

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS.
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO.
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA.
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA.

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES E ANTIINFLAMATÓRIA IN
VITRO DE UM EXTRATO DAS CASCAS DO CAULE DE *BERTHOLLETIA*
EXCELSA (HUMB. & BONPL.).

Bolsista: Ivanildo Vieira Pereira Filho, CNPQ.

MANAUS
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS.
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO.
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA.
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA.

RELATÓRIO FINAL
PIB-S/0115/2014
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES E ANTIINFLAMATÓRIA IN
VITRO DE UM EXTRATO DAS CASCAS DO CAULE DE *BERTHOLLETIA*
EXCELSA (HUMB. & BONPL.).

Bolsista: Ivanildo Vieira Pereira Filho, CNPQ.
Orientador: Profº Dr. Emerson Silva Lima.

MANAUS
2015

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, a Faculdade de Ciências Farmacêuticas e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida pelo Laboratório de Atividade Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

RESUMO

Bertholletia excelsa ou Castanheira-do-Brasil, pertencente à família Lecythidaceae, é uma árvore com distribuição desigual no ecossistema amazônico e com grande importância econômica para a região. Estudos apontam que a *Bertholletia excelsa* é um antioxidante em potencial por conter alto teor de fenóis. O referido trabalho teve como objetivo a caracterização da atividade antioxidante e anti-inflamatória *in vitro* do extrato seco da casca do caule da *Bertholletia excelsa*. Para a avaliação do potencial antioxidante da *Bertholletia excelsa* utilizou-se de testes preliminares como o DPPH, ABTS•+, Fenóis e Flavonoides Totais. Após a obtenção dos resultados preliminares, procedeu-se com o teste de viabilidade celular e posteriormente o ensaio de antioxidante celular e determinação de nitrito para a caracterização da atividade anti-inflamatória no modelo de macrófago ativado por lipopolissacarídeo. No teste de DPPH o extrato demonstrou atividade antioxidante alta, com $CI_{50} 7.67 \pm 0.11 \mu\text{g/mL}$, sendo o mesmo confirmado pelo ensaio de ABTS•+. Enquanto os testes Fenóis e Flavonoides totais demonstram resultados de $33,58\% \pm 0,25$ e $32,16216\% \pm 2,08$ de teor, respectivamente. Com o ensaio de viabilidade celular, notou-se que na concentração de $25\mu\text{g/mL}$ o extrato não produziu letalidade significativa. Já a atividade antioxidante celular o extrato de *Bertholletia excelsa* na concentração de $50\mu\text{g/mL}$ conseguiu inibir a oxidação em 49,77%. No ensaio da atividade anti-inflamatória houve inibição da produção de óxido nítrico, sinalizando efeito anti-inflamatório. Com tais resultados, conclui-se que o extrato do caule de *Bertholletia excelsa* é um bom antioxidante devido a sua alta concentração de compostos fenólicos, apresentando também propriedades anti-inflamatórias.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	6
2. OBJETIVOS.....	7
2.1. Objetivo Geral	7
2.2. Objetivos Específicos	7
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	7
3.1. Radicais livres, estresse oxidativo e defesas antioxidantes	7
3.2. Radicais livres e inflamação	8
3.3. <i>Bertholletia excelsa</i> (Humb. & Bonpl.) como potencial antioxidante	9
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
4.1. Matéria-prima	9
4.2. Preparação do extrato seco	9
4.3. Determinação do potencial antioxidante	9
4.3.1. Ensaio de DPPH	9
4.3.2. Teor de Fenólicos Totais	10
4.3.3. Teor de Flavonoides Totais	10
4.3.4. Atividade Antioxidante celular	10
4.4. Ensaio de viabilidade celular	11
4.5. Atividade Anti-inflamatória in vitro	11
4.6. Atividade inibitória sobre ativação por macrófagos	11
4.7. Determinação de nitrito	12
5. RESULTADOS.....	12
5.1. Determinação de atividade antioxidante pelo método de DPPH	12
5.2. Determinação da atividade antioxidante pela captura do radical ABTS•+	13
5.3. Determinação de Fenóis e Flavonoides Totais	13
5.4. Viabilidade Celular	14
5.5. Atividade Antioxidante Celular	16
5.6. Atividade Anti-inflamatória	17
6. DISCUSSÃO.....	Erro! Indicador não definido.
7. CONCLUSÃO.....	19
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20

1. INTRODUÇÃO.

A Amazônia apresenta-se como um ecossistema com rica biodiversidade com alta valorização econômica (BRAGA et al., 2010). Dentro desse contexto, a Castanheira-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*, Humb. & Bonpl.) destaca-se devido ao seu fruto ser um dos produtos mais conhecidos e estabelecidos no mercado de exportação (SALOMÃO, 2009).

Além da sua importância econômica, a *Bertholletia excelsa* apresenta riqueza em sua composição, tendo um alto teor de selênio e compostos fenólicos (PIRES et al., 2011). O interesse no estudo de compostos fenólicos tem aumentado devido ao fato de essas substâncias estarem se mostrando eficientes captadores de radicais de oxigênio, tornando-se assim potentes antioxidantes (BURATTO et al., 2011).

Os antioxidantes são importantes para o organismo, pois atuam contra os radicais livres, evitando sua formação ou interceptando-os impedindo que os mesmos ataquem lipídeos, aminoácidos de proteínas, dupla ligação dos ácidos graxos poli-insaturados e as bases do DNA, evitando assim a perda de integridade celular (BIANCHI et al., 1999). Além disso, o estresse oxidativo celular por ataque dos radicais livres aos componentes essenciais celulares é um dos mecanismos conhecidos que pode causar algumas patologias inflamatórias (RAMOS et al., 2000).

A terapia de suplementação antioxidante pode atenuar os efeitos de oxidação por radicais livres em pessoas que apresentem quadros graves, porém deve-se atentar que o excesso de antioxidantes pode causar um efeito pró-oxidativo, aumentando a lesão tecidual (LEITE et al., 2003).

Há fortes indícios que a utilização de compostos antioxidantes em tratamentos está associado à longevidade funcional, assim, o conhecimento das fontes de tais substâncias e seu estudo é importante para que os mesmos sejam utilizados de forma segura e consciente, tornando-se assim uma alternativa na promoção de uma vida saudável (PEREIRA et al., 2009).

