

Camilla Torres Pereira

Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)
Camilla.torres.cb@gmail.com

Maria Estella Torres Pereira

Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)
maria.estella.t@gmail.com

Karla de Lima Alves Simão

Universidade Federal de Campina Grande-
Campus- Patos/PB
karlla_cb@hotmail.com

Bruna de Lima Alves Simão

Universidade Federal de Campina Grande-
Campus- Patos/PB
brunna_2012pb@hotmail.com

Maria Alice Araújo de Medeiros

Universidade Federal de Campina Grande-
Campus- Patos/PB
alicemedeiros123@hotmail.com

Millena de Souza Alves

Universidade Federal de Campina Grande-
Campus- Patos/PB
millenaasouzaa@gmail.com

Yanna Carolina Ferreira Teles

Universidade Federal da Paraíba (UFPB)
Campus João Pessoa/PB
yannateles@gmail.com

Aleson Pereira de Sousa

Universidade Federal da Paraíba (UFPB)
Campus João Pessoa/PB
aleson_155@hotmail.com

**Heloisa Mara Batista Fernandes de
Oliveira**

Farmacêutica Bioquímica HUAB-EBSERH-UFRN
heloisambf@gmail.com

Abrahão Alves de Oliveira Filho

Universidade Federal de Campina Grande-
Campus Patos/PB
abrahão.farm@gmail.com

CITOTOXICIDADE DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DE *PSIDIUM* *GUINEENSE* SWARTZ EM CÉLULAS SANGUÍNEAS HUMANAS: UM ESTUDO *IN VITRO*

RESUMO

A busca pela resposta de diversos males e doenças que acometem o ser humano, torna o uso das plantas medicinais cada vez mais difundidos e aplicados amplamente por grande parte da população mundial no tratamento de várias doenças, onde na maioria das vezes fundamenta-se em pressupostos de que os produtos naturais não causam danos à saúde. Diante disso, atualmente, há um elevado grau de preocupação com relação ao uso seguro dos extratos obtidos de plantas medicinais. Myrtaceae é uma família de plantas que no Brasil é constituída por 23 gêneros e 990 espécies, nesta está incluso o gênero *Psidium*, distribuído amplamente em todo o Brasil, neste gênero está presente a espécie *Psidium guineense*, conhecida popularmente como araçá, que na Mata Atlântica suas folhas são utilizadas como cicatrizante local, antiinflamatório e anti-séptico bucal. Este estudo teve por objetivo avaliar a citotoxicidade do extrato acetato de *P. guineense* em células sanguíneas humanas para que possa se determinar a toxicidade teórica desta planta. Para a realização dos estudos de atividade citotóxica foram preparadas suspensões sanguíneas com sangue humano A, B e O, que foram misturadas a diferentes concentrações do extrato acetato de etila por 60 minutos e a hemólise quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm. Conforme os resultados encontrados o extrato acetato de etila de *P. guineense* mostrou-se com baixa toxicidade frente aos eritrócitos humanos testados *in vitro*, sendo assim uma opção para indústria de fitoterápicos.

Palavras-chave: Plantas medicinais; *Psidium guineense*; Citotoxicidade; Eritrócitos.

CYTOTOXICITY OF *PSIDIUM* *GUINEENSE* SWARTZ ETHYL ACETATE EXTRACT IN HUMAN BLOOD CELLS: AN *IN VITRO* STUDY

ABSTRACT

The search for the response of various diseases and illnesses that affect humans, makes the use of medicinal plants increasingly widespread and widely applied by much of the world population in the treatment of various diseases, where most of the time is based on assumptions. that natural products do not cause harm to health. Given this, there is currently a high degree of concern regarding the safe use of extracts obtained from medicinal plants. Myrtaceae is a family of plants that in Brazil is made up of 23 genera and 990 species, including the genus *Psidium*, widely distributed throughout Brazil. Its leaves are used as local healing, anti-inflammatory and mouthwash. This study aimed to evaluate the cytotoxicity of *Psidium guineense* acetate extract in human

blood cells so that the theoretical toxicity of this plant can be determined. For the cytotoxic activity studies, blood suspensions were prepared with human blood A, B and O, which were mixed at different concentrations of ethyl acetate extract for 60 minutes and hemolysis quantified by wavelength spectrophotometry of 540 nm. According to the results found, the ethyl acetate extract of *P. guineense* showed low toxicity to human erythrocytes tested in vitro, thus being an option for the herbal industry.

