ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL – PNQM07

ATIVIDADE HEMOLÍTICA E ANTIOXIDANTE DE PLANTA MEDICINAL UTILIZADA POR COMUNIDADES TRADICIONAIS DO SERTÃO PERNAMBUCANO: *AMBURANA CEARENSIS* (FABACEAE)

J. V. O., ALVES¹; J. S., LIMA¹; M. R. C., LIMA¹; P. M., SILVA¹; J. W. L. M., SILVA¹; D. S. J., SILVA¹; W. K., COSTA¹; L. C., AMORIM¹; A. G., SILVA¹ e M. V., SILVA¹.

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento Bioquímica.
E-mail para contato: jv-bio@hotmail.com

RESUMO – *Amburana cearensis* é popularmente conhecida como cerejeira ou amburana de cheiro. A espécie apresenta uma ampla distribuição na América do Sul, sendo característica das Florestas Sazonais. O extrato aquoso de sua casca foi testado para avaliar a presença de atividade antioxidante, que se apresentou bem expressiva, os antioxidantes são reconhecidos por bloquear a evolução das doenças associadas ao estresse oxidativo. Ademais, também foi realizado o teste citotóxico. Amostras de sangue foram coletadas de indivíduos O+ para o teste hemolítico. Frente aos testes de atividade hemolítica, a *Amburana cearensis* não apresentou resultados significativos, não apresentando toxicidade para eritrócitos humanos. É necessário que sejam feitas análises adicionais, tais como caracterização química e determinação do princípio ativo do extrato aquoso de *Amburana cearensis*.

Palavras chaves: Bioma Caatinga; Extrato Aquoso; Eritrócitos; Radicais Livres

ABSTRACT - *Amburana cearensis* is popularly known as cherry or amburana scent. The species presents a wide distribution in South America, being characteristic of Seasonal Forests. The aqueous extract of the bark was tested to evaluate the presence of antioxidant activity that it was very expressive, the antioxidants are known to block the evolution of associated diseases associated of oxidative stress. In addition, it was also performed the cytotoxic test. Blood samples were collected from O + individuals for the hemolytic test. In the face of the tests, *Amburana cearensis* did not present significant results with no toxicity to human erythrocytes. Further analysis needs to be conducted, such as chemical characterization and determination of the active principle of the aqueous extract of *Amburana cearensis*.

Key words: Caatinga biome; Aqueous Extract; Erythrocytes; Free radicals

1. INTRODUÇÃO

Amburana cearensis (Allemão) A.C. Smith, Fabaceae, é uma árvore de caule ereto, que chega a atingir 10 a 12 m de altura (ANDRADE-LIMA, 1989). A espécie é também conhecida como cumaru, cumaru-de-cheiro, cerejeira e, devido às suas qualidades madeireiras, tem sido explorada nos locais de ocorrência até a exaustão, para uso em movelaria fina, esculturas e marcenaria em geral, estando listada como espécie ameaçada de extinção (HILTON-TAYLOR, 2000). Além disso, devido às suas propriedades medicinais, a casca da árvore e as sementes são utilizadas na produção de medicamentos populares destinados ao tratamento de afecções pulmonares, tosse, asma, bronquite e coqueluche.

A indústria de perfumaria também faz uso dessa espécie (BEZERRA et al., 2005). A qual apresenta ampla distribuição na América do Sul, sendo característica de Floresta Estacional. Também ocorre em Floresta Estacional Semidecidual, restritas aos afloramentos rochosos ou calcários, em floresta Estacional Decidual Submontana, em florestas Ombrófila Densa (Mata Atlântica) até a Caatinga/ Mata seca. A *Amburana cearensis* possui casca vermelha - pardacenta, lisa suberosa e fina com 7 mm de espessura.

