



**UNIVERSIDADE DE CRUZ ALTA
UNIVERSIDADE REGIONAL DO NOROESTE DO ESTADO DO
RIO GRANDE DO SUL**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM ATENÇÃO
INTEGRAL À SAÚDE**

**CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS
DO EXTRATO DA CASCA DE *Schinus lentiscifolius*
(ANACARDIACEAE) E SEU EFEITO SOBRE A
RESPOSTA CELULAR AO ESTRESSE EM
LINFÓCITOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JÉSSYCA BANDEIRA CORRÊA

**IJUÍ-RS, Brasil
2017**

CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DO EXTRATO DA CASCA DE *Schinus lentiscifolius* (ANACARDIACEAE) E SEU EFEITO SOBRE A RESPOSTA CELULAR AO ESTRESSE EM LINFÓCITOS

Por

JÉSSYCA BANDEIRA CORRÊA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde, da Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ, RS), em associação ampla à Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Atenção Integral à Saúde**.

Orientador: Professor Dr. Thiago Gomes Heck

Co-orientadora: Professora Dra. Ilaine Teresinha Seibel Gehrke

IJUÍ - RS, Brasil
2017

Catálogo na Publicação

C824c Corrêa, Jéssyca Bandeira.

Caracterização de compostos fenólicos do extrato da casca de schinus lentiscifolius (anacardiaceae) e seu efeito sobre a resposta celular ao estresse em linfócitos / Jéssyca Bandeira Corrêa. – Ijuí, 2017.

133 f.: il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (Campus Ijuí). Atenção Integral à Saúde.

“Orientador: Thiago Gomes Heck”.

1. Plantas medicinais - Tratamento de doenças. 2. Schinus lentiscifolius – Medicina popular. 3. Schinus lentiscifolius – potencial biológico. 4. Schinus lentiscifolius - Estresse oxidativo. I. Heck, Thiago Gomes. II. Título.

CDU: 633.88

Carla Inês Costa dos Santos
CRB10/973

UNIVERSIDADE DE CRUZ ALTA E UNIVERSIDADE REGIONAL DO NOROESTE
DO RIO GRANDE DO SUL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM ATENÇÃO INTEGRAL
À SAÚDE

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DO EXTRATO DA
CASCA DE Schinus lentiscifolius (ANACARDIACEAE) E SEU EFEITO
SOBRE A RESPOSTA CELULAR AO ESTRESSE EM LINFÓCITOS**

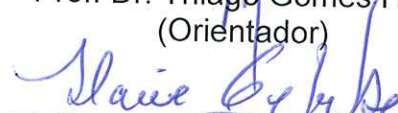
elaborada por:

JÉSSYCA BANDEIRA CORRÊA

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Atenção Integral à Saúde

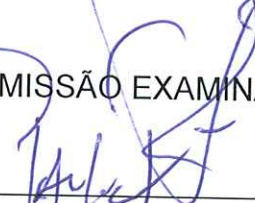


Prof. Dr. Thiago Gomes Heck
(Orientador)



Prof.ª. Dr.ª. Ilaine Teresinha Seibel Gehrke
(Co-Orientadora)

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr - (UFRGS)



Prof.ª. Dr.ª. Gabriela Trevisan dos Santos - (UFSM)



Prof. Dr. Jonatas Zeni Klafke - (UNICRUZ)

Ijuí, 12 de maio de 2017

DEDICO

À minha família, em especial, minha mãe que sempre compreendeu meus momentos de inquietação e angústias com muito carinho e apoio, não medindo esforços para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, Aquele que guia meus passos e que colocou em minha vida pessoas especiais e fundamentais para que eu conseguisse concluir mais essa etapa.

À minha família a qual devo meus princípios, minha educação, minha vida. Agradeço em especial à minha mãe Cecília e ao meu padrasto César pelo incentivo e apoio.

Ao meu namorado Jardel pelo amor e paciência, por me ouvir e me aconselhar e estar ao meu lado em todos os momentos.

Ao meu orientador e amigo Thiago Gomes Heck por todo o auxílio, confiança e incentivo. Obrigada por ter acreditado no meu potencial.

À professora Ilaine Teresinha Seibel Gehrke que auxiliou no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por ter se tornado além de professora, uma grande amiga.

À UNIJUÍ pelo espaço concedido para realização do trabalho.

Ao Grupo de Pesquisa em Fisiologia que foi fundamental para a produção do saber científico e que reafirma a cada dia a ideia de que a construção do conhecimento não se faz sozinho, mas no coletivo. Muito obrigada aos colegas, e hoje amigos, do laboratório.

Agradeço aos professores Cledir R. Santos e María A. R. Muñoz da Universidade da Fronteira-Chile, pela parceria.

Aos demais professores do PPGAIS que desde o início do mestrado transmitiram conhecimento e contribuíram para a minha evolução como profissional. Obrigada pelos ensinamentos.

Aos membros da banca por auxiliar na melhoria deste trabalho.

Agradeço também aos demais familiares e amigos que, durante esta jornada, apoiaram-me e garantiram o sorriso no meu rosto, foram e sempre serão a alegria dos meus dias.

RESUMO

Caracterização de compostos fenólicos do extrato da casca de *Schinus lentiscifolius* (Anacardiaceae) e seu efeito sobre a resposta celular ao estresse em linfócitos

As cascas da planta *Schinus lentiscifolius* March (aroeira-cinzenta) têm sido usadas na medicina popular no tratamento artrítico e de dores nos pés, no entanto, poucos são os estudos relativos ao seu potencial biológico. A presença de compostos fenólicos em vegetais é responsável pela sua atividade antioxidante. Neste trabalho buscamos caracterizar e identificar os principais compostos fenólicos presentes em extratos da casca de *S. lentiscifolius* e avaliar seu efeito sobre o estresse oxidativo, viabilidade celular e resposta celular ao estresse em linfócitos. Foi detectada a presença de flavonoides (Cromatografia em Camada Delgada) e identificados os flavonoides quercetina no extrato metanólico (SL-MEOH) e quercetina e canferol no extrato acetato de etila (SL-ACOET) (HPLC-DAD-ESI-MS/MS). O extrato SL-ACOET conteve maior teor de compostos fenólicos (12,32 mgEAG/g) do que o extrato SL-MEOH (7,53 ± 0,22 mgEAG/g) e maior atividade antioxidante *in vitro* avaliada pelo método de sequestro de radical livre DPPH mensurada pelos valores de concentração necessária para inibir 50% dos radicais (DPPH, CE₅₀ = 16,70 ± 0,480 µg.mL⁻¹). O extrato SL-ACOET foi avaliado quanto aos efeitos sobre a resposta celular ao estresse, a lipoperoxidação e viabilidade de linfócitos obtidos de linfonodos mesentéricos de ratos Wistar fêmeos (n= 22). SL-ACOET na concentração de 32 µg.mL⁻¹ foi capaz de reduzir os níveis de lipoperoxidação (TBARS) induzida por H₂O₂ (200 mM) em linfócitos (P<0,05), enquanto a concentração de 16 µg.mL⁻¹ melhorou a viabilidade celular (Trypan blue). O extrato SL-ACOET diminuiu a resposta celular ao estresse nos linfócitos desafiados por choque térmico (2 h, 41°C), avaliada pelos níveis intracelulares de proteínas de choque térmico de 70 kDa - HSP70, (iHSP70 por western blot) e pela quantidade exportada para o meio de cultura (eHSP70 por kit de ELISA) (P<0,05). Este estudo indica que compostos fenólicos contidos na casca de *S. lentiscifolius* possuem atividade antioxidante e efeito inibitório sobre a resposta celular ao estresse, o que justifica a exploração de suas ações biológicas na prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo e como coadjuvante na terapia antitumoral.

Palavras-chave: estresse oxidativo, *S. lentiscifolius*, flavonoides, lipoperoxidação, HSP70.

ABSTRACT

Characterization of phenolic compounds of *Schinus lentiscifolius* bark extract (Anacardiaceae) and its effect on the cellular response to lymphocyte stress

The bark of the *Schinus lentiscifolius* March plant has been used in folk medicine for the treatment of arthritic and foot pain. Although used by the population, there are few studies about its biological potential. The presence of phenolic compounds in plants is responsible for their antioxidant activity. We characterized and identified the main phenolic compounds presented in extracts of the *S. lentiscifolius* bark. Also, we evaluated the effects on oxidative stress, cell viability and cellular stress response in lymphocytes. Flavonoids were detected (thin layer chromatography) and identified (HPLC-DAD-ESI-MS / MS) in the extracts: quercetin in the SL-MEOH and quercetin and canferol in SL-ACOET. SL-ACOET showed higher content of phenolic compounds (12.32 mgEAG / g) than the SL-MEOH extract (7.53 ± 0.22 mgEAG / g). SL-ACOET showed higher antioxidant activity *in vitro* analyzed by concentration required to inhibit 50% of the radicals in free radical sequestration method (DPPH, $EC_{50} = 16.70 \pm 0.480$ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). The extract with the best performance in the DPPH method was used to test in lymphocytes obtained from mesenteric lymph nodes of female Wistar rats ($n = 22$). SL-ACOET at the concentration of 32 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ was able to reduce lipid peroxidation (TBARS method) induced in lymphocytes by H_2O_2 (200 mM) ($P < 0.05$), while the concentration of 16 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ improved cell viability (trypan blue method). The SL-ACOET extract decreased the cellular stress response in lymphocytes challenged by 2h 41°C heat shock (evaluated by reduced expression of iHSP70 by western blot method and reduced amounts of eHSP70 released to culture media by ELISA kit) ($P < 0.05$). This study provides new information on the antioxidant potential and ability of phenolic compounds contained in *S. lentiscifolius* bark in inhibiting the cellular response to stress, which justifies the exploration of their biological actions in the prevention of diseases related to oxidative stress and as a coadjuvant in antitumor therapy.

Keywords: oxidative stress, *S. lentiscifolius*, flavonoids, lipid peroxidation, HSP70.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Geração de espécies reativas de oxigênio a partir da redução do oxigênio.....	17
Figura 2 – Etapas da lipoperoxidação.....	18
Figura 3 – Rota biossintética dos metabólitos secundários	25
Figura 4 – Estrutura de compostos fenólicos	26
Figura 5 – Mecanismos antioxidantes diretos de compostos fenólicos	28
Figura 6 – <i>S. lentiscifolius</i>	33
Figura 7 – Fluxograma das etapas experimentais desde a coleta do material biológico até a avaliação dos efeitos sobre a resposta celular ao estresse	37
Figura 8 – Análise qualitativa por cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos da casca de <i>S. lentiscifolius</i>	47
Figura 9 – Perfil cromatográfico dos extratos obtidos da casca de <i>S. lentiscifolius</i> ..	48
Figura 10 – Espectro de massas [(-)-ESI-MS/MS] obtido para o extrato acetato de etila obtido das cascas de <i>S. lentiscifolius</i> (SL-ACOET) referente à quercetina	49
Figura 11 – Atividade antioxidante de extratos da casca de <i>S. lentiscifolius</i> pelo método DPPH.....	50
Figura 12 – Níveis de lipoperoxidação em linfócitos expostos por 1h, a 37°C, a diferentes concentrações de H ₂ O ₂ (20, 50, 100 e 200 mM).....	51
Figura 13 – Efeito do extrato acetato de etila (SL-ACOET) sobre a lipoperoxidação e viabilidade celular de linfócitos após 1h de exposição ao H ₂ O ₂ a 37°C	52
Figura 14 – Efeito do extrato acetato de etila (SL-ACOET) sobre a resposta celular ao estresse em linfócitos obtidos de linfonodo mesentérico.....	53
Figura 15 – Estrutura básica dos flavonoides quercetina e canferol.....	54
Figura 16 – Núcleo fundamental de flavonoides e sua numeração	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados espectrais, tempo de retenção de flavonoides e teor de fenóis totais nos extratos acetato de etila (SL-ACOET) e metanólico (SL-MEOH) obtidos das cascas de <i>S. lentiscifolius</i>	49
Tabela 2 – Valores de CE ₅₀ dos padrões e extratos da casca de <i>S. lentiscifolius</i>	50

LISTA DE ABREVIATURAS

- CAA: células apresentadoras de antígeno
- CAT: catalase
- CCD: cromatografia em camada delgada
- CE₅₀: concentração que reduz 50% de radical livre
- DAD: detector arranjo de diodos
- DMSO: dimetil sulfóxido
- DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
- eHSP: *Heat Shock Protein* extracelular
- eHSP70: *Heat Shock Protein* de 70 kDa extracelular
- EO: estresse oxidativo
- ER: espécies reativas
- ERN: espécies reativas de nitrogênio
- ERO: espécies reativas de oxigênio
- ESI: *electrospray ionization* (ionização por eletropulverização)
- ESI-MS/MS – *Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massa com Ionização por *Electrospray* acoplada à Espectrometria de Massa sequencial)
- Fe⁺²: ferro II
- FT: fenóis totais
- GPx: glutationa peroxidase
- GR: glutationa redutase
- GSH: glutationa reduzida
- GSSH: glutationa oxidada
- HPLC: *High Performance Liquid Chromatography* (cromatografia líquida de alta eficiência)
- HSE: *Heat Shock Element* (elemento de choque térmico)
- HSF-1: *Heat Shock Factor-1* (fator de choque térmico-1)
- HSP: *Heat Shock Protein* (proteína de choque térmico)
- H₂O₂: peróxido de hidrogênio
- iHSP70: *Heat Shock Protein* de 70 kDa intracelular
- LPO: lipoperoxidação
- MDA: malondialdeído
- MS: *Mass Spectrometry* (espectrometria de massa)

m/z: razão massa/carga

NF- κ B: fator nuclear kappa-B

NO•: óxido nítrico

NP-PEG: produto natural-polietilenoglicol

O₂: oxigênio

O₂ •⁻: superóxido

OH•: hidroxila

ONOO⁻: peroxinitrito

RL: radical livre

SL-HEX: extrato hexânico das cascas de *S. lentiscifolius*

SL-ACOET: extrato acetato de etila das cascas de *S. lentiscifolius*

SL-MEOH: extrato metanólico das cascas de *S. lentiscifolius*

SOD: superóxido dismutase

TLR: *Toll like receptors* (receptores do tipo Toll)

UV: ultravioleta

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAs.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Espécies reativas (ER), EO e suas implicações.....	16
2.1.1 ERO e ERN.....	16
2.1.2 EO e danos celulares.....	17
2.1.2.1 LPO.....	18
2.2 Sistemas de defesa antioxidante.....	18
2.3 Resposta celular ao estresse mediada por HSP.....	19
2.4 Plantas medicinais como alternativa terapêutica.....	22
2.4.1 Metabólitos secundários: a origem do potencial terapêutico das plantas.....	23
2.4.2 Compostos fenólicos como antioxidantes naturais.....	26
2.4.3 Substâncias e extratos vegetais como modulares da expressão de iHSP.....	29
2.5 Família botânica Anacardiaceae.....	31
2.5.1 Espécie <i>Schinus lentiscifolius</i> Marchand, 1869.....	32
3 OBJETIVOS.....	36
3.1 Objetivo geral.....	36
3.2 Objetivos específicos.....	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 Delineamento experimental.....	37
4.2 Material vegetal e preparação dos extratos.....	38
4.3 Técnicas cromatográficas.....	38
4.3.1 CCD.....	38
4.3.2 Identificação por HPLC-DAD-ESI-MS/MS.....	39
4.4 Teor de fenóis totais.....	39
4.5 Atividade antioxidante pela captura do radical DPPH.....	40
4.6 Animais.....	40
4.7 Preparação dos linfócitos.....	41

4.8	Determinação da concentração de H ₂ O ₂ para indução de dano lipídico	41
4.9	Efeito do extrato sobre a lipoperoxidação.....	42
4.10	Efeito do extrato sobre a resposta celular ao choque térmico	42
4.11	Análises celulares	43
4.11.1	Viabilidade celular e contagem das células pelo método de <i>Trypan Blue</i>	43
4.11.2	Determinação da LPO	43
4.11	Imunodeteccção de conteúdo intracelular de HSP70 (iHSP70)	43
4.1	Conteúdo extracelular de HSP72 (eHSP72)	45
4.13	Status imunoinflamatório pelo índice – H	45
4.14	Análise estatística	46
5	RESULTADOS	47
6	DISCUSSÃO	54
7	CONCLUSÃO	61
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
	ANEXO I - Artigo a ser submetido	75
	ANEXO II - Normas da Revista Brasileira de Farmacognosia	107
	ANEXO III – Parecer de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIJUÍ	112

1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da humanidade as plantas medicinais vêm sendo amplamente utilizadas na prevenção e no tratamento de doenças. Com o passar dos anos, o conhecimento popular acerca dos efeitos benéficos das plantas implica em estabelecer relação entre os saberes populares e a pesquisa científica, na perspectiva de responder questões relacionadas ao seu uso correto, garantia de qualidade, segurança e a eficácia dos tratamentos (FIRMO et al., 2011).

O reino vegetal tem se mostrado uma fonte valiosa de princípios ativos e a biodiversidade da flora brasileira é uma alternativa incontestável de recursos para a obtenção de novos potenciais/ativos químicos, e por isso requer estudos com relação ao potencial farmacológico das espécies que a compõe (GEHRKE, 2012). Diante do exposto, a caracterização dos constituintes químicos presentes nas plantas é parte essencial na busca por novas moléculas, alvos terapêuticos para saúde e o bem estar da humanidade.

Os produtos provenientes do metabolismo secundário de plantas ainda são os principais componentes de antineoplásicos, antimicrobianos, e de medicamentos utilizados no combate a doenças negligenciáveis como a malária e doenças cardiovasculares (GEHRKE, 2012). Neste contexto, evidenciam-se três grandes grupos de metabólitos: alcalóides, terpenóides e os compostos fenólicos, esses últimos amplamente estudados devido às propriedades antioxidantes (FARKAS; JAKUS; HEBERGER, 2004; BUBOLS et al., 2013; ALRAWAIQ; ABDULLAH, 2014).

Antioxidantes presentes nas plantas são de grande interesse na farmacologia devido à capacidade de proteger o organismo contra os danos provocados pelo estresse oxidativo (EO). O EO resulta de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, que ocorre em função do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou de nitrogênio (ERN) e pode danificar biomoléculas como lipídios, proteínas e o DNA. A concentração de ERO no ambiente celular pode ser controlado pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona redutase (GR), ou podem ser combatidos com antioxidantes não enzimáticos, que podem ter origem endógena ou dietética (BARBOSA et al., 2010).

Além dos sistemas de defesa enzimático e não enzimático, o organismo responde ao EO desencadeando a resposta celular ao estresse, a partir da expressão de *Heat Shock Proteins* (HSP) ou proteínas de choque térmico, na

tentativa de evitar a perda de funções do nível molecular ao sistêmico. Conseqüentemente, a ocorrência de doenças crônicas não transmissíveis (aterosclerose, doenças cardiovasculares, transtornos neurodegenerativos e câncer) estão relacionadas ao insucesso das defesas celulares em manter a homeostase. Nesse sentido, compostos antioxidantes, como os presentes em extratos de plantas (em especial as substâncias fenólicas), desempenham um papel fundamental na prevenção dessas doenças, pois além de protegerem biomoléculas (proteínas, lipídeos, DNA) através do sequestro de radicais livres e aumento de atividade de enzimas como a SOD e a CAT (SIMÕES et al., 2017) têm sido mencionados como moduladores (indutores/inibidores) da expressão de HSP (proteínas de choque térmico) (RAUTER et al., 2012; PUTICS et al., 2008; ASEA et al., 2015; MITJAVILA; MORENO, 2012). Diante destas evidências, parece claro que compostos antioxidantes provenientes de plantas podem ser uma alternativa para atenuar os efeitos provocados pelo estresse oxidativo no sistema celular.

No contexto regional, a região Noroeste do estado do Rio Grande do Sul (RS), que possui uma flora reduzida em função de ser uma região eminentemente agrícola, ainda apresenta um considerável número de espécies vegetais que não foram avaliadas quanto ao seu potencial químico-biológico (GEHRKE et al., 2012). A espécie *Schinus lentiscifolius*, popular aroeira-cinzenta, pertence à família Anacardiaceae, é muito comum no RS, possui inúmeras aplicações na medicina popular, porém tem sido pouco estudada quanto ao seu potencial medicinal e conteúdo de metabólitos secundários (LORENZI, 2002; ROSSINI et al., 1996; SCHENKEL et al., 2002; MONTANHA et al., 2004; PAWLOWSKI et al., 2009; VASCONCELOS; PAWLOWSKI; SOARES, 2010; GEHRKE, 2012; GEHRKE et al., 2013; PAWLOWSKI et al., 2013).

Conforme Lorenzi (2002) a planta é utilizada na medicina popular sendo que a infusão de suas folhas é utilizada para limpeza de ferimentos, enquanto que a decocção da casca da árvore produz uma essência balsâmica, que é utilizada para tratamento artrítico e dores nos pés. O látex é usado para dores musculares e dores de tendões, deslocções, fraturas e irritação da pele. A resina é recomendada para o tratamento de bronquites crônicas e a parte aérea é utilizada para tratamento antipirético (LORENZI, 2002).

Nessa perspectiva, a utilização popular de *S. lentiscifolius* somada à escassez de estudos na literatura que demonstrem o seu perfil químico e seus

efeitos biológicos motivaram a realização deste estudo. A pesquisa parte de resultados obtidos com extratos das folhas da espécie, nos quais foram identificadas substâncias fenólicas (GERHKE et al., 2013), logo, presume-se que estas possam estar presentes também em extratos da casca e possam ser responsáveis por alterar respostas celulares ao estresse. Para responder a essa hipótese, procuramos desenvolver um estudo que envolve desde a caracterização dos principais compostos fenólicos presentes nos extratos da casca da espécie *S. lentiscifolius* e a avaliação dos seus efeitos sobre a resposta celular ao estresse em linfócitos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Espécies reativas (ER), EO e suas implicações

2.1.1 ERO e ERN

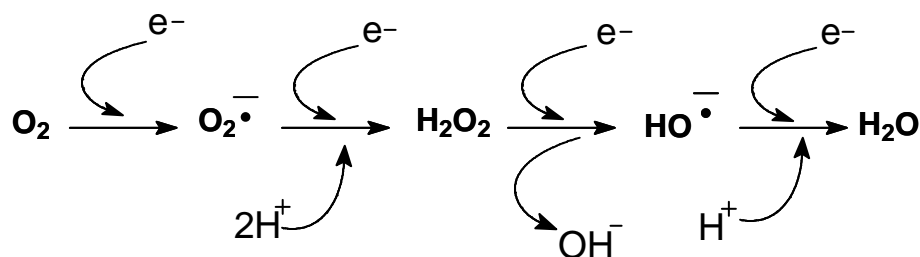
Um radical livre (RL) é uma estrutura química que possui um elétron desemparelhado na última camada, ou seja, apresentam um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. Esse elétron não pareado, na maioria das vezes, confere um alto grau de reatividade aos radicais livres (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Entretanto, existem outras espécies que, embora não possuam elétrons desemparelhados, são muito reativas em decorrência de sua instabilidade, sendo, portanto, designadas de maneira mais ampla como ERO ou ERN que podem ser gerados tanto de forma endógena quanto exógena (RIBEIRO et al., 2005). Dentre as principais espécies derivadas do oxigênio podemos citar entre as espécies radicalares, o ânion superóxido ($O_2 \bullet^-$) e o radical hidroxila ($OH\bullet$) e entre as espécies não radicalares, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). De maneira análoga, as espécies radicalares derivadas do nitrogênio podem ser representadas pelo óxido nítrico ($NO\bullet$) enquanto que as não radicalares pelo ânion peroxinitrito ($ONOO^-$). ERO e ERN quando em excesso estão associadas a lesões celulares como a lipoperoxidação (LPO), a oxidação de proteínas, a inativação enzimática, ativação excessiva de genes pró-inflamatórios e danos ao DNA. Os danos causados pelas ERO estão associados ao aumento do risco de neoplasias, doenças neurodegenerativas, *diabetes mellitus*, aterosclerose e isquemias (FERRARI; FRANÇA; HONORIO-FRANÇA, 2009; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; SALVADOR; HENRIQUES, 2004).

Os mecanismos envolvidos na geração ERO podem ocorrer por fatores exógenos (poluentes atmosféricos, radiação, toxinas e/ou microorganismos patogênicos) ou de forma endógena nas membranas celulares, no citoplasma, e principalmente nas mitocôndrias por meio da cadeia transportadora de elétrons (PENDYALA; BIJU; KUMARI, 2008; BARBOSA et al., 2010; SILVA; FERRARI, 2011). O $O_2 \bullet^-$ é o mais comumente gerado, a partir de elétrons que escapam da cadeia transportadora das mitocôndrias e reduzem o oxigênio (O_2) presente nas células (MARTELLI; NUNES, 2014).

Na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, o O_2 precisa receber quatro elétrons para que se reduza à água. Essa redução pode ocorrer de modo incompleto, quando há então a formação de $O_2 \bullet^-$, H_2O_2 e $OH\bullet$, intermediários

parcialmente reduzidos do oxigênio molecular (Figura 1) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

Figura 1 - Geração de espécies reativas de oxigênio a partir da redução do oxigênio



Fonte: SALVADOR; HENRIQUES (2004).

O principal problema é que o H_2O_2 atravessa facilmente as membranas celulares e ao reagir com íons cobre ou ferro origina o radical OH^{\bullet} que é uma ERO. O radical OH^{\bullet} reage com outras moléculas tornando-as também radicalares, no momento em que doam ou recebem elétrons, fato que desencadeia processos de oxidação da bicamada lipídica da membrana celular, do DNA e de proteínas. Em condições normais, a concentração dessas espécies dentro das células é extremamente baixa pelo fato de existirem enzimas antioxidantes que as removem, ou impedem sua formação (ROVER JÚNIOR; HÖEHR; VELLASCO, 2001).

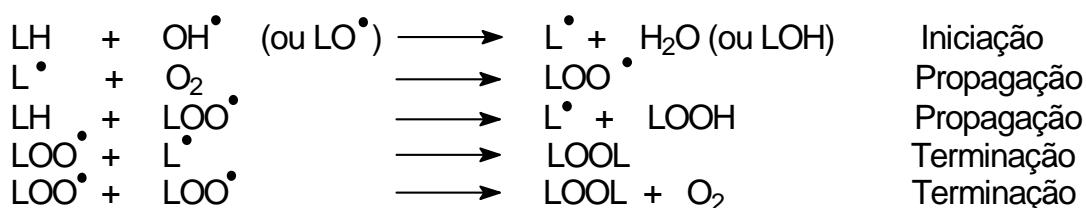
2.1.2 EO e danos celulares

A produção de ERO e ERN é observada em diversas condições fisiológicas e é imprescindível à manutenção da homeostase. Como essas ER são produzidas continuamente, o organismo conta com um eficiente sistema antioxidante para evitar o acúmulo, de forma a controlar e restabelecer o equilíbrio. Quando há um desequilíbrio entre espécies antioxidantes e pró-oxidantes com predomínio dessas últimas temos um quadro característico de EO (VASCONCELOS et al., 2007). Um dos principais mecanismos de lesão gerado pelo EO é a LPO que ocorre na membrana celular, além de danos oxidativos ao DNA e a proteínas (grupos carbonilas e sulfidrilas) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

2.1.2.1 LPO

A LPO nos tecidos caracteriza-se por uma cadeia de eventos bioquímicos envolvendo radicais livres e ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) a qual pode ser dividida em três etapas: (i) iniciação, (ii) propagação e (iii) terminação, onde L representa o lipídio (Figura 2) (PAOLINELLI; REEN; MORAES-SANTOS, 2006; GARDES-ALBERT; JORE; FERRADINI; 1991).

Figura 2 – Etapas da lipoperoxidação



A reação se inicia com o sequestro do hidrogênio do ácido graxo poli-insaturado (LH) da membrana celular que pode ser realizado pelo OH[•] ou pelo LO[•] (radical alcóxila), com conseqüente formação do L[•] (radical lipídico). Na primeira equação de propagação, o L[•] reage com o O₂, resultando em LOO[•] (radical peróxila), que, por sua vez, seqüestra novo hidrogênio do ácido graxo poli-insaturado, formando novamente o L[•] na segunda equação de propagação. Na fase de terminação ocorre os radicais (L[•] e LOO[•]) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até se autodestruírem.

Fonte: Gardes-Albert; Jore; Ferradini (1991).

A LPO causa alterações estruturais nas bicamadas lipídicas, provocando menor seletividade no transporte iônico e na sinalização transmembrana, o que prejudica o transporte celular colocando em risco a integridade de organelas e da própria célula (DELL'ANNA et al., 2007; KÜHN; BORCHERT, 2002). O dano às membranas celulares é habitualmente monitorada pelos níveis de malondialdeído (MDA) (LUZ et al., 2011) que é um produto secundário da LPO, derivado da ruptura de endociclicização de ácidos gordos poli-insaturados, tais como ácido linoléico, araquidônico e docosahexaenóico (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; LIMA; ABDALLA, 2001).

2.2 Sistemas de defesa antioxidante

O sistema antioxidante é um conjunto heterogêneo de substâncias que abrange vitaminas, minerais, pigmentos naturais e outros compostos vegetais e, ainda, enzimas, que bloqueiam o efeito danoso de radicais livres e ER formadas nas reações metabólicas ou por fatores exógenos ao organismo. A produção de agentes

pro-oxidantes por processos fisiológicos ou não, é normalmente equilibrada pela ação dos antioxidantes endógenos e exógenos (OU et al., 2002) que podem ser enzimáticos ou não enzimáticos (SALVADOR; HENRIQUES, 2004).

O sistema de defesa antioxidante enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas SOD, CAT e GPx (BARBOSA et al., 2010). A regulação desse sistema depende essencialmente de seu substrato (radicais livres e ERO ou ERN), da produção de co-substratos e da afinidade, seletividade e especificidade por esse substrato (SIES, 1993). As enzimas antioxidantes atuam de modo a prevenir, impedir e/ou controlar a formação de radicais livres e espécies reativas envolvidas com danos oxidativos.

A SOD age através de dismutação do radical O_2^{\bullet} a H_2O_2 . Esse H_2O_2 produzido pode ser então degradado por outras enzimas, como a CAT ou GPx. O H_2O_2 apesar de não ser um RL é igualmente reativo e pode causar danos potenciais através das reações de Fenton e Haber-Weiss, levando à geração do radical OH^{\bullet} , contra o qual não existe defesa enzimática. A GPx reduz o H_2O_2 à água a partir da conversão de glutathiona reduzida (GSH) em glutathiona oxidada (GSSG). Como a GSSG é capaz de promover ação oxidante em função da ligação dissulfeto existente em sua estrutura é importante a atuação da (GR) que irá recuperar a GSH de modo a manter o equilíbrio adequado entre os sistemas de defesa enzimáticos (BORELLA; VARELA, 2004; VASCONCELOS et al., 2007; BARBOSA et al., 2010).

O sistema de defesa não-enzimático inclui, especialmente, os compostos antioxidantes de origem dietética, entre os quais podemos destacar vitaminas, minerais e compostos fenólicos (BARBOSA et al., 2010), como por exemplo: ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (precursor de vitamina A) e flavonoides (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). Dessa forma, uma dieta rica em vegetais e frutos está reconhecidamente ligada à proteção de muitas doenças crônicas.

