



Universidade Federal
da Grande Dourados

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
Graduação em Biotecnologia



BIOTECNOLOGIA

ALEX SANTOS OLIVEIRA

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DO EXTRATO
HIDROETANÓLICO DA CASCA DE *Nectandra cuspidata* Nees & Mart. ex Nees**

**DOURADOS - MS
2018**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

ALEX SANTOS OLIVEIRA

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DO EXTRATO
HIDROETANÓLICO DA CASCA DE *Nectandra cuspidata* Nees & Mart. ex Nees**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD),
como pré-requisito para obtenção do título de
Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos

Co-Orientadora: Dr^a. Thaliny Bonamigo

DOURADOS - MS

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

O48a Oliveira, Alex Santos

Atividade antioxidante e citotóxica do extrato hidroetanólico da casca de
Nectandra cuspidata Nees & Mart. ex Nees / Alex Santos Oliveira -- Dourados:
UFGD, 2018.

40f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Edson Lucas dos Santos

TCC (Graduação em Biotecnologia) - Faculdade de Ciências Biológicas e
Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. Cerrado. 2. Leucemia. 3. Peroxidação Lipídica. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

ALEX SANTOS OLIVEIRA

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DO EXTRATO
HIDROETANÓLICO DA CASCA DE *Nectandra cuspidata* Nees & Mart. ex Nees**

Trabalho de Conclusão do Curso apresentado a Universidade Federal da Grande Dourados para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia, sob a orientação do Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos.

Aprovado em 20 de fevereiro de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos – Orientador
Universidade Federal da Grande Dourados

Dr^a. Thaliny Bonamigo
Universidade Federal da Grande Dourados

Dr. Uilson Pereira dos Santos
Universidade Federal da Grande Dourados

Dourados - MS, 20 de fevereiro de 2018.

Dedico este trabalho, bem como todas as minhas conquistas, aos meus pais, em especial ao meu pai Francisco Oliveira, por sempre acreditar em mim, me incentivar e dar forças para seguir em frente e a todos que contribuíram direta ou indiretamente em minha formação acadêmica.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer aos meus pais, Francisco José de Oliveira e Antônia Zilene dos Santos, por todo esforço e dedicação em me proporcionar uma boa educação, e sempre incentivar meus estudos e nos projetos da minha vida. Amo muito vocês.

A minha irmã, Raíssa Oliveira, por sempre me apoiar mesmo de longe com belas palavras de incentivo e acreditar no meu potencial.

A Universidade Federal da Grande Dourados e todos os professores que durante minha graduação contribuíram para minha formação acadêmica, bem como ao espaço físico para a realização deste estudo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos pelo seu apoio, dedicação, transmissão de conhecimentos, confiança, orientação deste trabalho e pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de orientados.

A Prof^ª. Dr^ª. Kely Picoli de Souza por estar sempre disposta a ajudar, ensinar e incentivar seus orientados.

Ao professor da UNIFESP Edgar Julian Paredes-Gamero por proporcionar a realização dos ensaios citotóxicos em seu laboratório e ao Msc. Wagner Vital por supervisionar, ajudar e ensinar os ensaios.

Aos meus amigos Otavio Marques, Brenda Ramires, Nathanya Nayla por serem a minha família em Dourados e que em todos esses anos de graduação, sempre me ajudaram e estiveram presentes em todos os momentos. Obrigado por tornarem minhas manhãs e tardes mais agradáveis, a amizade e os ótimos momentos levarei para minha vida inteira.

Ao Lucas Pires Guarnier por toda amizade e apoio que foram essenciais durante a minha graduação e ao Fernando Lima por ser um amigo incrível e me ajudar muito nesse período.

A todos os membros do GEBBAM (Grupo de Estudos de Biotecnologia e Bioprospecção Aplicados ao Metabolismo), em especial a Thaliny Bonamigo que me coorientou desde o início e transmitiu todo seu conhecimento em todos os experimentos com a maior paciência e dedicação do mundo.

Ao CNPq, a FUNDECT e a CAPES pelo apoio financeiro.

Aos membros da banca, por avaliar e colaborar com este estudo e contribuir com minha formação acadêmica.

A todos que me ajudaram, direta ou indiretamente, na realização deste estudo e contribuíram para minha formação acadêmica. O meu mais sincero sentimento de gratidão.

Sumário

ÍNDICE DE SIGLAS E ABREVIATURAS	I
LISTA DE FIGURAS	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. CERRADO	2
2.2. PLANTAS MEDICINAIS	2
2.2.1. <i>Nectandra cuspidata</i> Nees & Mart. ex Nees.....	3
2.3. RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO	4
2.5.1. Peroxidação lipídica	5
2.5. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	6
2.5.1. Sistema antioxidante enzimático.....	7
2.5.2. Sistema antioxidante não enzimático	8
2.5. CÂNCER	9
2.5.1. Leucemia.....	9
3. OBJETIVOS	11
3.1. OBJETIVO GERAL.....	11
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
5. ARTIGO CIENTÍFICO	17
6. ANEXO	36
6.1. ANEXO 1 – NORMAS DA REVISTA - OXIDATIVE MEDICINE AND CELLULAR LONGEVITY	36

ÍNDICE DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAPH – 2,2'-azobis-2-amidinopropano

ABTS - 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

CAT – Catalase

CCRF-CEM – Linhagem celular de leucemia linfóide aguda

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

DPPH – 1,1-difenil-2-picril-hidrazil

EAG – Equivalente ao ácido gálico

EHNC – Extrato hidroetanólico da casca de *Nectandra cuspidata* NEES

EPM – Erro padrão da média

EQ – Equivalente a quercetina

ERO – Espécie Reativa de Oxigênio

g – Grama

GPx – Glutathione peroxidase

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

IC₅₀ – Concentração necessária para inibir 50 % dos radicais livres

Kasumi-1 – Linhagem celular de leucemia mielóide aguda

LLA – Leucemia linfóide aguda

LMA – Leucemia mielóide aguda

MDA – Malondialdeído

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mM – Milimolar

N. cuspidata – *Nectandra cuspidata* Nees

NaCl – Cloreto de sódio

nm – Nanômetros

O₂^{·-} – Radical superóxido

OH[·] - Radical hidroxila

rpm – Rotação por minuto

SOD – Superóxido dismutase

TBA – Ácido tiobarbitúrico

µg – Micrograma

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fruto de <i>Nectrandra cuspidata</i>	3
Figura 2. Distribuição geográfica na América Central e na América do Sul de <i>N. cuspidata</i> . .	4
Figura 3. Mecanismo coordenado de defesa antioxidante enzimática.	7

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DA CASCA DE *Nectandra cuspidata* Nees & Mart. ex Nees

Alex Santos Oliveira¹

Edson Lucas dos Santos²

Thaliny Bonamigo³

RESUMO

Nectandra cuspidata é uma planta popularmente conhecida no Brasil com louro-pimenta, louro-canela e faz parte da flora nativa do cerrado brasileiro. Neste estudo, investigou-se a atividade antioxidante e citotóxica do extrato hidroetanólico da casca de *Nectandra cuspidata* (EHNC). O conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides foram determinados utilizando o método Follin-Ciocalteu e do cloreto de alumínio, respectivamente. A atividade antioxidante do EHNC foi avaliada através do ensaio de captura de radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), além da inibição da hemólise oxidativa em eritrócitos induzidos por 2,2'-azobis amidinopropano (AAPH) seguido da quantificação de malondialdeído (MDA) e investigação da modulação de enzimas antioxidantes endógenas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). As linhagens celulares CCRF-CEM e Kasumi-1 foram utilizadas para avaliar sua citotoxicidade. Os resultados mostram que o EHNC apresenta o conteúdo de compostos fenólicos de $292,88 \pm 11,49$ mg EAG/g do extrato e Flavonoides $7,03 \pm 1,18$ mg EQ/g do extrato. Em relação a sua capacidade antioxidante, demonstrou ser capaz de inibir 50% dos radicais livres de DPPH e ABTS em $3,9 \mu\text{g/mL}$ e $1,99 \mu\text{g/mL}$ para o EHNC, e em $3,54 \mu\text{g/mL}$ e $3,27$ para o ácido ascórbico, respectivamente. O EHNC foi capaz de inibir a hemólise e a peroxidação lipídica em eritrócitos humanos incubados com agente oxidante, o qual foi confirmado pelos níveis de MDA, sendo capaz de reduzir em $66,39 \pm 6,74\%$. O EHNC foi capaz de modular a ação da enzima CAT, aumentando sua atividade nas menores concentrações avaliadas e não foi observado alterações na atividade enzimática de SOD. O EHNC apresentou ação citotóxica contra as linhagens celulares CCRF-CEM e Kasumi-1. Esse estudo demonstra pela primeira vez que o EHNC é capaz de promover atividade antioxidante, modula a atividade endógena de CAT, e promove efeitos citotóxicos em linhagens celulares leucêmicas, abrindo novas perspectivas de estudos para utilização das cascas de *Nectandra cuspidata* Nees como um produto natural seguro e com propriedades antioxidantes.

Palavras-Chave: Cerrado, Leucemia, Peroxidação Lipídica.

¹ Graduando em Biotecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) Rodovia Dourados – Itahum, Km 12, CEP 79.804-970 – Dourados – MS – Brasil.

² Professor Doutor, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) Rodovia Dourados – Itahum, Km 12, CEP 79.804-970 – Dourados – MS – Brasil.

³ Doutora, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) Rodovia Dourados – Itahum, Km 12, CEP 79.804-970 – Dourados – MS – Brasil.

ANTIOXIDANT ACTIVITY AND CITOXICITY EVALUATION OF THE HYDROETHANOLIC EXTRACT FROM *Nectandra cuspidata* Nees BARK

Alex Santos Oliveira¹

Edson Lucas dos Santos²

Thaliny Bonamigo³

ABSTRACT

Nectandra cuspidata is a plant popularly known in Brazil with laurel-pepper, laurel-cinnamon and is part of the native flora of the Brazilian cerrado. In this study, the antioxidant and cytotoxic activity of the hydroethanolic extract of the shell of *Nectandra cuspidata* (EHNC) was investigated. The content of phenolic compounds and flavonoids were determined using the Follin-Ciocalteu method and aluminum chloride, respectively. The antioxidant activity of the EHNC was evaluated by the free radical capture test 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS). inhibition of oxidative hemolysis in erythrocytes induced by 2,2'-azobis amidinopropane (AAPH) followed by quantification of malondialdehyde (MDA) and investigation of the modulation of endogenous antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). Cell lines CCRF-CEM and Kasumi-1 were used to evaluate their cytotoxicity. The results show that the EHNC presents the content of phenolic compounds of 292.88 ± 11.49 mg EAG / g extract and Flavonoides 7.03 ± 1.18 mg EQ / g extract. In relation to its antioxidant capacity, it was able to inhibit 50% of the free radicals of DPPH and ABTS in $3.9 \mu\text{g} / \text{mL}$ and $1.99 \mu\text{g} / \text{mL}$ for the HNOS, and in $3.54 \mu\text{g} / \text{mL}$ and 3, 27 for ascorbic acid, respectively. EHNC was able to inhibit hemolysis and lipid peroxidation in human erythrocytes incubated with oxidizing agent, which was confirmed by MDA levels, being able to reduce by $66.39 \pm 6.74\%$. EHNC was able to modulate the action of the CAT enzyme, increasing its activity at the lowest concentrations evaluated and no changes were observed in the enzymatic activity of SOD. The EHNC presented cytotoxic action against CCFR-CEM and Kasumi-1 cell lines. This study demonstrates for the first time that EHNC is capable of promoting antioxidant activity, modulates the endogenous activity of CAT, and promotes cytotoxic effects in leukemic cell lines, opening up new perspectives for the use of Nees as a natural safe product of *Nectandra cuspidata* and with antioxidant properties.

Key-Words: Cerrado, Leukemya, Lipid peroxidation.

¹ Graduando em Biotecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) Rodovia Dourados – Itahum, Km 12, CEP 79.804-970 – Dourados – MS – Brasil.

² Professor Doutor, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) Rodovia Dourados – Itahum, Km 12, CEP 79.804-970 – Dourados – MS – Brasil.

³ Doutora, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) Rodovia Dourados – Itahum, Km 12, CEP 79.804-970 – Dourados – MS – Brasil

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do planeta. O bioma do Cerrado corresponde a aproximadamente 22% do território brasileiro, sendo considerada a mais rica savana do mundo. (KLINK et al., 2005; MARQUIS, 2002). A maioria das plantas nativas do cerrado ainda é desconhecida pela população brasileira e possui uma grande diversidade biológica em sua flora, que inclui espécies com propriedades medicinais (GUARIM NETO; MORAIS, 2003).

