

POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE *ERYTHROXYLUM DECIDUUM* A. ST. HIL. IN VITRO E IN VIVO

Antioxidant potential of *erythroxyllum deciduum* A. St. Hil. in vitro and in vivo

Mariana Maraschin da Rocha¹; Ana Cláudia Piovezan Borges²; Jean Carlos Budke²;
Alice Teresa Valduga²; Rogério Luis Cansian²; Albanin Aparecida Mielniczki-Pereira²

¹ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - Universidade Federal de Santa Catarina.

² Programa de Pós-graduação em Ecologia - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões

Data do recebimento: 30/10/2014 - Data do aceite: 12/03/2015

RESUMO: Plantas medicinais são utilizadas para o tratamento de doenças por grande parte da população, sendo importante estudar suas propriedades, no sentido de verificar a segurança de seu uso bem como para descobrir novas moléculas com potencial aplicação na indústria farmacêutica. O gênero *Erythroxyllum* compreende espécies que apresentam metabólitos secundários de interesse medicinal, incluindo *E. deciduum* St. Hil, conhecida como “cocão”. O objetivo desse trabalho foi investigar o potencial antioxidante do extrato metanólico de *E. deciduum*, *in vitro* e *in vivo*. No ensaio *in vitro*, realizado pelo método do DPPH, o extrato apresentou IC₅₀ de 10 µg.mL⁻¹. Para a avaliação *in vivo*, linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (selvagem e mutantes *ctt1Δ*, *ctt1Δsod1Δ*, *sod2Δ* e *sod1Δsod2Δ*) foram pré-tratadas com o extrato e submetidas a estresse induzido por peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O extrato metanólico de *E. deciduum* não foi citotóxico para as linhagens avaliadas, exceto em concentrações acima de 600 µg.mL⁻¹ para a mutante *sod1Δsod2Δ*. Para as células selvagens, o extrato não teve efeito protetor contra o H₂O₂. O extrato aumentou em cerca de 30% a sobrevivência da mutante *ctt1Δ* após o tratamento com H₂O₂, quando usado na concentração de 900 µg.mL⁻¹. Para as demais linhagens mutantes, não foi observada proteção.

Palavras-chave: *E. deciduum*. Cocão. *Saccharomyces cerevisiae*. Planta medicinal. Estresse oxidativo.

ABSTRACT : Medical plants are used to disease treatment by a broad part of population, so it is important to study their properties in the sense of ensure

their security use as well to discovery new molecules with potential application in pharmaceutical industry. The *Erythroxylum* genus covers species that have secondary metabolites of medical interesting, including *E. deciduum* St. Hil, popularly named “cocão”. The objective of this work was investigated the antioxidant potential of methanolic extract from *E. deciduum*, in vitro and in vivo. In the in vitro assay, performed by DPPH method, the extract presented CI_{50} of $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. To the in vivo assays, *Saccharomyces cerevisiae* strains (wild type and *ctt1Δ*, *ctt1Δsod1Δ*, *sod2Δ* e *sod1Δsod2Δ* mutants) were pre-treated with the extract and then subjected to H_2O_2 - induced stress. The methanolic extract of *E. deciduum* was not cytotoxic to the analyzed strains, as exception to the *sod1Δsod2Δ* mutant at concentrations upper $600 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The extract was not able to protect wild type strain against hydrogen peroxide (H_2O_2) stress. The extract increased survival of the *ctt1Δ* mutant about 30% after H_2O_2 treatment, when used at $900 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. To the remaining mutants no protection was observed.

Keywords: *E. deciduum*. Cocão. *Saccharomyces cerevisiae*. Medicinal plant. Oxidative stress.

Introdução

Estima-se que 60 a 70% da população faz o uso de plantas medicinais para tratamento de enfermidades (OMS, 2010) e nos últimos anos, a indústria vem fazendo o uso destas na fabricação de produtos de higiene, cosméticos e nutracêuticos (ABURJAI e NATSHEH, 2003; BERNAL et al., 2011), pois diversos estudos comprovam que compostos presentes nessas plantas são realmente benéficos à saúde e eficazes no tratamento de doenças (JABBAR et al., 2007). Adicionalmente, o estudo de propriedades de extratos de plantas pode ser útil para direcionar a descoberta de novas moléculas a serem utilizados na indústria farmacêutica (BAHMANI et al., 2014).

