

## ACÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DOS FRUTOS DE *Schinus terebenthifolius* RADDI NA INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS HUMANOS

Borges I.J.C.<sup>1</sup>, Bernardes N.R.<sup>2</sup>, Muzitano M.F.<sup>3</sup>, Oliveira D.B.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>UENF/Laboratório de Tecnologia de Alimentos, isabelaf.borges@gmail.com

<sup>2</sup>UENF/Laboratório de Tecnologia de Alimentos, nataliabernardes@uenf.br

<sup>3</sup>UFRJ/Laboratório de Farmácia, mfmuzitano@yahoo.com.br

<sup>4</sup>UENF/Laboratório de Tecnologia de Alimentos, dbarrosoliveira@uenf.br

**Resumo:** *Schinus terebenthifolius* Raddi (aroeira) é uma espécie nativa da flora brasileira e conhecida por possuir propriedades medicinais como adstringente, antidiarréica e anti-inflamatória. Esse projeto é dividido nas partes, química e biológica. Na parte química foi realizado o preparo e análise do extrato bruto e também o isolamento e identificação dos pigmentos contidos no extrato, esta identificação foi realizada por CLAE. Na parte biológica esses extratos e frações foram testados em linfócitos humanos. Este trabalho possui como objetivo avaliar a inibição de processos inflamatórios crônicos através da modulação da proliferação de linfócitos utilizando o extrato preparado a partir dos frutos de aroeira. Os extratos e frações foram testados em três concentrações 500, 100 e 20 µg/mL, o que pôde ser observado foi que nas maiores concentrações houve significativamente uma maior inibição da proliferação dos linfócitos humanos. Esses resultados juntos aos anteriores obtidos pela nossa equipe sobre a capacidade de inibição da produção de mediadores inflamatórios por macrófagos vem sugerir que esses extratos e frações dos frutos da aroeira possuem um alto potencial anti-inflamatório.

**Palavras-chave:** *Schinus terebenthifolius*, aroeira, inflamação e linfoproliferação.

**Área do Conhecimento:** Produtos Naturais e Imunologia.

### Introdução

Os frutos da aroeira (*Schinus terebenthifolius* Raddi) possuem propriedades medicinais, como adstringente, antidiarréica, diurética, febrífuga e anti-inflamatória (Degáspari *et al.*, 2004). Relacionadas aos frutos, poucos trabalhos vêm sendo produzidos. O objetivo deste trabalho é avaliar a atividade imunomoduladora do extrato, frações e flavonóides dos frutos de *S. terebenthifolius* na inibição da linfoproliferação *in vitro* utilizando cultura de linfócitos humanos. Esse trabalho vem complementar os resultados anteriores da nossa equipe que mostraram que os extratos e frações de *S. terebenthifolius* são capazes de inibir a

produção de óxido nítrico em cultura de macrófagos (Bernardes, 2010). É a primeira vez que a ação na inibição da proliferação de linfócitos é estudada para uma espécie do gênero *Schinus*.

### Metodologia

Os frutos foram coletados em Farol de São Tomé (Campos dos Goytacazes-RJ (Latitude = 21° 44' Sul; = 41° 18'. Oeste = altitude 12 m do nível do mar). Os frutos foram limpos e separados das cascas, e da semente. Essas cascas foram submetidos a uma extração metanólica exaustiva.

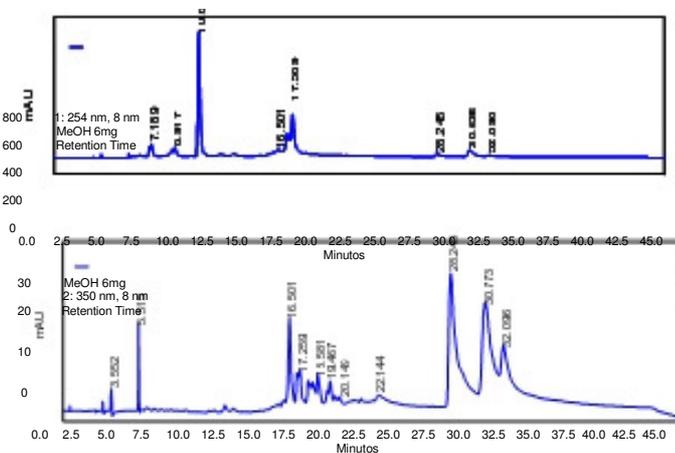
O extrato foi inicialmente analisado por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), e posteriormente por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), a fim de avaliar e estabelecer o perfil químico do extrato. Inicialmente o extrato bruto foi semipurificado através da filtração sobre sílica gel com solventes de polaridade crescente (metanol e água). O extrato semipuro ativo foi fracionado empregando a Cromatografia em Coluna (CC) e, seu perfil químico analisado por CLAE.

