

Maria Estella Torres Pereira

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

Camilla Torres Pereira

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

José Maria Barbosa-Filho

Universidade Federal da Paraíba (UFPB)
jbarbosa@ltf.ufpb.br

Gabriela Lemos de Azevedo Maia

Universidade Federal do Vale do São Francisco
(UNIVASF)
gabriela.lam@gmail.com

Aleson Pereira de Sousa

Universidade Federal da Paraíba (UFPB)
aleson_155@hotmail.com

Abrahão Alves de Oliveira Filho

Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)
abrahão.farm@gmail.com

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL HEMOLÍTICO DA FASE CLOROFÓRMICA DE *PRAXELIS* *CLEMATIDEA* (GRISEB.) R. M. KING & H. ROBINSON

RESUMO

O uso de compostos naturais utilizados para fins terapêuticos é uma prática tão antiga quanto a humanidade, sendo o consumo de substâncias vegetais para o tratamento de afecções altíssimo. Porém, é importante ressaltar que, o uso irrestrito de fitoterápicos e plantas medicinais pode causar uma série de efeitos colaterais como: reações alérgicas, intoxicações, mutações, teratogênese, carcinogênese e interações medicamentosas. Este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial tóxico da fase clorofórmica das folhas de *Praxelis clematidea* contra células sanguíneas humanas. O experimento foi realizado por meio de ensaios de atividade citotóxica utilizando suspensões sanguíneas com eritrócitos humanos (A, B e O). Foram empregadas diferentes concentrações da fase clorofórmica (50, 100, 500 e 1000 µg/mL) durante 60 minutos e a hemólise quantificada por meio de espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm. Os resultados encontrados evidenciam que a fase clorofórmica das folhas de *P. clematidea* em diferentes concentrações apresenta baixa toxicidade frente as células sanguíneas humanas *in vitro*, o que indica que este composto natural pode ser uma boa fonte para produção de medicamentos fitoterápicos. O estudo mostra baixo efeito citotóxico da amostra; todavia é necessário que estudos *in vivo* sejam realizados para que se possa reforçar os dados encontrados nessa pesquisa.

Palavras-chave: Toxicidade; Plantas medicinais; *Praxelis clematidea*; Eritrócitos.

EVALUATION OF THE HEMOLYTIC POTENTIAL OF THE CHLOROFORM PHASE OF *PRAXELIS CLEMATIDEA* (GRISEB.) R. M. KING & H. ROBINSON

ABSTRACT

The use of natural compounds used for therapeutic purposes is a practice as old as humanity, and the consumption of plant substances for the treatment of affections is very high. However, it is important to emphasize that the unrestricted use of herbal and medicinal plants can cause a series of side effects such as: allergic reactions, intoxications, mutations, teratogenesis, carcinogenesis and drug interactions. This work aimed to evaluate the toxic potential of the chloroform phase of *Praxelis clematidea* leaves against human blood cells. The experiment was carried out through assays of cytotoxic activity using blood suspensions with human erythrocytes (A, B and O). Different concentrations of the chloroform phase (50, 100, 500 and 1000 µg/mL) were used for 60 minutes and hemolysis was quantified by spectrophotometry at a wavelength of 540 nm. The results found show

that the chloroform phase of *P. clematidea* leaves at different concentrations has low toxicity against human blood cells *in vitro*, which indicates that this natural compound can be a good source for the production of herbal medicines. The study shows a low cytotoxic effect of the sample; however, it is necessary that *in vivo* studies are carried out in order to reinforce the data found in this research.

Keywords: Toxicity; Medicinal plants; *Praxelis clematidea*; Erythrocytes.

1. INTRODUÇÃO

O uso de compostos naturais utilizados para fins terapêuticos é uma prática tão antiga quanto a humanidade, e ao longo do tempo, uma diversidade de produtos animais, minerais e vegetais foram sendo utilizados como fontes medicamentosas (RATES, 2001).

O consumo, em especial, de substâncias de origem vegetal para o tratamento de afecções é altíssimo em virtude de fatores como: insatisfação causada pelo uso errôneo de fármacos sintéticos, responsabilidade ecológica, fácil acesso, baixo custo financeiro, e o fato de muitos considerarem medicamentos de origem natural inofensivos (RATES, 2001; IBIAPINA *et al.*, 2014).

A fitoterapia tem se desenvolvido amplamente, sendo utilizada em diversas situações que vão desde atenção primária à saúde até terapia integrativa e complementar (IBIAPINA *et al.*, 2014). Porém é importante ressaltar que, o uso irrestrito de fitoterápicos e plantas medicinais pode causar uma série de efeitos colaterais como: reações alérgicas, intoxicações, mutações, teratogênese,

carcinogênese e interações medicamentosas (FERREIRA *et al.*, 2014; SOUSA *et al.*, 2021).