O gênero *Erythroxylum* compreende cerca de 250 espécies (CRONQUIST, 1981), muitas das quais apresentam metabólitos secundários de interesse como flavonóides e alcalóides, bem como taninos, terpenos e fenilpropanóides, os quais apresentam

atividades antioxidantes, anticancerígenas e atividade anti-inflamatória, dentre outras (NASCIMENTO, 2008). Várias espécies deste gênero apresentam propriedades medicinais, como é o caso da popular coca (*E. coca* e *E. novogranatense*), a qual é objeto de estudo devido à presença de alcalóides em suas folhas e por ser utilizada como anestésico em pequenas cirurgias. Já a espécie *E. campestre* é utilizada como laxante e *E. tortuosum* como adstringente no caso de hemorragias, ambas na forma de infusão (NASCIMENTO, 2008).

A espécie *Erythroxylum deciduum* St. Hil., popularmente conhecida como “cocão”, é uma árvore de grande porte encontrada no Brasil, nos estados do Piauí e Nordeste até o Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul, além de também ocorrer na Argentina e Paraguai (LORENZI, 2002). Os estudos realizados até o momento com *E. deciduum*, indicam que frações metanólicas das folhas da planta possuem atividade antitumoral com elevado potencial citotóxico para linhagens de leucemia cultivadas *in vitro* sem, no entanto, apresentarem citotoxicidade para linha-

gens celulares não tumorais (NASCIMENTO et al., 2013). Por outro lado, já foi descrito que a ingestão de frutos de *E. deciduum* é tóxica para ovinos (COLODEL et al., 2004).

Muitas espécies de plantas produzem substâncias tóxicas capazes de causar danos em seres vivos. Com a diversidade de espécies existentes, o número de plantas potencialmente tóxicas é elevado. Desta forma, qualquer planta, na qual tenham sido isolados compostos com potencial terapêutico, deve ser cuidadosamente estudada para evitar que seu uso indiscriminado resulte em efeitos adversos (PERON et al., 2008).

Considerando a escassez de dados na literatura a respeito da toxicidade e potencial farmacológico de *E. deciduum*, bem como a presença de diferentes compostos com potencial antioxidante nos extratos da planta (NASCIMENTO et al., 2013), é importante que mais pesquisas sejam desenvolvidas com esta espécie no sentido de compreender seus efeitos para os organismos vivos e seus usos potenciais.

Neste sentido, este trabalho teve por objetivo investigar o potencial antioxidante do extrato metanólico de *E. deciduum*, *in vitro* e *in vivo*, utilizando-se, para os ensaios *in vivo*, células do micro-organismo *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*).

Material e Métodos

Coleta e preparação do extrato metanólico de *E. deciduum*

A coleta do material vegetal foi realizada no município de Erechim, RS (27°38'58.88"S, 52°16'12.52"O). A exsiccata foi identificada e depositada no herbário Padre Balduino Rambo da URI Erechim (HPBR) sob número 11.833.

Após coleta, folhas de *E. deciduum* foram desidratadas em estufa com fluxo de ar a

temperatura 30-40°C até atingir peso constante, sendo em seguida moídas em moinho de facas e homogeneizadas. A obtenção do extrato foi realizada pelo método de infusão, sendo utilizados 20 gramas de folhas moídas para 100 mL de metanol, mantidos a 4°C por 24 horas. Posteriormente o extrato foi filtrado em papel filtro Whatman nº 1 e rotavaporado a 45°C para a concentração. Em seguida, o extrato foi liofilizado e armazenado em frasco âmbar a 4°C para posterior análise.

Determinação do potencial antioxidante de *E. deciduum in vitro*

A atividade antioxidante *in vitro* foi investigada pelo método de DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazil) (MIRANDA; FRAGA, 2006). Para isso, a absorvância do radical DPPH foi medida em espectrofotômetro (515 nm), na presença ou ausência de diferentes concentrações do extrato metanólico de *E. deciduum* (entre 1 e 25 µg.mL⁻¹). Como controle, foi utilizado etanol no lugar de extrato e o branco foi montado somente com etanol (sem solução de DPPH). O percentual de captação do radical DPPH foi calculado em termos da porcentagem de atividade antioxidante (AA%), conforme a seguinte fórmula:

$$AA\% = 100 - \left\{ \frac{[(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100]}{Abs_{controle}} \right\}$$

Onde: AA é o percentual de atividade antioxidante.

