



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA-UNIPAMPA**  
**CAMPUS URUGUAIANA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**JONATHALINE APOLLO DUARTE**

**“AVALIAÇÃO IMUNOTOXICOLÓGICA DA ANACAUÍTA (*Schinus molle* L.)  
EM CULTURA CELULAR.”**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Uruguiana, RS, Brasil**

**2016**

**JONATHALINE APOLLO DUARTE**

**“AVALIAÇÃO IMUNOTOXICOLÓGICA DA ANACAUÍTA (*Schinus molle* L.)  
EM CULTURA CELULAR”.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Michel Mansur Machado

Co-orientador: Prof. Dr. Luís Flávio Souza de Oliveira

**URUGUAIANA**

**2016**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
CAMPUS URUGUAIANA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

A Comissão Examinadora, abaixo assinada

Aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO IMUNOTOXICOLÓGICA DA ANACAUÍTA  
(*Schinus molle* L.) EM CULTURA CELULAR.**

Elaborada por

**Jonathaline Apollo Duarte**

como requisito parcial para obtenção do grau de

**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**Comissão Examinadora:**

Michel Mansur Machado, Prof. Dr (UNIPAMPA)

Fabiane Moreira Farias

Rodrigo José Freddo

*Dedico este trabalho a minha “super família”. Que sempre incentivou, respeitou e patrocinou as minhas escolhas. Sou eternamente grata a vocês!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus! Por me guiar e proteger sempre, por todo aprendizado adquirido com as pessoas que colocou em meu caminho, pois com algumas aprendi a como devo ser e com outras a como não ser, e principalmente, por ter me feito uma pessoa de muita sorte! Sorte de ter nascido na família que tenho, embora não seja perfeita, é a minha família, a qual é mais que minha base, é meu pilar de sustentação e minha motivação! Obrigada família por ser exemplo de superação!

Aos meus pais, por toda compreensão, patrocínio, apoio, e especialmente, por terem me ensinado desde pequena que, para ter grandeza, você precisa primeiramente pensar e agir como pensam os grandes, e isso significa, ser leal e honesta aos próprios princípios, sendo que a grandeza se conquista trabalhando e não pisando nos outros. Obrigada pai e mãe, por nunca terem desistido de minha pessoa e por todos “se você desistir hoje vai desistir sempre!”

A minha irmã, pelos constantes exercícios de paciência, pelo companheirismo, por todas as risadas, mates e doces compartilhados e principalmente por me ensinar que sempre é possível recomeçar e que as pessoas podem SIM falar mil coisas sobre você, mas elas NÃO podem mudar quem você realmente é! Obrigada mana, por sempre alegrar os meus dias!

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores do PPGCF, que contribuíram para a minha formação, pelos conhecimentos compartilhados e por serem exemplos de profissionais. Em especial aos professores da banca pela disponibilidade em avaliar o meu trabalho. Aos professores da NAPO (Centro de Análise e Pesquisa Orgânica da UFSM) e o Departamento de Química da UFSM, que contribuíram com a análise fitoquímica do óleo essencial.

Ao Prof. Dr. Michel Mansur Machado, mestre e orientador, muito obrigada! Por todo conhecimento compartilhado, pelas experiências proporcionadas, pelas oportunidades ofertadas e pelo acolhimento durante toda a minha vida acadêmica.

Ao professor Luís Flávio de Oliveira, co-orientador e mentor, obrigada! Por sempre responder minhas dúvidas com outra pergunta, pois assim, o Sr. me ensinou os caminhos!

A professora Fabiane Farias, eu agradeço pelo acolhimento, conhecimentos, amizade e pelas experiências compartilhadas, muito obrigada! E agradeço também todos os integrantes do laboratório 409, vocês são muito especiais!

A todo o grupo NUBIOTOXIM, pela colaboração e contribuição no desenvolvimento do meu trabalho, por todo companheirismo, risadas e ajudas no desenvolvimento dos experimentos, eu aprendi muito com todos vocês! Obrigada aos líderes desse grupo por todo apoio e, principalmente, por confiarem e acreditarem no meu trabalho, eu cresci muito com vocês!

Aos amigos e colegas de mestrado, agradeço por todo incentivo, ajuda, conhecimento e experiências compartilhadas, vocês foram muito solidários e fazem parte dessa conquista!

