo do EEB do caule de *C. Procera*

Foi realizado um *Screening* fitoquímico com reagentes específicos para detecção dos metabolitos secundários presentes no material vegetal em estudo.

### 2.5 Avaliação da citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em triplicata e para comparação dos grupos experimentais utilizou-se o teste *t*. Todos os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m), analisados com o software GraphPad Prism 5.0, San Diego, CA, EUA, considerando-se o nível de significância mínimo  $p < 0,05$ .

#### 2.5.1 Atividade hemolítica

Foram utilizados eritrócitos humanos dos tipos A, B e O, coletados de três voluntários adultos e aparentemente saudáveis no Laboratório de Análises Clínicas – LAC da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). As drogas-testes utilizadas neste experimento foram o extrato etanólico bruto (EEB) nas concentrações de 10, 100 e 1000  $\mu\text{g/mL}$  para cada extrato.

Inicialmente foi realizada a lavagem dos eritrócitos, tendo o sangue (A, B, O) sido diluído em solução salina (NaCl 0,9%), centrifugados durante

5 minutos a 2500 rpm e ressuspensos por 3 vezes. Após isso, preparou-se uma solução de eritrócitos a 0,5% (100 mL NaCl 0,9% + 50 µL do lavado de eritrócitos), que foi distribuída (2 mL) em tubos de Falcon e adicionadas as drogas-teste nas seguintes concentrações: 10, 100 e 1000 µg/mL. Como controle negativo foi utilizado uma solução de eritrócitos a 0,5 % (0 % hemólise) e o controle positivo, o Triton X-100.

### 2.5.2 Atividade antihemolítica ou fragilidade osmótica eritrocitária

Para o teste de fragilidade osmótica, após a leitura no espectrofotômetro, retirou-se todo o sobrenadante dos tubos de Falcon, ressuspendeu-se o precipitado em 2 mL de uma solução hipotônica de NaCl a 0,24%, as quais foram incubadas a  $25 \pm 2$  °C por 1h e decorrido este tempo foi realizada a centrifugação por 5 minutos a 2500 rpm. Do sobrenadante foi retirada uma alíquota e feita a leitura em espectrofotômetro (540 nm).

A hemólise total foi obtida com a solução de sangue a 0,5% em meio hipotônico (NaCl 0,24%), (controle positivo). O controle negativo correspondeu aos valores obtidos no experimento de atividade hemolítica para a solução de sangue em NaCl 0,9%. Este experimento foi realizado em triplicata, igualmente para os três tipos sanguíneos e os resultados foram expressos como percentual da média aritmética em comparação ao controle positivo.

## 3 DISCUSSÃO

### 3.1 *Screening* fitoquímico qualitativo do EEB do caule de *C. Procera*

Os resultados obtidos a partir do *screening* fitoquímico do EEB do caule da *C. procera*, podem ser observados a seguir (Tabela 1).

**Tabela 1.** Resultados do *screening* fitoquímico do EEB do caule de *C.procera*.

Metabólito Secundário	Teste de Identificação
Alcaloides	Bouchardat (-) Mayer (-) Drangendorff (-) Bertrand (-)
Flavonoides	++
Esteroides	Reação de Liberman-Bouchard (+)

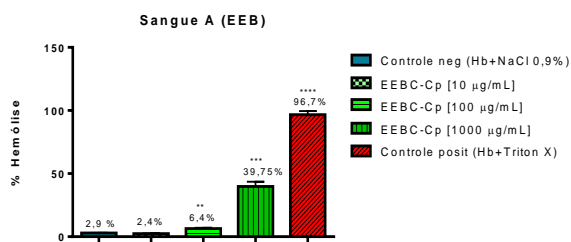
Taninos	FCl <sub>3</sub> (-) Gelatina 0,5% (-)
---------	---

De acordo com a tabela 1, os testes de identificação utilizando o EEB de *C.procera*, apresentaram-se positivos para os seguintes metabólitos secundários, flavonoides e esteroides. Em estudo semelhante, Melo et al, (2001), também constataram a presença destas substâncias nas folhas e galhos da *C. procera*. O que nos deu subsídios para continuar a investigação fitoquímica da planta.