2.3 Resposta celular ao estresse mediada por HSP

Para que um organismo sobreviva é necessário que seja capaz de responder as diversas formas de estresse fisiológico e ambiental, de acordo com o prejuízo ocasionado (GUISBERG; MORIMOTO, 2013), para tanto a expressão de HSP apresenta-se como uma das formas de resposta ao estresse celular. Apesar de serem denominadas “proteínas de choque térmico”, as HSP não são apenas

produzidas em resposta ao estresse térmico, mas também consideradas um mecanismo geral de proteção contra o estresse. Nessa condição essas proteínas são induzidas e atuam em resposta a inúmeros fatores como temperaturas elevadas, formação de radicais livres e em inúmeras condições patológicas entre elas infecções e inflamações (MALYSHEV, 2013).

Essa classe de proteínas é expressa em condições de estresse via *Heat Shock Factor-1* (HSF-1) ou fator de choque térmico. Na célula normal e não-estressada o HSF-1 se apresenta como um monômero inativo e em resposta ao estresse metabólico, rapidamente sofre trimerização tornando possível sua ligação imediata a uma seqüência de nucleotídeos, chamada de *Heat Shock Element* (HSE) ou elemento do choque térmico, localizada dentro da região promotora dos genes que codificam as HSP. Essa ligação resulta em alto nível de transcrição dos genes de choque térmico (POWERS; WORKMAN, 2007).

Por outro lado, existem classes de HSP que são expressas constitutivamente, as *Constitutive Heat Shock proteins* (HSC), em indivíduos não submetidos a condições de estresse e que são de forma idêntica as induzíveis. Por exemplo, a HSC70 constitutiva (HSP73, HSPA8, HSP70-8) é expressa em níveis superiores em condições fisiológicas enquanto que a síntese da HSP70 induzível (HSP72, HSPA1A, HSP70-1) é muito maior e se acumula em diferentes compartimentos celulares após o estresse (MULTHOF et al., 2015). Em condições fisiológicas as HSP atuam como chaperonas (acompanhantes) moleculares a fim de estabilizar ou auxiliar processos fisiológicos de síntese, dobramento, transporte e controle de atividade de proteínas reguladoras (NEUER et al., 2000).

As HSP são classificadas em diferentes famílias, de acordo com o seu peso molecular (kilodaltons) e as que mais se destacam são as de 90, 70, 117, 40 e 27 kilodaltons (HSP90, HSP70, HSP117, HSP40 e HSP27, respectivamente). Seis dos oito membros da família HSP70 residem predominantemente no citoplasma e tem a função de manter a homeostase protéica através do dobramento, redobramento e montagem de polipeptídeos nascentes, prevenção da agregação de proteínas, e auxílio ao transporte de outras proteínas através das membranas (HARTL, 1996). As proteínas da família HSP70 se apresentam mais conservadas e em maior concentração nos seres eucariontes (HU; MAYER; TOMITA, 2006; NEUER et al., 2000) e possuem um importante papel anti-inflamatório através de seu efeito inibidor sobre o fator nuclear kappa-B (NF-kB) e antiapoptótico (RICHTER-LANDSBERG,

2007). Considerando que a inflamação e os danos teciduais induzidos por agentes estressores estão envolvidos em várias doenças e que o aumento do conteúdo de HSP intracelular surge como uma forma de proteção, indutores de HSP têm recebido muita atenção devido ao seu potencial terapêutico (WESTERHEIDE; MORIMOTO, 2005).

Por outro lado, sabe-se que as células tumorais tendem a expressar mais HSP que as células normais e de fato parecem ser mais dependentes desta proteína, logo, a sua inibição acaba impedindo a proliferação, induzindo apoptose e impedindo a progressão de tumores (CALDERWOOD; GONG, 2012). Nesse sentido, o estudo de agentes inibidores de HSP também tem sido também alvo da terapêutica para tumores (ASEA et al., 2015).

Atualmente, muito tem se discutido sobre o papel das HSP70 como importantes moduladoras da resposta imune e o seu envolvimento em doenças crônicas (POCKLEY, 2002; MUSIAŁ; ZWOLIŃSKA, 2011; BERNARDO et al., 2016). Se por um lado HSP70 intracelular (iHSP70) possui função anti-inflamatória e antiapoptótica (RICHTER-LANDSBERG, 2007), por outro a presença desta proteína no ambiente extracelular (eHSP70) tem sido correlacionada a processos inflamatórios. Pacientes com trauma e no período imediatamente após operação *bypass* de artéria coronária possuem níveis circulantes elevados de HSP70. Monócitos imunoestimulados parecem ser capazes de secretar ativamente HSP70. Quando no ambiente extracelular, a HSP70 é capaz de ativar células imunes inatas através de um mecanismo dependente de *Toll-like receptors* (TLR) tipo 4 o que pode servir como sinal de dano endógeno e desencadear a ativação da resposta inflamatória após uma lesão tecidual (TOWNSEND et al., 2014). No entanto, Ziegler et al. (2005) demonstraram que pacientes suplementados com glutamina via nutrição parenteral tiveram níveis de HSP70 circulantes aumentados em 3,7 vezes o que foi correlacionado à diminuição do tempo de tratamento hospitalar intensivo. Estes dados sugerem que uma elevação de eHSP70 pode representar uma tentativa de resposta imunológica diante de situações que desafiam o organismo, como doenças ou desordens fisiológicas (HECK et al, 2017).

Dentre as isoformas de HSP70, a HSP72 aparentemente é a maior representante das eHSP, embora outras formas possam também estar presentes na circulação. Existem dois mecanismos para explicar a presença de eHSP70: um mecanismo de secreção celular onde são liberadas de forma livre ou ligada a

partículas de membrana por processo de exocitose e outro através da lise e morte celular, quando as membranas são rompidas podendo HSP ser liberada passivamente para fora das células (MAIO, 2011; CALDERWOOD; GONG; MURSHID, 2016).

Uma vez presente na circulação, as HSP podem atuar como antígenos dominantes nas respostas imunológicas, pois interagem com receptores TLR-2 e TLR-4 presentes nas membranas de células apresentadoras de antígeno os quais também são ativados a partir da ligação com a proteína de superfície celular (CD4) de lipopolissacarídeos presentes nas membranas bacterianas. Essa interação com receptores TLR é capaz de ativar NF- κ B e estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α (fator de necrose tumoral-alfa), IL-1 β (interleucina-1-beta) e IL-6 (interleucina 6) (CALDERWOOD; MAMBULA; GRAY-JR, 2007). Desta forma, sabendo que a presença de HSP70 no ambiente extracelular pode levar a um quadro pró-inflamatório torna-se importante investigar a relação entre iHSP70 e eHSP70, que revela um estado imunoinflamatório (HECK; SCHOLER; HOMEM DE BITTENCOURT, 2011; KRAUSE et al., 2015; GOETTEMS-FIORIN et al., 2016), se as plantas medicinais são capazes de promover alterações na resposta celular ao estresse.

2.4 Plantas medicinais como alternativa terapêutica

Com o passar dos anos, estudos sobre a utilização de espécies vegetais demonstram-se importantes para a validação das informações acerca do uso correto das plantas pela população (indicação e formas de preparo), no sentido de garantir segurança em relação aos efeitos tóxicos, interações e contra-indicações (FIRMO et al., 2011). Como o uso de produtos naturais tem se mostrado mais seguro do que os medicamentos sintéticos, esses têm sido amplamente utilizados na prevenção e no tratamento de doenças. Algumas espécies são fontes naturais de substâncias antioxidantes e, portanto são de grande interesse na área da farmacologia por atuarem na proteção do organismo contra os danos e doenças crônicas relacionadas ao EO (FAROOQI et al., 2015; MOHAN; NANDHAKUMAR, 2014).

A validação das informações quanto à presença de constituintes químicos presentes em espécie vegetais de uso terapêutico requer o uso de técnicas analíticas aprimoradas e de diferentes abordagens. Dentre as técnicas utilizadas

para caracterização de extratos de plantas medicinais destacam-se as técnicas hífenadas (combinadas) (PATEL et al., 2010).

Compostos fenólicos e polifenólicos naturais, por exemplo, incluem uma grande variedade de substâncias que muitas vezes são encontrados como misturas complexas de multicomponentes. Por esta razão, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) está entre os métodos analíticos mais comuns utilizados para a sua separação e colunas C18 de fase reversa são comumente utilizadas devido à sua elevada polaridade e solubilidade nos eluentes mais comuns (MOTILVA; SERRA; MACIÀ, 2013; ABU-REIDAH et al., 2013).

A cromatografia líquida (HPLC) pode ser acoplada a diferentes detectores espectrofotométricos ultravioleta, dentre os quais o DAD que permitem obter um espectro de absorção a cada segundo, gerando informações que possibilitam a confirmação dos compostos (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). Assim, dados espectrais para cada pico cromatográfico podem ser coletados e armazenados à medida que os compostos eluem da coluna, fornecendo informações adicionais para confirmar a identidade do pico (LANÇAS, 2003). Já os espectrométricos como a espectrometria de massa (MS) são capazes de indicar a fórmula molecular exata da substância sem a necessidade de grandes quantidades de amostra, pois a técnica pode trabalhar com quantidades a nível traço (HARBORNE, 1998). A utilização de fontes de bombardeamento rápido de átomos como spray de elétrons (*Electrospray Ionization, ESI*) possibilita o acoplamento com muitas técnicas de separação, como HPLC, uma vez que as amostras devem ser introduzidas na forma de solução (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008).

Por essa razão, a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector arranjo de diodos (DAD) e o detector de espectrometria de massa com base nos tempos de retenção, ultravioleta (UV) e espectros de massas (HPLC-DAD-ESI-MS/MS) tem sido uma ferramenta importante para a caracterização de metabólitos ativos presentes em extratos vegetais.

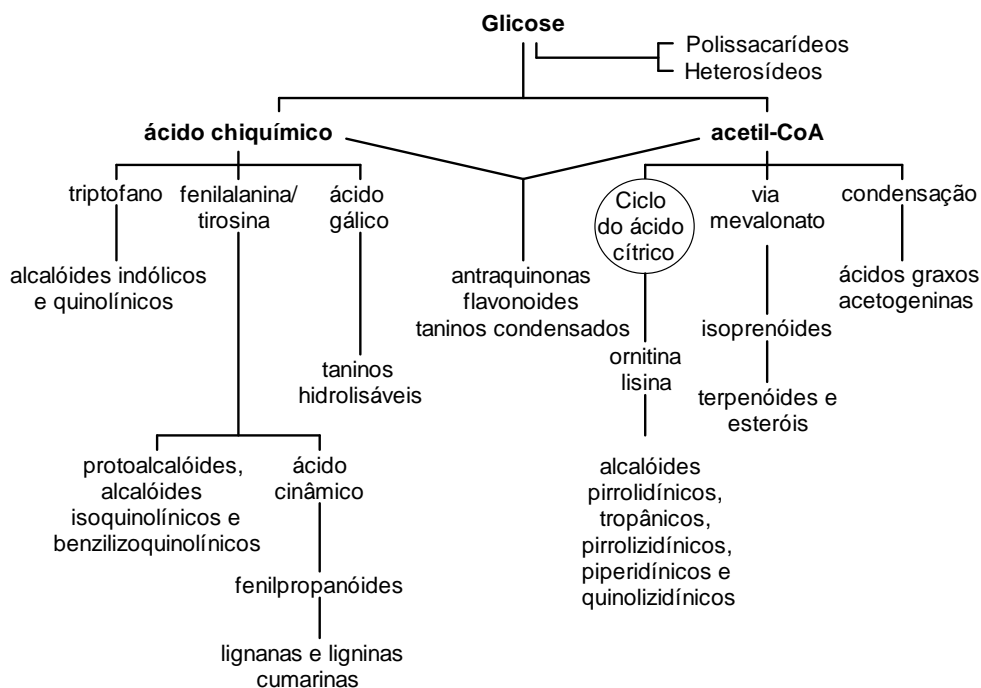
2.4.1 Metabólitos secundários: a origem do potencial terapêutico das plantas

Os metabólitos são compostos formados, degradados ou simplesmente transformados através de reações químicas que estão continuamente acontecendo nas células e que garantem a produção de energia necessária à vida. No caso dos vegetais, foi adotada por convenção a divisão entre metabolismo primário e

secundário. O metabolismo primário seria aquele responsável pela produção de substâncias (carboidratos, lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos) essenciais à manutenção da vida e comuns aos seres vivos. Já aquelas substâncias (alcalóides, flavonoides, taninos...) as quais não são necessariamente essenciais para a vida do organismo produtor, mas que garantem vantagens à sua sobrevivência (defesa contra herbívoros e microorganismos, proteção contra a radiação UV, atração de polinizadores ou animais dispersores de semente) são consideradas produtos do metabolismo secundário. O metabolismo secundário possui elevada capacidade biossintética, tanto em relação ao número de substâncias produzidas, quanto à sua diversidade numa mesma espécie, frequentemente apresentando atividades biológicas importantes (SIMÕES et al., 2010).

Segundo Leite (2008), as plantas apresentam como principais vias do metabolismo secundário, as vias do ácido chiquímico e do acetato (Figura 3). O ácido chiquímico é precursor de taninos hidrolisáveis, cumarinas, alcalóides derivados dos aminoácidos aromáticos e fenilpropanóides (compostos que tem em comum a presença de um anel aromático na sua estrutura); ao passo que os derivados do acetato são os aminoácidos alifáticos e os alcalóides derivados deles (LEITE, 2008). Existem ainda, metabólitos secundários que derivam não apenas de um desses intermediários, mas são resultantes da combinação desses dois compostos (acetato e ácido chiquímico), como é o caso das antraquinonas, dos taninos condensados e dos flavonoides (SIMÕES et al., 2010).

Figura 3 – Rota biossintética dos metabólitos secundários



Fonte: Simões et al. (2010).

Assim, como na bioquímica dos animais, as reações metabólicas dos vegetais não ocorrem de forma independente no organismo, logo a ativação de uma rota certamente significa ativações e inativações de outras, sendo que essas rotas não estão presentes em todos os organismos de forma idêntica, elas são definidas conforme a característica de cada espécie. Por exemplo, embora praticamente todas as espécies sejam capazes de produzir flavonoides, esses possuem diferenças estruturais importantes que variam de acordo com o organismo que os produz (SIMÕES et al., 2010).

Os produtos provenientes do metabolismo secundário, geralmente apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular, atividades biológicas marcantes e, diferentemente dos metabólitos primários, apresentam-se em baixas concentrações e em determinados grupos de plantas (BERG; LUBERT, 2008). Essas substâncias despertam grande interesse, não só pelas atividades biológicas exercidas pelas plantas em resposta aos estímulos do meio ambiente, mas também pela imensa atividade farmacológica que possuem sendo um campo atrativo de investigação e uma questão social importante para a melhoria da qualidade de vida humana, uma vez que são substâncias que podem ser obtidas de plantas alimentícias e medicinais (CHIANG et al., 2004; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

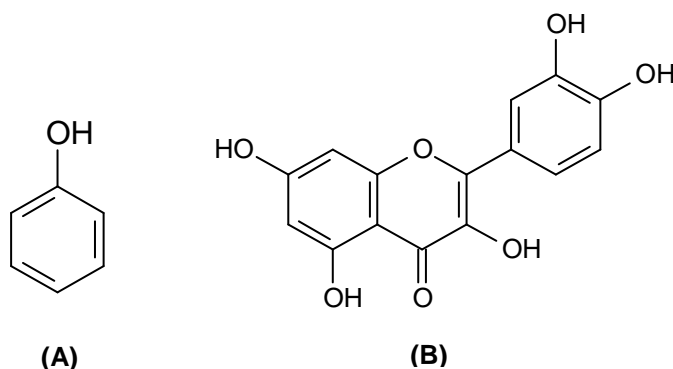
Os principais metabólitos secundários distribuem-se em três grupos de acordo com sua rota biossintética: terpenos, compostos nitrogenados (alcalóides) e compostos fenólicos (TAYZ; ZEIGER, 2013). Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico ou ácido malônico (CASTRO; KLUGE; PERES, 2005) e serão foco deste estudo devido à sua reconhecida capacidade antioxidante (LEOPOLDINI; RUSSO; TOSCANO, 2011).

2.4.2 Compostos fenólicos como antioxidantes naturais

Dentre todos os metabólitos secundários sintetizados pelas plantas, os compostos fenólicos são os mais difundidos no reino vegetal e são, portanto, os mais abundantes da dieta. Suas principais fontes alimentares são frutas e bebidas derivadas de plantas como, suco de frutas, chá, café e vinho tinto. Legumes, cereais, chocolate e leguminosas secas também contribuem para aumentar a ingestão de polifenóis totais (SCALBERT; JOHNSON; SALTMARSH, 2005).

Na natureza, os compostos fenólicos abrangem aproximadamente 8000 substâncias, todas possuindo como característica estrutural pelo menos um anel aromático com um ou mais grupamentos hidroxila, incluindo seus grupos funcionais (TORRAS-CLAVERIA et al., 2012; LEE et al., 2005). Esses compostos podem ser classificados em fenóis simples (Figura 4-A) ou polifenólicos (Figura 4-B) de acordo com o número de unidades fenólicas presentes na molécula. Os fenóis simples possuem apenas uma unidade fenólica enquanto que os polifenóis são aqueles que possuem em sua estrutura duas ou mais unidades (LEOPOLDINI; RUSSO; TOSCANO, 2011).

Figura 4 – Estrutura de compostos fenólicos



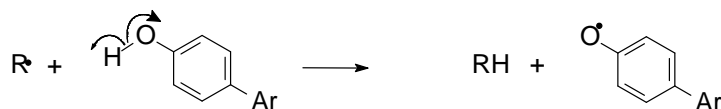
(A) Fenol simples; (B) polifenol (flavonoide quercetina)
Fonte: produção do autor.

Os compostos fenólicos são biossintetizados a partir da via dos fenilpropanoides e são frequentemente conjugados a açúcares, outros fenólicos e poliamidas (TORRAS-CLAVERIA et al., 2012). Dentre os fenólicos, merecem destaque os flavonoides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis como os mais comuns antioxidantes de fonte natural (KING; YOUNG, 1999; PANDEY; RIZVI, 2009) e é devido à elevada capacidade antioxidante do grupo, que os compostos fenólicos têm sido citados como protetores no combate ao estresse oxidativo associado a diversas doenças crônicas, como aterosclerose, hipertensão, doenças renais e cardiovasculares e obesidade desencadeadas por um aumento excessivo de espécies reativas (MORALES-GONZALES, 2013).

Os mecanismos antioxidantes envolvidos na proteção contra o estresse oxidativo podem ser classificados em mecanismos de ação diretos e indiretos. Os efeitos diretos estão envolvidos com a inibição da LPO, diminuição da formação de hidroperóxidos e estabilização de compostos eletronicamente ativos (MITJAVILA; MORENO, 2012). De forma direta, os polifenóis podem inativar radicais livres a partir da transferência de um átomo de hidrogênio à espécie radicalar (Figura 5-A), pela transferência de um elétron ao radical livre levando a formação de um ânion, espécie energeticamente estável, e um cátion que é mais estável e menos reativo que a espécie radicalar (Figura 5-B) incluindo ainda sua atuação no processo de quelação de metais como o Fe^{+2} (Figura 5-C) envolvido na reação de Fenton. Reações tipo Fenton ocasionam acúmulo de radicais livres e iniciam processos de dano às biomoléculas. Substâncias quelantes de metais atuam na remoção de metais podendo alterar seus potenciais redox tornando-os inativos. Além disso, a utilização de quelantes naturais, como os compostos fenólicos, apresenta menores problemas de toxicidade quando comparado a outros quelantes sintéticos (LEOPOLDINI; RUSSO; TOSCANO, 2011).

Figura 5 – Mecanismos antioxidantes diretos de compostos fenólicos

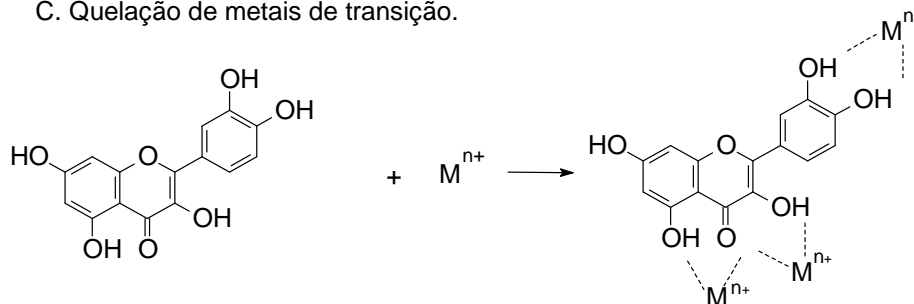
A. Transferência de um átomo de hidrogênio.



B. Transferência de um elétron.



C. Quelação de metais de transição.



Fonte: Adaptado de Leopoldini; Russo; Toscano (2011).

Com relação à ação antioxidante indireta, os compostos fenólicos interagem com vias de sinalização celulares que medeiam a função celular sob condições normais e patológicas. Através de mecanismos indiretos, substâncias fenólicas são capazes de modular vias de sinalização celular, bem como a expressão de genes, atuar na regulação de enzimas antioxidantes endógenas e promover alterações na acetilação de histonas nucleares (MITJAVILA; MORENO, 2012; RUSSO et al., 2015).

As ações antioxidantes, tanto diretas quanto indiretas, são responsáveis por promover efeitos benéficos em processos crônicos relacionados a doenças associadas com o EO (VASCONCELOS et al., 2007; SILVA; JASIULIONIS, 2014). De maneira geral, a ação benéfica dos compostos fenólicos na saúde humana vem sendo relacionada, principalmente, à sua ação sobre o sequestro de radicais livres e ER de modo a diminuir a LPO, além de potencializar a atividade de enzimas como a CAT, SOD e GPx no sentido de prevenir o desenvolvimento e progressão de doenças metabólicas como o diabetes (ANHÊ et al., 2013; CHEN et al., 2014;

D'ANDREA, 2015), doenças cardiovasculares (HABAUZIT; MORAND, 2012) câncer (CIMINO et al., 2012, BUSCH et al., 2015) e doenças neurodegenerativas (BAPTISTA et al., 2014; MAGALINGAM; RADHAKRISHNAN; HALEAGRAHARA, 2015), entre outros males associados ao estresse oxidativo.

2.4.3 Substâncias e extratos vegetais como modulares da expressão de iHSP

A expressão de HSP apresenta-se como uma forma de resposta celular ao estresse e na literatura existem estudos que relatam os efeitos da utilização de extratos de plantas ou substâncias naturais isoladas de vegetais sobre as concentrações de HSP intracelulares (NAM et al., 2013; MAITI et al., 2014; ASEA et al., 2015). Sabe-se que o aumento da expressão de HSP surge em resposta a diversas condições patológicas como uma forma de proteção, e que por isso indutores desta proteína têm recebido muita atenção devido ao seu potencial terapêutico (MALYSHEV, 2013). Por outro lado, células tumorais tendem a expressar mais HSP que as células normais e estudos de agentes que promovam a sua inibição também tem sido alvo da terapêutica (ASEA et al., 2015).

Conforme o estudo de Putics et al. (2008), o composto fenólico resveratrol demonstra um importante efeito sobre a resposta celular ao estresse. Nesse estudo, linhagem de células renais (COS-7) e linfócitos periféricos humanos foram incubados com concentrações de resveratrol que variaram de 12,5 a 200 μ M, durante 15 h e em seguida verificou-se o efeito do tratamento sobre os níveis de iHSP70. Nas culturas de células renais, o resveratrol induziu um aumento na concentração de iHSP70 de cinco vezes atingindo um valor próximo, mas menor do que o grupo que recebeu tratamento térmico a 43°C, durante 20 min, 4 horas antes da análise. Já nos linfócitos, a indução de iHSP70 parece começar na concentração de 40 μ M e atingir um plateau a 80 μ M. Apesar de nenhum desses valores ter apresentado uma significância estatística, a indução máxima pelo resveratrol tendeu a ser mais elevada do que o tratamento térmico a 43°C, durante 60 min, 4 horas antes da análise, o que sugere uma indução da resposta celular ao estresse dependente do tratamento com resveratrol.

A curcumina é outro composto fenólico com ação indutora de HSP e tem vários efeitos benéficos já verificados *in vivo* em modelos de envelhecimento, isquemia e no tratamento de doenças neurodegenerativas uma vez que tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e atuar como uma substância

anti-inflamatória, antioxidante, e como um inibidor da agregação de amilóide. Como o envelhecimento incorreto de proteínas e a sua agregação progressiva dentro e fora das células são características comuns da maior parte das doenças neurodegenerativas, a curcumina tem sido relatada como um co-adjuvante terapêutico importante por promover a restauração dos níveis de HSP intracelulares as quais protegem contra o acúmulo de proteínas danificadas nas células (MAITI et al., 2014).

O extrato etanólico de uma espécie de erva chinesa (*Eupatorium lindleyanum*) constituída de óleos voláteis, flavonoides, alcalóides, cumarinas, sesquiterpenos e ésteres foi capaz de induzir a expressão de HSP70 em células B16 (células de melanoma) (YAMASHITA et al., 2010). Pouco tempo depois, o mesmo autor busca investigar qual seriam os constituintes responsáveis pela ação anteriormente descrita para a planta e identificou duas substâncias chamadas de eupalinolide A e B (sesquiterpenos), onde ambas se apresentaram capazes de induzir a expressão de HSP70 via ativação de HSF-1 e que ambas as substâncias foram capazes de suprimir a apoptose e a produção de melanina causada pela exposição das células à radiação UV, através da indução da expressão de HSP70 (YAMASHITA et al., 2012).

Considerando que em muitos casos, o efeito das HSP e de alguns flavonoides (ex. quercetina) é oposto (enquanto os flavonoides favorecem a apoptose de células tumorais, as HSP promovem a sobrevivência), o pré-tratamento com flavonoides pode ser capaz de melhorar a eficiência da terapia hipertérmica em pacientes com câncer (HAVSTEEN, 2002).

Em 1992, Hosocawa investigava o efeito da quercetina sobre a ativação *in vitro* de HSF por temperatura elevada. Nesse estudo células de câncer de cólon foram tratadas com várias concentrações de quercetina (0,01, 0,1, 0,5 e 1,0 mM) dissolvidos em dimetil sulfóxido (DMSO) 2%, incubadas durante 45 min a 37 ou 43 ° C. Os resultados demonstraram que a 37°C, a ligação não específica não foi afetada pela quercetina. Já, a 43°C verificou-se uma supressão da ativação de HSF pela presença de quercetina 0,5 mM e uma total inibição por quercetina 1 mM. Esses resultados sugerem um importante efeito inibitório da quercetina sobre a expressão de HSP via inativação de HSF em células tumorais. Corroborando com esta hipótese, Havsteen (2002) apresenta a partir de inúmeras evidências, o pré-tratamento com quercetina como capaz de aumentar a sensibilidade térmica de

tumores através da supressão de HSP70 que ocorre pelo mecanismo de inibição da ativação de HSF, fazendo com que as células tumorais se tornem mais suscetíveis aos agentes auxiliares, ácidos e toxinas celulares aplicadas localmente. Dessa forma seria interessante incluir a terapia complementar com um agente inibidor de HSP que poderia potencializar os efeitos antineoplásicos das terapias convencionais e diminuir seus efeitos adversos (ASEA et al., 2015).

2.5 Família botânica Anacardiaceae

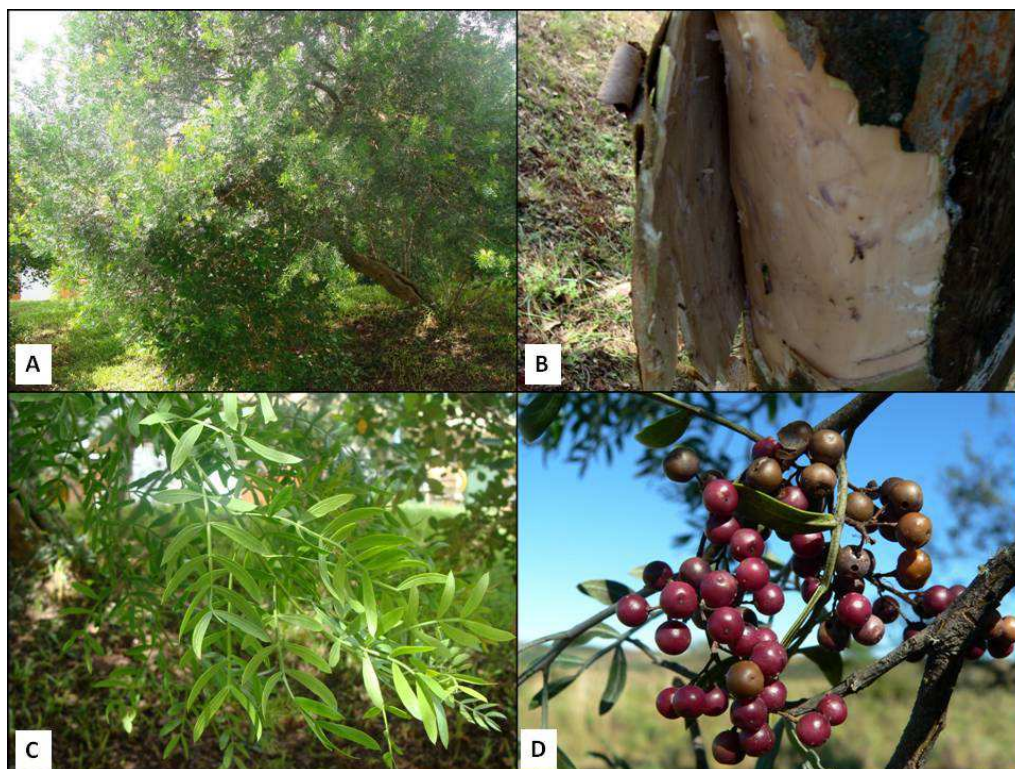
A família botânica Anacardiaceae abrange 80 gêneros (entre eles o gênero *Schinus*) e aproximadamente 600 espécies, muitas com importância alimentar, como manga (*Mangifera indica* L.), caju (*Anacardium occidentale* L.), seriguela (*Spondias mombin* L.) e pistache *Pistacia vera* L.), outras conhecidas por fornecer excelente madeira incluindo inúmeros compostos utilizáveis na indústria e na medicina. Plantas pertencentes a essa família apresentam flores, englobam árvores e arbustos e são de ocorrência nos países tropicais e temperados (LORENZI, 2002; BARROSO et al., 2002).

Uma das características da família Anacardiaceae é a presença de ductos secretores de terpenos e de goma-resina (polissacarídeos), geralmente associados ao floema (METCALFE; CHALK, 1950; ENGLER, 1896). Conduitos resiníferos conferem as espécies dessa família um aroma peculiar, sendo conhecidas pela denominação comum de “aroeira” (KATO; AKISUE, 2002). Dentre elas pode-se citar a aroeira salsa (*Schinus molle* L.), a aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi), a aroeira do campo (*Schinus lentiscifolius* March) e a aroeira de espinhos (*Schinus polygamus* Cav.) (ERAZO et al., 2006). Nos frutos, o sistema secretor, bastante desenvolvido é representado por canais ou cavidades e ocupa quase todo o mesocarpo (CARMELLO-GUERREIRO, 1996).