*“Valeu a pena? Tudo vale a pena  
Se a alma não é pequena.”*

(Fernando Pessoa)

## RESUMO

O emprego de produtos naturais para o tratamento, cura ou prevenção de doenças pela população é datada desde os tempos mais remotos, e apesar dos inúmeros avanços na ciência, o uso de plantas com finalidade medicinal, ainda representa na maioria das vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e de diversos grupos étnicos. Atualmente é possível verificarmos que apesar de todos os avanços nas indústrias farmacêuticas para a produção de fármacos sintéticos, a população ainda recorre às plantas medicinais. Entretanto, existe uma infinidade de plantas que ainda não são conhecidos os seus possíveis efeitos farmacológicos e/ou toxicológico. Diante desse contexto, a *Schinus molle* L. (Anacardiaceae), popularmente conhecida como anacauíta, é uma planta rica em óleo essencial, a qual vem sendo usada como uma opção de tratamento para diversas enfermidades, e apesar de seu amplo emprego na medicina popular, a literatura carece de informações voltadas para seu perfil imutotoxicológico. Assim, investigou-se os efeitos do óleo essencial frente a parâmetros citotóxico, mutagênico e genotóxico em cultura de linfócitos e macrófagos humanos. Inicialmente, determinaram-se as DL<sub>50</sub> para ambas as células estudadas, através do teste de proliferação celular, para então desenvolver os demais testes. As DL<sub>50</sub> encontradas foram de 30.07µg/mL para linfócitos humanos e de 42.07µg/mL para macrófagos humanos, assim, foram definidas as concentrações a serem testadas, sendo essas DL<sub>50</sub>, DL<sub>50/10</sub>, DL<sub>50/100</sub>, DL<sub>50/1000</sub> e DL<sub>50/10000</sub> para as células em questão, e foi constatado que o óleo essencial foi capaz de promover citotoxicidade em concentrações superiores a DL<sub>50/1000</sub>, para ambas as células testadas. Entretanto, o mesmo proporciona efeito genotóxico em culturas de macrófagos, somente para as duas concentrações maiores e quando avaliado os frente a parâmetros mutagênicos, constatou-se que, o mesmo não promove alterações cromossômicas assim como, também não alterou o índice de divisão celular, embora tenha sido capaz de proporcionar frequência de micronúcleo concentração dependente nos macrófagos. Contudo, é importante salientar a importância de conhecimento dos constituintes do óleo essencial da *Schinus molle* L., para maiores esclarecimentos referente a sua toxicidade, uma vez que, essa planta é amplamente empregada na medicina popular para as diversas finalidades. Dessa forma, os resultados encontrados nesse trabalho, tem a contribuir com a literatura. Para tanto, estudos complementares são necessários para auxiliar na construção completa do perfil toxicológico do óleo essencial da planta em estudo, buscando a segurança da população que a utiliza.

**PALAVRAS – CHAVES:** *Schinus molle* L., óleo essencial, genotóxico, mutagênico, citotóxico



## ABSTRACT

The use of natural products for the treatment, cure or prevention of disease by population is dated from the earliest times, and despite the numerous advances in science, the use of plants for medicinal purposes, yet is most often the only therapeutic resource many communities and various ethnic groups. It is currently possible to see that despite all the advances in the pharmaceutical industry for the production of synthetic drugs, people still make use of medicinal plants. However, there is a multitude of plants that are not yet known its possible pharmacological effects and / or toxicology. In this context, the *Schinus molle* L.(Anacardiaceae), popularly known as anacauíta, is a plant rich in essential oil, which has been used as a treatment option for various diseases, and despite its widespread use in therapy, the literature lacks information geared to your immunotoxicology profile. Thus, we investigated the effects of essential oil cytotoxic front parameters, mutagenic and genotoxic in cultured human lymphocytes and macrophages. Initially, the LD<sub>50</sub> were determined for both the cells studied by the cell proliferation assay, and then to develop other tests. The LD<sub>50</sub> was found to 30.07µg/ml for human lymphocytes and 42.07µg/ml for human macrophages, thus the concentrations to be tested have been identified and these LD<sub>50</sub>, LD<sub>50/10</sub>, LD<sub>50/100</sub> LD<sub>50/1000</sub> and LD<sub>50/10000</sub> to the cells in question, and it was found that the essential oil was able to promote cytotoxicity at concentrations above LD<sub>50/1000</sub>, for both test cells, however, it provides genotoxic effects in macrophage cultures, only the two concentrations and larger when measured against the mutagens parameters, it was found that it does not promote chromosomal abnormalities as well as, did not alter the rate of cell division, although it was able to provide frequency micronucleus concentration dependent on macrophages. However, it is important to stress the importance of knowledge of essential oil constituents of *Schinus molle* L., for further information regarding its toxicity, since this plant is widely used in folk medicine for a variety of purposes. Thus, the results found in this work, is to contribute to the literature. Therefore, further studies are needed to help complete construction of the toxicological profile of the essential oil of the plant under study, seeking the safety of the population makes use of this.