2. OBJETIVOS.

2.1. Objetivo Geral:

Avaliar as atividades antioxidante e anti-inflamatória in vitro de um extrato das cascas do caule de *Bertholletia excelsa*.

2.2. Objetivos Específicos:

- Avaliar a citotoxicidade do extrato seco das cascas do caule de *Bertholletia excelsa*;
- Conhecer o perfil antioxidante do extrato seco de *Bertholletia Excelsa*;
- Avaliar o efeito anti-inflamatório in vitro do extrato seco de *Bertholletia excelsa*.

3. REFERENCIAL TEÓRICO.

3.1. Radicais livres, estresse oxidativo e defesas antioxidantes.

O oxigênio molecular é essencial para a vida de organismos aeróbios, tendo como função principal a aceitação de elétrons na respiração mitocondrial, sendo finalmente reduzido à água pelo processo de fosforilação oxidativa. A redução completa do oxigênio à água necessita de quatro elétrons, produzindo produtos de redução como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (HO^{\bullet}) que são denominados espécies reativas de oxigênio ou radicais livres (KVIECINSKI, 2007).

Radicais livres são moléculas ou átomos que possuem um ou mais elétrons não pareados, fazendo com que os mesmos sejam substâncias livres muito reativas, altamente instáveis e de meia-vida curta. Tais propriedades tornam a presença dos radicais livres crítica para o organismo (BIANCHI et al., 1999).

A produção de radicais livres se dá pelo processo fisiológico do metabolismo aeróbico ou por células induzidas por fontes exógenas como drogas, toxinas, radiações ionizantes, etc. que contribuem para várias patologias que produzem danos celulares (RAMOS et al., 2000).

Além do oxigênio, o nitrogênio através do óxido nítrico pode ser um dos participantes da estrutura dos radicais livres, entre seus efeitos tóxicos destacam-se a lesão tecidual que é determinante para processos inflamatórios crônicos e na sepse (LEITE et al., 2003).

O estresse oxidativo pode ocorrer devido à excessiva produção oxidante ou pela redução ou esgotamento das defesas antioxidantes. A produção dessas substâncias pode ser benéfica em casos de infecção, onde há produção de radicais livres por células fagocitárias para conter invasão microbiana, ou pode tornar-se prejudicial quando há inflamação sistêmica, no qual ocorre descontrole na produção de radicais livres, podendo causar lesão à distância (LEITE et al., 2003).

Os danos que os radicais livres causam nas células estão relacionados com a gênese de várias patologias, incluindo doenças degenerativas como aterosclerose, problemas pulmonares e cardiopatias. Já as reações dessas substâncias com as

moléculas de DNA atuam no processo de mutagênese e carcinogênese (BIANCHI et al., 1999).

A grande produção de espécies reativas de oxigênio fez com que se criassem vários mecanismos de defesas antioxidantes para impedir danos celulares. Os antioxidantes são substâncias que em pequenas concentrações são capazes de inibir ou atrasar a oxidação do substrato oxidável de maneira eficaz (BIANCHI et al., 1999).

Os mecanismos de defesa antioxidantes enzimáticos são a primeira linha no combate aos danos causados pelo estresse oxidativo. Nesse sistema estão inseridas enzimas como a superóxido dismutase, catalase, glutathione redutase, glutathione peroxidase, peroxirredoxinas, tioredoxinas, entre outras. O mecanismo não-enzimático envolve substâncias adquiridas pela dieta ou sintetizadas pelo organismo como as vitaminas A, C e E, flavonoides e o peptídeo glutathione (CARDOSO et al., 2011).

Além dos mecanismos de defesa antioxidantes enzimáticos, produtos naturais com potencial antioxidante são importantes para atenuar o dano causado por radicais livres, complementando as defesas antioxidantes. Por esse motivo, há um crescente interesse por produtos naturais com propriedades antioxidantes na manutenção da saúde humana e prevenção de doenças (KVIECINSKI, 2007).

3.2. Radicais livres e inflamação.

A inflamação está associada aos danos causados pelos radicais livres que são produzidos pelos neutrófilos quando há exposição a agentes quimiotáticos, ação de macrófagos e imunocomplexos. Pequenas alterações nas quantidades de espécies reativas de oxigênio aumentam a expressão de moléculas de adesão, quimiocinas e citocinas. Porém, grandes alterações na quantidade de espécies reativas de oxigênio podem causar ativação de proteases, dano epitelial e lesão de outros tipos celulares, causando lesão tissular (WIESE, 2008).

A enzima NADPH-oxidase de leucócitos polimorfonucleares contém citocromo b245 que catalisa a redução de O_2 para formar espécies reativas de oxigênio. Células como macrófagos e linfócitos também possuem NADPH-oxidase na membrana. A cascata do ácido araquidônico que dá origem a leucotrienos e prostaglandinas gera radicais livres na síntese de eicosanoides (KVIECINSKI, 2007).

O óxido nítrico é um dos radicais livres envolvidos no processo inflamatório, trata-se de um gás solúvel produzido por células endoteliais, macrófagos e neurônios específicos. Um estímulo inflamatório induz a produção e liberação da enzima NO-sintase por células endoteliais e macrófagos, a consequência disso é a liberação de mais óxido nítrico no organismo. As principais ações desse radical livre se associam ao relaxamento do endotélio e destruição de micro-organismos. O óxido nítrico também possui ações deletérias quando reage com $O_2^{\bullet-}$, levando à produção de peroxinitrito (WIESE, 2008).

Alguns fármacos anti-inflamatórios têm demonstrado potencial antioxidante associado à sua atividade biológica. Dentre esses fármacos pode-se citar o Nimesulida, aminosalicilatos, etc. O estudo da atividade anti-inflamatória de antioxidantes naturais se tornou interessante para a comunidade científica, devido a este fato (KVIECINSKI, 2007).

3.3. *Bertholletia excelsa* (Humb. & Bonpl.) como potencial antioxidante.

A Castanheira-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) foi descrita por Humboldt e Bonpland em 1807, no entanto somente em 1825 Poiteau a integrou à família Lecythidaceae (TONINI et al., 2008). Compreende uma espécie heliófila encontrada em florestas de terra firme com temperatura média de 24°C a 27 °C e umidade relativa do ar acima de 80%. É tida como uma planta social ocorrendo em locais com grande frequência como castanhais, podendo até se associar com outras espécies de grande porte (SOUZA et al., 2008).

