

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DE *Bromelia antiacantha* BERTOL. (BROMELIACEAE)

Liliana Maria Manetti¹
Andersson Franklin Turra²
Orlando Seiko Takemura²
Antonio Laverde JR^{1,2*}

MANETTI, L. M.; TURRA, A. F.; TAKEMURA, O. S.; LAVERDE JR, A. Avaliação da atividade hemolítica de *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). *Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR*, Umuarama, v. 14, n. 1, p. 43-47, jan./abr. 2010.

RESUMO: A espécie *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae), conhecida como caraguatá ou gravatá, foi avaliada quanto à sua propriedade hemolítica frente a hemácias de sangue de carneiro. O extrato aquoso dos frutos apresentou atividade hemolítica a partir da diluição de 0,85%, enquanto que o extrato aquoso das folhas apresentou hemólise a partir da diluição de 0,90%. Tal atividade pode estar relacionada à presença de saponinas, uma vez que o estudo químico do extrato metanólico das folhas resultou no isolamento da saponina daucoesterol, um fitoesterol glicosilado.

PALAVRAS-CHAVE: Bromeliaceae; Caraguatá; Atividade hemolítica, β -sitosterol D-glicosilado; Daucoesterol.

HAEMOLYTIC ACTIVITY EVALUATION OF *Bromelia antiacantha* BERTOL. (BROMELIACEAE)

ABSTRACT: The specie *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae), popularly known as caraguatá or gravatá, was evaluated as for its hemolytic property against sheep red blood cells. The aqueous extract of the fruits presented hemolytic activity starting from the dilution of 0,85%, while the aqueous extract of the leaves presented hemolysis starting from the dilution of 0,90%. The activity should be related to the presence of saponins, once the chemical study of the leaves methanolic extract resulted in the isolation of the saponin daucoesterol, a glycosylated phytosterol.

KEYWORDS: Bromeliaceae; Caraguatá; Hemolytic activity; Glycosylated β -sitosterol; Daucoesterol.

Introdução

A espécie *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae) apresenta características medicinais, alimentícias, ornamentais e industriais reunindo em uma única espécie um potencial múltiplo de aplicações (REITZ, 1983; LORENZI; MATOS, 2002). Esta espécie é nativa da região sul e sudeste do Brasil, onde é conhecida popularmente como caraguatá ou gravatá. Apresenta hábito terrestre e forma densos agrupamentos (reboleiras), sendo usada em pequenas propriedades agrícolas como cerca viva e na extração de fibras (REITZ, 1983). Seus frutos são ácidos, purgativos, diuréticos, vermífugos e até abortivos. A polpa carnosa do fruto, preparada na forma de xarope, é empregada em casos de asma, bronquite e ancilostomíase, bem como para eliminar pedras nos rins, para o tratamento da icterícia e hidropsia (edema) (REITZ, 1983; CORREA, 1984; LORENZI; MATOS, 2002; ANDRIGHETTI-FROHNER et al., 2005).

Apesar de seu uso na medicina popular, esta espécie ainda possui poucos estudos com relação às suas propriedades farmacológicas. Segundo Brehmer (2005), o extrato metanólico dos frutos de *B. antiacantha*, na dose de 400mg/kg, reduziu o crescimento de tumor ascítico Ehrlich, mas não teve efeito sobre a hematopoese. Em estudo recente, Santos et al. (2009) relataram que nenhuma citotoxicidade foi observada

em fibroblastos L929 para extratos aquoso, metanólico e lipídico dos frutos de *B. antiacantha* entre 500 e 0,01 $\mu\text{g/mL}$, assim como uma baixa genotoxicidade (1000 $\mu\text{g/mL}$). Testes realizados para a determinação do potencial citotóxico dos extratos de frutos e folhas de *B. antiacantha* por meio do bioensaio de letalidade sobre náuplios de *Artemia salina* Leach, indicaram baixa atividade citotóxica, com valores de DL_{50} em torno de 620 e 360 $\mu\text{g/mL}$, para os extratos alcoólicos dos frutos e das folhas, respectivamente (MANETTI et al., 2010).