Aproximadamente 25% das plantas dos gêneros dessa família são caracterizadas como tóxicas e causadoras de dermatite de contato (JUDD et al., 1999). Embora os compostos fenólicos e catecólicos possuam propriedades tóxicas e alergênicas, a sua presença pode estar associada a inúmeras aplicações e usos populares sendo utilizadas como cicatrizantes, estomáquicos e antidiarréicos pela presença de taninos e óleo-resinas, a exemplo de caju-do-cerrado (*Anacardium humile* A. St.-Hil.), arendiúva (*Myracrodruon urun deuva* Allemão) e pimenteiro (*Schinus molle* L.) (LORENZI, 2002).

2.5.1 Espécie *Schinus lentiscifolius* Marchand, 1869

No Brasil, a *S. lentiscifolius* (Figura 6) é conhecida popularmente como “aroeira-cinzenta” e é utilizada na medicina popular sul-americana em diferentes preparações/formulações. A infusão (preparação indicada para partes de drogas vegetais de consistência menos rígida tais como folhas, flores, inflorescências e frutos, ou com substâncias ativas voláteis, que consiste em verter água fervente sobre a droga vegetal e, em seguida, tampar ou abafar o recipiente por um período de tempo determinado) (BRASIL, 2014) de suas folhas é utilizada para limpeza de ferimentos, enquanto que a decocção (preparação indicada para partes de drogas vegetais com consistência rígida, tais como cascas, raízes, rizomas, caules, sementes e folhas coriáceas, que consiste na ebulição da droga vegetal em água potável por tempo determinado) (BRASIL, 2014) da casca da árvore produz uma essência balsâmica, que é utilizada para tratamento artrítico e dores nos pés. O látex (fluido branco de aspecto leitoso, que representa o conteúdo citoplasmático de um sistema de células especializadas, conhecidas como laticíferos, consiste em minúsculas gotículas de matéria orgânica em suspensão ou dispersa em meio aquoso) (CUTTER, 2002; RODRIGUES, KRISPIM, 2014) é usado para dores musculares e dores de tendões, deslocções, fraturas e irritação da pele. A resina (mistura complexa de compostos orgânicos chamados terpenos, insolúvel em água, mas solúvel em alguns solventes orgânicos) é recomendada em bronquites crônicas. A parte aérea é utilizada para tratamento antipirético (LORENZI, 2002).

Figura 6 – *S. lentiscifolius*

Árvore (A), casca (B), folhas (C), frutos (D).
 Fonte: produção do autor.

Testes com extratos clorofórmicos ou diclorometânicos da espécie mostraram resultados positivos para a presença de peróxidos (SCHENKEL et al., 2002). Conforme a literatura, os peróxidos se destacam, principalmente, por sua atividade antimalárica (TARANTO et al., 2006; GUERREIRO, 2010; CHARNECA, 2011).

Diferentes frações obtidas de extratos aquosos da folha de *S. lentiscifolius* foram analisadas quanto à composição química e atividade antimicrobiana. Em todas as frações foram identificadas substâncias como mono e sesquiterpenos, o composto fenólico ácido gálico e flavonoides como a quercetina e a rutina. Do extrato bruto acetato de etila da folha foi isolado o triterpeno ácido morônico. A fração hexânica apresentou excelente atividade antifúngica, enquanto que a fração acetato de etila se mostrou mais efetiva frente a bactérias (GEHRKE et al., 2013).

Rossini et al. (1996), em estudo referente à composição química do óleo das folhas de *S. lentiscifolius*, identificaram 16 compostos, havendo predominância de sesquiterpenos hidrocarbonados onde, dentre esses, os majoritários são o δ -cadineno (16,79%) e o biciclogermacreno (6,93%). Dentre os monoterpenos hidrocarbonados identificados, o limoneno (10,36%) foi o componente presente em

maior concentração. No entanto, nesse estudo não foi evidenciada a presença de nenhum monoterpene oxigenado em *S. lentiscifolius*. Assim como no estudo de Rossini et al. (1996), Pawlowski et al. (2013) também revela a predominância de sesquiterpenos hidrocarbonatos (41,52%) e traz o δ -cadineno (14,43%) como composto majoritário presente no óleo da folha dessa espécie.

Conforme alguns estudos sugerem, o óleo essencial obtido das folhas de *S. lentiscifolius* desempenha importantes interações com as plantas associadas da biota, apresentando efeitos alelopáticos (PAWLOWSKI et al., 2009; PAWLOWSKI et al., 2013). Esses efeitos podem estar relacionados à presença de terpenos, os quais têm sido citados na literatura como responsáveis por suprimir a germinação das sementes e causar lesões para o crescimento de plântulas (SINGH; BATISH; KOHLI, 2002; VOKOU et al, 2003; ZHAO et al., 2009). Entre os sesquiterpenos hidrocarbonados identificados no óleo essencial extraído das folhas, o β -cariofileno mostrou-se capaz de inibir a germinação das sementes, raízes, partes aéreas e crescimento de determinadas espécies (PAWLOWSKI et al., 2013; WANG et al., 2010). O δ -cadineno, apresentado como composto majoritário (PAWLOWSKI et al., 2013), foi encontrado em altas concentrações no extrato de raiz do arbusto *Chrysanthemoides monilifera* spp. *rotundata* e exibiu atividade fitotóxica em *Isolepis nodosa* (ENS et al., 2009). Outros autores demonstram que, assim como o óleo, o extrato aquoso concentrado obtido das folhas de *S. lentiscifolius* também possui efeitos fitotóxicos e citotóxicos verificados sobre a germinação da alface e da cebola (VASCONCELOS; PAWLOWSKI; SOARES, 2010).

Com relação à presença de taninos que após hidrólise ácida dão origem a pequenas moléculas como o ácido gálico (GEHRKE et al., 2013), *S. lentiscifolius* tem sido citada na literatura como uma planta de elevado potencial na cicatrização de feridas (GHOSH; GABA, 2013). Os taninos ajudam no processo da cura de feridas, queimaduras e inflamações através da formação de uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre a pele ou mucosa danificada, ocorrendo, abaixo desta, o processo natural de reestruturação do epitélio e formação de vasos (SANTOS; MELLO, 2004). Os taninos podem ser classificados em dois grandes grupos, taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os taninos hidrolisáveis são constituídos por uma mistura de fenóis simples, galotaninos e elagitaninos, que após a hidrólise formam o ácido gálico e ácido elágico, que

possuem atividade anti-inflamatória e antioxidante (BATTESTIN et al., 2004; LIMA et al., 2010).

Montanha et al. (2004) buscando descobrir novos compostos com atividade frente ao vírus herpes, examinou o potencial antiviral *in vitro* de 51 espécies de plantas nativas do Sul do Brasil, entre elas *S. lentiscifolius*, que foram selecionadas, principalmente, em função de suas indicações etnofarmacológicas para o tratamento de infecções virais, como a gripe e infecções bronco pulmonares. Nesse estudo, os extratos aquoso e hidroalcoólico de *S. lentiscifolius*, demonstraram-se inativos frente ao vírus da herpes.

Com relação à atividade antioxidante de *S. lentiscifolius*, Gehrke (2012) a partir de resultados de inibição ao radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) sugere que os extratos aquosos hexânico do fruto e acetato de etila obtidos das folhas e frutos da espécie apresentam potencial antioxidante e correlaciona essa atividade à presença de substâncias pertencentes ao grupo dos compostos polifenólicos, como o composto fenólico ácido gálico e flavonoides como a quercetina e a rutina.

Apesar de existirem alguns estudos com *S. lentiscifolius*, o conhecimento a respeito dos constituintes responsáveis pela atividade farmacológica dos seus extratos ainda é escasso. A sua utilização na medicina popular e a inexistência de trabalhos na literatura que tragam o potencial medicinal e a identificação química de extratos obtidos da casca dessa espécie justifica a necessidade de serem estudados os seus efeitos biológicos.

Vale ressaltar, que o sistema antioxidante endógeno sozinho demonstra-se insuficiente e a identificação de extratos naturais com potenciais efeitos antioxidantes que evidenciem uma proteção significativa contra o estresse oxidativo pode ter um impacto clínico relevante. Nesse sentido, a triagem de extratos vegetais constitui-se uma etapa fundamental na busca por substâncias bioativas. A identificação dos constituintes químicos presentes seguido da investigação dos efeitos biológicos das plantas é imprescindível à descoberta de novos princípios ativos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar compostos fenólicos de extratos da casca de *S. lentiscifolius* (aroeira-cinzenta) e avaliar seus efeitos sobre a resposta celular ao estresse em linfócitos.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar a presença de compostos fenólicos e flavonoides nos extratos hexânico (SL-HEX), acetato de etila (SL-ACOET) e metanólico (SL-MEOH) obtidos da casca de *S. lentiscifolius*;
- Identificar os principais compostos fenólicos presentes nos extratos SL-HEX, SL-ACOET e SL-MEOH obtidos da casca de *S. lentiscifolius*;
- Avaliar o teor de fenóis totais (FT) em extratos obtidos da casca de *S. lentiscifolius*;
- Avaliar o efeito de extratos obtidos da casca de *S. lentiscifolius* sobre o sequestro ao radical livre DPPH;
- Avaliar o efeito do extrato da casca de *S. lentiscifolius* de maior potencial sobre o sequestro de radicais livres sobre a LPO de linfócitos extraídos de linfonodos mesentéricos expostos ao H₂O₂;
- Avaliar o efeito do extrato da casca de *S. lentiscifolius* de maior potencial no sequestro de radicais livres sobre a viabilidade celular de linfócitos extraídos de linfonodos mesentéricos expostos ao H₂O₂;
- Avaliar o efeito do extrato da casca de *S. lentiscifolius* de maior potencial no sequestro de radicais livres sobre os níveis de iHSP70 de linfócitos extraídos de linfonodos mesentéricos submetidos ao choque térmico;
- Avaliar o efeito do extrato da casca de *S. lentiscifolius* de maior potencial no sequestro de radicais livres sobre os níveis de eHSP70 de linfócitos extraídos de linfonodos mesentéricos submetidos ao choque térmico;
- Calcular a razão entre eHSP70 e iHSP70 em linfócitos mesentéricos tratados com o extrato de maior potencial sobre o sequestro de radicais livres e submetidos ao choque térmico.

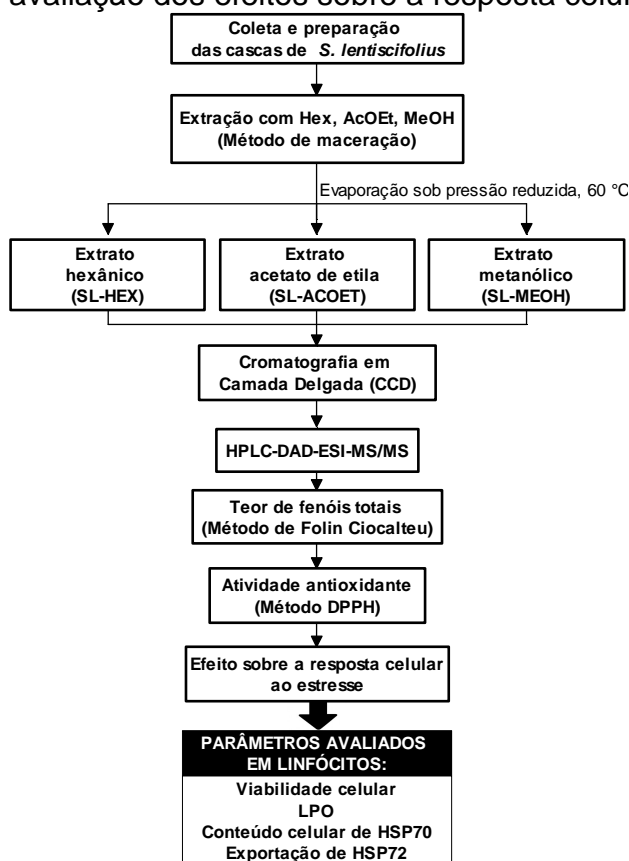
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

As cascas de *S. lentiscifolius* foram particionadas com solventes hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) obtendo-se os extratos hexânico (SL-HEX), acetato de etila (SL-ACOET) e metanólico (SL-MEOH) que foram avaliados quanto à presença de compostos fenólicos e flavonoides. Em extratos com resultado positivo para compostos fenólicos, verificou-se o teor de fenóis totais (FT) e a capacidade antioxidante a partir do método de inibição ao radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).

Para o extrato com melhor desempenho no sequestro ao radical livre DPPH, avaliamos o efeito sobre a resposta celular ao estresse em linfócitos mesentéricos de ratos Wistar fêmeos. As concentrações de extrato aplicadas nas células foram definidas conforme o comportamento do extrato frente ao método de inibição ao radical DPPH. Foram avaliados os efeitos sobre a viabilidade celular, lipoperoxidação (LPO), expressão (iHSP70) e exportação de HSP70 (eHSP70) por linfócitos. As principais etapas experimentais estão apresentadas na Fig. 7:

Figura 7 – Fluxograma das etapas experimentais desde a coleta do material biológico até a avaliação dos efeitos sobre a resposta celular ao estresse.



FONTE: produção do autor.

4.2 Material vegetal e preparação dos extratos

As cascas de *S. lentiscifolius* foram coletadas em Ijuí (latitude 28°23'16" sul e longitude 53°54'53" oeste, 328 metros do nível do mar), RS, Brasil, em outubro (primavera) de 2014 onde as temperaturas, mínima, média e máxima, encontravam-se em torno de 16, 23 e 30°C, respectivamente, a umidade relativa do ar próxima a 95%, insolação total diária de 11h e sem índices de precipitação (http://www.inmet.gov.br/sim/gera_graficos.php). As coletas foram realizadas no período da manhã. O material vegetal, identificado pela botânica Dr.^a Mara Lisiane Tissot Squalli, tem sua exsicata depositada no Herbário Rogério Bueno (UNIJUÍ) sob registro de número 6.376.

As cascas (200-250g) foram secas em estufa a 35 °C por dois dias consecutivos, cominuídas e submetidas a processo extrativo por partição sólido-líquido com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade: Hex, AcOEt e MeOH. A renovação do solvente foi realizada a cada 7dias, por 7 semanas. A extração foi inicialmente realizada com Hex, seguido da extração com AcOEt e MeOH. As fases orgânicas foram filtradas e concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida com temperatura controlada de 45 °C durante todo o procedimento. Resíduos do solvente orgânico foram eliminados através de fluxo de nitrogênio até massa constante. Esse processo deu origem aos extratos SL-HEX, SL-ACOET e SL-MEOH. O extrato utilizado para o tratamento celular foi solubilizado em DMSO1% em água destilada.

4.3 Técnicas cromatográficas

4.3.1 CCD

A análise qualitativa dos extratos SL-HEX, SL-ACOET e SL-MEOH foi efetuada em cromatofolhas de alumínio como suporte e sílica gel 60 F254 como adsorvente. A fase móvel utilizada para a eluição dos compostos foi hexano e acetato de etila (30:70). As cromatoplacas foram reveladas através de lâmpadas ultravioleta ($\lambda = 254$ e 365 nm Spectroline). Em seguida, as cromatoplacas foram borrifadas com solução cloreto de ferro III a 1% em água destilada (para detecção de compostos fenólicos) e com reagente produto natural-polietilenoglicol (NP-PEG) (específico para flavonoides) seguido de tratamento térmico em placa aquecedora a 50°C (WAGNER; BLADT, 1996).

4.3.2 Identificação por HPLC-DAD-ESI-MS/MS

As análises para caracterização de flavonóis, antocianinas, flavan-3-óis, estilbenos e ácidos hidroxicinâmicos por HPLC-DAD-ESI-MS / MS foram realizadas em sistema de HPLC Shimadzu (Tóquio, Japão) em modo de ionização positiva e negativa, equipado com uma bomba quaternária LC-10ADVP, uma FCV-10ALVP, uma unidade de degaseamento DGU-14A, um forno CTO10AVP e um detector de matriz de díodos UV-vis SPD-M10AVP, acoplado em tandem com um detector Q Trap MS / MS 3200 AB Applied Biosystems MDS Sciex (EUA). A coleta de dados do DAD foi realizada utilizando cromatografia Shimadzu através de um sistema de dados CLASSE-VP e o sistema de controle e coleta de dados HPLC-MS / MS pelo software Analyst 1.5.2.

As análises foram realizadas utilizando uma coluna C18 (Kromasil 250 × 4,6 mm, 5µm) com uma pré-coluna C-18 (Nova-Pak Waters, 22 × 3,9 mm, 4 µm) a 40°C, utilizando um gradiente de fase móvel constituído por água / acetonitrilo / ácido fórmico (87: 3: 10% v / v / v) (solvente A) e água / acetonitrilo / ácido fórmico (40: 50: 10% v / v / v) (solvente B). A taxa de fluxo foi de 0,8 mL.min⁻¹ e o gradiente foi de 94 a 70% de solvente A em 15 min, de 70 a 50% em 15 min, de 50 a 40% em 5 min e de 40 a 94% em 6 min, seguido por 9 min de estabilização a 94%. Cada amostra foi injetada em duplicata. A atribuição de identidade foi realizada considerando os tempos de retenção e por análise dos espectros DAD e ESI-MS / MS. Na análise dos espectros ESI-MS / MS o modo de ionização positiva teve como parâmetros: 5 V de energia de colisão, 4000 V de tensão de ionização, temperatura capilar a 450 ° C, gás nebulizador 40 psi e gás auxiliar 50 psi.

4.4 Teor de fenóis totais

O teor de FT nos extratos foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu com modificações (ALVES; KUBOTA, 2013). O extrato foi solubilizado a 1% (10 mg.mL⁻¹) em metanol. Esta solução (0,5 mL) foi misturada e incubada com 250 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (2N), por cinco minutos, à temperatura ambiente e, por fim, adicionou-se 2 mL de solução de carbonato de sódio (7,5%). Após incubação à temperatura ambiente, 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

(0,005 a 0,040 mg.mL⁻¹) e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato. A equação da curva de calibração do ácido gálico foi $y = 51,91x + 0,019$, onde y é a concentração de ácido gálico, e x é a absorbância a 760 nm e o coeficiente de correlação $R = 0,992$. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.5 Atividade antioxidante pela captura do radical DPPH

A técnica foi adaptada de Nascimento et al. (2011). Preparou-se uma solução estoque (1000 µg/mL) em etanol/metanol dos extratos. Em seguida foram preparadas diluições que correspondem à concentração final no ensaio de 500, 250, 125, 60, 30, 15, 7 e 3 µg.mL⁻¹. Adicionou-se a cada diluição 1 mL de solução DPPH 0,004%, exceto nos brancos. Um controle negativo foi feito pela adição de 1 mL de etanol/metanol e 1 mL de DPPH (sendo 0% de inibição). Após a adição do DPPH, aguardou-se 40 minutos para a leitura em espectrofotômetro a 515nm contra uma amostra em branco preparada para cada diluição, na qual se mantinha a mesma concentração de extrato em etanol/metanol, sem adição de DPPH. A capacidade de eliminar o radical DPPH (% de atividade antioxidante) foi calculada utilizando-se a equação: $\% \text{ inibição} = [(Ac - Aa) / Ac] \times 100$. Onde, Ac é a absorbância do controle negativo e Aa é absorbância da amostra com DPPH testada no tempo de 40 minutos.

O comportamento dos extratos frente ao sequestro do DPPH foi comparado ao de padrões antioxidantes (ácido gálico, quercetina, rutina e ácido ascórbico) e a concentração que causa 50% de inibição do radical livre DPPH (CE₅₀) foi calculada através de regressão linear a partir das médias das porcentagens de inibição. Os valores obtidos estão representados na forma de porcentagem de decréscimo da absorbância de DPPH em função da concentração da solução teste (µg.mL⁻¹).

4.6 Animais

Neste estudo, foram utilizados 22 Ratos *Wistar* fêmeos (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*), com idade entre 5-7 meses e peso corporal entre 200 e 250g, foram obtidos do biotério da UNIJUÍ onde permaneceram sob *temperatura controlada* (22± 2 °C) em *ciclo claro/escuro de 12/12h*, em caixa de polipropileno (33x17x40 cm). Ao longo dos experimentos, os animais tiveram livre acesso à água e foram alimentados com *ração padrão de laboratório* (Nuvlab®, Brasil) *ad libitum*.

Os procedimentos experimentais seguiram as normas éticas brasileiras, as recomendações das Normas Internacionais de Proteção aos Animais (1980) e do Código Brasileiro de Experimentação Animal (1988), em conformidade com o Guia de Cuidados e Utilização de Animais de Laboratório do *National Institutes of Health*. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Utilização de Animais da UNIJUÍ (n° 005/2016).

4.7 Preparação dos linfócitos

Para a obtenção dos linfócitos, os ratos foram mortos por decapitação e as células foram retiradas do linfonodo mesentérico como previamente descrito (HECK et al., 2017). Os linfócitos foram separados do tecido linfóide por esmagamento, ressuspensos em 10 mL de tampão fosfato-salino (PBS), pH 7,4. Adicionalmente, a suspensão de linfócitos foi filtrada (Whatman, catálogo n° 2105 841, 100x150mm) e centrifugada (1000g por 5 minutos). O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 5 mL (para testar o efeito do extrato sobre a viabilidade e LPO) ou em 8,1 mL (para testar o efeito do extrato sobre o conteúdo intracelular e exportação de HSP70) de meio RPMI-1640 suplementado com L-glutamina, HEPES 25mM e bicarbonato de sódio 23,8 mM (R4130, Sigma-Aldrich®), pH 7,4. O rendimento total de linfócitos nessas condições foi de cerca de 1×10^8 células por rato e viabilidade celular > 95% determinada pelo método de exclusão do Trypan Blue.

4.8 Determinação da concentração de H₂O₂ para indução de dano lipídico

Os linfócitos distribuídos em microtubos com igual suspensão celular ($\sim 10^7$ células), desafiados com H₂O₂ em diferentes concentrações: 20, 50, 100 e 200 mM. As culturas permaneceram à temperatura de 37°C durante 1h (CATALGOL; OZDEN; ALPERTUNGA, 2007). De cada animal foi obtido cerca de 10^8 células dando origem a 4 grupos experimentais duplicados com concentração aproximada de 10^6 células.mL⁻¹: Controle, 20mM, 50mM, 100mM e 200mM. O grupo Controle não recebeu nenhum tipo de tratamento. As culturas foram mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com L-glutamina, HEPES 25 mM e bicarbonato de sódio 23,8 mM (R4130, Sigma-Aldrich®). Após a incubação (1h, 37°C) as culturas foram centrifugadas a 1000g por 5 minutos, tiveram o sobrenadante desprezado e as células homogeneizadas em ácido tricloroacético 10%, com seringa de insulina para a avaliação da LPO.

4.9 Efeito do extrato sobre a lipoperoxidação

As suspensões de linfócitos foram distribuídas em microtubos com igual suspensão celular ($\sim 10^7$ células/mL), desafiados com H_2O_2 e tratados com três concentrações diferentes do extrato SL-ACOET, a $37^\circ C$ por 1h (CATALGOL; OZDEN; ALPERTUNGA, 2007) de modo a se obter 10 grupos experimentais: Controle, DMSO 1%, EXT-8, EXT-16, EXT-32, H_2O_2 , DMSO 1% + H_2O_2 , EXT-8 + H_2O_2 , EXT-16 + H_2O_2 , EXT-32 + H_2O_2 , onde os grupos identificados com DMSO 1% receberam 32 μL de DMSO 1% em água destilada, aqueles identificados com EXT-8, EXT-16, EXT-32 foram tratados com o extrato nas concentrações de 8, 16 e 32 $\mu g/mL$, respectivamente, e os grupos identificados com H_2O_2 foram desafiados com H_2O_2 200 mM. O grupo Controle não recebeu nenhum tipo de tratamento. As culturas foram mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com L-glutamina, HEPES 25 mM e bicarbonato de sódio 23,8 mM (R4130, Sigma-Aldrich®). Após a incubação, 10 μL de cada cultura foram separados para verificação da viabilidade celular. As culturas foram centrifugadas (1000g por 5 minutos), tiveram o sobrenadante desprezado e as células homogeneizadas em ácido tricloroacético 10%, com seringa de insulina para a avaliação da LPO.

4.10 Efeito do extrato sobre a resposta celular ao choque térmico

As suspensões de linfócitos foram distribuídas em microtubos com igual suspensão celular ($\sim 1 \times 10^7$ células/mL), tratadas com o extrato SL-ACOET na concentração de 32 $\mu g \cdot mL^{-1}$ dissolvido em DMSO 1% em água destilada e mantidas em banho-maria por 2h a $37^\circ C$ ou choque térmico ($41^\circ C$) de modo a se obter 8 grupos experimentais (4 grupos distintos e duplicados): C, HS, EXT, EXT + HS. O grupo Controle (C) e o grupo EXT permaneceram na temperatura de $37^\circ C$ por todo o experimento (6h), enquanto que os grupos HS e EXT + HS foram mantidos a $41^\circ C$ por 2h e a $37^\circ C$ por mais 4h. A escolha do protocolo de choque térmico por duas horas a $41^\circ C$ se deve à observação da indução de um pequeno aumento (30%) de HSP70 em linfócitos nessa temperatura (OEHLER et al., 2001). Já, a manutenção das células em cultura a $37^\circ C$ após o choque-térmico é justificada por estudos anteriores em que o pico na síntese de HSP70 ocorre em torno de 4h (AMICI; SANTORO, 1991; AMICI et al., 1992, HECK et al., 2017).

4.11 Análises celulares

4.11.1 Viabilidade celular e contagem das células pelo método de *Trypan Blue*

A contagem das células foi realizada pelo método Trypan Blue (BUROW et al., 1998). Após o isolamento e ressuspensão dos linfócitos em meio RPMI-1640 a suspensão celular foi diluída 5 ou 10 vezes de modo que a concentração final de Trypan Blue permanecesse 0,04%. Para a verificação da viabilidade celular foram contadas as células viáveis (não coradas) e não viáveis (coradas) presentes no quadrante central da câmara de Neubauer que é dada pela fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \left(\frac{\text{N}^\circ \text{ de células viáveis (não coradas)}}{\text{N}^\circ \text{ de células totais (coradas e não coradas)}} \right) \times 100$$

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 104, que é o fator de correção do volume do hemocitômetro, como se segue:

$$\text{Células/mL} = \text{n}^\circ \text{ células viáveis no quadrante central} \times \text{Fator de diluição} \times 10^4$$

As células foram distribuídas em micro tubos com igual suspensão celular ($\sim 10^6$ células.mL⁻¹) para os tratamentos.

4.11.2 Determinação da LPO

As células ($\sim 10^7$) foram homogeneizadas com seringa de insulina em ácido tricloroacético (TCA) a 10% e incubadas com ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,67% por 30 minutos a 100 °C. A absorbância foi mensurada a 535 nm e expressa a quantidade de MDA em mmol.10⁷ células⁻¹ dada em unidades arbitrárias relativas ao grupo controle (BUEGE; AUST, 1978).

4.11.3 Imunodeteção de conteúdo intracelular de HSP70 (iHSP70)

As células foram homogeneizadas com seringa de insulina em 50 µL de solução SDS 0,1% (m/v) (dodecilsulfato de sódio 0,1%) contendo inibidores de protease (PMSF 100 µmol.L⁻¹). O conteúdo de iHSP70 foi verificado por eletroforese desnaturante de quantidades idênticas de proteína carregadas em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Cada homogeneizado celular

(50 μ L) foi novamente homogeneizado com 10 μ L de tampão para eletroforese (5 M Tris pH 6,8, SDS 20% (m/v), glicerol 50% (v/v), ditioneitol 15% (v/v) e 5 mg.mL⁻¹ azul de bromofenol) e fervidos por 10 minutos para desnaturação completa das proteínas. Quantidades iguais de proteína (~35 μ g por poço) foram aplicadas no gel, para separação (4 h, 15 mA por gel, Mini-Protean Tetra Cell, BIO-RAD Laboratories, Richmond, CA, USA). Foi usado tampão contendo Tris a 25 mM e SDS a 1% (m/v), pH 8,3, gel de entrada (empilhamento) a 4% e gel de separação a 10% (em termos de monômeros de acrilamida). Foi usado como marcador de peso molecular 5 μ L de mistura de proteínas recombinantes pré-coloridas (161-0324, Biorad) por gel. A escolha por este padrão de peso molecular deve-se a presença de marcação em 78 kDa (próximo a proteína de interesse, HSP70, com ~70kDa) além da marcação em 45,7 kDa (peso aproximado ao da proteína actina, utilizado como normalizador).

Depois da separação pela corrida em gel de poliacrilamida, a porção referente ao gel de entrada foi descartada e a porção referente ao gel de separação foi submetida à eletrotransferência, em sistema refrigerado (BIO-RAD Blot Cell a 100 V constantes por 1 h) para promover a transferência das proteínas do gel para uma membrana fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Biorad). O sucesso do processo de transferência foi confirmado pela coloração da membrana de PVDF com Vermelho Ponceau S (Red Ponceau S, sal de sódio 0,3%, Sigma, em solução de ácido tricloroacético a 3%). Após este procedimento, as membranas foram descoradas com solução TBS (Tris - Glicina-Metanol a respectivamente 25mM - 192nM-10%)-Tween 0,1% (v/v).

Após a descoloração da membrana, inicia-se o procedimento de *imunoblotting* (*western blot*) onde primeiramente a membrana é mergulhada em tampão de bloqueio (leite em pó desnatado a 0,5% em TBS-Tween 0,1%) por 30min; em seguida ocorre a incubação com anticorpo monoclonal anti HSP70 (Sigma H5147, produzido em camundongo, Anti-HSP70 que reconhece tanto a forma induzível de 72-kDa quanto a forma constitutiva de 73-kDa) diluído 1:1000 em TEN-Tween 0,1%) por 12h; após, foram realizadas três lavagens (10min cada), com 15 mL TBS-Tween 0,1%; procedeu-se a incubação (1h) com o segundo anticorpo (anti-mouse contendo peroxidase Sigma A9044 a uma diluição de 1:15000 em bloto 1%); passada essa 1h foram realizadas três lavagens com duração de 10min cada, com 15 mL TBS-Tween 0,1%.

A imunodeteção foi realizada por quimiluminescência (ECL Plus RPN2132, GE). As bandas de proteína foram reveladas em filme (Amersham Hyperfilm ECL, GE Health Care). A equivalência na concentração protéica entre as amostras foi mensurada por meio da coloração do gel de poliacrilamida com corante Azul de Comassie [Comassie Blue R250 (0,1% m/v), ácido acético glacial (10% v/v) e metanol (40% v/v)], e as proteínas em torno de 43 kDa foram utilizadas para análise. A análise do conteúdo de β -actina foi usado como normalizador. Os filmes e géis foram digitalizados e as imagens quantificadas com uso do programa Image J, sendo os resultados expressos em unidades arbitrárias de HSP70 relativas ao grupo controle de cada experimento.

