

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO LEÃO SAMPAIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

JOSE ANDERSON FRANCELINO DA SILVA

**AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DO EUCALIPTOL FRENTE A MODELOS
ERITROCITÁRIOS**

Juazeiro do Norte – CE
2018

JOSE ANDERSON FRANCELINO DA SILVA

**AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DO EUCALIPTOL FRENTE A MODELOS
ERITROCITÁRIOS**

Artigo Científico apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de bacharel em Biomedicina.

Orientador: Esp. Cícero Roberto Nascimento Saraiva

JOSE ANDERSON FRANCELINO DA SILVA

**AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DO EUCALIPTOL FRENTE A MODELOS
ERITROCITÁRIOS**

Artigo Científico apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de bacharel em Biomedicina.

Orientador: Esp. Cícero Roberto Nascimento Saraiva

Data de aprovação: 29/11/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Esp. Cícero Roberto Nascimento Saraiva
Orientador

Prof^a. Esp. Lívia Maria Garcia Leandro
Examinador 1

Prof^a. Esp. Francisca Janielle Barros Nachabe
Examinador 2

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha família que me deu total apoio e a todos que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

Pela sublime presença de Deus em minha vida, importante força diretora de minha consciência, que ensina o amor e a linguagem silenciosa da vida, a fim de espriar a luz ao próximo, dando-nos sentido da verdadeira felicidade;

Pela minha família que sempre estiveram comigo nessa jornada acadêmica;

Ao Excelente Orientador Professor Roberto;

Aos amigos que a Biomedicina me proporcionou;

Ao meu amor Yásckara Paulino.

AValiação CITOTÓXICA DO EUCALIPTOL FRENTE A MODELOS ERITROCITÁRIOS

Jose Anderson Francelino da Silva¹; Cícero Roberto Nascimento Saraiva².

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo realizar a avaliação citotóxica do eucaliptol frente a modelos eritrocitários. O composto isolado foi doado pelo Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN) da URCA (Universidade Regional do Cariri). A avaliação da citotoxicidade do eucaliptol foi testada frente a curva de fragilidade osmótica das células vermelhas sanguíneas onde foram feitas análises, em triplicata, com o composto eucaliptol. Foi realizada com amostras de suspensão de hemácias previamente lavadas com solução salina e incubadas com eucaliptol diluído em Dimetil Sulfóxido (DMSO) a 1%, em seis concentrações (5µg/mL, 10µg/mL, 25µg/mL, 50µg/mL, 100µg/mL, 200µg/mL). As amostras foram incubadas em banho-maria a (37°C) nos tempos de 1 hora e 2 horas. Após esse tempo estabelecido foram centrifugados a (1.500rpm por 15 min) e seus sobrenadantes foram isolados e lidos em espectrofotômetro de massa (540nm), e o controle foi NaCl 0,9%. Foi observado que o contato direto do Eucaliptol com os eritrócitos não acarretou alterações morfológicas significativas em sua membrana. Portanto, conclui-se que com os resultados do presente estudo, o composto isolado eucaliptol frente aos modelos eritrocitários, não apresentou potencial citotóxico, e não ocorreu hemólise considerável quando incubado, porém se faz necessário a realização de testes mais específicos para uma maior compreensão do composto isolado em membranas celulares.

Palavras-chave: Citotoxicidade. Eucaliptol. Eritrócitos.

CYTOTOXIC EVALUATION OF EUCALYPTOL AGAINST ERYTHROCYTE MODEL

ABSTRACT

The present study aimed to perform the cytotoxic evaluation of Eucalyptol against erythrocyte models. The isolated compound was donated by the Natural Products Research Laboratory (LPRL) of Urca (Regional University of Cariri). The evaluation of the cytotoxicity of Eucalyptol was tested against the osmotic fragility curve of the red blood cells where analyses were performed in triplicate with the eucalyptol compound. It was performed with samples of suspension of red blood cells previously washed with saline solution and incubated with eucalyptol diluted in dimethyl sulphoxide (DMSO) at 1%, in six concentrations (5 M g/ml, 10 M g/ml, 25 µ g/ml, 50 µ g/ml, 100 µ g/ml, 200 µ g/ml). The samples were incubated in a water bath (37 ° C) in times of 1 hour and 2 hours. After this time, they were centrifuged at (1,500 rpm for 15 min) and their supernatants were isolated and read in mass spectrometry (540nm), and the control was NaCl 0.9%. It was observed that the direct contact of Eucalyptol with erythrocytes did not cause significant morphological alterations in its membrane. Therefore, it was concluded that with the results of the present study, to observe that the eucalyptol isolated compound against the erythrocyte models, did not present cytotoxic potential, and there was no significant haemolysis when incubated, but it is done necessary to

¹ Discente do Curso de Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, Juazeiro do Norte - CE

² Docente do Curso de Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, Juazeiro do Norte - CE

perform more specific tests for a greater understanding of the isolated compound in cell membranes.

