

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Marina Ortiz Lovatto

ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADE FARMACOLÓGICA
in vitro e in vivo DE Schinus molle L.

Santa Maria, RS

2019

Marina Ortiz Lovatto

ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADE FARMACOLÓGICA
***in vitro e in vivo* DE *Schinus molle* L.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Melânia Palermo Manfron

Santa Maria, RS

2019

Lovatto, Marina Ortiz
ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADE FARMACOLÓGICA in vitro
e in vivo DE Schinus molle L. / Marina Ortiz Lovatto.-
2019.
76 p.; 30 cm

Orientadora: Profª Drª. Melânia Palermo Manfron
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Comunicação, RS, 2019

1. Planta medicinal 2. Caracterização química 3.
Potencial terapêutico 4. Pleurisia I. Palermo Manfron,
Profª Drª. Melânia II. Título.


Marina Ortiz Lovatto


ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADE FARMACOLÓGICA
in vitro e in vivo DE Schinus molle L.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovado em 27 de Agosto de 2019


Melânia Palermo Manfron, Dr^a (UFSM)
(Presidente/Orientador)


Michel Mansur Machado, Dr (UNIPAMPA) - Parecer
(Membro Avaliador Externo)


Lauren Rosa Crossetti Vaucher, Dr^a (UFSM)
(Membro Avaliador Interno)

Santa Maria, RS

2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e todos seres de luz, por me acompanhar nessa trajetória, me proporcionando saúde, força, fé e determinação.

Agradeço aos meus pais, Clarice e Odanir, por toda a compreensão de minha ausência, pelo amor, apoio e conselhos recebidos. Tudo o que faço e farei será por vocês!

A minha Orientadora Melânia Palermo Manfron, pela confiança depositada, conhecimentos transmitidos e pela compreensão da correria de minha vida dupla de estudante e trabalhadora. Muito Obrigada.

A minha eterna amiga Maiara Maziero, que esteve presente em mais da metade da minha caminhada acadêmica desde a graduação. Obrigada por todo o carinho, apoio, segurança e parceria dentro e fora do laboratório. Por nunca deixar eu desistir, muito obrigada!

A Jocelene Cossetin por todo o apoio nos experimentos e pela presença no meu crescimento acadêmico.

Ao Laboratório de Investigações Fitoquímicas (LABINFITO), o qual tornou-se minha segunda casa nesses seis últimos anos entre a graduação e o mestrado. Obrigada Vanessa Ribeiro, Rafaela Castro Dornelles, Greice Moraes por todo conhecimento compartilhado, pela convivência diária, pelas risadas. Grace Panno obrigada pelas ajudas e ótima apresentação na JAI como minha IC, tens um futuro que só depende de você. Por fim Janice Facco, obrigada pelo empenho e dedicação nas análises do HPLC e pela preocupação constante com meus resultados.

Ao Fallon dos Santos Siqueira pela disponibilidade e parceria.

Ao Laboratório de Cultura Celular da Universidade Franciscana, em especial a Prof^a Dr^a. Michele Sagrillo pela disponibilidade e atenção.

Ao LABIBIO, em especial ao Pedro Henrique Doleski, por toda ajuda, paciência e determinação no experimento *in vivo*. Muito obrigada!

A todos que de alguma forma participaram direta ou indiretamente para que esse trabalho fosse feito e que apesar dos contratempos sempre estiveram do meu lado e acreditaram em mim. Muito obrigada!

RESUMO

ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADE FARMACOLÓGICA *in vitro* e *in vivo* DE *Schinus molle* L.

AUTORA: Marina Ortiz Lovatto
ORIENTADORA: Prof^a Dr^a. Melânia Palermo Manfron

A espécie *S. molle* L. é amplamente distribuída no Rio Grande do Sul. As partes aéreas da *S. molle* são utilizadas popularmente para diferentes finalidades terapêuticas como anti-inflamatória, anti-hemorrágica, antisséptico, laxativo leve, adstringente, antiasmática, estimulante digestivo, distúrbio menstrual, diurético e tônico. A necessidade de buscar novas alternativas terapêuticas para doenças respiratórias, de preferência, com o mínimo de efeitos colaterais, justifica este trabalho, tanto pelo ponto de vista do interesse científico, quanto pelo social. O presente trabalho teve por objetivo obter o extrato bruto das folhas de *S. molle* pelo processo de maceração, realizar análise fitoquímica, identificar e quantificar compostos presentes no extrato, avaliar atividades biológicas, como atividade anti-inflamatória e antimicrobiana, bem como, avaliar cito e genotoxicidade e potencial antioxidante frente as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. O extrato de *S. molle* após as análises apresentou concentrações de 79,14; 231,67; 52,65 mg de equivalentes/g de extrato que foram determinadas por dosagens fitoquímicas no extrato de *S. molle* para fenóis totais, taninos e flavonoides, respectivamente. A *S. molle* mostrou-se capaz de capturar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio com capacidade antioxidante com $IC_{50}=30,54\pm 0,41$ $\mu\text{g/mL}$. Não apresentou citotoxicidade e genotoxicidade, sendo um indicativo de segurança. A atividade antimicrobiana foi não significativa frente aos microrganismos *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Mycobacterium tuberculosis*, *M. abscessus*, *M. massiliense*, *M. fortuitum* e *M. smegmatis*. O extrato não demonstrou alterações hematológicas, mesmo no grupo induzido pleurisia com carragenina 2%. Os flavonoides rutina (58,63 mg/g) e quercetina (0,665 mg/g) foram identificados e quantificados.

Palavras-chave: Planta medicinal. Caracterização química. Potencial terapêutico. Pleurisia.

ABSTRACT

PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND PHARMACOLOGICAL ACTIVITY

in vitro and *in vivo* OF *Schinus molle* L.

AUTHOR: Marina Ortiz Lovatto

ADVISOR: Prof^a. Dr^a. Melania Palermo Manfron

The species *S. molle* L. is widely distributed in Rio Grande do Sul. The aerial parts of *S. molle* are popularly used for different therapeutic purposes as anti-inflammatory, anti-haemorrhagic, antiseptic, mild laxative, astringent, anti-asthmatic, digestive stimulant, menstrual, diuretic and tonic disorder. The need to seek new therapeutic alternatives for respiratory diseases, preferably with minimal side effects, justifies this work, both from the point of view of scientific and social interest. The present work aimed to obtain the crude extract of *S. molle* leaves by the maceration process, perform phytochemical analysis, identify and quantify compounds present in the extract, evaluate biological activities, such as anti-inflammatory and antimicrobial activity, as well as evaluate cyto and genotoxicity and antioxidant potential against reactive oxygen and nitrogen species. *S. molle* extract after analysis showed concentrations of 79,14; 231,67; 52,65 mg equivalents/g of extract that were determined by phytochemical dosages in *S. molle* extract for total phenols, tannins and flavonoids, respectively. *S. molle* was able to capture reactive oxygen and nitrogen species with antioxidant capacity with $IC_{50} = 30.54 \pm 0.41 \mu\text{g/mL}$. It did not present cytotoxicity and genotoxicity, being a safety indicator. Antimicrobial activity was not significant in relation to the microorganisms *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Mycobacterium tuberculosis*, *M. abcessus*, *M. massiliense*, *M. fortuitum* and *M. smegmatis*. The extract showed no hematological alterations, even in the group induced pleurisy with 2% carrageenan. The flavonoids rutin (58,63 mg/g) and quercetin (0,665 mg/g) were identified and quantified.

Keywords: Medicinal plant. Chemical characterization. Therapeutic potential. Pleurisy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.....	17
Figura 2: Estrutura Ácido Gálico.....	19
Figura 3: Estrutura Ácido Elágico.....	19
Figura 4: Núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração.....	20
Figura 5: <i>S. molle</i> – Aspecto Geral.....	21
Figura 6: <i>S. molle</i> – Folhas.....	22
Figura 7: Cromatograma do EXB de <i>S. molle</i> obtido por CLAE.....	43
Figura 8: Capacidade antioxidante pelo método do DPPH expresso em % de inibição EXB de <i>S. molle</i>	45
Figura 9: Ensaio óxido nítrico para EXB <i>S. molle</i>	46
Figura 10: Ensaio DCFH-DA para EXB <i>S. molle</i>	47
Figura 11: Ensaio MTT para EXB <i>S. molle</i>	48
Figura 12: Ensaio Cometa para EXB <i>S. molle</i>	49
Figura 13: Gráficos dos dados hematológicos de leucócitos (A), neutrófilos (B) e linfócitos (C).....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Procedimento para análise da atividade antimicrobiana.....	39
Tabela 2: Grupos tratamento animal.....	39
Tabela 3: Equação da reta e valor de r de fenóis totais, taninos e flavonoides.....	41
Tabela 4: Equação da reta, valor de r e teores de rutina e quercetina presentes no EXB de <i>S. molle</i> obtido por CLAE.....	43
Tabela 5: Resultados obtidos na CIM do EXB <i>S. molle</i>	50
Tabela 6: Parâmetros hematológicos após a indução de pleurisia em ratos tratados por 21 dias com EXB de <i>S. molle</i>	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AlCl₃: Cloreto de alumínio;
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária;
CAT: Catalase;
CIM: Concentração Inibitória Mínima;
CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
CN: Controle Negativo;
CP: Controle Positivo;
DAD: Detector de diodo;
DFC: Diclorofluoresceína;
DCFH-DA: Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína;
DMSO: Dimetilsulfóxido;
DNA: Ácido desoxirribonucleico;
DPOC: Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica;
DPPH: Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil;
EAG: Equivalente de Ácido Gálico;
ECAT: Equivalente de Catequina;
ERUT: Equivalente de Rutina;
EDTA: Etilenodiaminotetracético;
ER: Espécie Reativa;
ERNs: Espécies Reativas de Nitrogênio;
EROs: Espécies Reativas de Oxigênio;
EXB: Extrato Bruto;
GPx: Glutacionaperoxidase;
GSH: Glutationa;
HCl: Ácido Clorídrico;
IC50: Concentração inibitória de 50%;
IL-5: Interleucina 5;
H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio;
LOO: Radical Peróxido;
LOOH: Hidroperóxido Lipídico;
MDA: Malondialdeído;
MTT: Reagente brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium;

NaNO₂: Nitrito de Sódio;

NaOH: Hidróxido de Sódio;

NO₂: Dióxido de Nitrogênio;

OMS: Organização Mundial da Saúde;

ONU: Organização das Nações Unidas;

PBS: Tampão Fosfato Salino;

PL: Peroxidação Lipídica;

PMNS: Leucócitos Polimorfonucleares;

PNPMF: Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos;

RENAME: Relação Nacional de Medicamentos Essenciais;

SOD: Superóxido Desmutase;

TRIS: tris-(hidroximetil)-aminometano;

UFSM: Universidade Federal de Santa Maria.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 PLANTAS MEDICINAIS	16
3.2 METABÓLITOS	17
3.2.1 Compostos Fenólicos	19
3.2.2 Taninos	19
3.2.3 Flavonoides	20
3.3 FAMILIA ANACARDIACEAE	21
3.3.1 <i>Schinus molle</i>	22
3.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	23
3.5 ESPÉCIES REATIVAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	24
3.6 ATIVIDADE CITOTÓXICA E GENOTÓXICA	27
3.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	27
3.8 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	29
3.8.1 Patologia e Patogenia da Pleurite	30
3.8.2 Tratamento da Pleurisia	31
3.8.3 Modelo de Pleurisia Animal	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	33
4.1.1 Preparo do Extrato Bruto	33
4.2 QUANTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	33
4.2.1 Determinação de Fenóis Totais	33
4.2.2 Determinação de Taninos	34
4.2.3 Determinação de Flavonoides	34
4.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES NO EXTRATO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	35
4.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	36
4.4.1 Método radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)	36
4.4.2 Cultivo celular	36
4.4.3 Teste Óxido Nítrico	37
4.4.4 Teste do Diacetato Diclorofluoresceína (DCFH-DA)	37
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E GENOTÓXICA	38

4.5.1 Avaliação da Citotoxicidade pelo Ensaio de MTT	38
4.5.2 Avaliação da Genotoxicidade pelo Ensaio Cometa	38
4.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	39
4.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	40
4.7.1 Animais e Grupos Experimentais	40
4.7.2 Indução da Pleurisia	41
4.7.3 Análises Hematológicas	41
4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO	42
5.2 DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	42
5.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES NO EXTRATO POR CLAE.....	43
5.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	45
5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E GENOTÓXICA.....	48
5.5.1 Avaliação da Citotoxicidade pelo Ensaio de MTT	48
5.5.2 Avaliação da Genotoxicidade pelo Ensaio Cometa	50
5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	51
5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	52
6. CONCLUSÃO	56
7. REFERÊNCIAS	57
8. ANEXO A	65
9. ARTIGO	66

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais é um dos recursos mais antigos utilizados na terapêutica, seja para prevenção, cura ou tratamento de doenças. Para muitas comunidades e grupos étnicos o uso de plantas medicinais é o único recurso terapêutico para o tratamento de enfermidades (MACIEL *et al.*, 2002). Desde 1978 os medicamentos fitoterápicos são reconhecidos como recurso terapêutico pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que incentiva os países membros da Organização das Nações Unidas (ONU) à utilização dos seus conhecimentos tradicionais sobre plantas medicinais como recursos terapêuticos viáveis (MAIDANA; GONZÁLEZ; DEGEN DE ARRÚA, 2015).

Apesar de ao longo do tempo os medicamentos sintéticos e semissintéticos terem sido aprimorados e estarem mais presentes no cotidiano de parte da população, o uso de plantas medicinais supera os obstáculos que as populações carentes encontram na utilização desses medicamentos. Dentre esses obstáculos podemos citar a dificuldade de acesso à assistência médica e farmacêutica, como também o custo dos medicamentos industrializados (VEIGA JR., PINTO e MACIEL, 2005; DA SILVEIRA, BANDEIRA e ARRAIS, 2008;).

A preferência na utilização de plantas medicinais decorre entre outros fatores da facilidade de obtenção e do custo de produção. As plantas apresentam ampla diversidade de metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas (LAPA *et al.*, 2007). Tendo em vista que alguns compostos originados de plantas não podem ou nunca foram sintetizados, o estudo fitoquímico é importante para a descoberta de novos princípios ativos.

Dentre os metabólitos secundários podemos citar os compostos fenólicos, como polifenóis, flavonoides, taninos e xantinas. Esses metabólitos encontrados nas espécies vegetais são responsáveis por inúmeras atividades, como anti-inflamatória, antioxidante, anticarcinogênica, hipoglicemiantes, músculos relaxantes e estimulantes do sistema nervoso central (CALIXTO, 2019).

As plantas medicinais devem ser tratadas com atenção, cada uma tem uma orientação específica para o uso, e diferentemente dos medicamentos industrializados, não possuem bula para prestar maiores esclarecimentos sobre o produto, algumas plantas, a população as utiliza desconhecendo o seu potencial

tóxico; ou ainda não informando aos médicos o uso destas, o que contribui para a ocorrência de interações medicamentosas (SECOLI, 2010).

A *S. molle* (Anacardiaceae) também conhecida como anacauíta ou aroeira-mansa é uma árvore originária do Peru e se encontra como nativa no Brasil, Uruguai, Argentina e outros países da região Andina. É usualmente empregada em paisagismo e arborização de ruas e avenidas, uma vez que é de pequeno porte e apresenta frutos vermelhos vistosos, além de ser resistente a várias condições climáticas (BACKES; NARDINO, 2002).

Na medicina popular a *S. molle* é utilizada devido suas ações antibacteriana, antiviral, antisséptica tópica, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória. Também relatam-se propriedades analgésicas, antidepressivas e estimulantes, além do uso para tratamento de reumatismos, distúrbios menstruais e respiratórios, dores de dente e infecção do trato urinário (ALBA; BONILLA; ARROYO, 2009; MARTINS *et al.*, 2014).

A cultura popular fornece indicações importantes para o meio científico a respeito da utilização de espécies nativas, assim o conhecimento tradicional, é de grande valia antes do aprofundamento científico. O valor dos recursos naturais, geralmente, é descoberto pela população e quando apropriadamente investigado, pode levar a descoberta ou indicação de um novo produto/medicamento (CALIXTO, 2019).

O estudo da *S. molle* se justifica pelo seu uso como anti-inflamatório no sistema respiratório, por ser uma planta frequente no estado do Rio Grande do Sul e levando-se em conta a tendência mundial no uso de fitoterápicos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a partir do extrato bruto hidroetanólico 70% (EXB) das folhas da *S. molle*, a composição fitoquímica e atividades farmacológicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Dosear, fenóis totais, taninos e flavonoides;
- Avaliar atividade antioxidante, citotóxica, genotóxica, antimicrobiana, anti-inflamatória;
- Identificar os flavonoides rutina e quercetina no extrato de *S. molle*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PLANTAS MEDICINAIS

As plantas foram importantes no desenvolvimento da sociedade, além de fazerem parte da vida humana desde seus primórdios. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades ocorre desde a antiguidade, o ser humano as utiliza para satisfazer suas necessidades básicas de sobrevivência (alimento, fonte de calor, abrigo, etc.). Assim, ao longo do tempo as plantas foram uma das principais fontes de tratamento na terapêutica (MACIEL et al., 2002; CALIXTO, 2019).

O Brasil sendo um país de rica biodiversidade teve na cultura indígena a principal disseminadora do uso de plantas medicinais. A partir da colonização, os conhecimentos da flora local a respeito de plantas medicinais e suas aplicações foram fundidos com os conhecimentos europeus e africanos (BRASIL, 2006).

Até o século XIX os recursos terapêuticos eram constituídos predominantemente por plantas e extratos vegetais. Entretanto, o desenvolvimento de fármacos sintéticos, no início do século XX, favoreceu o desuso de plantas na terapêutica, devido a maior confiabilidade no efeito desejado (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2007). Atualmente, os produtos de derivados naturais são recursos importantes para as indústrias farmacêuticas, principalmente no desenvolvimento de novos fármacos (CALIXTO, 2019).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) “As plantas medicinais são aquelas capazes de aliviar ou curar enfermidades e têm tradição de uso como remédio em uma população ou comunidade”. Assim, o princípio ativo das plantas medicinais é o ponto comum entre o uso destas na antiguidade na forma de preparações caseiras e o seu uso na forma industrializada (ANVISA, 2004). Lorenzi e Matos (2008) destacam que é o princípio ativo que “tem a propriedade de provocar reações benéficas ou maléficas no organismo, capazes de resultar na recuperação ou não da saúde”.

As plantas mostram-se como importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos, pois similarmente aos microrganismos produzem uma grande diversidade de compostos químicos (CALIXTO, 2019). Esses produtos constituem modelos para a síntese de um grande número de fármacos, além de possuírem

ampla diversidade quanto à estrutura, propriedades físico-químicas e biológicas, o que chama a atenção de pesquisadores (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2007).