A utilização de plantas com fins medicinais para tratamento e prevenção de doenças é uma das mais antigas práticas medicinais da humanidade, sendo consideradas de fácil obtenção e baixo custo (VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005). Os efeitos farmacológicos das plantas medicinais devem-se aos seus variados compostos químicos naturalmente presentes, como por exemplo, compostos fenólicos, carotenoides e tocoferóis. Esses compostos estão relacionados com sua atividade antioxidante, sendo bastante descritos na literatura por ser capaz de minimizar o efeito causado por espécies reativas (LORDÊLO et al., 2010; ROCHA et al., 2013; VIEIRA et al., 2015).

Dentre as espécies de plantas que podem ser encontradas no Cerrado, a *Nectandra cuspidata*, conhecida como louro-pimenta e/ou louro-canela, possui significativo potencial para dar origem a novas substâncias bioativas, sendo que poucos são os trabalhos relacionados especificamente à espécie em questão, tanto do ponto de vista fitoquímico, quanto de sua bioprospecção (DEHARO et al., 2001; MUÑOZ et al., 2000 FERREIRA et al., 2017;). Tendo em vista a enorme biodiversidade do país, especialmente na região do Cerrado, há uma necessidade de conhecer as espécies da flora e seu uso na medicina.

As espécies reativas são mantidas em equilíbrio no organismo, reguladas através de mecanismos endógenos de defesa. O desequilíbrio entre uma maior produção de radicais livres e o sistema de defesa antioxidante do organismo é chamado de estresse oxidativo. Uma vez iniciado, ocorrerá uma sequência de reações em cadeia as quais irão resultar em produtos tóxicos ao organismo, tais como malondialdeído (MDA), que são acumulados e promovem o desenvolvimento de diversas doenças, dentre elas o câncer (COTIGUIBA et al., 2013).

Portanto, este estudo foi realizado com o objetivo de estudar a atividade antioxidante e citotoxicidade do extrato hidroetanólico da casca de *Nectandra cuspidata*, buscando ampliar o conhecimento sobre as plantas nativas do cerrado brasileiro no Estado do Mato Grosso do Sul e obtenção de informações sobre as propriedades medicinais desta espécie.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cerrado

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, ocupando uma área equivalente a 22% do território nacional (área aproximada de 2.036.448 km²), superado apenas pelo bioma Amazônia. O termo Cerrado é utilizado para nomear um conjunto de ecossistemas (savanas, matas, campos e matas de galeria) que ocorrem no Brasil Central (KLINK et al., 2005). Abrange predominantemente a região central do Brasil, englobando parte do território dos estados do Maranhão, Piauí, Bahia, Tocantins, Minas Gérias, Goiás, São Paulo, Paraná, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, além do Distrito Federal (GODINHO et al., 2016; IBGE, 2004; KLINK et al., 2005).

É considerado como a savana tropical mais diversificada do mundo, possuindo cerca de um terço da biodiversidade brasileira e 5% da fauna e flora mundial, grande diversidade para ser explorada na intenção de descobrir novos extratos vegetais e princípios ativos que possam ser utilizados em benefício da saúde humana. A vegetação típica do Cerrado é caracterizada por árvores de troncos tortuosos, de porte baixo, ramos retorcidos, cascas espessas e folhas grossas. São encontradas mais de 11.000 espécies vegetais, das quais 4.400 são endêmicas e cerca de 220 são utilizadas para fins medicinais (MEDEIROS, 2011; GODINHO et al., 2016).

No entanto, apesar da sua grande biodiversidade, é um dos biomas mais degradados pela ação antropológica, sendo a expansão da fronteira agrícola uma das principais ameaças a sua biodiversidade. As transformações ocorridas no Cerrado trazem grandes danos ambientais, dentre os quais podem ser citados a fragmentação dos habitats, extinção da biodiversidade e de espécies exóticas e erosão dos solos (KLINK et al., 2005; MEDEIROS, 2011; BRASIL, 2018;).

Portanto, estudos que acrescentem informações sobre as espécies nativas do Cerrado tornam-se necessários, contribuindo assim para a preservação do bioma e conhecimento do potencial farmacológico de espécies ainda não relatadas na literatura.

2.2. Plantas Medicinais

As plantas medicinais são utilizadas pelo homem desde o início de sua história e, desde muito antes do surgimento da escrita já são utilizadas para fins medicinais (CARNEIRO et al., 2014). Segundo a ANVISA (2014), planta medicinal é toda planta ou partes dela que contenham as substâncias ou classes de substâncias responsáveis pela sua ação terapêutica (BRASIL, 2012).

Cerca de 82% da população brasileira utiliza produtos à base de plantas medicinais, vinculadas ao conhecimento popular transmitido entre gerações (BRASIL, 2012). São utilizadas como uma terapia alternativa de tratamento e prevenção de diversas doenças por ser considerada de baixo custo e de fácil acessibilidade quando comparado a medicamentos industrializados, sendo favorável desde que o usuário tenha conhecimento prévio de sua finalidade, riscos e benefícios (BADKE et al., 2012; CARNEIRO et al., 2014).

Diferentes estudos apontam os benefícios dos extratos de plantas presentes no Cerrado com potencial farmacológico, tais como as espécies *Curetella americana* (LOPES et al., 2016), *Campomonesia adamantium* (ESPINDOLA et al., 2016) e *Hancornia speciosa* (SANTOS et al., 2016). No entanto, no Cerrado brasileiro ainda há muitas espécies que possuem pouco ou nenhuma informação medicinal como a *Nectandra cuspidata*.

2.2.1. *Nectandra cuspidata* Nees & Mart. ex Nees

A *Nectandra cuspidata* Nees & Mart. ex Nees é uma planta medicinal que faz parte da flora nativa do Cerrado brasileiro. Conhecida como louro-pimenta, louro-canela, louro-eucalipto, canelão seboso e/ou louro preto. A planta *N. cuspidata* é uma angiosperma pertence à família Lauraceae e apresenta-se como uma árvore de grande porte, até 25 metros de altura (ALVES; SARTORI, 2009; SANTOS; ALVES, 2013).

Possui folhas elípticas a lanceoladas, ápice longamente acuminado; frutos com cúpula pateliforme, globoso; flores pequenas, com cerca de 4-5 mm, receptáculo profundo, e estames e estilete com cerca de 50 a 60% do tamanho do pistilo. Floresce ao longo do ano; frutifica em fevereiro, março e outubro. Sua madeira é leve a média, relativamente durável e utilizada em construção assim como para inúmeros outros propósitos (ALVES; SARTORI, 2009; MORAES, 2005; SANTOS; ALVES, 2013).

Figura 1. Fruto de *Nectandra cuspidata*.



(Fonte: SANTOS; ALVEZ, 2013)

É uma das mais frequentes e bem distribuídas espécies do gênero, encontrada do sul do México até o Paraguai. No Brasil, apresenta distribuição abrangente, com ocorrência para os domínios Mata Atlântica, Cerrado e Amazônico, sendo encontrada desde o Norte até o estado do Paraná. No estado do Mato Grosso do Sul, a espécie pode ser coletada na floresta decidual ombrófila densa aluvial e savanas florestadas das regiões central, norte, sul e leste (QUINET et al., 2015).

O extrato etanólico da casca do caule possui potente atividade antimalárica e sua decocção é utilizada para tratamento de problemas estomacais. Extratos da folha possuem compostos fenólicos e atividade anti-leishmania (FERREIRA et al., 2017; MUÑOZ et al., 2000). A análise fitoquímica das folhas desta espécie revelou a presença de alcaloides, sesquiterpenos, poliprenóis, α -tocoferol e β -sisterol (BATISTA et al., 2015). No entanto, relatos sobre atividade antioxidante e citotoxicidade da casca não são encontrados na literatura.

Figura 2. Distribuição geográfica na América Central e na América do Sul de *N. cuspidata*.



Fonte: Global Biodiversity Information Facility (GBIF)

2.3. Radicais livres e estresse oxidativo

Radicalis livres são produtos do metabolismo celular, que podem ser definidos como qualquer átomo ou molécula energeticamente instável e muito reativa que possuem elétrons desemparelhados em sua órbita exterior. Devido sua elevada reatividade, podem se apropriar de elétrons de outros compostos para alcançar sua estabilidade, sendo assim denominado um agente oxidante (PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015).

No processo de respiração celular, o oxigênio (O_2) é reduzido nas mitocôndrias. Durante esse processo, são gerados subprodutos chamados espécies reativas de oxigênio (ERO), sendo as mais comuns o radical superóxido (O_2^\bullet), hidroxila (OH^\bullet) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Apesar do peróxido de hidrogênio não ser um radical livre, é uma espécie com potencial reativo (SLIMEN et al., 2014).

A geração de radicais livres no organismo é um processo contínuo e fisiológico, e desempenha importantes funções biológicas. Em quantidades adequadas, sua produção possibilita a geração de energia por meio da cadeia transportadora de elétrons, ativação de genes e participação nos mecanismos de defesa em processos de infecção e sinalização celular (KLINK et al., 2005; BARBOSA et al., 2010). A influência de fatores externos como a exposição aos raios ultravioletas, poluição do ar, tabagismo, consumo de álcool, excesso de exercícios físicos, dentre outros fatores, podem conduzir ao acúmulo intracelular das ERO no organismo (KANDOLA; BOWMAN; BIRCH-MACHIN, 2015).

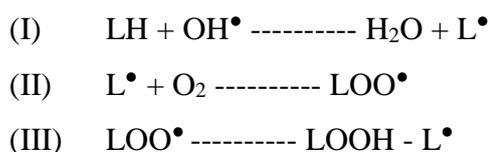
Estresse oxidativo é definido como uma alteração metabólica causada pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas no organismo e sua capacidade de eliminação através do sistema de defesa antioxidante (WINTERBOURN, 2015). Portanto, o equilíbrio entre a produção de espécies reativas e a sua eliminação pelo organismo é essencial (SITI; KAMISAH; KAMSIAH, 2015).

O processo de estresse oxidativo leva à oxidação de importantes biomoléculas como o DNA, RNA, lipídeos, e como consequência a perda de suas funções biológicas e desequilíbrio homeostático, gerando dano oxidativo celular e tecidual (PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015). O estresse oxidativo está relacionado com o desencadeamento de diversas doenças humanas, incluindo doenças neurológicas, dermatológicas, cardiovasculares, hepáticas, diabetes e câncer, assim como o envelhecimento precoce (LI et al., 2015; PISOSCHI e POP, 2015).

2.5.1. Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica pode ser descrita como uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação dos radicais livres sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares, gerando o radical alquila (L^\bullet), alcoxila (LO^\bullet) e peroxila (LOO^\bullet). O resultado desse processo oxidativo pode levar a destruição da estrutura das membranas, alterando sua permeabilidade, resultando na entrada e saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, falência de mecanismos e troca de metabólitos e, numa condição extrema à morte celular (LIMA; ABDALLA, 2001).

O processo de peroxidação lipídica pode ser dividido em três etapas mostradas na equação 1. A primeira etapa (I) ocorre com a interação do ácido graxo com radical hidroxila ou com oxigênio singlete, que tem como consequência a perda de um átomo de hidrogênio do ácido graxo e liberação de um radical lipídico; Na segunda etapa (II), o radical lipídico incorpora uma ou mais moléculas de oxigênio e se transforma-se em radical peroxila; Na terceira etapa (III), o radical peroxila interage com outra molécula de ácido graxo e o seu hidrogênio é retirado, originando um hidroperoxila e mais um novo radical lipídico, formando então uma reação em cadeia (VANNUCCHI et al., 1998).



Equação 1: Processo de peroxidação lipídica.

Como resultado da peroxidação de ácidos graxos, ocorre a produção de malondialdeído (MDA), resultante da oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas fosfolipídicas, sendo um subproduto secundário tóxico da peroxidação lipídica. O MDA é um biomarcador de dano oxidativo e pode ser quantificado no plasma sanguíneo (VANNUCCHI et al., 1998; VASCONCELOS et al., 2007).

2.5. Atividade Antioxidante

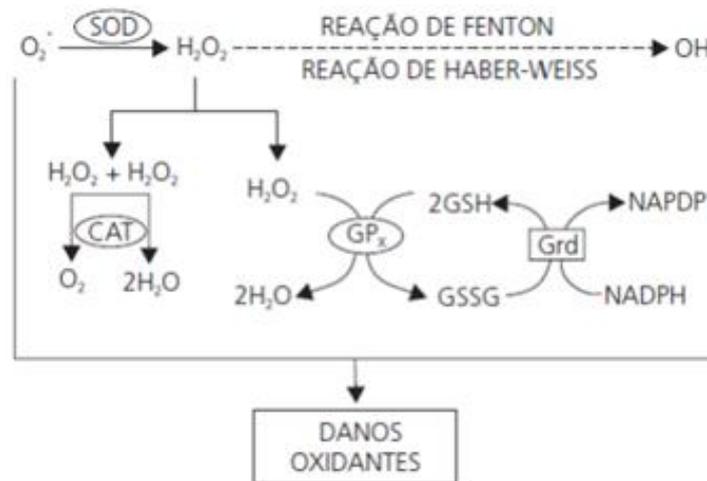
Antioxidantes são moléculas que inibem a ação de radicais livres, fornecendo proteção contra danos celulares causados pelas espécies reativas e reduzindo os efeitos causados pelo estresse oxidativo. Os antioxidantes naturais tornaram-se alvo de diversos estudos com o propósito de encontrar fontes que forneçam moléculas potencialmente seguras, eficazes e de menor custo, resultando em diversos benefícios à saúde humana. A atividade terapêutica de plantas medicinais pode ser atribuída às suas moléculas que possuem atividade antioxidante (NIMSE; PAL, 2015; DIMITROVA et al., 2017; YASHIN et al., 2017).

