

EFEITOS DO EXTRATO DE *BAUHINIA FORFICATA* LINK EM PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM SNC DE RATOS WISTAR

FERMINA FRANCESCA ALVES VARGAS¹; THIAGO ALVES VARGAS²; JULIA EISENHARDT DE MELLO²; ANA CAROLINA TEIXEIRA DE OLIVEIRA²; VINICIUS QUEIROZ KAISER²; JUCIMARA BALDISSARELLI³

¹Universidade Federal de Pelotas – ffrancescaavargas@gmail.com

²Universidade Católica de Pelotas – thiagoovargas@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – eisenhardtju@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – anacarolinateixeira_@live.com

²Universidade Federal de Pelotas – viniciuskaiser2015@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – jucimarabaldissarelli@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Bauhinia forficata (BF) é uma leguminosa nativa da Mata Atlântica, da família Leguminosae, popularmente conhecida como pata-de-vaca e que se encontra em grande quantidade em países como o Brasil, a Argentina e o Uruguai, estando presente no Brasil na faixa que vai do Rio de Janeiro ao Rio Grande do Sul. É considerada uma planta medicinal, que já foi estudada pelas suas propriedades antidiabéticas, anti-inflamatórias e antioxidantes (TRUS, 2018). Na literatura encontram-se estudos tanto em humanos como em animais, com chá ou extrato da planta, contudo, poucos são os estudos que envolvem o sistema nervoso central (SNC), não sendo estabelecida sua ação neste importante sistema do corpo humano.

Plantas ou compostos que possuem atividade antioxidante têm sido avaliados em diversas doenças com o objetivo de diminuir ou prevenir os danos causados ao organismo pelas espécies reativas decorrentes do estresse oxidativo, que levam a danos e disfunções celulares, associados a diversas patologias e comorbidades associadas a estas (TRUS, 2018).

Nesse contexto, ensaios sobre atividades biológicas de plantas medicinais *in vitro* são de extrema importância, já que esses testes utilizam menor número de animais, e geram resultados confiáveis que podem servir como base e norte para estudos *in vivo* (BEDNARCZUK et al., 2010). Dessa forma, este estudo tem o objetivo de verificar o efeito do extrato de Bf em parâmetros antioxidantes, *in vitro*, em cérebro total de ratos Wistar.

2. METODOLOGIA

Extrato de BF

O extrato da BF foi obtido de uma farmácia na cidade de Pelotas - RS, tendo sido as folhas coletadas na cidade de Campo do Tenente - PR e o extrato obtido por extração hidroalcoólica, concentração e desidratação.

Animais

Foram utilizados 5 ratos Wistar machos adultos, com 60 dias, provenientes do Biotério Central da UFPEL.

Os cuidados com os animais seguiram a Diretriz Brasileira para o Cuidado e

a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica – CONCEA e foram iniciados após aprovação pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Pelotas, sob o nº CEUA 038596/2021-10.

Coleta de amostras

Os animais foram eutanasiados após anestesia com Isoflurano e observação da perda dos reflexos corneanos e dor profunda, sendo coletado sangue por punção intracardíaca. O cérebro total foi separado e usado para as análises.

Parâmetros oxidativos *in vitro*

Todo o cérebro de ratos Wistar machos de 60 dias foi homogeneizado em tampão fosfato de sódio (pH 7,4) e centrifugado a 822g por 10 minutos. Para induzir o estresse oxidativo *in vitro*, 10 µL de peróxido de hidrogênio 5 mM (H₂O₂) e 5 µL de sulfato ferroso 20 µM (FeSO₄) foram adicionados ao homogeneizado de tecido cerebral (225 µL). Para avaliar o potencial antioxidante do extrato, 10 µL do extrato em diferentes concentrações (50, 100, 200, 300 e 400 µg/mL diluídos em água destilada) foram adicionados à mistura e incubados a 37°C por 1h. O ácido ascórbico (AA) 352,24 µg/mL foi utilizado como antioxidante padrão. Nesse sentido, foram obtidas as seguintes condições experimentais: Controle (C) homogeneizado não exposto a H₂O₂ + FeSO₄; Controle induzido (Ci) homogeneizado exposto a H₂O₂ + FeSO₄; e as concentrações de AA e extrato foram expostas ao H₂O₂ + FeSO₄ e aos respectivos tratamentos. Após a indução do estresse *in vitro* foram avaliados os seguintes parâmetros oxidativos: GST, NPSH, TSH e Nitritos.