Com isso, fica evidente a importância de avaliar os compostos vegetais quanto ao seu potencial tóxico ao organismo, visando oferecer mais segurança e promover o uso racional dos mesmos. Uma ferramenta importante para verificar potenciais toxicológicos de substâncias naturais são os testes *in vitro*, os quais oferecem resultados preliminares aos estudos *in vivo* e vêm sendo altamente estimulados (BEDNARCZUK *et al.*, 2010).

A família Asteraceae é um dos maiores táxons de angiospermas do mundo, a mesma possui cerca de 23.000 espécies distribuídas em mais de 1500 gêneros (BREMER; ANDERBERG, 1994). Dentre as espécies dessa família está *Praxelis clematidea* (Griseb.) R. M. King & H. Robinson, uma erva perene que pode chegar até 60 cm de altura, possuindo folhas opostas e flores com corola lilás (ABREU, 2020). *P. clematidea* é uma espécie que tem chamado a atenção e tem sido muito estudada quanto às suas propriedades terapêuticas (MAIA *et al.*,

2011; OLIVEIRA-FILHO *et al.*, 2016; XIAO *et al.*, 2020).

Assim, sabendo que produtos naturais apresentam-se como uma grande e importante fonte terapêutica, mas que os mesmos também podem causar efeitos prejudiciais ao organismo humano, esse trabalho objetiva avaliar o potencial citotóxico, *in vitro*, da fase clorofórmica das folhas de *P. clematidea*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo trata-se de uma pesquisa experimental e quantitativa. Segundo Ramos; Ramos; Busnello (2005) a pesquisa quantitativa está relacionada aquilo que pode ser mensurado em números, que podem ser classificados e analisados, e que utiliza técnicas estatísticas. Assim, esse método se faz imprescindível para a análise e interpretação dos resultados alcançados.

Material vegetal

Para o teste, foi utilizada a fase clorofórmica das folhas de *Praxelis clematidea*, gentilmente cedida pela equipe dos Professores Dr. José Maria Barbosa Filho e Dr^a Gabriela Lemos de Azevedo Maia, das Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), respectivamente.

A fase clorofórmica foi conservada em frasco de vidro âmbar e preservado sob refrigeração. Emulsões da fase clorofórmica

nas diferentes concentrações foram preparadas no momento do teste (utilizando 0,5% de DMSO) por meio de diluições em água destilada, para a obtenção da concentração ideal.

Análises *in vitro*

Amostra de eritrócitos humanos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de ética do Centro Universitário de Patos (UNIFIP), sob o número de Protocolo 2.373.249. As amostras sanguíneas dos tipos A, B e O foram oriundas de doadores saudáveis. Estas foram obtidas na Universidade Federal de Campina Grande/UFCG, e a manipulação assim como o descarte dos eritrócitos foram feitos de acordo com as Normas de Segurança seguidas pela referida unidade.

Atividade hemolítica

As amostras dos tipos sanguíneos A, B e O foram misturadas em NaCl 0,9 % na proporção de 1:30 e centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos para obtenção dos eritrócitos. Tal procedimento foi repetido três vezes, e o sedimento da última centrifugação ressuspenso em NaCl 0,9% para obtenção de uma suspensão a 0,5%. As amostras da fase clorofórmica em concentrações distintas 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

outra suspensão de eritrócitos contendo Triton X-100 a 1% como controle positivo (100 % de hemólise). Em seguida, as amostras foram incubadas durante 60 minutos à 22 ± 2 °C sob agitação lenta e constante. Após isso, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos e a hemólise quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm (RANGEL *et al.*, 1997).

Análise estatística

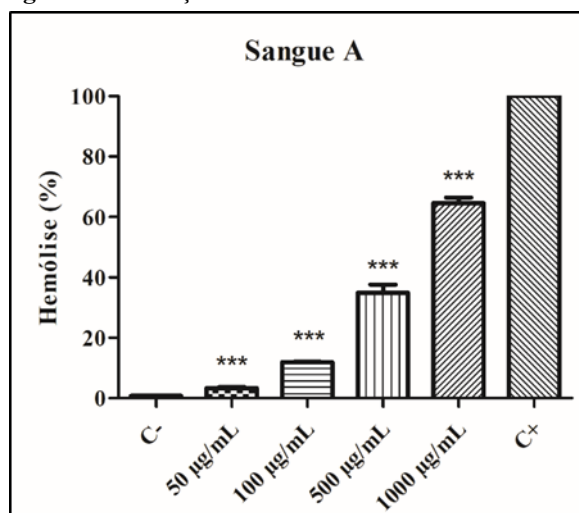
Os dados obtidos foram analisados através do método one-way ANOVA, com pós-teste Bonferroni. Todo o experimento foi realizado em triplicata e os números foram

considerados estatisticamente significativos quando apresentaram $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 5.0®.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse estudo, utilizou-se o teste de citotoxicidade *in vitro* para avaliar o potencial tóxico da fase clorofórmica das folhas de *P. clematidea* contra células sanguíneas humanas. Os resultados obtidos revelam uma similaridade entre o percentual de hemólise nos diferentes tipos sanguíneos testados, conforme pode ser visto nas figuras 1, 2 e 3.

