

## **EFEITO DE SCHINUS LENTISCIFOLIUS NOS PARÂMETROS OXIDATIVOS DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS AO RESIDUAL OIL FLY ASH (ROFA)<sup>1</sup>**

**Jessyca Bandeira Corrêa<sup>2</sup>, Analú Bender Dos Santos<sup>3</sup>, Renan Daniel Bueno Basso<sup>4</sup>,  
Fernanda Baldissera<sup>5</sup>, Thiago Gomes Heck<sup>6</sup>, Ilaine Teresinha Seibel Gehrke<sup>7</sup>.**

<sup>1</sup> Pesquisa Institucional desenvolvida no Departamento de Ciências da Vida (DCVida), pertencente ao Grupo de Pesquisa em Fisiologia.

<sup>2</sup> Acadêmica do Curso de Farmácia da UNIJUI, Bolsista PROBIC/FAPERGS, je.correa@yahoo.com.br

<sup>3</sup> Acadêmica do Curso de Educação Física Bacharelado, Bolsista PROBIC/FAPERGS, analu.bender@gmail.com

<sup>4</sup> Acadêmico do Curso de Educação Física Bacharelado, Bolsista PROBIC/FAPERGS, renandbb@hotmail.com

<sup>5</sup> Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, UFCSPA, baldissera.fernanda@yahoo.com

<sup>6</sup> Grupo de Pesquisa em Fisiologia, Departamento de Ciências da Vida (DCVida), Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS), UNIJUI, thiago.heck@unijui.edu.br

<sup>7</sup> Grupo de Pesquisa em Fisiologia, Departamento de Ciências da Vida (DCVida), UNIJUI, ilaine@unijui.edu.br

### **Introdução**

A exposição excessiva às partículas provenientes da queima de óleo diesel (Residual Oil Fly Ash - ROFA) presentes no ar atmosférico levam a alterações cardiovasculares, respiratórias e reprodutivas. Os metais de transição que constituem o ROFA levam à formação de processos oxidativos no pulmão (KELLY; SANDSTRÖM, 2004; GHIO et al., 2002). Efeitos cardíacos e sistêmicos são resultados da disseminação dos componentes de ROFA para tecidos extrapulmonares (GHIO et al., 2002). Portanto, a inalação de partículas atmosféricas e a consequente deposição no epitélio pulmonar e distribuição pela circulação podem contribuir para o desequilíbrio redox, caracterizando um quadro de estresse oxidativo (EO) (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). Um dos principais mecanismos de lesão gerado pelo EO é a lipoperoxidação que pode ocorrer na membrana celular e também gerar dano a proteínas e ao DNA (SCHENEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Para combater a ação de oxidantes os organismos vivos contam com a ação de mecanismos de defesa antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (SCHENEIDER; OLIVEIRA, 2004). Dentre as enzimas antioxidantes estão a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD) (TAWAHA et al., 2007). Fazem parte do sistema não enzimático cisteínas, ácido ascórbico, flavonoides e vitamina K (MELO et al., 2010). Os flavonoides são capazes de inativar radicais livres em compartimentos celulares lipofílicos e hidrofílicos (PEREIRA et al., 2009). Em geral, os compostos fenólicos possuem efeito antioxidante superior a outros antioxidantes como alfa-tocoferol, ácido ascórbico e carotenóides, no entanto podem atuar em sinergia com esses compostos (DICKO et al., 2006).

A *Schinus lentiscifolius*, popular “aroeira-cinzenta”, tem sido utilizada na medicina tradicional como antisséptico e antimicrobiano (GEHRKE et al., 2013). No entanto, ainda não existem

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico

**Evento:** XXII Seminário de Iniciação Científica

resultados científicos que comprovem a sua ação. Tendo em vista que o extrato acetato de etila obtido do chá das folhas de *Schinus lentiscifolius* (SL EACOET FL) possui propriedades antioxidantes demonstradas in vitro (GEHRKE et al., 2013) e que a instilação de ROFA é capaz de promover um quadro de estresse oxidativo (PETRY, 2011), o objetivo deste estudo é avaliar se esse extrato reduz o dano oxidativo provocado pela exposição aguda de camundongos ao ROFA.