Utilizando-se os valores de AA obtidos para cada concentração de extrato testada, chegou-se a uma equação da reta gerada por regressão linear, a partir da qual foi calculada a concentração de extrato necessária para capturar 50% do radical livre DPPH (IC₅₀).

A análise de atividade antioxidante *in vitro* não foi realizada com o extrato aquoso de *E. deciduum*, pois o mesmo não foi solú-

vel em etanol (que é o solvente utilizado na análise de DPPH).

Avaliação do potencial antioxidante de *E. decudu* *in vivo*.

As linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas estão descritas na Tabela I. As linhagens foram cultivadas a partir de uma colônia isolada em meio líquido YEL (1% de extrato de levedura, 2% peptona e 2% glicose). Para avaliar a sensibilidade ao extrato metanólico de *E. decudu*, as células (1×10^8 células.mL⁻¹) foram tratadas com duas faixas de concentrações: entre 25 e 150 µg.mL⁻¹ e entre 300 a 900 µg.mL⁻¹. Os tratamentos foram realizados em tampão fosfato salina PBS (3,2 mM Na₂HPO₄, 0,5 mM KH₂PO₄, 1,3 mM KCl, 135 mM NaCl, pH 7,4) durante 90 minutos a temperatura de 30°C. Em seguida foram diluídas, semeadas em YEPD sólido (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% de glicose, 2% ágar bacteriológico) e mantidas em estufa a 30°C por 48 horas para posterior contagem das colônias sobreviventes.

Para verificar a atividade antioxidante de *E. decudu*, as células (1×10^8 células.mL⁻¹) foram pré-tratadas em PBS por 90 minutos a 30°C, com uma concentração não citotóxica do extrato. Em seguida, as células foram lavadas e tratadas com peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 5 mM) em PBS por 60 minutos a 30°C. Para determinar a sobrevivência, as amostras foram diluídas, semeadas em meio YEPD

sólido e incubadas a 30°C por 48 horas antes da contagem das colônias.

Todos os testes foram repetidos pelo menos três vezes e realizados em duplicata para cada dose. Os dados são apresentados como média ± erro padrão (EP) e foram avaliados estatisticamente por ANOVA seguida de teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados

Análise da atividade antioxidante do extrato de *E. decudu* *in vitro*

O teste de DPPH mostrou que o extrato metanólico de *E. decudu* possui atividade antioxidante com comportamento linear na faixa de concentração entre 1 e 25 µg.mL⁻¹ ($R^2 = 0,932$), apresentando um IC₅₀ calculado de 10 µg.mL⁻¹ (Figura 1).

Figura 1 – Atividade antioxidante do extrato metanólico de *E. decudu* obtida pelo teste de DPPH.

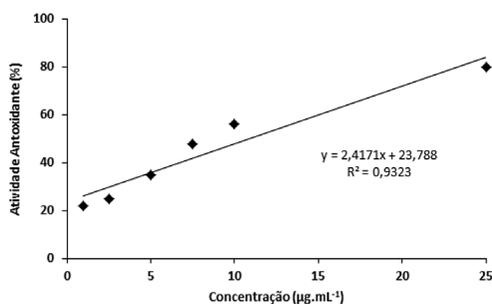


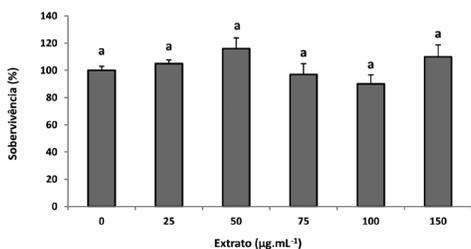
Tabela I - Linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas no estudo.