Com relação à parte biológica, foi verificada a inibição da proliferação de linfócitos a partir do extrato e conjuntos purificados a partir da Cromatografia em Coluna. Os linfócitos humanos foram isolados por gradiente de ficoll a partir de sangue total e plaqueados na concentração de  $2,0 \times 10^6$  células/mL. As células foram estimuladas com  $5 \mu\text{g/ml}$  de PHA - fitohemaglutinina (mitógeno) e cultivadas em RPMI + SFB por 5 dias em  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$  na presença ou ausência do extrato e conjuntos. A proliferação foi avaliada através do método colorimétrico utilizando o sal de tetrazol, MTT. A ciclosporina A, agente imunossupressor comercial, foi utilizada como fármaco controle.

## Resultados

O extrato metanólico foi submetido a análise por CLAE-DAD para o conhecimento acerca do seu perfil químico. A Figura 1 mostra o cromatograma do extrato metanólico em dois comprimentos de onda 254 e 350 nm.

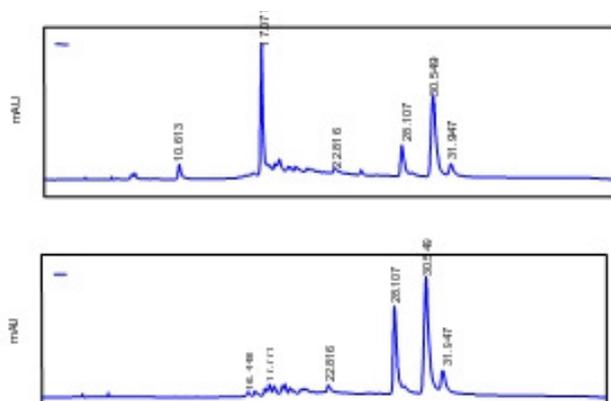
Os picos que aparecem entre 22 e 33 min apresentaram espectro de UV característico para flavonóides.



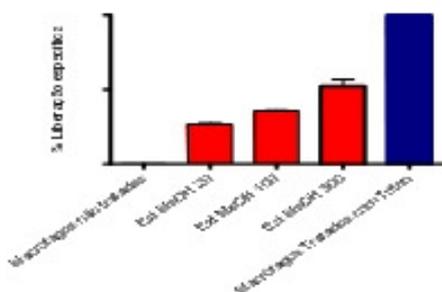
**Figura 1: Perfil químico do extrato metanólico por CLAE (gradiente  $\text{H}_2\text{O}/\text{H}_3\text{PO}_4$  - MeOH, coluna RP-18).**

Após o primeiro fracionamento do extrato em coluna cromatográfica aberta em fase inversa RP-2, obteve-se dois conjuntos em que as frações foram unidas de acordo com o perfil cromatográfico observado por CCD. A análise por CLAE dos dois conjuntos oriundos do extrato metanólico é mostrado na Figura 2.

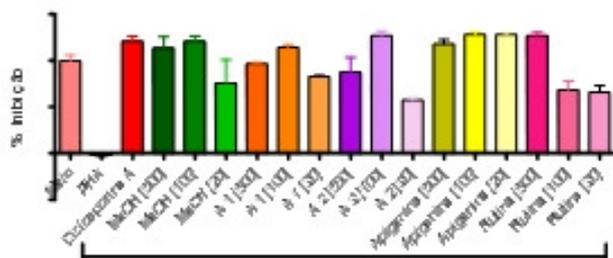
A Figura 3 mostra a atividade dessas amostras da aroeira frente a proliferação de linfócitos humanos induzida por PHA. A ciclosporina A na concentração de  $20 \mu\text{g/mL}$  foi utilizada como fármaco controle.



**Figura 2: Perfil químico do conjunto A1.**



**Figura 3:** Gráfico da porcentagem de inibição de linfócitos humanos, sob ação dos extratos e frações da aroeira (concentrações das amostras em g/mL). Concentração da ciclosporina A 20 g/mL. n=3, média desvio padrão.



**Figura 4:** Percentual de liberação de LDH. Controle 0% de liberação: cultura sem adição de amostras. Controle 100% de liberação; cultura tratada com Triton. n=3, média desvio padrão.

## Discussão

A análise por CLAE do extrato e frações da aroeira nos mostrou as características das substâncias presentes e nos permitiu correlacionar a composição química das mesmas com sua atividade biológica. Quando comparado os dois conjuntos resultantes do primeiro fracionamento pode-se notar que no conjunto A1 (Figura 2) encontra-se o pico

majoritário do extrato metanólico, com Tr em 10,067 minutos. O conjunto A2 (Figura 3), observa-se a presença de um pico pronunciado com Tr de 17,077 minutos, e a presença de picos que correspondem a flavonóides nos Tr de 28,107 a 31.947 minutos. A comparação dos picos presentes em A2 com padrões de flavonóides permitiu a identificação dos flavonóides apigenina (Tr 22.6 min) e rutina (Tr16.4 min). Esses flavonóides foram identificados por CLAE com a utilização de padrões.