O sistema de defesa antioxidante tem a finalidade de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não radicalares. As células possuem um sistema de defesa contra os danos causados pelas espécies reativas, sendo dividido em um sistema de defesa enzimático e outro não enzimático (BARBOSA et al., 2010).

2.5.1. Sistema antioxidante enzimático

No sistema de defesa antioxidante enzimático podem ser encontradas as enzimas superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrogênio - H_2O_2 (Equação 3), a catalase (CAT) que atua na decomposição de H_2O_2 e O_2 (Equação 2) e a glutatona peroxidase (GPx), que atua sobre peróxidos em geral, com a utilização de glutatona como co-fator. Um exemplo simplificado da integração do sistema de defesa antioxidante endógeno é mostrado na Figura 3.

Figura 3. Mecanismo coordenado de defesa antioxidante enzimática. SOD – Superóxido Dismutase, CAT – Catalase, GPx – Glutaciona Peroxidase, GRd – Glutaciona Redutase, $O_2^{\cdot-}$ – Radical superóxido, H_2O_2 – peróxido de hidrogênio, OH^{\cdot} - Radical hidroxil, GSH – Glutaciona reduzida – GSSG – glutaciona oxidada.



Fonte: BARBOSA et al., 2010.

A enzima SOD desempenha um papel modulatório das espécies reativas de oxigênio. É uma enzima que exerce a função de catalisar a dismutação do ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (GAETA et al., 2002). Representando, portanto, uma das mais importantes defesas antioxidantes enzimáticas existentes em praticamente todas as células expostas ao oxigênio. A SOD pode ser encontrada sob duas formas: no citoplasma, é dependente de cobre e zinco (SOD-Cu/Zn), enquanto na mitocôndria, necessita do manganês como co-fator (SOD-Mn) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).



Equação 2. Dismutação do radical superóxido pela SOD.

A enzima Catalase está distribuída por todo o organismo e está principalmente concentrada no fígado e nos eritrócitos, estando presente nos peroxissomas. Órgãos que possuem pouco ou nenhum peroxissomas estão expostos aos danos oxidativos, como é o caso do cérebro, pulmão e coração. A defesa por meio da catalase se dá por um mecanismo de difusão do peróxido de hidrogênio para o sangue, onde reage com a enzima catalase eritrocitária (equação 3). Quando se há altas concentrações de H₂O₂ intracelular surgem outros mecanismos que neutralizam o peróxido de hidrogênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).



Equação 3. Decomposição do peróxido de hidrogênio pela Catalase.

A enzima glutathiona peroxidase (GPx) reduz o H₂O₂ a água, porém ação depende da manutenção de um ciclo redox da glutathiona, por meio da relação entre a glutathiona reduzida (GSH) e a glutathiona oxidada (GSSG). Sendo assim, enzima glutathiona redutase (Grd) desempenha a função de recuperação da glutathiona reduzida (GSH), possibilitando a integridade do ciclo redox, e conseqüentemente o equilíbrio dos sistemas de defesa antioxidante (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

2.5.2. Sistema antioxidante não enzimático

O sistema antioxidante não enzimático é constituído por agentes endógenos, como por exemplo a glutathiona (GSH) que atua como co-fator para a enzima GPx e por antioxidantes dietéticos, dos quais se destacam o ácido ascórbico (vitamina C, capturando as ERRO pela transferência de elétrons) α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (pré-vitamina A), ácido úrico, melatonina, os minerais (exercendo importante função sendo co-fatores para as enzimas antioxidantes) e os compostos fenólicos (BARBOSA et al., 2010; RIBEIRO et al., 2005). Essas substâncias são amplamente encontradas em fontes vegetais.

Dentre os antioxidantes não enzimáticos, os compostos fenólicos merecem destaque. Estudos recentes investigaram que os efeitos antioxidantes de plantas medicinais podem ser atribuídos aos compostos fenólicos (DIMITROVA et al., 2017; NILE et al., 2017). O conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides em plantas medicinais tem sido associado a suas atividades antioxidantes e desempenham um papel na prevenção e no desenvolvimento de

doenças relacionadas a idade, em particular as causadas pelo estresse oxidativo, incluindo o câncer (AZWANIDA, 2015).

2.5. Câncer

As células normais do organismo humano se dividem, amadurecem e morrem, renovando-se em cada ciclo. O câncer se desenvolve quando as células anormais deixam de seguir esse processo natural, sofrendo mutação que pode provocar danos nos genes da célula. Danificada, dividem-se descontroladamente, produzindo assim novas células anormais. Estas células que sofreram mutação, quando não eliminadas pelo sistema de reparo e imunológico, acabam eventualmente produzindo novas células (TESSARIN, 2017).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) câncer é um termo genérico para englobar um conjunto de doenças que tem em comum o crescimento e a proliferação anormal e desordenada das células em um organismo (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2014).

Sua etiologia está relacionada a fatores endógenos (fatores genéticos e idade) e exógenos (ambientais). Dentre os fatores exógenos que contribuem para o desenvolvimento do câncer, destaca-se o tabagismo, certas infecções, alcoolismo, radiação, má alimentação, sedentarismo e poluentes ambientais (ANAND et al., 2008).

2.5.1. Leucemia

A leucemia é um tipo de câncer que ocorre na formação das células sanguíneas. Essa doença hematológica maligna prejudica seriamente a saúde humana (WANG et al., 2015).

Leucemia linfóide aguda (LLA) é um distúrbio das células hematopoiéticas caracterizadas pelo bloqueio da diferenciação celular com subsequente aumento de células imaturas. A linhagem celular CCRF-CEM é utilizada na pesquisa como modelo celular de LLA para testar diferentes tipos de substâncias com potencial terapêutico (BOZOK et al., 2014; KUETE et al., 2015).

A Leucemia mieloide aguda (LMA) é caracterizada pela expansão clonal de células mielóides imaturas que apresentam diferentes tipos de alteração genéticas e epigenéticas (KANSAL, 2016). A linhagem celular Kasumi-1 é utilizada na pesquisa como modelo celular de LMA para testar diferentes tipos de substâncias com potencial terapêutico, assim como investigar as vias metabólicas (HERNANDEZ; KHANDUAL; LÓPEZ, 2017; MITKEVICH et al., 2014).

Atualmente, as quimioterapias disponíveis para tratamento têm efeitos colaterais adversos. Sendo assim, é de extrema relevância a busca por novos fármacos que apresentem nenhum ou pouco efeito colateral (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antioxidante e citotóxico do extrato hidroetanólico das cascas de *Nectandra cuspidata* Nees (EHNC).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar os compostos fenólicos e flavonoides totais por espectrofotometria;
- Avaliar o potencial antioxidante do EHNC por captura direta de radicais livres DPPH e ABTS;
- Verificar o efeito protetor do EHNC na hemólise induzida em eritrócitos;
- Determinar as atividades das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT) em eritrócitos humanos;
- Avaliar a ação citotóxica do EHNC em linhagens celulares leucêmicas (CCRF-CEM e Kasumi-1).

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, F. M.; SARTORI, Â. L. B. *Nectandra* Rol. ex Rottb. (Lauraceae) no Mato Grosso do Sul, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 1, p. 119–129, 2009.

ANAND, P. et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 9, p. 2097-2116, 2008.

AZWANIDA, N. N. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 4, n. 3, p. 3–8, 2015.

BADKE, M. R. et al. Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. **Texto e Contexto Enfermagem**, v. 21, n. 2, p. 363–370, 2012.

BATISTA, A. L. et al. Chemical constituents from *Nectandra cuspidata* nees - Lauraceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 61, p. 229–231, 2015.

BOZOK, V. C. et al. Capsaicin induced apoptosis and gene expression dysregulation of human acute lymphoblastic leukemia CCRF-CEM cells. **Journal of BU ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology**, v. 19, n. 1, p. 183–190, 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada - 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.** Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf>. Acesso em: 28 jan. 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). **O Bioma Cerrado.** Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em: 28 jan. 2018.

CARNEIRO, F. M. et al. Tendências Dos Estudos Com Plantas Medicinais No Brasil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**, v. 3, n. 2, p. 44–75, 2014.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47–58, 2010.

DEHARO, E. et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 1, p. 91–98, 2001.

DIMITROVA, L. et al. Antimicrobial and antioxidant potential of different solvent extracts of the medicinal plant *Geum urbanum* L. **Chemistry Central Journal**, v. 11, n. 1, 2017.

ESPINDOLA, P. P. D. T. et al. Antioxidant and Antihyperlipidemic Effects of *Campomanesia adamantium* O. Berg Root. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

FERREIRA, L. DOS A. O. et al. Antileishmanial and antioxidant potential of fractions and isolated compounds from *Nectandra cuspidata*. **Natural product research**, p. 1–4, 2017.

GAETA, L. M. et al. Determination of superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in blood of healthy pediatric subjects. **Clinica Chimica Acta**, v. 322, n. 1–2, p. 117–120, 2002.

GODINHO, C. S. et al. Estudo fitoquímico de espécies arbóreas do cerrado. **Revista Multitexto**, v. 3, n. 2, p. 64–70, 2016.

GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY (GBIF). *Nectandra cuspidata* Nees & Mart. ex Nees in GBIF Secretariat (2017). GBIF Backbone Taxonomy. Disponível em: <https://doi.org/10.15468/39omei>. Acesso em: 26 jan. 2018.

HERNANDEZ, F. Y. F.; KHANDUAL, S.; LÓPEZ, I. G. R. Cytotoxic effect of *Spirulina platensis* extracts on human acute leukemia Kasumi-1 and chronic myelogenous leukemia K-562 cell lines. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 1, p. 14–19, 2017.

IBGE. **Mapa de Biomas do Brasil**. Disponível em: <http://mapas.ibge.gov.br/biomas2/viewer.htm>. Acesso em: 26 jan. 2018.

KANDOLA, K.; BOWMAN, A.; BIRCH-MACHIN, M. A. Oxidative stress - A key emerging impact factor in health, ageing, lifestyle and aesthetics. **International journal of cosmetic science**, v. 37, n. S2, p. 1-8, 2015.

KANSAL, R. Acute myeloid leukemia in the era of precision medicine: recent advances in diagnostic classification and risk stratification. **Cancer biology & medicine**, v. 13, n. 1, p. 41–54, 2016.

KLINK, C. A. et al. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147–155, 2005.

KUETE, V. et al. Cytotoxicity of two naturally occurring flavonoids (dorsmanin F and poinsettifolin B) towards multi-factorial drug-resistant cancer cells. **Phytomedicine**, v. 22, n. 7–8, p. 737–743, 2015.

LI, S. et al. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 11, p. 26087–26124, 2015.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3, p. 293–303, 2001.

LOPES, R. H. O. et al. Antioxidant and Hypolipidemic Activity of the Hydroethanolic Extract of *Curatella americana* L. Leaves. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

MEDEIROS, J. DE D. Guia de campo. Vegetação do Cerrado: 500 espécies. 2011.

MITKEVICH, V. A. et al. Cytotoxicity of RNase Sa to the acute myeloid leukemia Kasumi-1 cells depends on the net charge. **Oncoscience**, v. 1, n. 11, p. 738, 2014.

MORAES, P. L. R. DE. Sinopse das Lauráceas nos estados de Goiás e Tocantins, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 5, p. 1–18, 2005.

MUÑOZ, V. et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach: Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, n. 2, p. 127–137, 2000.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>>. Acesso em: 28 jan. 2018.

NILE, S. H.; NILE, A. S.; KEUM, Y.-S. Total phenolics, antioxidant, antitumor, and enzyme inhibitory activity of Indian medicinal and aromatic plants extracted with different extraction methods. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 76, 2017.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Adv.**, v. 5, n. 35, p. 27986–28006, 2015.

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 30, n. 1, p. 11-26, 2015.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 2015.

QUINET, A. . et al. **Lauraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17934>>. Acesso em: 18 jan. 2018.

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, 2005.

SANTOS, S. O.; ALVES, M. Sinopse taxonômica da família Lauraceae na porção norte da Floresta Atlântica brasileira¹. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 1, p. 14–28, 2013.

SANTOS, U. P. et al. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties as well as the phenolic content of the extract from *Hancornia speciosa* gomes. **PLoS ONE**, v. 11, n. 12, p. 1–19, 2016.

SITI, H. N.; KAMISAH, Y.; KAMSIAH, J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). **Vascular pharmacology**, v. 71, p. 40-56, 2015.