A árvore é de alto porte, podendo atingir entre 30m e 60m, com copa de 20m a 40m de diâmetro e tronco retilíneo de 100cm a 180cm de diâmetro. Sua madeira é pesada, com densidade de 0,75 g cm⁻³, sendo macia ao corte e com cerne em coloração castanho-rosa, com superfície sem brilho, lisa ao tato e de boa resistência a organismos xilófagos (SOUZA et al., 2008).

As sementes são disseminadas por roedores, como a cutia que as utilizam como forma de alimentação. Algumas sementes podem ser consumidas de imediato pelo animal, ou serem armazenadas para consumo posterior ou até abandonadas em outras áreas, onde germinam (TONINI et al., 2008).

Resultados propostos por Buratto e Carpes et al. (2011) afirmam que extratos etanólicos de *Bertholletia excelsa* apresentam baixa quantidade de flavonoides e compostos fenólicos, mas sua atividade antioxidante é elevada, sendo esta superior ao antioxidante BHT utilizado em indústrias de alimentos.

Estudos obtidos por Pires e Silva et al. (2011) confirmam a expressiva atividade antioxidante da Castanheira-do-Brasil, porém demonstraram resultados opostos com relação aos compostos fenólicos, afirmando que na *Bertholletia excelsa* há uma quantidade elevada dos mesmos.

Alguns estudos demonstraram que o Selênio, presente na Castanheira, também é capaz de apresentar uma resposta terapêutica alternativa para redução da atividade inflamatória (GONZÁLEZ et.al, 2009).

4. MATERIAL E MÉTODOS.

4.1. Matéria-prima.

Coletaram-se cascas de *Bertholletia excelsa* na Reserva Ducke pelo grupo do Prof. Dr. Anderson Guimaraes da UFAM-ITACOATICARA e as amostras foram limpas, secas e trituradas para a elaboração do extrato. Coletaram-se amostras da planta para identificação botânica junto ao herbário da UFAM.

4.2. Preparação do extrato seco.

Preparou-se um extrato hidroetanólico com a proporção (1:1) com a relação de droga solvente de 5% e deixado sob maceração a frio durante 72h. Após isso, o líquido foi filtrado e seco por nebulização (spray drier) sem adição de adjuvantes.

4.3. Determinação do potencial antioxidante.

4.3.1. Ensaio de DPPH.

Realizou-se este ensaio de acordo com Molyneux (2006) com pequenas modificações que permitiu a utilização de microplacas de 96 poços. Inicialmente, preparou-se a solução de DPPH (0,8 mmol/L). Em seguida foi feita a diluição da solução de forma que sua absorbância aproximou-se de 1.000±0,1. Na microplaca

adicionou-se 30µL do extrato e 270µL da solução de DPPH, em triplicata. No controle utilizou-se o mesmo volume do teste. Em seguida as microplacas foram incubadas em temperatura ambiente na ausência de luz por 30 minutos e então mensurou-se as absorvâncias em um leitor de microplacas (DTX800, Beckman) no comprimento de onda 517nm. Para obtenção da concentração mínima inibitória de 50% dos radicais DPPH (IC50), uma curva de concentração foi feita e a partir dela, gerou-se a equação da reta, sendo os resultados desta equação em µmoles/mL. As soluções do padrão e da amostra estão em oitos concentrações diferentes que irão de 0,781 a 100µg/mL, estas diluições são de 1:1 até a 8º diluição, o último volume foi descartado. O Padrão utilizado nesta determinação foi a Quercetina. Os cálculos de inibição foram feitos mediante a fórmula seguir:

$$\% \text{ Inibição} = 100 \times [1 - (\text{Abs2 amostra} - \text{Abs controle}) / \text{Abs controle}]$$

4.3.2. Teor de Fenólicos Totais.

Quantificou-se a concentração de fenóis totais pelo método descrito por Singleton & Rossi (1965) com algumas modificações. Inicialmente 10µL dos extratos (1mg/mL) mais 50µL da solução Folin-Ciocalteu (1:10) adicionados nas microplacas e foram incubados por 8 minutos, logo após adicionou-se o carbonato de sódio 0,4% e novamente foi incubado por 3 minutos. Em seguida, procedeu-se a mensuração da absorvância em 620 nm. O padrão para teste foi o ácido gálico.

$$\text{Fenóis totais} = (\text{Abs amostra} \times 100) / \text{Abs padrão}$$

4.3.3. Teor de Flavonoides Totais.

A quantificação de flavonoides totais realizou-se mediante o método descrito por Zhishen, Mengcheng, and Jianming (1999) com modificações. Inicialmente adicionou-se 30µL extrato (1mg/mL), 90µL de etanol, 6µL de cloreto de alumínio 10% e 6µL de acetato de potássio nas microplacas. Em seguida as amostras adicionadas foram incubadas por 30 minutos, após a incubação realizou-se a leitura no comprimento de onda 510 nm. O cálculo foi realizado de forma semelhante ao cálculo da quantificação de fenóis totais. O padrão desta quantificação foi a Quercetina.

$$\text{Flavonoides totais} = \text{Abs amostra} \times 100$$

4.3.4. Atividade Antioxidante celular.

A avaliação da atividade antioxidante em células foi avaliada na linhagem de fibroblastos 3T3L1 segundo o método descrito por WOLFE e LIU (2007). Foram cultivados 6 x 10⁴ células por poço em placa de 96 poços. Após 24 horas de incubação em estufa de CO₂ a 37 °C, o meio foi removido, os poços foram lavados com PBS e as células foram tratadas em triplicata com 100 µL de tampão de Hanks contendo 10 µmol de diclorofluoresceína, seguida de incubação por 30 minutos em estufa de CO₂ a 37 °C. Após o período de incubação, a solução foi descartada e as células foram lavadas com PBS. Em seguida, 50 µL de solução contendo diferentes concentrações dos compostos (5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL) foram adicionadas, juntamente com 50 µL de tampão de Hanks e iniciou-se imediatamente as leituras no leitor de microplaca (DTX 800, Beckman) com excitação 485 nm e emissão 535 nm a cada 10 minutos até 60 minutos. Como padrão para o teste utilizou-se a Quercetina nas concentrações de 1; 2,5 e 5 µg/mL. De todas as concentrações de amostras foi subtraído o valor de fluorescência do branco no respectivo tempo. O potencial antioxidante foi expresso em unidades de fluorescência. A concentração inibitória mediana (CI50) foi calculada para o tempo de