4.12 Conteúdo extracelular de HSP72 (eHSP72)

Após o experimento de choque térmico e tratamento com o extrato células em meios de cultura (~1mL) foram centrifugados (1000g por 5 min) e foi adicionado inibidor de protease (100 μ M PMSF) a cada alíquota de meio de cultura antes do congelamento a -20°C . As concentrações de eHSP72 nos meios de cultura foram determinadas com uso de Kit específico ultra sensível (HSP70 ELISA Kit, ENZO Life Sciences, ADI-EKS-715) em leitora de microplacas (450 nm) seguindo instruções do fabricante sendo os resultados expressos em unidades arbitrárias relativas ao grupo controle de cada experimento.

4.13 Status imunoinflamatório pelo índice – H

Para o cálculo do Índice - H, considera-se $R_c = [\text{eHSP70}]_c / [\text{iHSP70}]_c$ como a razão de HSP70 numa situação de controle, quaisquer que sejam as técnicas utilizadas para avaliar as concentrações de eHSP70 e iHSP70. Assim, o índice H pode ser calculado como o quociente de $R_j = [\text{eHSPA}]_j / [\text{iHSPA}]_j$ por R_c , que será considerado unidade normalizadora ($R_c = 1$) de todos os resultados remanescentes nessa situação “j”. Portanto, o índice-H = R_j / R_c , permite a comparação entre qualquer situação estressante “j” e a situação assumida como o controle “c”. O índice-H pode ser aplicado para estimar o balanço imunoinflamatório em muitas situações imunológicas (HECK et al., 2017).

4.14 Análise estatística

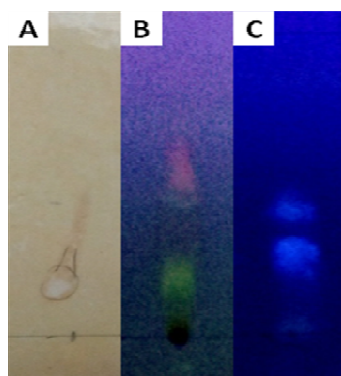
Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. A comparação entre os tratamentos quanto à atividade de sequestro ao radical DPPH foi realizada por Análise de Variância (ANOVA) de duas vias (dois fatores) de medidas repetidas seguido pelo teste de Bonferroni. O efeito das concentrações de H₂O₂ sobre a LPO foi por ANOVA de medidas repetidas. Para verificar o efeito do extrato sobre a LPO e viabilidade celular a comparação entre os grupos foi por ANOVA de uma via (um fator) seguida pelo teste de Dunnett. O efeito do choque térmico e do extrato sobre a concentração intracelular de HSP70, exportação de HSP72 (não paramétrica) e sobre a razão entre a quantidade extracelular e intracelular de HSP70 foi avaliado por ANOVA de uma via seguida de *post hoc* de Tukey. Foram consideradas significativas as comparações com $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

Cromatografia em Camada Delgada

A análise por CCD mostrou a partir da revelação com cloreto de ferro III a ausência de compostos fenólicos no extrato SL-HEX (Figura 8-A) e a presença dessas substâncias nos extratos SL-ACOET e SL-MEOH. A revelação com NP-PEG ($\lambda_{\text{excitação}} = 365 \text{ nm}$) mostrou uma banda de cor laranja e outra de cor verde relativas a compostos flavonoídicos para o extrato SL-ACOET (Figura 8-B). A cor laranja pode estar revelando substâncias como quercetina, miricetina e seus glicosídeos (flavonóis) ou luteolina e seus glicosídeos (flavonas). Já o verde pode ser característico de substâncias como o canferol, isoramnetina e seus glicosídeos (flavonóis) ou apigenina e seus glicosídeos (flavonas). Para o extrato SL-MEOH observaram-se bandas de cor azul que podem estar caracterizando ácidos fenólicos e cumarinas (Figura 8-C) (WAGNER; BLADT, 1996).

Figura 8 - Análise por cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos da casca de *S. lentiscifolius*

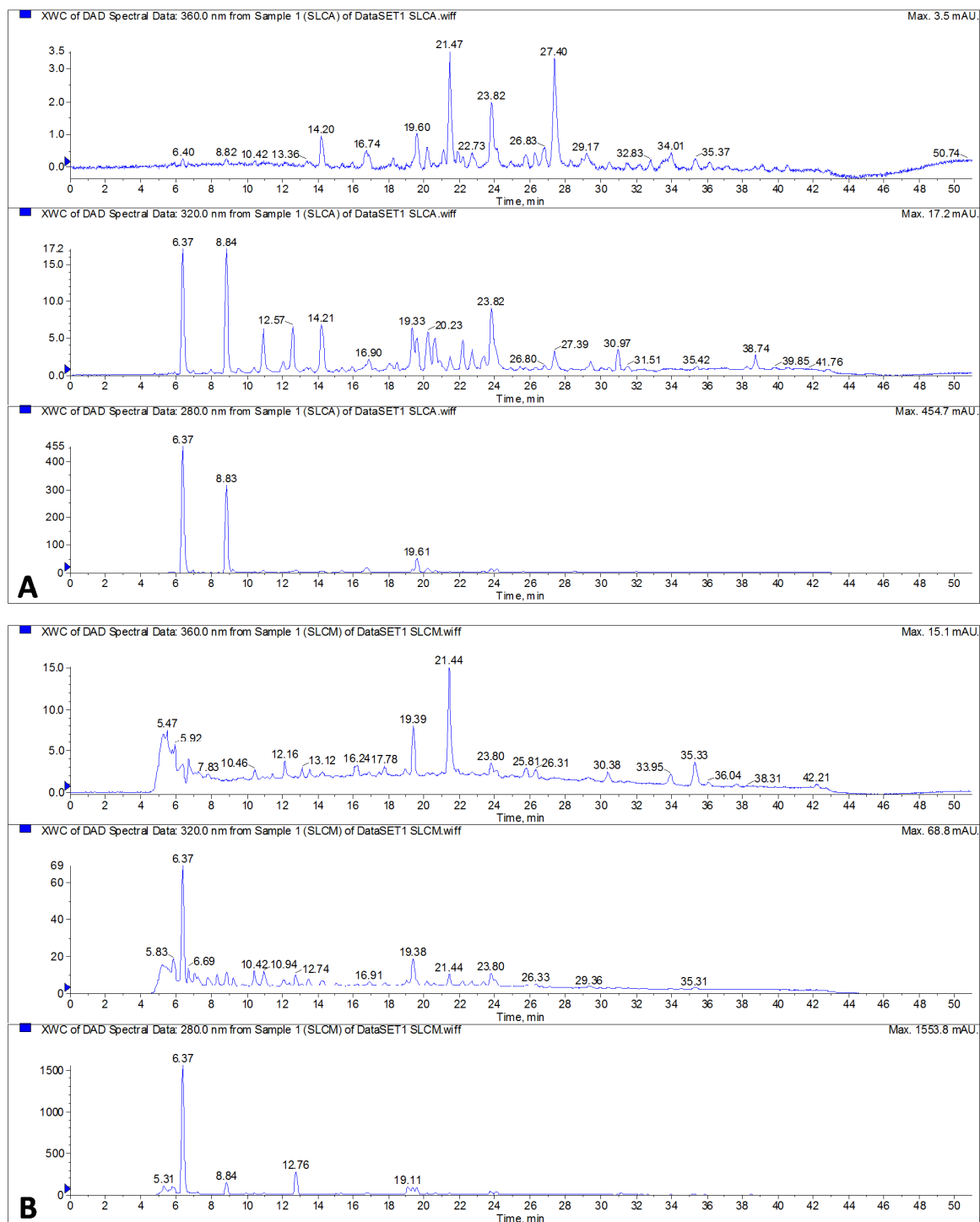


(A) SL-HEX, revelação com cloreto de ferro III. (B) SL-ACOET, revelação com NP-PEG ($\lambda_{\text{excitação}} = 365 \text{ nm}$). (C) SL-MEOH, revelação com NP-PEG ($\lambda_{\text{excitação}} = 365 \text{ nm}$). Eluente: hexano e acetato de etila (30:70).

Identificação por HPLC-DAD-ESI-MS/MS e teor de fenóis totais

Os compostos foram reconhecidos a partir de seus espectros de UV característicos, os quais foram identificados com base nos dados de HPLC-DAD-ESI-MS / MS e subsequente confirmação por comparação com os dados da literatura (KAMMERER et al., 2004). A análise por HPLC-DAD confirmou a inexistência de flavonóis, antocianinas, flavan-3-óis, estilbenos e ácidos hidroxicinâmicos no extrato SL-HEX. Os dados cromatográficos e espectroscópicos estão resumidos na Fig. 9.

Figura 9 – Perfil cromatográfico dos extratos obtidos da casca de *S. lenstiscifolius*



(A) Extrato obtido pelo método de maceração das cascas em acetato de etila (SL-ACOET). (B) Extrato obtido pelo método de maceração das cascas em metanol (SL-MEOH).

A tabela 1 apresenta os tempos de retenção, dados espectrais de massa e comprimento de onda de absorção máxima (λ_{\max}) para os compostos (quercetina e canferol) identificados no extrato SL-ACOET. A análise do perfil cromatográfico ($R_t=21,47\text{min}$) e espectro de massas para o extrato SL-ACOET, revelou um pico de

íon molecular [MH]⁻ 301,2 (m/z) (Fig. 10), consistente com um peso molecular de 302,2 g/mol, indicando a presença de um núcleo quercetina, e um pico de íon molecular [MH]⁻ 285,3 (m/z) sugerindo a massa de 286,3 g/mol, este último identificado como canferol.

Tabela 1 - Dados espectrais, tempo de retenção de flavonoides e teor de fenóis totais nos extratos acetato de etila (SL-ACOET) e metanólico (SL-MEOH) obtidos das cascas de *S. lentiscifolius*.

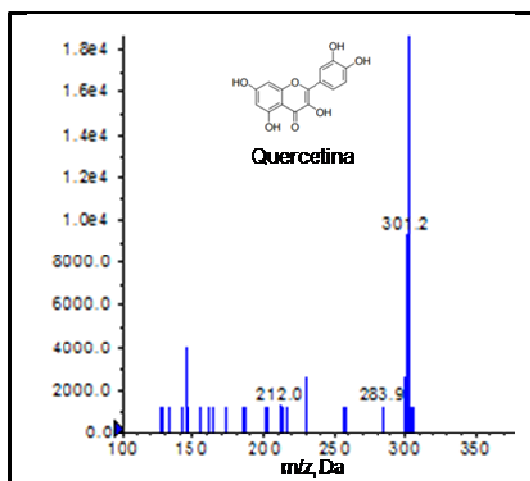
Extrato	Composto identificado	Tr (min)	λ_{\max} (nm)	Produto dos íons	[M-H] ⁻	Fenóis totais (mgEAG/g)
SL-ACOET	Quercetina	21,47	ND	212; 283,9	301,2	12,32 ± 0,21
	Canferol	27,4	ND	150; 239	285,3	
SL-MEOH	Quercetina	21,44	365,247	ND	301,1	7,53 ± 0,22

Tr: tempo de retenção; M-H: molécula desprotonada; ND: não determinado.

mgEAG/g: miligramas equivalentes de ácido gálico por g de extrato.

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

Figura 10 – Espectro de massas [(-)-ESI-MS/MS] obtido para o extrato acetato de etila obtido das cascas de *S. lentiscifolius* (SL-ACOET) referente à quercetina



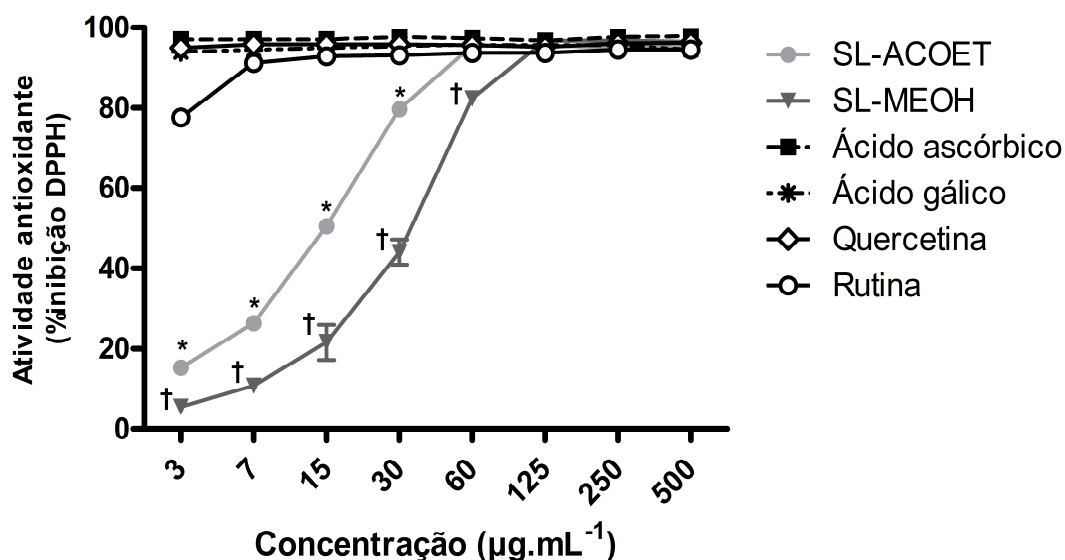
O teor fenólico determinado pelo método de Folin-Ciocalteu para o extrato SL-ACOET foi de 12,32 ± 0,21 mgEAG/g e para o extrato SL-MEOH foi de 7,53 ± 0,22 mgEAG/g (Tabela 1).

Atividade antioxidante pela captura do radical DPPH

O extrato SL-ACOET apresentou uma atividade antioxidante semelhante a todos os padrões (ácido ascórbico, ácido gálico, quercetina e rutina) em concentrações a partir de 60 µg.mL⁻¹. Já o extrato SL-MEOH demonstrou-se equivalente aos padrões somente a partir da concentração de 125 µg.mL⁻¹ (P>0,05).

O extrato SL-MEOH apresentou menor capacidade de inibir o radical DPPH do que o extrato SL-ACOET em concentrações que foram de 3 a 60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($P < 0,001$) (Fig. 11).

Figura 11 - Atividade antioxidante de extratos da casca de *S. lentiscifolius* pelo método DPPH



O percentual de inibição/sequestro de radicais livres foi calculado pela fórmula: % 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 testada no tempo de 40 minutos. SL-ACOET: extrato acetato de etila; SL-MEOH: extrato metanólico. * $P < 0,001$ vs. Ácido ascórbico, ácido gálico, quercetina, rutina; † $P < 0,001$ vs. Ácido ascórbico, ácido gálico, quercetina, rutina e SL-ACOET. Resultados expressos em média \pm desvio padrão. ANOVA de 2 vias de medidas repetidas, *post-hoc* de Bonferroni.

Os valores de CE_{50} (concentração necessária para reduzir em 50% a concentração do radical DPPH em solução) para os extratos e padrões ácido ascórbico, ácido gálico, quercetina e rutina estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de CE_{50} dos padrões e extratos da casca de *S. lentiscifolius*

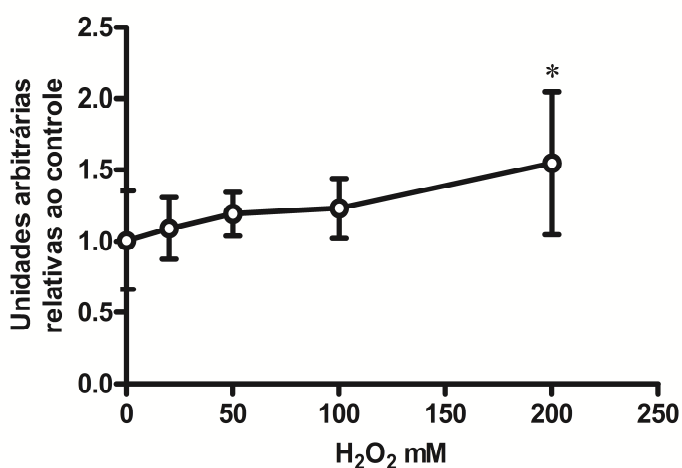
Amostras	DPPH CE_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Padrões	
ÁCIDO ASCÓRBICO	1,60 \pm 0,007
ÁCIDO GÁLICO	1,11 \pm 0,019
QUERCETINA	1,61 \pm 0,025
RUTINA	3,86 \pm 0,230
Extratos	
SL-ACOET	16,70 \pm 0,480
SL-MEOH	35,63 \pm 0,330

Valores expressos em média \pm desvio padrão (n=2).

Efeito do extrato SL-ACOET sobre a lipoperoxidação

Os níveis de LPO nos linfócitos foram diretamente proporcionais ($P=0,002$; $r^2=0,972$) a concentração de H_2O_2 utilizada, sendo que a concentração de 200 mM foi capaz de aumentar a LPO ($P<0,05$) (Fig. 12) em relação a linfócitos não tratados com H_2O_2 o que justifica a escolha desta concentração para indução do dano lipídico.

Figura 12 – Níveis de lipoperoxidação em linfócitos expostos por 1h, a 37°C, a diferentes concentrações de H_2O_2 (20, 50, 100 e 200 mM)



Valores expressos em média \pm desvio-padrão. (n=4-8). ANOVA de medidas repetidas. * $P<0,05$ vs. Controle.

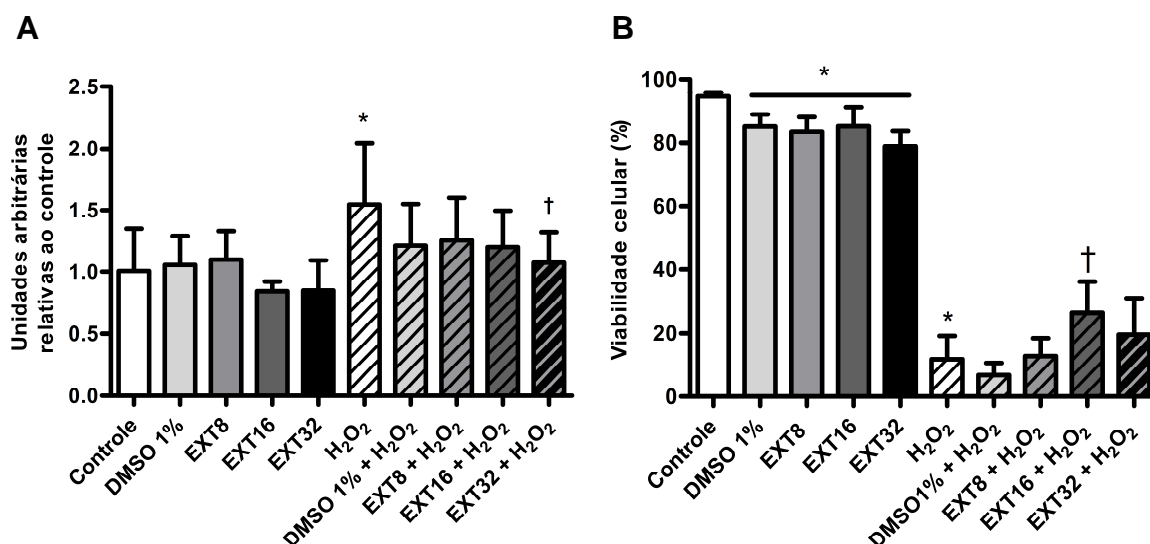
Como o CE_{50} para o extrato SL-ACOET foi de aproximadamente $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$, os linfócitos expostos ao H_2O_2 foram tratados com concentrações de extrato de 8, 16 e $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$, permanecendo a 37°C, durante 1h. O extrato não induziu LPO em nenhuma concentração testada. O grupo que recebeu o extrato na concentração de $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e o H_2O_2 , apresentou menores níveis de LPO quando comparado ao grupo que recebeu apenas H_2O_2 (Fig. 13-A).

Viabilidade celular

Os resultados referentes à viabilidade celular demonstraram que linfócitos em condições basais (sem H_2O_2) quando tratados com o extrato ou veículo (os grupos DMSO1%, EXT8, EXT16 e EXT32) tiveram uma diminuição na viabilidade (~12%) quando comparados ao grupo Controle (Fig. 13-B). Por outro lado, diante do desafio por oxidante, o tratamento com o extrato SL-ACOET na concentração de 16

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi capaz de aumentar viabilidade celular de 11,8% (grupo H_2O_2) para 26,4% (Fig. 13-B).

Figura 13 – Efeito do extrato acetato de etila (SL-ACOET) sobre a lipoperoxidação e viabilidade celular de linfócitos após 1h de exposição ao H_2O_2 a 37°C

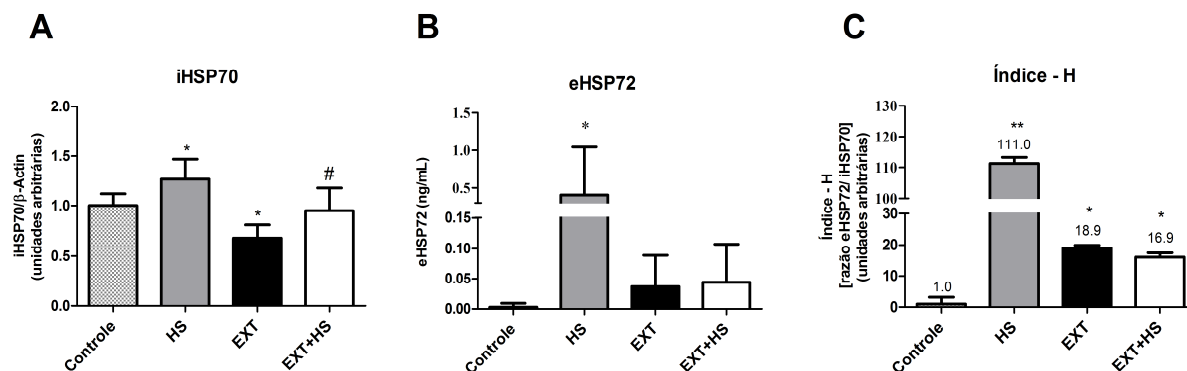


Controle (sem tratamento), DMSO 1% (32 μL de dimetilsulfóxido 1% em água destilada), EXT8, EXT16 e EXT32 (tratamento com extrato SL-ACOET nas concentrações de 8, 16 e 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente), H_2O_2 (peróxido de hidrogênio na concentração de 200 mM), EXT8+ H_2O_2 , EXT16+ H_2O_2 e EXT32+ H_2O_2 (peróxido de hidrogênio na concentração de 200 mM e tratamento com extrato SL-ACOET nas concentrações de 8, 16 e 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente). (A) Lipoperoxidação (n=4-8). (B) Viabilidade celular (n=5-6). *P < 0,05 vs. Controle, †P < 0,05 vs. H_2O_2 . Valores expressos em média \pm desvio-padrão. ANOVA de uma via seguido do teste de Dunnett para múltiplas comparações.

Efeito do extrato SL-ACOET sobre a resposta celular ao choque térmico

Como o esperado, o choque térmico aumentou os níveis de iHSP70 (HS vs Controle). Contudo, verificou-se que o tratamento com o extrato diminuiu a expressão de iHSP70 (EXT vs Controle) (Fig. 14-A). A inibição da resposta celular ao estresse também foi observada pela baixa concentração de eHSP72 nos meios de cultura (Fig. 14-B) e abolição do aumento do índice-H (relação entre eHSP70/iHSP70) (EXT+HS vs HS) em células tratadas com o extrato, mesmo quando expostas ao choque térmico (Fig. 14-C). Houve, portanto, uma resposta celular ao estresse característica induzida pelo choque térmico que na presença do extrato SL-ACOET foi inibida. No entanto, apesar de o extrato parecer ter revertido o efeito da temperatura, ainda assim observou-se um aumento do índice-H provocado pelo tratamento com o extrato (EXT vs Controle).

Figura 14 – Efeito do extrato acetato de etila (SL-ACOET) sobre a resposta celular ao estresse em linfócitos obtidos de linfonodo mesentérico

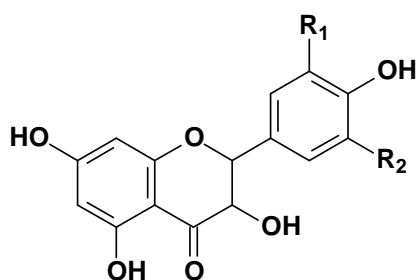


Os linfócitos foram incubados a 37°C (Controle e EXT) ou 41°C (HS e EXT+HS) durante 2h e permaneceram por mais 4h na temperatura de 37°C. Os grupos tratados com o extrato (EXT e EXT+HS) receberam o extrato acetato de etila (SL-ACOET) na concentração de 32 μ g/mL. (A) Concentração intracelular de HSP70 (n=3-5). (B) Concentração extracelular de HSP72 (n=5). (C) Razão entre a quantidade extracelular e intracelular de HSP70. *P < 0,05 vs. Controle, #P < 0,05 vs. EXT, ** P<0,05 vs. Controle, EXT e EXT+HS. Valores expressos em média \pm desvio-padrão. ANOVA de uma via seguida de *post-hoc* de Tukey.

6 DISCUSSÃO

Compostos fenólicos e flavonoides são amplamente difundidos no reino vegetal e são reconhecidos por sua atividade antioxidante (ZHAO; ZHANG; YANG, 2014). Gehrke et al. (2013) identificaram no extrato das folhas de *S. lentiscifolius* o composto fenólico ácido gálico e os flavonoides quercetina e rutina. Em nosso estudo com as cascas dessa espécie obtemos os extratos pelo método de fracionamento cujo objetivo foi obter frações enriquecidas de compostos biativos de modo a facilitar a identificação por meio de processos cromatográficos e espectroscópicos. A primeira extração com hexano (solvente apolar) teve por objetivo promover a retirada de óleos, gorduras, esteróis e pigmentos facilitando a extração posterior de flavonoides (SIMÕES et al., 2017). Deste modo, os resultados obtidos por CCD demonstraram a presença de compostos fenólicos e flavonoides no extrato SL-ACOET e de compostos fenólicos nos extrato SL-MEOH. A análise por espectrometria de massas revelou a presença dos flavonoides quercetina e canferol (Fig. 15) no extrato SL-ACOET, enquanto que no extrato SL-MEOH, apenas foi possível a identificação da quercetina (Tabela 1). Esses constituintes têm sido estudados por suas propriedades antioxidantes, como redução da LPO e controle da resposta antioxidante (SALGUEIRO et al., 2013).

Figura 15 – Estrutura básica dos flavonoides quercetina e canferol



Quercetina	R₁=OH	R₂=H
Canferol	R₁=H	R₂=H

Considerando que 98,89% da atividade antioxidante de plantas é resultado da ação de compostos fenólicos (BASMA et al., 2011) e tendo confirmada a presença de substâncias flavonoídicas, como quercetina nos extratos SL-ACOET e SL-MEOH e de canferol no extrato SL-ACOET, quantificaram-se os compostos

fenólicos totais nos extratos e à verificação da atividade antioxidante desses extratos frente ao sequestro ao radical livre DPPH.

O DPPH possui vantagens sobre outros radicais livres como os ânions $O_2^{\bullet-}$ e OH^{\bullet} , pois não é afetado por reações colaterais, como a quelação de íons metálicos e a inibição enzimática. Por esta razão o DPPH tem sido mais utilizado para testar de forma preliminar a capacidade de um composto ou extrato de planta em eliminar radicais livres. Conforme Alam, Bristi e Rafiquzzaman (2013), entre os métodos para avaliação da atividade antioxidante, o método DPPH se destaca como principal método *in vitro* e a LPO como o ensaio *in vivo* mais utilizado. Uma amostra que se revela promissora no ensaio antioxidante DPPH, pode ser alvo de estudos prospectivos *in vivo*.

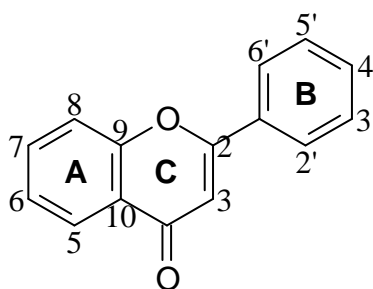
O poder antioxidante para os padrões e extratos foi mensurado a partir da concentração necessária para reduzir 50% dos radicais livres (CE_{50}). Quanto menor o valor de CE_{50} , maior o potencial antioxidante (SOWNDHARARAJAN; KANG, 2013). A partir dos valores de CE_{50} dos extratos e os seus comportamentos frente ao sequestro de radical DPPH, observa-se que o extrato SL-ACOET apresenta melhor capacidade antioxidante que o extrato SL-MEOH. Esse resultado pode ser justificado pela maior quantidade de compostos fenólicos totais no extrato SL-ACOET ($12,32 \pm 0,21$ mgEAG/g) do que no extrato SL-MEOH ($7,53 \pm 0,22$ mgEAG/g). Na literatura existem correlações positivas entre a quantidade de compostos fenólicos e o efeito sobre o sequestro ao radical livre DPPH (BASMA et al., 2011).

Antioxidantes com atividade sequestrante do radical DPPH são capazes de doar hidrogênios a radicais livres, principalmente peróxidos de lipídios ou radicais hidroperóxidos, que são os maiores propagadores da LPO (DAR et al., 2013). Por esta razão foi avaliado o efeito do extrato SL-ACOET sobre a LPO e viabilidade celular em linfócitos. A concentração de H_2O_2 mais indicada para induzir o dano lipídico (aumento de 54% na LPO) em linfócitos mesentéricos de ratas (tempo de tratamento de 1h, a $37^{\circ}C$), foi de 200 mM. A LPO induzida por H_2O_2 decorre da produção de radicais altamente reativos, como o radical OH^{\bullet} (gerado na reação de Fenton ou de Haber-Weiss) que embora tenha meia-vida curta é capaz de reagir com a maioria das macromoléculas celulares (proteínas, ácidos nucléicos, fosfolipídios, açúcares e carboidratos) (SIDDIQUE; ARA; AFZAL, 2012; CATALA, 2012). Por isso, extratos naturais que contenham compostos antioxidantes parecem

fazer parte de uma importante estratégia no sentido de minimizar os danos causados pelas espécies reativas. O extrato SL-ACOET $32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ causou uma redução de aproximadamente 30% na LPO induzida por H_2O_2 que pode ser explicada pela presença de substâncias antioxidantes no extrato, como os flavonoides quercetina e canferol. Essa habilidade se deve principalmente às características estruturais desses compostos.

Os flavonoides são constituídos por um núcleo básico de 15 carbonos ($\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$), formado por 02 anéis aromáticos (A, B) ligados através de um anel heterocíclico pirano (oxigenado) C (Fig. 16). Semelhante a outros compostos fenólicos, a atividade antioxidante de flavonoides é diretamente proporcional ao número e posição dos grupamentos hidroxila livres na molécula, e também está relacionada à estabilização eletrônica oriunda dos anéis benzênicos nos três anéis (A, B, C). Grupamentos hidroxila próximos aos carbonos 03 e 05 na presença do grupo 4-oxo no anel C geram efeitos máximos na eliminação de radicais livres (SROKA; CISOWSKI, 2003). Desta forma, a presença de compostos flavonoídicos no extrato SL-ACOET, pode ter sido responsável pela inibição da LPO observada neste estudo.

Figura 16 – Núcleo fundamental de flavonoides e sua numeração



Fonte: SIMÕES et al., 2017.