Keywords: Medicinal plants; *Psidium guineense*; Cytotoxicity; Erythrocytes.

1. INTRODUÇÃO

A busca pela resposta de diversos males e doenças que acometem o ser humano, torna a utilização das plantas medicinais cada vez mais difundidos e aplicados. O conceito de natural, constituiu que este tipo de terapêutica passasse a ser usada amplamente por grande parte da população mundial no tratamento de várias doenças humanas, fundamentando-se em pressupostos de que os produtos naturais não causariam danos, e portanto, não representariam quaisquer perigos a saúde (ARCANJO et al., 2013; ROSSATO, 2013).

Diante disso, atualmente, há um elevado grau de preocupação com relação ao uso seguro dos extratos de plantas, assim como em assegurar a qualidade e a segurança de fitomedicamentos. A Agência Nacional de vigilância sanitária do Brasil (ANVISA) publicou em 24 de fevereiro de 2000, a resolução n.º 17 determina que estes precisam ser submetidos a análises pré-clínica e ensaios clínicos toxicológicos e farmacológicos (BRASIL, 2000).

Um modelo experimental bastante utilizado para avaliar a toxicidade *in vitro* é o ensaio de citotoxicidade em eritrócitos. Esse teste é usado como método de triagem para toxicidade de novas drogas, com objetivo de estimar o dano que elas podem produzir *in vivo* em eritrócitos do

organismo (SCHREIER et al., 1997; APARICIO et al., 2005).

A membrana eritrocitária é uma estrutura delicada que pode ser significativamente alterada por interações com medicamentos (AKI; YAMAMOTO, 1991). Diversos estudos indicam que certos compostos isolados de plantas, tais como polifenóis e saponinas, podem causar alterações nas membranas das células vermelhas do sangue e, posteriormente, produzir hemólise (APARICIO et al., 2005; BUKOWSKA; KOWALSKA, 2004).

Myrtaceae é uma família de plantas que possui aproximadamente 132 gêneros e 5760 espécies (GOVAERTS et al., 2008). No Brasil, é constituída por 23 gêneros e 990 espécies (SOBRAL et al. 2015). Nesta está incluso o gênero *Psidium*, distribuído amplamente em todo o Brasil, possui representantes em todos os biomas brasileiros e cerca de 43% das espécies são do país (SOUZA, 2011; FRANZON et al., 2009).

Na Mata Atlântica, diversas comunidades tradicionais utilizam a decoção das folhas como cicatrizante local e antiinflamatório, ao mesmo tempo que a infusão das folhas é usada na forma de gargarejo como anti-séptico bucal, bem como antiinflamatório externo (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). Esta é a espécie *Psidium guineense*, que

apresenta como sinônimo botânico *Psidium araca* Raddi (SOBRAL et al., 2015) e é conhecida popularmente como araçá. Refere-se a um arbusto com estatura de 2,0 a 2,5 m e caule com casca lisa, seus frutos são semelhantes aos da goiaba, mas são menores e mais ácidos (NEIRA GONZÁLEZ et al., 2005).

Com base nas informações, esta pesquisa objetivou avaliar *in vitro* a atividade citotóxica do extrato acetato de etila de *Psidium guineense* em células sanguíneas humanas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Ensaio *in vitro*

Substância teste

Para o ensaio, foi utilizado o extrato Acetato de etila das folhas de *Psidium Guineense*, gentilmente atribuídos pela equipe da Prof^a. Dr^a. Yanna Teles, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Os extrato foi preservado em frasco de vidro âmbar e mantido sob refrigeração, emulsões dos extratos nas diferentes concentrações foram preparadas no momento do teste, utilizou 0,5% de DMSO e 0,02% Tween 80, por diluições em água destilada, foi obtida a concentração desejada do extrato.