Determinação de Nitritos

A determinação de nitritos ocorreu conforme Stuehr e Nathan (1989). Os resultados foram expressos em µmol de nitrito/mg de proteína.

Atividade da Glutathione S- Transferase

A atividade da glutathione S-transferase foi determinada no córtex cerebral e hipocampo, de acordo com Habig et al. (1974). A atividade enzimática foi expressa em nmol/h/mg de proteína.

Determinação dos níveis de tióis totais (TSH) e tióis não proteicos (NPSH)

Os níveis de tióis totais foram determinados de acordo com Ellman (1959). Os resultados foram expressos em mmol TSH/mg de proteína. Para a determinação do NPSH, 200 µL da amostra foram precipitados com 200 µL de ácido tricloroacético a 10% seguido de centrifugação (1050 g, 10 min), o sobrenadante desta centrifugação foi utilizado para análise. O teste colorimétrico foi realizado em tampão fosfato 1 M, pH 7,4. Os resultados foram expressos como mmol NPSH/mg de proteína.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade de GST e níveis de NPSH, TSH e nitritos foram avaliados no cérebro total (Figura 1). Com relação à GST (Figura 1A) houve aumento significativo entre as concentrações de 100, 200, 300 e 400 µg/mL quando comparado ao controle (C) (p<0,05 e p<0,01).

Na Figura 1B, foi possível observar um aumento significativo nos níveis de NPSH na concentração de 400 ug/mL em relação ao C ($p < 0,05$). Além disso, também foi demonstrado aumento nas concentrações de 50, 100, 200, 300 e 400 ug/mL quando comparadas ao Ci ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente). Quanto ao TSH (Figura 1C), houve diminuição apenas no AA quando comparado ao C ($p < 0,01$).

Já com relação aos nitritos, na Figura 1D, observa-se que houve um aumento nos teores de Nitrito em Ci ($p < 0,001$) e em todas as concentrações de BF, assim como AA, conseguiu-se reduzir esse aumento ($p < 0,05$).