Quanto à composição química desta bromeliácea, Santos et al. (2009) mostraram recentemente que os frutos são constituídos por carboidratos (45%), basicamente monossacarídeos ácidos, e lipídios (18%), representados principalmente pelos ácidos palmítico (30,1%), linoleico (30,7%) e oleico (20,1%). Análises fitoquímicas da espécie indicaram a presença de saponinas (WASICKY; HOEHNE, 1951), flavonóides e taninos (JORGE; FERRO, 1993).

Dando continuidade ao estudo de propriedades biológicas da espécie *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae), o presente trabalho teve como objetivo avaliar as propriedades hemolíticas de extratos das folhas e frutos da mesma, além da investigação da natureza química dos metabólitos secundários responsáveis por esta atividade biológica.

¹Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Instituto de Ciências Exatas, Agrárias, Tecnológicas e Geociências, Universidade Paranaense.

²Laboratório de Produtos Naturais, Curso de Farmácia, Instituto de Ciências Biológicas, Médicas e da Saúde, Universidade Paranaense. Praça Mascarenhas de Moraes, s/n, cx. p. 224, 87502-210 - Umuarama PR, Brasil.

Material e Método

Material vegetal

As folhas e frutos de *Bromelia antiacantha* foram coletados no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Paranaense (UNIPAR - Umuarama - PR) em abril de 2007 e 2008, respectivamente. A planta foi identificada pela botânica Profa. Dr^a. Ezilda Jacomassi, do Instituto de Ciências Biológicas, Médicas e da Saúde da UNIPAR – Campus Umuarama. Uma exsicata do material vegetal encontra-se depositada no Herbário Educacional da UNIPAR (Campus Paranavaí) sob o registro HEUP-2268.

Preparação dos extratos

As folhas foram secas em estufa a 35 °C, com circulação de ar e em seguida, pulverizadas em trituradores. Parte do material foi submetida à maceração em etanol, para a obtenção do extrato bruto das folhas (EFO). Enquanto outra parte do material seco e pulverizado foi submetida à repetidas extrações com solventes de polaridades crescentes utilizando um extrator Soxhlet, resultando nos extratos hexânico (EFOH), extrato de acetato de etila (EFOA) e extrato metanólico (EFOM). Todos os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo sob vácuo em temperatura de 50 °C e, posteriormente, armazenado em congelador.

Os frutos frescos e parte das folhas secas pulverizadas foram submetidos à decocção (1g da amostra/30 mL de água), resultando nos extratos aquosos dos frutos e folhas, respectivamente. O decocto foi resfriado, filtrado e disponibilizado para o teste de atividade hemolítica.

Determinação da atividade hemolítica

O índice de hemólise dos extratos aquosos foi realizado conforme a metodologia descrita pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1998). Os extratos foram diluídos sucessivamente em concentrações a partir de 0,40 a 1,00%, em intervalos de 0,05%. Posteriormente, foi adicionado a cada uma das amostras uma solução (1,00 mL) tampão fosfato (pH 7,4) e 1,00 mL de suspensão (2%) de sangue contendo hemácias de carneiro. Os tubos foram homogeneizados e deixados em repouso por 6 horas à temperatura ambiente. O experimento foi realizado em triplicata, utilizando-se como controle negativo 1,00 mL de tampão fosfato (pH 7,4) e 1,00 mL de suspensão (2%) de sangue e como controle positivo,

1,00 mL de solução aquosa de extrato de salsaparilha (*Smilax* sp) na concentração de 2%.