Eritrócitos humanos

Os eritrócitos humanos referentes aos tipos sanguíneos A, B e O foram oriundos de doadores saudáveis. Estes foram obtidos na Universidade Federal de Campina Grande/UFCG. A manipulação e o descarte dos eritrócitos foram realizados de acordo com as Normas de Segurança seguidas pela referida unidade. O estudo foi aprovado pelo Comitê de

ética do Centro Universitário de Patos (UNIFIP), sob o número de Protocolo 2.373.249.

Avaliação da citotoxicidade em eritrócitos humanos

Amostras de sangue humano A, B e O foram misturadas com NaCl 0,9 % na proporção de 1:30 e centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos para obtenção dos eritrócitos. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes e, o sedimento da última centrifugação ressuspensão em NaCl 0,9% para obter uma suspensão a 0,5%. As amostras do extrato em diferentes concentrações foram adicionadas à 2 mL da suspensão de eritrócitos para um volume final de 2,5 mL. Uma suspensão de eritrócitos foi utilizada como controle negativo (0 % de hemólise) e uma suspensão de eritrócitos acrescida de Triton X-100 a 1% como controle positivo (100 % de hemólise). Após isso, as amostras foram incubadas por 1 hora à 22 ± 2 °C sob agitação lenta e constante. Decorrido este tempo as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos e a hemólise quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm (RANGEL et al., 1997). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Análise Estatística

Todas as análises e testes foram realizados em triplicata, onde os dados são tratados através do método one-way ANOVA, com pós-teste Bonferroni. Os valores serão considerados estatisticamente significativos quando apresentarem $p < 0,05$. A análise estatística será realizada utilizando o software GraphPad Prism 5.0[®].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas possuem capacidade de sintetizar diversas substâncias tóxicas em quantidades exorbitantes contra diversos microrganismos como bactérias, fungos, vírus, além de animais predadores. Essas substâncias têm sido estudadas, contudo existem poucos trabalhos relacionados ao seu potencial toxicológico (DA FONSECA; PEREIRA, 2013).

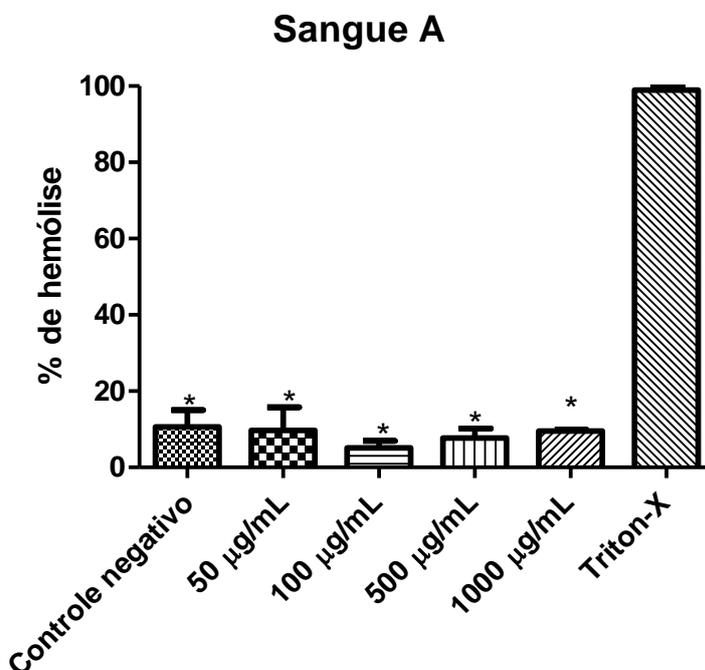
Com o surgimento de algumas doenças e o alto custo dos medicamentos, o uso indiscriminado de plantas medicinais como recurso terapêutico tem sido uma prática comum entre algumas populações devido a seu fácil acesso e pelo fato de ser mais econômico. Com isso, há preocupação com a utilização de certas plantas, pois algumas possuem poucas informações disponíveis sobre seus constituintes, bem como sobre os riscos em potencial

oferecidos à saúde humana e animal (DA FONSECA; PEREIRA, 2013).