## Material e métodos

### Grupos animais

Foram utilizadas 24 fêmeas de camundongos, com aproximadamente um ano de idade, pesando, em média, 30 g e provenientes do biotério da UNIJUI. Os animais foram mantidos sob iluminação artificial com ciclo claro/escuro de 12h, controle da temperatura ( $22 \pm 3^\circ\text{C}$ ) e umidade relativa do ar (50 a 60%) e recebendo ração padrão para animais de laboratório e água potável ad libitum. Este projeto foi aprovado no CEUA-UNIJUI (nº 028/2013).

### Delineamento experimental

As intervenções consistiram na instilação de ROFA e administração do SL EACOET FL nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, ambos por três dias consecutivos (PETRY, 2011). Os animais receberam 10 µL de solução salina 0,9% ou 10 µL de suspensão de ROFA (75 µg/10µL) via intranasal (i.n.). Parte destes animais foram submetidos à administração via oral (v.o.) por gavagem de solução DMSO 1% (veículo utilizado para a solubilização do extrato) ou SL EACOET FL nas concentrações de 5 mg/mL, 10 mg/mL e 20 mg/mL. Desta forma, os animais foram divididos em oito grupos experimentais (n = 3), conforme a Tabela 01.

Tabela 01: Grupos experimentais conforme a intervenção.

| Grupos experimentais | Intervenção                                              |
|----------------------|----------------------------------------------------------|
| ROFA i.n.            | 10 µL de ROFA + DMSO 1% (100 µL/10g) v.o. (n = 3)        |
|                      | 10 µL de ROFA + Ext 50 mg/kg v.o. (n = 3)                |
|                      | 10 µL de ROFA i.n. + Ext 100 mg/kg v.o. (n = 3)          |
|                      | 10 µL de ROFA i.n. + Ext 200 mg/kg v.o. (n = 3)          |
| Salina 0,9% i.n.     | 10 µL de salina 0,9% + DMSO 1% (100 µL/10g) v.o. (n = 3) |
|                      | 10 µL de salina 0,9% + Ext 50 mg/kg v.o. (n = 3)         |
|                      | 10 µL de salina 0,9% + Ext 100 mg/kg v.o. (n = 3)        |
|                      | 10 µL de salina 0,9% + Ext 200 mg/kg v.o. (n = 3)        |

### Caracterização das partículas de ROFA

O poluente ROFA consistiu de partículas retidas por um precipitador eletrostático instalado em chaminés de uma grande usina siderúrgica localizada em São Paulo, Brasil. Cerca de 78% das partículas de carbono e 98% de partículas de metais de transição possuem diâmetro inferior a 2,5

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico  
**Evento:** XXII Seminário de Iniciação Científica

um. A preparação e a composição estão detalhadas em outros estudos (ZANCHI et al., 2008; PETRY, 2011).

#### Preparação dos tecidos

Amostras de tecido pulmonar e hepático foram homogeneizadas em solução de fosfato de potássio (KPi) e centrifugadas por 10 min para coleta do sobrenadante. Foi utilizado inibidor de protease [PMSF (100  $\mu$ M)] para as análises de estresse oxidativo.

#### Determinação de proteína

A concentração de proteínas de cada amostra foi determinada pelo método de Bradford (1976). Os resultados obtidos foram expressos em mg de proteína por mL (mg/mL).

#### Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Foi utilizado o método descrito por Buege e Aust (1978). A concentração de TBARS formada foi expressa em nmol de malondialdeído (MDA) por mg de proteína (nmol/mg)

#### Determinação da atividade enzimática da catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi mensurada por meio da inibição da auto-oxidação do pirogalol em 60s e 120s à 420 nm e os resultados expressos em unidades de SOD por mg de proteína (U de SOD/mg) (MARKLUND; MARKLUND, 1974). A atividade da CAT foi determinada pela decomposição de peróxido de hidrogênio (10mmol/L) à 240 nm por 120 s e os resultados expressos em pmol de CAT por mg de proteína (pmol/mg) (AEBI, 1984).

#### Análise Estatística

Os resultados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão. A diferença entre os grupos foi comparada utilizando ANOVA de uma via seguido de teste post-hoc de Tukey. Foi considerado nível de significância de 5% ( $P < 0,05$ ).