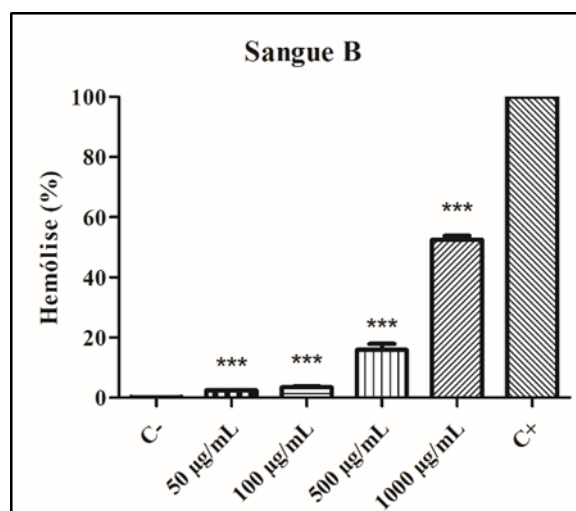
Figura 1. Avaliação hemolítica de *P. clematidea* em eritrócitos do tipo A.



(C⁻) Controle negativo (suspensão a 0,5%), (C⁺) Controle positivo (1% Triton X-100). $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**) e $P < 0,001$ (***) versus controle positivo.

Fonte: Autor próprio.

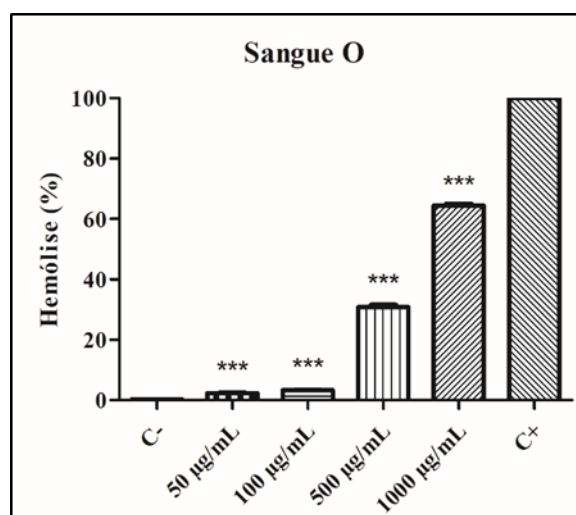
Figura 2. Avaliação hemolítica de *P. clematidea* em eritrócitos do tipo B.



(C⁻) Controle negativo (suspensão a 0,5%), (C⁺) Controle positivo (1% Triton X-100). P < 0,05 (*), P < 0,01 (**) e P < 0,001 (***) versus controle positivo.

Fonte: Autor próprio.

Figura 3. Avaliação hemolítica de *P. clematidea* em eritrócitos do tipo O.



(C⁻) Controle negativo (suspensão a 0,5%), (C⁺) Controle positivo (1% Triton X-100). P < 0,05 (*), P < 0,01 (**) e P < 0,001 (***) versus controle positivo.

Fonte: Autor próprio.

A fase clorofórmica das folhas de *P. clematidea* apresentou baixos índices de citotoxicidade em todos os tipos sanguíneos testados, entretanto, apenas nas concentrações mais altas (1000 µg / mL) foi revelado percentual de hemólise moderada $\geq 60\%$. Dentre os tipos sanguíneos testados o tipo B apresentou melhor interação com hemácias,

mesmo em maior concentração da substância com hemácias específicas do tipo B a hemólise foi considerada baixa $< 60\%$.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2001), o uso de plantas medicinais no cuidado à saúde é comum em todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento. Assim, a demanda por

pesquisas científicas que aumentem a segurança e qualidade de produtos e medicamentos de origem vegetal é altíssima e se faz necessária (TURINO; BELO; SILVA, 2004).

Dentre as etapas necessárias para a produção de um fitoterápico, que vão desde pesquisa científica até registro em órgão de vigilância sanitária competente, está a avaliação da atividade toxicológica (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Diversas plantas possuem constituintes químicos que têm efeito hemolítico, sendo necessários assim, testes que evidenciem tal atividade, tendo em vista que, mesmo que determinada espécie vegetal apresentasse atividades biológicas positivas, a mesma poderia não servir para a produção de um produto farmacológico, caso apresentasse potencial citotóxico elevado (ZOHRA; FAWZIA, 2014).