Com isso há necessidade de se realizar testes como por exemplo o *in vitro* que são mais reprodutíveis e rápidos. Tal importância é necessária para que se possa verificar a toxicidade de determinada substância e prevenir danos, ocasionados pelo seu consumo indiscriminado (BEDNARCZUK et al., 2010).

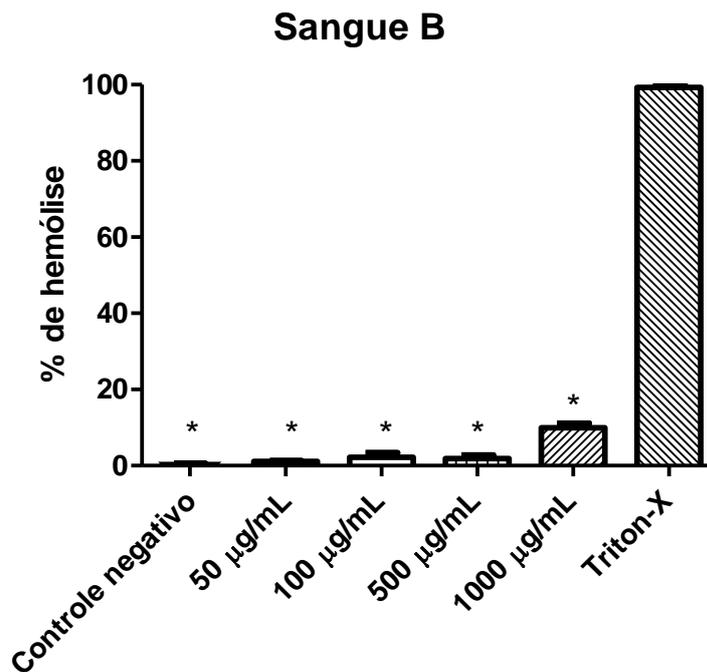
Os resultados referentes a citotoxicidade do Extrato Acetato de etila de *Psidium guineense* estão presentes nos gráficos 1, 2 e 3.

Gráfico 1. Avaliação da citotoxicidade de diferentes concentrações de *Psidium guineense* em eritrócitos humanos do tipo sanguíneo no sangue A.



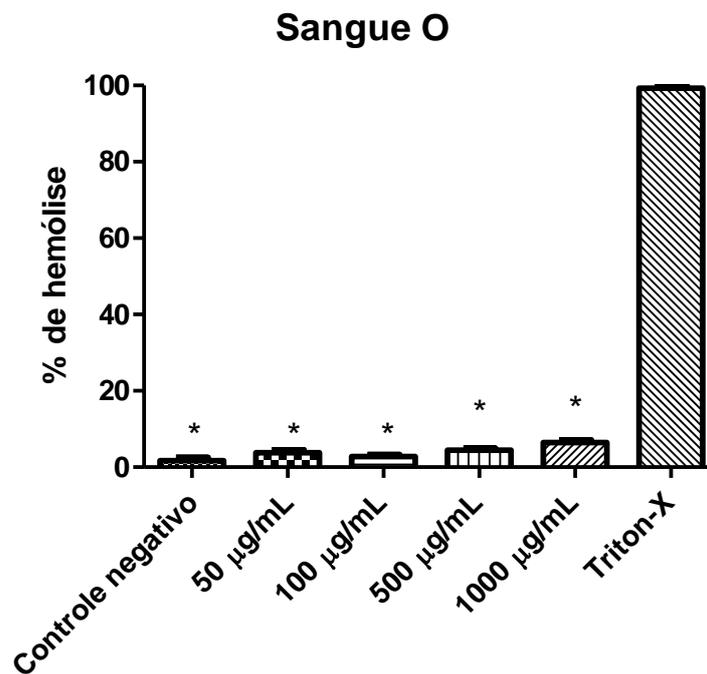
Fonte: Autor próprio.

Gráfico 2. Avaliação da citotoxicidade de diferentes concentrações de *Psidium guineense* em eritrócitos humanos do tipo sanguíneo no sangue B.