60 minutos conforme a formula abaixo, onde ΔF = fluorescência aos 60 minutos – Δ fluorescência aos 0 minutos).

$$\% \text{ inibição} = 100 - (\Delta F \text{ amostra} / \Delta F \text{ controle}) \times 100$$

4.4. Ensaio de viabilidade celular.

Antes de realizar os ensaios em cultura de célula verificou-se a citotoxicidade dos compostos para que fossem determinadas as concentrações não tóxicas a serem testadas nos ensaios subsequentes. A citotoxicidade foi avaliada pelo método de alamar blue segundo NAKAYAMA et al. (1997). Neste ensaio foram utilizados macrófagos da linhagem J774. Os macrófagos foram cultivados na concentração de 5×10^3 células por poço em placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação e aderência das células, as mesmas foram tratadas com o extrato seco nas concentrações de 5, 10, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$. As células foram tratadas em quadruplicata para cada período de tratamento (24, 48 e 72h). Como controle positivo de morte, avaliou-se a citotoxicidade da Doxorrubicina (5 $\mu\text{g/mL}$) e controle negativo somente meio de cultura. Para avaliar a influência do diluente DMSO, realizou-se um controle contendo somente DMSO. Após o período de tratamento (24, 48 e 72 horas) adicionou-se 10 μL de resazurina 0,4% (diluída 1:20). Após o tempo de metabolização da resazurina padronizado, que compreende 2 horas, foi realizada a leitura da fluorescência.

A viabilidade foi calculada conforme a fórmula abaixo, onde F_t = (fluorescência da célula + meio + substância + resazurina) e ΔF_b = (fluorescência da célula + meio + resazurina).

$$\% \text{ viabilidade} = (F_t \times 100) / F_b$$

4.5. Atividade Anti-inflamatória in vitro.

Neste estudo utilizou-se macrófagos da linhagem RAW 264.7. Essa linhagem teve as condições de cultivo adaptadas para o Laboratório de Atividade Biológica II da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Todos os procedimentos envolvendo o cultivo celular realizaram-se em capela de fluxo laminar vertical (VECO). Os macrófagos da linhagem RAW 264.7 são macrófagos murinos transformados pela injeção intraperitoneal do vírus de leucemia Abelson, obtidos da ascite de ratos BALB/c. Estas células possuem receptores para imunoglobulinas e produzem lisozimas. Também são capazes de responder de forma similar aos macrófagos obtidos diretamente de camundongos, além de serem alvos de ativação por polissacarídeos (RAMAMOORTHY; TIZARD, 1998). Os macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram adquiridos do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram mantidas congeladas em nitrogênio líquido, no Laboratório de Atividade Biológica II (BIOPHAR II) da Universidade Federal do Amazonas. As células foram cultivadas em meio essencial mínimo de Eagle (DMEM) (fabricante GIBCO), com baixa glicose, suplementado com soro fetal bovino 10 % (GIBCO), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 U/mL). As células foram incubadas em 5 % CO_2 atmosféricos a 37°C. Após a formação de uma monocamada confluenta, as células foram descoladas das garrafas de cultivo com auxílio de “cell scraper” (TPP) para dispersão das células e ressuspensas em meio DMEM contendo 10 % de SFB e, posteriormente, distribuídas em placas de cultura de células (96 ou 6 orifícios) em uma densidade (n° de células/mL) de acordo com a necessidade de cada ensaio.

4.6. Atividade inibitória sobre ativação por macrófagos.

Macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram plaqueados na densidade 1×10^6 células/mL em placas de 6 poços seguindo-se adesão por 24 h a 37°C , em atmosfera com 5% de CO_2 . Após aderência, o meio foi retirado e adicionado meio de cultivo DMEM suplementado com 10% de SFB com volume de 1000 μL /poço. As células foram estimuladas pela adição de lipopolissacarídeo - LPS (concentração final $1\mu\text{g/mL}$) e tratadas juntamente com o extrato seco nas concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. Para o experimento controle as células foram cultivadas apenas com meio de cultivo DMEM suplementado com 10% de SFB. Em seguida, as células foram incubadas por mais 24 horas a 37°C , 5% de CO_2 , coletou-se o sobrenadante celular e alíquotas foram congeladas (-20°C) para posterior análise das citocinas.

4.7. Determinação de nitrito.

A produção de $\text{NO}\bullet$ foi medida pela dosagem de seus produtos de degradação, nitrito, mais estáveis, utilizando o reagente de Griess. Neste método, o nitrito primeiramente reage com a sulfanilamida em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal de diazônio. Em seguida, este sal reage com N-naftil-etilenodiamina (NED) formando um composto azo estável de coloração púrpura, podendo assim ser quantificado espectrofotometricamente a 550 nm (GREEN et al., 1982).

Para a determinação da produção de $\text{NO}\bullet$, 100 μL do sobrenadante celular submeteu-se a reação com igual volume do reagente de Griess. Para o preparo deste reagente, utilizou-se soluções estoques de cloreto de naftiletlenodiamina (0,1%) dissolvido em H_3PO_4 (5%) e de sulfanilamida a 1% dissolvida em H_3PO_4 (5%). Pouco antes do uso, as soluções foram adicionados na proporção 1:1, formando o reagente de Griess propriamente dito. Após o período de incubação de 10 minutos as amostras foram lidas em leitor de microplacas (DTX 800, Beckman) a 560 nm. O cálculo das concentrações de nitrito realizou-se com base em curvas padrões utilizando diferentes concentrações de NaNO_3 (15 μM até 1000 μM).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinação de atividade antioxidante pelo método de DPPH.

Com o intuito de se avaliar a atividade antioxidante do extrato de *Bertholletia excelsa*, utilizou-se o método do DPPH em várias diluições. OS resultados são obtidos pelo potencial de redução do extrato com relação ao DPPH e expressos em porcentagem de inibição.

A Figura 1 compara os resultados do extrato de *Bertholletia excelsa* com o padrão utilizado, Quercetina.

