



## Toxicidade *in vitro* de plantas tóxicas: avaliação do teste de ação hemolítica

*In vitro* toxicity of poisonous plants: evaluation of hemolytic activity assay

Nebson Fernandes Pequeno<sup>1</sup> & Benito Soto-Blanco<sup>1</sup>

### RESUMO

As plantas tóxicas são importantes causas de patologias em animais de interesse pecuário no Brasil. Para que uma planta apontada como responsável por intoxicações acidentais venha a ser classificada como espécie tóxica, sua toxicidade deve ser comprovada experimentalmente em animais. No entanto, a sociedade atual vem clamando por redução na utilização de animais em pesquisas científicas, fazendo com que testes de toxicidade *in vitro* sejam cada vez mais empregados. Como falta validação para o uso destes testes para avaliação de plantas tóxicas, seu uso prático se torna inviável. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficácia do teste de ação hemolítica *in vitro* para avaliação preliminar da toxicidade de plantas, usando espécies com toxicidade conhecida. As espécies de plantas usadas foram *Crotalaria retusa*, *Ipomoea asarifolia*, *Ipomoea fistulosa*, *Datura stramonium*, *Nerium oleander*, *Ricinus communis*, *Lantana camara*, *Dieffenbachia picta* e *Alocacia* sp. e *Calotropis procera*. Todas estas amostras foram submetidas à avaliação da ação hemolítica *in vitro*, utilizando-se uma suspensão de eritrócitos de equino. Nenhuma das plantas utilizadas apresentou este efeito hemolítico. Assim, é possível afirmar que a utilização do teste de hemólise *in vitro* é ineficaz para a avaliação preliminar, como triagem, de plantas tóxicas. Deste modo, o uso de animais de laboratório atualmente permanece sendo a forma mais eficaz de identificação de novas espécies de plantas tóxicas.

**Descritores:** plantas tóxicas, *in vitro*, testes de toxicidade.

### ABSTRACT

Poisonous plants are important causes of diseases in Brazilian livestock. To be considered as poisonous plant to livestock, a plant must have confirmed this toxicity to experimental animals. However, nowadays society has claimed for reduction on use of animals for scientific research, resulting in increment on demand for *in vitro* toxicity assays. But assays for evaluation of poisonous plants are still lacking, resulting that their use as a routine procedure is unfeasible. Thus, the aim of the present work was to evaluate the efficacy of *in vitro* hemolytic activity assay for trial testing of plant toxicity, using species which toxicity already demonstrated. The plant species utilized were *Crotalaria retusa*, *Ipomoea asarifolia*, *Ipomoea fistulosa*, *Datura stramonium*, *Nerium oleander*, *Ricinus communis*, *Lantana camara*, *Dieffenbachia picta* e *Alocacia* sp., and *Calotropis procera*. Samples of all species were submitted to evaluation of *in vitro* hemolytic activity with equine erythrocytes. Any of tested plants presented the hemolytic action. Thus, it is feasible to assume that *in vitro* hemolytic activity assay presents very limited importance for trial of toxicity in plants. So, the use of laboratory animals is still the only efficacious way for identification of new species of poisonous plants.

**Key words:** poisonous plants, *in vitro*, toxicity assay.

## INTRODUÇÃO

Pode-se definir como planta tóxica de interesse pecuário aquela que, quando ingerida pelos animais de interesse zootécnico sob condições naturais, causa danos à saúde, e pode ser letal [18]. As toxinas presentes nas plantas podem influenciar diretamente na produção animal [4,17], sendo capazes de promover enormes prejuízos ao agronegócio [9,17]. Deste modo, para reduzir estes prejuízos podem ser adotadas de medidas profiláticas adequadas. No entanto, a prevenção à toxicose depende do estabelecimento de diagnósticos corretos e específicos. Neste sentido, o diagnóstico vago de intoxicação por planta não é suficiente, pois não ajuda a resolver o problema [17,18].

Para que uma planta apontada como responsável por intoxicações acidentais e venha a ser classificada como espécie tóxica de interesse pecuário, sua toxicidade deve ser comprovada experimentalmente. Esta reprodução experimental tem de ser realizada na mesma espécie animal naturalmente afetada, uma vez que há muitas diferenças na susceptibilidade aos efeitos das plantas tóxicas entre as espécies [4,18].

A sociedade atual vem clamando por redução na utilização de animais para pesquisas científicas, fazendo com que testes *in vitro* sejam cada vez mais empregados. Entretanto, para que um teste possa ser empregado em larga escala, ele deverá ser inicialmente validado, caso contrário seu uso prático se torna inviável.