A quercetina possui uma estrutura 4',5'-catecol no anel B que aumenta muito a sua capacidade de inibição da LPO e esta é uma característica dos flavonoides com maior potencial na eliminação de radicais peróxido, superóxido e peroxinitrito (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002; OBOH; ADEMOSUN; OGUNSUYI, 2016). A inibição da formação de radicais livres pela quercetina pode ocorrer em três etapas diferentes: na iniciação (pela interação com ânions superóxido), na formação de radicais hidroxila (por quelar íons ferro) e na

peroxidação lipídica (por reagir com radicais peroxi de lipídios) (AFANAS'EV, 1989). Conforme Wang et al. (2006), tanto a quercetina quanto o canferol atuam no sequestro de radicais livres, porém a quercetina parece ter maior potencial de doação de hidrogênio que o canferol devido à presença da porção 4',5'-catecol no anel B, o que indica que sua estrutura química é pré-requisito para reforçar a atividade de sequestro a radicais livres. Portanto, a ação antioxidante de um extrato não apenas depende da concentração das substâncias nele contidas, mas também das estruturas químicas e interações com outros antioxidantes (VANDERJAGT et al., 2002). Como existe um efeito antioxidante sinérgico entre quercetina e canferol, a presença dessas duas substâncias pode potencializar a ação protetora do extrato SL-ACOET contra a LPO (HIDALGO; SÁNCHEZ-MORENO; PASCUAL-TERESA, 2010).

Os resultados relativos à viabilidade celular indicam uma pequena diminuição do número de células viáveis (~10%) em consequência da presença de DMSO. O DMSO é amplamente utilizado para diluir ou incorporar componentes ou misturas em meios aquosos para ensaios biológicos *in vitro*, no entanto, uma das preocupações em se introduzir solventes em sistemas celulares é quanto ao potencial citotóxico (SANTOS et al., 2003; TIM et al., 2013). Considerando que a concentração de 1% (v/v) só começa a apresentar toxicidade em culturas celulares a partir de três ou mais dias de incubação (BEN; KITABATAKE; DOI, 1990), optamos pela utilização desse solvente na concentração de 1% (v/v) para a solubilização do extrato SL-ACOET. Contudo, notamos uma pequena queda na viabilidade celular causada pelo DMSO (e nos extratos preparados com DMSO), mesmo estando em concentração final menor que 1% no meio de cultura por um tempo de incubação de 1h. Esta diminuição do número de células viáveis pode estar relacionada com a capacidade do DMSO em aumentar a permeabilidade das membranas celulares e permitir a passagem de compostos tóxicos para o interior das células (WALKER, 1992). Portanto, devido a inconvenientes como esse é importante verificar o efeito do solvente sobre as variáveis analisadas de forma a garantir uma correta interpretação dos resultados.

Como o esperado, quando as células são desafiadas com H_2O_2 200 mM notamos uma diminuição ainda maior na viabilidade celular (de 95% para 11,8 %). Na literatura outros estudos em diferentes condições experimentais também demonstram o H_2O_2 atuando negativamente sobre a viabilidade de linfócitos

(SHINDE et al., 2011; CHIKKANNA, 2015). Contudo, o número de células viáveis aumentou de 11,8 para 26,3% quando o extrato SL-ACOET foi administrado na concentração de 16µg/mL (Fig. 3-B). Em suma, o extrato SL-ACOET preveniu os efeitos oxidativos em linfócitos, verificado pelo aumento da viabilidade celular e pela proteção contra a LPO.

Quando avaliada a resposta celular ao estresse (caracterizada pela expressão e exportação de HSP70) (Fig. 14), observou-se que esta foi atenuada pela presença do extrato SL-ACOET. Esse efeito pode estar relacionado com a ação dos flavonoides quercetina e canferol, os quais têm sido descritos por inibir a expressão de HSP (HOSOCAWA, 1992; HAVSTEEN, 2002; KANTENGWA; POLLA, 1991). Um dos mecanismos de inibição de HSP por flavonoides é via inativação de HSF (HOSOCAWA, 1992; HAVSTEEN, 2002; YANG et al., 2016). O HSF ou fator de choque térmico, em situação de estresse celular, como elevação de temperatura, torna-se ativo (sofre trimerização) e se liga a uma sequência de nucleotídeos chamada de *Heat Shock Element* (HSE) ou elemento do choque térmico, localizada dentro da região promotora dos genes que codificam as HSP. Essa ligação resulta em alto nível de transcrição dos genes de choque térmico e é responsável por aumentar suas concentrações celulares (POWERS; WORKMAN, 2007). Quando há inibição do HSF, a quercetina o altera para uma forma que é incapaz de se ligar ao HSE e, portanto, não há produção de HSP70 no interior da célula e conseqüentemente também temos uma menor exportação desta proteína para o ambiente extracelular (Fig. 14-B) (HAVSTEEN, 2002).

Além do mecanismo de inativação de HSF, os flavonoides quercetina e canferol também podem inibir a expressão de HSP através da inibição da via da *protein kinase C* (PKC), ou proteína quinase C. A PKC é uma enzima transmembrana que tem sua atividade aumentada durante o choque térmico e quando sua via é inibida se tem uma diminuição na síntese de HSP (FERRIOLA; CODY; MIDDLETON, 1989; GAMET-PAYRASTRE, 1999). Portanto, a presença de flavonoides no extrato parece explicar a diminuição da síntese e exportação de HSP70 em linfócitos, uma vez que essas substâncias têm sido reportadas por inibir a expressão de proteínas de resposta ao estresse por mecanismos relacionados à inativação de HSF e inibição de PKC (que tem sua atividade aumentada durante o choque térmico).

A quercetina e o canferol têm sido mencionados como potenciais agentes coadjuvantes na terapia antitumoral, devido à capacidade desses compostos de também inibirem a expressão de HSP70 em células tumorais (RUSAK; GUTZEIT; LUDWIG-MÜLLER, 2002; YANG et al., 2016). Kantengwa e Polla (1991) trataram monócitos com quercetina e canferol na concentração de 100µM, 5 minutos antes do choque térmico (44°C-20 minutos) e verificaram após 2h de recuperação a 37°C que o canferol inibiu a expressão de HSP70 e que ambos os compostos foram capazes de inibir a expressão de HSP83. Portanto, pode-se sugerir que a presença dessas substâncias no extrato poderia permitir, através da inibição da expressão de HSP, que os efeitos antineoplásicos das terapias convencionais fossem potencializados.

Na condição de que o extrato é capaz de inibir a expressão e exportação de HSP72, tem-se uma preocupação quanto a esse bloqueio de resposta celular ao estresse que pode significar um prejuízo à sinalização entre células do sistema imune uma vez que esta proteína no ambiente extracelular pode atuar como uma importante sinalizadora imunológica. A resposta imunitária mediada por HSP se inicia quando a eHSP72 se liga a receptores de membrana de células apresentadoras de antígeno (CAA), tais como receptores do tipo Toll (TLR-2, TLR-4 e TLR-7), CD40 e lectinas de tipo C que levam a ativação de vias pró-inflamatórias (CALDERWOOD et al., 2007; DE MAIO, 2011). Quando as CAA (monócitos, macrófagos, linfócitos B, células dendríticas, células de *Langerhans*) ligam-se a eHSP72 por receptores específicos, estimulam uma cascata de transdução de sinal que resulta no aumento de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, óxido nítrico e moléculas coestimuladoras. Desta forma, um aumento de eHSP72 pode ser um bom indicador de condições agudas ou crônicas e, portanto o bloqueio da sua exportação em algumas situações pode comprometer a sua atuação como biomarcador de doenças (ASEA, 2006).

Nesse estudo, a atividade antioxidante demonstrada pelo extrato pode ser associada aos efeitos citoprotetores de flavonoides diante de desafios como o choque térmico. O aumento de temperatura pode gerar aumento na produção de ERO e representar um desafio redox à homeostase celular. Neste sentido, uma menor expressão de iHSP70 e menor liberação de eHSP72 podem significar um efeito protetor aos linfócitos tratados com o extrato.

Ao que se sabe, pela primeira vez na literatura são mostrados resultados relativos a efeitos celulares de extratos da casca de *S. lentiscifolius*, logo, esta é

também a primeira vez que o novo marcador de resposta celular ao estresse (índice-H, que é relação entre eHSP70/iHSP70) testado em linfócitos (HECK et al., 2017) é usado como método avaliativo do efeito de extratos vegetais. O índice-H representa o status imunoinflamatório e a capacidade funcional de linfócitos. Nesse contexto, os valores do índice-H (aumentados pelo desafio do choque térmico), atenuados pelo tratamento com o extrato, reforçam os efeitos citoprotetores do extrato das cascas de *S. lentiscifolius*. Logo, este trabalho serve de ponto de partida para novas pesquisas *in vivo* que esclareçam de fato seus mecanismos de ação a fim de melhor caracterizar os efeitos biológicos dos extratos obtidos da casca de *S. lentiscifolius*.

7 CONCLUSÃO

O extrato acetato de etila das cascas de *S. lentiscifolius* possui substâncias fenólicas da classe dos flavonoides, tais como quercetina e canferol. A presença desses compostos parece ser responsável pelo potencial antioxidante das cascas de *S. lentiscifolius*. Além disso, o extrato apresentou capacidade de abolir a resposta celular ao estresse. Em conjunto estes dados sugerem que extratos da casca de *S. lentiscifolius* podem ter ação biológica a serem explorados na prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo e como coadjuvantes de terapias complementares no tratamento do câncer.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-REIDAH, I. et al. Profiling of phenolic and other polar constituents from hydro-methanolic extract of watermelon (*Citrullus lanatus*) by means of accurate-mass spectrometry (HPLC-ESI-QTOF-MS). **Food Research International**, v. 51, p. 354-362, 2013.

AFANAS'EV, I.B. et al. Chelating and free radical scavenging mechanism of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, v. 38, n. 11, p. 1763-1769, 1989.

ALAM, M.N.; BRISTI, N.J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p.143-152, 2013.

ALRAWAIQ, N.S.; ABDULLAH, A. A Review of Flavonoid Quercetin: Metabolism, Bioactivity and Antioxidant Properties. **International Journal of PharmTech Research**, v.6, n. 3, p. 933-941, 2014.

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.

AMICI, C. et al. Antiproliferative prostaglandins activate heat shock transcription factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences** of the U S A, v. 89, n. 14, p. 6227-6231, 1992.

AMICI, C.; SANTORO, M.G. Suppression of virus replication by prostaglandin A is associated with heat shock protein synthesis. **Journal of General Virology**, v. 72, p. 1877-85, 1991.

ANHÊ, F.F. et al. Polyphenols and type 2 diabetes: A prospective review. **Pharma Nutrition**, v. 1, n. 4, p. 105-114, 2013.

ASEA, A. Initiation of the Immune Response by Extracellular Hsp72: Chaperokine Activity of Hsp72. **Current Immunology Reviews**, v. 2, n. 3, p. 209-215, 2006.

ASEA, A.A.A. et al. **Heat Shock Protein-Based Therapies**. v. 9. New York: Springer, 2015. 385 p.

BAPTISTA, F.I. et al. Flavonoids as therapeutic compounds targeting key proteins involved in Alzheimer's disease. **ACS chemical neuroscience**, v. 5, n. 2, p. 83-92, 2014.

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

BARROSO, G.M. et al. **Sistemática das Angiospermas do Brasil**. 2ª. ed. v. 1. Viçosa-MG: Editora UFV. 2002. 309 p.

BASMA, A.A. et al. Antioxidant activity and phytochemical screening of the methanol extracts of *Euphorbia hirta* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n. 5, p. 386-390, 2011.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Revista Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 63-72, 2004.

BEHBAHANI, M. et al. In vitro anti-HIV-1 activities of kaempferol-7-O-glucoside isolated from *Securigera securidaca*. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 6, p. 463-469, 2014.

BEN, T.A.; KITABATAKE, N.; DOI, E. Toxicity of dimethyl sulfoxide as a solvent in bioassay system with HeLa cells evaluated colorimetrically with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 2961-2966, 1990.

BERG, J. M. T. E LUBERT, J. **Bioquímica**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 545p.

BERNARDO, B.C. et al. HSP70: therapeutic potential in acute and chronic cardiac disease settings. **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 18, p. 2177-2183, 2016.

BORELLA, M.L.L.; VARELA, Q.D. Antioxidantes enzimáticos. In: SALVADOR, M.; HENRIQUES, J.A.P. **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. Canoas: ULBRA, 2004, p. 35-36.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 26 de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Online. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a9e43d0044140f579b5affb9cd167b7c/dc0026_13_05_2014.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 10 nov. 2015.

BUBOLS, G.B. The Antioxidant Activity of Coumarins and Flavonoids. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 3, 2013.

BUEGE, J.A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 302-309, 1978.

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.

BUSCH, C. et al. Epigenetic activities of flavonoids in the prevention and treatment of cancer. **Clinical epigenetics**, v. 7, n. 1, p. 1-18, 2015.

CALDERWOOD, S.K. et al. Cell surface receptors for molecular chaperones. **Methods**, v. 43, n.3, p. 199-206, 2007.

CALDERWOOD, S.K.; MAMBULA, S.S.; GRAY-JR, P.J. Extracellular heat shock proteins in cell signaling. **New York Academy of Sciences**, v.1113, p. 28-39, 2007.

CALDERWOOD, S.K.; GONG, J. Molecular chaperones in mammary cancer growth and breast tumor therapy. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, n. 4, p. 1096-1103, 2012.

CALDERWOOD, S.K.; GONG, J.; MURSHID, A. Extracellular HSPs: The Complicated Roles of Extracellular HSPs in Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. 2, 2016.

CARMELLO-GUERREIRO, S.M. **Morfologia, anatomia e desenvolvimento dos frutos, sementes e plântulas de *Schinus terebinthifolius* Raddi, *Lithraea molleoides* (Vell) Engl., *Myracrodruon urundeuva* Fr. Allem. e *Astronium graveolens* Jacq. (Anacardiaceae)**. 1996. 90f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1996.

CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A.; PERES, L.E.P. **Manual de Fisiologia Vegetal: teoria e prática**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2005. v. 1. 640 p.

CATALA, A. **Lipid Peroxidation**. InTech, 2012. 546 p.

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.

CHARNECA, P.J.M. **Endoperóxidos de origem marinha com atividade antimalárica**. 2011. 49 p. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Algarve – Portugal.

CHEN, Y. et al. Single-dose oral quercetin improves redox status but does not affect heat shock response in mice. **Nutrition Research**, v. 34, n. 7, p. 623-629, 2014.

CHEN, A.Y.; CHEN, Y.C. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. **Food Chemistry**, v. 138, p. 2099-2107, 2013.

CHIANG, Y.M. et al. Metabolite profiling and chemopreventive bioactivity of plant extracts from *Bidens pilosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, p. 409-419, 2004.

CHIKKANNA, D. et al. Hydrogen peroxide induced dna damage: protection by pippali (*Piper longum*) aqueous extract. **European Journal of Pharmaceutical and Medical Research**, v. 2, n. 3, p. 568-574, 2015.

CIMINO, S. et al. Polyphenols: key issue involved in chemoprevention of prostate cancer. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, 2012.

CUTTER, E.G. **Plant anatomy**. Translated by Vera Maria Gabriela Caruso Catena. Part I. Cells and Tissues. 2. ed. São Paulo, Rocca, 2002, 304 p.

DAR, R.A. et al. Evaluation of antioxidant activity of crocin, podophyllotoxin and kaempferol by chemical, biochemical and electrochemical assays. **Arabian Journal of Chemistry**, p. 1-10, 2013.

D'ANDREA, G. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? **Fitoterapia**, v. 106, p. 256-271, 2015.

DELL'ANNA, M.L. et al. Membrane lipid alterations as a possible basis for melanocyte degeneration in vitiligo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n.5, p. 1226-1233, 2007.

DE MAIO, A. Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the stress observation system: a form of communication during injury, infection, and cell damage. It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa. **Cell Stress Chaperones**, v. 16, n. 3, p. 235-249, 2011.

DEVI, K.P. et al. Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. **Pharmacological Research**, v. 99, p. 1-10, 2015.

ENGLER, A. Anacardiaceae: Anatomisches Verhalten. **Leipzig: Die Natürlichen Pflanzenfamilien Bd**, p. 139-140, 1896.

ENS, E.J. et al. Identification of volatile compounds released by roots of an invasive plant, bitou bush (*Chrysanthemoides monilifera* spp. rotundata), and their inhibition of native seedling growth. **Biological Invasions**, v. 11, p. 275–287, 2009.

ERAZO, S. et al. Constituents and biological activities of *Schinus polygamus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 395-400, 2006.

FARKAS, O.; JAKUS, J.; HÉBERGER, K. Quantitative Structure – Antioxidant Activity Relationships of Flavonoid Compounds. **Molecules**, v. 9, p. 1079-1088, 2004.

FAROOQI, A.A. et al. Natural Products Mediated Regulation of Oxidative Stress and DNA Damage in Ultraviolet Exposed Skin Cells. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 16, n. 12, p. 1078-1084, 2015.

FERRARI, C.K.B.; FRANÇA, E.L.; HONORIO-FRANÇA, A.C. Nitric oxide, health and disease. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 7, p. 163-73, 2009.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERRIOLA, P.C.; CODY, V.; MIDDLETON JR, E. Protein kinase C inhibition by plant flavonoides: kinetic mechanisms and structure-activity relationships, **Biochemical Pharmacology**, v. 38, n. 10, p. 1617-1624, 1989.

FIRMO, W.C.A. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Caderno de Pesquisa**, v. 18, n. especial, 2011.

GAMET-PAYRASTRE, L. et al. Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. **General Pharmacology Journal**, v. 32, n. 3, p. 279-286, 1999.

GARDÈS-ALBERT, M.; JORE, D.; FERRADINI, C. Membrane lipid peroxidation: pulse and γ -radiolysis in oxyradical research. **Membrane lipid oxidation**, v. 2, p. 1-30, 1991.

GEHRKE, I.T.S. **Estudo fitoquímico e biológico das espécies *Schinus lentiscifolius*, *Schinus terebentifolius*, *Schinus molle* e *Schinus polygamus* (anacardiaceae) do RS.** 2012. 184 f. Tese (Tese em Química Orgânica) - Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS.

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

GHOSH, P.K.; GABA, A. Phyto-Extracts in Wound Healing. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n.5; p. 760-820, 2013.

GOETTEMS-FIORIN, P.B. et al. Fine particulate matter potentiates type 2 diabetes development in high-fat diet-treated mice: stress response and extracellular to intracellular HSP70 ratio analysis. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 72, n. 4, p. 643–656, 2016.

GUERREIRO, B.E.C. **Endoperóxidos com actividade antimalárica: estrutura, reactividade e actividade.** 2010. 54 p. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Algarve – Portugal.

GUISBERT, E.; MORIMOTO, R.I. The regulation and function of the heat shock response. In: **Protein Quality Control in Neurodegenerative Diseases**. Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 1-18.

HABAUZIT, V.; MORAND, C. Evidence for a protective effect of polyphenols containing foods on cardiovascular health: an update for clinicians. **Therapeutic Advances Chronic Disease**, v.3, p. 87-106, 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine.** 4ª edição. Oxford University Press, 2007. 704 p.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** Edição ilustrada: Oxford University Press. 2015. 896 p.

HANASAKI, Y; OGAWA, S; FUKUI, S. The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 16, p. 845-850, 1994.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical Methods: A guide to modern techniques of plant analysis.** Chapman and Hall: New York, 3rd ed., 1998.

HARTL, F.U. Molecular chaperones in cellular protein folding. **Nature**, v. 381, p. 571–579, 1996.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & therapeutics**, v. 96, n. 2, p. 67-202, 2002.

HECK, T.G.; SCHOLER, C.M.; HOMEM DE BITTENCOURT, P.I. Jr. HSP70 expression: does it a novel fatigue signalling factor from immune system to the brain? **Cell Biochemistry and Function**, v. 29, p. 215-226, 2011.

HECK, T.G. et al. Acute exercise boosts cell proliferation and the heat shock response in lymphocytes: correlation with cytokine production and extracellular-to-intracellular HSP70 ratio. **Cell Stress Chaperones**, v. 22, n. 2, p. 271-291, 2017.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002.

HIDALGO, M.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; PASCUAL-TERESA, S. Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 121, p. 691–696, 2010.

HOSOCAWA, N. et al. Inhibition of the Activation of Heat Shock Factor In Vivo and In Vitro by Flavonoids. **Molecular and Cellular Biology**, v. 12, n. 8, p. 3490-3498, 1992.

HU, B.; MAYER, M.P.; TOMITA, M. Modeling Hsp70-Mediated Protein Folding. **Biophysical Journal**, v. 91, p. 496-507, 2006.

JUDD, W. S. et al. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. Sunderland: Sinauer, 1999. p. 339-340.

KAMMERER, D. et al. Polyphenol Screening of Pomace from Red and White Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, 4360-4367, 2004.

KANTENGWA, S.; POLLA, B.S. Flavonoids, but not protein kinase C inhibitors, prevent stress protein synthesis during erythrophagocytosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 180, n. 1, p. 308-314, 1991.

KATO, E.T.M.; AKISUE, G. Estudo farmacognóstico de cascas de *Myracrodruon urundeuva*. **Revista Lecta**, v. 20, p. 69-76, 2002.

KING, A; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 50, n. 2, p. 213-218, 1999.

KIM, S.H.; CHOI, K.C. Anti-cancer Effect and Underlying Mechanism(s) of Kaempferol, a Phytoestrogen, on the Regulation of Apoptosis in Diverse Cancer Cell Models. **Toxicology Research**, v. 29, n. 4, p. 229-234, 2013.

KRAUSE, M. et al. The chaperone balance hypothesis: the importance of the extracellular to intracellular HSP70 ratio to inflammation-driven type 2 diabetes, the effect of exercise, and the implications for clinical management. **Mediators Inflammation**, v. 2015, p. 1-12, 2015.

KÜHN, H.; BORCHERT, A. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, n. 2, p. 154-172, 2002.

LANÇAS, F.M. The role of the separation sciences in the 21th century. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 183-197, 2003.

LARSON, R. L. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, v. 4, p. 969-978, 1988.

LEE, S.J. et al. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 131-137, 2005.

LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. 1ª edição. São Paulo: Atheneu, 2008. 344p.

LEOPOLDINI, M.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 125, p. 288-306, 2011.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LIMA, C. R. O. et al. Caracterização dos metabólitos secundários do barbatimão. In: SILVA, L. A. F. et al. **Manual do barbatimão**. Goiânia: Kelps, 2010. p. 61-68.

LI, X.; WU, X.; HUANG, L. Correlation between Antioxidant Activities and Phenolic Contents of *Radix Angelicae Sinensis* (Danggui). **Molecules**, v. 14, p. 5349-5361, 2009.

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

LUZ, H.K.M. et al. Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, p. 1-13, 2011.

MAGALINGAM, K.B.; RADHAKRISHNAN, A.K.; HALEAGRAHARA, N. Protective Mechanisms of Flavonoids in Parkinson's Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 1-14, 2015.

MAITI, P. et al. Molecular Chaperone Dysfunction in Neurodegenerative Diseases and Effects of Curcumin. **BioMed Research International**, v. 2014, n. 1, 2014.

MALYSHEV, I. **Immunity, Tumors and Aging: The Role of HSP70**. New York: Springer Verlag. 2013. 141 p.

MAIO, A.D. Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: A form of communication during injury, infection, and cell damage. **Cell Stress and Chaperones**, v. 16, p.235-249, 2011.

MARCO, P.H.; POPPI, R.J.; SCARMINIO, I.S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p.1218-1223, 2008.

MARTELLI, F.; NUNES, F.M.F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 3, p. 54-57, 2014.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. v. 1, Claredon Press, Oxford. 1950.

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.

MOHAN, S.; NANDHAKUMAR, L. Role of various flavonoids: Hypotheses on novel approach to treat diabetes. **Journal of Medical Hypotheses and Ideas**, v. 8, p. 1-6, 2014.

MONTANHA, J. A. et al. Antiviral Activity of Brazilian Plant Extracts. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, n. 2, p. 183-186, 2004.

MORALES-GONZALES, J.A. **Oxidative stress and chronic degenerative diseases**: A role for antioxidants. InTech. 2013. 501 p.

MOTILVA, M.; SERRA, A.; MACIÀ, A. Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: an overview. **Journal Chromatography A**, v. 1292, p. 66-82, 2013.

MULTHOFF, G. et al. The role of heat shock protein 70 (Hsp70) in radiation-induced immunomodulation. **Cancer Letters**, v. 368, n. 2, p. 179-184, 2015.

MUSIAŁ, K.; ZWOLIŃSKA, D. Heat shock proteins in chronic kidney disease. **Pediatric Nephrology**, v. 26, p. 1031-1037, 2011.

NAM, J.W. et al. Heat Shock Factor 1 Inducers from the Bark of *Eucommia ulmoides* as Cytoprotective Agents. **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, n. 7, p. 1322-1327, 2013.

NASCIMENTO, J.C. et al. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonoides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 92, n. 4, p. 327-332, 2011.

NEUER, A. et al. The role of heat shock proteins in reproduction. **Human Reproduction Update**, v. 6, n. 2, p. 149-159, 2000.

OBOH, G.; ADEMOSUN, A.O.; OGUNSUYI, O.B. Quercetin and Its Role in Chronic Diseases. In: GUPTA, S.C.; PRASAD, S.; AGGARWAL, B.B. **Drug Discovery from Mother Nature**. Springer, v. 929. 2016. p. 377-387.

OEHLER, R. et al. Cell type-specific variations in the induction of hsp70 in human leukocytes by feverlike whole body Hyperthermia. **Cell Stress & Chaperones**, v. 6, n. 4, p. 306-315, 2001.

OU, B. et al. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3122-3128, 2002.

PANDEY, K.B.; RIZVI, S.I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 5, p. 270-278, 2009.

PAOLINELLI, S. T.; REEN, R.; MORAES-SANTOS, T. Curcuma longa ingestion protects in vitro hepatocyte membrane peroxidation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 3, p. 429-435, 2006.

PATEL, K.N et al. Introduction to hyphenated techniques and their applications in pharmacy. **Pharm Methods**, v.1, n.1, p. 2-13, 2010.

PAWLOWSKI, Â. et al. **Potencial alelopático dos óleos voláteis de *S. lentiscifolius* March**. Porto Alegre: URGs, 2009.

PAWLOWSKI, Â. et al. Chemical composition of *Schinus lentiscifolius* March. essential oil and its phytotoxic and cytotoxic effects on lettuce and onion. **South African Journal of Botany**, v. 88, p. 198-203, 2013.

PENDYALA, G.; THOMAS, B.; KUMARI, S. The challenge of antioxidants to free radicals in periodontitis. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 12, n. 3, p. 79-83, 2008.

PEREIRA, R.J; CARDOSO, M.G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

POCKLEY, A.G. Heat Shock Proteins, Inflammation, and Cardiovascular Disease. **Circulation**, v. 105, p. 1012-1017, 2002.

POWERS, M.V.; WORKMAN, P. Inhibitors of the heat shock response: Biology and pharmacology. **FEBS Letters**, v. 581, p. 3758-3769, 2007.

PUTICS, A. Resveratrol Induces the Heat-Shock Response and Protects Human Cells from Severe Heat Stress. **Antioxidant & Redox Signaling**, v. 10, n. 1, p. 65-75, 2008.

RAUTER, A.P. et al. Non-toxic *Salvia sclareoides* Brot. Extracts as a source of functional food ingredients: Phenolic profile, antioxidant activity and prion binding properties. **Food Chemistry**, v. 132, n. 4, p. 1930-1935, 2012.

RIBEIRO, S.M.R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

RICHTER-LANDSBERG, C. Heat sock proteins: Expression and functional roles in nerve cells and glia. In: **Heat sock proteins in neural cells**. Austin: Landes Bioscience, p. 1-12, 2007.

RODRIGUES, C.; KRISPIM, R. **Podologia**: portfólio. 1ª edição. São Paulo: Clube de autores, 2014. 260 p.

ROSSINI, C. et al. Essential oils from leaves of *Schinus molle* and *Schinus lentiscifolius* of Uruguayan origin. **Journal of Essential Oil Research**, v. 8, n. 1.p. 71-73, 1996.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A.P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

RUSAK, G.; GUTZEIT, H.O.; LUDWIG-MÜLLER, J. Effects of Structurally Related Flavonoids on hsp Gene Expression in Human Promyeloid Leukaemia Cells. **Food Technology and Biotechnology**, v. 40, n. 4, p. 267-273, 2002.

RUSSO, G.L. et al. Dietary Polyphenols and Chromatin Remodelling. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 01-45, 2015.

SALGUEIRO, A.C.F. et al. The influence of *Bauhinia forficata* Link subsp. pruinosa tea on lipid peroxidation and non-protein SH groups in human erythrocytes exposed to high glucose concentrations. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 1, p. 81-87, 2013.

SALVADOR, M.; HENRIQUES, J.A.P. **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. Canoas: ULBRA, 2004. 204 p.

SANTOS, N.C. et al. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n.7, p. 1035-1041, 2003.

SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2004. p. 403-434.

SCALBERT, A.; JOHNSON, I. T; SALTMARSH, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 215-217, 2005.

SCHENKEL, E.P. et al. Screening of Brazilian plants for the presence of peroxides. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 2, p. 191-196, 2002.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 4, p. 308-313, 2004.

SHINDE, R. et al. Effect of bacoside extract on H₂O₂ stressed lymphocytes. **International Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 1, n. 4, p. 567-571, 2011.

SIDDIQUE, Y.H.; ARA, G.; AFZAL, M. Estimation of lipid peroxidation induced by hydrogen peroxide in cultured human lymphocytes. **Dose Response**, v. 10, n.1, p.1-10, 2012.

SIES, H. Strategies of antioxidant defese. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, p. 213-219, 1993.

SILVA, W.J.M. da; FERRARI, C. K. B. Metabolismo Mitocondrial, Radicais Livres e Envelhecimento. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 14, n. 3, p.441-451, 2011.

SILVA, C.T. da.; JASIULIONIS, M.G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, n.1, p. 38-42, 2014.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª edição. Florianópolis: Editora da UFCS. 2010. 1102 p.

SIMÕES C.M.O. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed. 2017. 486 p.

SINGH, H.P., BATISH, D.R., KOHLI, R.K. Allelopathic effect of two volatile monoterpenes against bill goat weed (*Ageratum conyzoides* L.). **Crop Protection**, v. 21, p. 347-350, 2002.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de Análise instrumental**. Bookman: Porto Alegre, 2002.

SOWNDHARARAJAN, K.; KANG, S.C. Free radical scavenging activity from different extracts of leaves of *Bauhinia vahlii* Wight & Arn. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 20, n. 4, p. 319-325, 2013.

SROKA, Z.; CISOWSKI, W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. **Food Chemical Toxicology**, v. 41, n. 6, p. 753-758, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ª edição, Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

TARANTO, A.G. et al. Estudos sobre o mecanismo de ação da artemisinina e dos endoperóxidos, a mais nova classe de agentes antimaláricos. **Sitientibus**, n. 34, p. 47-58, 2006.

TIM, M. et al. Considerations regarding use of solvents in in vitro cell based assays. **Cytotechnology**, v. 65, n. 5, p. 887-894, 2013.

TORRAS-CLAVERIA, L. et al. Analysis of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry in senescent and water-stressed tobacco. **Plant Science**, v. 182, p. 71-78, 2012.