LINHAGEM	GENÓTIPO	ENZIMA DEFICIENTE
EG103 (Selvagem)	<i>MATa, leu2-3, 112his3-D1, trp1-289, ura3-52.</i>	Nenhuma
EG110 (<i>sod2Δ</i>)	Idem EG103, exceto por <i>sod2::TRP1</i>	MnSOD
EG133 (<i>sod1Δ sod2Δ</i>)	Idem EG103, exceto por <i>sod1::URA3, sod2::TRP1</i>	MnSOD e CuZnSOD
EG223 (<i>ctt1Δ</i>)	Idem EG103, exceto por <i>ctt1::TRP1</i>	Catalase citosólica
EG213 (<i>ctt1Δ sod1Δ</i>)	Idem EG103, exceto por <i>sod1::URA3, ctt1::TRP1</i>	CuZnSOD e catalase

Análise da citotoxicidade e atividade antioxidante do extrato de *E. deciduum* in vivo

Os testes *in vivo* foram realizados com o micro-organismo *S. cerevisiae*, um eucarioto unicelular que possui muitos genes com funções análogas e mecanismos de funcionamento bioquímico similares aos observados nos eucariotos superiores (MUSTACCHI et al., 2006). No teste inicial de citotoxicidade, foi observado que na faixa de concentração entre 25 e 150 µg.mL⁻¹, o extrato metanólico de *E. deciduum* não afeta a sobrevivência de células selvagens de *S. cerevisiae* (Figura 2). Com base nestes dados, a mesma faixa de concentrações foi utilizada para investigação do potencial antioxidante de *E. deciduum* em células tratadas com H₂O₂. O resultado mostrou que o extrato metanólico da planta não teve efeito protetor nas células selvagens expostas ao H₂O₂, não havendo diferenças estatísticas entre os tratamentos na presença ou ausência do mesmo (Figura 3).

Figura 2 - Efeito do extrato metanólico de *E. deciduum* sobre a sobrevivência de células selvagens de *S. cerevisiae*.



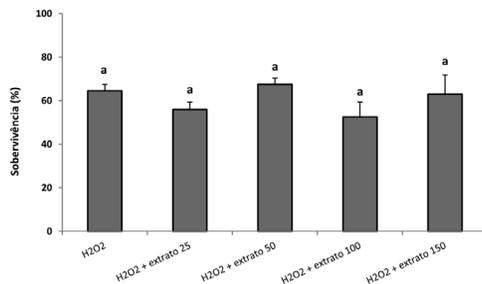
Os dados são apresentados com média ± EP. Não houve diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, conforme analisado por ANOVA seguida de teste de Tukey.

Considerando os resultados negativos em relação ao efeito antioxidante do extrato de *E. deciduum* na linhagem selvagem, foi levantada a hipótese de que o mesmo poderia ser mais efetivo em células deficientes em vias antioxidantes. A partir disso, foi investigado o potencial protetor do extrato em relação ao H₂O₂, utilizando-se linhagens mutantes para

genes codificadores de enzimas antioxidantes (*ctt1Δ*, *ctt1Δsod1Δ*, *sod2Δ* e *sod1Δsod2Δ*). O resultado é apresentado na Figura 4 e demonstra que o extrato metanólico de *E. deciduum* não apresentou atividade protetora significativa em nenhuma das linhagens testadas, mesmo sendo elas naturalmente deficientes para vias antioxidantes.

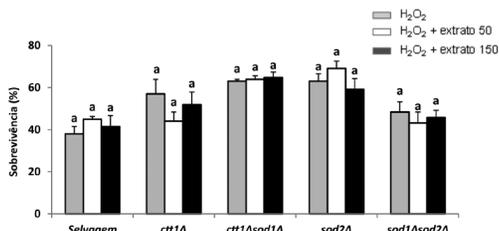
Um novo grupo de experimentos foi realizado utilizando-se uma faixa de concentração maior do extrato metanólico de *E. deciduum*, variando entre 300 e 900 µg.mL⁻¹. Neste caso, foi observado que na dose mais alta testada, o extrato apresentou um efeito protetor em relação ao H₂O₂ na linhagem *ctt1Δ* (Figura 5). Entretanto, para linhagem *sod1Δsod2Δ* houve uma leve tendência de sensibilidade nas concentrações de 600 e 900 µg.mL⁻¹.

Figura 3 - Efeito do extrato metanólico de *E. deciduum* em células selvagens de *S. cerevisiae* tratadas com H₂O₂.