O objetivo do trabalho foi verificar a eficácia do teste de ação hemolítica *in vitro* de plantas tóxicas e, desta forma, avaliar a viabilidade do uso do mesmo para avaliação preliminar da toxicidade de espécies suspeitas de promoverem quadros de toxicose.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de folhas de *Crotalaria retusa*, *Ipomoea asarifolia*, *Ipomoea fistulosa*, *Datura stramonium*, *Nerium oleander*, *Ricinus communis*, *Lantana camara*, *Dieffenbachia picta* e *Alocasia* sp. Também foi coletado o látex de *Calotropis procera*. As plantas utilizadas estavam em fase adulta e foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da UFERSA (Universidade Federal Rural do Semi-Árido).

Amostras de folhas ou o látex das diferentes plantas tóxicas recém-colhidas foram utilizadas para a realização do teste de atividade hemolítica *in vitro*. Para este teste, eritrócitos do sangue de equino foram separados por centrifugação (3.000 rpm por 5 minu-

tos), lavados e novamente centrifugados três vezes com solução fisiológica, e suspensos também em solução fisiológica formando um hematócrito de 1%. As amostras das plantas foram trituradas em solução salina a 0,7%, na concentração de 1 g/L, e posteriormente as soluções finais foram filtradas. Foram misturados 2 mL da solução com a planta ou duas gotas de látex e 1 mL da suspensão de eritrócitos, com subsequente incubação sob homogeneização contínua por 20 minutos a temperatura ambiente. Concomitantemente, foram utilizados controles negativo (solução de *Chenopodium ambrosioides* – mastruz – e solução fisiológica no lugar da planta) e positivo (água destilada no lugar de solução da planta) para hemólise. A ocorrência de lise dos eritrócitos foi observada após centrifugação.

Os resultados obtidos foram determinados qualitativamente, sendo considerados como capazes ou não de promover ação hemolítica *in vitro*.

## RESULTADOS

Todas as plantas utilizadas neste trabalho não apresentaram ação hemolítica *in vitro*. Além disto, a solução de *Chenopodium ambrosioides* (mastruz) e a solução fisiológica, utilizadas como controle negativo, não promoveram a lise dos eritrócitos, o que evitaria resultados falso positivos. Por outro lado, o uso de água destilada ao invés do macerado da planta promoveu a hemólise, servindo como controle positivo, para evitar casos de falso negativos.

## DISCUSSÃO

Muitos testes de toxicidade utilizados atualmente para avaliação de agentes tóxicos empregam animais de laboratório. No entanto, tem sido crescente a demanda por testes *in vitro*, que não utilizem animais para serem executados [8]. Neste sentido, o teste para verificação da ação hemolítica *in vitro* tem sido utilizado como uma das metodologias de triagem para diversos agentes tóxicos [10,14]. O teste de hemólise *in vitro* já foi empregado por diversos autores para a avaliação toxicológica de diferentes plantas [6,15]. Assim, no presente estudo foi empregado este teste para avaliação de várias plantas reconhecidamente tóxicas, com diferentes mecanismos de ação tóxica, procurando verificar sua validade como forma de triagem para plantas tóxicas.

Esta mesma metodologia empregada para verificação de ação hemolítica *in vitro* foi utilizada no trabalho anterior [13]. No referido trabalho, foi verifi-

cado a *Floehlichia ulbotiana (lanata)*, planta conhecida popularmente como “ervanço”, é capaz de promover este efeito de destruição dos eritrócitos. Como se trata de uma planta apontada como responsável por casos de fotossensibilização em animais de interesse zootécnico, principalmente eqüinos, também foi realizado o teste para verificação da capacidade de saponificação em água, no qual foi verificado que esta planta provavelmente contém compostos conhecidos como saponinas. De fato, muitas plantas que causam fotossensibilização secundária possuem como princípio tóxico as saponinas, e estas apresentam propriedade hemolítica *in vitro* [4,11]. Assim, o teste de hemólise *in vitro* é capaz de revelar efeito positivo para estas plantas. No entanto, nenhuma das plantas empregadas no presente trabalho é conhecida como contendo saponinas.

Atualmente o teste de hemólise *in vitro* vem sendo empregado rotineiramente em substituição a testes para avaliação de fototoxicidade, que tradicionalmente utilizavam animais de laboratório, como camundongos e cobaias, nos quais se avalia o desenvolvimento de eritema e edema ao se instilar as substâncias no olho. Assim, o emprego desta metodologia vem propiciando o abandono deste teste nos animais [19]. No entanto, no presente estudo não foi observada hemólise pelo látex de *Calotropis procera*, que é reconhecidamente irritante para os olhos [12], o que justifica a necessidade de melhor avaliação da sensibilidade desta metodologia de ensaio toxicológico.