TOWNSEND, C. et al. **Sabiston Tratado de Cirurgia: A Base Biológica da Prática Cirúrgica Moderna**. 19ª Edição. Brasil: Elsevier Brasil. 2014. 2240 p.

VANDERJAGT, T.J. et al. Comparison of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of New Mexico. **Life Sciences**, v. 70, p. 1035-1040, 2002.

VASCONCELOS, S.M.L. et al. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, p.1323-1338, 2007.

VASCONCELOS, M.; PAWLOWSKI, Â.; SOARES, G.L.G. Potencial alelopático dos extratos aquosos e dos hidrolatos de *Schinus lentiscifolius* March. (Anacardiaceae). In: Salão de Iniciação Científica, 2010, Porto Alegre. **Livro de resumos**. Porto Alegre : UFRGS, 2010.

VELLOSA, J.C.R. et al. Antioxidant and cytotoxic studies for kaempferol, quercetin and isoquercitrin. **Eclética Química**, v. 36, n. 2, 2011.

VOKOU, D. et al. Effects of monoterpenoids, acting alone or in pairs, on seed germination and subsequent seedling growth. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, p. 2281-2301, 2003.

YAMASHITA, Y. et al. HSP70 inducers from Chinese herbs and their effect on melanin production. **Experimental Dermatology**, v. 19, p. 340-342, 2010.

YAMASHITA, Y. et al. Purification and characterization of HSP-inducers from *Eupatorium lindleyanum*. **Biochemical Pharmacology**, v. 83 , p. 909-922, 2012.

YANG, W. et al. Heat shock protein inhibitor, quercetin, as a novel adjuvant agent to improve radiofrequency ablation-induced tumor destruction and its molecular mechanism. **Chinese Journal of Cancer Research**, v. 28, n. 1, p. 19-28, 2016.

WAGNER, H. BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2ª Edição. Berlin: Springer, 1996. 384 p.

WALKER, M. **DMSO: Nature's Healer**. Penguin, 1992. 340 p.

WANG, L. et al. Distinctive antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonols. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 9798-804, 2006.

WANG, R.L. et al. Responses of *Mikania micrantha*, an invasive weed to elevated CO₂: induction of β -caryophyllene synthase, changes in emission capability and

allelopathic potential of β induction of β -caryophyllene. **Journal of Chemical Biology**, v. 36, p. 1076-1082, 2010.

WESTERHEIDE, S.D.; MORIMOTO, R.I. Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation. **Journal Biological Chemistry**, v. 280, p. 33097-33100, 2005.

ZHAO, X. et al. Terpenes from Eupatorium adenophorum and their allelopathic effects on Arabidopsis seeds germination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 478-482, 2009.

ZHAO, H.; ZHANG, H.; YANG, S. Phenolic compounds and its antioxidant activities in ethanolic extracts from seven cultivars of Chinese jujube. **Food Science and Human Wellness**, v. 3, p. 183-190, 2014.

ZIEGLER, T.R. et al. Parenteral glutamine increases serum heat shock protein 70 in critically ill patients. **Intensive Care Medicine**, v. 31, p. 1079-1086, 2005.

ANEXO I - Artigo a ser submetido

O artigo foi elaborado de acordo com as normas da Revista Brasileira de Farmacognosia. Por se tratar de múltiplas etapas entendemos que devem estar descritas de modo claro para que o estudo possa ser replicado ou utilizado como referencial não só teórico como metodológico, o que justifica o texto com número de palavras além do estabelecido nas normas da revista que seria de até 3000 palavras excluindo referências, tabelas, figuras e legendas de figuras.

Efeito antioxidante e inibitório da resposta celular ao estresse em linfócitos do extrato da casca de *Schinus lentiscifolius* March (Anacardiaceae)

Jéssyca B. Corrêa^{a,b*}, Bárbara P. Moreira^a, Larissa Lohmanm^a, Lucas M. Sulzbacher^a, Analú B. dos Santos^{a,b}, María A. R. Muñoz^c, Cledir R. Santos^c, Ilaine T. S. Gehrke^a, Thiago G. Heck^{a,b}

^a Grupo de Pesquisa em Fisiologia, Departamento de Ciências da Vida, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ), 98700-000, Brasil

^b Programa de Pós Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS/UNICRUZ/UNIJUI), Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ), 98700-000, Brasil

^c Departamento de Ciências Químicas e Recursos Naturais, Núcleo Científico e Tecnológico de Biorecursos, BIOREN-UFRO, Universidade da Fronteira, Temuco, Chile

Resumo: As cascas da planta *Schinus lentiscifolius* March (aroeira-cinzenta) têm sido usadas na medicina popular no tratamento artrítico e de dores nos pés, no entanto, poucos são os estudos relativos ao seu potencial biológico. A presença de compostos fenólicos em vegetais é responsável pela sua atividade antioxidante. Neste trabalho buscamos caracterizar e identificar os principais compostos fenólicos presentes em extratos da casca de *S. lentiscifolius* e avaliar

seu efeito sobre o estresse oxidativo, viabilidade celular e resposta celular ao estresse em linfócitos. Foi detectada a presença de flavonoides (Cromatografia em Camada Delgada) e identificados os flavonoides quercetina no extrato metanólico (SL-MEOH) e quercetina e canferol no extrato acetato de etila (SL-ACOET) (HPLC-DAD-ESI-MS/MS). O extrato SL-ACOET conteve maior teor de compostos fenólicos (12,32 mgEAG/g) do que o extrato SL-MEOH ($7,53 \pm 0,22$ mgEAG/g) e maior atividade antioxidante *in vitro* avaliada pelo método de sequestro de radical livre DPPH mensurada pelos valores de concentração necessária para inibir 50% dos radicais (DPPH, $CE_{50} = 16,70 \pm 0,480$ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). O extrato SL-ACOET foi avaliado quanto aos efeitos sobre a resposta celular ao estresse, a lipoperoxidação e viabilidade de linfócitos obtidos de linfonodos mesentéricos de ratos Wistar fêmeos (n= 22). SL-ACOET na concentração de 32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi capaz de reduzir os níveis de lipoperoxidação (TBARS) induzida por H_2O_2 (200mM) em linfócitos ($P < 0,05$), enquanto a concentração de 16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ melhorou a viabilidade celular (Trypan blue). O extrato SL-ACOET diminuiu a resposta celular ao estresse nos linfócitos desafiados por choque térmico (2 h, 41°C), avaliada pelos níveis intracelulares de proteínas de choque térmico de 70 kDa - HSP70, (iHSP70 por western blot) e pela quantidade exportada para o meio de cultura (eHSP70 por kit de ELISA) ($P < 0,05$). Este estudo indica que compostos fenólicos contidos na casca de *S. lentiscifolius* possuem atividade antioxidante e efeito inibitório sobre a resposta celular ao estresse, o que justifica a exploração de suas ações biológicas na prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo e como coadjuvante na terapia antitumoral.

Palavras-chave: estresse oxidativo, *S. lentiscifolius*, flavonoides, lipoperoxidação, HSP70.

Abstract: The bark of the *Schinus lentiscifolius* March plant has been used in folk medicine for the treatment of arthritic and foot pain. Although used by the population, there are few studies about its biological potential. The presence of phenolic compounds in plants is

responsible for their antioxidant activity. Also, we evaluated the effects on oxidative stress, cell viability and cellular stress response in lymphocytes. Flavonoids were detected (thin layer chromatography) and identified (HPLC-DAD-ESI-MS / MS) in the extracts: quercetin in the SL-MEOH and quercetin and canferol in SL-ACOET. SL-ACOET showed higher content of phenolic compounds (12.32 mgEAG / g) than the SL-MEOH extract (7.53 ± 0.22 mgEAG / g). SL-ACOET showed higher antioxidant activity *in vitro* analyzed by concentration required to inhibit 50% of the radicals in free radical sequestration method (DPPH, $EC_{50} = 16.70 \pm 0.480$ $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$). The extract with the best performance in the DPPH method was used to test in lymphocytes obtained from mesenteric lymph nodes of female Wistar rats ($n = 22$). SL-ACOET at the concentration of 32 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ was able to reduce lipid peroxidation (TBARS method) induced in lymphocytes by H_2O_2 (200 mM) ($P < 0.05$), while the concentration of 16 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ improved cell viability (trypan blue method). The SL-ACOET extract decreased the cellular stress response in lymphocytes challenged by 2h 41°C heat shock (evaluated by reduced expression of iHSP70 by western blot method and reduced amounts of eHSP70 released to culture media by ELISA kit) ($P < 0.05$). This study provides new information on the antioxidant potential and ability of phenolic compounds contained in *S. lentiscifolius* bark in inhibiting the cellular response to stress, which justifies the exploration of their biological actions in the prevention of diseases related to oxidative stress and as a coadjuvant in antitumor therapy.

Keywords: oxidative stress, *S. lentiscifolius*, flavonoids, lipid peroxidation, HSP70.

Introdução

Os antioxidantes presentes nas plantas são de grande interesse na farmacologia devido à sua capacidade de proteção do organismo contra os danos provocados pelo estresse oxidativo (EO). O EO resulta de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes,

o qual ocorre em função do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou de nitrogênio (ERN), as quais podem danificar biomoléculas como lipídios, proteínas e o DNA.

O organismo responde ao EO desencadeando uma resposta celular ao estresse caracterizada pelo aumento na expressão e/ou exportação de proteínas de choque térmico de 70kDa (HSP70). Quando as células são expostas a situações de estresse não-mortais, o aumento na síntese de HSP70 permite com que essas células fiquem mais protegidas contra novas exposições, o que se reflete em menores lesões a nível molecular e sistêmico (Heck et al., 2017). Se por um lado, as HSP70 no ambiente intracelular (iHSP70) possuem um importante papel anti-inflamatório através de seu efeito inibidor sobre o fator nuclear kappa-B (NF-kB) e antiapoptótico, no meio extracelular (eHSP70) parecem servir como sinal de dano e ser capaz de desencadear a ativação de respostas inflamatórias após situações de estresse (Richter-Landsberg, 2007; Heck et al., 2017).

O EO pode ser evitado pela ação de enzimas antioxidantes, ou combatido por antioxidantes não enzimáticos de origem endógena ou dietética. Para atenuar os efeitos provocados pelo EO no sistema celular, os compostos antioxidantes vegetais (em especial as substâncias fenólicas) podem atuar no sequestro de radicais livres e no aumento da atividade de enzimas antioxidantes endógenas superóxido dismutase e catalase (Simões et al., 2017). Além disso, compostos vegetais podem atuar como moduladores da expressão de HSP70 (Putics et al., 2008; Yang et al., 2016). Não existem estudos sobre efeitos de compostos vegetais na exportação de HSP70.

Schinus molle March (aroeira-cinzenta) é uma espécie pertencente à família anacardiaceae, comum no Rio Grande do Sul (Bioma Campos Sulinos, RS, Brasil). Vários compostos importantes foram identificados nos extratos das folhas da planta, como compostos fenólicos e polifenólicos (Gehrke et al., 2013), o que nos desafia a investigar os componentes das cascas. Conforme Lorenzi (2002), a decocção da casca da árvore produz uma essência

balsâmica com efeitos anti-inflamatórios, utilizada para o tratamento artrítico e dores nos pés. Considerando que não existem estudos que caracterizem o conteúdo de metabólitos secundários de extratos da casca dessa espécie e tampouco estudos sobre seus efeitos biológicos, o objetivo deste trabalho é avaliar se os extratos da casca de *S. lentiscifolius* contem compostos fenólicos com atividade antioxidante e se estes possuem efeitos sobre o estresse oxidativo, viabilidade celular e sobre a resposta celular ao estresse.

Materiais e métodos

Delineamento experimental

As cascas de *S. lentiscifolius* foram particionadas com solventes hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) obtendo-se os extratos hexânico (SL-HEX), acetato de etila (SL-ACOET) e metanólico (SL-MEOH), os quais foram avaliados quanto à presença de compostos fenólicos e flavonoides. Em extratos com resultado positivo para compostos fenólicos, verificou-se o teor de fenóis totais (FT) e a capacidade antioxidante a partir do método de inibição ao radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).

Para o extrato com melhor desempenho no seqüestro ao radical livre DPPH, avaliamos o efeito sobre a resposta celular ao estresse em linfócitos mesentéricos de ratos Wistar fêmeos. As concentrações de extrato aplicadas nas células foram definidas conforme o comportamento do extrato frente ao método de inibição ao radical DPPH. Foram avaliados os efeitos sobre a viabilidade celular, lipoperoxidação (LPO), expressão (iHSP70) e exportação de HSP70 (eHSP70) por linfócitos. As principais etapas experimentais estão apresentadas na Fig. 1:

Material vegetal e preparação dos extratos

As cascas de *S. lentiscifolius* foram coletadas em Ijuí (latitude 28°23'16" sul e longitude 53°54'53" oeste, 328 metros do nível do mar), RS, Brasil, em outubro (primavera) de 2014 onde as temperaturas, mínima, média e máxima, encontravam-se em torno de 16, 23

e 30°C, respectivamente, a umidade relativa do ar próxima a 95%, insolação total diária de 11h e sem índices de precipitação (http://www.inmet.gov.br/sim/gera_graficos.php). As coletas foram realizadas no período da manhã. O material vegetal, identificado pela botânica Dr.^a Mara Lisiane Tissot Squalli, tem sua exsicata depositada no Herbário Rogério Bueno (UNIJUÍ) sob registro de número 6.376.

As cascas (200-250g) foram secas em estufa a 35 °C por dois dias consecutivos, cominuídas e submetidas a processo extrativo por partição sólido-líquido com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade: Hex, AcOEt e MeOH. A renovação do solvente foi realizada a cada 7 dias, por 7 semanas. A extração foi inicialmente realizada com Hex, seguido da extração com AcOEt e MeOH. As fases orgânicas foram filtradas e concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida com temperatura controlada de 45 °C durante todo o procedimento. Resíduos do solvente orgânico foram eliminados através de fluxo de nitrogênio até massa constante. Esse processo deu origem aos extratos SL-HEX, SL-ACOET e SL-MEOH. O extrato utilizado para o tratamento celular foi solubilizado em DMSO1% em água destilada.

Técnicas cromatográficas

Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A análise qualitativa dos extratos SL-HEX, SL-ACOET e SL-MEOH foi efetuada em cromatofolhas de alumínio como suporte e sílica gel 60 F254 como adsorvente. A fase móvel utilizada para a eluição dos compostos foi hexano e acetato de etila (30:70). As cromatoplasmas foram reveladas com lâmpadas ultravioleta ($\lambda = 254$ e 365 nm Spectroline). Em seguida, as cromatoplasmas foram borrifadas com solução cloreto de ferro III a 1% em água destilada (para detecção de compostos fenólicos) e com reagente produto natural-polietilenoglicol (NP-PEG) (específico para flavonoides) seguido de tratamento térmico em placa aquecedora a 50°C (Wagner & Bladt, 1996).

Identificação por HPLC-DAD-ESI-MS/MS

As análises para caracterização de flavonóis, antocianinas, flavan-3-óis, estilbenos e ácidos hidroxicinâmicos por HPLC-DAD-ESI-MS / MS foram realizadas em sistema de HPLC Shimadzu (Tóquio, Japão) em modo de ionização positiva e negativa, equipado com uma bomba quaternária LC-10ADVP, uma FCV-10ALVP, uma unidade de degaseamento DGU-14A, um forno CTO10AVP e um detector de matriz de díodos UV-vis SPD-M10AVP, acoplado em tandem com um detector Q Trap MS / MS 3200 AB Applied Biosystems MDS Sciex (EUA). A coleta de dados do DAD foi realizada utilizando cromatografia Shimadzu através de um sistema de dados CLASSE-VP e o sistema de controle e coleta de dados HPLC-MS / MS pelo software Analyst 1.5.2.

As análises foram realizadas utilizando uma coluna C18 (Kromasil 250 × 4,6 mm, 5µm) com uma pré-coluna C-18 (Nova-Pak Waters, 22 × 3,9 mm, 4 µm) a 40°C, utilizando um gradiente de fase móvel constituído por água / acetonitrilo / ácido fórmico (87: 3: 10% v / v / v) (solvente A) e água / acetonitrilo / ácido fórmico (40: 50: 10% v / v / v) (solvente B). A taxa de fluxo foi de 0,8 mL.min⁻¹ e o gradiente foi de 94 a 70% de solvente A em 15 min, de 70 a 50% em 15 min, de 50 a 40% em 5 min e de 40 a 94% em 6 min, seguido por 9 min de estabilização a 94%. Cada amostra foi injetada em duplicata. A atribuição de identidade foi realizada considerando os tempos de retenção e por análise dos espectros DAD e ESI-MS / MS. Na análise dos espectros ESI-MS / MS o modo de ionização positiva teve como parâmetros: 5 V de energia de colisão, 4000 V de tensão de ionização, temperatura capilar a 450 ° C, gás nebulizador 40 psi e gás auxiliar 50 psi.

Determinação de fenóis totais

O teor de FT nos extratos foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu com modificações (Alves & Kubota, 2013). O extrato foi solubilizado a 1% (10 mg.mL⁻¹) em metanol. Esta solução (0,5 mL) foi misturada e incubada com 250 µL do reagente de Folin-

Ciocalteu (2N), por cinco minutos, à temperatura ambiente e, por fim, adicionou-se 2 mL de solução de carbonato de sódio (7,5%). Após incubação à temperatura ambiente, 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 (0,005 a 0,040 mg.mL⁻¹) e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato. A equação da curva de calibração do ácido gálico foi $y = 51,91x + 0,019$, onde y é a concentração de ácido gálico, e x é a absorbância a 760 nm e o coeficiente de correlação $R = 0,992$. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Atividade antioxidante pela captura do radical DPPH

A técnica foi adaptada de Nascimento et al. (2011). Preparou-se uma solução estoque (1000 µg/mL) em etanol/metanol dos extratos. Em seguida foram preparadas diluições que correspondem à concentração final no ensaio de 500, 250, 125, 60, 30, 15, 7 e 3 µg.mL⁻¹. Adicionou-se a cada diluição 1 mL de solução DPPH 0,004%, exceto nos brancos. Um controle negativo foi feito pela adição de 1 mL de etanol/metanol e 1 mL de DPPH (sendo 0% de inibição). Após a adição do DPPH, aguardou-se 40 minutos para a leitura em espectrofotômetro a 515nm contra uma amostra em branco preparada para cada diluição, na qual se mantinha a mesma concentração de extrato em etanol/metanol, sem adição de DPPH. A capacidade de eliminar o radical DPPH (% de atividade antioxidante) foi calculada utilizando-se a equação: $\% \text{ inibição} = [(Ac - Aa) / Ac] \times 100$. Onde, Ac é a absorbância do controle negativo e Aa é absorbância da amostra com DPPH testada no tempo de 40 minutos.

O comportamento dos extratos frente ao sequestro do DPPH foi comparado ao de padrões antioxidantes (ácido gálico, quercetina, rutina e ácido ascórbico) e a concentração que causa 50% de inibição do radical livre DPPH (CE₅₀) foi calculada através de regressão linear a partir das médias das porcentagens de inibição. Os valores obtidos estão representados na

forma de porcentagem de decréscimo da absorbância de DPPH em função da concentração da solução teste ($\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Animais

Neste estudo, foram utilizados 22 Ratos *Wistar* fêmeos (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*), com idade entre 5-7 meses e peso corporal entre 200 e 250g, foram obtidos do biotério da UNIJUÍ onde permaneceram sob temperatura controlada (22 ± 2 °C) em ciclo claro/escuro de 12/12h, em caixa de polipropileno (33x17x40 cm). Ao longo dos experimentos, os animais tiveram livre acesso à água e foram alimentados com ração padrão de laboratório (Nuvlab[®], Brasil) *ad libitum*.

Os procedimentos experimentais seguiram as normas éticas brasileiras, as recomendações das Normas Internacionais de Proteção aos Animais (1980) e do Código Brasileiro de Experimentação Animal (1988), em conformidade com o Guia de Cuidados e Utilização de Animais de Laboratório do *National Institutes of Health*. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Utilização de Animais da UNIJUÍ (n° 005/2016).

Preparação dos linfócitos

Para a obtenção dos linfócitos, os ratos foram eutanasiados por decapitação e as células foram retiradas do linfonodo mesentérico como previamente descrito (Heck et al., 2017). Os linfócitos foram separados do tecido linfóide por esmagamento, ressuspensos em 10 mL de tampão fosfato-salino (PBS), pH 7,4. Adicionalmente, a suspensão de linfócitos foi filtrada (Whatman, catálogo n° 2105 841, 100x150mm) e centrifugada (1000 x g por 5 minutos). O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 5mL (para testar o efeito do extrato sobre a viabilidade e LPO) ou em 8,1 mL (para testar o efeito do extrato sobre o conteúdo intracelular e exportação de HSP70) de meio RPMI-1640 suplementado com L-glutamina, Hepes 25mM e bicarbonato de sódio 23,8 mM (R4130, Sigma-Aldrich[®]),

pH 7,4. O rendimento total de linfócitos nessas condições foi de cerca de 1×10^8 células por rato e viabilidade celular $> 95\%$ determinada pelo método de exclusão do Trypan Blue.

Viabilidade celular e contagem das células pelo método de Trypan Blue

A contagem das células foi realizada pelo método Trypan Blue (BUROW et al., 1998). Após o isolamento e ressuspensão dos linfócitos em meio RPMI-1640 a suspensão celular foi diluída 5 ou 10 vezes de modo que a concentração final de Trypan Blue permanecesse 0,04%. Para a verificação da viabilidade celular foram contadas as células viáveis (não coradas) e não viáveis (coradas) presentes no quadrante central da câmara de Neubauer que é dada pela fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \left(\frac{\text{N}^\circ \text{ de células viáveis (não coradas)}}{\text{N}^\circ \text{ de células totais (coradas e não coradas)}} \right) \times 100$$

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, como se segue:

$$\text{Células/mL} = \text{n}^\circ \text{ células viáveis no quadrante central} \times \text{Fator de diluição} \times \mathbf{10^4}$$

As células foram distribuídas em micro tubos com igual suspensão celular ($\sim 10^6$ células.mL⁻¹) para os tratamentos.

Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) para indução da lipoperoxidação

Os linfócitos distribuídos em microtubos de igual suspensão celular ($\sim 10^7$ células) foram desafiados com H₂O₂ em diferentes concentrações: 20, 50, 100 e 200mM. As culturas permaneceram à temperatura de 37°C durante 1h (Catalgol et al., 2007). De cada animal foi obtido cerca de 10^8 células dando origem a 5 grupos experimentais duplicados com concentração aproximada de 10^6 células.mL⁻¹: Controle, 20mM, 50mM, 100mM e 200mM. O

grupo Controle não recebeu nenhum tipo de tratamento. As culturas foram mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com L-glutamina, Hepes 25 mM e bicarbonato de sódio 23,8 mM (R4130, Sigma-Aldrich®). Após a incubação as culturas foram centrifugadas a 1000g por 5 minutos, tiveram o sobrenadante desprezado e as células homogeneizadas em ácido tricloroacético 10%, com seringa de insulina para a avaliação da LPO.

Efeito do extrato sobre a lipoperoxidação

As suspensões de linfócitos foram distribuídas em microtubos com igual suspensão celular ($\sim 10^7$ células/mL), desafiados com H_2O_2 e tratados concomitantemente com três concentrações diferentes do extrato SL-ACOET, a 37°C por 1h (Catalgol et al., 2007) de modo a se obter 10 grupos experimentais: Controle, DMSO 1%, EXT-8, EXT-16, EXT-32, H_2O_2 , DMSO 1% + H_2O_2 , EXT-8 + H_2O_2 , EXT-16 + H_2O_2 , EXT-32 + H_2O_2 , onde os grupos identificados com DMSO1% receberam 32 μ L de DMSO 1% em água destilada, aqueles identificados com EXT-8, EXT-16, EXT-32 foram tratados com o extrato nas concentrações de 8, 16 e 32 μ g/mL, respectivamente, e os grupos identificados com H_2O_2 foram desafiados com H_2O_2 200 mM. O grupo Controle não recebeu nenhum tipo de tratamento. As culturas foram mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com L-glutamina, Hepes 25 mM e bicarbonato de sódio 23,8 mM (R4130, Sigma-Aldrich®). Após a incubação, 10 μ L de cada cultura foram separados para verificação da viabilidade celular. As culturas foram centrifugadas (1000 x g por 5 minutos), tiveram o sobrenadante desprezado e as células homogeneizadas em ácido tricloroacético 10%, com seringa de insulina para a avaliação da LPO.

Efeito do extrato sobre a resposta celular ao choque térmico

As suspensões de linfócitos foram distribuídas em microtubos com igual suspensão celular ($\sim 1 \times 10^7$ células/mL), tratadas com o extrato SL-ACOET na concentração de 32 μ g.mL⁻¹ dissolvido em DMSO 1% em água destilada e mantidas em banho-maria por 2h a

37°C ou choque térmico (41 °C) de modo a se obter 8 grupos experimentais (4 grupos distintos e duplicados): C, HS, EXT, EXT + HS. O grupo Controle (C) e o grupo EXT permaneceram na temperatura de 37°C por todo o experimento (6h), enquanto que os grupos HS e EXT + HS foram mantidos a 41°C por 2h e a 37°C por mais 4h. A escolha do protocolo de choque térmico por duas horas a 41°C se deve à observação da indução de um pequeno aumento (30%) de HSP70 em linfócitos nessa temperatura (Oehler et al., 2001). Já, a manutenção das células em cultura a 37°C após o choque-térmico é justificada por estudos anteriores em que o pico na síntese de HSP70 ocorre em torno de 4h (Amici & Santoro, 1991; Amici et al., 1992, Heck et al., 2017).

Análises celulares

Determinação da lipoperoxidação

As células ($\sim 10^7$) foram homogeneizadas com seringa de insulina em ácido tricloroacético (TCA) a 10% e incubadas com ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,67% por 30 minutos a 100 °C. A absorbância foi mensurada a 535 nm e expressa a quantidade de MDA em $\text{mmol} \cdot 10^7 \text{ células}^{-1}$ dada em unidades arbitrárias relativas ao grupo controle (Buege & Aust, 1978).

Imunodeteção de conteúdo intracelular de HSP70 (iHSP70)

As células foram homogeneizadas com seringa de insulina em 50 μL de solução SDS 0,1% (m/v) (dodecilsulfato de sódio 0,1%) contendo inibidores de protease (PMSF 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). O conteúdo de iHSP70 foi verificado por eletroforese desnaturante de quantidades idênticas de proteína carregadas em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Cada homogeneizado celular (50 μL) foi novamente homogeneizado com 10 μL de tampão para eletroforese (5 M Tris pH 6,8, SDS 20% (m/v), glicerol 50% (v/v), ditiotreitol 15% (v/v) e 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ azul de bromofenol) e fervidos por 10 minutos para desnaturação completa das proteínas. Quantidades iguais de proteína ($\sim 35\mu\text{g}$ por poço) foram aplicadas no

gel, para separação (4 h, 15 mA por gel, Mini-Protean Tetra Cell, BIO-RAD Laboratories, Richmond, CA, USA). Foi usado tampão contendo Tris a 25 mM e SDS a 1% (m/v), pH 8,3, gel de entrada (empilhamento) a 4% e gel de separação a 10% (em termos de monômeros de acrilamida). Foi usado como marcador de peso molecular 5 μ L de mistura de proteínas recombinantes pré-coloridas (161-0324, Biorad) por gel. A escolha por este padrão de peso molecular deve-se a presença de marcação em 78 kDa (próximo a proteína de interesse, HSP70, com ~70kDa) além da marcação em 45,7 kDa (peso aproximado ao da proteína actina, utilizado como normalizador).

Depois da separação pela corrida em gel de poliacrilamida, a porção referente ao gel de entrada foi descartada e a porção referente ao gel de separação foi submetida à eletrotransferência, em sistema refrigerado (BIO-RAD Blot Cell a 100 V constantes por 1 h) para promover a transferência das proteínas do gel para uma membrana fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Biorad). O sucesso do processo de transferência foi confirmado pela coloração da membrana de PVDF com Vermelho Ponceau S (Red Ponceau S, sal de sódio 0,3%, Sigma, em solução de ácido tricloroacético a 3%). Após este procedimento, as membranas foram descoradas com solução TBS (Tris - Glicina-Metanol a respectivamente 25mM - 192nM-10%)-Tween 0,1% (v/v).

Após a descoloração da membrana, inicia-se o procedimento de *imunoblotting* (*Western blots*) onde primeiramente a membrana é mergulhada em tampão de bloqueio (leite em pó desnatado a 0,5% em TBS-Tween 0,1%) por 30min; em seguida ocorre a incubação com anticorpo monoclonal anti HSP70 (Sigma H5147, produzido em camundongo, Anti-HSP70 que reconhece tanto a forma induzível de 72-kDa quanto a forma constitutiva de 73-kDa) diluído 1:1000 em TEN-Tween 0,1%) por 12h; após, foram realizadas três lavagens (10min cada), com 15 mL TBS-Tween 0,1%; procedeu-se a incubação (1h) com o segundo anticorpo (anti-mouse contendo peroxidase Sigma A9044 a uma diluição de 1:15000 em bloto

1%); passada essa 1h foram realizadas três lavagens com duração de 10min cada, com 15 mL TBS-Tween 0,1%.

A imunodeteção foi realizada por quimiluminescência (ECL Plus RPN2132, GE). As bandas de proteína foram reveladas em filme (Amersham Hyperfilm ECL, GE Health Care). A equivalência na concentração protéica entre as amostras foi mensurada por meio da coloração do gel de poliacrilamida com corante Azul de Comassie [Comassie Blue R250 (0,1% m/v), ácido acético glacial (10% v/v) e metanol (40% v/v)], e as proteínas em torno de 43 kDa foram utilizadas para análise. A análise do conteúdo de β -actina foi usado como normalizador. Os filmes e géis foram digitalizados e as imagens quantificadas com uso do programa Image J, sendo os resultados expressos em unidades arbitrárias de HSP70 relativas ao grupo controle de cada experimento.

Conteúdo extracelular de HSP72 (eHSP72)

Após o experimento de choque térmico e tratamento com o extrato células em meios de cultura (~1mL) foram centrifugados (1000 x g por 5 min) e foi adicionado inibidor de protease (100 μ M PMSF) a cada alíquota de meio de cultura antes do congelamento a -20°C . As concentrações de eHSP72 nos meios de cultura foram determinadas com uso de Kit específico ultra sensível (HSP70 ELISA Kit, ENZO Life Sciences, ADI-EKS-715) em leitora de microplacas (450 nm) seguindo instruções do fabricante sendo os resultados expressos em unidades arbitrárias de HSP70 relativas ao grupo controle de cada experimento.

Status imunoinflamatório pelo Índice - H

Para o cálculo do Índice - H, considera-se $R_c = [\text{eHSP70}]_c / [\text{iHSP70}]_c$ como a razão de HSP70 numa situação de controle, quaisquer que sejam as técnicas utilizadas para avaliar as concentrações de eHSP70 e iHSP70. Assim, o índice H pode ser calculado como o quociente de $R_j = [\text{eHSPA}]_j / [\text{iHSPA}]_j$ por R_c , que será considerado unidade normalizadora ($R_c = 1$) de todos os resultados remanescentes nessa situação “j”. Portanto, o índice-H = $R_j /$

R_c , permite a comparação entre qualquer situação estressante “j” e a situação assumida como o controle “c”. O índice-H pode ser aplicado para estimar o balanço imunoinflamatório em muitas situações imunológicas (Heck et al., 2017).