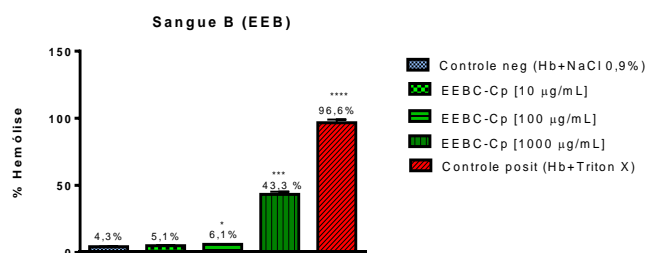
### 3.2 Atividade hemolítica

A partir da realização do protocolo de hemólise e comparando-se as três concentrações utilizadas no teste de atividade hemolítica com o grupo controle negativo (Hb + NaCl 0,9%), pode-se afirmar que apenas a concentração de 10 µg/mL do EEB e da fração clorofórmica do caule de *C. procera* reduziu a hemólise de forma estatisticamente significativa sobre os 3 tipos sanguíneos. Em contrapartida as demais concentrações (100 e 1000 µg/mL) induziram a hemólise das células, como pode ser visto nas figuras de 2 a 7.

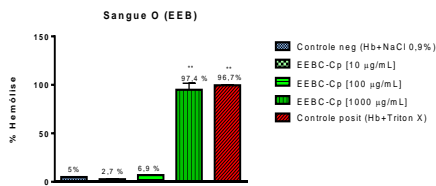
**Figura 2.** Porcentagem de hemólise em eritrócitos do tipo sanguíneo A na presença do extrato etanólico bruto (10, 100 e 1000 µg/mL) do caule de *C. procera*



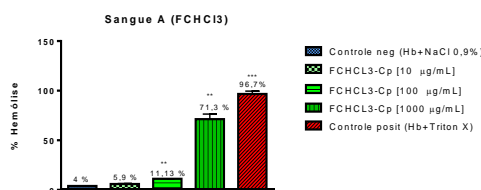
**Figura 3.** Porcentagem de hemólise em eritrócitos do tipo sanguíneo B na presença do extrato etanólico bruto (10, 100 e 1000 µg/mL) do caule de *C. procera*



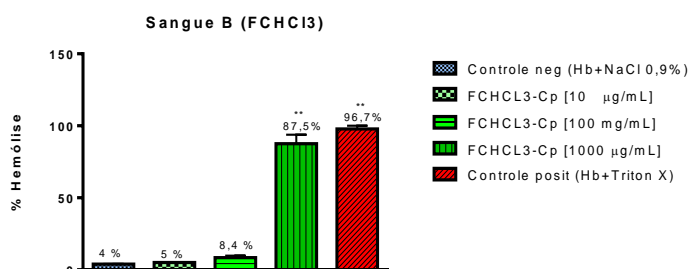
**Figura 4.** Porcentagem de hemólise em eritrócitos do tipo sanguíneo O na presença do extrato etanólico bruto (10, 100 e 1000 µg/mL) do caule de *C. procera*



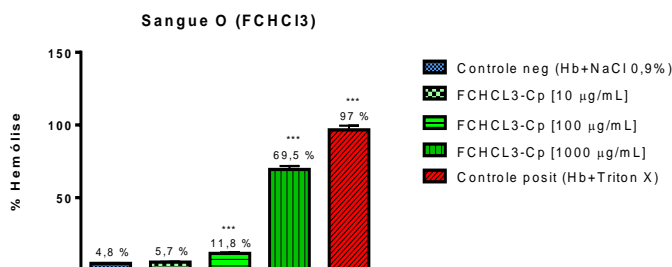
**Figura 5.** Porcentagem de hemólise em eritrócitos do tipo sanguíneo A na presença da fração clorofórmica (10, 100 e 1000 µg/mL) do caule de *C. procera*