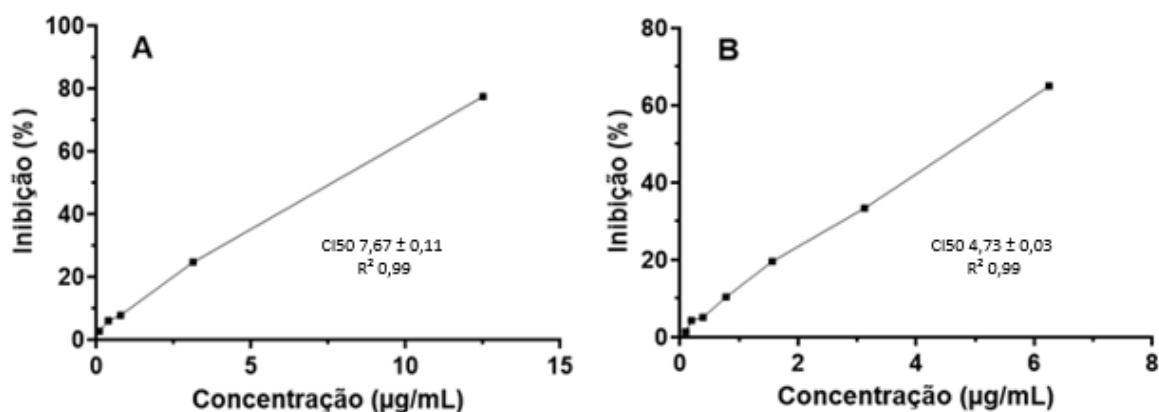


Figura 1: O gráfico A apresenta a curva com as diluições do extrato de *Bertholletia excelsa*, enquanto o gráfico B representa a curva do padrão Quercetina no método de DPPH.

O teste de DPPH demonstra que o extrato da casca do caule de *Bertholletia excelsa* é um bom antioxidante, obtendo valor de concentração inibitória (CI50) baixo e aproximado a Quercetina.

5.2. Determinação da atividade antioxidante pela captura do radical ABTS•+.

Para confirmar-se o potencial antioxidante do extrato de *Bertholletia excelsa* utilizou-se o método da captura do radical ABTS•+. Tal ensaio é baseado na capacidade dos antioxidantes capturarem o cátion ABTS•+, produzindo assim decréscimo na absorbância.

A Figura 2 apresenta os dados de porcentagem de inibição das diluições do extrato de *Bertholletia excelsa* em comparação com a Quercetina.

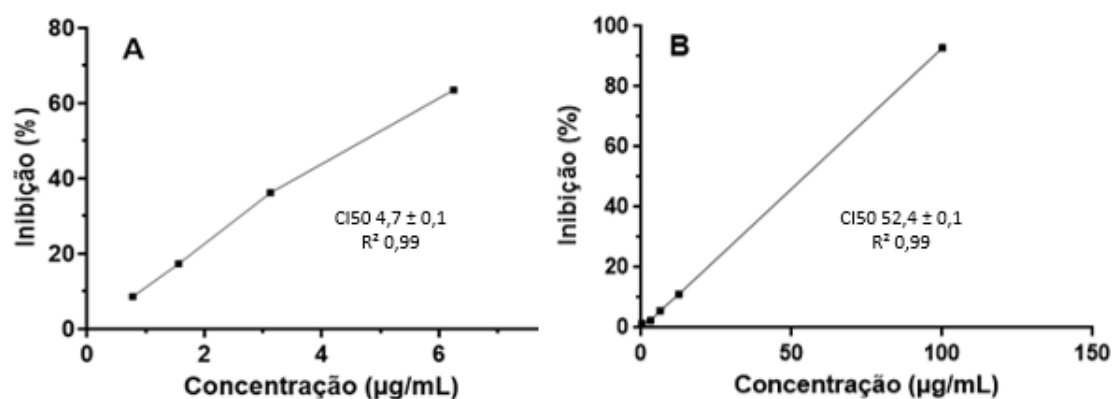


Figura 2: Comparação entre as curvas pelo método do Radical de ABTS•+, onde o Gráfico A representa as diluições de *Bertholletia excelsa* e o gráfico B as diluições de Quercetina.

O método do Radical ABTS•+ confirma a condição do extrato de *Bertholletia excelsa* como antioxidante. Observa-se que neste teste o extrato demonstrou-se superior a Quercetina, padrão utilizado, apresentando CI50 mais baixo.

5.3. Determinação de Fenóis e Flavonoides Totais.

Compostos fenólicos são substâncias responsáveis pelo potencial antioxidante em várias espécies de plantas. Para que essas substâncias sejam consideradas antioxidantes ao exercer seu papel biológico, é necessário que as mesmas, mesmo em baixas concentrações, consigam impedir, prevenir ou retardar a oxidação (SOARES, 2008). Dentre os vários compostos fenólicos existentes, os flavonoides se apresentam como uma das classes principais, apresentando importante papel no potencial antioxidante de um extrato.

A Figura 3 apresenta a curva de calibração dos padrões utilizados.

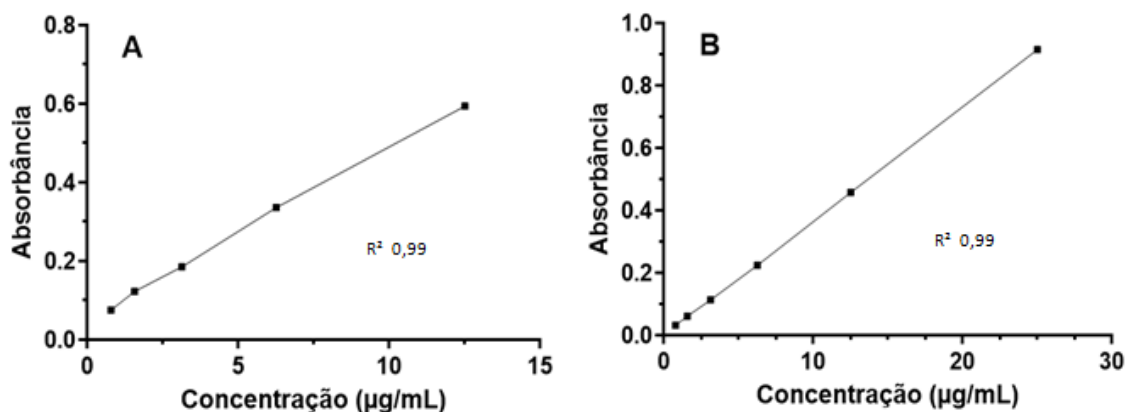


Figura 3: Gráfico A apresenta a curva de calibração de Fenóis Totais com Ácido Gálico, enquanto o gráfico B representa a curva de calibração do método de Flavonoides Totais com Quercetina.