Os dados são apresentados com média ± EP. Não houve diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, conforme analisado por ANOVA seguida de teste de Tukey.

Figura 4 - Efeito do extrato metanólico de *E. deciduum* sobre células deficientes em genes de defesa antioxidante tratadas com H₂O₂.

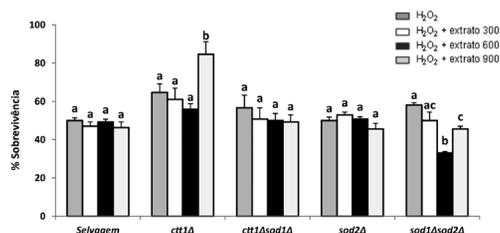


Um controle negativo sem extrato e sem H₂O₂ (não apresentado na figura) foi utilizado como referência para normalização

dos dados e para as comparações estatísticas. Os dados são apresentados com Média ± EP. Não houve diferenças estatísticas significativas comparando-se os diferentes tratamentos dentro de cada linhagem individualmente.

Figura 5 – Efeito de altas concentrações do extrato metanólico de *E. deciduum* sobre células deficientes em genes de defesa antioxidante tratadas com H₂O₂.

Um controle negativo sem extrato e sem H₂O₂ (não



apresentado na figura) foi utilizado como referência para normalização dos dados e para as comparações estatísticas. Os dados são apresentados com média ± EP. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) comparando-se os diferentes tratamentos dentro de cada linhagem individualmente.

Discussão

O gênero *Erythroxyllum* inclui plantas produtoras de metabólitos secundários como flavonoides e alcaloides, que são moléculas com propriedades antioxidantes. Na espécie *E. deciduum* foram identificados os flavonoides 7,4'-dimetoxi-quercentina-3-O-β-D-glicopiranosídeo, em frações do extrato metanólico da planta (NASCIMEN-TO et al., 2013). No presente estudo, foi demonstrado que o extrato metanólico de *E. deciduum* apresenta atividade antioxidante *in vitro*, conforme determinado pelo teste de DPPH, com IC₅₀ de 10 µg.mL⁻¹. Não foram encontrados na literatura trabalhos avaliando atividade antioxidante da espécie *E. deciduum in vitro*. Ricardo et al. (2007) em estudo químico e de avaliação da atividade antioxidante da espécie *E. angustifolium*, realizado através do fracionamento do extrato bruto, obteve IC₅₀ de 22 µg.mL⁻¹ e identificou

o flavonoide quercetina 3-O-raminosídeo. Estes resultados indicam que mais espécies do gênero *Erythroxyllum* possuem potencial antioxidante e que estes podem estar associados com diferentes compostos da classe dos flavonoides.

De forma geral, o extrato metanólico de *E. deciduum* não foi citotóxico para as linhagens de *S. cerevisiae* avaliadas, exceto quanto utilizado em concentrações acima de 600 µg.mL⁻¹ para a duplo mutante *sod1Δsod2Δ*. Nascimento et al. (2013) também verificou que o extrato da planta não é citotóxico para células mieloides não tumorais cultivadas *in vitro*. Entretanto, é conhecido que os frutos de *E. deciduum* podem ser tóxicos para ovinos (COLODEL et al., 2004). Em conjunto, estes dados reforçam a necessidade de se avaliar com cautela plantas que tenham potencial terapêutico. Diferentes partes dos vegetais irão apresentar diferenças em termos de composição química o que, por consequência, pode ter efeito em relação à toxicidade sobre diferentes organismos vivos (RÊGO JÚNIOR et al., 2011).

O extrato metanólico de *E. deciduum* não foi efetivo para proteger as células selvagens de *S. cerevisiae* contra os efeitos oxidativos do H₂O₂ em nenhuma das concentrações testadas. Já na avaliação feita com linhagens de *S. cerevisiae* deficientes em genes de defesa antioxidante, o extrato aumentou em cerca de 30% a sobrevivência da mutante *ctt1Δ* quando usado na concentração de 900 µg.mL⁻¹, que é um valor comparativamente mais alto do que o de IC₅₀ obtido pelo teste de DPPH. Entretanto, devido à natureza complexa dos sistemas biológicos em relação às condições controladas dos experimentos feitos em ambientes sintéticos, esta diferença entre atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* é esperada (BURT et al., 2004).

