

**Avaliação do efeito hemaglutinante e oxidante de**  
***Wissadula periplocifolia* (L.) C. Presl.**

SÁ, I.J.A.S<sup>1</sup>; PESSÔA H.L.F<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal da Paraíba. Cidade Universitária, sem nº - Campus I. João Pessoa, PB. 58059-900. [silveira.italo1@gmail.com](mailto:silveira.italo1@gmail.com)

<sup>2</sup> Universidade Federal da Paraíba. Cidade Universitária, sem nº - Campus I. João Pessoa, PB. 58059-900. [hilzeth@gmail.com](mailto:hilzeth@gmail.com)

**RESUMO:** *Wissadula periplocifolia* (L.) C. Presl. popularmente conhecida como jangadeira, pertence à família *Malvaceae*, da qual muitas espécies são largamente utilizadas na terapêutica. Apesar de muitas plantas serem usadas há séculos, não se pode afirmar que esse atributo, por si só, garanta a segurança de seu uso – desta forma, todos os produtos derivados de plantas que são usados como drogas devem ser avaliados a fim de garantir sua segurança em relação a efeitos tóxicos.. Este trabalho tem como objetivo geral avaliar os efeitos biológicos do extrato etanólico bruto de *Wissadula periplocifolia* (L.) C. Presl., e como objetivos específicos avaliar os efeitos hemaglutinante e antihemaglutinante e as atividade oxidante e antioxidante do mesmo extrato etanólico em hemácias humanas. Os efeitos hemaglutinante e antihemaglutinante foram evidenciados utilizando-se anticorpos monoclonais IgM específicos para os antígenos A e B. As atividades oxidante e antioxidante foram avaliadas através da quantidade de metahemoglobina formada na ausência e na presença de fenilhidrazina. O EEtOH não apresentou atividade hemaglutinante nas concentrações testadas, frente a eritrócitos dos tipos A e B, e apresentou atividade antihemaglutinante para os tipos sanguíneos citados. Não foi capaz de oxidar a hemoglobina humana, entretanto foi capaz de impedir a oxidação da hemoglobina na presença de fenilhidrazina. Assim, conclui-se, nas concentrações testadas, os testes realizados não evidenciaram efeitos nocivos do EEtOH de *W. periplocifolia* frente aos eritrócitos humanos dos grupos A e B. Observou-se, ainda, efeito antioxidante, sugerindo possíveis aplicações medicinais.

**Palavras-chave:** *Wissadula periplocifolia* (L.) C. Presl., efeito hemaglutinante, efeito oxidante.

**ABSTRACT:** *Wissadula periplocifolia* (L.) C. Presl., popularly known as white velvetleaf, belongs to the family Malvaceae, of which many species are used in therapeutics. Although many plants have been used for centuries, it can not be said that this attribute guarantees the safety of its use - in this way, all products derived from plants that are used as drugs should be evaluated for it. The objective of this work is to evaluate the biological effects of the crude ethanolic extract of *Wissadula periplocifolia* (L.) C. Presl., and as specific objectives to evaluate the haemagglutinating and antihaemagglutinating activities and the oxidant and antioxidant activities of the same ethanolic extract in human red blood cells. The haemagglutinating and antihaemagglutinating activities were evidenced using IgM monoclonal antibodies specific for antigens A and B. The oxidant and antioxidant activities were evaluated by the amount of methemoglobin formed in the absence and presence of phenylhydrazine. The EEtOH showed no haemagglutinating activity at the tested concentrations, against types A and B erythrocytes, and showed antihaemagglutinating activity for the blood types mentioned above. It was not able to oxidize human hemoglobin, however it was able to prevent the oxidation of hemoglobin in the presence of phenylhydrazine. Thus, it was concluded that the tests performed did not show harmful effects of *W. periplocifolia* EEtOH, in the tested concentrations, against the human erythrocytes of groups A and B. There was also an antioxidant effect in the tested concentrations, suggesting possible medicinal applications.

**Key words:** *Wissadula periplocifolia* (L.) C. Presl., Haemagglutinating activity, oxidant activity.

## INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 80% da população mundial utiliza plantas, a mais antiga e difundida forma de medicação (HALBERSTEIN, 2005), como fonte primária de diversos agentes medicinais (CORDELL, 1995; GURIB-FAKIM, 2006). Sua utilização como recurso terapêutico é baseada na cultura popular, constituindo um emprego predominantemente empírico. Apesar deste fato, as plantas continuam a ser usadas pela população, não sendo substituídas completamente pelos fármacos sintéticos por vários motivos, como sua eficácia, o custo elevado dos medicamentos alopáticos convencionais e a falta de acesso aos mesmos (COSTA, 1994; ROBBERS et al., 1997; SIMÕES et al., 2000).

