

## SÍNTESE E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DE UM EXTRATO ETANÓLICO DE *VACHELLIA CAVEN*

VÍTOR PEREIRA KLEIN<sup>1</sup>; LUANE PINHEIRO GARCIA<sup>2</sup>; THOBIAS TONIOLO DE SOUZA<sup>3</sup>; PEDRO HENRIQUE FLORES DA CRUZ<sup>4</sup>; ROGÉRIO ANTÔNIO FREITAS<sup>5</sup>; RODRIGO DE ALMEIDA VAUCHER<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas – [vitorpereiraklein17@gmail.com](mailto:vitorpereiraklein17@gmail.com)

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – [luanegarcia25@hotmail.com](mailto:luanegarcia25@hotmail.com)

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas – [thobias.toniolo@gmail.com](mailto:thobias.toniolo@gmail.com)

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas – [pedronerdcruz9@hotmail.com](mailto:pedronerdcruz9@hotmail.com)

<sup>5</sup> Universidade Federal de Pelotas – [rafreitag@gmail.com](mailto:rafreitag@gmail.com)

<sup>6</sup> Universidade Federal de Pelotas – [rodvaucher@hotmail.com](mailto:rodvaucher@hotmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A biodiversidade brasileira é reconhecida internacionalmente como a maior do planeta, abrigando mais de 46 mil espécies vegetais conhecidas. Estes números se tornam ainda mais impressionantes ao se considerar a estimativa de que apenas 11% da biodiversidade nacional foi descrita pela literatura (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2023). Agregada a uma flora tão diversa está a variedade de compostos derivados de seu metabolismo, bem como a ampla gama de aplicações dos mesmos, seja na indústria alimentícia, farmacológica, agropecuária, estética, química ou outra (KAUFFMANN e CASTRO, 2023; SOUZA et al., 2017).

Apesar de tamanha abundância, muitas espécies nativas ainda carecem de estudos acerca de suas propriedades bioativas, como é o caso da *Vachellia caven*, previamente denominada *Acácia caven*. Pertencente à família Fabaceae, a *V. caven*, popularmente chamada de “espinilho” é um arbusto nativo dos pampas e pantanais cuja distribuição compreende o sul e centro-oeste do Brasil; nordeste e noroeste da Argentina; centro, norte e sul do Chile; Bolívia; Paraguai; e Uruguai; (BELLVER et al., 2019; ZULOAGA et al., 2008).

Espécies do gênero *Vachellia* são conhecidas por suas múltiplas aplicações na medicina tradicional (FOWORA et al., 2021; ISLA et al., 2021; TAHA et al., 2022), *V. tortilis*, por exemplo, apresenta diversas propriedades aplicáveis à área da saúde, como atividade antibacteriana, antifúngica, antiparasitária, antioxidante, antiproliferativa, antidiabética e anti-inflamatória (TAHA et al., 2022; ZIANI et al., 2020).

O espinilho, por sua vez, é muito usado empiricamente no tratamento de diversas enfermidades: A casca é usada para tratamento de feridas; as folhas e sementes para reumatismo e problemas digestivos; infusão de frutos para prevenção de hemorroida; e chá de flores secas para digestão, reumatismo, analgesia e efeito sedativo. Um estudo realizado por Isla et al. (2021) respalda o conhecimento popular ao demonstrar atividade antioxidativa e anti-inflamatória de compostos extraídos da flor de *V. caven*. Os principais fitoquímicos identificados no estudo mencionado foram compostos fenólicos e flavonoides, o que corrobora os achados de Malizia et al. (2002) e Lamarque et al. (1998), que apontaram anisaldeído, (E, E)-farnesil acetato, eugenol e álcool benzílico como componentes majoritários de formulações obtidas das flores da planta.

O potencial fitoterápico do gênero *Vachellia* muito se deve a ampla variedade de metabólitos destas espécies, principalmente flavanóides; terpenóides; saponinas; taninos; fenóis; polifenóis; antocianinas; lactonas; açúcares; e aminoácidos (MORE, MEDDOWS-TAYLOR e PRINSLOO, 2021). No entanto, a

literatura disponível acerca das propriedades e aplicações da *V. caven* à área da saúde ainda é escassa. Dessa maneira, espera-se, através do presente projeto, elucidar as propriedades bioativas da *V. caven*, e com isso embasar o desenvolvimento de tecnologias fitoterápicas.