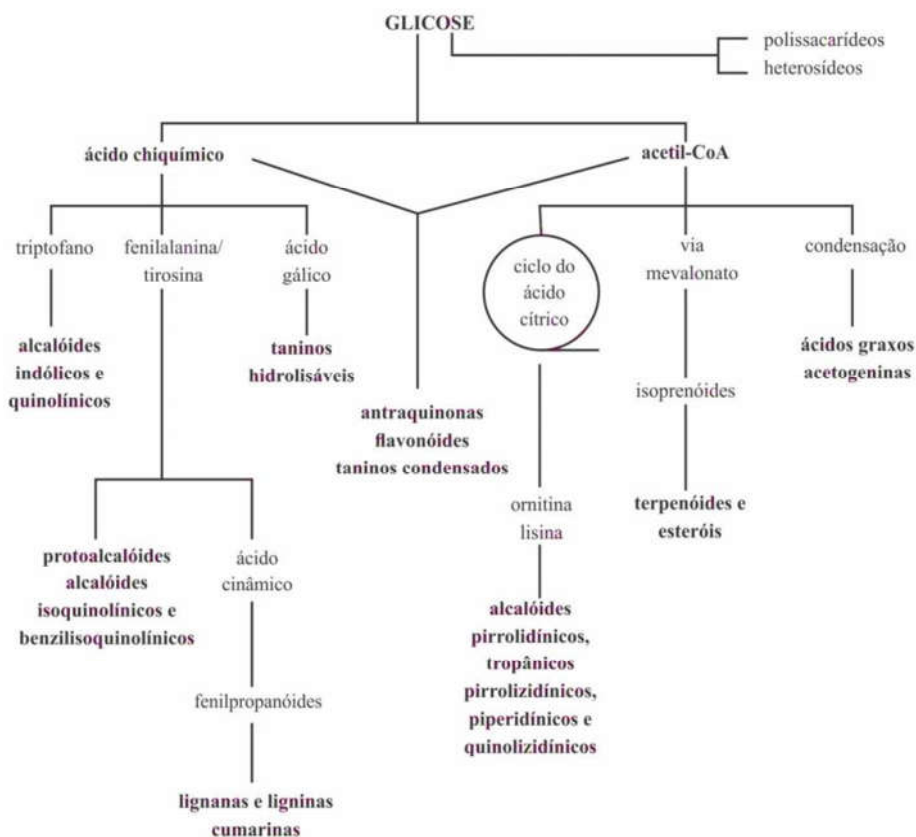
Considerando as plantas medicinais como instrumentos importantes da assistência farmacêutica, a OMS expressa através de comunicados e resoluções, a necessidade de valorizar o uso de plantas medicinais (MAIDANA; GONZÁLEZ; DEGEN DE ARRÚA, 2015). Assim, em 22 de junho de 2006, o governo federal brasileiro aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) que estabelece ações pelos diversos parceiros, em torno de objetivos comuns voltados à garantia do acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos em nosso país (BRASIL, 2009).

3.2 METABÓLITOS

Os vegetais produzem compostos químicos que são responsáveis entre outras funções pelo crescimento e sobrevivência deles, esses compostos são classificados em dois grupos: metabólitos primários e metabólitos secundários. Os metabólitos primários são macromoléculas responsáveis pelas funções essenciais dos vegetais, como o crescimento, desenvolvimento e manutenção das células. São exemplos de metabólitos primários os lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. Metabólitos secundários são micromoléculas responsáveis pelas funções adaptativas dos vegetais, como proteção e sobrevivência das espécies. São exemplos desses alcaloides, compostos fenólicos e terpenoides (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

A formação dos metabólitos secundários ocorre a partir do metabolismo da glicose por via dos intermediários, ácido chiquímico e acetato (Figura 1). Os metabólitos secundários podem ser resultado de combinações entre uma unidade de ácido chiquímico uma ou mais unidades de acetato ou derivados deste, como as antraquinonas, os flavonoides e os taninos condensados. Podem ser encontrados na forma livre as chamadas agliconas, ou estarem ligados a uma ou mais unidades de açúcar os denominados heterosídeos. Os aminoácidos aromáticos precursores dos metabólitos secundários aromáticos, são derivados do ácido chiquímico (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2007; VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

Figura 1: Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.



Fonte: SIMÕES *et al.*, 2007, p. 411.

Os metabólitos secundários são de grande interesse farmacológico, uma vez que são biologicamente ativos. Por esse motivo as plantas apresentam grande importância comercial, principalmente nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e do ramo de cosméticos (NAKATA *et al.*, 2018). Metabólitos de plantas podem apresentar diferentes atividades, como por exemplo: antioxidante, antimicrobiana, fungicida, inseticida, etc (DOS SANTOS *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2013; MAZIERO *et al.*, 2019).

Em determinados grupos de plantas, os metabólitos secundários são encontrados em concentrações relativamente baixas. A sua produção pode ser influenciada por diversos fatores: sazonalidade, ritmo circadiano, desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, altitude, poluição atmosférica e indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos (GOBBONETO; LOPES, 2007).

3.2.1 Compostos Fenólicos

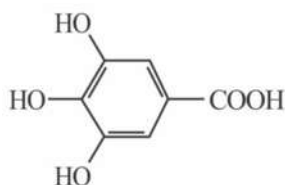
Os compostos fenólicos incluem uma grande variedade de estruturas, sejam elas simples ou complexas (ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, taninos, lignanas e ligninas). Caracterizam-se por pelo menos um anel aromático, o qual está substituído por pelo menos um grupamento hidroxila. São compostos normalmente solúveis em água e solventes orgânicos, pois a maior parte não é encontrada na sua forma livre na natureza, mas sim como ésteres ou heterosídeos. Devido a sua capacidade de inibir a peroxidação lipídica e a lipoxigenase *in vitro*, justifica-se o uso desses compostos como antioxidantes (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007; SOUZA et al., 2007).

3.2.2 Taninos

Os compostos antissépticos que impedem o desenvolvimento de microorganismos, geralmente são taninos, pois quando se complexam com as proteínas precipitam-se nas células superficiais das mucosas e tecidos devido à formação de uma camada protetora (DIAS; SOUZA; ALSINA, 2011). Os taninos, também metabólitos secundários, são solúveis em água e importantes como componentes gustativos, sendo responsáveis pela adstringência de frutos e produtos vegetais, a qual é gerada pela complexação desses com as proteínas (SILVEIRA, 2014).

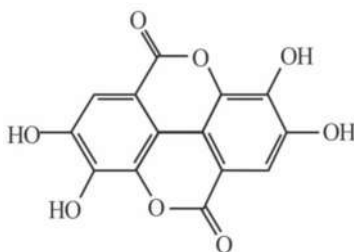
Classificados quanto sua estrutura química são divididos em taninos hidrolisáveis e condensados. Os hidrolisáveis podem ser divididos em galotaninos e elagitaninos, os quais são derivados da esterificação da glicose com o ácido gálico (Figura 2) e elágico (Figura 3), utilizados principalmente para curtir couro. Os elagitaninos são encontrados em alimentos e derivam da policondensação de duas ou mais unidades de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol (SANTOS; DE MELLO, 2007).

Figura 2: Estrutura Ácido Gálico.



Fonte: SIMÕES *et al.*, 2007, p. 522.

Figura 3: Estrutura Ácido Elágico.

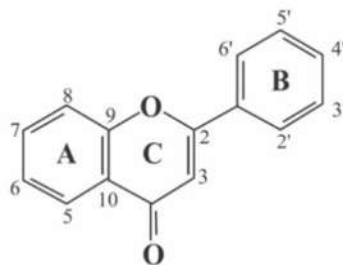


Fonte: SIMÕES *et al.*, 2007, p. 521.

3.2.3 Flavonoides

São compostos fenólicos cuja síntese não ocorre na espécie humana, entretanto são substâncias naturais que fazem parte da nossa dieta e são encontradas em abundância na natureza. A maioria dos representantes dessa classe possui seu núcleo fundamental (Figura 4) com 15 átomos de carbono, o qual é constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007). Os flavonoides contribuem para conservação da saúde e o prolongamento da vida útil de produtos, pois apresentam atividade antioxidante, a qual se caracteriza por manter um sistema oxidativo controlado (CIAPPINI *et al.*, 2013).

Figura 4: Núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração.



Fonte: SIMÕES *et al.*, 2007, p. 579.

Metabólitos secundários não estão presentes universalmente entre as plantas, expressando a individualidade de famílias, gêneros e, até mesmo, espécies. Sendo assim, são chamados princípios ativos vegetais as substâncias responsáveis pelo efeito medicinal de uma planta, porém dependendo da dose administrada, o efeito deixa de ser terapêutico e passa a ser tóxico (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

3.3 FAMILIA ANACARDIACEAE

Sendo uma das maiores famílias da ordem *Sapindales*, apresenta uma distribuição predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais. No Brasil destacam-se os gêneros *Anacardium occidentale*, o cajueiro, natural da região amazônica; *Spondias spp*, os cajás; *Spondias tuberosa*, o umbu, da região Nordeste; e o gênero *Schinus* da região Sul, entre outros, ocorrendo assim, cerca de 15 gêneros e 700 espécies (SOUZA; LORENZI, 2005).

A família Anacardiaceae tem sido descrita com diferentes atividades farmacológicas como antiviral, antimicrobiana e anti-inflamatória, para o gênero *Manfigera* da manga. O gênero *Rhus* apresenta atividade antimalárica, antiviral e citotóxica, tendo expressiva atividade biológica (SILVA; OLIVEIRA; LIMA, 2015). A *Schinus terebinthifolius*, é utilizada na medicina popular como antioxidante, anti-inflamatória, antialérgica, anticancerígena, adstringente, antidiarreica, depurativa, diurética (SILVA *et al.*, 2017).

3.3.1 *Schinus molle*

Originária do Peru a espécie *S. molle* encontra-se como nativa no Brasil, Uruguai, Argentina e outros países da região Andina. Popularmente conhecida como “anacauíta”, “aroeira”, “aroeira mansa” (diferenciada da *Schinus terebinthifolius* – aroeira brava - por não causar alergias), “aroeira periquita”, “aroeira salsa”, “pimenteiro”, entre outras denominações, a *S. molle* é uma espécie amplamente distribuída no estado do Rio Grande do Sul (Figura 5) (BACKES; NARDINO, 2002).

LORENZI (2008) apresenta como características morfológicas da espécie *S. molle* altura de 4-8 m, com caule com 25-35 cm de diâmetro, revestido por casca com ritidoma escamoso. Folhas compostas, sem espículas, pêndulas, com 9-25 folíolos linear-lanceolados a lineares, subcoriáceos, glabros, de margem serrada, de 3-8 cm de comprimento. Inflorescências paniculadas terminais e axilares; flores amareladas, pouco vistosas, actinomorfas, diclamídeas.

Figura 5: *S. molle* – Aspecto Geral.



Fonte: Flora Digital do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. Disponível em: http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=11225. Acesso em 01/12/2018.

Pelas características a *S. molle* é uma árvore usualmente empregada na arborização urbana e no paisagismo, já que seus frutos são drupas globosas vermelhas bem vistosas (LORENZI, 2008). Seus frutos apresentam aroma de pimenta, sendo utilizados na adulteração ou como substituto da pimenta do reino

(BACKES; IRGANG, 2009). A casca e as folhas secas (Figura 6) são utilizadas no Brasil contra febres, problemas do trato urinário, contra cistites, uretrite, blenorragia, tosse e bronquite, problemas menstruais com excesso de sangramento, além de gripe, diarreia e inflamações em geral (LORENZI; MATOS, 2008).

Figura 6: *S. molle* – Folhas.



Fonte: Flora Digital do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=9403>. Acesso em 01/12/2015.

Estudos apontam que o óleo essencial da *S. molle* mostra-se mais promissor como antifúngico do que como antimicrobiano, e que pomadas a base do óleo contribuem para a cicatrização de feridas (ALBA; BONILLA; ARROYO, 2009). Os estudos de repelentes e inseticidas aumentaram, devido aos surtos de epidemias associadas a doenças transmitidas por mosquitos. Os efeitos do óleo de frutos e folhas de *S. molle* como repelentes e inseticidas estão associados ao cis-menth-2-en-1-ol e ao trans-piperitol (CHIFFELLE et al., 2013).

3.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A CLAE realiza análises qualitativas e quantitativas, de vários tipos de amostras com inúmeros compostos presentes. Utiliza como fase estacionária pequenas colunas previamente preparadas e a fase móvel, líquido que é eluído sob alta pressão. Com a capacidade de separar, identificar e quantificar compostos; a CLAE é uma das ferramentas mais utilizadas em química analítica, pois proporciona

curto tempo de análise, alta resolução, eficiência e sensibilidade (ENGIDA et al., 2013).

Como principais fontes de variação e necessidade de ajuste e/ou correção na análise por CLAE estão: o tipo de coluna utilizada, o volume de injeção, a proporção e o tipo de fase móvel utilizada, o tempo de análise, o tipo detector utilizado e o pré-preparo da amostra (LANÇAS, 2012). Entretanto é uma técnica amplamente utilizada para análise de drogas, extratos vegetais, aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, antibióticos, etc (GASCÓN et al., 2010; BARCIA; JACQUES, 2014; CASTRO et al., 2015).

O uso da CLAE facilita a análise de compostos naturais, ajudando a identificar seus metabólitos, moléculas normalmente responsáveis pela sua atividade biológica. O estudo etnofarmacológico torna-se uma importante ferramenta para a exploração científica do conhecimento popular, pois contribui para a bioprospecção e descoberta de novos fármacos, bem como para a preservação da biodiversidade e promoção do uso racional das plantas em combinação com os fármacos disponíveis. A pesquisa por plantas e seus metabólitos constituem um estímulo adicional à pesquisa de novos medicamentos fitoterápicos, o que é favorecido em nosso país devido a grande biodiversidade da flora brasileira (RIBEIRO; GUIMARÃES, 2013; CALIXTO, 2019).

3.5 ESPÉCIES REATIVAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) pode ocorrer durante os processos oxidativos biológicos a partir de compostos endógenos, assim como podem ser originados de alguns compostos exógenos gerando diferentes radicais livres (RL). Utiliza-se usualmente o termo EROs, pois essa terminologia inclui os RL e outras espécies que embora não possuam elétrons desemparelhados, em decorrência da sua instabilidade são muito reativas (RIBEIRO et al., 2005; TESTON; NARDINO; PIVATO, 2010).

O EROs podem ser radicais ou não radicais de oxigênio como por exemplo: radical hidroxila (OH^{\bullet}), superóxido (O_2^{\bullet}), peroxila (ROO^{\bullet}); e oxigênio (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl). O organismo pode sofrer ação constante de outras espécies reativas que se originam da combinação das ER com outros átomos, como por exemplo, as espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Entre

as ERNs, cita-se o óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; BARBOSA et al., 2014).

Para avaliar a capacidade antioxidante de compostos naturais a metodologia de DPPH (Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil) esta entre as utilizadas. Os radicais livres apresentam elétrons desemparelhados, e o DPPH possui coloração púrpura/violeta devido à localização do seu radical livre. Quando uma substância antioxidante doa o elétron para o radical DPPH esse passa a ficar na forma reduzida com coloração violeta clara ou amarelo pálido. A mudança de coloração resulta na diminuição da absorbância do radical, a qual é monitorada por espectrofotometria para a determinação da capacidade antioxidante (OLIVEIRA, 2015).

As metodologias de Óxido nítrico e Diacetato de diclorofluoresceína permitem avaliar a produção de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, respectivamente. A avaliação do teste do óxido nítrico permite detectar a presença de nitrito orgânico em amostras. A formação de coloração rosada quando o reagente de Griess é adicionado nas amostras que contêm NO_2 , é o que detecta o nitrito formado. A sulfanilamida presente no reagente de Griess é responsável pela formação de diazônio do nitrito da amostra. Quando o composto azo (N-1-naftilenodiaminobicloridrato) interage com os sais de diazônio, a coloração rosa aparece na amostra (CHOI et al., 2012; NOH et al., 2015).

O teste do diacetato diclorofluoresceína utiliza o reagente diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA). Este composto tem a capacidade de permear a membrana celular quando desacetilado por enzimas mitocondriais, dando origem a 2',7'-dicloro-dihidrofluoresceína que reage com espécies reativas de oxigênio (EROs), principalmente peróxido de hidrogênio (H_2O_2), produzindo a 2',7'-diclorofluoresceína, a qual emite fluorescência. Quanto maior a fluorescência emitida, maior a quantidade de espécies reativas de oxigênio (GÜNDEL et al., 2019).

No metabolismo celular normalmente ocorre à produção de espécies reativas (ER), em baixas concentrações a produção é benéfica para o organismo, como por exemplo, na indução de resposta mitogênica e a defesa contra agentes infecciosos, além de servirem como mensageiros de sinalização. Entretanto, uma produção elevada de ER pode levar a efeitos indesejáveis como o estresse oxidativo, que pode acarretar em consequências celulares deletérias como peroxidação lipídica,

deformações na membrana celular e desnaturação de proteínas (VALKO et al., 2007; CHUANG; CHEN, 2013).

A peroxidação lipídica (PL), conhecida pela oxigenação dos ácidos graxos, caracteriza-se pela cascata de reações que acontece a partir da ação de ER sobre os lipídios insaturados do organismo. Nos sistemas biológicos, a PL pode ocorrer de forma enzimática envolvendo enzimas como lipoxigenases ou de forma não enzimática envolvendo metais de transição ou ER (LIMA; ABDALLA, 2001).

A PL caracteriza-se por três etapas:

- I) Iniciação: ocorre o ataque de uma ER sobre o ácido graxo poli-insaturado abstraindo um átomo de hidrogênio a partir do grupo metileno, levando a formação de um radical lipídico.
- II) Propagação: o radical será estabilizado por um rearranjo molecular, que forma um dieno conjugado. O dieno, que é um radical alquila, em meios aeróbicos reage com o oxigênio formando o radical peróxido (LOO). O radical peróxido para se estabilizar abstrai um hidrogênio alílico de outro ácido graxo gerando outro radical carbono, dando origem a um hidroperóxido lipídico (LOOH).
- III) Terminação: estabilização dos lipídicos livres e os peróxidos, formando produtos mais estáveis. Entretanto como os peróxidos lipídicos são compostos instáveis tendem a degradar-se em produtos secundários, dentre os quais alguns podem ser utilizados como indicadores de danos oxidativos, como é o caso do malondialdeído (MDA) (GROTTO et al., 2009; SOARES et al., 2016).

O organismo possui um sistema de defesa antioxidante que tem por finalidade contrabalançar a ação das ER que entram em contato com o mesmo, esse sistema pode ser enzimático ou não enzimático. O enzimático visa impedir ou controlar a propagação do processo oxidativo e inclui enzimas como superóxido dismutase (SOD), glutationaperoxidase (GPx) e catalase (CAT). O não enzimático inclui substâncias de origens diversas, como a glutatona (GSH), melatonina, e os antioxidantes obtidos pela dieta como ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), carotenoides e compostos fenólicos (SILVA et al., 2016).

Devido a sua estrutura química e suas propriedades redutoras, os compostos fenólicos estão entre os metabólitos vegetais mais pesquisados e tem recebido uma maior atenção nos últimos anos (VIEIRA et al., 2015). Podem agir neutralizando ou

sequestrando ER, ou ainda quelando metais de transição. Por apresentarem ressonância em seu anel aromático, os intermediários formados na peroxidação lipídica são relativamente estáveis, assim os compostos fenólicos podem agir tanto na etapa de iniciação como na de propagação do processo (SOUZA et al., 2007).