Neste contexto de valorização das plantas medicinais, um impulso na busca de informações comprovadas cientificamente foi gerado, e verificou-se que a planta possui um laboratório químico único, no qual as células vegetais conseguem sintetizar substâncias complexas e fundamentais para a vida do homem, utilizando substâncias químicas simples e fontes de energias naturais (CASTELLANO, 1981). O número total de produtos naturais produzidos por plantas está estimado em 500.000 (DEMAIN, 2000).

Apesar de muitas plantas serem usadas há séculos e serem naturais, a associação popular de que este atributo, sozinho, garanta a segurança de seu uso é tão ingênua quanto supor que o seu tempo de uso comprova sua eficácia – assim, é extremamente importante que testes que avaliam genotoxicidade de preparações vegetais sejam realizados a fim de avaliar seu potencial mutagênico ou modulação da genotoxicidade quando associados com outras substâncias, para garantir a segurança dos seus usos. Desta forma, todos os produtos derivados de plantas que são usados com drogas devem ser avaliados através de métodos idênticos àqueles usados para novos compostos

sintéticos a fim de garantir sua segurança em relação a efeitos tóxicos e conhecimentos sobre efeitos secundários, interações, contra-indicações, mutagenicidade, assim como a existência de ensaios farmacológicos e experimentação clínica que demonstrem eficácia para esse tipo de medicamento (CUNHA, 2005). Esta prática inclui avaliação pré-clínica de segurança e eficácia, estudos controlados de fase clínica (placebo – controlados, randomizados, duplo – cegos, estatisticamente validados) com consentimento dos participantes da pesquisa e a exigência de que tais estudos sejam conduzidos de acordo com regulamentações federais (TALALAY; TALALAY, 2001).

É importante ressaltarmos o conhecimento de dois termos criados para melhor guiar a população a respeito da utilização das plantas; são estes: fitoterápicos e plantas medicinais. A OMS define planta medicinal como sendo "todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos", ou seja, as plantas medicinais são aquelas capazes de aliviar ou curar enfermidades e têm tradição de uso como remédio em uma população ou comunidade (VEIGA et al, 2005). Os responsáveis pelo efeito terapêutico que a planta medicinal possui são os princípios ativos (MONTANARI, 2002). Segundo a Agência de Vigilância Sanitária – ANVISA, medicamento fitoterápico é um produto obtido por processos tecnologicamente adequados, empregando exclusivamente matérias-primas vegetais, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico (BRASIL, 2004).

O extrato etanólico utilizado em nosso estudo é oriundo da espécie *Wissadula periplocifolia* (L.) C. Presl. (Figura 1), popularmente conhecida como jangadeira, pertencente à família *Malvaceae*, cuja distribuição geográfica começa das Antilhas, englobando o nordeste brasileiro (Figura 2). Muitas espécies desta família são largamente

utilizadas na terapêutica como emolientes, anti-febris, diuréticos, antiinflamatórios e em doenças reumáticas, dentre outras aplicações (SCHULTZ, 1968).



**FIGURA 1** – Flor e ramo da espécie *Wissadula periplocifolia* (L.) C. Presl.



**FIGURA 2** – Distribuição Global de *Wissadula periplocifolia* (pontos amarelos).

Recentemente foram isolados e purificados nessa espécie cinco constituintes químicos, sendo três flavonoides (um glicosilado e duas gliconas) e dois esteroides, todos inéditos nessa espécie (BOVINI, 2010; GOMES, 2011). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), há pesquisadores nordestinos que buscam identificar a ação dos flavonoides presentes em algumas espécies, como a *Wissadula periplocifolia*. O interesse específico nestes componentes deve-se à ação anti-inflamatória e anticâncer observadas em outros estudos. Há trabalhos publicados que relatam que flavonoides apresentaram atividade “in vivo” em sarcoma 180 e carcinoma de Ehrlich e que não foram tóxicos para as células “in vitro”.

O amplo emprego de plantas dessa família em práticas medicinais, bem como um possível efeito anti-câncer, é motivo suficiente para sua escolha como tema de estudos químicos e farmacológicos, visando seu melhor aproveitamento.