SLIMEN, I. B. et al. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. **International journal of hyperthermia**, v. 30, n. 7, p. 513-523, 2014.

TESSARIN, M. C. F.; DA SILVA, M. A. M. Nutrigenômica e Câncer: Uma Revisão. **Cadernos UniFOA**, v. 8, n. 1 (Esp.), p. 79–96, 2017.

VANNUCCHI, H. et al. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 31, n. 1, p. 31, 1998.

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

WANG, B. et al. Pure total flavonoids from *Citrus paradisi* Macfadyen act synergistically with

arsenic trioxide in inducing apoptosis of Kasumi-1 leukemia cells in vitro. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, v. 16, n. 7, p. 580–585, 2015.

WINTERBOURN, C. C. Are free radicals involved in thiol-based redox signaling? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 80, p. 164–170, 2015.

YASHIN, A. et al. Antioxidant Activity of Spices and Their Impact on Human Health: A Review. **Antioxidants**, v. 6, n. 3, p. 70, 2017.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DA CASCA DE *Nectandra cuspidata* Nees & Mart. ex Nees

Alex Santos Oliveira¹, Thaliny Bonamigo¹, Wagner Donizetti Santana Vital² Uilson Pereira dos Santos¹, Edgar Julian Paredes Gamero², Kely de Picoli Souza¹, Edson Lucas dos Santos¹

¹Univesidade Federal da Grande Dourados, UFGD – Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais – Itahum Km 13. Dourados, Mato Grosso do Sul, 79800-000, Brasil.

²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Av. Pedro de Toledo, nº 669, São Paulo, São Paulo, 04096-401, Brasil.

RESUMO

Nectandra cuspidata é uma planta popularmente conhecida no Brasil com louro-pimenta, louro-canela e faz parte da flora nativa do cerrado brasileiro. Neste estudo, investigou-se a atividade antioxidante e citotóxica do extrato hidroetanólico da casca de *Nectandra cuspidata* (EHNC). O conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides foram determinados utilizando o método Follin-Ciocalteu e do cloreto de alumínio, respectivamente. A atividade antioxidante do EHNC foi avaliada através do ensaio de captura de radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), além da inibição da hemólise oxidativa em eritrócitos induzidos por 2,2'-azobis amidinopropano (AAPH) seguido da quantificação de malondialdeído (MDA) e investigação da modulação de enzimas antioxidantes endógenas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). As linhagens celulares CCRF-CEM e Kasumi-1 foram utilizadas para avaliar sua citotoxicidade. Os resultados mostram que o EHNC apresenta o conteúdo de compostos fenólicos de $292,88 \pm 11,49$ mg EAG/g do extrato e Flavonoides $7,03 \pm 1,18$ mg EQ/g do extrato. Em relação a sua capacidade antioxidante, demonstrou ser capaz de inibir 50% dos radicais livres de DPPH e ABTS em $3,9 \mu\text{g/mL}$ e $1,99 \mu\text{g/mL}$ para o EHNC, e em $3,54 \mu\text{g/mL}$ e $3,27$ para o ácido ascórbico, respectivamente. O EHNC foi capaz de inibir a hemólise e a peroxidação lipídica em eritrócitos humanos incubados com agente oxidante, o qual foi confirmado pelos níveis de MDA, sendo capaz de reduzir em $66,39 \pm 6,74\%$. O EHNC foi capaz de modular a ação da enzima CAT, aumentando sua atividade nas menores concentrações avaliadas e não foi observado alterações na atividade enzimática de SOD. O EHNC apresentou ação citotóxica contra as linhagens celulares CCFR-CEM e Kasumi-1. Esse estudo demonstra pela primeira vez que o EHNC é capaz de promover atividade antioxidante, modula a atividade endógena de CAT, e promove efeitos citotóxicos em linhagens celulares leucêmicas, abrindo novas perspectivas de estudos para utilização das cascas de *Nectandra cuspidata* Nees como um produto natural seguro e com propriedades antioxidantes.

Palavras-Chave: Cerrado, Leucemia, Peroxidação Lipídica.

1. INTRODUÇÃO

O bioma do Cerrado corresponde a aproximadamente 22% do território brasileiro, sendo considerada a mais rica savana do mundo [1, 2]. A utilização de plantas com fins medicinais para tratamento e prevenção de doenças é uma das mais antigas práticas medicinais da humanidade, sendo consideradas de fácil obtenção e baixo custo [3].

Plantas medicinais são alvo de estudo por serem fontes de compostos que possuem atividade antioxidante, como por exemplo os compostos fenólicos [4]. Atualmente, muitos estudos se dedicam a explorar e utilizar plantas medicinais para a prevenção dos efeitos dos radicais livres, realizando assim a prevenção e tratamento de diversas doenças [5, 6].

A formação de espécies reativas no organismo humano é um processo contínuo, principalmente por consequência de processos aeróbicos para geração de energia. Em excesso, causam danos oxidativos em biomoléculas, afetando a estrutura celular [7, 8]. O sistema de defesa antioxidante possui mecanismos enzimáticos e não enzimáticos, que são capazes de neutralizar a ação dessas espécies reativas, diminuindo e prevenindo os danos causados, inclusive prevenindo doenças, como o câncer [9, 10].

Nectandra cuspidata faz parte da família Lauraceae, popularmente conhecida no Brasil com louro-pimenta, louro-canela e faz parte da flora nativa do cerrado brasileiro [11]. O extrato etanólico da casca do caule possui uma potente atividade antimalárica e sua decocção é utilizada para tratamento de problemas no estômago [12]. A análise fitoquímica das folhas desta espécie revelou a presença de alcaloides, sesquiterpenos, poliprenóis, α -tocoferol e β -sisterol [13]. No entanto, relatos sobre atividade antioxidante e citotoxicidade não são encontrados na literatura.

Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antioxidante e citotoxicidade do extrato hidroetanólico da casca de *Nectandra cuspidata* (EHNC).

2. MATERIAL E MÉTODOS

.1. Material vegetal

As cascas do caule de *N. cuspidata* foram coletadas no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil, sob as coordenadas S 22° 05' 545'', W 055° 20' 746''. A identificação do material vegetal foi realizada por um botânico da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados (FCBA, UFGD), Dourados, MS, Brasil e uma exsicata da espécie foi depositada no Herbário DDMS/UFGD, com a numeração *Nectandra cuspidata* Nees (n° 5253).

Após a higienização e secagem, as cascas foram moídas e o extrato foi preparado através da maceração com etanol 70%, à temperatura ambiente. O conteúdo foi acondicionado em recipiente escuro, e a cada 7 dias o extrato foi filtrado e o solvente repostado na proporção (1:5) (g/solvente). Ao final de 21 dias, o conteúdo filtrado foi concentrado em evaporador rotativo a vácuo para extração do solvente e em seguida liofilizado. Ao final, o EHNC foi armazenado em freezer -20°C e protegido da luz. O rendimento do extrato foi de aproximadamente 28% e foi calculado pela equação:

$$\text{Rendimento (\%)} = \left(\frac{\text{Massa do extrato seco}}{\text{Massa do material vegetal}} \right) \times 100$$

.2. Análise Química

2.2.1 Determinação dos teores de compostos fenólicos e flavonoides

A concentração de compostos fenólicos presentes no EHNC foi determinada de acordo com o método colorimétrico Folin-Ciocalteu descrito em MEDA et al. [14], com algumas modificações. Para esta finalidade, 0,5 mL do EHNC (200 µg/mL) foi misturado com 2,5 mL de reagente Follin-Ciocalteu e 2,0 mL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 14 %. A absorvância foi lida a 760 nm em espectrofotômetro T70 UV/VIS – (PG Instruments) após incubação de 2 horas à temperatura ambiente, sob ausência de iluminação. O ácido gálico foi utilizado como padrão para produzir uma curva de calibração nas concentrações de 0,4 - 11 µg/mL. A média das três leituras foi utilizada para determinar o teor de compostos fenólicos, o qual foi expresso como mg equivalente de ácido gálico por grama de EHNC (EAG/g).

O conteúdo de flavonoides do EHNC foi determinado de acordo com o método descrito por Liberio et al. [15], com algumas modificações. Para esta finalidade, 0,5 mL do EHNC (200 µg/mL) foi misturado com uma solução de 4,5 mL de cloreto de alumínio hexahidratado 2%

(AlCl₃·6H₂O), em metanol absoluto. Em seguida, incubado durante 30 minutos em local escuro a temperatura ambiente. A absorbância foi lida a 415nm em espectrofotômetro T70 UV/VIS – (PG Instruments). A quercetina nas concentrações de 0,4 - 11 µg/mL foi utilizada como padrão para produzir uma curva de calibração. A média de três leituras foi utilizada para determinar o teor de flavonoides, o qual foi expressa como mg equivalentes a quercetina por grama de EHNC (EQ/g).

.3. Atividade Antioxidante

2.3.1 Atividade antioxidante pelo ensaio de DPPH·

A capacidade de sequestrar o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH·) foi determinada de acordo com o método descrito por Gupta e Gupta [16]. Para este ensaio, 200 µL de EHNC (1,5-50 µg/mL) foi misturado com 1,800 µL de solução de DPPH (0,11 mM DPPH em etanol 80%), A mistura foi homogeneizada e incubada em temperatura ambiente por 30 minutos. A captura dos radicais DPPH· foi quantificada através de um espectrofotômetro T70 UV/VIS – (PG Instruments), utilizando um comprimento de onda de 517 nm. O ácido ascórbico foi utilizado como antioxidante de referência (controle positivo). Os testes foram realizados em duplicata, em dois experimentos independentes. A porcentagem de inibição foi calculada a partir do controle com a seguinte equação e resultado expresso em % de inibição de DPPH:

$$\text{Inibição de DDPH (\%)} = \left(\frac{1 - \text{Absorbância}_{\text{amostra}}}{\text{Absorbância}_{\text{controle}}} \right) \times 100$$

2.3.2 Atividade antioxidante pelo método ABTS^{•+}

A capacidade de capturar o radical 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS^{•+}) foi determinada segundo o método descrito por RE et. al. [17]. As soluções estoques incluíram solução de ABTS 7 mM e persulfato de potássio 140 mM. O radical ABTS^{•+} foi gerado a partir da reação de 5 mL solução aquosa de ABTS[•] 7 mM com 88 µL de persulfato de potássio 140mM. Esta solução foi mantida ao abrigo da luz, em temperatura ambiente por 12-16 horas. Após esse período, diluiu-se a solução em etanol até obter absorbância a comprimento de 0,70 (± 0,05) a 734 nm utilizando o espectrofotômetro T70 UV/VIS – (PG Instruments). Em seguida, misturou-se 20 µL de EHNC (1,5 - 50 µg/mL) com 1,980 µL do radical ABTS^{•+} e a absorbância foi lida 734 nm após 6 minutos. O ácido ascórbico foi utilizado como antioxidante

de referência (controle positivo). Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata. A porcentagem de inibição do radical ABTS foi calculada de acordo com a seguinte equação, onde $Absorbância_{controle}$ é a absorbância do radical $ABTS^{*+}$ sem a amostra testada:

$$\text{Inibição de ABTS (\%)} = \left(\frac{(Absorbância_{controle} - Absorbância_{amostra})}{Absorbância_{controle}} \right) \times 100$$

2.3. Ensaio de inibição da hemólise oxidativa

2.3.1. Preparo da suspensão de eritrócitos

Após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro Universitário da Grande Dourados (UNIGRAN), Brasil (CEP processo número 123/12), 20 mL de sangue periférico foram coletados de indivíduos adultos, saudáveis e não fumantes, e transferidos para tubos contendo anticoagulante citrato de sódio. Subsequentemente foram centrifugados a 3000 rpm por 10 min. Após a centrifugação, o plasma sanguíneo e a camada de leucócitos foram descartadas, e os eritrócitos lavados três vezes com solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9%. Em seguida foi preparada uma suspensão eritrocitária a 10% em solução de NaCl 0,9% para atingir uma concentração final de 2,5% para o próximo ensaio.

2.3.2. Ensaio de hemólise e inibição da hemólise oxidativa induzida

O efeito protetor da hemólise oxidativa pelo EHNC foi avaliado de acordo com o método descrito por Campos et al., (2015) com algumas modificações. Os ensaios foram realizados a partir da solução eritrocitária previamente preparada. Para isto, os eritrócitos foram pré-incubados a 37°C durante 30 minutos na presença de diferentes concentrações de ácido ascórbico (controle positivo) ou EHNC (12-100 µg/mL). Após este período, foram adicionados 500 µl do indutor de hemólise oxidativa, 2,2'-azobis- (2-amidinopropano) 50 mM (AAPH). Esta mistura foi incubada a 37°C durante 4h, sob agitação periódica. Como controle negativo, foi utilizada a suspensão eritrocitária incubada com solução salina. Foram preparados também o controle AAPH, o controle do solvente (EtOH) e controle de hemólise total (solução eritrocitária e água destilada). As amostras permaneceram incubadas durante 4 horas e foram avaliadas a cada 60 min. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 min, e posteriormente uma alíquota de 200 µL do sobrenadante foram adicionadas em cubetas previamente preenchidas com 1,800 µL de solução salina 0,9%, submetidas a leitura no espectrofotômetro e a absorbância foi lida a 540 nm. A porcentagem de hemólise no sobrenadante foi medida com a fórmula $A/B \times 100$, onde (A) representa a absorbância da

amostra e (B) é a hemólise total de eritrócitos (com água destilada). Dois experimentos independentes foram realizados em duplicata.