3.6 ATIVIDADE CITOTÓXICA E GENOTÓXICA

A genética toxicológica detecta substâncias capazes de induzir mutação, que caracteriza-se por alterações na molécula de DNA. Esta está exposta a agentes químicos, físicos e/ou biológicos que podem danificá-la alterando suas bases, por exemplo, por ação de espécies reativas de nitrogênio ou oxigênio. O principal modelo em substituição ao uso de animais de experimentação é o cultivo celular, pois sugere se o produto em estudo pode lesar o DNA direta ou indiretamente (QUEIROZ, 2017).

As medidas de genotoxicidade incluem danos ao DNA, mutações e aberrações cromossômicas. O Ensaio Cometa ou Single-Cell Gel Electrophoresis é o método de eletroforese em microgel, que utilizando microscopia avalia danos e reparos de DNA. Caracteriza-se pela sensibilidade, simplicidade, baixo custo, pequeno uso de amostra, fácil aplicação e curto tempo de análise, porém, sua desvantagem é a baixa representatividade celular (BRIANEZI; DE CAMARGO; MIOT, 2009; PÉREZ-IGLESIAS et al., 2017).

A capacidade intrínseca de um material em promover alteração das células de uma cultura celular, culminando ou não na sua morte é conhecida por citotoxicidade. Um dos métodos para sua avaliação *in vitro* é o ensaio colorimétrico quantitativo baseado no sal de tetrazólio MTT (brometo de 3-[4,5-32 dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). Neste as desidrogenases mitocondriais de células vivas reduzem o anel de tetrazólio (composto de coloração amarela) em cristais de formazan (composto de coloração azul)(QUEIROZ, 2017).

3.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O uso indiscriminado de medicamentos tem proporcionado o aumento da resistência antibacteriana no panorama global. Um dos fatores preocupantes nesse campo é que enquanto a quantidade de superbactérias aumenta, observamos uma

redução no ritmo de desenvolvimento de antimicrobianos. Assim, a necessidade de pesquisas para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos se faz necessária (GONÇALVES et al., 2011).

Nesse contexto os extratos de plantas tem sido uma alternativa na busca por novos compostos antibacterianos. O extrato de *S. molle* possui diferentes propriedades terapêuticas, entre elas, a antimicrobiana. A complexidade da composição química da planta faz com que certos componentes direcionem seu uso terapêutico contra determinadas bactérias (MARTINS et al., 2014).

O extrato de *S. molle* apresenta atividade antibacteriana relatada contra o micro-organismo *Staphylococcus aureus* (FERNANDES, 2014). Estudos demonstram que o óleo essencial de *S. molle* apresenta resposta dependente da dose frente aos microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (MEHANI; SEGNI, 2012).

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria com capacidade para sobreviver a ambientes adversos ao seu crescimento, e está presente, principalmente em ambientes hospitalares. É uma bactéria que atinge principalmente imuno comprometidos, e está envolvido nas infecções de feridas por queimaduras, trato urinário, córneas, orelhas, e nos pulmões de pacientes com fibrose cística (TSENG et al., 2013).

Classificada na família das Enterobactérias, a *Klebsiella pneumoniae* confere resistência a inúmeros antibióticos, especialmente da classe dos carbapenêmicos, devido à produção de carbapenemases. É restrita ao ambiente hospitalar, costuma acometer pacientes imuno comprometidos com extensa exposição prévia a cuidados de saúde (MUNOZ-PRICE et al., 2013).

A *Escherichia coli* também pertencente à família das Enterobactérias, é encontrada na microbiota intestinal. É frequentemente utilizada como indicador de poluição da água, uma vez que transita por água e sedimentos. Expressa-se como um dos primeiros micro-organismos a habitar o corpo humano, e é a bactéria responsável pela maioria das infecções do trato urinário (RORIZ-FILHO et al., 2010; TENAILLON et al., 2010).

Mycobacterium tuberculosis pertencente à família Mycobacteriaceae é a bactéria causadora da tuberculose, importante problema de saúde pública. Entre algumas das plantas com ação antimicrobiana desse patógeno esta a *Curcuma longa* (GETAHUN et al., 2015; MARMITT et al., 2015).

Encontram-se, também, entre as micobactérias *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium massiliense*, *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium smegmatis*. As infecções causadas por *M. abscessus* afetam principalmente a pele e tecidos subcutâneos, a doença pulmonar causada por essa micobactéria é altamente prevalente em pacientes com fibrose cística. A infecção geralmente é causada por substâncias contaminadas injetadas ou através de procedimentos invasivos com equipamento ou material contaminado, apresentando-se assim, como uma preocupação na área hospitalar (NESSAR et al., 2012; BERNUT et al., 2014).

Sendo um patógeno oportunista, o *Mycobacterium massiliense* comumente causa infecções de feridas, formação abscessos e pneumonia. Estudos relatam o *Mycobacterium fortuitum* como agente oportunista em infecções causadas após mesoterapia e tatuagens, além de raros casos de endocardite de prótese valvar. A *Mycobacterium smegmatis* caracteriza-se por uma micobactéria de crescimento rápido e causa raras infecções oportunistas em pacientes humanos, como por exemplo, nos tecidos moles da mão (CARDOSO et al., 2008; CORLISS; TIMOTHY, 2009; DIFONZO et al., 2009; BOSIO et al., 2012; LAMRABET; MEDIE; DRANCOURT, 2012; PHILIPS et al., 2014).

3.8 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Segundo a OMS as doenças respiratórias afetam as vias respiratórias como as vias nasais, os brônquios e pulmões; e incluem desde infecções agudas como pneumonites e bronquites até doenças crônicas como a Asma e Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC). Fatores como agentes infecciosos, poluentes atmosféricos, exposição ativa ou passiva ao fumo contribuem para a ocorrência e o aumento da prevalência das doenças que afetam o pulmão (SOUZA et al., 2012; FORO DE LAS SOCIEDADES RESPIRATORIAS INTERNACIONALES, 2017).

A pleurisia/pleurite é uma enfermidade que caracteriza-se por dor súbita no peito, a qual pode ser agravada pela respiração intensa ou tosse. Causada pela inflamação da pleura (membrana que reveste os pulmões), faz com que a expiração do indivíduo afetado seja rápida e superficial. Dentre suas etiologias, a mais frequente é a infecciosa que leva à fraqueza muscular, e por consequência, a diminuição da força física. Pacientes com enfermidades sistêmicas apresentam pleurisia em quase 10% dos casos (RONALD, 2011).

3.8.1 Patologia e Patogenia da Pleurite

A camada dupla e muito fina que recobre os pulmões denomina-se pleura, e é constituída pelas pleuras visceral que envolve os pulmões e parietal que recobre internamente as paredes da cavidade torácica (JOHNSON, 2012). Existe uma camada muito fina de líquido lubrificante entre as duas pleuras, que facilita o deslizamento suave dos pulmões dentro da caixa torácica, quando se enchem e esvaziam de ar (YALCIN; CHOONG; EIZENBERG, 2013).

Ao sofrer inflamação ou infecção a pleura torna-se volumosa, irritada e áspera, podendo causar dor muito intensa no peito. Sendo assim, denomina-se pleurisia o edema (acúmulo anormal de líquidos) causado por diferentes fatores. Entre eles podemos citar os fatores primários (infecções, traumas ou neoplasias) e secundários (processos respiratórios, cardiovasculares, endócrinos e outros) (JOHNSON, 2012; RONALD, 2011).

A inflamação é uma resposta complexa (dinâmica e adaptativa) que envolve fatores bioquímicos e imunológicos, na tentativa de proteger o organismo, removendo estímulos prejudiciais (HANNA, 2012). O aparecimento de sinais cardinais de inflamação (dor, calor, vermelhidão, tumor e perda de função) ocorre devido ao processo inflamatório. O processo inflamatório caracteriza-se pela produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios como: histamina, bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos e citocinas (ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012; BATISTA et al., 2018).

Os alérgenos são um dos mecanismos capazes de ativar as células inflamatórias e mediadores responsáveis pela inflamação brônquica (GLOBAL ASTHMA NETWORK, 2014). A resposta inflamatória alérgica em asmáticos inicia-se pela interação de alérgenos ambientais com os linfócitos T do tipo T helper (Th2), que são células que apresentam os alérgenos ao sistema imunológico, os quais produzem citocinas responsáveis pelo início e manutenção do processo inflamatório. As citocinas liberadas atraem para a superfície da mucosa, entre outros granulócitos, os eosinófilos. A partir daí ocorre um dano que é uma causa de hiper-responsividade crônica, onde a interleucina 5 (IL-5) e o fator estimulante de colônias granulócitos-macrófagos induzem os eosinófilos a produzir cisteinil-leucotrienos e a liberar proteínas dos grânulos que lesam o epitélio (RANG et al., 2012).

3.8.2 Tratamento da Pleurisia

A localização do processo inflamatório ou infeccioso que está causando o quadro de pleurisia é o primeiro passo para se estabelecer o diagnóstico. A auscultação permite localizar os ruídos respiratórios, de modo a predizer a localização do processo, entretanto outras técnicas mais pontuais podem ser utilizadas, como por exemplo: radiografia de tórax, análises de sangue, toracocenteses, tomografia computadorizada, ultrassom, toracoscopia e biópsia (JOHNSON, 2012).

Para o diagnóstico se dá preferência por métodos não invasivos, assim até o estabelecimento do diagnóstico o uso de bandagens elásticas em torno do tórax pode ajudar na diminuição de dores e sintomas da pleurisia. Após diagnóstico o tratamento é feito em cima da causa, em caso de processos inflamatórios utilizam-se anti-inflamatórios; em infecções bacterianas recorre-se ao uso de antibióticos. Caso após tratamento se continue com a sintomatologia, processos invasivos como a biópsia são necessários para uma investigação mais completa (RONALD, 2011).

3.8.3 Modelo de Pleurisia Animal

Servindo como a primeira linha de defesa contra lesões nos tecidos; sejam elas locais e/ou sistêmicas, bem como mobilização de mediadores imuno, endócrino e neurológicos, a inflamação aguda representa uma infecção rápida, inespecífica e de resposta espontânea de um tecido à lesão (KUMAR *et al.*, 2004; NAMAS *et al.*, 2009). Experimentalmente, a inflamação pleural (pleurisia) pode ser reproduzida em roedores através da administração de agentes pró-inflamatórios na cavidade pleural, como por exemplo, cristais de urato ou pirofosfato de cálcio, a carragenina e albumina bovina metilada (SILVA *et al.*, 2017). Extraído de algas marinhas, a carragenina é um agente pró-inflamatório, que uma vez administrado na cavidade pleural desencadeia eventos característicos do processo inflamatório agudo e a ativação da imunidade inata, observados na clínica. Assim, este modelo mostra sua importância sendo útil para investigar o papel dos mediadores e vias envolvidas na inflamação aguda e os efeitos anti-inflamatórios de novos agentes terapêuticos (MOORE; AYOUB; SEED, 2010).

Experimentalmente o modelo de pleurisia induzida por carragenina reproduz os eventos principais da inflamação aguda de forma similar à humana assim, tem sido amplamente utilizado para investigar a fisiopatologia da inflamação aguda na pleurisia. A injeção no espaço pleural leva a lesão pulmonar, inflamação local e infiltração por leucócitos polimorfonucleares (PMNs), o que nos permite avaliar o papel dos mediadores envolvidos em danos celulares. Vários tipos de células, incluindo neutrófilos, macrófagos, monócitos e linfócitos, podem estar envolvidos na incidência de inflamação aguda, entretanto os linfócitos (células B e T) são os que estão presentes no parênquima pulmonar e ao longo das vias aéreas (SINGH *et al.*, 2003; CORSINI *et al.*, 2005; MOLDOVEANU *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010; PETRONILHO *et al.*, 2015).

A reação aguda provocada pela carragenina é caracterizada por migração e acumulação de exsudato pleural devido ao aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos; produção de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e quimiocinas, produtos de ativação do complemento e proteases; além de níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (EROS) (WARD, 2010). As EROS produzidas a partir de PMNs e outras fontes celulares podem desempenhar um papel crucial na destruição de tecidos e órgãos associados ao processo inflamatório (MITTAL *et al.*, 2014). As células podem responder ao estresse de várias maneiras, incluindo a ativação de caminhos que permitem a sobrevivência e promoção da apoptose (morte celular programada), bem como a eliminação de células danificadas (ELMORE, 2007).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As folhas e folíolos da parte intermediária da planta de *S. molle* foram coletadas no dia quinze de maio de 2017 no distrito de Pains (29°46'25.5"S 53°41'26.2"W), localizado na cidade de Santa Maria no Rio Grande do Sul. O material vegetal foi identificado pelo Prof° Dr. Renato Aquino Záchia (UFSM). O material testemunho (Anexo A) está depositado no herbário do departamento de Biologia da UFSM, sob o registro SMDB-15.062. A obtenção do extrato ocorreu no Laboratório de Investigações Fitoquímicas (LABINFITO) da UFSM, onde 1.500 g do material coletado foram desidratados em estufa com circulação de ar ($\pm 45^{\circ}\text{C}$) pulverizado em moinhos de facas e armazenado em frasco âmbar.

4.1.1 Preparo do Extrato Bruto

Mil e duzentos gramas de material pulverizado foram macerados com o líquido extrator etanol 70% (proporção 1:10). Em dias alternados o recipiente foi vigorosamente agitado, sendo o solvente renovado uma vez por semana durante 60 dias. Procederam-se 3 macerações com 8 extrações cada, a partir de 400 g de material vegetal em cada maceração. Após esse período, os extratos foram recolhidos, o solvente evaporado a 45°C sob pressão reduzida em rotavapor, e após liofilização o extrato seco foi armazenado em frasco âmbar.

4.2 QUANTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

4.2.1 Determinação de Fenóis Totais

A determinação do teor de fenóis totais foi realizada pelo método do Folin-Ciocalteu modificado (CHANDRA; MEJIA, 2004). Nessa metodologia a concentração de fenóis totais na amostra é determinada a partir da curva padrão de ácido gálico nas concentrações de 1,0; 3,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50,0 $\mu\text{g/mL}$.

Para a realização do teste em 1 mL do extrato aquosa (0,1%), adiciona-se mesmo volume de reativo Folin-Ciocalteu. Após incubar por 5 minutos acrescenta-

se 2 mL de carbonato de sódio a 20% (preparado na hora do uso). Após nova incubação de 10 minutos no escuro, realiza-se a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro no comprimento de onda de 730 nm.

A análise de cada ponto da curva e da amostra foi realizada em triplicata. Obteve-se a equação da reta pela curva de calibração construída através das respectivas leituras das absorvâncias *versus* as concentrações de Ácido Gálico. O teor de fenóis totais na amostra é calculado pela equação da reta.

4.2.2 Determinação de Taninos

Realizou-se a determinação de taninos pelo método da vanilina modificado (COSTA et al., 1999). A concentração de taninos na amostra foi determinada a partir da curva padrão de catequina nas concentrações de 25,0; 50,0; 150,0; 300,0; 450,0; 600,0; 750,0; 900,0; e 950,0 µg/mL.

Na análise 1 mL de amostra (0,04%) previamente diluída em Metanol 80% adicionou-se 5 mL de Vanilina 4% (solução CH₄O:HCl). Após 15 minutos de incubação realizou-se a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro com comprimento de onda em 490 nm.

A análise de cada ponto da curva e da amostra foi realizada em triplicata. A equação da reta é obtida pela curva de calibração construída através das respectivas leituras das absorvâncias *versus* as concentrações de catequina. O teor de taninos na amostra é calculado pela equação da reta.

4.2.3 Determinação de Flavonoides

O teor de flavonoides determinou-se de acordo com o método do Cloreto de Alumínio (AlCl₃) (ZHISHEN; MENGCHENG; JIANMING, 1999). A concentração de flavonoides é obtida através da curva padrão de Rutina, a partir de soluções com concentrações crescentes de 40,0; 80,0; 120,0; 160,0 e 200,0 µg/mL.

Em 500 µL de amostra aquosa (0,04%), adicionou-se 1 mL de água destilada e 150 µL de Nitrito de Sódio 5% (NaNO₂). Após incubação de 5 min adicionou-se 150 µL de AlCl₃, e incubou-se por mais 6 min. Decorrido o tempo acrescentou-se 2 mL de Hidróxido de Sódio 4% (NaOH) e 1,2 mL de água destilada, e incubou-se mais 15 min até leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 510 nm.

A análise de cada ponto da curva e da amostra foi realizada em triplicata. Obteve-se a equação da reta pela curva de calibração construída através das respectivas leituras das absorbâncias *versus* as concentrações de Rutina. O teor de flavonoides na amostra é calculado pela equação da reta.

4.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES NO EXTRATO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A análise qualitativa e quantitativa de compostos fenólicos foi realizada pelo método da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplado a um detector de diodo (DAD), seguindo metodologia proposta por CALZADA et al. (2018). Utilizou-se cromatógrafo líquido (SHIMADZU, Kyoto/Japão), composto de bomba modelo LC-20AT, injetor automático SIL-20A, detector DAD SPD-M20A e comunicador CBM 20A, controlado por Software LC SP1. A coluna analítica utilizada foi Zorbax Eclipse Plus, com fase estacionária sílica C 18, partícula com 5 µm de diâmetro, dimensões de 4,6 mm por 150 mm.

A eluição ocorreu com fluxo de 1,0 mL/min, com gradiente de eluente para as fases móveis: A (acetonitrila) e B (ácido acético 2%) [4:96 v/v, 0 min; 12:88 v/v, 20 min; 20:80 v/v, 30 min; 50:50 v/v, 45 min; e 4:96 v/v, 60 min]. A amostra foi preparada na concentração de 10 mg/mL, retirou-se 20 µL e diluiu-se em 980 µL de MeOH resultando em 0,2 mg de extrato. O volume de injeção foi de 20 µL e a detecção acompanhada em sistema de fotodiodo entre 230-400 nm, durante 60 minutos.

A identificação dos compostos fenólicos fez-se através de comparação do tempo de retenção das amostras com os padrões rutina e quercetina Merck. A curva padrão da rutina foi obtida por injeção, em triplicatas, de cinco concentrações de soluções estoque (0,01, 0,03, 0,06, 0,09 e 0,12 mg/mL). A equação da reta e o coeficiente de correlação foram então derivados da curva padrão.

4.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

4.4.1 Método radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)

Para a avaliação quantitativa da capacidade antioxidante do EXB de *S. molle* realizou-se a técnica de Choi et al (2002) modificada, utilizando o Ácido Ascórbico para obter a curva padrão nas concentrações de 1,5625; 3,125; 6,25; 12,5; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0 µg/mL, como controle negativo utilizou-se uma solução de DPPH diluída em metanol.

Para curva de calibração adicionou-se em tubo de ensaio 2,5 mL de cada concentração de Ácido Ascórbico, 1 mL de solução de DPPH 0,3 mM solubilizada em 2,5 mL de etanol. Após incubação no escuro por 30 minutos as leituras em espectrofotômetro foram realizadas no comprimento de onda de 518 nm. O ensaio foi realizado em triplicata com os padrões e a amostra.

A percentagem de inibição é calculada pela equação:

$$\% \text{ Inibição} = 100 - \frac{(\text{Abs da amostra} - \text{Abs do branco}) \times 100}{\text{Abs do controle}}$$

O gráfico obtido através da relação da porcentagem de inibição do radical DPPH *versus* as concentrações do padrão e dos extratos permite determinar a concentração do padrão e do extrato (µg/mL) necessária para atingir 50% de atividade sequestrante de radicais DPPH (IC₅₀), assim indicando a capacidade antioxidante do EXB de *S. molle*.