As disfunções na coagulação sanguínea estão associadas com a inflamação, complicações cardiovasculares, câncer, trombose venosa, tromboembolismo e outras patologias. Estudos na disfunção da coagulação, como a atividade hemaglutinante e antihemaglutinante, se fazem necessários devido aos efeitos indesejáveis da heparina e ao entendimento da fisiopatologia e do estado de hipercoagulação. A heparina não fracionada e as heparinas de baixo peso molecular são os únicos polissacarídeos sulfatados que são normalmente utilizados como agentes anticoagulantes. Porém, esses compostos têm vários efeitos colaterais tais como hemorragia e trombocitopenia. Além disso, há uma procura crescente por terapias contra a trombose o que indica a necessidade de buscar fontes alternativas de agentes anti-coagulantes (AZEVEDO et al., 2009).

A principal função do sangue é transportar os gases respiratórios,  $O_2$  e  $CO_2$ , entre os tecidos e os pulmões através da hemoglobina. Os eritrócitos contêm enzimas responsáveis pela produção de energia para manter a hemoglobina como oxihemoglobina, a forma reduzida e funcional da proteína (SIEMS et al., 2000). Entretanto, o íon ferro da hemoglobina está continuamente exposto a altas concentrações de oxigênio, o que resulta na sua lenta oxidação a metahemoglobina (metHB) ou ferrihemoglobina, que é incapaz de se ligar ou transportar oxigênio. Em condições normais o nível de metHB nos eritrócitos é mantida abaixo de 1% da hemoglobina total (MANSOURI et al., 1993). A formação de metHb *in vivo* pode ser reproduzida *in vitro* pela

exposição de uma suspensão de eritrócitos a um agente oxidante e a quantidade de metHB formada está diretamente relacionada com a extensão do stress oxidativo causado pelo agente. Da mesma forma, a exposição de eritrócitos a agentes antioxidantes presentes em misturas complexas, tais como os extratos vegetais, podem evitar a formação de metHb.

A efetividade do extrato em inibir a formação de metHb na presença de um agente oxidante pode ser utilizada como a medida da sua atividade antioxidante (CLARO et al., 2005; ARBOS et al. 2008). Há um interesse crescente em antioxidantes naturais oriundos especificamente de vegetais, uma vez que vários dados epidemiológicos sugerem o seu efeito protetor frente a uma lista crescente de doenças (CAO et al., 1996; LONG; HALLIWELL, 2001; LEONARD et al., 2002).

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar os efeitos biológicos do extrato etanólico bruto de *Wissadula periplocifolia* (L.) C. Presl., e como objetivos específicos avaliar os efeitos hemaglutinante e antihemaglutinante e as atividade oxidante e antioxidante do mesmo extrato etanólico em hemácias humanas, para que se possa analisar a segurança de seu uso pela população humana.

## METODOLOGIA

### MATERIAL VEGETAL

A espécie *Wissadula periplocifolia* (L.) C. Presl., popularmente conhecida como jangadeira, pertencente à família *Malvaceae*, foi coletada na Pedra da Boca, município de Araruna – PB, em agosto de 2005. A identificação botânica foi realizada pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria de Fátima Agra, do Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais LTF/DCF/UFPB. Uma exsicata do material encontra-se arquivada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (CCEN/UFPB) sob a numeração 6498.

### OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO de *Wissadula periplocifolia*

O material botânico fresco (3 kg), composto por cascas do caule, foi desidratado em estufa à temperatura média de 40° C durante 96 horas, sendo em seguida triturado para obtenção de pó. O material moído (1.000 g) foi macerado em etanol (EtOH) a 95% por 72 horas, sendo tal processo repetido até total extração dos constituintes químicos. A solução etanólica foi concentrada em rotaevaporador a 50° C, fornecendo extrato etanólico bruto.

### PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra do EEtOHB de *Wissadula periplocifolia*, na concentração de 10 mg/ml, foi solubilizada em Tween 80 a 0,4% e dissolvida em água destilada.

## ERITRÓCITOS HUMANOS

Os eritrócitos humanos (A, B e O) foram oriundos de sangue para descarte da Unidade Transfusional do Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB. A manipulação e o descarte dos eritrócitos foram realizados de acordo com as Normas de Segurança seguidas pela referida Unidade.

## ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE E ANTIHEMAGLUTINANTE

A amostra (1, 10, 100 e 1000 µg) foi diluída em NaCl 0,9% e foram adicionadas a suspensões de eritrócitos 5% (1 mL). Após um período de incubação de 1 hora sob agitação lenta (100 rpm) e à temperatura ambiente, foram adicionados, em preparações diferentes, uma gota (50 µL) dos anticorpos monoclonais IgM específicos para os antígenos A e B (BIORAD). A hemaglutinação foi visualizada a olho desarmado e confirmada com a utilização de lupa. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

## ATIVIDADE OXIDANTE E ANTIOXIDANTE

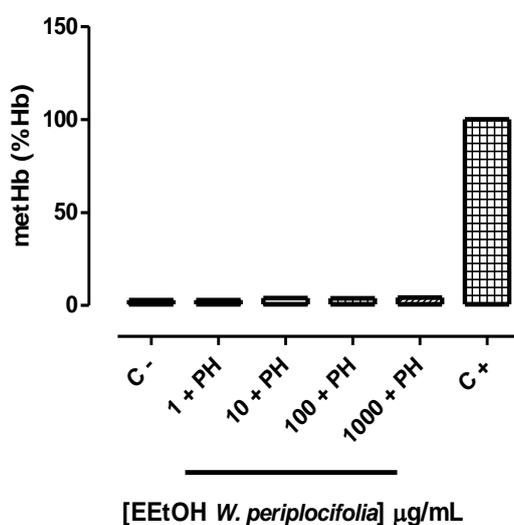
A amostra (1, 10, 100 e 1000 µg) ou a vitamina C (20 mmol/L) foram previamente diluídas em salina tamponada com fosfato e suplementada com glicose (200 mg/dL), de pH 7,6, sendo então adicionadas a suspensões de eritrócitos 33% (1 mL) . Após um período de incubação de 1 hora, sob agitação (100 rpm) e à temperatura ambiente, foi adicionado um agente oxidante, a fenilhidrazina (PH) (1 mmol/L). As amostras foram então aeradas e

mantidas sob agitação por mais 20 minutos. A incubação dos eritrócitos na presença de PH gera radicais livres que resultam na formação de altos níveis de metemoglobina (metHb) que estarão diretamente relacionados com a extensão do estresse oxidativo produzido. A redução nos níveis de metHb devido a vitamina C (antioxidante) ou uma possível ação antioxidante do extrato serão quantificados por espectrofotometria, a 540 e 630 nm, como uma porcentagem da hemoglobina total (WEFFORT-SANTOS et al.,2008). Valores de metHb até 2% da Hb total são considerados normais enquanto que valores acima de 4% são elevados. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e os valores de metHb serão expressos como média aritmética simples. Foi utilizado o software estatístico Prisma para análise dos dados e elaboração de gráficos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

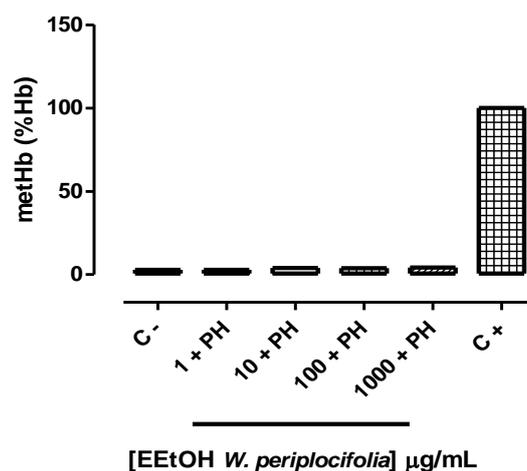
Sob as condições citadas, o extrato etanólico de *W. periplocifolia* não provocou aglutinação no sangue dos tipo A e B, e apresentou atividade antiaglutinante nos referidos tipos sanguíneos.

O EEtOH de *W. periplocifolia* não apresentou efeito oxidante (Gráfico 1).



**GRÁFICO 1** – Efeito oxidante do EEtOH das cascas do caule de *W. periplocifolia* em eritrócitos humanos. C – (hemoglobina) e C + (hemoglobina + PH).

O EEtOH das cascas do caule de extrato etanólico de *W. periplocifolia* impediu a formação de metahemoglobina induzida pela fenilhidrazina em todas as concentrações testadas (Gráfico 2).



**GRÁFICO 2** – Efeito antioxidante do EEtOH das cascas do caule de *W. periplocifolia* em eritrócitos humanos. C – (hemoglobina) e C + (hemoglobina + PH).

A ausência de atividade hemaglutinante e oxidante revela que, nas concentrações testadas, o EEtOH bruto de *W. periplocifolia* não apresenta efeitos nocivos aos eritrócitos humanos dos grupos A e B, de forma que reflète a segurança da administração de tal composto aos seres humanos deste grupo sanguíneo para os eventos testados no estudo.