Fonte: Autor próprio.

Gráfico 3. Avaliação da citotoxicidade de diferentes concentrações de *Psidium guineense* em eritrócitos humanos do tipo sanguíneo no sangue O.



Fonte: Autor próprio.

Com base na análise dos dados dos gráficos 1, 2 e 3, observa-se que o extrato acetato de etila de *Psidium guineense* apresentou baixa citotoxicidade nas suas diferentes concentrações em comparação com o controle negativo.

Desoti et al. (2011), realizaram um estudo com seis tipos de espécies vegetais, das quais três eram da família Myrtaceae. Foram testados os extratos de acetato de etila, hexânicos

e metanólicos de tais espécies. O estudo apresentou eficácia na leitura visual da hemólise das suspensões de hemácias testadas. O extrato hexânico de *Psidium cattleianum* (variedade vermelha) apresentou 75% de hemólise em todas as concentrações testadas. No caso do extrato metanólico e extrato acetato de etila, todos apresentaram apenas 25% de hemólise na maior concentração testada.

No estudo de Barros Gomes et al. (2018), que verificou a citotoxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia *Syzygium aromaticum* da família Myrtaceae em *Artemia salina* Leach, os resultados obtidos apresentaram alta toxicidade isso pode decorrer pela presença do eugenol que é um forte agente bactericida, fungicida, antimicrobiano, anti-séptico e antialérgico, mas também pela mistura de outros componentes presentes nesse óleo, como por exemplo, o cariofileno e o copaeno que possuem um ótimo poder cicatrizante, diurético, anti-inflamatório.

De acordo com Costa (2017), que avaliou a atividade citotóxica do extrato de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae) com irradiação gama, atividade hemolítica em porcentagem para as concentrações de 1000, 500, 250 e 125 µg dos extratos de raiz e caules não irradiados e irradiados. Para os não irradiados os resultados, na sua maioria, ficaram muito próximos a zero, o que indicou baixa taxa de hemólise, resultando em uma baixa toxicidade. Os extratos irradiados não aumentaram significativamente a taxa de hemólise, em quase todas as doses utilizadas e concentrações as porcentagens diminuíram, sendo aproximado à zero.

4. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados pode-se observar que o extrato Acetato de etila de *Psidium guineense* apresentou baixa toxicidade frente aos eritrócitos humanos testados *in vitro*, contudo são necessários mais estudos como *in vivo* para reforçar os dados desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

- AKI, H.; YAMAMOTO, M. Drug binding to human erythrocytes in the process of ionic drug-induced hemolysis: Flow microcalorimetric approaches. **Biochemical Pharmacology**, v. 41, n. 1, p. 133-138, 1991.
- ARCANJO, G. M. G.; MEDEIROS, M. L. F. S.; DE SÁ AZEVEDO, R. R.; ROCHA, T. J. M.; DE SOUZA GRIZ, S. A.; MOUSINHO, K. C. Estudo da utilização de plantas medicinais com finalidade abortiva. **Revista Eletrônica de Biologia (REB)**, v. 6, n. 3, p. 234-250, 2013.
- 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**, v. 39, n. 5, p. 1063-1067, 2005.
- BARROS GOMES, P. R.; MOUCHREK FILHO, V. E.; FERREIRA RABÊLO, W.; ALBUQUERQUE DO NASCIMENTO, A.; COSTA LOUZEIRO, H.; DA SILVA LYRA, W.; FONTENELE, M. A. Caracterização química e citotoxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*). **Revista Colombiana de Ciências Químico-Farmacéuticas**, v. 47, n. 1, p. 37-52, 2018.
- BEDNARCZUK, V. O.; VERDAM, M. C. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v. 11, n. 2, p. 43-49, 2010.
- BRASIL. Resolução da diretoria colegiada nº17 de 24 fev. 2000. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**. 25 fev. 2000.
- BUKOWSKA, B.; KOWALSKA, S. Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. **Toxicology letters**, v. 152, n. 1, p. 73-84, 2004.
- COSTA, M. C. V. V. **Citotoxicidade, propriedades antioxidantes e avaliação da atividade antimicrobiana do extrato de *Syzygium cumini* (L.) Skeels após irradiação gama**. 2017. 136f. Tese (Doutorado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) – Universidade Federal do Pernambuco, Recife. 2017.