Key words: Cytotoxic, Eucalyptol, Erythrocyte.

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde caracteriza plantas medicinais, como determinado vegetal, que demonstre em seu organismo, princípios ativos que possuam atributos com fins terapêuticos (WHO, 2003).

As plantas medicinais são empregadas com a finalidade de prevenção e tratamento de determinadas patologias e conseqüentemente suavizar as manifestações clínicas das mesmas. Desde a origem do homem, os vegetais vem sendo aplicados no uso contra diversas patologias, pelo fato de possuir eficiência medicinal. Com o surgimento das primeiras culturas, pôde ser observado que algumas plantas apresentaram compostos em sua constituição, chamados de princípios ativos; os quais, ao serem avaliados frente à algumas doenças mostrou poder terapêutico, mesmo sendo testados sem características de um embasamento científico (BADKE et al., 2011).

Os óleos essenciais obtidos a partir de plantas medicinais são compostos bastante voláteis, que são extraídos do vegetal, onde está presente em folhas e caules de alguns grupos de vegetais, que apresenta compostos químicos diversificados, proporcionando distintas atividades biológicas. Essas atividades podem ser desempenhadas por seu composto majoritário ou pela associação de substâncias químicas na sua composição (OUSSALAH et al., 2007).

Já existe diversos estudos para avaliar a citotoxicidade de vários tipos de plantas com seus óleos vegetais, extratos e derivados. O teste de fragilidade osmótica é uma metodologia antiga, rápida e simples que a partir dela obtém-se informações importantes sobre a influência de produtos naturais com as membranas celulares (MAIWORM et al., 2008).

Segundo Freshney et al. (2016), estudos para medir a citotoxicidade de óleos vegetais e extratos e seus derivados, não tinha tanta importância até esse presente século, a forma como se manuseava o vegetal e obtenção dos seus componentes secundários, as formas como eram aplicada as substâncias ativas diretamente na pele, a citotoxicidade é caracterizada por trazer algumas, alterações na parede da membrana celular, onde pode acarretar uma possível inibição enzimática.

Bastante utilizada em várias partes do mundo o gênero *Eucalyptus*, possui diversas propriedades terapêuticas é cultivada a bastante tempo. Tendo como seu país de origem a Austrália, a erva do *Eucalyptus* possui um ótimo valor econômico, fazendo parte da

composição atividades medicinais (ESTANISLAU et al., 2001). Encontrado também em outras plantas como gengibre, alecrim, hortelã e canela. O principal composto majoritário encontrado no óleo essencial de *Eucalyptus* é o eucaliptol (1,8-cineol), que possui diversas atividades terapêuticas: cicatrizante, desinfetante, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica e antisséptica (ESFPM, 2012).

Nesse contexto, é indispensável à busca e compreensão de possíveis danos que esse produto natural pode ocasionar no organismo, minimizando seus riscos e melhorando a vida da população. Portanto o presente estudo teve como objetivo a avaliação citotóxica do eucaliptol frente a modelos eritrocitários.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 TIPO DE ESTUDO

A presente pesquisa trata-se de um estudo experimental, o qual consiste em determinar um objeto de estudo, selecionar as variáveis que seriam capazes de influenciá-lo, definir as formas de controle e de observação dos efeitos que a variável produz no objeto (GIL, 2002).

2.2 LOCAL E PERÍODO DE REALIZAÇÃO DOS TESTES

As atividades foram realizadas no Laboratório de Bioquímica do Centro Universitário Leão Sampaio (UNILEÃO), Juazeiro do Norte– CE, durante o período de Agosto a Outubro de 2018.

2.3 OBTENÇÃO DO EUCALIPTOL

O composto Eucaliptol foi cedido gentilmente pelo Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN) da Universidade Regional do Cariri (URCA), sob a coordenação do Dr. José Galberto Martins da Costa.

