

Evento: XXV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

EXTRATOS DAS CASCAS DE SCHINUS LENTISCIFOLIUS APRESENTAM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E AUMENTAM A VIABILIDADE CELULAR DE LINFÓCITOS¹

EXTRACTS FROM SCHINUS LENTISCIFOLIUS BARKS SHOW ANTIOXIDANT ACTIVITY AND INCREASE THE CELLULAR VIABILITY OF LYMPHOCYTES

Bárbara Pezzini Moreira², Larissa Vilma Lohmann³, Jéssyca Bandeira Corrêa⁴, Thiago Gomes Heck⁵, Ilaine Teresinha Seibel Gehrke⁶

¹ Trabalho de pesquisa realizado pelo Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF/Unijui)

² Aluna de Graduação em Engenharia Química da UNIJUI, Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GpeF).

³ Aluna de Graduação em Engenharia Química da UNIJUI, Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GpeF).

⁴ Mestranda Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS) UNIJUI/UNICRUZ, Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GpeF).

⁵ Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF), Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS), Departamento de Ciências da Vida (DCVida), Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI).

⁶ Docente do Departamento de Ciências da Vida da UNIJUI, Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF), Laboratório de Pesquisa em Química (LAPEQUI).

Introdução

Schinus lentiscifolius (aroeira-cinzenta) pertence à família anacardiaceae e é nativa de regiões tropicais e subtropicais. A essência proveniente da decocção das cascas da árvore é utilizada na medicina popular (LORENZI, 2002). Considerando que nos extratos das folhas de *S. lentiscifolius* foram identificados compostos fenólicos e flavonoides (GERHKE et al., 2013) e sabendo que estes podem estar localizados em cascas de caule de plantas (OLIVEIRA et al., 2014) nos propomos a estudar os extratos, bem como avaliar sua capacidade antioxidante.

O estresse oxidativo decorre de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante. A geração de radicais livres e espécies reativas não radicais é resultante do metabolismo de oxigênio. O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres e espécies reativas não radicais (BARBOSA et al., 2010). Os compostos fenólicos têm como mecanismo de prevenção aos danos oxidativos a proteção das moléculas de modo direto, atuando como citoprotetores e/ou antioxidantes, ou de modo indireto, induzindo mudanças celulares nas respostas de defesa (resposta ao estresse) (MITJAVILA; MORENO, 2012).

Diante da escassez de estudos que relacionem os constituintes químicos dos extratos dessa

Evento: XXV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

espécie às suas atividades biológicas, o objetivo deste estudo foi determinar o teor de fenóis totais nos extratos das cascas de *Schinus lentiscifolius*, a atividade antioxidante dos extratos através do método quantitativo de inibição ao radical DPPH e verificar seus efeitos sobre a viabilidade celular de linfócitos expostos ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Materiais e métodos

As cascas de *S. lentiscifolius* foram particionadas com solventes hexano, acetato de etila e metanol originando os extratos SL-HEX, SL-ACOET e SL-MEOH. Posteriormente, todos os extratos foram avaliados quanto à presença de compostos fenólicos e flavonoides por cromatografia em camada delgada (CCD), e para aqueles que apresentaram resultado positivo, foram analisados por HPLC-DAD-ESI-MS/M e determinado o teor de fenóis totais e a capacidade antioxidante a partir do método de inibição ao radical DPPH.