4.4.2 Cultivo celular

Sangue humano periférico foi usado para as análises de viabilidade celular, citogenotoxicidade e genotoxicidade. As amostras foram obtidas no Laboratório Escolar de Análises Clínicas da Universidade Franciscana, sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da instituição (CAAE: 31211214.4.0000.5306). Para isso, foi coletado sangue humano de voluntários saudáveis por punção venosa usando um Vacutainer VR (BD Diagnostics, Plymouth, Reino Unido) e tubos de heparina. O gradiente de densidade Histopaque-1077VR foi usado para separar células mononucleares usando amostras de sangue de 4 mL. Após a separação, células a uma densidade inicial de $2,5 \times 10^5$ foram tratadas em

placa de cultura celular com 96 poços com extrato bruto de *S. molle* nas concentrações de 10, 15, 30 e 60 µg/mL, concentrações previamente determinadas a partir do IC₅₀ do EXB obtido no ensaio de DPPH.

4.4.3 Teste Óxido Nítrico

A placa de cultura celular foi centrifugada após incubação dos tratamentos (10, 15, 30 e 60 µg/mL de EXB) em células viáveis, o sobrenadante foi separado para a realização do ensaio. Foram transferidos 100 µL dos respectivos sobrenadantes dos testes para placa de Elisa de 96 poços. Após, 100 µL do reagente de Griess foram incorporados ao sobrenadante. Esse reagente é composto por uma solução I (Sulfanilamida 1%) + solução II (N-1-naftilenodiamino-bicloridrato), na proporção 1:1 (v/v). Após 15 minutos de incubação em temperatura ambiente, as placas foram lidas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram calculados em porcentagem em relação ao controle negativo (CHOI et al., 2012).

4.4.4 Teste do Diacetato Diclorofluoresceína (DCFH-DA)

Uma curva padrão nas concentrações de 0,4; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 µM foi preparada, utilizando placa de cultura celular e os reagentes TRIS HCl (10mM) pH7,4, DFC (10µM) e DCFH-DA (0,1mM). Para o preparo da amostra foram pipetados 100 µL do EXB nas concentrações de estudo (10, 15, 30 e 60 µg/mL), previamente preparadas na placa de cultivo celular, 130 µL de solução TRIS HCl (10 mM) pH 7,4 e 20 µL de DCFH-DA (0,1 mM). O ensaio foi realizado em triplicata. Após incubação de uma hora no escuro e a temperatura ambiente, realizou-se leitura em espectrofluorímetro. A fluorescência foi determinada com base nos comprimentos de onda de excitação (488 nm) e de emissão (525 nm) (ESPOSTI et al., 2002).

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E GENOTÓXICA

4.5.1 Avaliação da Citotoxicidade pelo Ensaio de MTT

Amostras do EXB de *S. molle* nas concentrações de 10, 15, 30 e 60 µg/mL, foram analisadas pelo método de MTT, onde o reagente brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), solúvel em água e de coloração amarela, foi incorporado em células viáveis tratadas com o EXB (20 µL na concentração de 5 mg/mL em PBS). As placas de cultivo celular foram homogeneizadas e mantidas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂, por 1 hora. Por meio da enzima succinato desidrogenase, a atividade mitocondrial das células viáveis reduz o MTT. Este é convertido em cristais azul de formazan, os quais são insolúveis em água e apresentam coloração azul-púrpura.

Após a incubação, foi descartado 180 µL do sobrenadante e adicionou-se 200 µL de DMSO (dimetilsulfóxido). Posterior a centrifugação de 10 minutos a 2000 rpm, retirou-se 100 µL da solução e transferiu-se para placa de 96 poços. As amostras foram quantificadas por espectrofotometria no comprimento de onda de 570 nm. O valor de absorbância obtido foi proporcional ao número de células viáveis em comparação ao controle negativo (FUKUI; YAMABE; ZHU, 2010).

4.5.2 Avaliação da Genotoxicidade pelo Ensaio Cometa

Para o ensaio cometa em uma lâmina de vidro, previamente coberta com uma camada de agarose de baixo ponto de fusão 5%, as amostras de extrato bruto previamente depositadas na placa de cultivo celular, foram suspensas. O material foi imerso em solução de lise (89 mL de solução para 10 mL de DMSO e 1 mL Triton X-100), para a remoção das membranas e citoplasmas das células, a solução de lise foi preparada a partir de 146,1g de NaCl, 37,2g de EDTA e 1,2 g de Tris base em 800 mL de água destilada. As lâminas foram então incubadas em tampão alcalino de eletroforese (300 mM NaOH e 1 mM EDTA em água destilada), e realizou-se corrida eletroforética por 30 minutos a 25 V e 300 mA. Após, realizaram-se os processos de neutralização, fixação e coloração para possibilitar a análise do material genético. A análise de cada lâmina foi realizada com o auxílio de um microscópio óptico, e as

células foram comparadas com o controle negativo (células viáveis sem nenhum tipo de tratamento). O EXB foi avaliado nas concentrações 10, 15, 30 e 60 µg/mL, assim como no ensaio de MTT (MCKELVEY-MARTIN et al., 1993).

4.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para avaliação da atividade antimicrobiana frente às bactérias *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* pelo método de microdiluição em caldo, o EXB de *S. molle* foi diluído duas vezes em série variando de 3,75 a 20,02929 mg/mL. As placas foram incubadas a 37 °C e as CIMs foram registradas após 24 h de incubação. A CIM foi definida como a menor concentração de compostos que inibe o crescimento visível bacteriano. Este teste foi realizado em triplicata e o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio foi utilizado como indicador de crescimento microbiano (CLSI, 2013).

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) para o EXB de *S. molle* frente às micobactérias *M. tuberculosis*, *M. abscessus*, *M. massiliense*, *M. fortuitum* e *M. smegmatis*, foi realizada pesando 15,00 mg do extrato de *S. molle*, e este foi diluído em 1 mL de álcool etílico absoluto, obtendo-se uma concentração inicial de 15,0 mg/mL. A suspensão bacteriana foi preparada na escala 0,5 de Mc Farland, com solução salina 0,9 % e auxílio de espectrofotômetro (absorbâncias na faixa de 0,08 a 0,1). Transferiram-se 40 µL da suspensão bacteriana para tubo de ensaio contendo 3960 µL de caldo Muller-Hinton (CLSI, 2013).

Em uma placa de Elisa de 96 poços, foram adicionados aos poços P1 a P8 100 µL de caldo Muller-Hinton. No poço P1 foram adicionados também 50 µL do extrato diluído. Posteriormente, iniciaram-se as diluições seriadas até o poço P8, desprezando-se, por fim, 100 µL. Em todos os poços foram adicionados 100 µL de inóculo, obtendo concentração final de 3750 µg/mL no poço P1; 1875 µg/mL em P2; 937 µg/mL em P3; 468 µg/mL em P4; 234 µg/mL em P5; 117 µg/mL em P6; 58 µg/mL em P7 e 29 µg/mL em P8.

Para o controle negativo (poço P9), foram utilizados 200 µL de caldo Muller-Hinton. No controle positivo (poço P10) foram adicionados 100 µL de caldo Muller-Hinton e 100 µL de inóculo. Para o controle do extrato foram utilizados 100 µL de caldo Muller-Hinton e 100 µL de extrato. Foram realizadas as mesmas diluições feitas com a amostra para os controles. As CIMs das micobactérias foram

registradas após incubação de 72h a 30°C, exceto para *Mycobacterium tuberculosis*, onde as placas foram incubadas por 7 dias a 37°C. Todas as análises foram realizadas em triplicata, e o procedimento para a análise da atividade antimicobactérias está representado na tabela 1 (NCCLS, 2003).

Tabela 1: Procedimento para análise da atividade antimicobacteriana.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
L1	3750	1875	937	468	234	117	58	29	C-	C+
L2	3750	1875	937	468	234	117	58	29	C-	C+
L3	3750	1875	937	468	234	117	58	29	C-	C+
L4	CE	CE	CE	CE	CE	CE	CE	CE	CE	CE

P1 a P10: número de poços da placa de Elisa utilizados no experimento; L1 a L4: número de linhas da placa de Elisa utilizadas no experimento; C-: controle negativo; C+: controle positivo; CE: controle do extrato

4.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

4.7.1 Animais e Grupos Experimentais

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Maria, registrado sob o número CEUA N° 6736291118. Foram usados 24 ratos machos adultos, espécie Wistar pesando entre 100 e 250g, provenientes do Biotério Central da UFSM. Os animais foram mantidos sob um período de adaptação, com fotoperíodo de 12 h claro e escuro e temperatura ambiente de 23°C±1, mantidos por ar condicionado e receberam ração e água *ad libitum*. Os animais foram divididos em 5 grupos de acordo com o tratamento recebido (Tabela 2).

Tabela 2: Grupos tratamento animal.

GRUPO	Tratamento
CTR	Apenas solução salina
EXB	Apenas EXB de <i>S. molle</i> (100 mg/Kg)
CAR	Solução salina e carragenina
CAR+EXB	EXB de <i>S. molle</i> (100 mg/Kg) e carragenina
CAR+IND	Indometacina 10 mg/Kg e carragenina

4.7.2 Indução da Pleurisia

A pleurisia foi induzida no 22º dia de experimento sendo os animais anestesiados com injeção, intraperitoneal, de cetamina e xilazina (3:1 v/v) 10 minutos antes da injeção de salina estéril (0,9% NaCl) contendo carragenina 2% no espaço intrapleural direito. O grupo controle recebeu 0,2 mL de solução salina estéril de acordo com Petronilho et al. (2015) modificado. A eutanásia dos animais foi realizada, após 2 horas da indução da pleurisia, por punção cardíaca sob anestesia com isoflurano. As amostras sanguíneas foram coletadas em tubos de ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) para o isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).

4.7.3 Análises Hematológicas

A análise hematológica foi realizada em contador eletrônico (BC- 2800 Vet – Auto Hematology Analyser, Mindray ®) a partir das amostras coletadas na eutanásia sendo determinado: concentração de eritrócitos totais ($\times 10^6/\mu\text{L}$), concentração de hemoglobina (g/dL), concentração de plaquetas (μL) e concentração de leucócitos totais (μL), volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). O diferencial leucocitário foi realizado em microscopia de imersão, em aumento de 1000x, a partir de esfregaços sanguíneos confeccionados em lâmina de vidro e corados com Panótico rápido (Diff-Quick ®). A proteína plasmática total (PPT) foi verificada por refratometria, utilizando-se a porção plasmática do capilar de microhematócrito.

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) com o teste de Dunnet para análises *in vitro* e como média \pm S.E.M. One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni (n=5) para a análise *in vivo* usando o software Graph Pad Prism versão 6.0 e foram expressos como a média. O nível de significância estatística foi definido como $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO

A partir de mil e duzentos gramas (1200g) de material pulverizado macerados com o etanol 70% obteve-se, após liofilização, cento e trinta e um gramas (131g) de extrato seco, com rendimento 10,92%.

5.2 DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os metabólitos secundários fenóis totais, taninos e flavonoides quantificados no EXB *S. molle* foram calculados a partir das curvas de calibrações das substâncias padrão para cada metabólito (Tabela 3). O EXB de *S. molle* apresentou para fenóis totais, taninos e flavonoides valores, $79,14 \pm 0,02$ mg EAG g^{-1} ; $231,67 \pm 2,49$ mg ERUT g^{-1} e $52,65 \pm 0,00$ mg ECAT g^{-1} , respectivamente.

Tabela 3: Equação da reta, valor de r e substância padrão utilizada na análise de fenóis totais, taninos e flavonoides.

Metabólito Secundário	Equação da Reta	Valor de r	Padrão
Fenóis Totais	$y = 0,0298x + 0,0076$	0,9984	Ácido Gálico
Taninos	$y = 0,0002x + 0,0009$	0,9992	Catequina
Flavonoides	$y = 0,0023x - 0,0013$	1	Rutina

Fonte: Autor

O Ácido Gálico, um dos fenóis amplamente encontrado em produtos naturais, demonstra grande atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica e antitumoral (LIMA, 2014). A análise do extrato da aroeira apresenta resultado menor ($79,14 \pm 0,02$ EAG g^{-1}) quanto ao teor de fenóis totais, quando comparado a *Myracrodruon urundeuva* (aroeira do campo), que apresenta teor (194 EAG g^{-1}) maior que a *S. molle* (VIEIRA et al., 2015). Apesar de ambas as espécies pertencerem à família Anacardiaceae, a diferença ocorre pela singularidade de cada espécie.

O teor de fenóis totais encontrados para o EXB de *S. molle* foi significativo também, quando comparado com o resultado de Mellitz (2017), onde a espécie *S. molle* apresentou 4,57 mg EAG g⁻¹. O que pode justificar a discrepância nos resultados é que o material vegetal utilizado por Mellitz (2017) foi às cascas, uma parte mais rígida da planta que requer uma extração mais eficiente e um tempo mais prolongado de contato, entre a amostra e solvente, para que ocorra a extração do composto de interesse.

A Catequina, tanino condensado, é um composto fenólico com capacidade antioxidante considerável (UETA et al., 2014). O estudo do teor de taninos (231,67±0,00 mg ECAT g⁻¹) mostrou-se significativo, uma vez que o EXB de *S. molle* apresenta valores superiores aos valores encontrados por Lins et al. (2015) para *Melissa officinalis* (Erva-cidreira) com 16,718±0,721 mg g⁻¹ e a *Cymbopogon citratus* (Capim-cidreira) com 90,07±0,098 mg g⁻¹, plantas medicinais popularmente utilizadas. O resultado da análise também se mostrou significativa comparada ao estudo de Bernardes et al. (2011), onde os valores de taninos encontrados nos frutos e casca dos frutos de *Schinus terebinthifolius*, foram inferiores (2,70% e 2,54%, respectivamente). A diferença de espécies comparadas e de material vegetal utilizado como amostra pode justificar a diferença nos resultados encontrados para o teor do metabólito analisado.

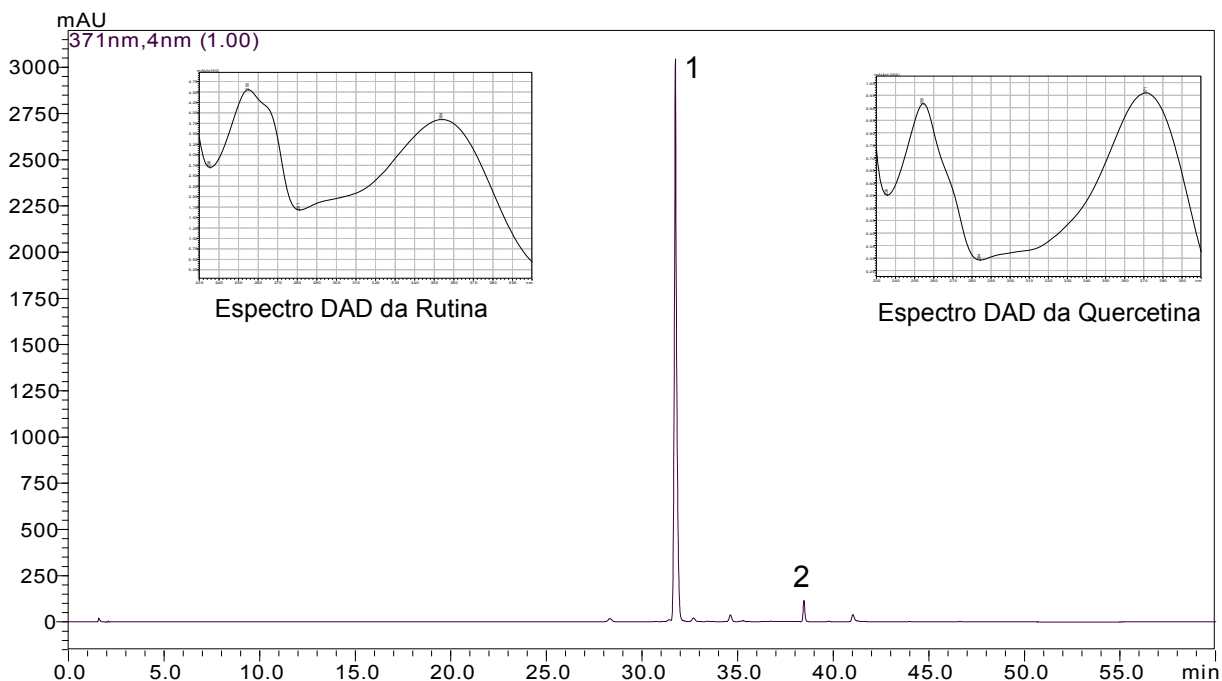
A Rutina é um flavonoide pertencente à subclasse dos flavonóis com ação terapêutica e não tóxica em patologias que envolvem a ocorrência de radicais livres (BECHO; MACHADO; GUERRA, 2009). A capacidade antioxidante dos flavonoides no organismo humano é o resultado de uma combinação de propriedades quelantes do ferro e dos capturadores de radicais livres (CIAPPINI et al., 2013). O teor de flavonoides (52,65±2,49 mg ERUT g⁻¹) encontrado no EXB de *S. molle* é significativo, uma vez que se aproxima do teor (69,67±3,34 mg/g) em *S. terebinthifolius*, planta do mesmo gênero (ULIANA et al., 2016).

5.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES NO EXTRATO POR CLAE

No EXB de *S. molle* foram identificados às substâncias rutina (1) e quercetina (2) (Figura 7). A identificação ocorreu pela análise dos tempos de retenção com

comparação dos espectros DAD das substâncias no comprimento de onda de 371 nm (rutina – 31,54 min e quercetina – 41,02 min).

Figura 7: Cromatograma do EXB de *S. molle* obtido por CLAE.



Fonte: Autora

A quantificação das substâncias identificadas ocorreu pelo cálculo da área sobre a curva. As equações das retas obtidas através da curva padrão dos compostos, os valores de r e os teores encontrados para as substâncias estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4: Equação da reta, valor de r e teores de rutina e quercetina presentes no EXB de *S. molle* obtido por CLAE.

Substância	Equação da reta	Valor de r	Teor mg/g
Rutina	$y = 3E+07x - 14850$	0,9998	58,63
Quercetina	$y = 9E+07x - 152615$	0,9999	0,665

Fonte: Autora

A presença dos flavonoides rutina e quercetina já havia sido elucidada por Gehrke (2012) na espécie *S. molle* e também foram identificadas nas demais

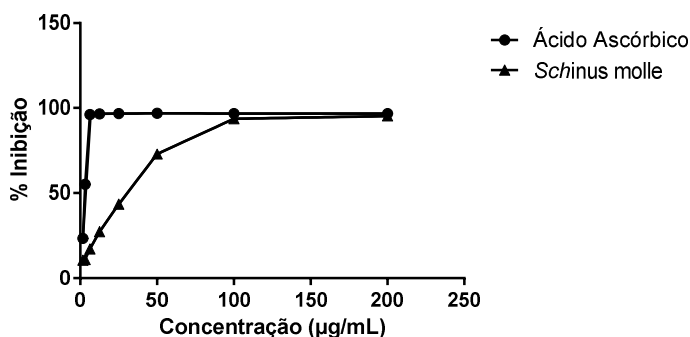
espécies do gênero *Schinus*. Os valores encontrados na análise do EXB de *S. molle* demonstram que a substância presente em maior concentração é rutina (1). A Rutina caracteriza-se por ser um flavonoide com ação terapêutica e que normalmente apresenta ação não tóxica em patologias que envolvem a produção de radicais livres. A combinação de propriedades quelantes do ferro e dos capturadores de radicais livres fornece a capacidade antioxidante dos flavonoides dentro do organismo humano (CIAPPINI et al., 2013).