#### Resultados e discussão

O tecido pulmonar demonstrou aumento na lipoperoxidação (Fig. 1 - A) dependente da instilação de ROFA (75 $\mu$ g/10 $\mu$ L) e da administração do extrato. O tratamento com o extrato a uma concentração de 20mg/mL reduziu a lipoperoxidação pulmonar quando comparado ao grupo tratamento que recebeu o extrato a uma concentração de 5mg/mL. Com relação aos animais que não receberam extrato, verificou-se um aumento de 62% na peroxidação lipídica dependente do ROFA (Fig. 1 - A). Não foram observadas diferenças na atividade das enzimas CAT (Fig. 1 - B) e SOD (Fig. 1 - C). Os resultados obtidos para as variáveis de estresse oxidativo do tecido hepático (Fig. 2) não demonstraram diferença entre os grupos.

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico  
**Evento:** XXII Seminário de Iniciação Científica

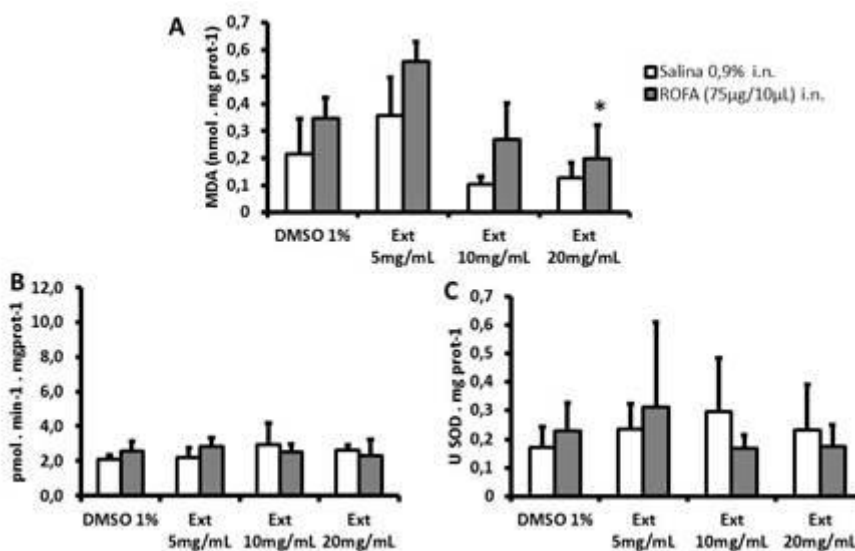


Fig. 1. Análise de estresse oxidativo do tecido pulmonar. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão, n=3 camundongos. (A) lipoperoxidação: diferença comparando com ROFA + Ext 5 mg (\* $P < 0,05$ ); (B) atividade enzimática da CAT ( $P=0,7426$ ); (C) atividade enzimática da SOD ( $P = 0,8742$ ).

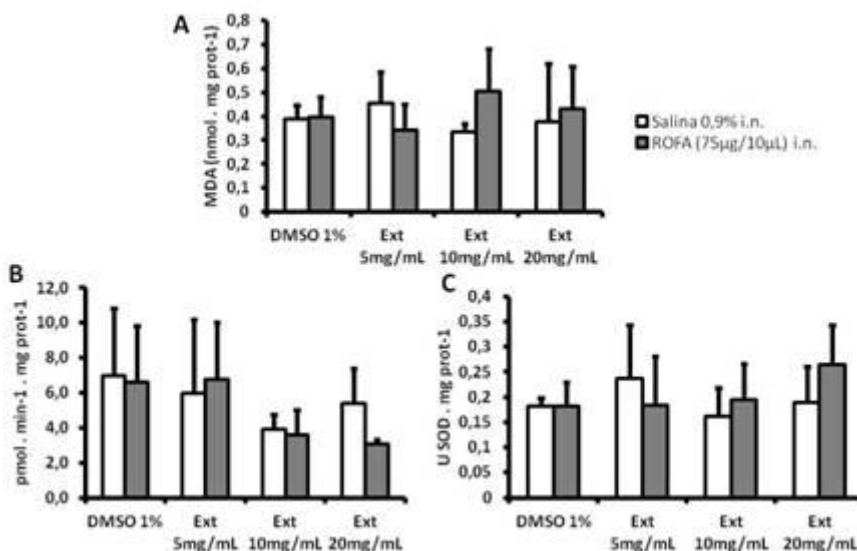


Fig. 2. Análise de estresse oxidativo do tecido hepático. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão, n=3 camundongos. (A) lipoperoxidação ( $P = 0,8363$ ); (B) atividade enzimática da CAT ( $P = 0,4849$ ); (C) atividade enzimática da SOD ( $P = 0,7323$ ).