A *Amburana cearensis* é plantas medicinal do bioma Caatinga, que vem sendo utilizada por várias comunidades tradicionais do sertão pernambucano para fins medicinais. Por ser tão usada pelas comunidades se faz necessário investigar toxicidade e os potenciais biológicos dessa planta para saúde humana. Um dos potenciais biológicos de podemos investigar são os agentes antioxidantes, que são reconhecidos por bloquear a evolução e no combate aos sintomas, desencadeados por doenças associadas ao estresse oxidativo (Valko, M. et al 2007; Dudonne, S. et al 2009). Os agentes antioxidantes trazem efeitos terapêuticos, porém os usos indevidos podem trazer reações adversas. Nosso trabalho tem por objetivo de avaliar o potencial antioxidante do extrato aquoso da casca de *Amburana cearensis* pelos testes de DPPH e Fosfomolibdênio; verificar se há toxicidade em eritrócitos humanos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta e Extração

As cascas e ramos férteis da *Amburana cearensis* foram coletadas no PARNA do Catimbau, que é localizado na cidade de Buíque no sertão pernambucano; os ramos férteis foram levados para o herbário do instituto agrônomo de Pernambuco – IPA, onde foi identificado pelo voucher 96 345. As cascas foram trazidas para o Departamento de Bioquímica – Campus Recife - UFPE, onde as cascas foram secas, por 48 h, à 40° c na estufa e triturada após a secagem. O pó obtido foi utilizado para fazer o extrato aquoso. Foram pesados 10 gramas do pó das cascas trituradas, homogeneizado com 100ml de água destilada por 30 minutos em banho-maria à 100°C. O material foi filtrado com a ajuda de bomba a vácuo e colocado em placas de Petri, levado ao freezer, para em seguida ser liofilizado e utilizado para realizar os testes propostos.

Atividade Antioxidante Utilizando Método do DPPH

A atividade de radical livre de DPPH dos extratos foi realizada de acordo com a BrandWilliams et al. com algumas modificações. Para a realização da atividade antioxidante diluímos 0,008 g de DPPH em 100ml de metanol e lemos no ELISA® no comprimento de onda à 517 nm para se obter a UV-VIS absorvância entre 0,6-0,7. 1 mg do extrato foi diluído em 1 mL de água. Desta solução de 1000 µg/ml fazemos mais 6 concentrações, para que no final tenhamos uma variação de 16 - 1000 µg/ml. 40 µl de cada concentração foram misturados com 250 µl da solução de DPPH e após 30 minutos de incubação no escuro as absorvâncias foram lidas ao mesmo comprimento de onda acima mencionado. As medições foram realizadas em triplicata e suas atividades de eliminação foram calculados com base no percentual de redução do DPPH calculada pela seguinte fórmula:

$$SRL(\%) = \frac{ABS\ CONTROLE - ABS\ AMOSTRAS}{ABS\ CONTROLE} \times 100$$

Onde: ABS controle é o radical com metanol e ABS amostras é o Radical com o extrato.

Ensaio De Fosfomolibdênio

Ensaio de acordo com Prieto et al (1999). A capacidade antioxidante total (% TAC) foi avaliada por ensaio de fosfomolibdênio. 1 mg do extrato foi diluído em 1 mL de água, uma alíquota de 100 µl foi combinado com 1 ml de solução de reagente (ácido sulfúrico a 600 mM, 28 mM de fosfato de sódio e molibdato de amônio 4 mm). Os microtubos 1,5 mL foram tampados e incubados em banho-maria a seco por 90 ° C durante 90 min. Depois, a absorbância foi medida à 695 nm contra um em branco (1 mL de reagente e 100 µl de solvente). Atividade antioxidante total foi expressa em relação ao ácido ascórbico.

Atividade Hemolítica

As amostras de 5 mL sangue foram obtidas de voluntários saudáveis do tipo O+ por punção venosa e colocadas em tubos heparinizados. Para obtenção dos eritrócitos, o sangue foi centrifugado (1500 rpm, durante 10 min) e lavado três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4). Foi preparada uma solução em salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4 a 1 % de eritrócitos. Para realização da atividade cada tubo de ensaio recebeu 1,1 mL de suspensão de eritrócitos (1%) e 0,4 mL das várias concentrações do extrato em diferentes concentrações (16-1000 µg/mL). O controle negativo e controle positivo receberam 0,4 mL de tampão fosfato-salina e de Triton X-100, respectivamente. Após 60 minutos de incubação à temperatura ambiente, as células foram centrifugadas (1500 rpm, durante 5 min) e o sobrenadante foi usado para medir a absorbância da hemoglobina liberada à 540 nm. O valor médio foi calculado a partir dos ensaios em quadruplicata. A atividade hemolítica foi expressa em relação à ação do Triton X- 100 e calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Atividade hemolítica (\%)} = [(Aa - Ab) \cdot 100] / (Ac - Ab)$$