2.3.3. *Ensaio de inibição da peroxidação lipídica*

Uma suspensão de eritrócitos 10% foi utilizada para avaliar os efeitos do EHNC de inibição da peroxidação lipídica. Os eritrócitos foram pré-incubados a 37°C durante 30 min. com diferentes concentrações de ácido ascórbico ou EHNC (12 - 100 µL/mL). Foram utilizados os mesmos controles do ensaio anterior. Em seguida, 50 mM de AAPH foi adicionada à suspensão de eritrócitos, e incubados a 37°C durante 4 horas, com agitação periódica. Após o período de 120, 180 e 240 minutos, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm durante 5 min, e 500 µL de alíquotas do sobrenadante foram transferidas para tubos com 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 10 nmol. Como um controle padrão, 500 µL de solução de malondialdeído a 20 Mm (MDA), foram adicionados a 1 mL de TBA. As amostras foram incubadas a 96°C durante 45 min e, em posteriormente, 4 ml de álcool n-butílico foram adicionados a cada amostra, e em seguida as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm durante 5 min. O sobrenadante das amostras foi utilizado para a leitura em espectrofotômetro a 532nm. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata. Os níveis de MDA nas amostras foram expressos em nmol/mL, obtido com a seguinte fórmula:

$$\text{MDA} = \text{Absorbância}_{\text{amostra}} \times \left(\frac{20 \times 220,32}{\text{Absorbância}_{\text{padrão MDA}}} \right)$$

2.4. **Avaliação da atividade antioxidante enzimática**

2.4.1. *Preparo do hemolisado*

Após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal da Grande Dourados (Universidade Federal da Grande Dourados; UFGD), Brasil (CEP processo número 2.407.793), as hemácias foram obtidas de um doador saudável após centrifugação do sangue total lavadas com solução de NaCl a 0,9% e centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos, desprezando-se em seguida o sobrenadante. O processo foi repetido três vezes. Uma solução de hemácias a 40% foi utilizada para realização dos experimentos. Para realização do tratamento, 300 µL da solução de hemácias foram homogeneizadas com 300 µL do EHNC nas concentrações de 12,5 - 100 µg/mL, durante de 30, 120 e 180 minutos. As amostras tratadas

foram centrifugadas a 3.000 rpm por 5 minutos e alíquotas de 50 µL das hemácias foram retiradas e hemolisadas com água destilada na proporção 1:20 (v/v), com posterior armazenamento a -80°C para as seguintes análises: Superóxido Dismutase, hemoglobina (Hb) e Catalase.

2.4.2. Dosagem de hemoglobina no Hemolisado

A determinação da concentração de hemoglobina (Hb) no hemolisado torna-se fundamental para a obtenção dos valores finais de CAT. Os valores foram obtidos através do método de Drabkin. Um padrão de Hb de 11,7 g/dL foi utilizado. Para o ensaio 2 µL das amostras preparadas a partir do hemolisado 1:20, descrito na preparação das amostras ou do padrão foram adicionadas ao reagente de Drabkin (2 mL). Essa mistura forma um composto, a cianometahemoglobina, que pode ser mensurada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

2.4.3. Superóxido Dismutase (SOD)

A técnica utilizada para determinação da SOD baseia-se na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. O radical superóxido é gerado pela auto oxidação do pirogalol quando em meio básico. A SOD presente nas amostras tratadas compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção. A oxidação do pirogalol leva à formação de um produto colorido, detectado em espectrofotômetro no comprimento de onda de 420 nm. O ensaio consiste na adição de 1,940 µL de tampão Tris 1 M (EDTA 5 mM; pH 8,0), 20 µL de cada amostra seguido de 40 µL de pirogalol 10 mM. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 420 nm (25° C) em um intervalo de 5 minutos, zerando o aparelho com H₂O destilada. Os resultados foram expressos em % de inibição da auto oxidação do pirogalol, através da equação:

$$\text{Inibição de oxidação do pirogalol (\%)} = \frac{\text{Absorbância}_{\text{autooxidação total do pirogalol}}}{\text{Absorbância}_{\text{amostra}}} \times 100$$

2.4.4. Atividade da Catalase

Do hemolisado dos tratamentos, 20 µL foi adicionado ao meio de reação, que continha tampão fosfato 50 mM, pH 7,0 e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 20 mM. A medida da atividade da CAT ocorreu através da velocidade com que o H₂O₂ é reduzido pela ação da enzima, provocando diminuição no valor da absorbância em 240 nm. A diferença na leitura das absorbâncias a 240 nm, em determinado intervalo de tempo (15 segundos), permitiu estabelecer

a velocidade de redução do H_2O_2 , que é proporcional a velocidade da reação enzimática catalisada pela CAT.

O cálculo da atividade da CAT foi feito pela seguinte equação: $(2,3/\Delta t) \cdot (a/b) \cdot (\log a_1/a_2)$, onde Δt é a variação do tempo de reação (15s), a e o volume de hemolisado na cubeta, b é a concentração de hemoglobina da amostra em g/dL, a_1 e o valor da absorbância no tempo zero ($t = 0$) e a_2 e o valor da absorbância no tempo final ($t = 15s$). A unidade final será expressa-se em k/gHb/min.

2.5. Atividade Citotóxica

2.5.1. Linhagens celulares e condições da cultura

As linhagens celulares CCRF-CEM (Leucemia linfocítica aguda) e Kasumi-1 (Leucemia mieloide aguda) foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 100U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina, e foram em armazenadas em incubadora a 37°C, 5% de CO₂ e 90% de umidade relativa.

2.5.2. Ensaio de citotoxicidade

Foi realizado o teste de AlamarBlue, onde a resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido) apresenta coloração azul e emite fraca fluorescência. Em células viáveis a resazurina é reduzida a resorufina passando a apresentar coloração rosa e emissão de fluorescência ($\lambda_{Ex.} = 560$ nm; $\lambda_{Ex.} 590$ nm) (NAKAYAMA et al., 1997). Células CCRF-CEM (Leucemia linfocítica aguda) e Kasumi-1 (Leucemia mieloide aguda) na densidade de 2×10^4 células/poço foram cultivadas em microplacas de 96 poços durante 24 horas e expostas a concentrações de EHNC (25-300 μ g/mL) durante 24 horas em estufa de CO₂ 5% a 37° C. Após a incubação, foi adicionado 20 μ L do reagente AlamarBlue 10 vezes concentrado, diluído em tampão fosfato de potássio, e a placa foi incubada novamente por 4 horas a 37° C. A redução foi mensurada por análise de fluorescência realizada em leitor de microplacas FlexStation3. A viabilidade foi normalizada assumindo-se o controle como 100%.

2.6. Análises estatísticas

Os dados são mostrados como média \pm erro padrão da média (EPM) e foram analisados por diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, usando o teste t de Student ou por análise de variância (ANOVA), seguido pelos pós teste de Dunnett, comparando os tratamentos

com o controle, usando o programa GraphPad Prisma 6. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Determinação de compostos fenólicos e flavonoides

A concentração de compostos fenólicos no EHNC foi de $292,88 \pm 11,49$ mg de ácido gálico/g de extrato (GAE/g) e a concentração de flavonoides foi de $7,03 \pm 1,18$ mg de quercetina/g de extrato (QE/g).

3.2. Avaliação da Atividade Antioxidante

3.2.1 Atividade antioxidante pelo método DPPH· e ABTS⁺

Considerando a presença de compostos com potencial antioxidante no EHNC, foi avaliada a sua capacidade antioxidante *in vitro*. O EHNC foi capaz de capturar tanto o radical livre DPPH quanto o ABTS nas diferentes concentrações avaliadas. O EHNC apresentou o IC₅₀ de 3,90, semelhante ao antioxidante padrão ácido ascórbico, de 3,54 na captura do radical DPPH. Na captura do radical ABTS, o EHNC apresentou IC₅₀ de 1,99 e de 3,27 para o antioxidante padrão ácido ascórbico (Tabela 1).

Tabela 1. IC₅₀ e concentração da atividade máxima da captura dos radicais DPPH e ABTS do antioxidante padrão e EHNC.

Amostras	DPPH			ABTS		
	IC ₅₀ (µg/mL)	Atividade máxima		IC ₅₀ (µg/mL)	Atividade máxima	
		%	µg/mL		%	µg/mL
Ácido ascórbico	3,54	95,13 ± 0,18	12,5	3,27	95,67 ± 1,9	12,5
EHNC	3,90	91,82 ± 0,27	12,5	1,99	94,80 ± 0,6	6,25

Os valores são expressos como média ± EPM. DPPH ($n = 2$) e ABTS ($n = 3$).

3.2.2. Ensaio de hemólise e inibição da hemólise oxidativa induzida

O EHNC foi também avaliado pela a sua atividade hemolítica e capacidade de proteger eritrócitos contra a hemólise induzida por AAPH (Figura 1). Quando os eritrócitos foram incubados apenas com o ácido ascórbico ou EHNC, sem agente indutor de hemólise AAPH, observou-se que os tratamentos não induziram a hemólise nos tempos e nas concentrações testadas, como mostra a Figura 1, indicando que o extrato não promoveu hemólise nas concentrações avaliadas para este modelo celular, sendo similar ao ácido ascórbico, um antioxidante padrão.

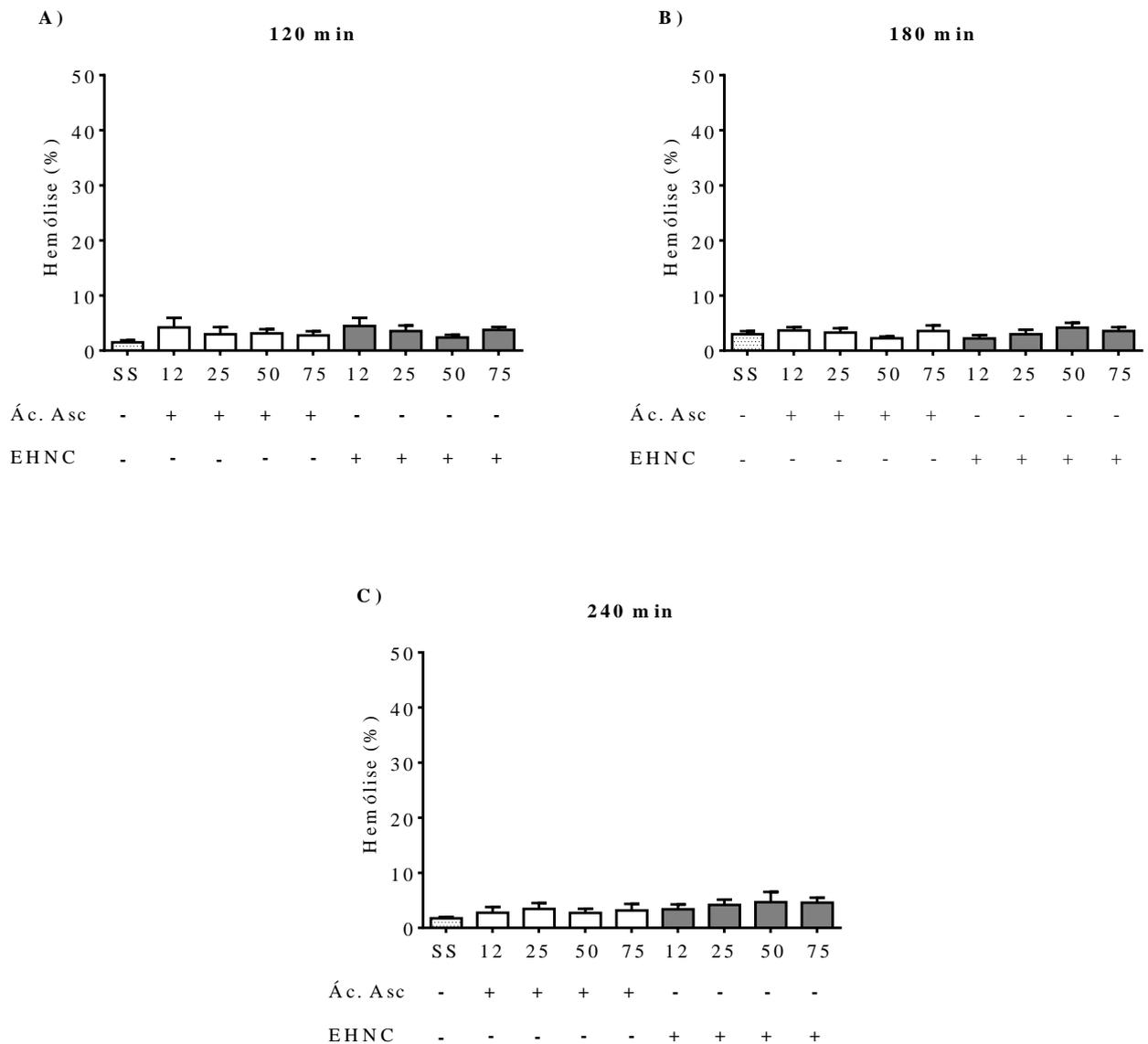


Figura 1. Efeito hemolítico do extrato hidroetanólico de *N. cuspidata* (12 - 75 µg/mL), comparado ao ácido ascórbico, em eritrócitos. (A) Eritrócitos incubados por 120 min, (B) 180 min e (C) 240 min. Os resultados estão expressos em média ± EPM (erro padrão da média), n=2.