5.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

A capacidade antioxidante foi avaliada pelos métodos de ensaio do sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), teste do óxido nítrico e teste do diacetato difluorosceína (DCFH-DA). O método da eliminação do DPPH molécula estável, com aplicabilidade e viabilidade é uma das técnicas atualmente utilizadas para verificar a capacidade antioxidante de compostos e baseia-se na neutralização ou na redução do radical.

A partir da construção da curva de calibração para o DPPH e para o Ácido ascórbico (substância padrão) foi avaliada quantitativamente a capacidade antioxidante de *S. molle*. A partir da equação da reta da curva, foi calculado para o EXB de *S. molle* e para o Ácido Ascórbico o IC_{50} , que caracteriza-se pela concentração inibitória capaz de sequestrar 50% do radical DPPH. As porcentagens de inibição do radical DPPH pelo padrão Ácido ascórbico e pelo EXB de *S. molle* proporcionaram o gráfico com variáveis % de inibição e concentração (Figura 8).

Figura 8: Capacidade antioxidante pelo método do DPPH expresso em % de inibição EXB de *S. molle*.



Fonte: Autora.

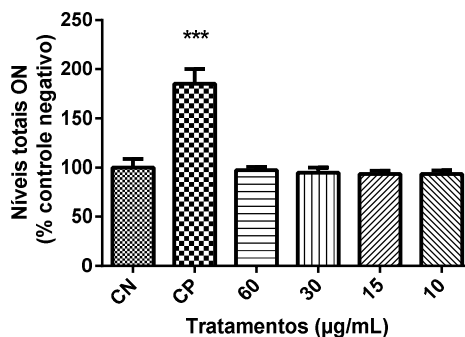
Os resultados apresentam o Ácido Ascórbico com $IC_{50}=3,42\pm 0,86$ $\mu\text{g/mL}$ e EXB de *S. molle* $IC_{50}=30,54\pm 0,41$ $\mu\text{g/mL}$, quanto menor a absorvância da solução contendo o radical DPPH e o padrão Ácido Ascórbico ou o EXB de *S. molle* maior é a porcentagem de inibição; o que indica maior capacidade antioxidante. Sendo assim, os resultados apontam que o EXB de *S. molle* possui capacidade antioxidante, e que quanto maior a concentração do extrato utilizada, mais próxima do padrão fica essa capacidade.

Estudo de Singh et al. (2015) com a *Jurinea dolomiaea* também avaliou a capacidade antioxidante do Ácido Ascórbico, demonstrando que o EXB de *S. molle* apresenta $IC_{50}=30,54$, próximo ao do Ácido Ascórbico $IC_{50}=21,0$ $\mu\text{g/mL}$, o que supõem a capacidade antioxidante do extrato. Dentre a família Anacardiaceae, *Sclerocarya birrea* e *Harpephyllum caffrum* apresentam grande capacidade antioxidante, uma vez que seus IC_{50} para os extratos da folha são de 5,60 e 6,86 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente; valores próximos ao obtido para o padrão Ácido Ascórbico (MOYO et al., 2010).

A *Myracrodruon urundeuva* também da família Anacardiaceae, apresentou no estudo de Vieira et al., (2015) $IC_{50}=12,9\pm 0,2$. Em estudo de Martins et al. (2014) o óleo essencial das folhas de *S. molle* apresenta uma porcentagem de inibição ($IC_{50}=16,0$ $\mu\text{g/mL}$) quatro vezes menor que o óleo dos frutos dela ($IC_{50}=64,0$ $\mu\text{g/mL}$), entretanto ambas as amostras apresentam capacidade antioxidante, quando comparadas ao ácido ascórbico. Esses resultados corroboram que a família Anacardiaceae apresenta forte capacidade antioxidante.

A avaliação da capacidade do EXB de *S. molle* de inibir a produção de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) ocorreu pelo ensaio do óxido nítrico. A figura 9 demonstra hormese nos resultados obtidos, pois todas as concentrações do EXB testadas quando comparadas entre elas e ao controle negativo, foram eficientes para combater a produção de ERNs.

Figura 9: Ensaio óxido nítrico para EXB *S. molle*.



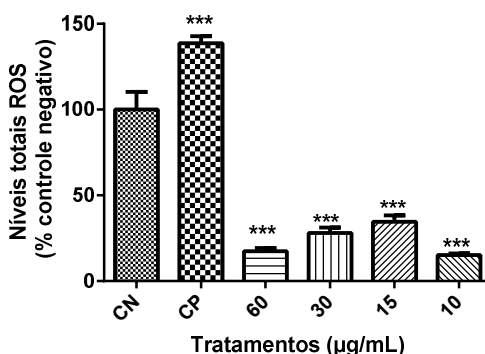
Ensaio Óxido Nítrico após 24h de incubação. Os resultados foram expressos em porcentagem do controle negativo (100%). Sendo CN o controle negativo: células em meio de cultura. Os dados foram expressos com média \pm desvio padrão (D.P.). As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de 1 via, seguida por teste *post hoc* de Dunnett. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Fonte: Autor

A *Myracrodoum urundeuva* conhecida como aroeira do sertão e pertencente à família Anacardiaceae é utilizada entre outros motivos por sua ação anti-inflamatória. Estudo de Pereira (2017) demonstra que o extrato aquoso da *M. urundeuva* tem inibição das ERNs menor que o controle, ao passo que o extrato de acetato de etila inibiu a produção das ERNS. Assim o EXB de *S. molle*, mostra-se promissor, já que apresentou ação contra as ERNs, mesmo sendo obtido por solvente hidroalcolico.

Outro ensaio que permite analisar a capacidade de inibir as espécies reativas, principalmente das de oxigênio (EROs) é o ensaio DCFH-DA. A figura 10 demonstra que todas as concentrações testadas apresentaram resultados melhores que o controle negativo frente as EROs. Ainda foi observado que as concentrações que apresentaram melhor capacidade de inibição foram as de 60 e 10 µg/mL. Esta última apresentou um resultado ainda mais satisfatório, visto que apresenta-se como um resultado hormético, ou seja, a maior concentração de extrato não é que apresenta a melhor inibição, o que normalmente é esperado para ensaios de extratos vegetais.

Figura 10: Ensaio DCFH-DA para EXB *S. molle*.



Ensaio DCFH-DA após 24h de incubação. Os resultados foram expressos em porcentagem do controle negativo (100%). Sendo CN o controle negativo: células em meio de cultura. Os dados foram expressos com média \pm desvio padrão (D.P.). As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de 1 via, seguida por teste *post hoc* de Dunnett. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Fonte: Autora

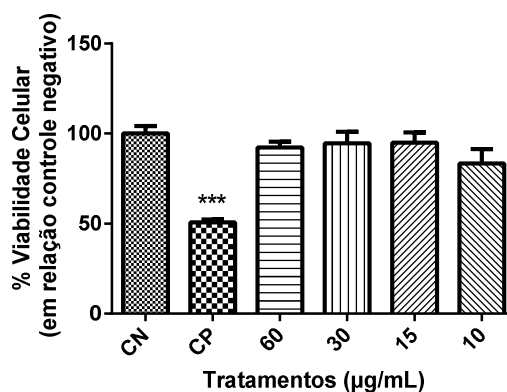
Os compostos fenólicos presentes na Manga (*Mangifera indica* L.) pertencente à família Anacardiaceae assim como o gênero *Schinus*, reduziram os sinais de EROs necessárias para conduzir a proliferação de células tumorais, demonstrando ação antioxidante da planta (TALCOTT; TALCOTT, 2009). Não foram encontrados outros trabalhos utilizando o teste de DCFH-DA para realizar-se uma melhor correlação de resultados.

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E GENOTÓXICA

5.5.1 Avaliação da Citotoxicidade pelo Ensaio de MTT

Para a avaliação da citotoxicidade do EXB de *S. molle* foi realizado o ensaio de MTT. As quatro concentrações do EXB testadas no teste do MTT aumentaram o efeito proliferativo nas células, de modo que como etapa adicional ao teste realizou-se lavagem do extrato para eliminação de interferentes, como alguns metabólitos secundários, a exemplo os compostos fenólicos. Assim, conforme figura 11, as quatro concentrações mantiveram a viabilidade celular, bem como o controle negativo, apresentando-se como não citotóxicas.

Figura 11: Ensaio MTT para EXB *S. molle*.



Ensaio MTT após 24h de incubação. Os resultados foram expressos em porcentagem do controle negativo (100%). Sendo CN o controle negativo: células em meio de cultura. Os dados foram expressos com média \pm desvio padrão (D.P.). As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de 1 via, seguida por teste *post hoc* de Dunnett. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Fonte: Autora

Em estudo realizado por Meneses et al. (2015) a ação do óleo essencial de *S. molle* sobre a viabilidade de esporos de *Aspergillus parasiticus* ocorreu somente nas concentrações mais altas. Entretanto, como o uso do ensaio do MTT não havia sido relatado para óleos essenciais em esporos de fungo, problemas como a volatilização do óleo pode ter sido a causa de resultados inespecíficos.

O extrato de *S. molle* apresentou atividade citotóxica na linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano (Hep G2), já o óleo essencial foi citotóxico em linhagem celular de carcinoma de mama. A citotoxicidade do óleo essencial pode estar relacionada a constituintes menores presentes na espécie (QUISPE et al., 2016).

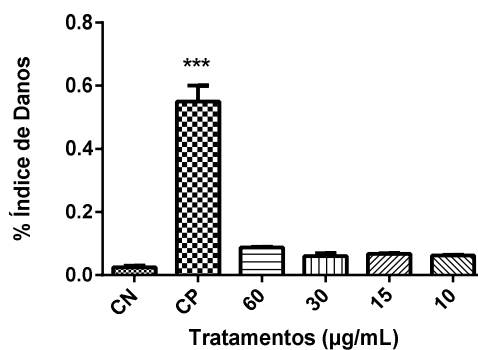
No presente estudo o EXB de *S. molle* em todas as concentrações testadas apresentaram resultados próximo ao controle negativo, não afetando a viabilidade celular. Entretanto mais estudos da ação do extrato em células saudáveis são necessários, uma vez que a maior parte dos estudos encontrados na literatura são da ação do extrato em células carcinogênicas.

5.5.2 Avaliação da Genotoxicidade pelo Ensaio Cometa

Utilizado para investigar o dano de substâncias ao DNA das células, o Ensaio Cometa, tem sido amplamente utilizado em análises. Foram utilizadas as mesmas concentrações de EXT de *S. molle* que no ensaio de MTT (10, 15, 30, 60 $\mu\text{g/mL}$).

Analisando a figura 12, pode-se observar que todas as concentrações testadas da amostra não apresentaram dano significativo ao DNA. Dentre as diferentes concentrações a de 30 e 10 $\mu\text{g/mL}$ foram as que mais se aproximaram do controle negativo. O ensaio cometa demonstrou que o EXB de *S. molle* não apresentou dano ao DNA das células, uma vez que o índice de danos ficou próximo à zero para as quatro concentrações do EXB testadas.

Figura 12: Ensaio Cometa para EXB *S. molle*.



Ensaio cometa após 24h de incubação. Os resultados foram expressos em porcentagem do controle negativo (100%). Sendo CN o controle negativo: células em meio de cultura. Os dados foram expressos com média \pm desvio padrão (D.P.). As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de 1 via, seguida por teste *post hoc* de Dunnett. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Fonte: Autora

No estudo desenvolvido por Duarte et al. (2018) onde foi analisado o óleo volátil da *S. molle* apenas a DL_{50} e a $DL_{50/10}$ apresentaram dano significativo para os macrófagos humanos, quando comparados ao grupo controle negativo, de modo que essas apresentam mais de 20% de dano ao DNA. Em contrapartida, o óleo volátil não provocou danos de DNA significativos em nenhuma das concentrações testadas na cultura de linfócitos humanos.

Lin et al. (2014) analisaram a ação do α -felandreno no dano ao DNA, onde verificaram que o α -felandreno induziu dano ao DNA baseado na produção da cauda do cometa e que as doses mais altas levaram a um dano maior. Sendo assim, o EXB de *S. molle* demonstra-se promissor, apesar de requerer mais estudos, uma vez que o índice de dano ao DNA foi quase nulo.

5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A partir da Concentração Inibitória Mínima (CIM) a atividade antimicrobiana do EXB de *S. molle* foi determinada. A tabela 5 apresenta os resultados obtidos nas análises.

Tabela 5: Resultados obtidos na CIM do EXB *S. molle*.

Bactéria	ATCC	CIM ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1705	9375
<i>Escherichia coli</i>	35218	9375
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	18750
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	27294	1875
<i>Mycobacterium abcessus</i>	19977	937
<i>Mycobacterium massiliense</i>	48898	937
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	6841	937
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	700084	468

Fonte: Autora.

Observando os resultados obtidos, nota-se que o extrato apresentou valores de CIM elevados, sugerindo reduzido efeito antimicrobiano para o EXB de *S. molle*. Em estudo realizado por Gehrke (2012) a amostra do extrato hexânico do chá das folhas de *S. molle* foi a mais ativa frente aos microrganismos *S. aureus*, *E. coli* e *K. pneumoniae*, essa ação pode ter ocorrido, devido ao solvente utilizado, pois os metabólitos responsáveis pelas ações farmacológicas têm afinidade de extração diferenciada pelo solvente utilizado. Machado e Valentini (2014) pesquisaram o potencial antibacteriano do extrato da folha e do óleo essencial do fruto de *S.*

terebenthifolius e perceberam que ambos apresentam boa atividade contra *E. coli* e *P. aeruginosa*, mas apenas o óleo tem atividade quanto ao *S. aureus*.

A atividade antimicrobiana de *S. molle* apresenta-se significativa para os óleos extraídos da espécie. Frente aos microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* o estudo de Mehani e Segni (2012) demonstra que o óleo essencial de *S. molle* apresenta resposta dependente da dose.

Rojas et al. (2005) investigaram a atividade antimicrobiana de 102 extratos de plantas peruanas frente ao *M. tuberculosis*, onde CIM maior que 200 µg/mL para a espécie *S. molle*, e apenas 5 espécies (*Annona montana*, *Heliotropium arborescens*, *Cajanus Cajan*, *Iryanthera lancifolia* e *Swartzia polyphylla*) apresentaram CIM de 100 µg/mL. As micobactérias se apresentam como uma classe mais resistente, principalmente devido à composição da sua parede celular ser mais lipídica, o que dificulta a ação dos agentes antimicrobianos (FONTANA, 2008).

Desse modo, a divergência de resultados entre os estudos já existentes para a espécie *S. molle* e o gênero *Schinus*, pode ser justificada pela espécie utilizada, parte da planta utilizada como amostra, forma de obtenção da amostra, solventes utilizados na extração, tipo de bactérias testadas, metodologia empregada, entre outros fatores determinantes. Estudos complementares devem ser realizados, tendo em vista, evidências de sinergismo de extratos vegetais com drogas antimicrobianas no combate a bactérias (ZAGO et al., 2009).

5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Para a análise da atividade anti-inflamatória, os parâmetros hematológicos foram avaliados, pois são marcadores que fornecem informações sobre as condições fisiológicas e patológicas do organismo *in vivo*, uma vez que sua alteração pode ser causada por substâncias tóxicas (LI et al., 2010; DA SILVA et al., 2016; GUEX et al., 2018). A exposição por 21 dias à dose de EXB de *S. molle* (100mg/kg), não apresentou injúrias em animais saudáveis, bem como o grupo induzido, uma vez que, não houve alteração significativa nos parâmetros hematológicos analisados quando comparado ao grupo controle (Tabela 6). Estes resultados diferem de outros estudos que encontraram alteração em pelo menos um marcador hematológico (LUKA et al., 2014; DA SILVA et al., 2016; DE LIMA et al., 2018).

Tabela 6: Parâmetros hematológicos após a indução de pleurisia em ratos tratados por 21 dias com EXB de *S. molle*.

Hematológicos	CTRL	EXB	CAR	CAR + EXB	CAR + IND
Parâmetros	(10 ml/kg)	(100mg/kg)	(2%)	(2%+100mg/kg)	(2%+100mg/kg)
RBC ($\times 10^6$ μ l)	5.25 \pm 1.46	6.24 \pm 0.17	5.75 \pm 1.09	6.31 \pm 0.46	4.82 \pm 0.62
HGB (g/dl)	10.87 \pm 3.14	13.12 \pm 0.38	11.68 \pm 2.31	12.73 \pm 0.80	8.98 \pm 1.22
HCT (%)	30.06 \pm 8.56	35.78 \pm 0.85	31.46 \pm 6.03	35.28 \pm 2.19	25.66 \pm 1.19
MCV (fl)	56.93 \pm 0.68	57.40 \pm 0.61	54.60 \pm 0.85	56.20 \pm 0.80	53.94 \pm 1.89
MCHC (g/dl)	35.93 \pm 0.35	36.63 \pm 0.39	36.48 \pm 0.88	36.00 \pm 0.21	34.78 \pm 0.58
WBC ($\times 10^3$ ul)	4900 \pm 2066	6667 \pm 375	5275 \pm 597	5300 \pm 651	8725 \pm 1078
Linfócitos (%)	84.00 \pm 1.15	75.00 \pm 6.12	78.25 \pm 2.75	79.75 \pm 2.81	57.60 \pm 6.34*
Neutrófilos(%)	15.00 \pm 1.73	22.75 \pm 5.12	19.25 \pm 2.87	18.50 \pm 2.47	41.00 \pm 6.40*
Monócitos (%)	0.67 \pm 0.67	1.00 \pm 1.00	1.50 \pm 0.29	1.00 \pm 0.41	1.40 \pm 0.51
Eosinófilos (%)	0.33 \pm 0.33	1.00 \pm 1.00	0.75 \pm 0.48	0.75 \pm 0.48	0.00 \pm 0.00

Legenda: CTRL: tratado com salina. EXB: tratado com extrato bruto de *S. molle* (100mg/kg). CAR: induzido com carragenina 2%. CAR + EXB: induzido com carragenina 2% + tratamento com extrato bruto de *S. molle* (100mg/kg). CAR + IND: induzido com carragenina 2% + tratamento com Indometacina (10mg/kg). Os resultados são expressos como média \pm S.E.M. One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni (n=5) em ratos machos. RBC (hemácias), HGB (hemoglobina), HCT (hematócrito), VCM (volume corpuscular médio), (CHCM) concentração média de hemoglobina corpuscular celular, WBC (contagem de leucócitos), linfócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos. Os valores foram considerados significativamente diferentes quando * P <0,05.