Usando a curva de calibração de Fenóis, estima-se que haja $33,58 \pm 0,25$ miligramas equivalentes de ácido gálico para o extrato de *Bertholletia excelsa*. Já com relação a flavonoides obteve-se $32,16216 \pm 2,08$ µgeq.Q/ml.

Comparando os resultados, percebe-se que o extrato hidroetanólico de *Bertholletia excelsa*, com valor de CI50 $7,67$ mg/mL, aproxima-se da atividade antioxidante da vitamina C.

5.4. Viabilidade Celular.

Os testes de viabilidade celular sobre os macrófagos J774 foram feitos utilizando peróxido de hidrogênio em concentrações de $80\mu\text{M}$ e $100\mu\text{M}$ e as amostras de *Bertholletia excelsa* e Quercetina em diferentes concentrações. Obteve-se os resultados abaixo:

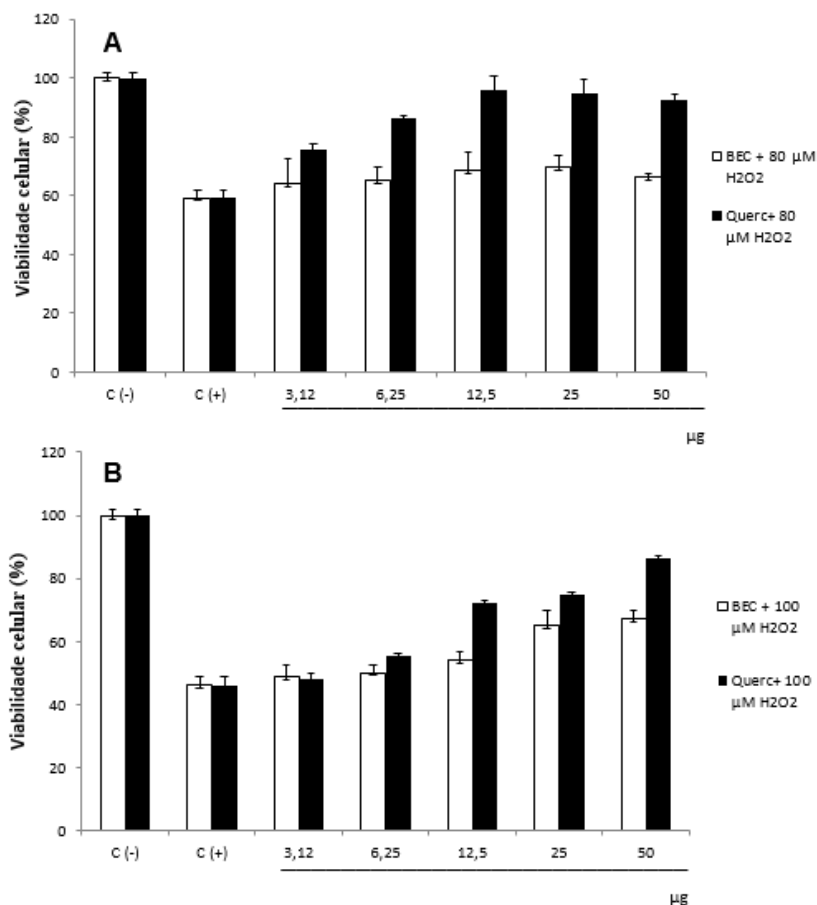


Figura 4: Testes de viabilidade celular de extrato de *Bertholletia excelsa* e Quercetina sobre macrófagos em concentrações de 80μM (A) e 100μM (B) de peróxido de Hidrogênio, onde C (+) representa o tratamento celular apenas com peróxido e C (-) as células tratadas sem peróxido.

Comparando-se os ensaios de viabilidade celular com as duas concentrações de peróxido (80μM e 100μM), observamos que as concentrações do extrato de *Bertholletia excelsa* mostraram-se mais eficazes com a o Peróxido de Hidrogênio a 100μM, demonstrando certa distância dos resultados de morte celular, apenas com peróxido, e se aproximando dos resultados do padrão (Quercetina).

A partir desses dados, foram realizados mais alguns testes com o extrato de *Bertholletia excelsa* e Quercetina para comparação de possíveis efeitos citotóxicos.

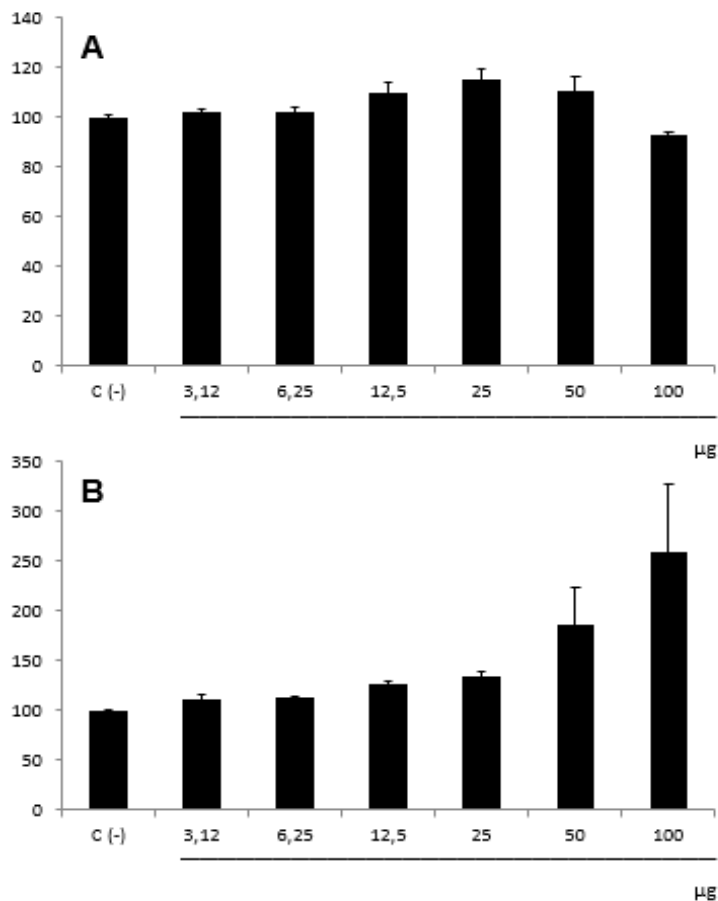


Figura 5: Viabilidade celular com extrato de *Bertholletia excelsa* (A) e abaixo viabilidade celular com Quercetina (B).