Fracionamento cromatográfico

Cerca de 6,78g do extrato metanólico (EFOM) foi submetido à coluna cromatográfica em sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm), utilizando diclorometano como solvente de empacotamento e aumentando-se gradativamente a polaridade da fase móvel com diclorometano 100%, diclorometano/metanol (10%, 20%, 50%), metanol 100% e metanol/água a 10%. Foram coletadas seis frações (A-F, 100 mL cada), as quais foram concentradas e monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD), em cromatoplas de alumínio constituídas de sílica gel GF₂₅₄. As cromatoplas foram reveladas por meio de irradiação com luz ultravioleta em comprimentos de onda de 254 e 366 nm seguida de aquecimento após serem borrifadas com uma solução de vanilina ácida. A fração B (4,32g) foi refracionada em 104 frações, as quais foram reunidas em 13 novas subfrações (B1-B13). A fração B11 foi purificada por cromatografia em coluna, resultando no isolamento do **composto BA1**. Este e outros compostos isolados foram submetidos a análises espectrométricas por ressonância magnética nuclear (RMN).

Análises de RMN

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C foram obtidos em espectrômetro Varian GEMINI 2000, operando a 300,070 MHz para ¹H e 75,460 MHz para ¹³C, tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em ppm, utilizando-se uma mistura de CDCl₃/CD₃OD (4:1) como solvente.

Resultados e Discussão

No presente estudo, o teste de hemólise de sangue de carneiro *in vitro* foi empregado para a avaliação da atividade hemolítica das folhas e frutos de *B. antiacantha*.

A hemólise total da solução foi observada nas diluições de 0,85% e 1,00%, para os frutos, e 0,90% e 1,00% para as folhas. A hemólise parcial ocorreu a partir da diluição de 0,70% para os frutos e folhas. Nas demais diluições não foram observadas hemólise.

Uma vez que se constatou a ação hemolítica nas hemácias de carneiro, foi avaliada a possibilidade de se associar este efeito com a presença de

compostos saponínicos no extrato polar de *B. antiacantha*. Wasick e Hoehne (1951) relataram a presença de saponinas nas folhas e frutos desta planta em triagem fitoquímica realizada com esta espécie. Considerando a possibilidade de encontrar esta classe de compostos nesta espécie, foi realizada a investigação química da porção mais polar do extrato das folhas obtida por Soxhlet. O extrato metanólico (EFOM) foi fracionado em coluna cromatográfica resultando em algumas subfrações. Após vários refracionamentos

e purificações, foi isolado um composto cristalino branco, o qual foi denominado de composto BA1. Após realizar análises espectroscópicas de RMN de ^1H e ^{13}C do composto BA1 e comparar os deslocamentos químicos obtidos com dados da literatura (LENDL et al., 2005; SAXENA; ALBERT, 2005), o mesmo foi identificado como sendo o daucosterol ou β -sitosterol glicosilado (**Figura 1**). Os dados de RMN de ^{13}C do composto BA1, do daucosterol e do β -sitosterol foram organizados na Tabela 1.

Tabela 1: Dados de RMN dos deslocamentos químicos (ppm) RMN de ^{13}C do daucosterol.

	composto BA1a (δ ppm)	Daucosterolb (LENDL et al., 2005) (δ ppm)	β -sitosterolc (SAXENA; ALBERT, 2005) (δ ppm)
C-1	37,01	36.8	37,0
C-2	29,27	29.0	29,5
C-3	78,77	78.4	79,9
C-4	38,34	38.1	38,7
C-5	140,12	139.9	140,2
C-6	121,76	121.4	121,9
C-7	29,38	31.4	31,7
C-8	31,64	31.4	32,2
C-9	49,97	49.7	50,5
C10	36,43	36.2	36,6
C-11	20,77	20.5	21,0
C-12	39,51	39.3	39,6
C-13	42,05	41.8	42,2
C-14	56,52	56.3	56,6
C-15	23,96	23.7	24,2
C-16	27,94	27.7	28,1
C-17	55,78	55.5	55,9
C-18	11,41	11.1	11,6
C-19	18,49	18.5	19,2
C-20	35,86	35.6	36,0
C-21	18,33	18.0	18,6
C-22	33,65	33.4	34,0
C-23	25,71	25.4	26,0
C-24	45,60	45.4	45,7
C-25	28,84	28.6	29,2
C-26	19,29	18.1	19,6
C-27	18,88	18.9	18,9
C-28	22,74	22.5	23,0
C-29	11,44	11.1	11,8
C-1'	100,89	100.6	-
C-2'	73,35	73.1	-
C-3'	76,31	76.1	-
C-4'	69,93	69.7	-
C-5'	75,81	75.6	-
C-6'	61,40	61.1	-