Sendo, Aa - absorbância da amostra, Ab - absorbância do controle negativo (fosfato-salina) e Ac - absorbância do controle positivo (Triton X-100).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os radicais livres de DPPH apresentam inicialmente a coloração roxa por terem elétrons-livres. A mudança de cor ocorre quando um radical de hidrogênio é doado por uma molécula antioxidante que entra em ressonância com a molécula de DPPH, tomando uma cor amarelada, diminuindo, assim, a absorbância. A baixa absorbância indica a atividade de sequestro dos radicais livres (SANTOS et al, 2007). O extrato da casca da *Amburana cearensis* se mostrou um ótimo doador de H⁺ para o radical DPPH. O extrato foi comparado com padrão ácido gálico, na concentração de 1000 µg/mL. O extrato aquoso da casca teve um desempenho de 93,2%, enquanto o ácido gálico 90 %. Porém a persistência da atividade do ácido gálico é superior a da *Amburana cearensis*; com a diminuição da concentração a atividade de sequestro de prótons vai diminuindo.

Gráfico 1 – Atividade sequestradora de H⁺ pelo radical DPPH.

No trabalho realizado por Sousa (2007), em cascas e folhas de cinco espécies de plantas medicinais: *Terminalia brasiliensis* Camb., *Terminalia fagifolia* Mart. Et Zucc, *Cenostigma macrophyllum* Tul. Var *acuminata* Teles Freire, *Qualea grandiflora* Mart. e *Copernicia prunifera* (Miller) H.E.Moore, as concentrações do extrato variou de 27,58 a 111,14 µg/mL para o iniciar o decrescimento inicial do DPPH, comparando com o nosso estudo na concentração 16 µg/mL já tínhamos um decrescimento de 65,5%.

O método de avaliar a capacidade antioxidante total tem a vantagem de interagir com os componentes lipofílicos e hidrofílicos presentes na amostra estudada, ou seja, mede a capacidade antioxidante total de todos os componentes da amostra (PRIETO et al., 1999). No ensaio do fosfomolibdênio o extrato da *Amburana cearensis* teve uma porcentagem de 46,3% de equivalência ao padrão ácido ascórbico, ambos na concentração de 1 µg/ML. Nesse ensaio podemos demonstrar a atividade antioxidante total do extrato. Em 1 mg de extrato temos 0,463 µg de compostos antioxidantes.

O ensaio da atividade hemolítica é considerado um bom indicador de toxicidade geral e atividade biológica, sendo um método muito recorrido pelos pesquisadores para investigação da ação de extratos de plantas sobre os eritrócitos humanos. Os testes *in vitro* para determinar a ação tóxica nos eritrócitos humanos têm sido utilizados como um dos métodos de triagem para os diferentes agentes tóxicos (KUBLIK et al., 1996), incluindo a avaliação de extratos vegetais (GANDHI; CHERIAN, 2000). A *Amburana cearensis* não apresentou ação hemolítica. A atividade hemolítica foi empregada para avaliar o potencial do extrato em causar lesões na membrana plasmática das células, pela formação de poros ou pela ruptura total, através da leitura óptica da hemoglobina liberada.

Gráfico 2 – Atividade hemolítica do extrato aquoso da casca da *Amburana cearensis*

Neste ensaio, o extrato aquoso não promoveu danos à membrana plasmática dos eritrócitos, ao contrário do controle positivo (Triton X- 100 a 1%). As plantas contêm princípios ativos responsáveis pelas propriedades terapêuticas a elas atribuídas, mas também, por reações adversas que podem aparecer em decorrência de uso indevido ou contado direto. Dentre os metabólitos secundários, os alcaloides, mesmo em pequenas quantidades, são substâncias naturalmente, tóxicas (Dewick, 2002).