**Figura 6.** Porcentagem de hemólise em eritrócitos do tipo sanguíneo B na presença da fração clorofórmica (10, 100 e 1000 µg/mL) do caule de *C. procera*



**Figura 7.** Porcentagem de hemólise em eritrócitos do tipo sanguíneo O na presença da fração clorofórmica (10, 100 e 1000 µg/mL) do caule de *C. procera*



A partir do resultado encontrado para o teste de atividade hemolítica, percebe-se que em baixa concentração, o EEB e a fração clorofórmica do caule de *C. procera* não possuem a capacidade de causar danos na membrana eritrocitária

dos três tipos sanguíneos do sistema ABO. Em estudo realizado com as folhas da *C. procera*, Zohra e Fawzia (2014), constatou baixa toxicidade ao testar o extrato metanólico nas concentrações entre 50 e 500 µg/mL, de igual modo, neste estudo as concentrações de 10 e 100 µg/mL mostraram baixa toxicidade.

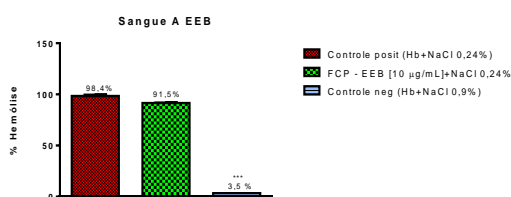
Cabe lembrar que a composição química de um vegetal, pode variar significativamente, de acordo com a época de coleta, condições climáticas e de solo (Simões & Spitzer, 2003).

### 3.3 Atividade antihemolítica

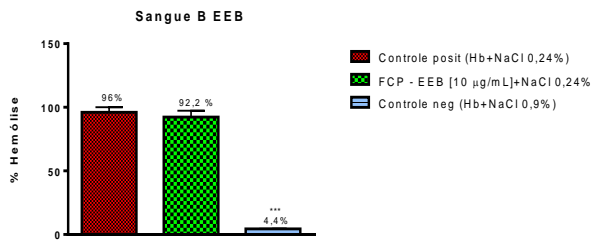
Uma vez que a concentração de 10 µg/mL não foi capaz de induzir a lise dos eritrócitos, partiu-se então para uma segunda etapa, que foi verificar se em um meio hipotônico (solução de NaCl 0,24%) os extratos nesta concentração seriam capazes de proteger o eritrócito da hemólise induzida pela entrada de água na célula, através do ensaio de Fragilidade Osmótica Eritrocitária (FOE). O teste foi realizado, portanto, com o intuito de avaliar a atividade antihemolítica dos extratos selecionados.

O EEB e a fração clorofórmica do caule de *C. procera* na concentração de 10µg/mL não apresentaram atividade anti-hemolítica quando comparado ao controle positivo, ou seja, não houve proteção dos eritrócitos nos três tipos sanguíneos (ABO) na presença da solução hipotônica (0,24% de NaCl), como pode-se observar nas figuras de 8 a 13.

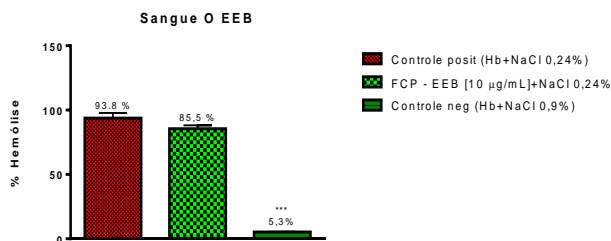
**Figura 8.** Atividade antihemolítica do extrato etanólico bruto (10 µg/mL) do caule de *C. procera* frente a eritrócitos do tipo sanguíneo A