Para a determinação do teor de FT foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu com modificações (ALVES e KUBOTA, 2013). O extrato foi solubilizado a 1% (10 mg.mL⁻¹) em metanol. Esta solução (0,5 mL) foi então misturada e incubada com 250 µL do reagente de Folin Ciocalteu (2N), por cinco minutos, a temperatura ambiente e adicionou-se 2 mL de solução de carbonato de sódio (7,5%). Após incubação no escuro, por 2 horas, a absorbância foi medida a 760 nm em cubeta de vidro, tendo como “branco” o metanol e todos os reagentes, menos o extrato. O teor de FT foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com o padrão ácido gálico e expresso como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato. A equação da curva de calibração do ácido gálico foi $y = 51,91x + 0,019$ (y = concentração de ácido gálico; x = absorbância; $R = 0,992$). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A determinação da atividade antioxidante foi realizada através do método quantitativo de inibição ao radical DPPH, no extrato que apresentou maior conteúdo de fenóis totais, conforme Gehrke (2012). O método quantitativo foi realizado pela medida da leitura da absorbância da amostra contra uma amostra em branco e um padrão o di-terc-butil metil fenol (BHT). A amostra testada e o padrão BHT foram preparados nas concentrações de 20 µg/mL em etanol solução estoque. Após diluições seriadas obteve-se as concentrações de 500,0 a 3µg/mL, sendo acrescentadas a cada diluição 0,5 mL de solução de DPPH (0,004%). As amostras permaneceram à temperatura ambiente por 30 minutos sob proteção da luz, em seguida a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV-VIS (517 nm) para medir a redução do radical livre DPPH contra uma amostra em branco preparada para cada diluição. Foi utilizada uma solução de etanol (1,0 mL) acrescida de 0,25 mL de solução metanólica 0,004% de DPPH como controle (0% de inibição).

No extrato que apresentou melhor capacidade de seqüestro ao radical livre DPPH avaliou-se o efeito sobre a resposta celular ao estresse em linfócitos quanto à viabilidade celular. Para esta determinação, os linfócitos foram extraídos de linfonodos mesentéricos de ratos Wistar fêmeos provenientes do biotério da UNIJUI (CEUA-UNIJUI n° 005/2016), distribuídos em microtubos com igual suspensão celular, desafiados com H_2O_2 e tratados com três concentrações diferentes do extrato da casca de *S. lentiscifolius* (8, 16 e 32 µg/mL) a 37°C por 1h (CATALGOL; OZDEN;

Evento: XXV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

ALPERTUNGA, 2007). A contagem das células foi realizada pelo método Trypan Blue (BUROW et al., 1998). A viabilidade é dada pela razão entre o número de células viáveis (não coradas) e o número de células totais (coradas e não coradas), multiplicada por 100. O número de células por mL na suspensão foi obtido pelo produto entre o número de células viáveis presentes no quadrante central, o fator de diluição e o número 10^4 , que é o fator de correção do volume do hemocitômetro.

Resultados

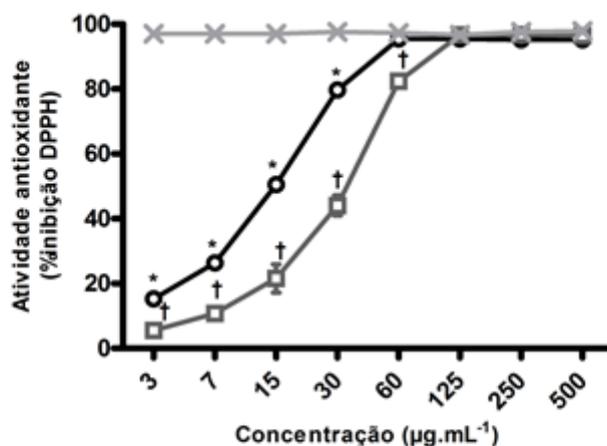
Quanto ao conteúdo de fenóis totais, o extrato que apresentou maior valor em mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato foi o SL-ACOET (Tabela 1), mostrando-se com uma possível maior capacidade antioxidante. Essa possibilidade se comprova quando analisado os resultados da atividade antioxidante pelo método de inibição de DPPH (Figura 1), onde o extrato SL-ACOET apresenta uma maior porcentagem de inibição de DPPH comparado ao SL-MEOH.

Tabela 1 - Conteúdo de FT nos extratos da casca de *S. lentiscifolius*.

Extrato	mgEAG/g
SL-ACOET	12,32 ± 0,21
SL-MEOH	7,53 ± 0,22

Valores expressos em média±desvio padrão (n=3).

Figura 1 - Atividade antioxidante de extratos da casca de *S.lentiscifolius* pelo método DPPH.