Em seguida, avaliou-se a capacidade de proteção contra a lise celular induzida por AAPH em eritrócitos humanos (Figura 2). O EHNC apresentou atividade antihemolítica de maneira concentração tempo-dependente aos 120, 180 e 240 minutos. Após uma incubação de 240 min com EHNC, uma redução de $41,63 \pm 10,48\%$ de hemólise foi observada na concentração de $75 \mu\text{g/mL}$.

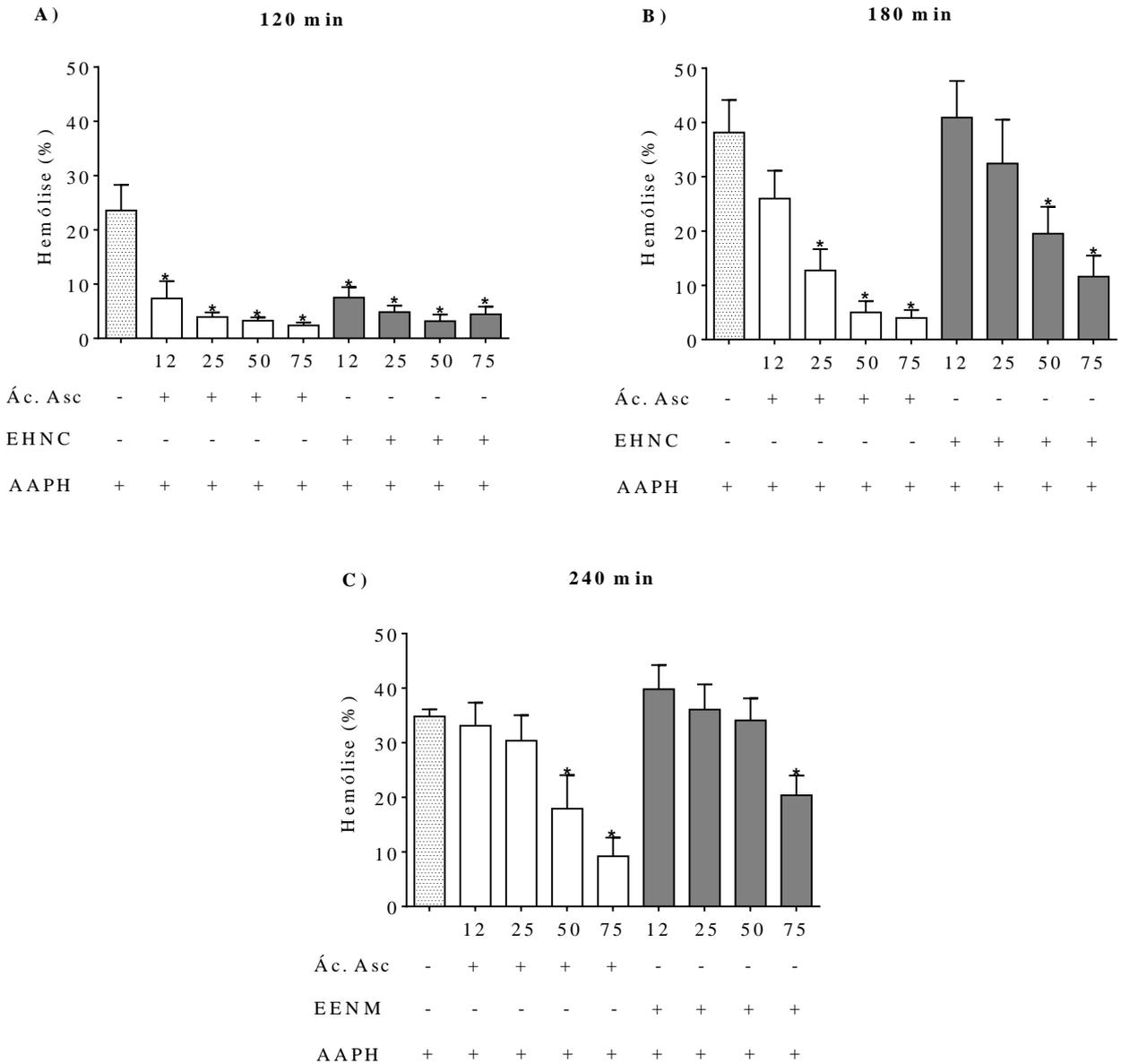


Figura 2. Efeito hemolítico do extrato hidroetanólico de *N. cuspidata* (12 - 75 $\mu\text{g/mL}$), comparado ao antioxidante padrão, ácido ascórbico, em eritrócitos induzidos com AAPH. (A) Eritrócitos incubados por 120 min, (B) 180 min e (C) 240 min. Os resultados estão expressos em média \pm EPM (erro padrão da média), $n=2$. * Representa resultados estatisticamente significativos ($P < 0.05$) quando o grupo tratado foi comparado com o grupo AAPH (eritrócitos incubados apenas com o agente oxidante).

3.2.3. Ensaio de inibição da peroxidação lipídica

A capacidade do EHNC de proteger os eritrócitos humanos contra a peroxidação lipídica induzida pelo agente oxidante AAPH foi avaliada através da dosagem de MDA (Figura 3). O EHNC promoveu redução dos níveis de MDA em todo o período experimental de forma concentração tempo-dependente. Depois de 240 minutos de incubação dos eritrócitos com EHNC, observou-se uma redução de $66,39 \pm 6,74\%$ de MDA na concentração mais elevada avaliada.

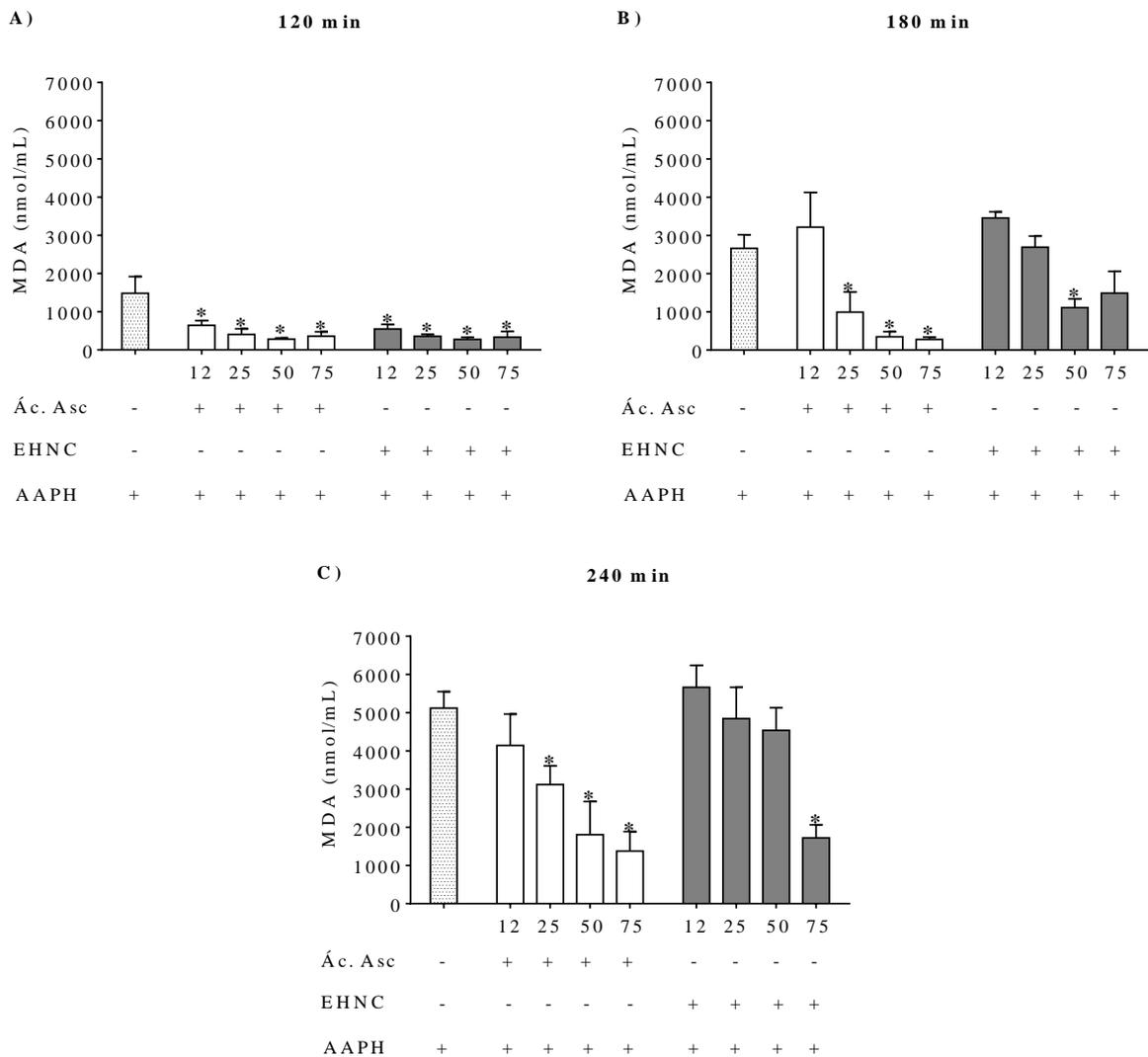


Figura 3. Concentração de malondialdeído (MDA) em eritrócitos humanos induzidos a peroxidação lipídica com o agente indutor após o tratamento em diferentes concentrações (12,5 – 75 µg/mL) do extrato de *N. cuspidata* e ácido ascórbico. (A) Eritrócitos incubados por 120 min, (B) 180 min e (C) 240 min. Os resultados estão expressos em média \pm EPM (erro padrão da média), n=2. * Representa resultados estatisticamente significativos ($P < 0.05$) quando o grupo tratado foi comparado com o grupo de AAPH (eritrócitos incubados apenas com o agente oxidante).

3.4. Avaliação da atividade antioxidante enzimática

3.4.1. Atividade de Superóxido Dismutase

Em nenhuma das concentrações avaliadas o EHNC alterou a atividade da enzima superóxido dismutase em todos os tempos avaliados quando comparados ao controle somente com a presença de soro fisiológico (Figura 4).