Enquanto que na concentração de 100µg de Quercetina observou-se um aumento de 158% no número de células (devido a proliferação celular), o extrato de *Bertholletia excelsa* não demonstrou muita discrepância com relação as diferentes concentrações, sendo que na amostra com 25µg observou-se seu melhor resultado com aumento de 14% no número de células com relação ao início do ensaio.

5.5. Atividade Antioxidante Celular.

A avaliação da atividade antioxidante em fibroblastos 3T3L1 foi realizada utilizando-se o extrato de *Bertholletia excelsa* em diferentes concentrações e como padrão utilizou-se a Quercetina na concentração de 5 µg/mL como é observado na figura abaixo:

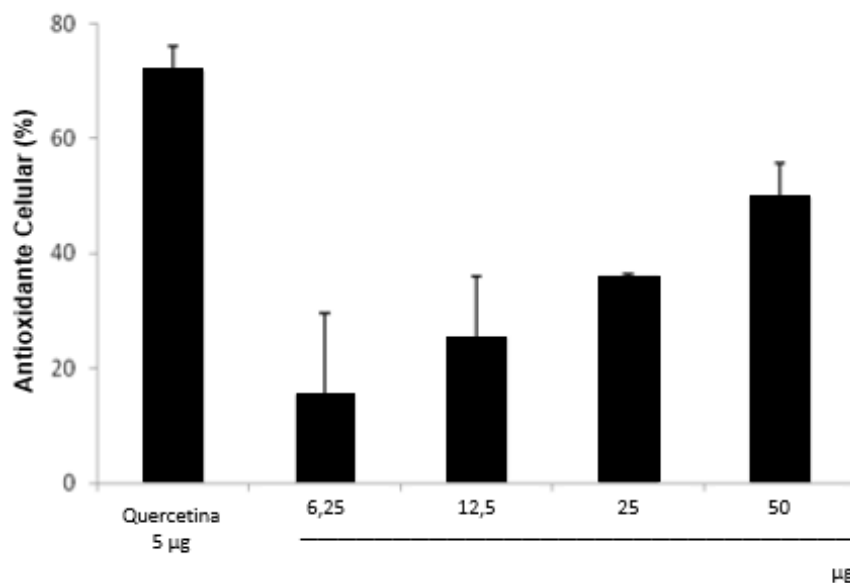


Figura 6: Comparação da atividade antioxidante celular da Quercetina (5 µg/mL) e do extrato de *Bertholletia excelsa* em diferentes concentrações.

Na concentração de 50µg/mL o extrato de *Bertholletia excelsa* conseguiu inibir a morte de 49,77% das células, não conseguindo ser mais efetivo que o padrão de Quercetina que na concentração de 5 µg/mL conseguiu inibir em 71,91% a morte celular.

Com relação a viabilidade celular, o extrato seco de *Bertholletia excelsa* apresentou pouca ou quase nenhuma morte celular em quase todas as concentrações, podendo ser observado que em algumas das mesmas houve proliferação celular. Ao se comparar com ensaios feitos por Martinez (2011), utilizando própolis de *Apis mellifera*, partindo da mesma metodologia, podemos concluir que o extrato de *Bertholletia excelsa* apresenta menor citotoxicidade, pois mesmo estando em concentrações de 3,12µg até 100µg apresentou menor letalidade que a própolis que na concentração de 0,5µg já apresentava considerável taxa de letalidade celular. Estudos realizados por Iha et. al (2008), com o extrato etanólico de frutos de *P. guajava*, obtiveram resultados similares não apresentando citotoxicidade, assim como o extrato de *Bertholletia excelsa*, para a linhagem J774 até a concentração de 50 µg/ mL.

5.6. Atividade Anti-inflamatória.

A avaliação da atividade anti-inflamatória foi realizada pela determinação de nitrito, na qual as células são induzidas a um processo inflamatório ao adicionar-se LPS, um dos componentes da membrana celular das bactérias, e o extrato de *Bertholletia excelsa* e Dexametasona (anti-inflamatório padrão). Tal atividade anti-inflamatória é medida pela dosagem de produtos de degradação mais estáveis celulares, utilizando o reagente de Griess. Quanto mais nitrito produzido, maior foi o quadro inflamatório celular, significando uma menor atividade anti-inflamatória do extrato.

Ao se comparar os resultados do extrato de *Bertholletia excelsa*, observa-se que houve impedimento na produção de óxido nítrico, sinalizando que o extrato apresenta efeitos anti-inflamatórios, estando próximo dos resultados apresentados pela Dexametasona. Fato ilustrado na figura abaixo:

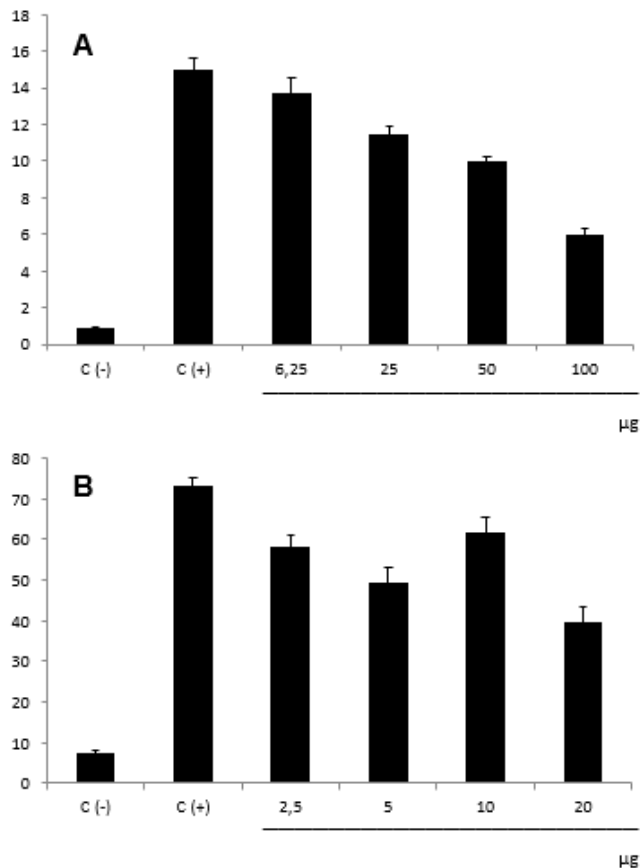


Figura 7: Avaliação da atividade anti-inflamatória comparativa entre o extrato de *Bertholletia excelsa* (A) e o padrão, Dexametasona (B), onde C (+) representa o controle utilizando apenas LPS.