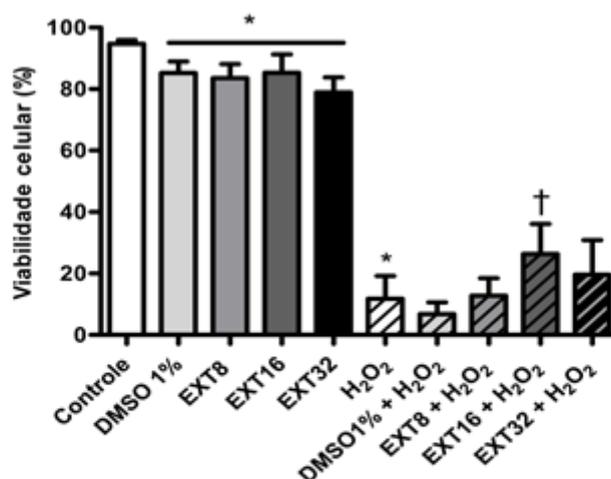


Cálculo de inibição/sequestro de radicais livres: % inibição = $[(Ac - Aa) / Ac] \times 100$, onde Ac é a absorbância da solução controle (somente DPPH e metanol) e Aa é a absorbância da amostra testado no tempo de 40 minutos. ● = SL-ACOET: extrato acetato de etila; □ = SL-MEOH: extrato metanólico. Resultados expressos em média ± desvio padrão. ANOVA de 2 vias de medidas repetidas, post-hoc de Bonferroni. *P<0,001 vs. Ácido ascórbico † P<0,001 vs. Ácido ascórbico e SL-ACOET.

Evento: XXV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

A partir desses dados, o extrato utilizado para verificação do efeito na viabilidade celular dos linfócitos foi o SL-ACOET, cujo resultado mostra-se na Figura 2. Analisando o gráfico, a concentração do extrato que apresentou maior capacidade de aumentar a viabilidade celular dos linfócitos desafiados com H₂O₂ foi a de 16 µg/mL.

Figura 2- Efeito do extrato SL-ACOET sobre a viabilidade celular de linfócitos após 1h de exposição ao H₂O₂ a 37°C.



Controle, DMSO 1% (32µL de DMSO 1% em água destilada), EXT8, EXT16 e EXT32 (tratamento SL-ACOET de 8, 16 e 32 µg/mL, respectivamente), H₂O₂ (concentração de 200mM), EXT8+H₂O₂, EXT16+H₂O₂ e EXT32+H₂O₂. Valores expressos em média ± desvio-padrão. (n=5-6). ANOVA de uma via seguido do teste de Dunnett para múltiplas comparações. *P < 0,05 vs. Controle, † P < 0,05 vs. H₂O₂.

Considerações finais

A partir dos dados obtidos, pode-se concluir que a presença de compostos fenólicos expressas no extrato SL-ACOET pode ser responsável pelo seu potencial antioxidante e que esse extrato pode representar uma alternativa promissora na medicina complementar.

Palavas-chave: compostos fenólicos; radical livre; potencial terapêutico.

Key-words: Phenolic compounds; free radical; therapeutic potential

Referências

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras:** manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 4. Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, v. 1, 2002.

GEHRKE, I.T.S. et al. Antimicrobial activity of *Schinus lentiscifolius* (Anacardiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 2, p. 486-491, 2013.

Evento: XXV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

OLIVEIRA, A.K.M. et al. Análise fitoquímica e potencial alelopático das cascas de *Pouteria ramiflora* na germinação de alface. **Hortic. bras.**, v. 32, n. 1, p. 41-47, 2014.

BUROW, M.E. et al. Differences in susceptibility to tumour necrosis factor alpha-induced apoptosis among MCF-7 breast cancer cell variants. **Cancer Research**, v. 58, n. 21, p. 4940-4946, 1998.

CATALGOL, B.K.; OZDEN, S.; ALPERTUNGA, B. Effects of trichlorfon on malondialdehyde and antioxidant system in human erythrocytes. **Toxicology in vitro**, v. 21, p. 1538-1544, 2007.

ALVES, E.; KUBOTA, E. H. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 37-41, 2013.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629-643, jul./ago. 2010.

MITJAVILA, M.T.; MORENO, J.J. The effects of polyphenols on oxidative stress and the arachidonic acid cascade. Implications for the prevention/treatment of high prevalence diseases. **Biochemical Pharmacology**, v. 84, p. 1113-1122, 2012.