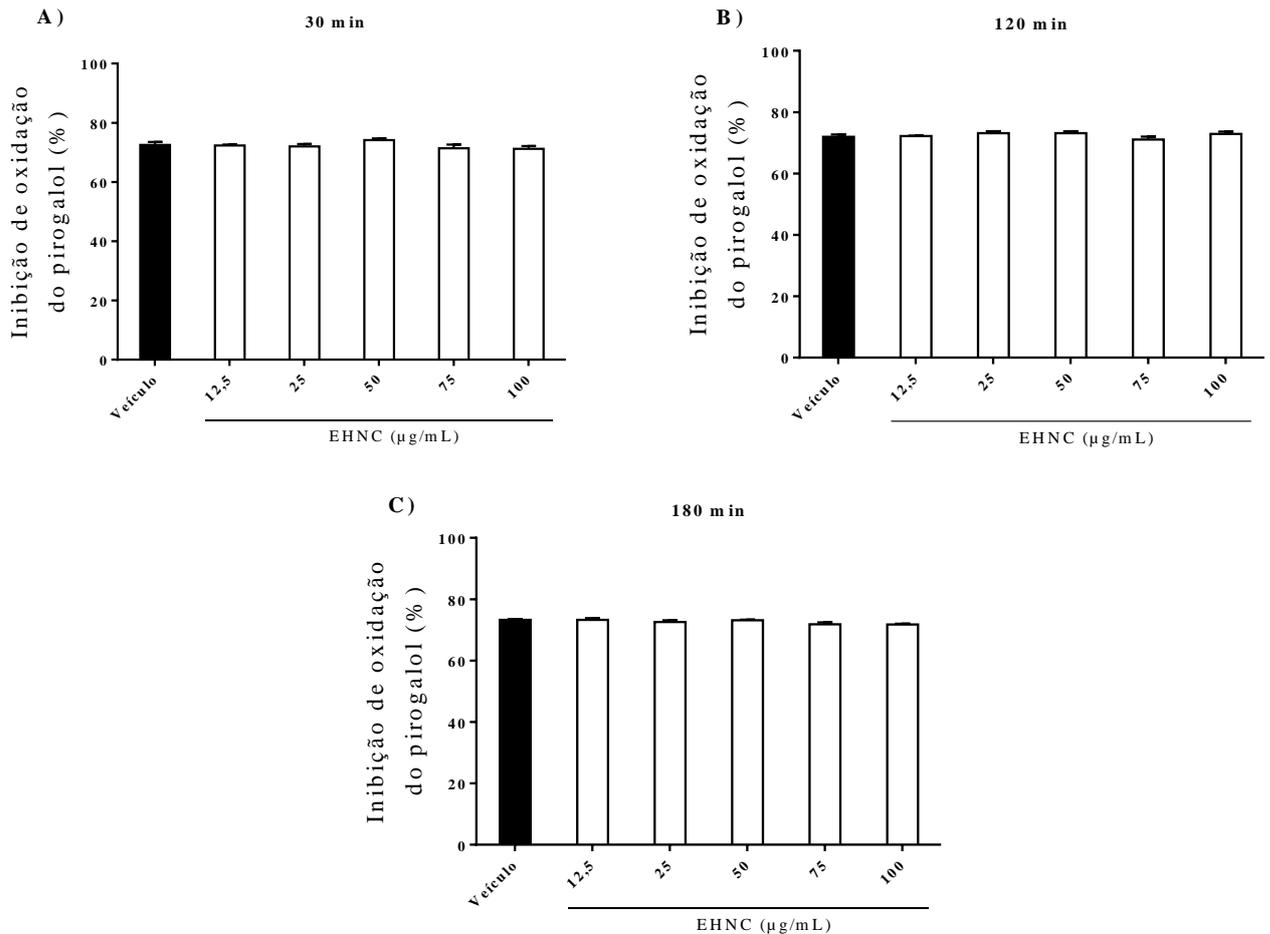


Figura 4: Atividade da enzima superóxido dismutase em eritrócitos após o tratamento com diferentes concentrações (12,5 – 100) extrato de *N. cuspidata* comparado ao grupo veículo sem tratamento. (A) Eritrócitos incubados por 30 min, (B) 120 min e (C) 180 min. Os resultados estão expressos em média \pm EPM (erro padrão da média), n=3.

3.4.2. Atividade da Catalase

Os efeitos do EHNC sobre a atividade da Catalase em eritrócitos humanos submetidos a diferentes concentrações e tempos de tratamento estão apresentados na Figura 5. O EHNC foi capaz de elevar a atividade da enzima catalase nas concentrações de 12,5 e 25 $\mu\text{g/mL}$ aos 30 minutos de tratamento em todas as concentrações avaliadas (12,5-100 $\mu\text{g/mL}$) aos 120 minutos quando comparado com o grupo controle veículo (sem a influência do extrato). Porém em 180 minutos, demonstrou diminuição da atividade da catalase nas concentrações de 12,5 – 75 $\mu\text{g/mL}$.

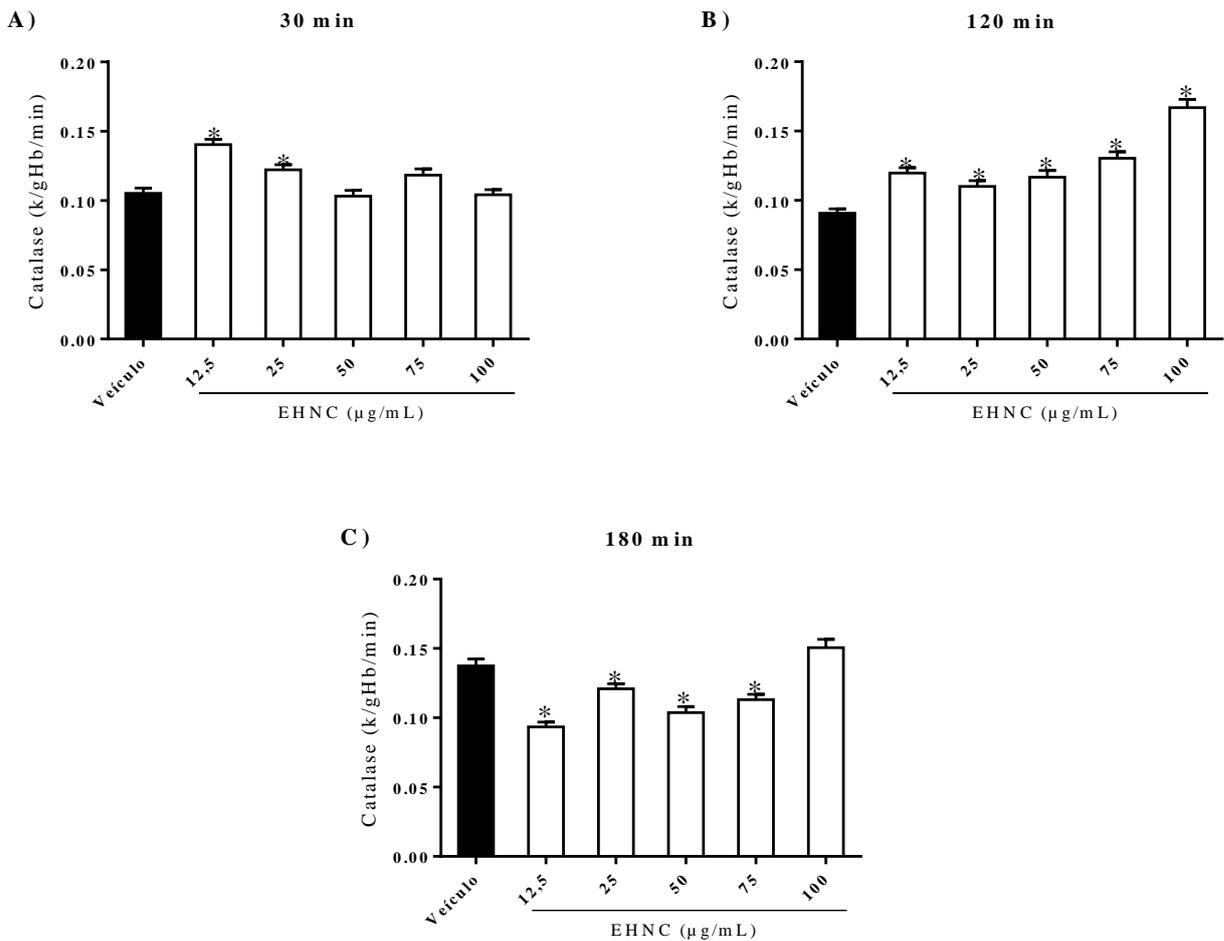


Figura 5: Atividade da enzima catalase em eritrócitos sobre diferentes concentrações em $\mu\text{g/mL}$ do extrato de *N. cuspidata* comparado ao grupo veículo sem tratamento. (A) Eritrócitos incubados por 30 min, (B) 120 min e (C) 180 min. Os resultados estão expressos em média \pm EPM (erro padrão da média), $n=3$. * Representa resultados estatisticamente significativos ($P < 0.05$) quando o grupo tratado foi comparado com o grupo veículo (eritrócitos incubados apenas com a concentração de solvente em sua maior concentração).

3.5. Atividade Citotóxica

Como resultados preliminares, o EHNC foi capaz de reduzir a viabilidade de células leucêmicas em 53,41% para a linhagem celular CCRF-CEM e 55,71% linhagem Kasumi-1 na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$. O IC_{50} foi de 168,05 $\mu\text{g/mL}$ para CCRF-CEM e 176,78 $\mu\text{g/mL}$ para a Kassumi-1.

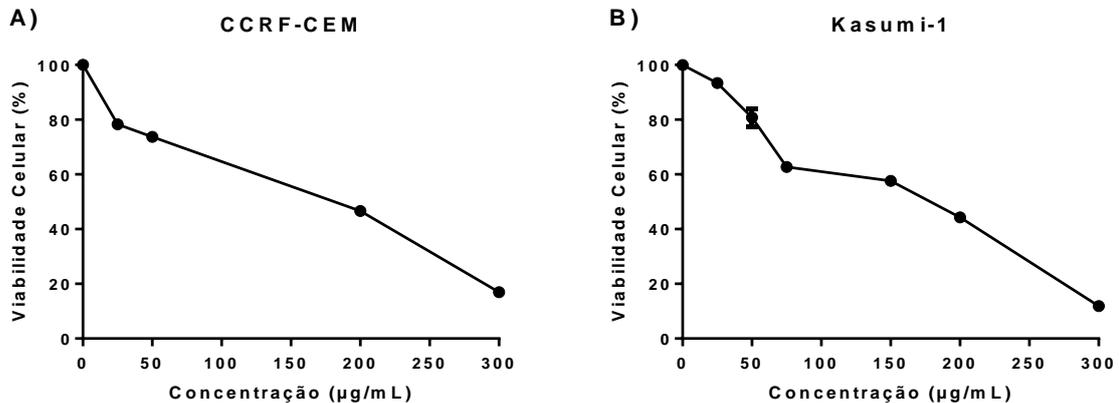


Figura 6: Atividade citotóxica do EHNC. (A) Células de leucemia linfocítica aguda (CCRF-CEM) e (B) células de leucemia mielóide aguda (Kassumi-1) em curva de dose-resposta (25-300 $\mu\text{g/mL}$).

4. DISCUSSÃO

A fitoterapia vem sendo utilizada a décadas para o tratamento e prevenção de diversas doenças, tendo em vista seus baixos custo e eficácia comprovados. Estudos químicos e farmacológicos têm demonstrado cada vez mais a eficiência das plantas medicinais, utilizadas com alternativas terapêuticas [19]. Dentre as plantas medicinais, espécies do gênero *Nectandra* apresentam ação antioxidante, relacionada a sua composição química presente, possuindo moléculas como alcaloides e sesquiterpenos [13].

Pela primeira vez, foi demonstrado o potencial antioxidante do extrato hidroetanólico da casca de *Nectandra cuspidata* Nees (EHNC). Essa atividade pode ser atribuída ao conteúdo de compostos fenólicos, tendo em vista que estes são a principal classe de metabólitos secundários, diferentes estudos relacionam a atividade antioxidante com o conteúdo de compostos fenólicos, incluindo plantas da família Lauraceae [20–22].

O EHNC demonstrou ser capaz de capturar os radicais livres DPPH e ABTS. Neste estudo, a capacidade de antioxidante de captura dos radicais livres DPPH do EHNC obteve resultado de IC_{50} inferior a um estudo feito por FERREIRA et al. [22] com o extrato

hidroetanólico da folha de *N. cuspidata*, demonstrando assim que tanto na casca quanto na folha possuem compostos que possuem atividade antioxidante.

O EHNC foi eficaz em proteger eritrócitos humanos contra a peroxidação lipídica da membrana induzida pela ação do radical peroxil gerado pelo agente oxidante AAPH. A proteção contra a peroxidação lipídica pode ser atribuído a capacidade de captura direta dos radicais peroxil pelo EHNC pelos compostos antioxidantes, evitando assim a hemólise decorrente da oxidação dos lipídeos presente na membrana celular [23].

A capacidade de modular mecanismos de defesa antioxidante pode prevenir o acúmulo de espécies reativas de oxigênio e o estresse oxidativo. A manutenção do balanço das espécies reativas de oxigênio necessita da ação de enzimas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT). Essas enzimas atuam como a primeira linha de defesa, reduzindo no organismo os efeitos deletérios das espécies oxidantes [10].

Neste contexto, o EHNC, extrato que possui compostos fenólicos, demonstrou neste estudo utilizando como modelo eritrócitos humanos a capacidade de modulação de antioxidantes endógenos pela elevação da atividade da catalase. Compostos fenólicos são moléculas que apresentam atividade antioxidante e reduzem o efeito deletério das espécies reativas. Esses resultados estão de acordo com os descritos por SANTOS et al. [5] e CASAGRANDE et al.[24], tendo em vista que, os estudos com extratos de plantas provenientes do Cerrado Brasileiro, ricos em compostos fenólicos, são capazes de modular a ação de enzimas antioxidantes endógenas em eritrócitos humanos, como por exemplo, ativação da enzima catalase. Entretanto, neste estudo, o EHNC não promoveu alteração na atividade de SOD em comparação ao controle.

O EHNC apresentou ação citotóxica contra as linhagens celulares CCFR-CEM e Kasumi-1. A atividade citotóxica do EHNC pode estar relacionada com a presença de compostos fenólicos em sua composição, tendo em vista que estudos com compostos isolados são capazes de reduzir a viabilidade celular da linhagem celular CCRF-CEM e outras linhagens cancerígenas [25, 26].