Imunopatologias, como os processos auto-imunes e doenças alérgicas possuem elevada incidência no mundo e também no Brasil. Os medicamentos disponíveis atualmente, embora eficientes na maioria dos casos, causam efeitos colaterais indesejáveis, resultando em complicações ao paciente, especialmente após uso prolongado (Rang *et al.*, 2007). A busca por novas moléculas bioativas em plantas é de grande interesse, considerando a necessidade de obter medicamentos mais eficazes e com menores efeitos colaterais.

O processo inflamatório compreende basicamente dois mecanismos de defesa: uma resposta inespecífica e uma resposta imunológica específica, na qual há produção de anticorpos contra um determinado agente agressor. Na resposta específica estão envolvidas células efetoras onde destacam-se os linfócitos B e T. Os linfócitos T exercem um papel crucial na ampliação e na manutenção dos eventos inflamatórios, através da produção e modulação da produção de citocinas (Abbas *et al.*, 2008). Na resposta inflamatória crônica a inibição de linfócitos T é essencial e exerce efeito importante para a restauração do para um bom funcionamento do organismo (Gao *et al.*, 2004), e na inflamação aguda, as primeiras células de defesa são os macrófagos e neutrófilos que produzem radicais livres como primeira linha de defesa contra bactérias e demais partículas estranhas ao organismo.

Observa-se no gráfico 4 a inibição da proliferação dos linfócitos humanos sob ação do extrato e frações de aroeira, onde é possível observar que nas maiores concentrações do extrato e das frações houve significativamente uma maior inibição da proliferação dos linfócitos humanos. Esta inibição foi mantida mesmo em menores concentrações para a maioria das amostras testadas. Este efeito é seletivo tendo em vista que essas amostras mostraram-se tóxicas apenas na maior concentração. Esse efeito tóxico foi avaliado através da dosagem da enzima citoplasmática LDH no sobrenadante da cultura de linfócitos (Figura 5). Dessa forma comprovando um efeito anti-mitogênico para essas amostras. Dados da literatura mostram que os flavonóides contendo dupla ligação em C-2,3 apresentam maior atividade supressiva na proliferação de linfócitos. Essa característica está presente nos dois flavonóides estudados apigenina e rutina. De acordo com nossos resultados a glicosilação dos flavonóides reduz essa bioatividade. Essa influência da glicosilação na atividade imunossupressora de linfócitos foi também reportada por outros autores. A capacidade da apigenina em inibir a proliferação de linfócitos humanos mostrou ser reversível quando avaliada em cultura de linfócitos murinos (Lee et al., 1995).

### Conclusão

Os resultados obtidos permitiram verificar que o extrato, frações e flavonóides presentes nos frutos da aroeira (*S. terebenthifolius*), são capazes de inibir a proliferação de linfócitos humanos *in vitro* estimulados por mitógeno, neste caso específico PHA. Esse trabalho vem complementar os resultados anteriores da nossa equipe que mostraram que os extratos e frações de *S. terebenthifolius* são capazes de inibir a produção de óxido nítrico em cultura de macrófagos. As propriedades imunomoduladoras do extrato, frações e

substâncias da aroeira pode justificar o seu uso popular como planta anti-inflamatória e ressaltar suas propriedades de alimento funcional. É a primeira vez que a ação supressora da proliferação de linfócitos é descrita para uma espécie do gênero *Schinus*.

### Referências

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. (Trad. Farias, A. S.); **Imunologia Celular e Molecular**, 6ª ed., Elsevier: Rio de Janeiro, 2008.
- BERNARDES, N.R. Estudo da Composição Química e dos Efeitos Imunofarmacológicos do Extrato dos Frutos da Aroeira (*Schinus terebenthifolius* Raddi). **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. 108 páginas. 2010.
- DEGÁSPARI, C.H. Propriedades antioxidantes e antimicrobianas dos frutos da aroeira (*Schinus terebenthifolius* Raddi). **Tese de doutorado**, Universidade Federal do Paraná. 104 páginas, 2004.
- LEE S.J., CHOI J.H., SON K.H., CHANG H.W., KANG S.S., KIM H.P. Suppression of mouse lymphocyte proliferation *in vitro* by naturally-occurring biflavonoids. **Life Sci** 57: 551-558, 1995.
- Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Flower, R.J. (Trad. Do Nascimento, A. P.); **Farmacologia**, 6ª ed., Elsevier: Rio de Janeiro, 2007.