No ensaio de ZAPATA *et al.* (2010) foi analisado o potencial tóxico de óleos essenciais de quinze espécies pertencentes à família Asteraceae contra células animais. Os resultados obtidos em tal estudo evidenciaram que, dos óleos das quinze espécies testadas, apenas o de uma (*Ambrosia arborescens*) apresentou citotoxicidade. Esse baixo perfil citotóxico corrobora com os resultados encontrados no presente trabalho.

Eser *et al.* (2017), analisaram a citotoxicidade dos extratos etanólico e aquoso da raiz, das flores e dos galhos de *Anthemis tinctoria* var. *tinctoria* (Asteraceae). Os extratos (etanólico

e aquoso) das flores e dos galhos, assim como o extrato aquoso da raiz, apresentaram 0% potencial tóxico. Somente o extrato etanólico da raiz apresentou potencial tóxico. Assim, é possível perceber que tanto os extratos analisados no estudo de Eser *et al.* (2017) como a fase clorofórmica das folhas de *P. clematidea* apresentaram baixa citotoxicidade.

4. CONCLUSÃO

Conforme os resultados do presente estudo, conclui-se que a fase clorofórmica de *P. clematidea* testada *in vitro* mostrou baixa toxicidade frente aos eritrócitos humanos, estes compostos revelam ser promissores candidatos para futuras análises de bioatividade no desenvolvimento de novos fármacos oriundos de produtos naturais. Todavia é necessário que estudos *in vivo* sejam realizados para que se possa reforçar os dados encontrados nessa pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ABREU, V. H. R. *Praxelis in Flora do Brasil 2020* em construção. Retrieved from <http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB16267>
- BEDNARCZUK, V. O. *et al.* Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v. 11, n. 2, 2010.
- BRASIL (2001). Proposta de política nacional de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde.

BREMER, K.; ANDERBERG, A. A. **Asteraceae: cladistics & classification**. 1994.

ESER, F. *et al.* Dyeing, fastness, and cytotoxic properties, and phenolic constituents of *Anthemis tinctoria* var. *tinctoria* (Asteraceae). **The Journal of The Textile Institute**, v. 108, n. 9, p. 1489-1495, 2017.

FERREIRA, T. S. *et al.* Phytotherapy: an introduction to its history, use and application. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 2, p. 290-298, 2014.

IBIAPINA, W. V. *et al.* Inserção da fitoterapia na atenção primária aos usuários do SUS. **Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança**, v. 12, n. 1, p. 60-70, 2014.

MAIA, G. L. D. A. *et al.* (2011) Flavonoids from *Praxelis clematidea* RM King and Robinson modulate bacterial drug resistance. **Molecules**, v. 16, n. 6, p. 4828-4835, 2011.

OLIVEIRA FILHO, A. A. *et al.* In vitro anti-Candida activity and mechanism of action of the flavonoid isolated from *Praxelis clematidea* against *Candida albicans* species. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 6, n. 01, p. 066-069, 2016.

OLIVEIRA, A. B. *et al.* A normatização dos fitoterápicos no Brasil. **Visão Acadêmica**, v. 7, n. 2, 2006.

RAMOS, P.; RAMOS, M. M.; BUSNELLO, S. J. **Manual prático de metodologia da pesquisa: artigo, resenha, projeto, TCC, monografia**. 2005. Tese de Doutorado. dissertação e tese. Blumenau: Acadêmica.

RANGEL, M. *et al.* Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon**, v. 35, n. 2, p. 305-309, 1997.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 57-69, 2001.

SOUSA, A. P. *et al.* Analysis of the toxicological and pharmacokinetic profile of Kaempferol-3-O- β -D-(6''-Ep-coumaryl) glucopyranoside-Tiliroside: in silico, in vitro and ex vivo assay. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, 2021.

TURINO, F.; BELO, M. G.; SILVA, A. G. Uma visão diagnóstica da fitoterapia na Pastoral da Saúde. **Natureza on line**, v. 2, p. 15-21, 2004.

XIAO, L. *et al.* Benzofuranos e lignanos anti-neuroinflamatórios de *Praxelis clematidea*. **Fitoterapia**, v. 140, p. 104440, 2020.

ZAPATA, B. *et al.* Antifungal activity, cytotoxicity and composition of essential oils from the Asteraceae plant family. **Revista iberoamericana de micologia**, v. 27, n. 2, p. 101-103, 2010.

ZOHRA, M.; FAWZIA, A. Hemolytic activity of different herbal extracts used in Algeria. **International Journal of Pharma Sciences and Research**, v. 5, n. 8, p. 495-500, 2014.

Maria Estella Torres Pereira

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

Camilla Torres Pereira

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

José Maria Barbosa-Filho

Prof. Adjunto da Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Gabriela Lemos de Azevedo Maia

Profa. Adjunta da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF)

Aleson Pereira de Sousa

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

Abrahão Alves de Oliveira Filho

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