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que o EHNC apresenta compostos fenólicos e flavonoides, os quais podem estar relacionados as atividades biológicas, incluindo a sua atividade antioxidante e citotóxica. Em conjunto, esses resultados abrem novas perspectivas de estudos para utilização das cascas de *Nectandra cuspidata* como um produto natural seguro e com propriedades antioxidantes.

6. REFERENCIAS

- [1] R. J. Marquis, *The cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna*. Columbia University Press, 2002.
- [2] C. a. Klink, C. a. Klink, R. B. Machado, and R. B. Machado, “A conservação do Cerrado brasileiro,” *Megadiversidade*, vol. 1, no. 1, pp. 147–155, 2005.
- [3] V. F. Veiga, A. C. Pinto, and M. A. M. Maciel, “Plantas medicinais: Cura segura?,” *Quimica Nova*, vol. 28, no. 3. pp. 519–528, 2005.
- [4] S. H. Nile, A. S. Nile, and Y.-S. Keum, “Total phenolics, antioxidant, antitumor, and enzyme inhibitory activity of Indian medicinal and aromatic plants extracted with different extraction methods,” *3 Biotech*, vol. 7, no. 1, p. 76, 2017.
- [5] J. F. Campos, D. T. H. De Castro, M. J. Damiaão, et al., “The Chemical Profile of *Senna velutina* Leaves and Their Antioxidant and Cytotoxic Effects,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2016, 2016.
- [6] U. P. Santos, J. F. Campos, H. F. V. Torquato, et al., “Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties as well as the phenolic content of the extract from *Hancornia speciosa gomes*,” *PLoS ONE*, vol. 11, no. 12, pp. 1–19, 2016.
- [7] I. B. Slimen, T. Najar, A. Ghram, et al., “Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review,” *International Journal of Hyperthermia*, vol. 30, no. 7. pp. 513–523, 2014.
- [8] A. M. Pisoschi and A. Pop, “The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review,” *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 97, pp. 55–74, 2015.

- [9] V. Lubrano, “Enzymatic antioxidant system in vascular inflammation and coronary artery disease,” *World Journal of Experimental Medicine*, vol. 5, no. 4, p. 218, 2015.
- [10] G. G. Cotiguiba, J. R. do N. Silva, R. R. de S. Azevedo, T. J. M. Rocha, and A. F. Santos, “Methods of the Antioxidant Defense : A Literature Review,” *Journal of Health Sciences*, vol. 15, no. 3, pp. 231–238, 2013.
- [11] S. O. Santos and M. Alves, “Sinopse taxonômica da família Lauraceae na porção norte da Floresta Atlântica brasileira¹,” *Revista Brasileira de Biociências*, vol. 11, no. 1, pp. 14–28, 2013.
- [12] V. Muñoz, M. Sauvain, G. Bourdy, et al., “A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach: Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 69, no. 2, pp. 127–137, 2000.
- [13] A. L. Batista, N. C. Yoshida, F. R. Garcez, and W. S. Garcez, “Chemical constituents from *Nectandra cuspidata* nees - Lauraceae,” *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 61, pp. 229–231, 2015.
- [14] A. Meda, C. E. Lamien, M. Romito, J. Millogo, and O. G. Nacoulma, “Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in *Burkina Fasan* honey, as well as their radical scavenging activity,” *Food Chemistry*, vol. 91, no. 3, pp. 571–577, 2005.
- [15] S. A. Liberio, A. L. A. Pereira, R. P. Dutra, et al., “Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith,” *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 11, no. 1, p. 108, 2011.
- [16] D. Gupta and R. K. Gupta, “Bioprotective properties of *Dragon’s blood* resin: In vitro evaluation of antioxidant activity and antimicrobial activity,” *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 11, no. 1, p. 13, 2011.
- [17] R. Re, N. Pellegrini, a. Proteggente, et al., “Antioxidant Activity Applying an Improved Abts Radical Cation Decolorization Assay,” *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 26, no. 9, pp. 1231–1237, 1999.

- [18] J. F. Campos, U. P. Das Santos, P. D. S. Da Rocha, et al., “Antimicrobial, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Cytotoxic Activities of Propolis from the Stingless Bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jataí),” *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2015, 2015.
- [19] S. C. Argenta, L. C. Argenta, S. R. Giacomelli, and V. S. Cezarotto, “Plantas medicinais: cultura popular versus ciência,” *Revista Eletrônica de Extensão da URI*, vol. 7, no. 1809–1636, pp. 51–60, 2011.
- [20] S. I. Abdelwahab, A. A. Mariod, M. M. E. Taha, et al., “Chemical composition and antioxidant properties of the essential oil of *Cinnamomum altissimum* Kosterm.(Lauraceae),” *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 10, no. 1, pp. 131–135, 2017.
- [21] K. I. Ereifej, H. Feng, T. M. Rababah, et al., “Effect of Extractant and Temperature on Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Selected Spices,” *Food and Nutrition Sciences*, vol. 7, no. 5, pp. 362–370, 2016.
- [22] L. dos A. O. Ferreira, M. M. de Oliveira, F. L. Faleiro, et al., “Antileishmanial and antioxidant potential of fractions and isolated compounds from *Nectandra cuspidata*,” *Natural product research*, pp. 1–4, 2017.
- [23] L. Haider, M. T. Fischer, J. M. Frischer, et al., “Oxidative damage in multiple sclerosis lesions.,” *Brain : a journal of neurology*, vol. 134, no. Pt 7, pp. 1914–24, 2011.
- [24] J. C. Casagrande, L. F. B. Macorini, K. A. Antunes, et al., “Antioxidant and cytotoxic activity of hydroethanolic extract from *Jacaranda decurrens* leaves,” *PLoS ONE*, vol. 9, no. 11, 2014.
- [25] A. V Gadetskaya, G. E. Zhusupova, A. H. Tarawneh, et al., “Therapeutic efficacy of phenolic compounds from Limonium in acute lymphoblastic leukemia,” *Planta Medica*, vol. 81, no. 5, p. PC3, 2015.
- [26] V. Kuete, A. T. Mbaveng, E. C. N. Nono, et al., “Cytotoxicity of seven naturally occurring phenolic compounds towards multi-factorial drug-resistant cancer cells,” *Phytomedicine*, vol. 23, no. 8, pp. 856–863, 2016.

6. ANEXO

6.1. Anexo 1 – Normas da revista - Oxidative Medicine and Cellular Longevity

Author Guidelines

Language editing

Hindawi has partnered with Editage to provide an English-language editing service to authors prior to submission. Authors that wish to use this service will receive a 10% discount on all editing services provided by Editage. To find out more information or get a quote, please [click here](#).

Submission

Manuscripts should be submitted by one of the authors of the manuscript through the online [Manuscript Tracking System](#). Regardless of the source of the word-processing tool, only electronic PDF (.pdf) or Word (.doc, .docx, .rtf) files can be submitted through the MTS. There is no page limit. Only online submissions are accepted to facilitate rapid publication and minimize administrative costs. Submissions by anyone other than one of the authors will not be accepted. The submitting author takes responsibility for the paper during submission and peer review. If for some technical reason submission through the MTS is not possible, the author can contact omcl@hindawi.com for support.

Terms of Submission

Papers must be submitted on the understanding that they have not been published elsewhere and are not currently under consideration by another journal published by Hindawi or any other publisher. The submitting author is responsible for ensuring that the article's publication has been approved by all the other coauthors. It is also the authors' responsibility to ensure that the articles emanating from a particular institution are submitted with the approval of the necessary institution. Only an acknowledgment from the editorial office officially establishes the date of receipt. Further correspondence and proofs will be sent to the author(s) before publication unless otherwise indicated. It is a condition of submission of a paper that the authors permit editing of the paper for readability. All inquiries concerning the publication of accepted papers should be addressed to omcl@hindawi.com.

Peer Review

All manuscripts are subject to peer review and are expected to meet standards of academic excellence. If approved by the editor, submissions will be considered by peer-reviewers, whose identities will remain anonymous to the authors.

Concurrent Submissions

In order to ensure sufficient diversity within the authorship of the journal, authors will be limited to having two manuscripts under review at any point in time. If an author already has two manuscripts under review in the journal, he or she will need to wait until the review process of at least one of these manuscripts is complete before submitting another manuscript for consideration. This policy does not apply to Editorials or other non-peer reviewed manuscript types.

Article Processing Charges

Oxidative Medicine and Cellular Longevity is an open access journal. Open access charges allow publishers to make the published material available for free to all interested online visitors. For more details about the article processing charges of Oxidative Medicine and Cellular Longevity, please visit the [Article Processing Charges](#) information page.

Units of Measurement

Units of measurement should be presented simply and concisely using System International (SI) units.

Title and Authorship Information

The following information should be included

- Paper title
- Full author names
- Full institutional mailing addresses
- Email addresses

Abstract

The manuscript should contain an abstract. The abstract should be self-contained and citation-free and should not exceed 200 words.

Introduction

This section should be succinct, with no subheadings.

Materials and Methods

This part should contain sufficient detail so that all procedures can be repeated. It can be divided into subsections if several methods are described.

Results and Discussion

This section may each be divided by subheadings or may be combined.

Conclusions

This should clearly explain the main conclusions of the work highlighting its importance and relevance.

Acknowledgments

All acknowledgments (if any) should be included at the very end of the paper before the references and may include supporting grants, presentations, and so forth.

References

Authors are responsible for ensuring that the information in each reference is complete and accurate. All references must be numbered consecutively and citations of references in text should be identified using numbers in square brackets (e.g., “as discussed by Smith [9]”; “as discussed elsewhere [9, 10]”). All references should be cited within the text; otherwise, these references will be automatically removed.

Preparation of Figures

Upon submission of an article, authors are supposed to include all figures and tables in the PDF file of the manuscript. Figures and tables should not be submitted in separate files. If the article is accepted, authors will be asked to provide the source files of the figures. Each figure should be supplied in a separate electronic file. All figures should be cited in the paper in a consecutive order. Figures should be supplied in either vector art formats (Illustrator, EPS, WMF, FreeHand, CorelDraw, PowerPoint, Excel, etc.) or bitmap formats (Photoshop, TIFF, GIF, JPEG, etc.). Bitmap images should be of 300 dpi resolution at least unless the resolution is intentionally set to a lower level for scientific reasons. If a bitmap image has labels, the image and labels should be embedded in separate layers.

Preparation of Tables

Tables should be cited consecutively in the text. Every table must have a descriptive title and if numerical measurements are given, the units should be included in the column heading. Vertical rules should not be used.

Proofs

Corrected proofs must be returned to the publisher within 2-3 days of receipt. The publisher will do everything possible to ensure prompt publication. It will therefore be appreciated if the manuscripts and figures conform from the outset to the style of the journal.

Copyright

Open Access authors retain the copyrights of their papers, and all open access articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits

unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided that the original work is properly cited.

The use of general descriptive names, trade names, trademarks, and so forth in this publication, even if not specifically identified, does not imply that these names are not protected by the relevant laws and regulations.

While the advice and information in this journal are believed to be true and accurate on the date of its going to press, neither the authors, the editors, nor the publisher can accept any legal responsibility for any errors or omissions that may be made. The publisher makes no warranty, express or implied, with respect to the material contained herein.

Conflicts of Interest

Conflicts of interest (COIs, also known as ‘competing interests’) occur when issues outside research could be reasonably perceived to affect the neutrality or objectivity of the work or its assessment. For more information, see our publication ethics policy. Authors must declare all potential interests – whether or not they actually had an influence – in a ‘Conflicts of Interest’ section, which should explain why the interest may be a conflict. If there are none, the authors should state “The author(s) declare(s) that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.” Submitting authors are responsible for co-authors declaring their interests. Declared conflicts of interest will be considered by the editor and reviewers and included in the published article.

Authors must declare current or recent funding (including for article processing charges) and other payments, goods or services that might influence the work. All funding, whether a conflict or not, must be declared in the ‘Acknowledgments’. The involvement of anyone other than the authors who 1) has an interest in the outcome of the work; 2) is affiliated to an organization with such an interest; or 3) was employed or paid by a funder, in the commissioning, conception, planning, design, conduct, or analysis of the work, the preparation or editing of the manuscript, or the decision to publish must be declared.

Clinical Study

When publishing clinical studies, Hindawi aims to comply with the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) on trials registration. Therefore, authors are requested to register the clinical trial presented in the manuscript in a public trials registry and include the trial registration number at the end of the abstract. Trials initiated after July 1, 2005 must be registered prospectively before patient recruitment has begun. For trials initiated before July 1, 2005, the trial must be registered before submission.

Ethical Guidelines

In any studies that involve experiments on human or animal subjects, the following ethical guidelines must be observed. For any experiments on humans, all work must be conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (1964). Papers describing experimental work which carries a risk of harm to human subjects must include a statement that the experiment

was conducted with the human subjects' understanding and consent, as well as a statement that the responsible Ethical Committee has approved the experiments. In the case of any animal experiments, the authors must provide a full description of any anesthetic or surgical procedure used, as well as evidence that all possible steps were taken to avoid animal suffering at each stage of the experiment.