## 2. METODOLOGIA

Galhos de *V. caven* foram coletados seguindo as diretrizes da Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre boas práticas agrícolas e de coleta para plantas medicinais (2003). O espécime encontra-se em um aglomerado com diversos indivíduos da espécie com hábito arbustivo e alturas entre 3 e 4m, apresentando caules tortuosos e solo arenoso avermelhado; em Uruguaiana, RS, Brasil, nas coordenadas 29°45'20.8" S', 57°00' 01.9" W. Após a coleta um galho foi destinado a exsiccata, realizada pelo biólogo Pedro Henrique Flores da Cruz (CRBio:129610/03-P) e o material utilizado para a identificação foi depositado no Herbário PEL, do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas – UFPel, enquanto o restante das amostras foram transportadas ao Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), onde foram secas à temperatura ambiente em local arejado por 7 dias.

As amostras secas foram então trituradas em moinho de facas e 50g do material foram submersas em 250mL de etanol 99,9% e submetidos à agitação constante ao longo de 24 horas, a 55°C. em seguida o material foi filtrado e sujeito a rotaevaporação para a retirada do solvente, obtendo-se ao final do processo 4,5g de extrato, que foi posteriormente liofilizado e ressuspensionado em uma solução de 50% etanol e 50% PBS, na concentração de 100mg/mL.

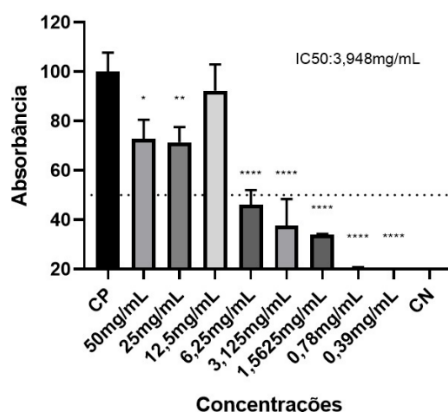
A determinação da atividade hemolítica foi realizada de acordo com o método de Vaucher et al. (2010), com modificações. Foi preparada em PBS uma solução de hemácias 4% (v/v), utilizando sangue de carneiro desfibrinado. Nesta solução foram preparadas 8 diluições seriadas de base 2 do extrato partindo de uma concentração inicial de 50mg/mL. TritonX-100 e PBS foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente. As diluições foram incubadas por 1 hora sob agitação constante a 28°C e em seguida centrifugadas a 2000rpm por 10 minutos. Foram transferidos 200µL do sobrenadante para uma placa de 96 poços, na qual foi realizada a leitura da absorbância em uma leitora de microplaca (Thermoplate, China) na faixa de 405nm.

A análise estatística foi realizada através do software GraphPad Prism versão 8.1 utilizando o teste de análise de variância (ANOVA) de uma via. Em seguida os resultados foram utilizados para o cálculo da HC50 pelo método de regressão não linear com uma curva variável em função de dose resposta.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme pode ser visualizado na Fig. 1 a HC50, caracterizada neste estudo como a concentração capaz de promover a lise de 50% das hemácias, foi determinada em 3,948mg/mL. Apesar da literatura vigente carecer de dados similares para comparação, é possível obter uma melhor compreensão deste resultado ao se observar o estudo de Isla et al. (2021). O estudo em questão verificou o potencial antioxidante e anti-inflamatório de uma infusão e uma decocção de flores de *V. caven*.

Figura 1: Atividade hemolítica do extrato etanólico de *V. caven*.