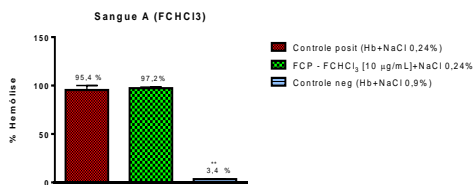
**Figura 9.** Atividade antihemolítica do extrato etanólico bruto (10 µg/mL) do caule de *C. procera* frente a eritrócitos do tipo sanguíneo B



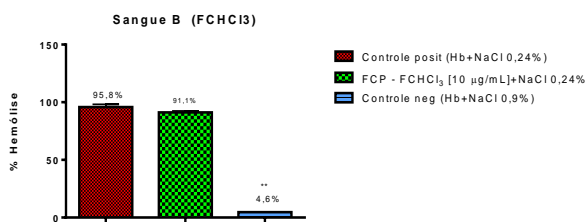
**Figura 10.** Atividade antihemolítica do extrato etanólico bruto (10 µg/mL) do caule de *C. procera* frente a eritrócitos do tipo sanguíneo O



**Figura 11.** Atividade antihemolítica da fração clorofórmica (10 µg/mL) do caule de *C. procera* frente a eritrócitos do tipo sanguíneo A

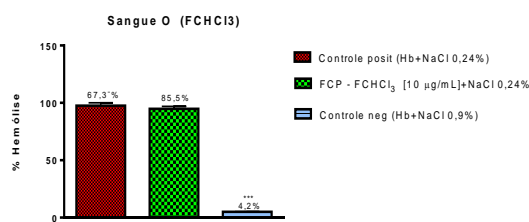


**Figura 12.** Atividade antihemolítica da fração clorofórmica (10 µg/mL) do caule de *C. procera* frente a eritrócitos do tipo sanguíneo B





**Figura 13.** Atividade antihemolítica da fração clorofórmica (10 µg/mL) do caule de *C. procera* frente a eritrócitos do tipo sanguíneo O



#### 4 CONCLUSÃO

Através da realização da prospecção fitoquímica do EEB do caule de *C. procera* foi possível identificar a presença de duas classes de metabólito secundários: flavonoides e esteroides, constituintes que possuem uma ampla variedade de atividades biológicas. O EEB, bem como a fração clorofórmica do caule de *C. procera* não induziu hemólise quando avaliado na concentração a 10 µg/mL, porém nas demais concentrações foi verificada atividade hemolítica frente aos eritrócitos dos tipos sanguíneos ABO. No teste de atividade antihemolítica nenhuma amostra foi capaz de proteger o eritrócito, tanto o EEB como a fração clorofórmica do caule de *C. procera* na concentração de 10 µg/mL permitiram a ocorrência de hemólise, mostrando este modo, que não há atividade antihemolítica. De acordo com este estudo, foi possível concluir que o EEB e a fração clorofórmica do caule de *C. procera* apresentam toxicidade moderada.

#### REFERÊNCIAS

- JOLY, A. B. **Botânica – Introdução à taxonomia vegetal**. 5 ed. São Paulo, Ed Nacional, 1997.
- MELO, M.M. et al. Estudo fitoquímico da *Calotropis procera* Ait. , sua utilização na alimentação de caprinos: efeitos clínicos e bioquímicos séricos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. 2(1): 15-20, 2001.
- SARAIVA S.R.G.L. et al. Antioxidant activity and acute toxicity of *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). **African. Journal. Biotechnology**, 11(75): 13998-14006, 2012.
- SATO, Y. et al. Mechanism of free radical-induced hemolysis of human erythrocytes: hemolysis by water-solution radical initiator. **Biochemistry**, v. 34, p. 8940-8949, 1995.

SIMÕES, C. M. O.; PETROVICK, VP.R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 2ed. rev. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC,2003.

SOEJARTO, D.D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. **Journal Ethnopharmacology**, v. 51, p. 1-15, 1996.

SOUTO, P.C. et al. Biometria de Frutos e Numero de Sementes de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br no Semi-Arido da Paraiba. **Revista Verde**, 3: 108 113, 2008.