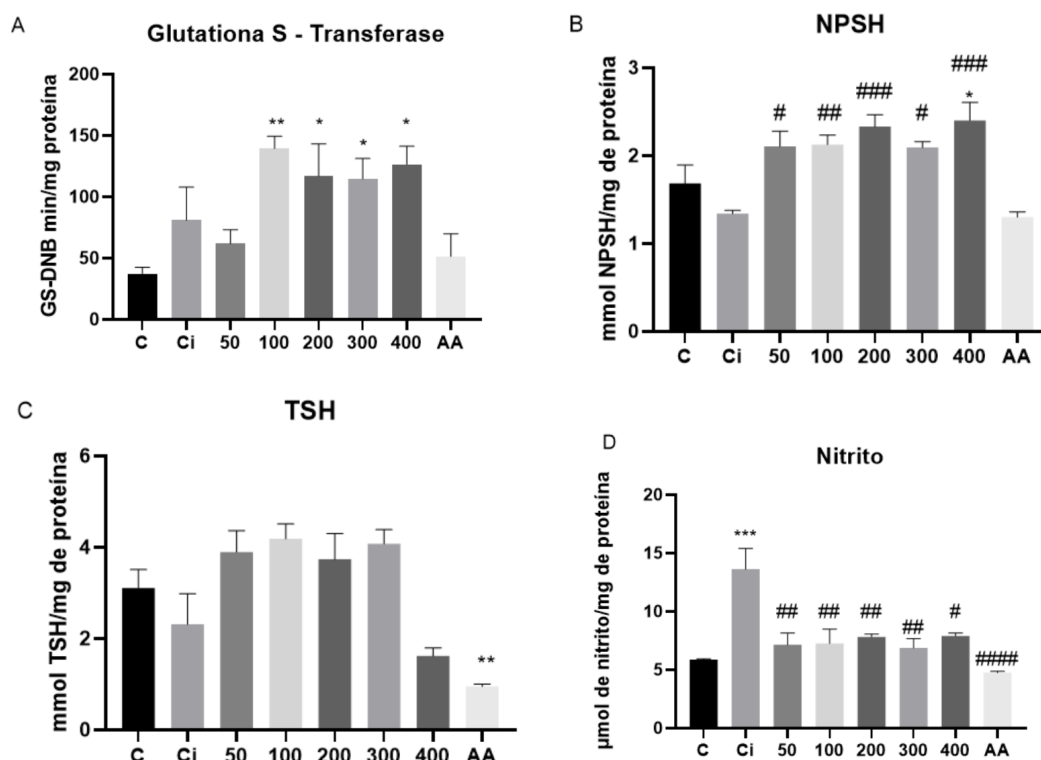


FIGURA 1. Efeito da BF, *in vitro*, sobre a atividade da GST (A) e níveis de NPSH (B), TSH (C) e Nitritos (D) em cérebro total. *, ** e *** representam diferença significativa de C ($p < 0,05$, $p < 0,01$ ou $0,001$). #, ##, ### e #### representam diferença significativa de Ci ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ ou $p < 0,0001$, $n = 5$).

Foram avaliadas, *in vitro*, diferentes concentrações do extrato de BF, visando obter informações sobre as propriedades antioxidantes em cérebro total, sendo observado que a planta apresentou características protetoras interessantes contra o estresse oxidativo. O extrato de BF teve a capacidade de diminuir os níveis de nitritos, que foram aumentados com a indução do estresse e aumentar as concentrações dos antioxidantes GST e NPSH em praticamente todas as dosagens. Dessa forma é plausível sugerir que a BF pode estar envolvida no aumento da atividade de enzimas importantes na detoxificação do organismo e dos níveis de defesas antioxidantes endógenas importantes. Esse poderia ser um dos mecanismos envolvidos em sua ação benéfica em patologias, já que o estresse oxidativo se encontra intimamente relacionado com diversas doenças

como diabetes, hiper e hipotireoidismo, bem como doença de Alzheimer, causando extensos danos ao organismo, principalmente relacionados às comorbidades destas patologias. Logo, a redução nos níveis de nitrito demonstra que além da capacidade do extrato em aumentar os níveis de moléculas protetoras ao SNC através de dois diferentes mecanismos de ação, os antioxidantes enzimáticos (glutathione S-transferase), bem como não enzimáticos (tiois), também agem sobre outro mecanismo, diminuindo diretamente as moléculas pró-oxidantes. No estudo de Peroza et al (2013), foi demonstrado o efeito do extrato de BF na redução da concentração de TBARS, corroborando com os resultados encontrados e confirmando o potencial antioxidante da BF.

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho é possível demonstrar que a planta *Bauhinia forficata* Link possui potencial antioxidante *in vitro*. Assim, se essas características forem confirmadas *in vivo* podem influenciar positivamente diversas patologias, principalmente a DM, que está intimamente relacionada ao estresse oxidativo, sobretudo em relação à progressão da doença e suas comorbidades.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEDNARCZUK, V.O., VERDAM, M.C.S., MIGUEL, M.D., MIGUEL, O.G. **Testes in vitro e in vivo used in the toxicological screening of natural products.** Visão Acadêmica, Curitiba, v.11, n.2, Jul. - Dez./2010 - ISSN 1518-5192.

ELLMAN, G. L. (1959). **Tissue sulfhydryl groups.** Archives of Biochemistry and Biophysics, 82(1), 70–77.

HABIG, W.H., PABST, M.J., JAKOBY, W.B. **Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation.** J BiolChem 1974;249(22):7130–7139.

PEROZA, L. R., BUSANELLO, A., LEAL, C. Q., ROPKE, J., BOLIGON, A. A., MEINERZ, D., LIBARDONI, M., ATHAYDE, M. L., FACHINETTO, R. ***Bauhinia forficata* prevents vacuos chewing movements induced by Haloperidol in rats and has antioxidant potential in vitro.** Neurochemical Research. 38,789-796 (2013). DOI 10.1007/s11064-013-0981-8.

STUEHR, D.J., NATHAN, C.F. (1989) **Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells.** J Exp Med 169:1543–1555. DOI: 10.1084/jem.169.5.1543.

TRUS, Aline D'oria. ***Bauhinia forficata* Link (Leguminosae) no tratamento de diabetes.** Faculdades de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2018.