4. CONCLUSÃO

O extrato aquoso da casca da *Amburana cearensis* apresentou resultados significativos para os testes realizados, que foram atividade antioxidante que se mostrou um ótimo doador de H⁺ para o radical DPPH. O extrato foi comparado com padrão ácido gálico, na concentração de 1000 µg/mL, levando em consideração que extrato da casca teve um desempenho de 93,2% enquanto o ácido gálico 90 %. Na atividade antioxidante total o extrato aquoso teve 46,3% de equivalência ao ácido ascórbico. Enquanto para a atividade hemolítica, não apresentou hemólise na concentração de 1000mg/ml, inicialmente, testada. Indicando que o extrato não causa lesões na membrana plasmática das células.

5. REFERÊNCIAS

- Alves, João Victor De Oliveira; Silva, Diego Santana Jerônimo da; Lima, Matheus Ranieli Calado; Silva, Marcia Vanusa Da; "EFEITO ANTIOXIDANTE DE PLANTA RESTRITA AO BIOMA CAATINGA: JACARANDÁ (JACARANDA RUGOSA)", p. 77-78. In: **Santana, Otacilio Antunes; Cabral Filho, Paulo Euzébio; Rodrigues, Claudio Gabriel. Anais do Encontro Anual da Biofísica 2017**. São Paulo: Blucher, 2017. ISSN 2526--607-1, DOI 10.5151/biofisica2017-028.
- ANDRADE-LIMA, D. Plantas da caatinga. Rio de Janeiro: **Acad. Bras. de Ciênc.**, 1989.
- BEZERRA, A. M. E.; CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R. Estudo fitoquímico de espécimens jovens de *Amburana cearensis* A.C. Smith. In: **REUNIÃO ANUAL DA SBQ**, 29., 2005, Águas de Lindóia. Anais... Águas de Lindóia: 2005. 2p.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. (1995) Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Brazilian Apples. Food Nutri. Sci.*, 6, 727-735.
- DEWICK, P.M. Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach. John Wiley & Sons LTD, 2º ed., p.291-300. 2002.
- GANDHI, V.M.; CHERIAN, K.M. Red cell haemolysis test as an in vitro approach for the assessment of toxicity of karanja oil. *Toxicology In Vitro*, v. 14, p. 513-516, 2000.
- HILTON-TAYLOR, C. 2000 **IUCN red list of threatened species**. Cambridge: IUCN, 2000.
- KUBLIK, H.; BOCK, T. K.; SCHREIER, H.; MÜLLER, B. W. Nasal absorption of 17- β estradiol from different cyclodextrin inclusion formulations in sheep. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 42, p. 320-24, 1996.
- PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E. **Anal. Biochem.**, v. 269, p. 337-341, 1999.
- SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, I. et al. In vitro antioxidant activity of brewed using different procedures: Italian, espresso and filter. **Food Chem.**, Oxford, v. 90, n. 1/2, p. 133-139, Jan./ Feb. 2005.
- SANTOS, ET AL, Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade do café (*Coffea arabica*). **Quím. Nova**. 30, 604-610, 2007.
- SOUSA, C. M. M.. Fenóis totais e Atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, São Paulo, v. 30,n.2, p.351-355, 2007.
- VALKO, Marian; LEIBFRITZ, Dieter; MONCOL, Jan; *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VAN ACKER, S.A.B.E.; VAN DEN BERG, D.J.; TROMP, M.N.; VAN BENNEKOM, W.P.; VAN DER VIJGH, W.J.; BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radic. Biol. & Med.**, v.20, n.3, p.331-42, 1996.

VIEGAS, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E., Produtos Naturais como Candidatos à Fármacosúteis no Tratamento do Mal de Alzheimer. **Quím. Nova**. 27(4): 655-660, 2004.

WILLIAMS, R.J., SPENCER, J.P.E., RICE-EVANS, C. Flavonoids: Antioxidant or signaling molecules? **Free Radic. Biol. & Med.**, 36, 838-849, 2004.

6. AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer ao Departamento de Bioquímica – UFPE, ao CNPQ, à CAPES e à PROPESQ pelo apoio oferecido ao desenvolvimento da pesquisa.