Análise estatística

Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. A comparação entre os tratamentos quanto à atividade de sequestro ao radical DPPH foi realizada por Análise de Variância (ANOVA) de duas vias (dois fatores) de medidas repetidas seguido pelo teste de Bonferroni. O efeito das concentrações de H_2O_2 sobre a LPO foi por ANOVA de medidas repetidas. Para verificar o efeito do extrato sobre a LPO e viabilidade celular a comparação entre os grupos foi por ANOVA de uma via (um fator) seguida pelo teste de Dunnett. O efeito do choque térmico e do extrato sobre a concentração intracelular de HSP70, exportação de HSP72 (não paramétrica) e sobre a razão entre a quantidade extracelular e intracelular de HSP70 foi avaliado por ANOVA de uma via seguida de *post hoc* de Tukey. Foram consideradas significativas as comparações com $P < 0,05$.

Resultados

Análise química por Cromatografia em Camada Delgada e HPLC-DAD-ESI-MS/MS

As análises por CCD mostram uma predominância de compostos fenólicos nos extratos SL-ACOET e SL-MEOH e de flavonoides no extrato SL-ACOET (Fig. S1). Os compostos foram reconhecidos a partir de seus espectros de UV característicos, os quais foram identificados com base nos dados de HPLC-DAD-ESI-MS / MS e subsequente confirmação por comparação com os dados da literatura (Kammerer et al., 2004). A análise por HPLC-DAD confirmou a inexistência de flavonóis, antocianinas, flavan-3-óis, estilbenos e ácidos hidroxicinâmicos no extrato SL-HEX. Os dados cromatográficos e espectroscópicos foram resumidos na Fig. S2.

A tabela 1 apresenta os tempos de retenção, dados espectrais de massa e comprimento de onda de absorção máxima (λ_{\max}) para os compostos (quercetina e canferol) identificados no extrato SL-ACOET. A análise do perfil cromatográfico ($R_t=21,47\text{min}$) e espectro de massas para o extrato SL-ACOET, revelou um pico de íon molecular $[\text{MH}]^-$ 301,2 (m/z) (Fig. S3), consistente com um peso molecular de 302,2 g/mol, indicando a presença de um núcleo quercetina, e um pico de íon molecular $[\text{MH}]^-$ 285,3 (m/z) sugerindo a massa de 285,3 g/mol, este último identificado como canferol.

Teor de fenóis totais

O teor fenólico determinado pelo método de Folin-Ciocalteu para o extrato SL-ACOET foi de $12,32 \pm 0,21\text{mgEAG/g}$ e para o extrato SL-MEOH foi de $7,53 \pm 0,22\text{mgEAG/g}$ (Tabela 1).

Atividade antioxidante pela captura do radical DPPH

O extrato SL-ACOET apresentou uma atividade antioxidante semelhante a todos os padrões (ácido ascórbico, ácido gálico, quercetina e rutina) em concentrações a partir de $60\ \mu\text{g.mL}^{-1}$. Já o extrato SL-MEOH demonstrou-se equivalente aos padrões somente a partir da concentração de $125\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($P>0,05$). O extrato SL-MEOH apresentou menor capacidade de inibir o radical DPPH do que o extrato SL-ACOET em concentrações que foram de 3 a $60\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($P<0,001$) (Fig. 2).

Os valores de CE_{50} (concentração necessária para reduzir em 50% a concentração do radical DPPH em solução) para os extratos e padrões ácido ascórbico, ácido gálico, quercetina e rutina estão descritos na Tabela 2.

O extrato SL-ACOET por ter apresentado maior potencial antioxidante foi selecionado para avaliação do efeito sobre a viabilidade celular e a resposta celular ao estresse em linfócitos.

Efeito do extrato SL-ACOET sobre a lipoperoxidação

Os níveis de LPO nos linfócitos foram diretamente proporcionais ($P=0,002$; $r^2=0,972$) a concentração de H_2O_2 utilizada, sendo que a concentração de 200 mM foi capaz de aumentar a LPO ($P<0,05$) (Fig. S4) em relação a linfócitos não tratados com H_2O_2 o que justifica a escolha desta concentração para indução do dano lipídico.

Como o CE_{50} para o extrato SL-ACOET foi de aproximadamente $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$, os linfócitos expostos H_2O_2 foram tratados concomitantemente com concentrações de extrato de 8, 16 e $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$, permanecendo a 37°C , durante 1h. O extrato não induziu LPO em nenhuma concentração testada. O grupo que recebeu extrato SL-ACOET na concentração de $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e H_2O_2 apresentou menores níveis de LPO quando comparado ao grupo que recebeu apenas H_2O_2 (Fig. 3-A).

Viabilidade celular

Os resultados demonstraram que linfócitos em condições basais (sem H_2O_2) quando tratados com o extrato ou veículo (os grupos DMSO1%, EXT8, EXT16 e EXT32) tiveram uma diminuição na viabilidade ($\sim 12\%$) quando comparados ao grupo Controle (Fig. 3-B). Por outro lado, diante do desafio por oxidante, o tratamento com o extrato SL-ACOET na concentração de $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi capaz de aumentar viabilidade celular de 11,8% (grupo H_2O_2) para 26,4% (Fig. 3-B).

Efeito do extrato SL-ACEOT sobre a resposta celular ao choque térmico

Como o esperado, o choque térmico aumentou os níveis de iHSP70 (HS vs Controle). Contudo, verificou-se que o tratamento com o extrato diminuiu a expressão de iHSP70 (EXT vs Controle) (Fig. 4-A). A inibição da resposta celular ao estresse também foi observada pela baixa concentração de eHSP72 nos meios de cultura (Fig. 4-B) e abolição do aumento do índice-H (relação entre eHSP70/iHSP70) (EXT+HS vs HS) em células tratadas com o extrato, mesmo quando expostas ao choque térmico (Fig. 4-C). Houve, portanto, uma resposta celular ao estresse característica induzida pelo choque térmico que na presença do

extrato SL-ACOET foi inibida. No entanto, apesar de o extrato parecer ter revertido o efeito da temperatura, ainda assim observou-se um aumento do índice-H provocado pelo tratamento com o extrato (EXT vs Controle).

Discussão

Compostos fenólicos e flavonoides são amplamente difundidos no reino vegetal e são reconhecidos por sua atividade antioxidante (Zhao et al., 2014). Gehrke et al. (2013) identificaram no extrato das folhas de *S. lentiscifolius* o composto fenólico ácido gálico e os flavonoides quercetina e rutina. Em nosso estudo com extratos da casca da espécie, os resultados obtidos por CCD demonstraram a presença de compostos fenólicos e flavonoides no extrato acetato de etila (SL-ACOET) e de compostos fenólicos nos extrato metanólico (SL-MEOH). A análise por espectrometria de massas revelou a presença dos flavonoides quercetina e canferol no extrato SL-ACOET, enquanto que no extrato SL-MEOH, apenas foi possível a identificação da quercetina (Tabela 1). Esses constituintes têm sido estudados por suas propriedades antioxidantes, como redução da LPO e controle da resposta antioxidante (Salgueiro et al., 2013).

Considerando que 98,89% da atividade antioxidante de plantas é resultado da ação de compostos fenólicos (Basma et al., 2011) e tendo confirmada a presença de substâncias flavonoídicas (quercetina nos extratos SL-ACOET e SL-MEOH e canferol no extrato SL-ACOET), quantificou-se os compostos fenólicos totais nos extratos e avaliamos a atividade antioxidante frente ao sequestro ao radical livre DPPH. Os extratos foram comparados a padrões antioxidantes de origem natural, e tanto o extrato SL-ACOET quanto o extrato SL-MEOH, apresentaram um potencial no sequestro de radicais livres, uma vez que se demonstraram equivalentes ao ácido ascórbico, ácido gálico, quercetina e rutina a partir de concentrações de $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (SL-ACOET) e $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (SL-MEOH) (Fig. 2).

O poder antioxidante para os padrões e extratos foi mensurado a partir da concentração necessária para diminuir 50% dos radicais livres (CE_{50}). Quanto menor o valor de CE_{50} , maior o potencial antioxidante (Sowndhararajan & Kang, 2013). A partir dos valores de CE_{50} dos extratos e os seus comportamentos frente ao sequestro de radical DPPH, observou-se que o extrato SL-ACOET apresenta melhor capacidade antioxidante que o extrato SL-MEOH. Esse resultado pode ser justificado pela maior quantidade de compostos fenólicos totais no extrato SL-ACOET ($12,32 \pm 0,21$ mgEAG/g) do que no extrato SL-MEOH ($7,53 \pm 0,22$ mgEAG/g). Na literatura existem correlações positivas entre a quantidade de compostos fenólicos e o efeito sobre o sequestro ao radical livre DPPH (Basma et al., 2011).

Antioxidantes com atividade sequestrante do radical DPPH são capazes de doar hidrogênios a radicais livres, principalmente peróxidos de lipídios ou radicais hidroperóxidos, que são os maiores propagadores da LPO (Dar et al., 2013). Por esta razão foi avaliado o efeito do extrato SL-ACOET sobre a LPO e viabilidade celular em linfócitos. A concentração de H_2O_2 mais indicada para induzir o dano lipídico (aumento de 54% na LPO) em linfócitos mesentéricos de ratas durante o tempo de tratamento de 1h, a $37^\circ C$, foi de 200 mM (Fig. S4). A LPO induzida por H_2O_2 decorre da produção de radicais altamente reativos, como o radical $OH\cdot$ (gerado na reação de Fenton ou de Haber-Weiss) que embora tenha meia-vida curta é capaz de reagir com a maioria das macromoléculas celulares (proteínas, ácidos nucleicos, fosfolipídios, açúcares e carboidratos) (Siddique et al., 2012; Catala, 2012). Por isso, extratos naturais que contenham compostos antioxidantes parecem fazer parte de uma importante estratégia no sentido de minimizar os danos causados pelas espécies reativas. O extrato SL-ACOET $32 \mu g.mL^{-1}$ causou uma redução de aproximadamente 30% na LPO induzida por H_2O_2 que pode ser explicada pela presença de substâncias antioxidantes no extrato, como os flavonoides quercetina e canferol. Essa habilidade se deve principalmente às características estruturais desses compostos.

Os flavonoides são constituídos por um núcleo básico de 15 carbonos (C₆-C₃-C₆), formado por 02 anéis aromáticos (A, B) ligados através de um anel heterocíclico pirano (oxigenado) C (Fig. S5). Semelhante a outros compostos fenólicos, a atividade antioxidante de flavonoides é diretamente proporcional ao número e posição dos grupamentos hidroxila livres na molécula, e também está relacionada à estabilização eletrônica oriunda dos anéis benzênicos nos três anéis (A, B, C). Grupamentos hidroxila próximos aos carbonos 03 e 05 na presença do grupo 4-oxo no anel C geram efeitos máximos na eliminação de radicais livres (Sroka & Cisowski, 2003). Desta forma, a presença de compostos flavonoídicos no extrato SL-ACOET, pode ter sido responsável pela inibição da LPO observada neste estudo.

A inibição da formação de radicais livres pela quercetina pode ocorrer em três etapas diferentes: na iniciação (pela interação com ânions superóxido), na formação de radicais hidroxila (por quelar íons ferro) e na peroxidação lipídica (por reagir com radicais peroxi de lipídios) (Afanas'ev, 1989). Conforme Wang et al. (2006), tanto a quercetina quanto o canferol atuam no seqüestro de radicais livres, porém a quercetina parece ter maior potencial de doação de hidrogênio que o canferol devido à presença da porção 4',5'-catecol no anel B, o que indica que sua estrutura química é pré-requisito para reforçar a atividade de seqüestro a radicais livres. Portanto, a ação antioxidante de um extrato não apenas depende da concentração das substâncias nele contidas, mas também das estruturas químicas e interações com outros antioxidantes (Vanderjagt et al., 2002). Como existe um efeito antioxidante sinérgico entre quercetina e canferol, a presença dessas duas substâncias pode potencializar a ação protetora do extrato SL-ACOET contra a LPO (Hidalgo et al., 2010).

Os resultados relativos à viabilidade celular indicam uma pequena diminuição do número de células viáveis (~10%) em consequência da presença de DMSO. O DMSO é utilizado para diluir ou incorporar componentes ou misturas em meios aquosos para ensaios biológicos *in vitro*, no entanto, uma das preocupações em se introduzir solventes como esse

em sistemas celulares é quanto ao potencial citotóxico (Santos et al., 2003; Tim et al., 2013). Considerando que a concentração de 1% (v/v) só começa a apresentar toxicidade em culturas celulares a partir de três ou mais dias de incubação optamos pela utilização desse solvente na concentração de 1% (v/v) para a solubilização do extrato SL-ACOET (Ben et al., 1990). Contudo, notamos uma pequena queda na viabilidade celular causada pelo DMSO (e nos extratos preparados com DMSO), mesmo estando em concentração final menor que 1% no meio de cultura por um tempo de incubação de 1h. Esta diminuição do número de células viáveis pode estar relacionada com a capacidade do DMSO em aumentar a permeabilidade das membranas celulares e permitir a passagem de compostos tóxicos para o interior das células (Walker, 1992). Portanto, devido a inconvenientes como esse é importante verificar o efeito do solvente sobre as variáveis analisadas de forma a garantir uma correta interpretação dos resultados.

Como o esperado, quando as células são desafiadas com H_2O_2 200 mM observou-se uma diminuição ainda maior na viabilidade celular (de 95% para 11,8 %). Na literatura outros experimentos em diferentes condições também demonstram o H_2O_2 atuando negativamente sobre a viabilidade de linfócitos (Shinde et al., 2011; Chikkanna, 2015). Contudo, o número de células viáveis aumentou de 11,8 para 26,3% quando o extrato SL-ACOET foi administrado na concentração de 16 μ g/mL (Fig. 3-B). Em suma, o extrato SL-ACOET preveniu os efeitos oxidativos em linfócitos, verificado pelo aumento da viabilidade celular e pela proteção contra a LPO.

Quando avaliada a resposta celular ao estresse (caracterizada pela expressão e exportação de HSP70) (Fig. 4), observou-se que esta foi atenuada pela presença do extrato SL-ACOET. Esse efeito pode estar relacionado com a ação dos flavonoides quercetina e canferol, os quais têm sido descritos por inibir a expressão de HSP (Hosocawa, 1992; Havsteen, 2002; Kantengwa & Polla, 1991). Um dos mecanismos de inibição de HSP por

flavonoides é via inativação de HSF (Hosocawa, 1992; Havsteen, 2002; Yang et al., 2016). O HSF ou fator de choque térmico, em situação de estresse celular, como elevação de temperatura, torna-se ativo (sofre trimerização) e se liga a uma sequência de nucleotídeos, chamada de *Heat Shock Element* (HSE) ou elemento do choque térmico, localizada dentro da região promotora dos genes que codificam as HSP. Essa ligação resulta em alto nível de transcrição dos genes de choque térmico e é responsável por aumentar suas concentrações celulares (Powers & Workman, 2007). Quando há inibição do HSF, a quercetina o altera para uma forma que é incapaz de se ligar ao HSE e, portanto, não há produção de HSP70 no interior da célula e conseqüentemente também temos uma menor exportação desta proteína para o ambiente extracelular (Fig. 4-B) (Havsteen, 2002).

Além do mecanismo de inativação de HSF, os flavonoides quercetina e canferol também podem inibir a expressão de HSP através da inibição da via da *protein kinase C* (PKC), ou proteína quinase C. A PKC é uma enzima transmembrana que tem sua atividade aumentada durante o choque térmico e quando sua via é inibida se tem uma diminuição na síntese de HSP (Ferriola et al., 1989; Gamet-Payrastre, 1999). Portanto, a presença de flavonoides no extrato parece explicar a diminuição da síntese e exportação de HSP70 em linfócitos, uma vez que essas substâncias têm sido reportadas por inibir a expressão de proteínas de resposta ao estresse por mecanismos relacionados à inativação de HSF e inibição de PKC.

A quercetina e o canferol têm sido mencionados como potenciais agentes coadjuvantes na terapia antitumoral, devido à capacidade desses compostos de também inibir a expressão de HSP70 em células tumorais (Rusak et al., 2002; Yang et al., 2016). Kantengwa & Polla (1991) trataram monócitos com quercetina e canferol na concentração de 100µM, 5 minutos antes do choque térmico (44°C-20 minutos) e verificaram após 2h de recuperação a 37°C que o canferol inibiu a expressão de HSP70 e que ambos os compostos foram capazes de inibir a

expressão de HSP83. Portanto, pode-se sugerir que a presença dessas substâncias no extrato poderia permitir, através da inibição da expressão de HSP, que os efeitos antineoplásicos das terapias convencionais fossem potencializados.

Na condição de que o extrato é capaz de inibir a expressão e exportação de HSP72, tem-se uma preocupação quanto a esse bloqueio de resposta celular ao estresse, fato que pode significar um prejuízo à sinalização entre células do sistema imune, pois esta proteína no ambiente extracelular pode atuar como uma importante sinalizadora imunológica. A resposta imunitária mediada por HSP se inicia quando a eHSP72 se liga a receptores de membrana de células apresentadoras de antígeno (CAA), tais como receptores do tipo Toll (TLR-2, TLR-4 e TLR-7), CD40 e lectinas de tipo C que levam a ativação de vias pró-inflamatórias (Calderwood et al., 2007; De Maio, 2011). Quando as CAA (monócitos, macrófagos, linfócitos B, células dendríticas, células de *Langerhans*) ligam-se a eHSP72 por receptores específicos, estimulam uma cascata de transdução de sinal que resulta no aumento de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, óxido nítrico e moléculas coestimuladoras. Desta forma, um aumento de eHSP72 pode ser um bom indicador de condições agudas ou crônicas e, portanto o bloqueio da sua exportação em algumas situações pode comprometer a sua atuação como biomarcador de doenças (Asea, 2006).

Nesse estudo, a atividade antioxidante demonstrada pelo extrato pode ser associada aos efeitos citoprotetores de flavonoides diante de desafios como o choque térmico. O aumento de temperatura pode gerar aumento na produção de ERO e representar um desafio redox à homeostase celular. Neste sentido, uma menor expressão de iHSP70 e menor liberação de eHSP72 podem significar um efeito protetor aos linfócitos tratados com o extrato. Por outro lado, o aumento do índice-H provocado somente pela administração do extrato parece mostrar que o uso de antioxidantes em condições normais, ou seja, quando o organismo não é submetido a situações de estresse não apresenta benefício uma vez que

podem desencadear uma resposta pro-inflamatória. Essa resposta pode estar relacionada com o efeito pro-oxidante de alguns compostos fenólicos que é provocado pelo aumento de radicais hidroxila no sistema de Fenton (Hanasaki et al., 1994). Deste modo, compostos fenólicos como flavonóides, podem atuar como pró-oxidantes e antioxidantes dependendo das condições e, portanto podem oferecer não somente benefícios, mas também alguns riscos caso não sejam utilizados com cautela.

Ao que se sabe, pela primeira vez na literatura são mostrados resultados relativos a efeitos celulares de extratos das cascas de *S. lentiscifolius*, logo, esta é também a primeira vez que o novo marcador de resposta celular ao estresse (índice-H, que é relação entre eHSP70/iHSP70) testado em linfócitos (Heck et al., 2017) é usado como método avaliativo do efeito de extratos vegetais. O índice-H representa o status imunoinflamatório e a capacidade funcional de linfócitos. Nesse contexto, os valores do índice-H (aumentados pelo desafio do choque térmico) e abolidos pelo tratamento com o extrato, reforçam os efeitos citoprotetores do extrato das cascas de *S. lentiscifolius* em condições de estresse. Logo, este trabalho serve de ponto de partida para novas pesquisas *in vivo* que esclareçam de fato seus mecanismos de ação a fim de melhor caracterizar os efeitos biológicos dos extratos obtidos das cascas de *S. lentiscifolius*.

Conclusão

O extrato acetato de etila das cascas de *S. lentiscifolius* possui substâncias fenólicas da classe dos flavonoides, tais como quercetina e canferol. A presença desses compostos parece ser responsável pelo potencial antioxidante das cascas de *S. lentiscifolius*. Além disso, o extrato apresentou capacidade de abolir a resposta celular ao estresse. Em conjunto estes dados sugerem que extratos da casca de *S. lentiscifolius* podem ter ação biológica a serem explorados na prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo e como coadjuvantes de terapias complementares no tratamento do câncer.

Agradecimentos

Mara Lisiane Tissot-Squalli: identificação botânica do material vegetal. Larissa Lohmann, Bárbara Pezzini Moreira, Lucas Machado Sulzbacher e Analú Bender dos Santos: auxílio no desenvolvimento dos procedimentos experimentais relativos às análises celulares. Maria Antonieta Ruiz Muñoz e Cleidir Rodrigues Santos: identificação por HPLC-DAD-ESI-MS/MS. Ilaine Teresinha Seibel Gehrke: auxílio na elaboração dos protocolos experimentais relativos à obtenção dos extratos, concepção e revisão crítica. Thiago Gomes Heck: auxílio na elaboração dos protocolos experimentais relativos à obtenção dos linfócitos e análises celulares, análise dos dados, concepção e revisão crítica.

Conflitos de interesse

Declaramos que não há conflitos de interesse na elaboração do artigo.

Referências

- Afanas'ev IB et al 1989. Chelating and free radical scavenging mechanism of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 38 (11):1763-1769.
- Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M 2013. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm J* 21(2):143-152.
- Alves E, Kubota EH 2013. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. *Rev Ciênc Farm Básica e Apl* 34(1):37-41.
- Amici C et al. 1992. Antiproliferative prostaglandins activate heat shock transcription factor. *Proc Nat Acad Sci USA* 89(14):6227-31.
- Amici C, Santoro MG 1991. Suppression of virus replication by prostaglandin A is associated with heat shock protein synthesis. *J Gen Virol* 72:1877-85.
- Asea A 2006. Initiation of the Immune Response by Extracellular Hsp72: Chaperokine Activity of Hsp72. *Curr Immunol Rev* 2(3):209-215.
- Basma AA et al. 2011 Antioxidant activity and phytochemical screening of the methanol extracts of *Euphorbia hirta* L. *Asian Pac J Trop Med* 4(5):386-390.
- Ben TA, Kitabatake N, Doi E 1990. Toxicity of dimethyl sulfoxide as a solvent in bioassay system with HeLa cells evaluated colorimetrically with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide. *Agric Biol Chem* 54(11):2961-2966.
- Buege JA, Aust SD 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52:302-309.
- Calderwood SK et al 2007. Cell surface receptors for molecular chaperones. *Methods* 43(3):199-206.
- Catala A 2012 *Lipid Peroxidation*. InTech 546 p.
- Catalgol BK, Ozden S, Alpertunga B 2007. Effects of trichlorfon on malondialdehyde and antioxidant system in human erythrocytes. *Toxicol in vitro* 21:1538-1544.
- Chikkanna D et al 2015. Hydrogen peroxide induced dna damage: protection by pippali (*Piper longum*) aqueous extract. *Eur J Pharm Med Res* 2(3):568-574.

- Dar RA et al 2013. Evaluation of antioxidant activity of crocin, podophyllotoxin and kaempferol by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Arab J Chem* 10:1119-1128.
- De Maio A 2011. Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the stress observation system: a form of communication during injury, infection, and cell damage. It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa *Cell Stress Chaperones* 16(3):235-249.
- Ferriola PC, Cody V, Middleton JR E 1989. Protein kinase C inhibition by plant flavonoides: kinetic mechanisms and structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol* 38(10):1617-1624.
- Gamet-Payraastre L et al 1999. Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. *Gen Pharmacol J* 32(3):279-286.
- Gehrke ITS et al 2013. Antimicrobial activity of *Schinus lentiscifolius* (Anacardiaceae). *J Ethnopharmacol* 148(2):486-491.
- Hanasaki Y; Ogawa S; Fukui S 1994. The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.*, 16:845-850.
- Havsteen BH 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther* 96(2):67-202.
- Heck TG et al 2017. Acute exercise boosts cell proliferation and the heat shock response in lymphocytes: correlation with cytokine production and extracellular-to-intracellular HSP70 ratio. *Cell Stress Chaperones* 22(2):271-291.
- Hidalgo M, Sánchez-Moreno C, Pascual-Teresa S 2010. Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chem* 121(3):691-696.
- Hosocawa N et al 1992. Inhibition of the Activation of Heat Shock Factor *In Vivo* and *In Vitro* by Flavonoids. *Mol Cell Biol* 12(8):3490-3498.
- Kammerer D et al 2004. Polyphenol Screening of Pomace from Red and White Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *J Agric Food Chem* 52:4360-4367.
- Kantengwa S, Polla BS 1991. Flavonoids, but not protein kinase C inhibitors, prevent stress protein synthesis during erythrophagocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* 180(1):308-314.
- Lorenzi H 2002. *Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil*. 4. Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, v. 1.
- Nascimento JC et al 2011. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonoides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. *Rev Bras Farmacogn* 92(4):327-332.
- Oehler R et al 2001. Cell type-specific variations in the induction of hsp70 in human leukocytes by feverlike whole body Hyperthermia. *Cell Stress Chaperones* 6(4):306-315.
- Powers MV, Workman P 2007. Inhibitors of the heat shock response: Biology and pharmacology. *FEBS Letters* 581:3758-3769.
- Putics A 2008. Resveratrol Induces the Heat-Shock Response and Protects Human Cells from Severe Heat Stress. *Antioxid Redox Signaling* 10(1):65-75.
- Richter-landsberg C 2007. Heat shock proteins: Expression and functional roles in nerve cells and glia. In: *Heat shock proteins neural cells*. Austin: Landes Bioscience, p. 1-12.
- Rusak G, Gutzeit HO, Ludwig-Müller J 2002. Effects of Structurally Related Flavonoids on HSP Gene Expression in Human Promyeloid Leukaemia Cells. *Food Technol Biotechnol* 40(4):267-273.
- Salgueiro, ACF et al 2013. The influence of *Bauhinia forficata* Link subsp. pruinosa tea on lipid peroxidation and non-protein SH groups in human erythrocytes exposed to high glucose concentrations. *J Ethnopharmacol* 148(1):81-87.
- Santos NC et al 2003. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem Pharmacol* 65(7):1035-1041.

- Shinde R et al 2011. Effect of bacoside extract on H₂O₂ stressed lymphocytes. *Int J Pharm Biol Sci* 1(4):567-571.
- Siddique YH, Ara G, Afzal M 2012. Estimation of lipid peroxidation induced by hydrogen peroxide in cultured human lymphocytes. *Dose Response* 10(1):1-10.
- Simões CMO et al 2017. *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Porto Alegre: Artmed. 486 p.
- Sowndhararajan K, Kang SC 2013. Free radical scavenging activity from different extracts of leaves of *Bauhinia vahlii* Wight & Arn. *Saudi J Biol Sci* 20(4):319-325.
- Sroka Z, Cisowski W 2003. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem Toxicol* 41(6):753-758.
- Tim M et al 2013. Considerations regarding use of solvents in *in vitro* cell based assays. *Cytotechnology* 65(5):887-894.
- Vanderjagt TJ et al 2002. Comparison of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of New Mexico. *Life Sci* 70:1035-1040.
- Yang W et al 2016. Heat shock protein inhibitor, quercetin, as a novel adjuvant agent to improve radiofrequency ablation-induced tumor destruction and its molecular mechanism. *Chin J Cancer Res* 28(1):19-28.
- Wagner H, Bladt S 1996. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. 2^a Edição. Berlin: Springer, 384 p.
- Walker M 1992. *DMSO: Nature's Healer*. Penguin, 340 p.
- Zhao H, Zhang H, Yang S 2014. Phenolic compounds and its antioxidant activities in ethanolic extracts from seven cultivars of Chinese jujube. *Food Sci Hum Wellness* 3:183-190.

Figuras

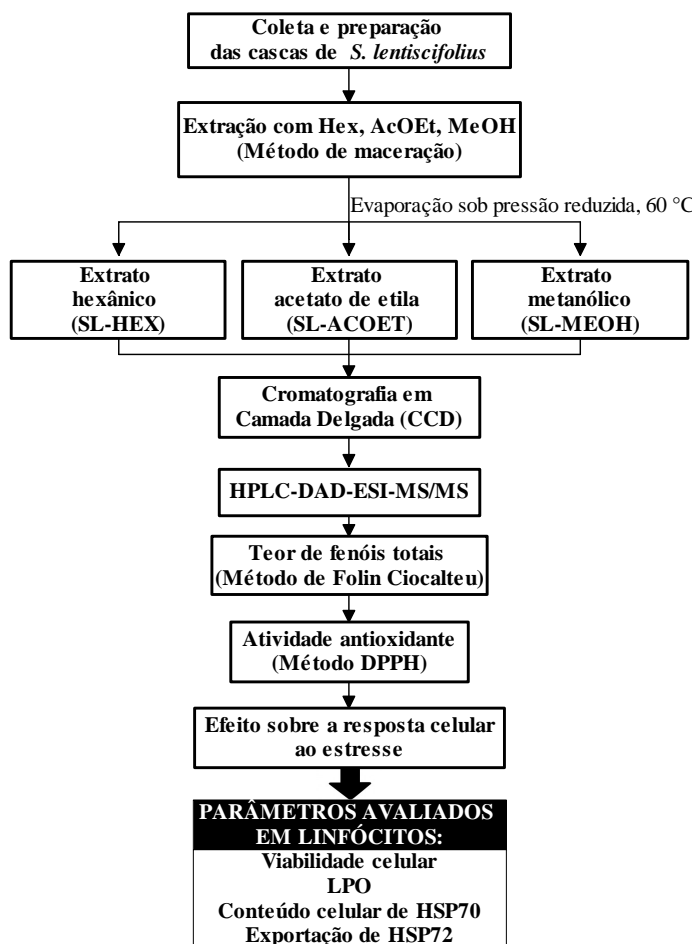


Fig. 1. Etapas experimentais desde a coleta do material biológico até a avaliação dos efeitos sobre a resposta celular ao estresse.

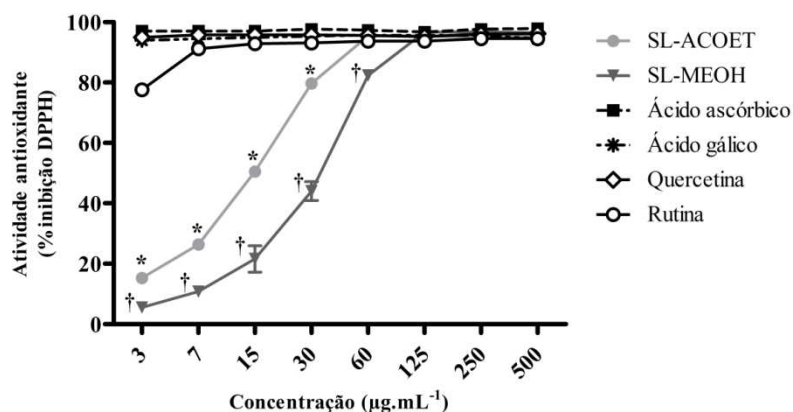


Fig. 2. Atividade antioxidante de extratos da casca de *S. lentiscifolius* pelo método DPPH. O percentual de inibição/sequestro de radicais livres foi calculado pela fórmula: % inibição = $[(Ac - Aa) / Ac] \times 100$, onde Ac é a absorbância da solução controle (somente DPPH e metanol) e Aa é a absorbância da amostra testada no tempo de 40 minutos. SL-ACOET: extrato acetato de etila; SL-MEOH: extrato metanólico. Resultados expressos em média \pm desvio padrão. ANOVA de 2 vias de medidas repetidas, *post-hoc* de Bonferroni. * $P < 0,001$ vs. Ácido ascórbico, ácido gálico, quercetina, rutina; † $P < 0,001$ vs. Ácido ascórbico, ácido gálico, quercetina, rutina e SL-ACOET.