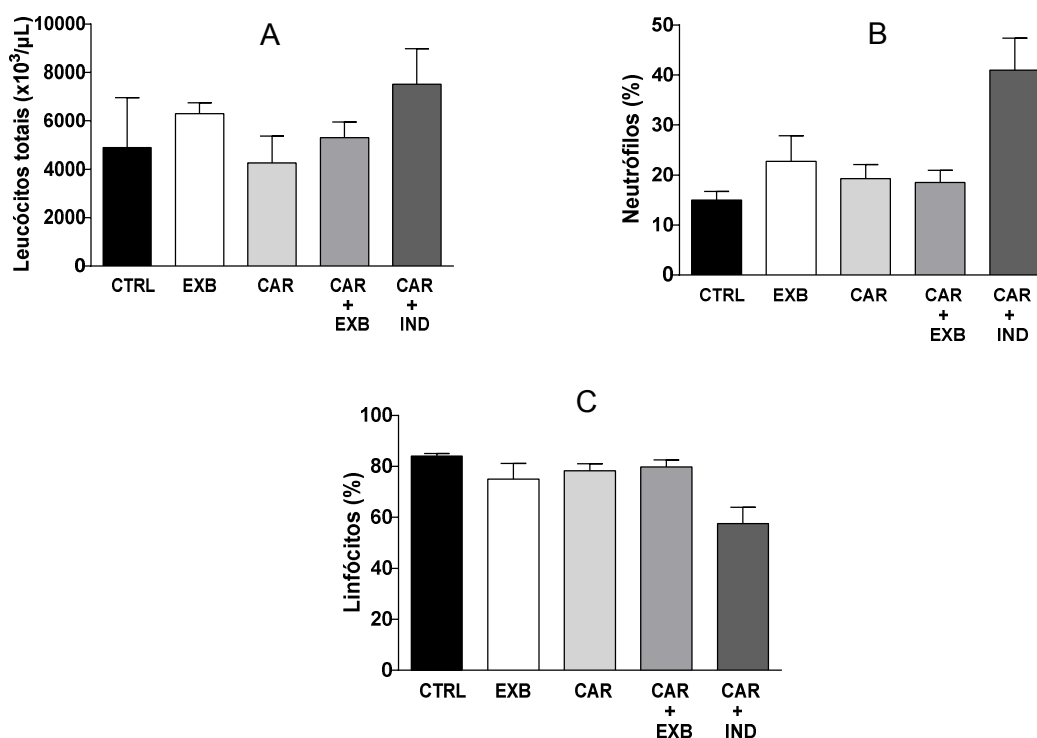
Fonte: Autora.

O grupo induzido com carragenina 2% e tratado com o fármaco Indometacina apresentou indicadores de alterações, uma vez que houve redução de hemácias, hemoglobinas, hematócrito, volume corpuscular médio e concentração média de hemoglobina corpuscular celular. Essa redução pode ter sido causada devido a Indometacina que é um anti-inflamatório não estereoidal, e pode causar lesões teciduais após sua administração, conforme apresenta a bula do medicamento.

Estudo de Barbosa et al. (2010) corrobora essa hipótese, pois, no seu estudo que realizou avaliações hematológicas e bioquímicas do uso de diclofenaco de sódio, meloxicam e firocoxibe em ratos, apresentou a mesma redução nos indicadores hematológicos para o grupo tratado com diclofenaco de sódio, também um anti-inflamatório não esteroideal.

A análise dos leucócitos e seus diferenciais apresentou diferença estatística no grupo induzido com carragenina 2% e tratado com o fármaco indometacina, mas não apresentou essa diferença para os demais grupos. Dentre os leucócitos, os linfócitos e neutrófilos apresentaram-se alterados como demonstra-se na figura 13.

Figura 13: Gráficos dos dados hematológicos de leucócitos (A), neutrófilos (B) e linfócitos (C).



Legenda: CTRL: tratado com salina. EXB: extrato bruto de *S. molle* (100 mg/kg). CAR: Carragenina 2%. CAR + EXB: Carragenina 2% + extrato bruto de *S. molle* (100 mg/kg). CAR + IND: Carragenina 2% + Indometacina (10 mg/kg).

Fonte: Autora.

Um processo fundamental no início da resposta inflamatória é a aderência dos neutrófilos no endotélio vascular, já que esses passam a ocupar uma posição mais periférica na circulação sanguínea quando são estimulados por mediadores de

inflamação liberados pela lesão causada. O aumento dos neutrófilos pode ser assim justificado, como no estudo de Lourenço et al. (2011), onde foi avaliada a atividade de *Tropaeolum majus* L. sobre a mobilização e migração leucocitária em modelo de bolsão inflamatório, e o grupo tratado com Indometacina também apresentou aumento de neutrófilos.

A análise dos dados hematológicos do teste *in vivo* sugere que o EXB de *S. molle* (100 mg/kg) não apresenta ação de dano ao organismo, uma vez que não alterou significativamente os indicadores, e possui indicativo de ação anti-inflamatória. Entretanto, fazem-se necessários testes complementares que corroborem sua real ação anti-inflamatória.

6. CONCLUSÃO

Considerando o aumento do apelo do uso de produtos naturais, o presente estudo teve por objetivo a partir do extrato bruto hidroalcoólico 70% (EXB) das folhas da *S. molle* L., realizar a análise fitoquímica e atividade farmacológicas. Os resultados obtidos quanto à segurança e não toxicidade do extrato foram significativos.

- O EXB de *S. molle* apresenta em sua composição fenóis totais ($79,14 \pm 0,02$ mg EAG g^{-1}); taninos ($231,67,75 \pm 0,00$ mg ECAT g^{-1}) e flavonoides ($52,65 \pm 2,49$ mg ERUT g^{-1}).
- Apresenta ação antioxidante ($IC_{50}=30,54 \pm 0,41$ $\mu g/mL$) e capacidade de capturar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.
- Não apresenta citotoxicidade e genotoxicidade, o que caracteriza indicativo de segurança.
- Não apresentou atividade antimicrobiana frente à *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *M. tuberculosis*, *M. abcessus*, *M. massiliense*, *M. fortuitum* e *M. smegmatis*.
- Não apresentou alterações hematológicas *in vivo* e apresentou indicativos de atividade anti-inflamatória, mas necessita de estudos complementares.
- O EXB de *S. molle* apresenta na sua composição os flavonoides Rutina ($58,63$ mg/g) e Quercetina ($0,665$ mg/g), que podem estar diretamente ligados a sua ação antioxidante e anti-inflamatória.

7. REFERÊNCIAS

- ALBA, A. G.; BONILLA, P. R.; ARROYO, J. A. **Actividad cicatrizante de una pomada con aceite esencial de *Schinus molle* L. “Molle” en ganado vacuno com hieridas infectadas y en ratones.** Ciencia e Investigación, v. 12, n. 1, p. 29–36, 2009.
- ANVISA. **Medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/fitoterapicos>>. Acesso em: 1 jun. 2019.
- ASHLEY, N. T.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. **Inflammation : Mechanisms, Costs, and Natural Variation.** Rev. Ecol. Evol. Syst., August, p. 385–406, 2012.
- BACKES, A.; NARDINO, M. **Árvores, arbustos e algumas lianas nativas no Rio Grande do Sul.** 2. ed. São Leopoldo: 2002.
- BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do Sul - Guias de Identificação e Interesse Ecológico.** Porto Alegre: C. Cruz, 2009.
- BARBOSA, C. M. et al. **Avaliações hematológicas e bioquímicas do uso de diclofenaco de sódio, meloxicam e firocoxibe em ratos.** Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 47, n. 2, p. 118–126, 2010.
- BARBOSA, M. R. et al. **Plant generation and enzymatic detoxification of reactive oxygen species.** Ciência Rural, Santa Maria, 2014.
- BARCIA, M. T.; JACQUES, A. C. **Determinação de ácido ascórbico e tocoferóis em frutas por CLAE.** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, January, 2009.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. **Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo.** Quimica Nova, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- BATISTA, D. C. et al. **Anti-inflammatory effect of a new piperazine derivative: (4-methylpiperazin-1-yl)(1-phenyl-1 H -pyrazol-4-yl) methanone.** Inflammopharmacolog, p. 217–226, 2018.
- BECHO, J. R. M.; MACHADO, H.; GUERRA, M. DE O. **Rutina – Estrutura , Metabolismo E Potencial.** Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais, p. 21–25, 2009.
- BERNARDES, N. R. et al. **Quantification of the levels of tannins and total phenols and evaluation of the antioxidant activity of fruits of *Pepper tree*.** Revista Vértices, v. 13, n. 3, p. 117–128, 2011.
- BERNUT, A. et al. ***Mycobacterium abscessus* cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 111, n. 10, p. E943–E952, 2014.
- BOSIO, S. et al. ***Mycobacterium fortuitum* prosthetic valve endocarditis: A case for the pathogenetic role of biofilms.** Cardiovascular Pathology, v. 21, n. 4, p. 361–364, 2012.
- BRASIL, M. DA S. **POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS,** 2006.
- BRASIL, M. DA S. **Programa nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Série C: projetos, programas e relatórios,** 2009. Disponível em: <http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/programa_nacional_plantas_medicinais_fitoterapicos.pdf>. Acesso m 1 de julho de 2019.
- BRIANEZI, G.; DE CAMARGO, J. L. V.; MIOT, H. A. **Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 45, n. 4, p. 325–334, 2009.

- CALIXTO, J. B. **The role of natural products in modern drug discovery.** Anais da Academia Brasileira de Ciências (2019), v. 91, p. 1–7, 2019.
- CALZADA, F. et al. **Antilymphoma potential of the ethanol extract and rutin obtained of the leaves from *Schinus molle* linn.** Pharmacognosy Research, v. 10, n. 2, p. 119, 2018.
- CARDOSO, A. M. et al. **Emergence of nosocomial *Mycobacterium massiliense* infection in Goiás, Brazil.** Microbes and Infection, v. 10, n. 14–15, p. 1552–1557, 2008.
- CARVALHO, J. C. T. GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. **Compostos Fenólicos Simples e Heterosídeos.** In: Farmacognosia da Planta ao Medicamento. 6^a ed. [s.l.] UFRGS, UFSC, 2007. p. 1102.
- CASTRO, P. et al. **Uso de espécies amazônicas para envelhecimento de bebidas destiladas : análises física e química da madeira.** CERNE, v. 21, n. 2, p. 319-327, 2015.
- CHANDRA, S.; MEJIA, E. G. **Polyphenolic compounds, antioxidant capacity and quinonoreductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to Mate (*Ilex paraguaiensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 52, p. 3583–3589, 2004.
- CHIFFELLE, I. et al. **Proximal analysis and insecticidal effects of extracts from pepper tree (*Schinus molle*) leaves on elm leaf beetle (*Xanthogaleruca luteola*) larvae.** Industrial Crops and Products, v. 43, n. 1, p. 523–528, 2013.
- CHOI, C. W. et al. **Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison.** Plant Science, v. 163, n. 6, p. 1161–1168, 2002.
- CHOI, W. S. et al. **The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells.** Cellular Immunology, v. 280, n. 2, p. 164–170, 2012.
- CHUANG, S.; CHEN, J. **Photooxidation and antioxidant responses in the earthworm *Amyntas gracilis* exposed to environmental levels of ultraviolet B radiation.** Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, v. 164, n. 3, p. 429–437, 2013.
- CIAPPINI, M. C. et al. **Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en mieles de tréboles, eucalipto y alfalfa.** Rev. Cienc. Tecnol. n. July, 2013.
- CORLISS, A. B.; TIMOTHY, J. B. ***Mycobacterium smegmatis* infection of the hand.** Hand, v. 4, n. 2, p. 165–166, 2009.
- CORSINI, E. et al. **Increased carrageenan-induced acute lung inflammation in old rats.** Immunology, v. 115, n. 2, p. 253–261, 2005.
- COSTA, T. S. A. et al. **Avaliação de metodologias para determinação de taninos no suco de caju.** Boletim CEPPA, v. 12, n. 2, p. 167–176, 1999.
- DA SILVA, A. R. H. et al. **Acute and sub-chronic (28 days) oral toxicity evaluation of tincture *Baccharis trimera* (Less) Backer in male and female rodent animals.** Regulatory Toxicology and Pharmacology, v. 74, p. 170–177, 2016.
- DA SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. **Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: Uma realidade.** Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 18, n. 4, p. 618–626, 2008.
- DE LIMA, R. et al. **Acute and subacute toxicity and chemical constituents of the hydroethanolic extract of *Verbena litoralis* Kunth.** Journal of Ethnopharmacology, v. 224, p. 76–84, 2018.

- DIAS, R. A. DE L.; SOUZA, P. S.; ALSINA, O. L. S. DE. **Secagem e Extração de Taninos Totais da Hortelã (*Mentha x vilosa* Hudson)**. Revista Agrarian, v. 4, n. 12, p. 123–133, 2011.
- DIFONZO, E. M. et al. **Mesotherapy and cutaneous *Mycobacterium fortuitum* infection**. International Journal of Dermatology, v. 48, n. 6, p. 645–647, 2009.
- DOS SANTOS, A. C. A. et al. **Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* raddi, anacardiaceae, do Rio Grande do Sul**. Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 20, n. 2, p. 154–159, 2010.
- DUARTE, J. A. et al. **Immunotoxicological evaluation of *Schinus molle* L. (anacardiaceae) essential oil in lymphocytes and macrophages**. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, v. 2018, 2018.
- ELMORE, S. **Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death**. Toxicologic Pathology, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.
- ENGIDA, A. M. et al. **Extraction , identification and quantitative HPLC analysis of flavonoids from sarang semut (*Myrmecodia pendan*)**. Industrial Crops & Products, v. 41, p. 392–396, 2013.
- FERNANDES, T. J. S. **Atividade antimicrobiana e determinação da cim de extratos e fases particionadas de produtos vegetais**. UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA, 2014.
- FONTANA, R. T. **As Micobactérias de Crescimento Rápido e a infecção hospitalar: um problema de saúde pública**. Revista Brasileira de Enfermagem, v. 61, n. 3, p. 371–376, 2008.
- FORO DE LAS SOCIEDADES RESPIRATORIAS INTERNACIONALES. **El impacto mundial de la Enfermedad Respiratoria**. 2ª ed. México, 2017.
- FUKUI, M.; YAMABE, N.; ZHU, B. T. **Resveratrol attenuates the anticancer efficacy of paclitaxel in human breast cancer cells in vitro and in vivo**. European Journal of Cancer, v. 46, n. 10, p. 1882–1891, 2010.
- GASCÓN, T. M. et al. **Avaliação do método de quimioluminescência na análise de homocisteína plasmática e sua comparação com o método de HPLC em amostras de crianças**. Einstein, v. 8, p. 187–191, 2010.
- GEHRKE, I. T. S. **Estudo fitoquímico e biológico das espécies *Schinus lentiscifolius*, *Schinus terebinthifolius*, *Schinus molle* e *Schinus polygamus* (Anacardiaceae) DO RS**. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA, 2012.
- GETAHUN, H. et al. **Latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection**. New England Journal of Medicine, v. 372, n. 22, p. 2127–2135, 2015.
- GLOBAL ASTHMA NETWORK. **The Global Asthma Report Asthma**. Disponível em: <http://www.globalasthmareport.org/2014/resources/Global_Asthma_Report_2014.pdf>. Acesso em: 1 jun. 2019.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. **Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários**. Química Nova, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.
- GONÇALVES, D. M. et al. **Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC**. Revista Cubana de Plantas Medicinales, v. 19, n. 3, p. 189–198, 2011.
- GROTTO, D. et al. **Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification**. Química Nova, v. 32, n. 1, p. 169–174, 2009.
- GUEx, C. G. et al. **Safety assessment of ethanolic extract of *Olea europaea* L. leaves after acute and subacute administration to Wistar rats**. Regulatory Toxicology and Pharmacology, v. 95, p.

395–399, 2018.

GÜNDEL, S. S. et al. **Ecotoxicology and Environmental Safety Evaluation of cytotoxicity , genotoxicity and ecotoxicity of nanoemulsions containing Mancozeb and Eugenol.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 169, n. November 2018, p. 207–215, 2019.

HANNA, M. M. **Anti-inflammatory, analgesic and ulcerogenicity studies.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 55, p. 12–22, 2012.

JOHNSON, S. **Pleurite.** Disponível em: <<https://it.healthline.com/health/pleurite?lang-it#Overview1>>. Acesso em 1 de julho de 2019.

KUMAR, R. et al. **The dynamics of acute inflammation.** *Journal of Theoretical Biology*, v. 230, n. 2, p. 145–155, 2004.

LAMRABET, O.; MEDIE, F. M.; DRANCOURT, M. **Acanthamoeba polyphaga-enhanced growth of Mycobacterium smegmatis.** *PLoS ONE*, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2012.

LANÇAS, F. M. **Efeitos de temperatura em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).** *Scientia Chromatographica* 2012, v. 4, n. 1, p. 13–19, 2012.

LAPA, A. J. et al. **Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais.** In: *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*. 6. ed. [s.l.] UFRGS, UFSC, 2007. p. 1102.

LI, X. et al. **Acute and subacute toxicity of ethanol extracts from *Salvia przewalskii* Maxim in rodents.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 131, n. 1, p. 110–115, 2010.

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

LIMA, K. G. **Avaliação Do Efeito Do Ácido Gálico No Tratamento De Células De Hepatocarcinoma Hepg2.** PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL, 2014.

LIN, J. J. et al. **Alpha-Phellandrene-Induced DNA Damage and Affect DNA Repair Protein Expression in WEHI-3 Murine Leukemia Cells In Vitro.** *Far Eastern Entomologist*, v. 165, n. May 2014, p. 16, 2014.

LINS, A. D. F. et al. **Quantificação de Compostos Bioativos em Erva Cidreira (*Melissa officinalis* L.) e Campim Cidreira [*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf].** *Gaia Scientia*, v. 9, p. 17–21, 2015.

LORENZI, H. **ÁRVORES BRASIELIRAS: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil.** 5. ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil.** 2ª ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008.

LOURENÇO, E. L. B. et al. **Atividade de *Tropaeolum majus* L. sobre a mobilização e migração leucocitária em modelo de bolsão inflamatório.** *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, v. 15, n. 3, p. 247–256, 2011.

LUKA, J. et al. **Acute toxicity study and effect of prolonged administration (28 days) of crude ethanolic root extract of *Diospyros mespiliformis* Hochst (Ebenaceae) on clinical, haematological and biochemical parameters of albino rats.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 153, n. 1, p. 268–273, 2014.

MACHADO, B. C. T.; VALENTINI, S. A. **Avaliação do potencial farmacotécnico e antimicrobiano de diferentes extratos da aroeira pimenteira (*Schinus terebenthifolius* Raddi).** *SaBios: Rev. Saúde e Biol.*, v. 9, n. 1, p. 34–42, 2014.