2.4 MATERIAL SANGUÍNEO E ASPECTOS ÉTICOS

O sangue foi fornecido pelos autores do trabalho e a amostra foi coletada por meio de punção venosa em tubos com anticoagulante citrato, cumprindo com todos os aspectos éticos especificados na Resolução 466/12, do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 2012).

2.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Foi realizada a avaliação da fragilidade osmótica das células vermelhas sanguíneas com amostras de suspensão de hemácias previamente lavadas com solução salina e incubadas com eucaliptol diluído em Dimetil Sulfóxido (DMSO) á 1%, em seis concentrações (5µg/mL, 10µg/mL, 25µg/mL, 50µg/mL, 100µg/mL, 200µg/mL), foram incubadas em banho-maria a (37°C) nos tempos de 1 hora e 2 horas. Após esse tempo estabelecido foram centrifugados a (1.500rpm por 15 min) e seus sobrenadantes foram isolados e lidos em espectrofotômetro de massa (540nm). O controle foi NaCl (0,9%). Após a centrifugação das amostras em diferentes concentrações obteve-se alíquotas de cada amostra que foram ressuspensas em 2mL de solução salina e foram confeccionados esfregaços corados com (May- Grunwald- Giensa) e lidos em microscopia óptica (x100) (BARROS et al., 2016).

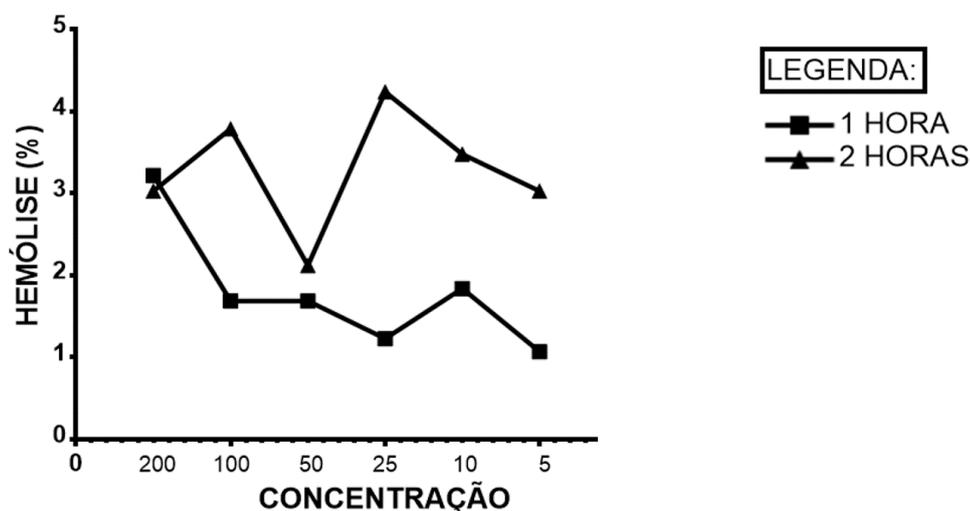
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada através do software Graph Pad Prism versão 3.0 do Windows. Os resultados foram analisados pelo programa Análise de Variância - ANOVA seguidamente pelo Teste de Student Newman Keuls. As análises estatísticas foram representadas pela Média \pm Erro Padrão da Média (EPM).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a leitura no espectrofotômetro, foi determinado o percentual de hemólise, e os resultados estão representados no gráfico 1, representado a seguir.

Gráfico 1: Fragilidade osmótica de amostras de sangue tratadas com diferentes concentrações de Eucaliptol