Solventes deuterados: ^aCDCl₃/CD₃OD (4:1); ^bCDCl₃/CD₃OD (1:1); ^cCDCl₃.

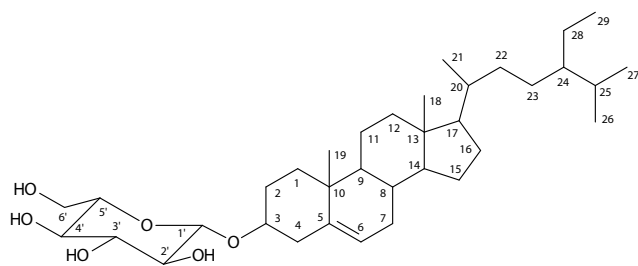


Figura 1: Estrutura química da saponina daucosterol.

A aglicona do daucosterol, o β -sitosterol, é um dos fitoesteróis mais comuns encontrados na natureza, o qual se assemelha em estrutura e função com o colesterol. O daucosterol é a forma glicosilada do β -sitosterol, sendo considerada, portanto, uma saponina, já que esta classe de compostos se refere aos compostos glicosídicos com esqueleto do tipo esteróide ou triterpênico. Normalmente, as saponinas se dissolvem em água dando origem a soluções afofoenas (espumantes), devido à sua ação tensoativa. Também são capazes de emulsionar óleos e produzir hemólise (HASSAN et al., 2010). Embora o mecanismo exato da ruptura das membranas das hemácias (hemólise) por saponinas ainda não seja claramente elucidado, sabe-se que ele está correlacionado com suas propriedades anfílicas. A principal hipótese considera que as saponinas interagem com membranas lipídicas de células e formam complexos insolúveis com o colesterol levando à formação de poros, permeabilização das células e da subsequente perda de hemoglobina no meio extracelular (GAUTHIER et al., 2009).

Segundo Kim et al. (2003), o daucosterol apresentou efeito inibitório sobre a sortase, uma proteína envolvida nos processos de secreção e ancoramento de proteínas nas paredes celulares de bactérias Gram-positivas. A atividade do β -sitosterol glicosilado está relacionada apenas ao composto glicosídeo, uma vez que o β -sitosterol na forma de aglicona não apresentou atividade antibacteriana. O daucosterol ou β -sitosterol glicosilado foi identificado anteriormente em Bromeliaceae apenas na espécie *Ananas erectifolius* (MARQUES, GUTIÉRREZ, DEL RIO, 2007) e está sendo relatado pela primeira vez na espécie *Bromelia antiacantha*.

Além desta saponina, outros compostos isolados da fração metanólica foram analisados por RMN e identificados preliminarmente como compostos fenólicos. Várias espécies da família Bromeliaceae apresentam compostos fenólicos, principalmente flavonóides e derivados de ácidos cinâmicos, muitos dos quais com estruturas muito semelhantes entre si (MANETTI, DELAPORTE, LAVERDE JR., 2009).

Assim, alguns dos compostos fenólicos isolados do extrato EFOM, provavelmente estejam relacionados a substâncias destas classes químicas.