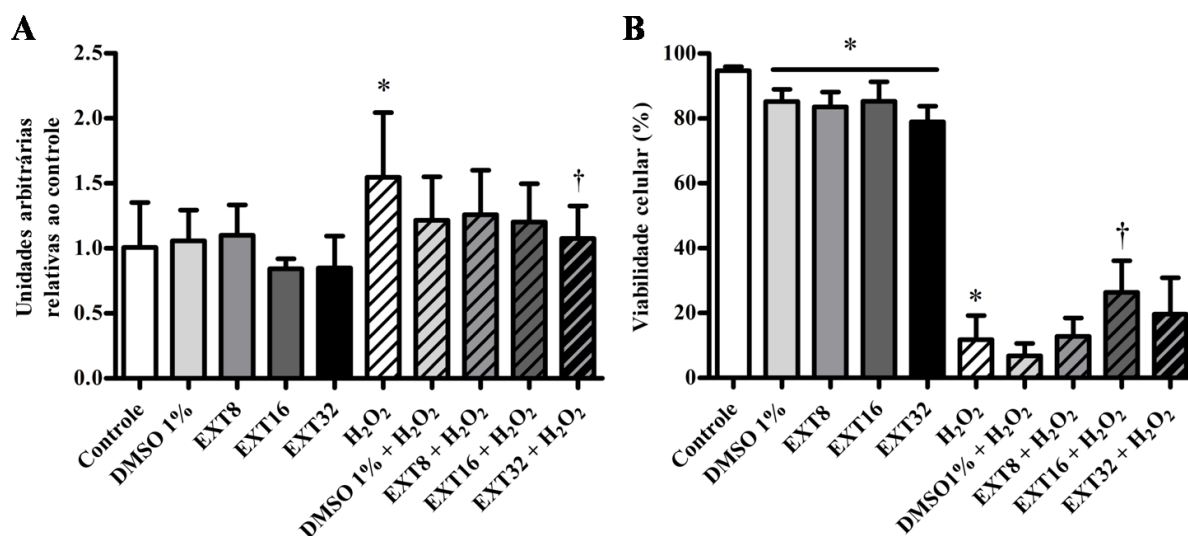


Fig. 3. Efeito do extrato acetato de etila (SL-ACOET) sobre a lipoperoxidação e viabilidade celular de linfócitos após 1h de exposição ao H₂O₂ a 37°C. Controle (sem tratamento), DMSO 1% (32µL de dimetilsulfóxido 1% em água destilada), EXT8, EXT16 e EXT32 (tratamento com extrato SL-ACOET nas concentrações de 8, 16 e 32 µg/mL, respectivamente), H₂O₂ (peróxido de hidrogênio na concentração de 200 mM), EXT8+H₂O₂, EXT16+H₂O₂ e EXT32+H₂O₂ (peróxido de hidrogênio na concentração de 200 mM e tratamento com extrato SL-ACOET nas concentrações de 8, 16 e 32 µg/mL, respectivamente). (A) Lipoperoxidação (n=4-8). (B) Viabilidade celular (n=5-6). *P < 0,05 vs. Controle, †P < 0,05 vs. H₂O₂. Valores expressos em média ± desvio-padrão. ANOVA de uma via seguido do teste de Dunnett para múltiplas comparações.

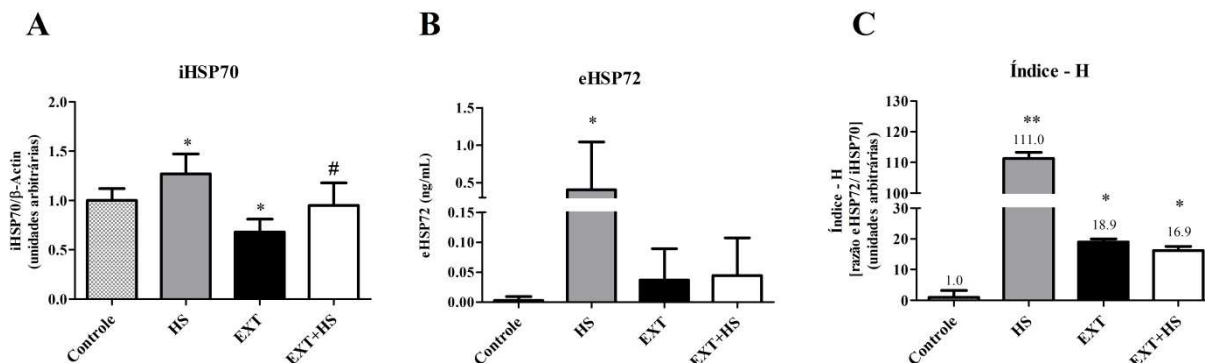


Fig. 4. Efeito do extrato acetato de etila (SL-ACOET) sobre a resposta celular ao estresse em linfócitos obtidos de linfonodo mesentérico. Os linfócitos foram incubados a 37°C (Controle e EXT) ou 41°C (HS e EXT+HS) durante 2h e permaneceram por mais 4h na temperatura de 37°C. Os grupos tratados com o extrato (EXT e EXT+HS) receberam o extrato SL-ACOET na concentração de 32 µg/mL. (A) Concentração intracelular de HSP70 (n=3-5). (B) Concentração extracelular de HSP72 (n=5). (C) Razão entre a quantidade extracelular e intracelular de HSP70. *P < 0,05 vs. Controle, #P < 0,05 vs. EXT, ** P<0,05 vs. Controle, EXT e EXT+HS. Valores expressos em média ± desvio-padrão. ANOVA de uma via seguida de *post-hoc* de Tukey.

Figuras suplementares

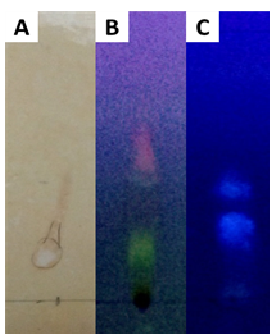


Fig. S1. Análise por cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos da casca de *S. lentiscifolius*. (A) Extrato hexânico (SL-HEX), revelação com cloreto de ferro III. (B) Extrato acetato de etila (SL-ACOET), revelação com NP-PEG ($\lambda_{\text{excitação}} = 365 \text{ nm}$). (C) Extrato metanólico (SL-MEOH), revelação com NP-PEG ($\lambda_{\text{excitação}} = 365 \text{ nm}$). Eluente: hexano e acetato de etila (30:70).

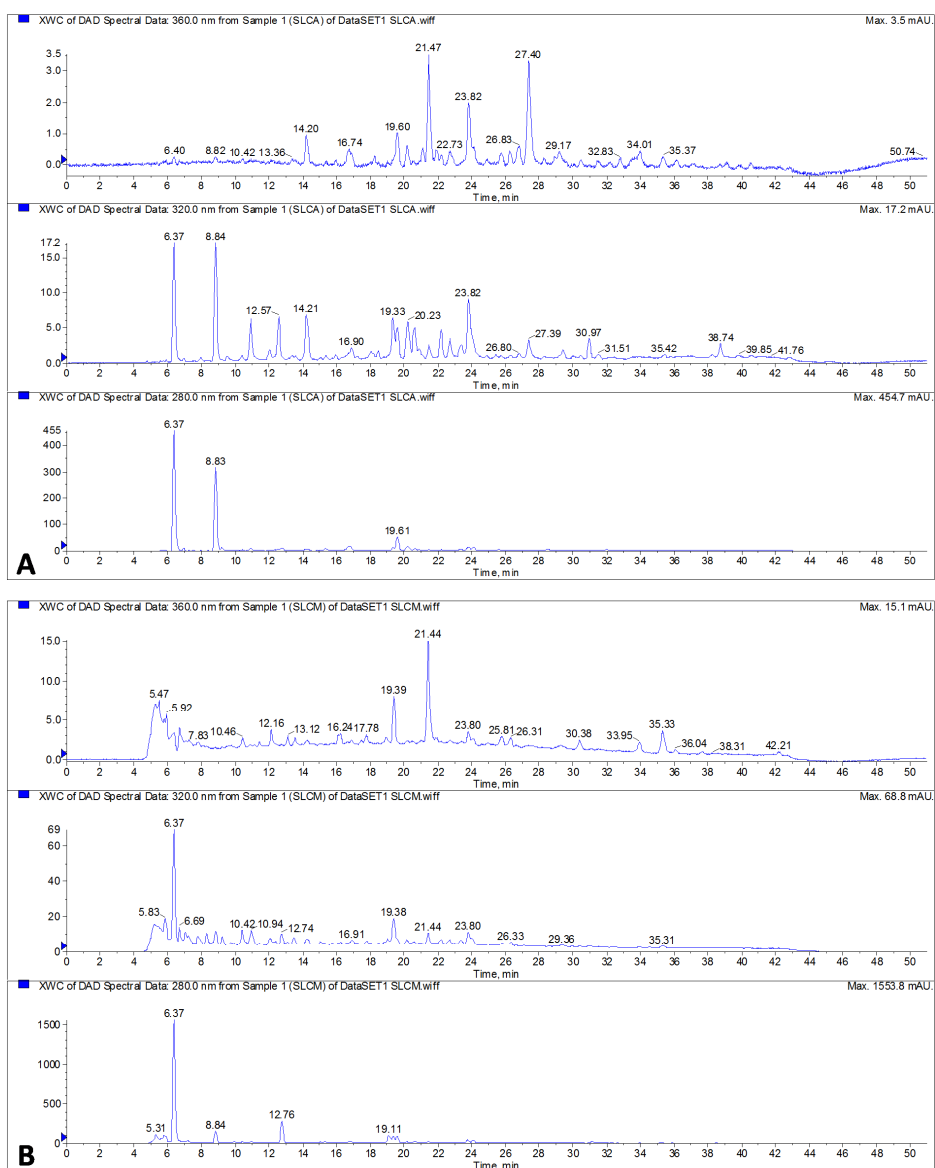


Fig. S2. Perfil cromatográfico dos extratos obtidos da casca de *S. lentiscifolius*. (A) Extrato obtido pelo método de maceração das cascas em acetato de etila (SL-ACOET). (B) Extrato obtido pelo método de maceração das cascas em metanol (SL-MEOH).

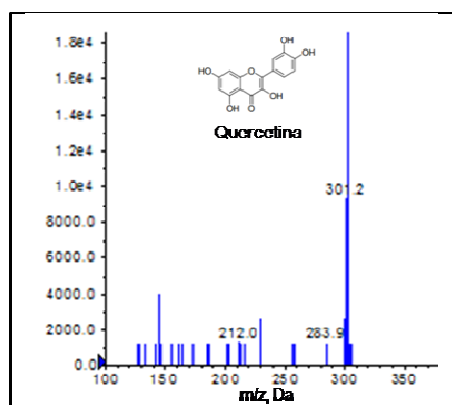


Fig. S3. Espectro de massas [(-)-ESI-MS/MS] obtido para o extrato acetato de etila obtido das cascas de *S. lentiscifolius* (SL-ACOET) referente à quercetina.

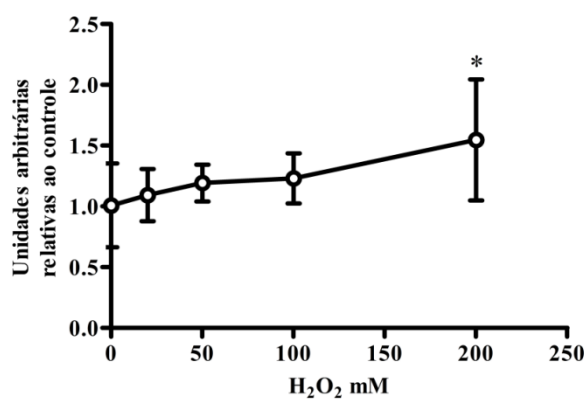


Fig. S4. Níveis de lipoperoxidação em linfócitos expostos por 1h a diferentes concentrações de H₂O₂ (20, 50, 100 e 200 mM). Valores expressos em média ± desvio-padrão. (n=4-8). ANOVA de medidas repetidas. *P<0,05 vs. Controle.

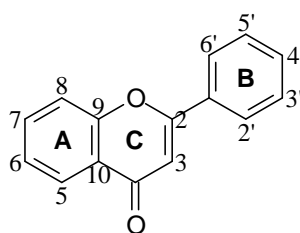


Fig. S5. Núcleo fundamental de flavonoides e sua numeração.

Tabelas

Tabela 1 - Dados espectrais, tempo de retenção de flavonoides e teor de fenóis totais nos extratos acetato de etila (SL-ACOET) e metanólico (SL-MEOH) obtidos das cascas de *S. lentiscifolius*.

Extrato	Composto identificado	Tr (min)	λ_{\max} (nm)	Produto dos íons	[M-H]-	Fenóis totais (mgEAG/g)
SL-ACOET	Quercetina	21,47	ND	212; 283,9	301,2	12,32 ± 0,21
	Canferol	27,4	ND	150; 239	285,3	
SL-MEOH	Quercetina	21,44	365,247	ND	301,1	7,53 ± 0,22

Tr: tempo de retenção; M-H: molécula desprotonada; ND: não determinado.
 mgEAG/g: miligramas equivalentes de ácido gálico por g de extrato.
 Valores expressos em média±desvio padrão (n=3).

Tabela 2 - Valores de CE₅₀ dos padrões e extratos da casca de *S. lentiscifolius*.

Amostras	DPPH CE ₅₀ (µg.mL ⁻¹)
Padrões	
ÁCIDO ASCÓRBICO	1,60 ± 0,007
ÁCIDO GÁLICO	1,11 ± 0,019
QUERCETINA	1,61 ± 0,025
RUTINA	3,86 ± 0,230
Extratos	
SL-ACOET	16,70 ± 0,480
SL-MEOH	35,63 ± 0,330

Valores expressos em média ± desvio padrão (n=2).

ANEXO II - Normas da Revista Brasileira de Farmacognosia

Forma e preparação de manuscritos

1. NORMAS GERAIS

1.1 Todos os manuscritos submetidos devem ser inéditos. A publicação simultânea de manuscritos descrevendo o mesmo trabalho em diferentes periódicos não é aceitável. Os direitos de publicação passam a ser da Revista Brasileira Farmacognosia, inclusive traduções; publicações subseqüentes são aceitas desde que citada a fonte.

1.2 A **Revista Brasileira Farmacognosia** recebe para publicação trabalhos científicos originais, revisões e comunicações. O conteúdo dos trabalhos é de total responsabilidade do(s) autor(es), e não reflete necessariamente a opinião do Editor, dos Editores de Seção ou dos membros do Conselho Editorial.

1.3 O idioma para a publicação é o inglês. Manuscritos escritos por autores cuja língua materna não é o inglês devem ser verificados por um serviço de edição profissional de língua inglesa antes da submissão. Auxílio de serviços de edição independente pode ser encontrado em <http://journalexperts.com?rcode=BJP>. Este trabalho é pago e de responsabilidade dos autores e o uso de um desses serviços de tradução não garante o aceite ou preferência para publicação.

1.4 A **Revista Brasileira de Farmacognosia** submeterá todos os manuscritos recebidos à análise de consultores ad hoc, cujos nomes permanecerão em sigilo e que emitirão pareceres para decidir sobre a pertinência de sua aceitação, podendo inclusive, reapresentá-los ao(s) autor(es) com sugestões para que sejam feitas alterações necessárias e/ou para que os mesmos sejam adequados às normas editoriais da revista.

1.5 Toda idéia e conclusão apresentadas nos trabalhos publicados são de total responsabilidade do(s) autor(es), e não reflete necessariamente a opinião do Editor, dos Editores de Seção ou dos membros do Conselho Editorial.

1.6 Todos os artigos envolvendo estudos com humanos ou animais deverão ter Pareceres dos Comitês de Ética de Pesquisa em Seres Humanos ou em Animais das instituições a que pertencem os autores, autorizando tais estudos.

1.7 Todo material vegetal utilizado na pesquisa descrita no trabalho deve ter a indicação do seu local de coleta (inclusive coordenadas obtidas por GPS, se possível), o país de origem, o responsável pela identificação da espécie e a localização da exsicata. Os autores devem estar preparados para fornecer evidência documental de que a aprovação para a coleta foi concedida pela autoridade apropriada no país de origem.

1.8 Os seguintes critérios de rejeição têm aplicação imediata: i) o manuscrito não se enquadra nas áreas da Revista; ii) o manuscrito é muito preliminar, com apenas relato de atividade biológica sem a comparação com uma referência ou sem um controle positivo; iii) a origem botânica não está claramente identificada, autenticada e documentada; iv) trabalhos experimentais de atividade antimicrobiana e antioxidante com extrato bruto sem a identificação das substâncias ativas isoladas e identificadas.

2. NORMAS PARA A ELABORAÇÃO DAS CONTRIBUIÇÕES

2.1 Os **autores** devem manter uma cópia eletrônica do manuscrito submetido, para o caso de possível perda ou danos causados ao original enviado à revista.

2.2 As **Figuras** (fotografias, gráficos, desenhos etc.) deverão ser apresentadas no final no texto, após as Referências, numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. As respectivas

legendas deverão ser claras, concisas, sem abreviaturas e localizadas abaixo das figuras. Suas respectivas posições no texto deverão ser indicadas, preferentemente, logo após sua citação no corpo do trabalho.

2.3 As Tabelas e os Quadros também devem ser apresentados após as Referências, numerados consecutivamente em algarismos arábicos. As tabelas (dados numéricos) não podem ser fechadas por linhas laterais. As respectivas legendas deverão ser claras, concisas, sem abreviaturas e localizadas na parte superior dos mesmos. Deverão ser indicados os locais aproximados no texto, onde as tabelas e os quadros serão intercalados, preferentemente, logo após sua citação no corpo do trabalho.

2.4 As legendas de ilustrações botânicas devem ser de acordo com as normas adotadas pela revista. Solicitar as normas pelo endereço revista@sbfgnosia.org.br.

3. FORMATAÇÃO DO TEXTO E CONTEÚDO DO TRABALHO

3.1 Original papers. Trabalhos originais são artigos de pesquisa original descrevendo resultados experimentais. O manuscrito deve estar disposto na seguinte ordem: Título, Resumo, Unitermos, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos, Referências, Figuras com legendas, Tabelas, Fórmulas estruturais. Resultados e Discussão podem aparecer como duas partes distintas, ou como um combinado "Resultados e discussão". O tamanho normal do texto principal de um trabalho original, excluindo referências, tabelas, figuras e legendas de figuras, é de cerca de 3000 palavras. Em casos excepcionais e casos devidamente justificados, manuscritos podem ser aceitos. Ao submeter tais manuscritos, os autores devem apresentar uma justificativa com as razões para o texto ser longo.

3.2 Short communication. Esta seção é destinada principalmente para artigos que descrevem isolamento de substâncias conhecidas de nova fonte neotropical, ou resultados complementares de um trabalho em andamento. A comunicação deve ser escrita na seguinte ordem: Título, Resumo com 200 palavras, Palavras-chave, Introdução, Material e Métodos com detalhes dos dados experimentais sem sub-título, Resultados e Discussão em um corpo de texto sem título, Agradecimentos, no máximo vinte Referências, e no máximo três Figuras e/ou Tabelas. Os autores deverão limitar o texto a no máximo 2000 palavras.

3.3 Revisões geralmente a partir de convites pelo editor-chefe. Os textos devem ser concisos e não é necessário incluir detalhes experimentais. O principal objetivo de revisões é fornecer, de uma forma concisa e precisa, o estado-da-arte de um assunto e informar o leitor os desenvolvimentos mais recentes nesta área.

3.4 Além dessas normas, modelos para formatação de trabalhos originais e da carta de submissão estão disponíveis em www.sbfgnosia.org.br/revista. Os autores são convidados a utilizar esses modelos ao preparar um manuscrito.

3.5 Os originais deverão ser redigidos em folhas de papel tamanho A4, espaço duplo, fonte tipo Times New Roman, tamanho 12, com texto justificado, margem de 2 cm em cada um dos quatro lados, e perfazendo o total de, no máximo, quinze e, no mínimo, cinco páginas, incluindo figuras, tabelas e quadros.

3.6 Título e subtítulo: Deverão estar de acordo com o conteúdo do trabalho, levando em conta o âmbito e objetivos da Revista. Estes deverão estar escritos em caixa baixa, negritados, fonte tipo Times New Roman, tamanho 14. Para os trabalhos redigidos nas línguas Portuguesa e Espanhola, providenciar também versão do título para a língua Inglesa, o qual acompanhará o Abstract. O nome das plantas no título deve estar completo, incluindo nome do autor e Família, conforme <http://www.tropicos.org>.

3.7 Autores: Os nomes dos autores devem vir abaixo do título, centralizados. O nome e os sobrenomes devem aparecer na ordem correta, sendo obrigatório que o primeiro (nome) e o último (sobrenome) apareçam por extenso (e.g. Carlos N. U. Silva ou Carlos N. Ubiratan Silva). No caso de

vários autores, seus nomes deverão ser separados por vírgulas.

3.8 Filiação dos autores: Após o nome de cada autor deverá constar um número Arábico, sobrescrito, que indica sua instituição de procedência e, deverá aparecer logo abaixo da nominata dos autores, também centralizado e com endereços completos, inclusive o CEP da cidade. Deve-se assinalar o nome do autor correspondente com um asterisco sobrescrito, para o qual toda correspondência deverá ser enviada. O endereço eletrônico institucional, telefone e fax do autor principal aparecerão na primeira página do trabalho como uma nota de rodapé. A revista não publica endereços eletrônicos comerciais.

3.9 Abstract: Deverá apresentar concisamente o trabalho destacando as informações de maior importância, expondo metodologia, resultados e conclusões. Permitirá avaliar o interesse pelo artigo, prescindindo de sua leitura na íntegra. Dever-se-á dar destaque ao Resumo como tópico do trabalho (máximo de 200 palavras). Os manuscritos devem vir acompanhados também da versão do resumo para a língua Portuguesa. Para autores não-brasileiros, o resumo em português será feito pela revista.

3.10 Keywords: Também em número máximo de seis e separados por vírgula.

3.11 Introdução: Deverá estabelecer com clareza o objetivo do trabalho e sua relação com outros trabalhos na mesma área. Extensas revisões da literatura deverão ser substituídas por referências a publicações mais recentes, onde estas revisões tenham sido apresentadas e estejam disponíveis.

3.12 Material e Métodos: A descrição dos materiais e dos métodos usados deverá ser breve, porém suficientemente clara para possibilitar a perfeita compreensão e a reprodução do trabalho. Processos e técnicas já publicados, a menos que tenham sido extensamente modificados, deverão ser referenciados por citação.

3.13 Resultados: Deverão ser apresentados com o mínimo possível de discussão ou interpretação pessoal e, sempre que possível, ser acompanhados de tabelas e figuras adequadas. Os dados, quando pertinentes deverão ser submetidos a uma análise estatística.

3.14 Discussão: Deverá ser restrita ao significado dos dados obtidos e resultados alcançados, evitando-se inferências não baseadas nos mesmos. Opcionalmente, Resultados e Discussão poderão ser apresentados em um único item.

3.15 Agradecimentos: Este item é opcional e deverá vir antes das Referências Bibliográficas.

4. REFERÊNCIAS

A formatação das referências deve ser padronizada em conformidade com as exigências da revista, como é mostrado abaixo:

4.1 Citações no texto: no início da citação: autor em caixa baixa, seguido do ano entre parênteses. Ex. Pereira (1999); no final da citação: autor em caixa baixa e ano - ambos entre parênteses. Ex. (Silva, 1999) ou (Silva & Souza, 1998) ou (Silva et al., 1999) ou (Silva et al., 1995a,b); citação textual: colocar, também, a página Ex. (Silva, 1999, p.24).

4.2 As Referências Bibliográficas serão ordenadas alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, em caixa baixa e em ordem crescente de data de publicação. Levar em consideração as seguintes ocorrências:

4.2.1 Revista: Será utilizado a abreviatura do periódico, em itálico, definida no *Chemical Abstracts Service Source Index* (ver <http://www.cas.org/sent.html>). Caso a abreviatura autorizada de um determinado periódico não puder ser localizado e não for óbvio como o título deve ser abreviado, deve-se citar o título completo.
Vargas TOH 1996. Fatores climáticos responsáveis pela morte de borboletas na região sul do

Brasil. *Rev Bras Assoc Entomol* 11: (100-105).

No caso especial da revista citada não ser de fácil acesso, é recomendado citar o seu número de *Chemical Abstracts*, como segue:

Qu W, Li J, Wang M 1991. Chemical studies on *Helicteres isora* L. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao* 22: 203-206, apud *Chemical Abstracts* 116: 124855r.

Numa citação de citação, colocar o nome das fontes em itálico

Wax ET 1977. Antimicrobial activity of Brazilian medicinal plants. *J Braz Biol Res* 41: 77-82, apud *Nat Prod Abs* 23: 588-593, 1978.).

4.2.2 Livro:

Costa AF 1996. *Farmacognosia*. Lisboa: Calouste Gulbenkian.

4.2.3 Capítulo de livro:

Farias CRM, Ourinho EP 1999. Restauração dentária. In: Goldaman GT (org.). *A nova odontologia*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 95-112.

4.2.4 Tese e Dissertação:

Lima N 1991. *Influência da ação dos raios solares na germinação do nabo selvagem*. Campinas, 755p. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Campinas.

Romero MAV 1997. *Estudo químico de Brunfelsia hopeana Benth e do mecanismo de ação da escopoletina*. João Pessoa, 119 p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Produtos naturais, Universidade Federal da Paraíba.

4.2.5 Congressos:

Thomas G, Selak M, Henson PM 1996. Estudo da fração aquosa do extrato etanólico das folhas de *Cissampelos sympodialis* em neutrófilos humanos. *XIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil*. Florianópolis, Brasil.

4.2.6 Patentes:

Devem ser identificadas conforme modelo abaixo e na medida do possível o número do *Chemical Abstracts* deve ser informado.

Ichikawa M, Ogura M, Lijima T 1986. Antiallergic flavone glycoside from *Kalanchoe pinnatum*. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 61,118,396*, apud *Chemical Abstracts* 105: 178423q.

4.2.7 Páginas Internet:

Taylor L 2000. *Plant based drugs and medicines*. <http://www.rain-tree.com/plantdrugs.htm>, acesso em outubro 2009.

5. ABREVIATURAS

As unidades devem ser de acordo com o Sistema Internacional (SI) como adotado na 11th *General Conference on Weights and Measures*. Abreviaturas comuns para serem usadas são: m metro; ppm partes por milhão; cm centímetros; cpm contagem por minuto; mm milímetro; dpm desintegrações por minuto; µm micrometro; nm nanometro; kg kilograma; g grama; mg miligrama; µg micrograma; ng nanograma; LD50 dose letal média; mL mililitro; LC50 concentração letal média; µL microlitro; Hz hertz; s segundos; M molar; min minutos; mM milimolar; h horas; M molar; µM micro molar; SD desvio padrão; SE erro padrão; Ci Curie; X média. Ao usar uma palavra que é, ou está confirmada para ser, uma marca de propriedade comercial, os autores devem utilizar o símbolo ®.

6. ILUSTRAÇÕES

6.1 A qualidade das ilustrações depende da qualidade dos originais fornecidos. As Figuras não

podem ser modificados ou realçadas pela equipe de educação da revista. Os gráficos devem ser apresentados como parte do arquivo do manuscrito. O contraste é importante.

6.2 Remover as cores das ilustrações, exceto para os gráficos em que o autor gostaria de tê-los publicados coloridos (ver a seção de Custos abaixo para informações).

6.3 Coloque as figuras em formato .TIFF, .jpg ou .eps, indicando o número e o título da figura. Tons não são aceitáveis. InscriçõesAs legendas devem estar com fonte Times New Roman, em um tamanho razoável que possa estar legível após redução, quando necessário.

7. CUSTOS

A Revista custeará integralmente os trabalhos de até quinze páginas, incluindo tabelas e figuras. Acima deste número de páginas, as despesas correrão por conta do(s) autor(es). Não serão aceitas fotografias coloridas, a não ser que o(s) autor(es) custeiem sua publicação, independente do número de páginas do trabalho.

8. PROVAS TIPOGRÁFICAS

As provas tipográficas serão enviadas ao autor correspondente em arquivo PDF. Modificações de frases ou adições não são permitidas nesta fase. É da responsabilidade do autor correspondente garantir que todos os autores do manuscrito estejam de acordo com as alterações feitas sobre as provas. As provas tipográficas devem retornar no prazo de cinco dias, a contar da data do recebimento das mesmas a fim de garantir a publicação do manuscrito no prazo.

Todo contato com a revista deve ser feito ao Editor, conforme endereço abaixo:


Revista Brasileira de Farmacognosia
Prof. Cid Aimbiré M. Santos - Editor
Laboratório de Farmacognosia
Departamento de Farmácia - UFPR
Rua Prof. Lothario Meissner, 632 - Jd Botânico
80210-170, Curitiba-PR, Brasil
revista@sbfgnosia.org.br

ANEXO III – Parecer de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIJUI



PARECER CONSUBSTANCIADO CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIJUI

PARA USO EXCLUSIVO CEUA	
PROTOCOLO Nº: 005/2016	ESPÉCIE ANIMAL: Ratos Wistar
DATA DE PROTOCOLO: 12/04/2016	QUANTIDADE: 49
DATA DA REUNIÃO: 13 de maio de 2016	SEXO: Fêmeas
DURAÇÃO (Início e termino do projeto/aula): 25/05/2016 a 12/06/2017	IDADE E PESO (aproximado): 3 a 5 meses; 200 a 250 gramas

I – IDENTIFICAÇÃO
(X) PROTOCOLO DE PESQUISA
II – PESQUISADOR RESPONSÁVEL
Thiago Gomes Heck
III – INSTITUIÇÃO/DEPARTAMENTO
Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul; Departamento de Ciências da Vida- DCVida
IV – TÍTULO DO PROTOCOLO
PERFIL FITOQUÍMICO DE EXTRATOS DA CASCA DE <i>Schinus lentiscifolius</i> (AROEIRA) E O EFEITO SOBRE A RESPOSTA CELULAR AO ESTRESSE.
V – CONSIDERAÇÕES DO PARECERISTA
O protocolo apresenta a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, sendo de parecer favorável à realização deste.
VI – SITUAÇÃO
(X) APROVADO
De acordo,
Ijuí, 17 de junho de 2016.
 Prof. Dr. Fernando Silvério Ferreira da Cruz Coordenador da CEUA/UNIJUI