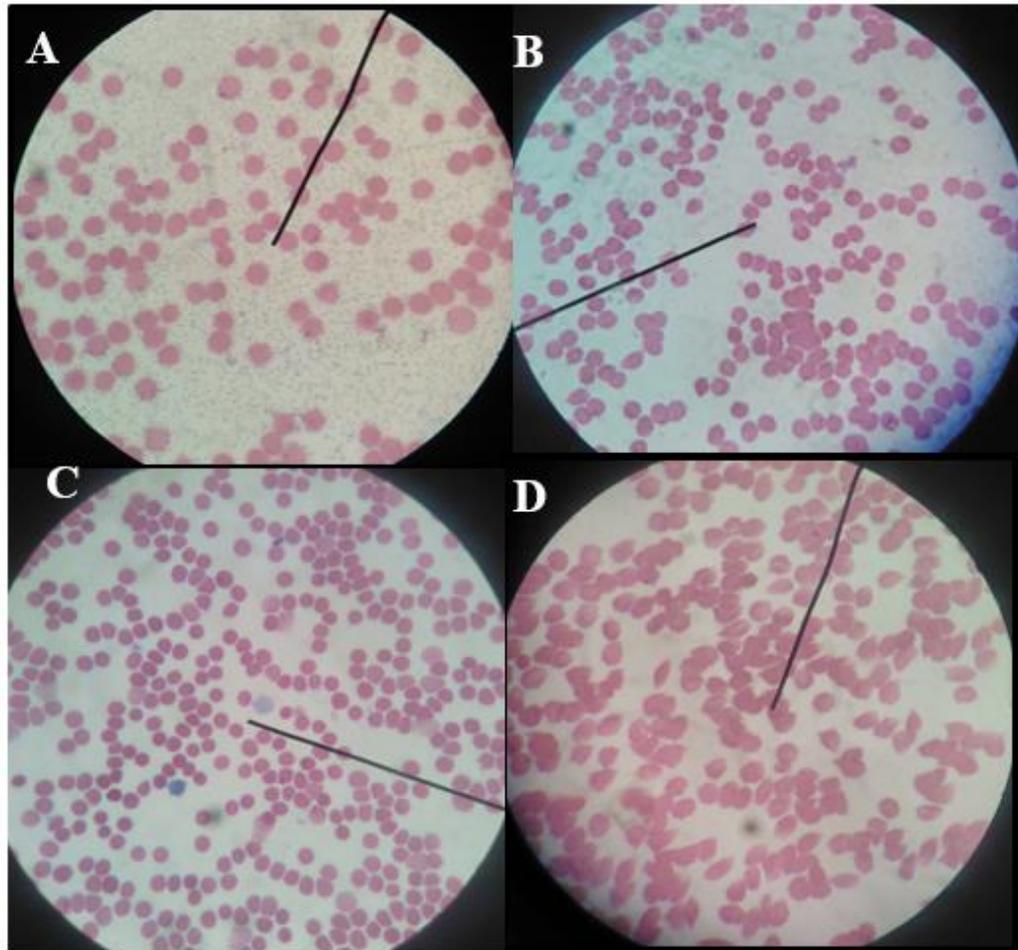
Os resultados do presente estudo indicam que nas concentrações de 5 a 100 µg/mL do composto isolado no tempo de 2 horas houve mais hemólise que no período de 1 hora, apenas na concentração 200 µg/mL o tempo de incubação não interferiu na fragilidade osmótica das hemácias em contato com o Eucaliptol.

Em relação à concentração do Eucaliptol, quanto menor a concentração da substância, maior o percentual de hemólise, com exceção da concentração de 50 µg/mL, que apresentou potencial citoprotetor com período de incubação de 2 horas. Porém em todas as concentrações, o percentual de hemólise não foi significativo, sendo inferior à 5% em todas as concentrações testadas.

Em pesquisas desenvolvidas para a avaliação da fragilidade osmótica de eritrócitos submetidos às duas concentrações (50% e 100%) de extrato bruto de *Turnera subulata*, Silva (2012) verificou que não houve hemólise significativa na concentração controle de 0,9% de solução salina, corroborando com o resultado apresentado no presente estudo.

Foram confeccionados e visualizados esfregaços dos precipitados da maior e da menor concentração do composto isolado utilizado (5µg/mL e 200µg/mL), no qual não foi notado alterações significativas em nenhuma das lâminas, como mostra na figura 1.

Figura 1: Visualização das lâminas nas concentrações de 5 μ g/mL e 200 μ g/mL, nos tempos de 1 e 2 horas



A: Concentração de 5 μ g/mL (1 hora). B: Concentração de 5 μ g/mL (2 horas). C: Concentração de 200 μ g/mL (1 hora). D: Concentração de 200 μ g/mL (2 horas)

Foi observado que o contato direto do Eucaliptol com os eritrócitos não acarretou alterações morfológicas significativas em sua membrana.

Segundo Didelon et al. (2000), as hemácias incubadas com produtos vegetais podem ocasionar uma alteração na sua estrutura e no seu citoesqueleto causado por modificações do grau de partição da estrutura destas células, caracterizando esse produto como citotóxico.