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico  
**Evento:** XXII Seminário de Iniciação Científica

Inúmeros estudos têm demonstrado a capacidade antioxidante de compostos fenólicos, tanto através da potencial diminuição da peroxidação lipídica (SAEED; KAHAN; SHABBIR, 2012; LIMA et al., 2006), quanto pela inibição ao radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (GEHRKE et al., 2013). A presença de flavonoides na espécie estudada pode ter sido responsável pela redução da peroxidação lipídica uma vez que a ação antioxidante é direcionada sobre o radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ) e o ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), que são espécies altamente reativas envolvidas na iniciação da peroxidação lipídica (GALATI, 2002). A quercetina, um dos flavonoides identificados nos extratos de *Schinus lentiscifolius* (GEHRKE, 2013), tem a capacidade de inibir o processo de formação de radicais livres em três etapas diferentes, na iniciação (pela interação com íons superóxido), na formação de radicais hidroxil (por quelar íons de ferro) e na peroxidação lipídica (por reagir com radicais peroxi de lipídeos) (AFANAS'EV, 1989). A atividade antioxidante de compostos fenólicos está relacionada à estrutura química e pode ser determinada pela ação da molécula como agente redutor (velocidade de inativação do radical livre, reatividade com outros antioxidantes e potencial quelação de metais) (MAMEDE; PASTORE, 2004).

#### Conclusões

Os resultados preliminares deste estudo com o extrato acetato de etila obtido das folhas de *Schinus lentiscifolius* sugerem uma redução na lipoperoxidação pulmonar. Essa atividade pode estar relacionada à presença de compostos fenólicos da classe dos flavonoides.

Palavras-chave: estresse oxidativo; lipoperoxidação; flavonoides.

#### Referências bibliográficas

- AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymology*, Orlando, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AFANAS'EV, I.B. et al.. Chelating and free radical scavenging mechanism of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.*, v. 38, p. 1763-1769, 1989.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, v. 52, p. 302-309, 1978.
- DICKO, M. H. et al. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, v. 1, n. 1, p. 21-28, 2006.
- GALATI, G. et al. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology*, Amsterdam, v. 177, p.91- 104, 2002.
- GEHRKE, I. T. S. et al. Atividade antioxidante e perfil cromatográfico por CLAE/DAD de *Schinus lentiscifolius* (anacardeaceae). *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (RASBQ)*, 2013.
- GHIO, A. J. et al. Biologic Effects of Oil Fly Ash. *Environmental Health Perspectives*, v. 110, p. 89-94, 2002.

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico  
**Evento:** XXII Seminário de Iniciação Científica

- HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.*, v. 142, n.2, p. 231-55, 2004.
- KELLY, F.J.; SANDSTROM, T. Air pollution, oxidative stress, and allergic response. *The Lancet*, v. 363, p. 95-96, 2004.
- LIMA, A. R. et al. Avaliação in vitro da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, n. 4, p. 531-536, 2006.
- MAMEDE, M. E. O; PASTORE, G. M. Compostos fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante. *B CEPPA*, v. 22, n. 2, p. 233-252, 2004.
- MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem.*, n. 47, p. 469-474, 1974.
- MELO, J. G. et al. Antiproliferative Activity, Antioxidant Capacity and Tannin Content in Plants of Semi-Arid Northeastern Brazil. *Molecules*, v. 15, p. 8534-8542, 2010.
- PEREIRA, A. L. F. et al. Antioxidantes alimentares: Importância química e biológica. *Journal Brazilian Society Food Nutrition*, v. 34, n. 3, p. 231-247, 2009.
- PETRY, M. R. Análise dos efeitos pulmonares e cardiovasculares da inalação aguda de Residual Oil Fly Ash em ratos submetidos ao treinamento físico. 2011. 99 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA, Porto Alegre, RS.
- SAEED, N.; KAHAN, M. R.; SHABBIR, M. Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 12, p. 221, 2012.
- SCHNEIDER, C. D., OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev. Bras. Med. Esporte*, v. 10, n. 4, p. 308-313, 2004.
- TAWAHA, K. et al. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*, v. 104, p. 1372-1378, 2007.
- ZANCHI A. C. et al. Chronic Nasal Instillation of Residual-Oil Fly Ash (ROFA) Induces Brain Lipid Peroxidation and Behavioral Changes in Rats. *Inhalation Toxicology*, v. 20, p.795–800, 2008.