DA FONSECA, C. A.; PEREIRA, D. G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 16, n. 7/8, p. 51-54, 2013.

DESOTI, V. C.; MALDANER, C. L.; CARLETTO, M. S.; HEINZ, A. A.; COELHO, M. S.; PIATI, D.; TIUMAN, T. S. Triagem fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do Paraná. **Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR**, Umuarama, v. 15, n. 1, p. 3-13, 2011.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2.ed. São Paulo: Editora Unesp, 2002. 608p.

FRANZON, R. C.; CAMPOS, L. D. O.; PROENÇA, C. E. B.; SOUSA-SILVA, J. C. **Araçás do gênero Psidium: principais espécies, ocorrência, descrição e usos**. Embrapa Cerrados-Documents (INFOTECA-E), 1.ed. Planaltina, Distrito Federal: Embrapa Cerrados, 2009. 47p.

GOVAERTS, R.; SOBRAL, M.; ASHTON, P.; BARRIE, F.; HOLST, B. K.; LANDRUM, L. L.; SOARES-SILVA, L. H. **World checklist of Myrtaceae**. Editora: Royal Botanic Gardens, 2008. 455p.

NEIRA GONZÁLEZ, A.M.; RAMÍREZ GONZÁLEZ, M. B.; SÁNCHEZ PINTO, N.L. Estudio fitoquímico y actividad antibacterial de *Psidium guineense* Sw (choba) frente a *Streptococcus mutans*, agente causal de caries dentales. **Revista cubana de plantas medicinales**, v. 10, n. 3-4, p. 0-0, 2005.

RANGEL, M.; MALPEZZI, E. L. A.; SUSINI, S. M. M.; FREITAS, J. C. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon**, v. 35, n. 2, p. 305-309, 1997.

ROSSATO, A. E.; PIERINI, M. D. M.; AMARAL, P. D. A.; SANTOS, R. R. D.; CITADINI-ZANETTE, V. **Fitoterapia racional: aspectos taxonômicos, agroecológicos, etnobotânicos e terapêuticos**. 1ª ed. Florianópolis: Diretoria da Imprensa Oficial e Editora de Santa Catarina, 2013. 216p.

SCHREIER, H.; GAGNÉ, L.; BOCK, T.; ERDOS, G. W.; DRUZGALA, P.; CONARY, J. T.; MULLER, B. W. Physicochemical properties and *in vitro* toxicity of cationic liposome cDNA complexes. **Pharmaceutica Acta Helveticae**, v. 72, n. 4, p. 215-223, 1997.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. 2015. **Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB171>. Acesso em: 7 mai. 2019.

SOUZA, A. D. **Caracterização molecular, citogenética e seleção de espécies de myrtaceae resistentes ao nematóide *Meloidogyne enterolobii***. 2011. 118f. 2011. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2011.

Camilla Torres Pereira

Acadêmica do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

Maria Estella Torres Pereira

Acadêmica do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

Karla de Lima Alves Simão

Acadêmica do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

Bruna de Lima Alves Simão

Acadêmica do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

Maria Alice Araújo de Medeiros

Acadêmica do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

Millena de Souza Alves

Acadêmica do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

Yanna Carolina Ferreira Teles

Farmacêutica, doutora em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos – UFPB. .
Profa. Adjunta departamento de Química e Física – UFPB.

Aleson Pereira de Sousa

Biomédico, doutorando em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos - UFPB.

Heloisa Mara Batista Fernandes de Oliveira

Farmacêutica bioquímica, doutora em produtos naturais e sintéticos bioativos – UFPB.

Abrahão Alves de Oliveira Filho

Farmacêutico, doutor em produtos naturais e sintéticos bioativos - UFPB. Prof. Adjunto da unidade acadêmica de ciências biológicas – UFCG.