O extrato de *Bertholletia excelsa* apresentou atividade anti-inflamatória a partir da concentração de 6,25µg. Já o extrato etanólico bruto de *Lychnophora passerina* em estudos propostos por Oliveira (2010), apresentou atividade anti-inflamatória na concentração de 2,5µg, tendo assim uma melhor atividade anti-inflamatória que o extrato seco de *Bertholletia excelsa* no ensaio de determinação de nitritos.

5.CONCLUSÃO.

O extrato seco *Bertholletia excelsa* não apresenta letalidade significativa pelo método de alamar blue, estando apto à utilização celular.

Com o conjunto de resultados obtidos a partir do referido trabalho, podemos concluir que o extrato do caule de *Bertholletia excelsa* apresenta grande poder antioxidante, devido ao seu alto teor de compostos fenólicos, estando próximos dos resultados obtidos pela Quercetina (padrão) de acordo com os ensaios de DPPH, ABTS, Fenóis Totais, Flavonoides Totais e Antioxidante Celular.

O extrato seco de *Bertholletia excelsa* apresentou atividade anti-inflamatória no ensaio de determinação de nitrito, com resultados próximos ao padrão Dexametasona.

Com os resultados positivos para atividade antioxidante e anti-inflamatória do extrato seco de *Bertholletia excelsa* pode-se realizar mais alguns estudos para que o mesmo possa vir a ser utilizado com sua propriedade antioxidante em alimentos, medicamentos e cosméticos. Quando se trata de atividade anti-inflamatória, o extrato de *Bertholletia excelsa* pode ser estudado utilizando outros métodos, com a finalidade, de futuramente, poder ser utilizado como tratamento em processos inflamatórios.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

BIANCHI, Maria L. P.; ANTUNES, Lusânia M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição*, vol. 12, Campinas, agosto, 1999.

BRAGA, Adriano C. et al. Atividade Antioxidante e quantificação de compostos bioativos dos frutos de abricó (*Mammea americana*). *Revista Alimento e Nutrição*, vol. 21, p.31-36, Araraquara, jan./mar. 2010.

BURATTO, Ana P.; CARPES, Solange T.; VECCHIA, Paula D.; LOSS, Edenes M. S.; APPELT, Patrícia. Determinação da atividade antioxidante e antimicrobiana em Castanha-do-Pará (*Bertholletia excelsa*). UTFPR – Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Pato Branco. *Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos, Campo Mourão (PR)*, Vol. 2, n.1, p 60-65, Jan./Jun. 2011.

CARDOSO, Luciana M. et al. Efeitos biológicos das antocianidinas no processo aterosclerótico. *La Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, vol. 40, 2011.

GONZÁLEZ, Celso M. et al. Efecto antiinflamatorio del selenio en pacientes sépticos. *Revista de la Asociación Mexicana de Medicina*. Vol. 23, Núm. 4, p. 199-205, Out./Dez. 2009.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N nitrates] in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, v. 26, p. 131-138, 1982.

IHA, Silvia M. et al. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(3): 387-393, Jul./Set. 2008.

KVIECINSKI, Maicon R. Avaliação das atividades antioxidante, antiinflamatória e antitumoral do extrato bruto hidro-etanólico e frações de *Bidens pilosa* L. (Asteraceae). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2007.

LEITE, Heitor P.; SARNI, Roseli S. Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*. Vol. 18, pg. 87-94, 2003.

MARTINEZ, Clarissa R. Caracterização química e citotoxicidade da própolis de *Apis mellifera* sobre fibroblastos da mucosa oral humana: estudo in vitro. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS. Campo Grande, 2011.

OLIVEIRA, Patricia C. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade anti-inflamatória de *Lychnophora passerina* (Mart ex DC) Gardn (Asteraceae). Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP. Escola de Farmácia. Ouro Preto, 2010.

PEREIRA, A. L. F.; VIDAL, T. F.; CONSTANT, P. B. L. Antioxidantes alimentares: importância química e biológica. *Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição*. São Paulo, SP, vol.34, n.3, p.231-247, dez. 2009.

PIRES, Liliane V. et al. Investigação de Selênio e dos compostos fenólicos presentes na castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K) e sua atividade antioxidante in vitro. *Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição*, São Paulo, SP, vol. 36, p. 1-354, jun. 2011.

RAMOS, Valderéz A. et al. Papel do estresse oxidativo na manutenção da inflamação em pacientes com artrite reumatóide juvenil. *Jornal de Pediatria - Vol. 76, Nº2, 2000*.

SALOMÃO, Rafael P. Densidade, estrutura e distribuição espacial de castanheira-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H. & B.) em dois platôs de floresta ombrófila densa na Amazônia setentrional brasileira. *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Ciências Naturais*, Belém, v. 4, n. 1, p. 11-25, jan.- abr. 2009

SOARES, Marcia et al. Avaliação da atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos presentes no bagaço de maçã cv. Gala. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, jul./set. 2008.

SOUZA, Cíntia R. et al. Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.). EMBRAPA, Amazônia Ocidental, Manaus, 2008.

TONINI, Hélio et al. Estrutura e produção de duas populações nativas de Castanheira-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* O. Berg) em Roraima. *Revista Floresta*, vol. 38, n. 3, Curitiba, PR, jul./set. 2008.

WIESE, Luiz P. L. Avaliação de atividade antioxidante e antiinflamatória de extrato e frações de *Alternanthera tenella* colla. Universidade de Santa Catarina. Florianópolis, 2008.

WOLFE, K. L.; LIU, R. H. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *J Agric Food Chem.*, n. 55, v. 22, p. 8896-8907, 2007.