- MACIEL, M. A. M. et al. **Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares.** Química Nova, v. 25, n. 3, p. 429–438, 2002.
- MAIDANA, M.; GONZÁLEZ, Y.; DEGEN DE ARRÚA, R. **Plantas medicinales empleadas por pacientes diabéticos en Paraguay.** Infarma Ciências Farmacêuticas, p. 214–220, 2015.
- MARMITT, D. J. et al. **Plantas com potencial antibacteriano da relação nacional de plantas medicinais de interesse do sistema único de saúde: revisão sistemática.** Rev. Saúde Públ. Santa Cat., Florianópolis, October, 2015.
- MARTINS, M. D. R. et al. **Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils.** Journal of Ethnopharmacology, v. 151, n. 1, p. 485–492, 2014.
- MAZIERO, M. et al. **Phytochemical study , an evaluation of the antioxidant potential and the antimicrobial activity of *Inga semialata* (Vell .) C . Mart . hydroalcohol extract.** Natural Product Research, v. 0, n. 0, p. 1–5, 2019.
- MCKELVEY-MARTIN, V. J. et al. **The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review.** Mutation Research, v. 288, p. 47–63, 1993.
- MEHANI, M.; SEGNI, L. **Antimicrobial Effect of Essential oil of Plant *Trigonella focnum greacum* on some Bacteria Pathogens.** International Science Index, Bioengineering and Life Sciences, v. 7, n. 12, p. 358–360, 2012.
- MELLITZ, G. M. **A influencia dos métodos de extração na quantificação de fenóis totais na casca de *Schinus molle* e *Schinus terebinthifolius*.** UNIVERSIDADE REGIONAL DO NOROESTE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL - UNIJUI, 2017.
- MENESES, A. K. L. et al. **Antifungal and antimycotoxigenic activity of essential oils from *Eucalyptus globulus*, *Thymus capitatus* and *Schinus molle*.** Food Science and Technology (Campinas), v. 35, n. 4, p. 664–671, 2015.
- MITTAL, M. et al. **Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury.** Antioxidants & Redox Signaling, v. 20, n. 7, p. 1126–1167, 2014.
- MOLDOVEANU, B. et al. **Inflammatory mechanisms in the lung.** Journal of inflammation research, v. 2, p. 1–11, 2009.
- MOORE, A. R.; AYOUB, S. S.; SEED, M. P. **Cyclooxygenase Enzymes and Their Products in the Carrageenan-Induced Pleurisy in Rats.** In: Cyclooxygenases: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, v. 644p. 201–205.
- MOYO, M. et al. **Phenolic composition, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Sclerocarya birrea* and *Harpephyllum caffrum* (Anacardiaceae) extracts.** Food Chemistry, v. 123, n. 1, p. 69–76, 2010.
- MUNOZ-PRICE, L. S. et al. **Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases.** The Lancet Infectious Diseases, v. 13, n. 9, p. 785–796, 2013.
- NAKATA, C. H. et al. **Avaliação do extrato bruto hidroalcoólico de *Equisetum arvense* (cavalinha) sobre a proliferação de fibroblastos.** Brazilian Journal of Natural Sciences, v. 2, 2018.
- NAMAS, R. et al. **The acute inflammatory response in trauma / hemorrhage and traumatic brain injury: Current state and emerging prospects.** Libyan Journal of Medicine, v. 4, n. 3, p. 97–103, 2009.
- NESSAR, R. et al. ***Mycobacterium abscessus*: A new antibiotic nightmare.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 67, n. 4, p. 810–818, 2012.
- NOH, H. J. et al. **Anti-inflammatory activity of a new cyclic peptide, citrusin XI, isolated from the fruits of *Citrus unshiu*.** Journal of Ethnopharmacology, 2015.

- OLIVEIRA, C. et al. **Effect of plant neutrophil elastase inhibitor on leucocyte migration, adhesion and cytokine release in inflammatory conditions.** British Journal of Pharmacology, v. 161, n. 4, p. 899–910, 2010.
- OLIVEIRA, G. L. S. **Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais *in vitro* pelo método do dpph: Estudo de revisão.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 17, n. 1, p. 36–44, 2015.
- PEREIRA, A. DE P. C. **Avaliação das Atividades Antioxidante e Antiinflamatória de *Commiphora leptophloeos*, *Myracrodruon urundeuva*.** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, 2017.
- PÉREZ-IGLESIAS, J. M. et al. **Evaluation of imazethapyr-induced DNA oxidative damage by alkaline Endo.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 142, n. 3, p. 503–508, 2017.
- PETRONILHO, F. et al. **Ebselen Attenuates Lung Injury in Experimental Model of Carrageenan-Induced Pleurisy in Rats.** Inflammation, v. 38, n. 4, p. 1394–1400, 2015.
- PHILIPS, R. C. et al. ***Mycobacterium fortuitum* infection arising in a new tattoo Rebecca.** Dermatology online Journal, v. 20, n. 2, p. 3–7, 2014.
- QUEIROZ, T. B. DE. **Estudo do potencial citotóxico e genotóxico do geraniol em células mononucleares do sangue periférico e de hepatocarcinoma humano HepG2.** Universidade Estadual Paulista, 2017.
- QUISPE, L. S. et al. **Chemical composition, antioxidant and antiproliferative activities of essential oil from *Schinus areira* L. and *Minthostachys spicata* (Benth.) Epl. grown in Cuzco, Peru.** Journal of Essential Oil Research, v. 28, n. 3, p. 234–240, 2016.
- RANG, H. P. et al. **Sistema Respiratório.** In: Farmacologia. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. p. 804.
- RIBEIRO, K. DA S.; GUIMARÃES, A. L. DE A. **O uso de medicamentos à base de plantas medicinais por médicos do SUS no município de Teresópolis/RJ.** Revista Agrogeoambiental, Pouso Alegre, Edição Especial n. 1, p. 61-65, ago. 2013.
- RIBEIRO, S. M. R. et al. **A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico.** Biosci. J., v. 21, n. 3, p. 133–149, 2005.
- ROJAS, R. et al. **Anti-*Mycobacterium tuberculosis* Activity of Peruvian Plant Extracts Using a Rapid , Inexpensive Colorimetric Assay.** Salasar, v. 13, n. 2442, 2005.
- RONALD, M. S. **Pleuritis.** Revista de Actualización Clínica, v. 12, p. 596–599, 2011.
- RORIZ-FILHO, J. S. et al. **Infecção do trato urinário.** Mediciana (Ribeirão Preto), 2010.
- SANTOS, S. D. C.; DE MELLO, J. C. P. **Taninos.** In: Farmacognosia da Planta ao Medicamento. 6^a ed. Porto Alegre, Florianópolis: UFRGS, UFSC, 2007. p. 1102.
- SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. **Introdução.** In: UFRGS; UFSC (Eds.). . Farmacognosia da Planta ao Medicamento. 6^a ed., p. 1102.
- SECOLI, S. R. **Polifarmácia : interações e reações.** Revista Brasileira de Enfermagem, v. 63, n. 1, p. 136–140, 2010.
- SILVA, L. R.; OLIVEIRA, A. A.; LIMA, R. A. **Identificação dos metabólitos secundários do extrato etanólico das folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi.** SOUTH AMERICAN Journal of Basic Education, Technical and Technological, v. 2, n. 2, p. 84–93, 2015.
- SILVA, A. O. DA et al. **Antioxidant power of carotenoids , flavonoids and vitamin.** ReonFacema, v. 2, n. 4, p. 320–324, 2016.

- SILVA, M. M. DA et al. **Schinus terebinthifolius: phenolic constituents and in vitro antioxidant, antiproliferative and in vivo anti-inflammatory activities.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 27, n. 4, p. 445–452, 2017.
- SILVEIRA, J. M. **Influência da desfolha na qualidade de uvas merlot produzida na região da campanha rio grande do sul, brasil.** UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA, 2014.
- SINGH, A. et al. **Effect of FK506 (tacrolimus) in animal models of inflammation.** Inflammopharmacology, v. 11, n. 3, p. 249–257, 2003.
- SINGH, P. et al. **Antioxidant and Antibacterial Activity of *Jurinea dolomiaea* Boiss Extracts.** International Journal of Life-Sciences Scientific Research, v. 1, n. 2, p. 74–78, 2015.
- SOARES, A. A. et al. **Avaliação da peroxidação lipídica no plasma de ratos submetidos à lesão tecidual e tratados com hidrogel.** Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, Umuarama, v. 19, n. 3, p. 175–178, 2016.
- SOUZA, C. M. DE M. et al. **Fenóis Totais e Atividade Antioxidante De Cinco Plantas Medicinais.** Quim. Nova, v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.
- SOUZA, C. A. DE et al. **Doenças respiratórias e fatores associados: estudo de base populacional em São Paulo, 2008-2009.** Rev Saúde Pública, v. 46, n. 1, p. 16–25, 2012.
- SOUZA, C. V.; LORENZI, H. **BOTÂNICA SISTEMÁTICA: Guia ilustrado para a identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.** 2^a ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2005.
- TALCOTT, S.; TALCOTT, S. **Propiedades Fitoquímicas del Mango que Contribuyen a Beneficios en la Salud.** Reporte Final de la Investigación para el Consejo Nacional del Mango, Texas A&M University, 2009.
- TENAILLON, O. et al. **The population genetics of commensal *Escherichia coli*.** Nature Reviews Microbiology, v. 8, n. 3, p. 207–217, 2010.
- TESTON, A. P.; NARDINO, D.; PIVATO, L. **Envelhecimento cutâneo: teoria dos radicais livres e tratamentos visando a prevenção e o rejuvenescimento.** UNINGÁ Review, Jan, p. 71–84, 2010.
- TSENG, B. S. et al. **The extracellular matrix protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by limiting the penetration of tobramycin.** Environmental Microbiology, v. 15, n. 10, p. 2865–2878, 2013.
- UETA, B. et al. **Atividade Antioxidante Da Catequina e Análise Comparativa Com As Vitaminas A e C.** III SIMPÓSIO DE CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS, São Paulo, 2014.
- ULIANA, M. P. et al. **Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves.** Industrial Crops and Products, v. 83, p. 235–240, 2016.
- VALKO, M. et al. **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.** The international journal of biochemistry & cell biology, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.
- VEIGA JR., V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. **Plantas medicinais: Cura segura?** Quimica Nova, v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005.
- VIEIRA, L. M. et al. **Fenóis totais, atividade antioxidante e inibição da enzima tirosinase de extratos de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Anacardiaceae).** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 17, n. 4, p. 521–527, 2015.
- VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. **Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância.** Embrapa Clima Temperado. Documentos, 2010.

WARD, P. A. **Oxidative stress: Acute and progressive lung injury**. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 1203, p. 53–59, 2010.

YALCIN, N. G.; CHOONG, C. K. C.; EIZENBERG, N. **Anatomy and Pathophysiology of the Pleura and Pleural Space**. Thoracic Surgery Clinics of NA, v. 23, n. 1, p. 1–10, 2013.

ZAGO, J. A. A. et al. **Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos**. Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 19, n. 4, p. 828–833, 2009.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. **The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals**. Food Chemistry, v. 64, n. 4, p. 555–559, 1999.

ZUANAZZI, J. A. S. MONTANHA, J. A. **Flavonoides**. In: Farmacognosia da Planta ao Medicamento. 6ª ed. [s.l.] UFRGS, UFSC, 2007. p. 1102.

8. ANEXO A



9. ARTIGO

Phytochemical Study and Evaluation of Antioxidant Potential of *Schinus molle* L. Hydroalcohol Extract

LOVATTO, M. O.¹; MAZIERO, M.¹; PANNO, G. F.²; FACCO, J.³;
SAGRILLO, M. R.⁴; MANFRON, M. P.⁵

1 Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

2 Graduate Program in Biology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

3 Graduate Program in Chemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

4 Teacher of the Franciscan University, Franciscan University, Santa Maria, Brazil.

5 Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

The species *S. molle* L. is originally from Peru and is native to Brazil, Uruguay, Argentina and other Andean countries. Today it is widely distributed in Rio Grande do Sul. *S. molle* aerial parts are popularly used for different therapeutic purposes such as: anti-inflammatory, anti-hemorrhagic, antiseptic, mild laxative, astringent, anti-asthmatic, digestive stimulant, menstrual disorder, diuretic and tonic. The need to seek new therapeutic alternatives for respiratory diseases, preferably with minimal effects, justifies this work, both from the point of view of scientific and social interest. The present work aimed to obtain or extract crude extract of *S. molle* leaves by maceration process, perform phytochemical analysis, identify and quantify compounds without extraction, evaluate biological activities such as anti-inflammatory and antimicrobial activity, as well as evaluate cytology and genotoxicity and antioxidant potential against reactive oxygen and nitrogen species. From the phytochemical analysis of *S. molle*, they were identified as 79,14; 231,67 mg; 52,65; equivalent/g extract for total phenols, tannins and flavonoids respectively. Test tests used to evaluate antioxidant potential, or *S. molle* EXB, suggested antioxidant capacity with $IC_{50} = 30.54 \pm 0.41 \mu\text{g} / \text{mL}$ and were able to capture reactive oxygen and nitrogen species. It has no citations and genotoxicity and is a safety indicator. *S. molle* EXB has no antimicrobial activity against *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Mycobacterium tuberculosis*, *abcessus*, *massiliense*, *fortuitum* and *smegmatis* microorganisms. A sample of extract not demonstrating hematological alterations in the same group induced by 2% carrageenan pleurisy. Labeled compounds (58,63 mg/g) and quercetin (0,665 mg/g) were used and quantified.

Keywords: Medicinal plant. Chemical characterization. Therapeutic potential.

1 Introduction

Plants are an important source of biologically active natural products, as similarly to microorganisms produce a great diversity of chemical compounds (CALIXTO, 2019). These products are models for the synthesis of a large number of drugs, besides having wide diversity in structure, physicochemical and biological properties, which draws the attention of researchers (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2007).

Originally from Peru, the species *Schinus molle* L. is native to Brazil, Uruguay, Argentina and other Andean countries. Popularly known as “anacaúta”, “aroeira”, “aroeira tame”, “aroeira periquita”, “aroeira salsa”, “pimentoiro”, among other names, *Schinus molle* L. is a species widely distributed in the state of Rio Grande do Sul. South (BACKES; NARDINO, 2002).

In cellular metabolism normally occurs to the production of reactive species (ER), in low concentrations the production is beneficial for the organism, as for example, in the induction of mitogenic response and the defense against infectious agents, besides serving as signaling messengers. However, high ER production can lead to undesirable effects such as oxidative stress, which can lead to deleterious cellular consequences such as lipid peroxidation, cell membrane deformation and protein denaturation (CHUANG; CHEN, 2013; VALKO et al., 2007).

The search for plants and their metabolites is an additional stimulus to the research of new herbal medicines, which is favored in our country due to the great biodiversity of the Brazilian flora (CALIXTO, 2019; RIBEIRO; GUIMARÃES, 2013). *S. molle* extract is an alternative for use as an antioxidant.

2 Material and Methods

2.1. Obtention of the vegetable extract

The leaves and leaflets of the intermediate part of the *S. molle* plant were collected on May 15, 2017 in Pains district (29 ° 46'25.5 "S 53 ° 41'26.2" W), located in the city of Santa Maria in Rio Grande do Sul. The plant material was identified by Prof. Dr. Renato Aquino Záchia (UFMS). The control material (Appendix A) is

deposited in the UFSM Biology Department Herbarium, under registration SMDB-15.062.

The extract was obtained from the Laboratory of Phytochemical Investigations (LABINFITO) of UFSM, where 1,500 g of the collected material was dehydrated in an oven with air circulation ($\pm 45^{\circ}\text{C}$) pulverized in knife mills and stored in an amber flask. One thousand two hundred grams of pulverized material was macerated with 70% ethanol extractant. On alternate days the container was vigorously shaken, the solvent being renewed once a week for 30 days. After this period, the extracts were collected, the solvent evaporated at 45°C under reduced pressure on rotavap, and after lyophilization the dried extract was stored in an amber flask.

2.2. Determination of Secondary Metabolites

2.2.1 Determination of Total Phenols

The determination of the total phenol content was performed by the modified Folin-Ciocalteu method (CHANDRA; MEJIA, 2004). In this methodology the concentration of total phenols in the sample is determined from the standard curve of gallic acid at concentrations of 1.0; 3.0; 5.0; 10.0; 20.0; 30.0; 40.0 and 50.0 $\mu\text{g/mL}$. To perform the test on 1 mL of the aqueous sample (0.01%), the same volume of Folin-Ciocalteu reagent is added. After incubating for 5 minutes, add 2 mL of 20% sodium carbonate (prepared at the time of use). After a further incubation of 10 minutes in the dark, the spectrophotometer absorbances are read at a wavelength of 730 nm.

2.2.2 Determination of Tannins

Tannins were determined by the modified vanillin method (COSTA et al., 1999). The tannin concentration in the sample will be determined from the standard catechin curve at 25.0; 50.0; 150.0; 300.0; 450.0; 600.0; 750.0; 900.0; and 950.0 $\mu\text{g/mL}$. In the analysis 1 mL of sample (0.04%) previously diluted in 80% Methanol was added 5 mL of 4% Vanillin (CH_4O : HCl solution). After 15 minutes of incubation, absorbances were read on a spectrophotometer with a wavelength of 490 nm. Analysis of each curve point and sample was performed in triplicate.

2.2.3 Determination of Flavonoids

The flavonoid content was determined according to the Aluminum Chloride (AlCl_3) method (ZHISHEN; MENGCHENG; JIANMING, 1999). The concentration of flavonoids is obtained through the standard rutin curve from solutions with increasing concentrations of 40.0; 80.0; 120.0; 160.0 and 200.0 $\mu\text{g/mL}$. In 500 μL of aqueous sample (0.04%), 1 mL of distilled water and 150 μL of 5% Sodium Nitrite (NaNO_2) were added. After 5 min incubation, 150 μL AlCl_3 was added, and incubated for a further 6 min. After time, 2 mL of Sodium Hydroxide (NaOH) and 1.2 mL of distilled water were added, and an additional 15 min was incubated until spectrophotometer reading at 510 nm wavelength.

2.3 Antioxidant Capacity Assenssment

2.3.1 Free radical method 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyla (DPPH)

For quantitative evaluation of the antioxidant capacity of *S. molle* L. EXB, the modified CHOI et al (2002) technique was used, using Ascorbic Acid to obtain the standard curve at concentrations of 1.5625; 3.125; 6.25; 12.5; 25.0; 50.0; 100.0 and 200.0 $\mu\text{g/mL}$, as a negative control, a diluted DPPH solution in methanol was used. For the calibration curve, 2.5 ml of each concentration of Ascorbic Acid, 1 ml of 0.3 mM DPPH solution solubilized in 2.5 ml of ethanol was added to the test tube. After incubation in the dark for 30 minutes spectrophotometer readings were taken at 518 nm wavelength. The assay was performed in triplicate with the standards and the sample. Percent inhibition is calculated by the equation: % Inhibition = $100 - [(Abs \text{ Sample} - Blank \text{ Abs}) \times 100 / Abs \text{ Control}]$. The graph obtained by the ratio of percentage inhibition of DPPH radical versus standard and extract concentrations allows to determine the concentration of standard and extract ($\mu\text{g/mL}$) required to achieve 50% DPPH radical scavenging activity (IC_{50}), thus indicating the antioxidant capacity of *Schinus molle* L. EXB.

2.3.2 Cell Cultivation

Peripheral human blood was used for cell viability, cytogenotoxicity and genotoxicity analyzes. As samples were discarded at the Clinical Analysis Laboratory of the Franciscan University, under the Institution's Human Research Ethics Committee (CAAE:31211214.4.0000.5306). For this, human blood was collected from healthy volunteers by venipuncture using a VR Vacutainer (BD Diagnostics, Plymouth, UK) and heparin tubes. The Histopaque-1077VR density gradient was used to separate mononuclear cells using 4 mL blood size. After selection, cells with an initial density of 2.5×10^5 were treated in the 96-point cell culture plate with crude extraction of *S. molle* in the 10, 15, 30 and 60 $\mu\text{g/mL}$ samples with the same compositions. multi-use from the EXB IC_{50} , DPPH could not be tested.