A atividade antioxidante foi avaliada através da determinação da concentração necessária para neutralizar 50% dos radicais livres (SC50) pelos métodos neutralização de radicais hidroxila, peróxido de hidrogênio e ABTS+; enquanto o potencial anti-inflamatório foi analisado avaliando a atividade inibitória frente as enzimas pro-inflamatórias xantina oxidase e lipoxigenase, através da determinação da IC50. Dentre todos os resultados obtidos, o valor mais elevado encontrado foi de 120µg/mL, concentração esta muito inferior à aqui registrada como necessária para indução de hemólise significativa. No entanto deve-se levar em consideração que o estudo em questão foi desenvolvido sobre formulações obtidas a partir das flores do espinilho e não de suas folhas e pequenos galhos. Portanto, sem a determinação dos compostos efetivamente extraídos não é possível determinar se as concentrações de baixa toxicidade serão de fato capazes de exercer atividades comparáveis as observadas na pesquisa supracitada.

#### 4. CONCLUSÕES

O presente estudo é pioneiro na investigação da segurança farmacológica de extratos vegetais de *Vachellia caven* e abre portas para pesquisas futuras acerca das propriedades bioativas tão pouco estudadas desta espécie.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELLVER, Carlos Gómez et al. Noves dades per a la flora al·lòctona de Catalunya i del País Valencià. **Butlletí de la Institució Catalana d'Història Natural**, p. 23-40, 2019.

FOWORA, M.A. et al. In Vitro susceptibility of dermatophytes to anti-fungal drugs and aqueous Acacia nilotica leaf extract in Lagos, Nigeria. **Journal of Biomedical Science and Engineering**, v. 14, n. 2, p. 74-82, 2021.

ISLA, M.I. et al. Flower beverages of native medicinal plants from Argentina (Acacia caven, Geoffroea decorticans and Larrea divaricata) as antioxidant and anti-inflammatory. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 281, p. 114490, 2021.

KAUFFMANN, A.C.; CASTRO, V.S. Phenolic Compounds in Bacterial Inactivation: A Perspective from Brazil. **Antibiotics**, v. 12, n. 4, p. 645, 2023.

LAMARQUE, A.L. et al. Volatile constituents from flowers of *Acacia caven* (Mol.) Mol. var. *caven*, *Acacia aroma* Gill. ex Hook., *Erythrina crista-galli* L. and *Calliandra tweedii* Benth. **Flavour and fragrance journal**, v. 13, n. 4, p. 266-268, 1998.

MALIZIA, R.A. et al. Volatile constituents of *Acacia caven* (Mol.) Mol. flower concrete from species growing in Argentina. **Journal of Essential Oil Research**, v. 14, n. 2, p. 132-134, 2002.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Brasil: 6º Relatório Nacional para a Convenção sobre Diversidade Biológica. Ministério do Meio Ambiente, Secretaria da Biodiversidade. **Secretaria da Biodiversidade**. Brasília, 2023. ISBN: 978-65-88265-00-0.

MORE, G.K.; MEDDOWS-TAYLOR, S.; PRINSLOO, G. Metabolomic Profiling of Antioxidant Compounds in Five *Vachellia* Species. **Molecules**, v. 26, n. 20, p. 6214, 2021.

SOUSA, I.J.O. et al. A diversidade da flora brasileira no desenvolvimento de recursos de saúde. **Uningá Review**, v. 31, n. 1, 2017.

TAHA, D. et al. Traditional Knowledge, Phytochemistry, and Biological Properties of *Vachellia tortilis*. **Plants**, v. 11, n. 23, p. 3348, 2022.

VAUCHER, R.A.; MOTTA, A.S.; BRANDELLI, A. Evaluation of the in vitro cytotoxicity of the antimicrobial peptide P34. *Cell biology international*, v. 34, n. 3, p. 317-323, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants. **WHO**. Geneva, 2003.

ZIANI, B. et al. Phenolic profiling, biological activities and in silico studies of *Acacia tortilis* (Forssk.) Hayne ssp. *raddiana* extracts. **Food Bioscience**, v. 36, p. 100616, 2020.

ZULOAGA, F.O. et al. Catalogue of the vascular plants of the southern cone (Argentina, southern Brazil, Chile, Paraguay and Uruguay). **Catalogue of the vascular plants of the southern cone (Argentina, southern Brazil, Chile, Paraguay and Uruguay)**., 2008.