Acredita-se que o efeito antioxidante observado em membros da família *Malvaceae* seja decorrente da sua alta concentração de compostos fenólicos (Oliveira et al., 2012), que são metabólicos secundários universalmente presentes em árvores de grande porte (Robards et al., 1999). Flavonoides são compostos polifenólicos de baixa massa molecular, com reconhecida atividade antiinflamatória e antioxidante (Trueba, 2001). No que se refere à *W. periplocifolia*, estudos sugerem que o flavonóide tirilósido possa contribuir para o efeito antioxidante demonstrado (Oliveira et al., 1999). A propriedade antioxidante encontrada sugere que *W. periplocifolia* possa ser empregada no tratamento de diversas patologias em que se observe o aumento da produção de radicais livres (CAO et al., 1996).

Assim, conclui-se que os testes realizados não evidenciaram efeitos nocivos do EEtOH das cascas do caule de *W. periplocifolia*, nas concentrações testadas, frente aos eritrócitos humanos do grupo A e B. Observou-se, ainda, efeito antioxidante nas concentrações testadas, sugerindo possíveis aplicações medicinais.

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo financiamento da pesquisa.

Agradeço à professora dra. Hilzeth Luna, que me introduziu ao mundo da pesquisa científica, sempre paciente e dedicada aos seus orientandos.

Agradeço aos meus pais e família, que sempre acreditaram em mim e tornaram esse sonho possível.

Agradeço aos meus amigos, que tornaram estes anos morando longe de casa mais agradáveis e repletos de boas memórias.

## REFERÊNCIAS

ARBOS, K.A.; CLARO, L.M.; BORGES, L.; SANTOS, C.A.M.; WEFFORT-SANTOS, M. Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. **Nutrition Research**, v. 28, p. 457-463, 2008.

BOVINI, M.G.; CARVALHO-OKANO, R.M.; VIEIRA, M.F. Malvaceae A. Juss. No Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 52, p. 17-47, 2001.

CAO, G.; BOOTH, S.L.; BOOTH, S.L.; PRIOR, R.L. Food-borne nitrates and nitrites as a cause of methemoglobinemia. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 27, p. 189-192, 1996.

CLARO, L.M.; LEONART, M.S.; COMAR, S.R. NASCIMENTO, A.J. Effect of vitamins C e E on oxidative process in human erythrocytes. **Cell Biochemistry and Function**, v. 24, p. 531-535, 2005.

DINIZ, M.F.F.M. et al. **Memento de Plantas Mediciniais**, Editora Universitária-UFPB, 2ª Edição, p.79-81, 2006.

GOMES, R.A. **Estudo Fitoquímico de *Sidastrum micrathum* (A. St.-Hil) Fryxell e *Wissadula periplocifolia* (L.) C. Presi: uma contribuição à Quimiotaxonomia da Família Malvaceae**. 2011. 312 páginas. Tese (Doutorado em Farmacologia), UFPB, João Pessoa.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs tomorrow. **Molecular**

**Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.

LEONARD, S.S.; CUTLER, D.; DING, M.; VALLYATHAN, V.; CASTRANOVA, V.; SHI, X.  
Antioxidant properties of fruit and vegetable juices: more to the story than ascorbic acid.

**Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 32, p. 193-200, 2002.

LONG, L.H.; HALLIWELL, B. Oxidation and Generation of Hydrogen Peroxide by Thiol Compounds in Commonly Used Cell Culture Media. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 286, p. 991–994, 2001.

MANSOURI, A.; LURIE, A. A. Concise review : methemoglobinemia. **American Journal of Hematology**, v. 42, p. 7-12, 1993.

OLIVEIRA, R.L.C.; LINS NETO, E.M.F.; ARAÚJO, E.L.; ALBUQUERQUE, U.P.  
Conservation priorities and population structure of woody medicinal plants in an area of caatinga vegetation (Pernambuco State, NE Brazil). **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 132, p. 189-206, 2007.

SIEMS, W. G.; SOMMERBURG, O.; GRUNE, T. Erythrocyte free radical and energy metabolism. **Clinical Nephrology**, v. 53, p.9-17, 2000.

TALALAY, P.; TALALAY; P. The importance of Using Scientific Principles in the Development of Medicinal Agents from Plants. **Academic Medicine**, v. 76, p. 238-247, 2001.