2.3.3 Nitric Oxide Test

A cell culture plate was centrifuged after incubating the treatments (10, 15, 30 and 60 $\mu\text{g/mL}$ EXB) in viable cells, or the supernatant was separated for the assay. 100 μL of the assayed test supernatants were transferred to a 96-well Elisa plate. Afterwards, 100 μL of Griess reagent was incorporated into the supernatant. This reagent is composed of a 1:1 (sulfanylamide) + 1(N-1-naphthylenediamine bichlorohydrate) solution I, with a 1:1 (v/v) ratio. After 15 minutes incubation at room temperature, plates were placed on the spectrophotometer at 540 nm wavelength. Results were calculated as a percentage of negative control (CHOI et al., 2012).

2.3.4 Dichlorofluorescein diacetate test (DCFH-DA)

A standard curve at 0.4; 1.0; 2.0; 4.0 and 8.0 μM were prepared using cell culture plate and TRIS HCl (10mM) pH7,4, DFC (10 μM) and DCFH-DA (0.1mM) reagents. For sample preparation, 100 μL of EXB was pipetted in the study analyzes (10, 15, 30 and 60 $\mu\text{g} / \text{mL}$), previously prepared in the cell culture plate, 130 μL of TRIS HCl solution (10 mM) pH 7.4 and 20 μL DCFH-DA (0.1 mM). The assay was performed in triplicate. After incubation for one hour in the dark and at room temperature, read the spectrophotometer. A fluorescence was determined based on excitation (488 nm) and emission (525 nm) wavelengths (ESPOSTI et al., 2002).

2.4 Identification and quantification of constituents in the extract by high performance liquid chromatography

The qualitative and quantitative analysis of phenolic compounds was performed by the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method coupled to a diode detector (DAD), following the methodology proposed by CALZADA et al. (2018). Liquid chromatograph (SHIMADZU, Kyoto/Japan), model LC-20AT pump, SIL-20A automatic injector, DAD SPD-M20A detector and CBM 20A communicator, controlled by LC SP1 software, were used. The analytical column used was Zorbax Eclipse Plus, with silica C 18 stationary phase, 5 μm diameter particle, dimensions 4.6 mm by 150 mm. Elution occurred at a flow rate of 1.0 mL/min, with eluent gradient for the mobile phases: A (acetonitrile) and B (2% acetic acid) [4: 96, v/v, 0 min; 12:88, v/v, 20 min; 20:80, v/v, 30 min; 50:50, v/v, 45 min; and 4: 96, v/v, 60 min]. The sample was prepared at a concentration of 10 mg/mL, 20 μL was removed and diluted with 980 μL MeOH resulting in 0.2 mg extract. The injection volume was 20 μL and the detection accompanied by photodiode system between 230-400 nm for 60 minutes. The phenolic compounds were identified by comparing the retention time of the samples with the Merck rutin and quercetin standards. The standard rutin curve was obtained by triplicate injection of five stock solution concentrations (0.01, 0.03, 0.06, 0.09 and 0.12 mg/mL). The regression equation and the correlation coefficient were then derived from the curve.

3. Results and Discussion

3.1 Determination of Secondary Metabolites

The secondary metabolites total phenols, tannins and flavonoids quantified in EXB *S. molle* were calculated from the standard substance calibration curves for each metabolite (Table 2). *S. molle* EXB presented values for total phenols, flavonoids and tannins, $79.14 \pm 0.02 \text{ mg EAG g}^{-1}$; $52.65 \pm 0.00 \text{ mg ECAT g}^{-1}$; $231.67 \pm 2.49 \text{ mg ERUT g}^{-1}$, respectively.

The analysis of aroeira extract presented lower result ($79.14 \pm 0.02 \text{ EAG g}^{-1}$) in terms of the total phenol content, when compared to *Myracrodruon urundeuva* (field mastic), which presented content (194 EAG g^{-1}). larger than *S. molle* (VIEIRA et

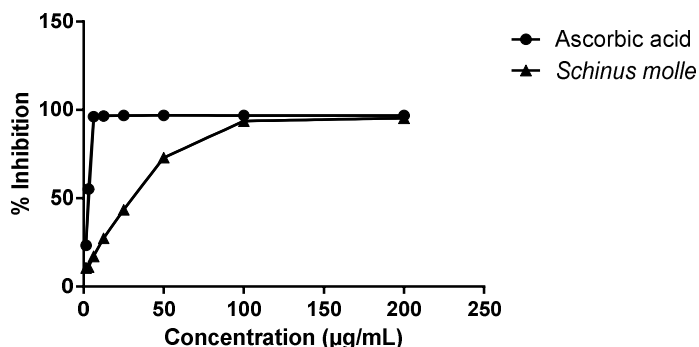
al., 2015). Although both species belong to the Anacardiaceae family, the difference is due to the uniqueness of each species.

The flavonoid content (52.65 ± 2.49 mg ERUT g⁻¹) found in *S. molle* EXB is significant as it is close to the (69.67 ± 3.34 mg/g) content in *S. terebinthifolius*, plant of the same genus (ULIANA et al., 2016). The study of tannin content (231.67 ± 0.00 mg ECAT g⁻¹) was significant, since *S. molle* EXB presented values higher than those found by Lins et al. (2015) for *Melissa officinalis* (Lemongrass) with $16,718 \pm 0,721$ mg g⁻¹ and *Cymbopogon citratus* (Lemongrass) with $90,07 \pm 0,098$ mg g⁻¹, popularly used medicinal plants.

3.2 Determination of antioxidant activity

From the construction of the calibration curve for DPPH and ascorbic acid (standard substance), the antioxidant capacity of *S. molle* was quantitatively evaluated. From the curve line, the IC₅₀ was calculated for *S. molle* EXB and for Ascorbic Acid, which is characterized by the inhibitory concentration capable of sequestering 50% of the DPPH radical. Percentages of inhibition of DPPH radical by the standard Ascorbic Acid and *S. molle* EXB provided the graph with % inhibition and concentration variables (Figure 1).

Figure 1: Antioxidant capacity by DPPH method expressed as % inhibition of *S. molle* EXB.



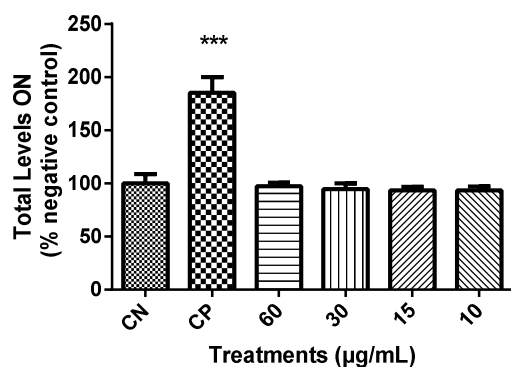
The results show Ascorbic Acid with IC₅₀= 3.42 ± 0.86 µg / mL and *S. molle* EXB IC₅₀= 30.54 ± 0.41 µg / mL, the lower the absorbance of the solution containing the DPPH radical and the standard Ascorbic Acid or *S. molle* EXB major is the inhibition percentage; which indicates higher antioxidant capacity. Thus, the results

indicate that *S. molle* EXB has antioxidant capacity, and the higher the concentration of the extract used, the closer this capacity becomes.

Myracrodruon urundeuva also from the Anacardiaceae family, presented in the study by Vieira et al. (2015) $IC_{50} = 12.9 \pm 0.2$. In a study by Martins et al. (2014) the essential oil of *S. molle* leaves has an inhibition percentage ($IC_{50} = 16.0 \mu\text{g/mL}$) four times lower than its fruit oil ($IC_{50} = 64.0 \mu\text{g/mL}$), however both samples have antioxidant capacity when compared to ascorbic acid. These results corroborate that the Anacardiaceae family has a strong antioxidant capacity.

The evaluation of *S. molle* EXB's ability to inhibit the production of reactive nitrogen species (RNS) was carried out by nitric oxide assay. Figure 2 shows hormones in the obtained results, since all EXB concentrations tested when compared between them and the negative control were efficient to combat the production of NREs.

Figure 2: Nitric oxide assay for EXB *S. molle*.



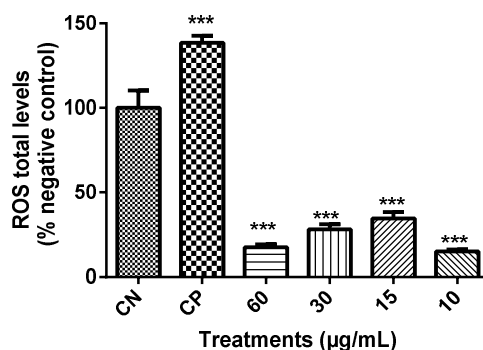
ON assay after 24 h of incubation. The results were expressed as a percentage of the negative control (100%). With CN being the negative control: cells in culture medium. Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). The analyzes were performed by variance (ANOVA) of 1-way, followed by Dunnett's post hoc test. Values with $p < 0.05$ were considered statistically significant. Being * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. CN: negative control (viable cells + culture medium) and CP: positive control (viable cells + hydrogen peroxide + culture medium).

Myracrodoum urundeuva known as aroeira do sertão and belonging to the Anacardiaceae family is used among other reasons for its anti-inflammatory action. A study by Pereira (2017) shows that the aqueous extract of *M. urundeuva* has lower NRN inhibition than the control, whereas ethyl acetate extract inhibited the production

of RNS. Thus, the *S. molle* EXB is promising, as it showed action against NRAs, even being obtained by hydroalcoholic solvent.

Another assay that allows us to analyze the antioxidant capacity, especially of reactive oxygen species (ROS) is the DCFH-DA assay. Figure 3 shows that all concentrations tested presented better results than the negative control against ROS. It was also observed that the concentrations with the best antioxidant capacity were 60 and 10 $\mu\text{g/mL}$. The latter presented an even more satisfactory result, since it presents itself as a hormonal result (does not follow the higher concentration/best action ratio).

Figure 3: DCFH-DA assay for EXB *S. molle*.



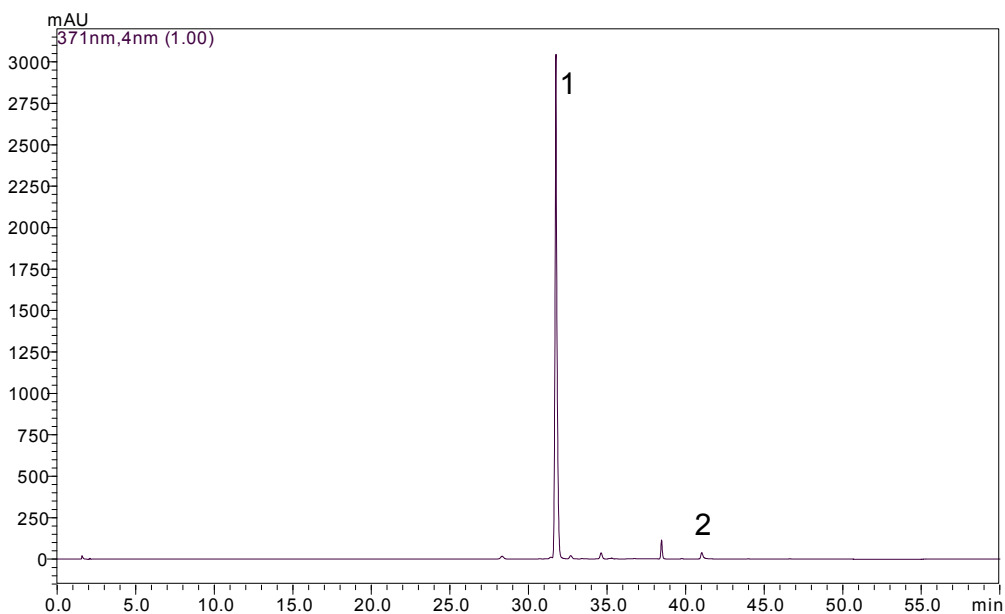
DCFH-DA assay after 24 h of incubation. The results were expressed as a percentage of the negative control (100%). With CN being the negative control: cells in culture medium. Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). The analyzes were performed by variance (ANOVA) of 1-way, followed by Dunnett's post hoc test. Values with $p < 0.05$ were considered statistically significant. Being * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. CN: negative control (viable cells + culture medium) and CP: positive control (viable cells + hydrogen peroxide + culture medium).

The phenolic compounds present in Mango (*Mangifera indica*L.) Belonging to the Anacardiaceae family as well as the genus Schinus, reduced the ROS signals necessary to lead the proliferation of tumor cells, demonstrating plant antioxidant action (TALCOTT; TALCOTT, 2009). No other studies were found using the DCFH-DA test to achieve a better correlation of results.

3.3 Identification and quantification of constituents in the extract by high performance liquid chromatography

In *S. molle* EXB, rutin (1) and quercetin (2) were identified (Figure 4). Identification occurred by analysis of retention times with comparison of DAD spectra of substances at wavelength 371 nm (rutin - 31.54 min and quercetin - 41.02 min). The quantification of the identified substances occurred by calculating the area on the curve. The equations of the lines obtained through the standard curve of the compounds were $y=3E+07x-14850$ ($r=0.9998$) and $y=9E+07x-152615$ ($r=0.9999$), for rutin and quercetin, respectively.

Figure 4: Chromatogram of *S. molle* EXB obtained by HPLC.



The presence of rutin and quercetin flavonoids had already been elucidated by Gehrke (2012) in the *S. molle* species and were also identified in the other species of the genus *Schinus*. The values found in the analysis of *S. molle* EXB show that the substance present in the highest concentration is rutin (1). Rutin is characterized by being a flavonoid with therapeutic action and that normally presents non-toxic action in pathologies that involve the production of free radicals. The combination of iron chelating properties and free radical scavengers provides the antioxidant capacity of flavonoids within the human organism (CIAPPINI et al., 2013).

4 Conclusion

Considering the increased appeal of the use of natural products, the aim of this study was to use the phytochemical analysis and pharmacological activity from the 70% crude hydroalcoholic extract (EXB) of the leaves of *S. molle* L.. The results obtained regarding the safety and non toxicity of the extract were relevant.

S. molle EXB has in its composition total phenols (79.14 ± 0.02 mg EAG g^{-1}); flavonoids (52.65 ± 2.49 mg ERUT g^{-1}) and tannins ($231.67.75 \pm 0.00$ mg ECAT g^{-1}). It has antioxidant action ($IC_{50} = 30.54 \pm 0.41$ $\mu g/mL$) and ability to capture reactive oxygen and nitrogen species. *S. molle* EXB has in its composition the flavonoids Rutina (58.63 mg/g) and Quercetin (0.665 mg/g), which may be directly linked to its antioxidant action, and thus has its suggested use.

5 References

- BACKES, A.; NARDINO, M. **Árvores, arbustos e algumas lianas nativas no Rio Grande do Sul**. 2. ed. São Leopoldo, 2002.
- CALIXTO, J. B. **The role of natural products in modern drug discovery**. BIODIVERSITY AS SOURCE OF INNOVATOR PRODUCT, v. 91, p. 1–7, 2019.
- CALZADA, F. et al. **Antilymphoma potential of the ethanol extract and rutin obtained of the leaves from *Schinus molle* linn.** Pharmacognosy Research, v. 10, n. 2, p. 119, 2018.
- CHANDRA, S.; MEJIA, E. G. **Polyphenolic compounds, antioxidant capacity and quinonereductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to *Mate (Ilex paraguaiensis)* and *Green (Camellia sinensis)* Teas**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 52, p. 3583–3589, 2004.
- CHOI, C. W. et al. **Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison**. Plant Science, v. 163, n. 6, p. 1161–1168, 2002.
- CHOI, W. S. et al. **The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells**. Cellular Immunology, v. 280, n. 2, p. 164–170, 2012.
- CHUANG, S.; CHEN, J. **Comparative Biochemistry and Physiology , Part A Photooxidation and antioxidant responses in the earthworm *Amyntas gracilis* exposed to environmental levels of ultraviolet B radiation**. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, v. 164, n. 3, p. 429–437, 2013.
- CIAPPINI, M. C. et al. **Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en mieles de tréboles , eucalipto y alfalfa**. Revista Ciência e Tecnologia July, 2013.
- COSTA, T. S. A. et al. **Avaliação de metodologias para determinação de taninos no suco de caju**. Boletim CEPPA, v. 12, n. 2, p. 167–176, 1999.
- GEHRKE, I. T. S. **Estudo fitoquímico e biológico das espécies *Schinus lentiscifolius*, *Schinus terebinhtifolius*, *Schinus molle* e *Schinus polygamus* (Anacardiaceae) DO RS**. UNIVERSIDADE

FEDERAL DE SANTA MARIA, 2012.

GÜNDEL, S. S. et al. **Ecotoxicology and Environmental Safety Evaluation of cytotoxicity , genotoxicity and ecotoxicity of nanoemulsions containing Mancozeb and Eugenol.** *Ecotoxicology and Environmental Safety* v. 169, n. November 2018, p. 207–215, 2019.

LINS, A. D. F. et al. **Quantificação de Compostos Bioativos em Erva Cidreira (*Melissa officinalis* L.) e Campim Cidreira [*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf].** *Gaia Scientia*, v. 9, p. 17–21, 2015.

MARTINS, M. D. R. et al. **Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 151, n. 1, p. 485–492, 2014.

MOYO, M. et al. **Phenolic composition, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Sclerocarya birrea* and *Harpephyllum caffrum* (Anacardiaceae) extracts.** *Food Chemistry*, v. 123, n. 1, p. 69–76, 2010.

NOH, H. J. et al. **Anti-inflammatory activity of a new cyclic peptide, citrusin XI, isolated from the fruits of *citrus unshiu*.** *Journal of Ethnopharmacology*, 2015.

OLIVEIRA, G. L. S. **Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do dpph: Estudo de revisão.** *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 17, n. 1, p. 36–44, 2015.

PEREIRA, A. DE P. C. **Avaliação das Atividades Antioxidante e Antiinflamatória de *Commiphora leptophloeos*, *Myracrodruon urundeuva*.** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, 2017.

RIBEIRO, K. DA S.; GUIMARÃES, A. L. DE A. **O uso de medicamentos à base de plantas medicinais por médicos do SUS no município de Teresópolis / RJ.** *Revista Agrogeoambiental*, n. 21, p. 61–65, 2013.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. **Introdução.** In: *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*. 6^a ed. Porto Alegre, Florianópolis: UFRGS, UFSC, 2007. p. 1102.

TALCOTT, S.; TALCOTT, S. **Propiedades Fitoquímicas del Mango que Contribuyen a Beneficios en la Salud.** Reporte Final de la Investigación para el Consejo Nacional del Mango. Texas A&M University, 2009.

ULIANA, M. P. et al. **Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves.** *Industrial Crops and Products*, v. 83, p. 235–240, 2016.

VALKO, M. et al. **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.** *The international journal of biochemistry & cell biology*, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VIEIRA, L. M. et al. **Fenóis totais, atividade antioxidante e inibição da enzima tirosinase de extratos de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Anacardiaceae).** *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 17, n. 4, p. 521–527, 2015.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. **The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals.** *Food Chemistry*, v. 64, n. 4, p. 555–559, 1999.