Pereira et al. (2009) em seu estudo utilizando extrato aquoso de folhas de *Indigofera Suffruticosa* sobre eritrócitos de ratos, indicaram que em todas as concentrações testadas (37,5; 75 e 150 mg/ml), não houve hemólise quando se utilizou solução salina na concentração de 0,9%, porém em concentrações menores que 0,5% de solução salina, o extrato utilizado conseguiu alterar o perfil da curva de fragilidade osmótica quando comparado com o grupo controle (0,9%).

O composto isolado eucaliptol não aumentou a fragilidade osmótica das células sanguíneas, sugerindo que esse produto não causa expressivas modificações na estrutura da membrana celular.

Diferentemente, de Barros et al. (2016), onde utilizando óleos essenciais das folhas de *Piper aduncum*, e da casca de *Cinnamomum zeylanicum*, observaram que esses produtos podem induzir efeitos tóxicos nas membranas dos glóbulos vermelhos, pois aumentaram de forma significativa a curva de fragilidade osmótica.

Em estudos desenvolvidos por Giani et al. (2007) e Mousinho et al. (2008) também puderam constatar modificações na estrutura osmótica em eritrócitos, quando utilizaram uma planta chinesa (*Buzhong Yi Qi Wan*) e extrato de *Ricinus communis L.*

4 CONCLUSÃO

Com o presente estudo, foi possível observar que o composto isolado eucaliptol frente aos modelos eritrocitários, não apresenta potencial citotóxico, pois quando incubado com eritrócitos, não ocasionou hemólise considerável. Porém, é necessário a realização de testes mais específicos para a elucidação do comportamento desse composto isolado em membranas celulares e avaliação da sua toxicidade.

REFERÊNCIAS

BADKE et al. Plantas medicinais: O saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Escola Anna Nery Revista de Enfermagem**. v.15, n. 1, 2011.

BARROS, F. J. et al. Activity of essential oils of *Piper aduncum* and *Cinnamomum zeylanicum* by evaluating osmotic and morphologic fragility of erythrocytes. **European Journal of Integrative Medicine**. v. 8, n. 4, 2016.

BRASIL, Conselho Nacional de Saúde. Resolução Nº 466 de 12 de dezembro de 2012. Aprova “**Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos**”. 2012.

DIDELON, J. et al. Osmotic fragility of the erythrocyte membrane: characterization by modeling of the transmittance curve as a function of NaCl concentration. **Biorheology**. v.37, n. 5-6, 2000.

ESFPM. **Eucaliptol**. Disponível em: <http://www.esfpm.com/outros/AL/MOLECULA%20do%20mes_Outubro.pdf>. Acesso em: 18 set 2012.

ESTANISLAU, A. A. et al. Composição Química e Atividade Antibacteriana dos Óleos Essenciais de Cinco Espécies de *Eucalyptus* Cultivadas em Goiás. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, 2001.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications**. 7ª Ed. Nova Jersey, EUA: Editora Wiley-Blackwell, 2016.

GIANI, T.S. et al. Assessment of effects of a formula used in the traditional Chinese medicine (*Buzhong Yi Qi Wan*) on the morphologic and osmotic fragility of red blood cells. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.17, n.4, 2007.

GIL, A. C. **Como elaborar projetos de pesquisa**. 4ª Ed. São Paulo: Editora Atlas, 2002.

MAIWORM, A. I et al. Osmotic and morphological effects on red blood cell membrane action of an aqueous extract of *Lantana camara*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.18, n. 1, 2008.

MOUSINHO, K. C. et al. Effect of the extract of *Ricinus communis* L. on the osmotic Fragility, labeling of red blood cells with Technetium-99m and morphology of the cells. **Brazilian archives of Biology and Technology**. v.51, n.6, 2008.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**. v. 18, n. 1, 2007.

PEREIRA, D. R. et al. Fragilidade Osmótica do extrato aquosos de folhas de *Indigofera suffruticosa* sobre eritrócitos de ratos. In: IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão (JEPEX), 2009, Recife. **IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão (JEPEX)**. Recife: IX JEPEX, v. 1, n. 1, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on good agricultural practices for medicinal plants**. Genebra, 2003.

SILVA, T. R. P. M. **Avaliação de Atividades biológicas da *Turnera subulata***. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) - Universidade Federal de Pernambuco, 2012.