Um grande número de compostos foi apontado como responsável por ação hemolítica *in vitro*,

entre as quais estão plantas [6,15], metais pesados [16] e fármacos [19]. O efeito hemolítico direto dos diferentes agentes tóxicos se deve a vários mecanismos inespecíficos. Por exemplo, os compostos surfactantes produzem seu efeito hemolítico por meio de dois possíveis mecanismos. Um dos mecanismos propostos é a ocorrência de solubilização da membrana plasmática do eritrócito, que romperia por se tornar mais frágil. Outra hipótese é a ocorrência de lise osmótica, por meio da alteração da permeabilidade da membrana plasmática da hemácea [1,7]. Por outro lado, os compostos xenobióticos reduzidos, como, por exemplo, os compostos fenólicos, são capazes de promover hemólise por meio da oxidação da hemoglobina, formando metemoglobulina [3,5]. Já a bilirrubina promove a perda de lipídeos na membrana plasmática do eritrócito, com exposição de resíduos de fosfatidil-serina [2]. Os metais pesados promovem sua ação por meio da peroxidação lipídica, com formação de espécies reativas do oxigênio e malonaldeído [16].

#### CONCLUSÕES

Apesar da lise de eritrócitos ser uma técnica utilizada na avaliação da toxicidade de compostos químicos, diversas plantas tóxicas de interesse pecuário, com diferentes mecanismos de ação tóxica, não foram capazes de promover hemólise *in vitro*. Assim, o teste de hemólise *in vitro* não pode ser empregado com segurança para avaliação de toxicidade de plantas, sendo ainda é necessária a utilização de animais.

#### REFERÊNCIAS

- 1 Aparicio R.M., García-Celma M.J., Vinardell M.P. & Mitjans M. 2005. *In vitro* studies of the hemolytic activity of micro-emulsions in human erythrocytes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 39: 1063-1067.
- 2 Brito M.A., Silva R.F.M. & Brites D. 2002. Bilirrubin induces loss of membrane lipids and exposure of phosphatidylserine in human erythrocytes. *Cell Biology and Toxicology*. 18: 181-192.
- 3 Bukowska B. & Kowalska S. 2004. Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. *Toxicology Letters*. 152: 73-84.
- 4 Cheeke P.R. 1998. *Natural toxicants in feeds, Forages, and Poisonous Plants*. 2nd edn. Danville: Interstate Publishers, 479p.
- 5 Eyer P., Hestle H., Kiese M. & Klein G. 1975. Kinetics of ferrihaemoglobin formation by some reducing agents and the role of hydrogen peroxide. *Molecular Pharmacology*. 11: 326-334.
- 6 Gandhi V.M. & Cherian K.M. 2000. Red cell haemolysis test as an *in vitro* approach for the assessment of toxicity of karanja oil. *Toxicology in Vitro*. 14: 513-516.
- 7 Hägerstrand H. & Isomaa B. 1991. Amphiphile-induced antihemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation. *Chemico-Biological Interactions*. 79: 335-347.
- 8 Harbell J.W., Koontz S.W., Lewis R.W., Lovell D. & Acosta D. 1997. Cell cytotoxicity assays. *Food and Chemical Toxicology*. 35: 79-126.
- 9 James L.F., Nielsen D.B. & Panter K.E. 1992. Impact of poisonous plants on the livestock industry. *Journal of Range Management*. 45: 3-8.

- 10 Kublik H., Bock T.K., Schreier H. & Muller B.W. 1996. Nasal absorption of 17- $\beta$ -estradiol from different cyclodextrin inclusion formulations in sheep. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 42: 320-324.
- 11 Lee S.T., Stegelmeier B.L., Gardner D.R. & Vogel K.P. 2001. The isolation and identification of steroidal saponin in switchgrass. *Natural Toxins*. 10: 273-281.
- 12 Lima G.F.C., Aguiar E.M., Maciel F.C., Lima C.A.C., Pereira G.F., Guedes F.X. & Garcia L.R.U.C. 2004. Flor-de-seda - fonte de feno de qualidade para os sertões. In: Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte. (Ed). *Armazenamento de Forragens para a Agricultura Familiar*. Natal: EMPARN, pp.14-18.
- 13 Macedo M.F. 2005. Etiopatogênese da fotossensibilização em animais de produção do semi-árido potiguar. 63f. Mossoró, RN. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido.
- 14 Mehta R., Lopez-Berestein G., Hopfer R., Mills K. & Juliano R.L. 1984. Liposomal amphotericin B is toxic to fungal cells but not to mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 770: 230-234.
- 15 Mulky M.J. & Gandhi V.M. 1977. Mowrah (*Madhuca latifolia*) seed saponin. Toxicological studies. *Journal of Applied Chemistry and Biotechnology*. 27: 708-713.
- 16 Ribarov S.R. & Benov L.C. 1981. Relationship between the hemolytic action of heavy metals and lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 640: 721-726.
- 17 Riet-Correa F. & Medeiros R.M.T. 2001. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 21: 38-42.
- 18 Tokarnia C.H., Döbereiner J. & Peixoto P.V. 2000. *Plantas Tóxicas do Brasil*. Rio de Janeiro: Helianthus, 310p.
- 19 Yamamoto T., Tsurumaki Y., Takei M., Hosaka M. & Oomori Y. 2001. *In vitro* method for prediction of the phototoxic potentials of uroquinolones. *Toxicology in Vitro*. 15: 721-727.