Conclusões

Os extratos aquosos das folhas e frutos de *Bromelia antiacantha* Bertol. demonstraram hemólise frente a hemácias de carneiro, podendo este efeito estar relacionado à presença de compostos saponínicos neste vegetal, incluindo o daucosterol, atividade já relatada por outros autores. O presente trabalho consiste no primeiro relato desta substância na espécie *B. antiacantha*, fato que contribui com o conhecimento da composição química de espécies desta família.

Agradecimentos

Nossos agradecimentos à Universidade Paranaense (UNIPAR) pelo apoio financeiro recebido e à Diretoria Executiva de Gestão da Pesquisa e da Pós-Graduação (DEGPP) pelo incentivo aos programas institucionais de iniciação científica (PIC e PIBIC) e de pesquisa docente. Estendemos nossos agradecimentos à Profa. Dr^a. Ezilda Jacomassi (UNIPAR, campus sede) pela identificação botânica da planta e ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá (UEM) pelas análises de RMN.

Referências

- BREHMER, J. S. **Estudo de extratos de plantas medicinais no desenvolvimento do tumor ascítico ehrlich**. 2005. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.
- CORREA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. v. 2, p. 437.
- FROHNER, C. R. A. et al. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. **Fito-terapia**, v. 76, p. 374-378, 2005.
- GAUTHIER, C. et al. Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 2002-2008, 2009.
- HASSAN, S. M. et al. Haemolytic and antimicro-

bial activities of saponin-rich extracts from guar meal. **Food Chemistry**, v. 119, p. 600-605, 2010.

JORGE, L. I.; FERRO, V. O. Reconhecimento da espécie *Bromelia antiacantha* Bertol. Características botânicas e fitoquímicas. **Revista Farmácia Bioquímica USP**, v. 29, p. 69-72, 1993.

KIM, S. H. et al. Inhibition of sortase, a bacterial surface protein anchoring of transpeptidase, by β -sitosterol-3-*O*-glucopyranoside from *Fritillaria verticillata*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 67, n. 11, p. 2477-2479, 2003.

LENDL, A. et al. Phenolic and terpenoid compounds from *Chione venosa* (SW.) URBAN var. *venosa* (Bois Bandé). **Phytochemistry**, v. 66, n. 19, p. 2381-2387, 2005.

LORENZI, H. E.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Nova Odessa-Instituto Plantarum, 2002. 512 p.

MANETTI, L. M.; DELAPORTE, R. R.; LAVERDE JÚNIOR, A. Metabólitos secundários da família Bromeliaceae. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1885-1897, 2009.

MANETTI, L. M. et al. Avaliação das atividades antimicrobiana, citotóxica, moluscicida e antioxidante de *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 4, p. 406-413, 2010.

MARQUES, G.; GUTIÉRREZ, A.; DEL RIO, J. C. Chemical characterization of lignin and lipophilic fractions from leaf fibers of curaua. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 1327-1336, 2007.

REITZ, R. **Bromeliáceas e a malária: bromélia endêmica**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1983. 856 p.

SANTOS, V. N. C. et al. Ripe fruits of *Bromelia antiacantha*: investigations on the chemical and bioactivity profile. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2A, p. 358-365, 2009.

SAXENA, V. K.; ALBERT, S. β -Sitosterol-3-*O*- β -D-xylopyranoside from the flowers of *Tridax procumbens* Linn. **Journal of Chemical Sciences**, v. 117, n. 3, p. 263-266, 2005.

VALLÉS, D.; FURTADO, S.; CANTERA, A. M. B. Characterization of news proteolytic enzymes from ripe fruits of *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 409-413, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneve, Switzerland, 1998.

WASICKY, R.; HOEHNE, W. Conteúdo em "saponinas brutas" de algumas plantas brasileiras. **Anais Fac. Farm. e Odont. Univ. São Paulo**, v. 9, p. 17-26, 1951.

Recebido em: 21/10/2009

Aceito em: 03/03/2010

Received on: 21/10/2009

Acaccepted on: 03/03/2010