Em situação de estresse oxidativo, as células de *S. cerevisiae* são capazes de induzir

a expressão de uma série de genes de defesa antioxidante, num mecanismo adaptativo mediado principalmente pelo fator de transcrição Yap1, o qual, em geral, responde à presença de H₂O₂ (OUYANG et al., 2011). A resposta isolada apenas na mutante *ctl1Δ*, possivelmente não está relacionada com este mecanismo de adaptação geral e sim com uma ação direta dos compostos antioxidantes do extrato contra as espécies reativas de oxigênio geradas pelo H₂O₂, que é o substrato da enzima catalase (ausente na linhagem *ctl1Δ*) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Em conjunto, os resultados obtidos neste estudo mostram que apesar da identificação prévia de alcaloides no extrato metanólico de folhas de *E. deciduum* (NASCIMENTO et al., 2008), este não se apresentou como um bom antioxidante para células selvagens de *S. cerevisiae*. Entretanto, em situações de deficiência específica em vias de defesa antioxidante, principalmente naquelas diretamente relacionadas com a desintoxicação de H₂O₂, o extrato pode contribuir para a proteção e melhoria da viabilidade celular.

REFERÊNCIAS

- ABURJAI, T e NATSHEH, F. M. Plants used in cosmetics. **Phytotherapy Research**, v.17, p. 987-1000, 2003.
- BAHMANI, M. et al. A review on most important herbal and synthetic antihelmintic drugs. **Asian Pacific Journal of Topical Medicine**, v. 7, p. 29-33, 2014.
- BERNAL, J. et al. Advanced analysis of nutraceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, p. 758-774, 2011.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.
- COLODEL, E. M. et al. Intoxicação por *Erythroxylum deciduum* (Erythroxylaceae) em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, p. 165-168, 2004.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. Columbia University. New York, 1262p, 1981.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in biology and medicine**. 4ª Edição. Oxford University Press Inc. New York. 2007.
- JABBAR, A. et al. Anthelmintic activity of *Chenopodium album* (L) and *Caesalpinia crista* (L) against trichostrongylid nematodes of sheep. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 86-91, 2007.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 4.ed. São Paulo. Nova Odessa, 2002.
- MIRANDA, A. L. P.; FRAGA, C. A. M. Atividade Seqüestradora de Radical Livre Determinação do Potencial Antioxidante de Substâncias Bioativas. In: MONGE, A.; GANELLIN, C. R. (ed.) **Practical Studies for Medicinal Chemistry**, IUPAC, 2006.
- MUSTACCHI, R.; HOHMANN, S.; NIELSEN, J. Yeast systems biology to unravel the network of life. **Yeast**, v. 23, n. 3, p. 227-238, 2006.
- NASCIMENTO, G. C. **Estudo fitoquímico da atividade antitumoral e citotoxicidade in vitro de *Erythroxylum deciduum* (Erythroxylaceae)**. 2008. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares), UnUCET-Universidade Estadual de Goiás, Goiás, 2008.

NASCIMENTO, G. C.; MENEZES, A. C. S.; LACERDA, E.P. Estudo Fitoquímico e Avaliação da Atividade Antitumoral e Citotoxicidade in vitro de *Erythroxylum deciduum* (Erythroxylaceae). **Revista Processos Químicos**, v. 10, p. 44-55, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Monographs on Medicinal Plants Commonly Used in the Newly Independent States** (NIS), 2010.

OUYANG, X. et al. Yap1 activation by H₂O₂ or thiol-reactive chemicals elicits distinct adaptative gene responses. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 50, p. 1-13, 2011.

PERON, A. P. et al. Avaliação mutagênica das plantas medicinais *Baccharis trimera* Less. e *Solanum melongena* L. em células de medula óssea de ratos Wistar. **Revista Brasileira de Biociências**, v.6, p.127-130, 2008.

RÊGO JÚNIOR, N. O. et al. Compostos bioativos e atividade antioxidante de extratos brutos de espécies vegetais da caatinga. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, p. 50-57, 2011.

RICARDO, L. L et al. Estudo químico e avaliação da atividade antioxidante da planta *Erythroxylum angustifolium*. **Anais do XVI EAIC**, 2007.