**KEY-WORDS:** *Schinus molle* L., oil essential of leaves, genotoxic, mutagens, cytotoxic

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 01:</b> Árvore Anacauíta e sua folha	17
<b>Figura 02:</b> Células Hematopoiéticas Pluripotentes	19
<b>Figura 03:</b> Processo de Diferenciação dos Linfócitos B	20
<b>Figura 04:</b> Processo de Diferenciação de Monócito em Macrófagos	22
<b>Figura05:</b> Determinação da DL50 do óleo essencial de <i>Schinus molle</i> L. em cultura de linfócitos humanos.	32
<b>Figura 06:</b> Determinação da DL50 do óleo essencial de <i>Schinus molle</i> L. em cultura de macrófagos humanos.	32
<b>Figura 07:</b> Avaliação da viabilidade celular em culturas de LH e MH expostos a diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Schinus molle</i> L.	33
<b>Figura 08:</b> Avaliação do índice de dano de DNA em culturas de LH e MH tratados com diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Schinus molle</i> L.	35
<b>Figura 09:</b> Avaliação da frequência de micronúcleo em culturas de LH e MH tratados com diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Schinus molle</i> L.	36
<b>Figura 10:</b> Avaliação da instabilidade cromossômica numérica em LH e MH humanos tratados com o óleo essencial de <i>Schinus molle</i> L.	37
<b>Figura 11:</b> Análise do índice mitótico em culturas de LH e MH tratados com diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Schinus molle</i> L.	38

## LISTA DE TABELAS

<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>Tabela01:</b> Caracterização fitoquímica do óleo essencial de <i>Schinus molle</i> L.	30
<b>Tabela02:</b> Classificação dos compostos majoritários do óleo volátil de <i>Schinus molle</i> L.	31

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>BPPC</b>	Boas Práticas de Pesquisa Clínica
<b>CPG</b>	Controle Positivo de Genotoxicidade
<b>CG</b>	Cromatografia Gasosa
<b>CG-MS</b>	Cromatografia Gasosa com Detecção por Espectro de Massas
<b>CN</b>	Controle Negativo
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dose Letal Média
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>EROs</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>MS</b>	Espectrometria de Massa
<b>ID</b>	Índice de Dano ao DNA
<b>LPS</b>	Lipopolisacarídeo
<b>LB</b>	Linfócito B
<b>LH</b>	Linfócitos Humanos
<b>LT</b>	Linfócito T
<b>MH</b>	Macrófagos Humanos
<b>OV</b>	Óleo Volátil
<b>SI</b>	Sistema Imune
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>µg</b>	Microgramas

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1. Considerações sobre <i>Schinus molle</i> L.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2. Sistema</b>	<b>18</b>
<b>Imunológico.....</b>	
3.2.1. Linfócitos B.....	19
3.2.2. Linfócitos T.....	20
3.2.3. Macrófagos.....	21
<b>3.3. Importância da Pesquisas de Toxicidades pelo Uso de Plantas..</b>	<b>22</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>40</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>41</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>47</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são empregados pela humanidade desde os tempos imemoriais (VIEGAS Jr, BOLZANI., 2006), sendo que, o conhecimento sobre plantas medicinais representa na maioria das vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e de diversos grupos étnicos (MACIEL, PINTO, VEIGA Jr., 2002). A procura por tratamento ou cura de enfermidades pela ingestão de ervas e folhas talvez tenham sido um dos primeiros recursos para a utilização dos produtos naturais (VIEGAS Jr, BOLZANI., 2006).

Apesar de todos os avanços nas indústrias farmacêuticas para a produção de fármacos sintéticos, a população ainda recorre às plantas medicinais. Assim, esses produtos podem ser encontrados tanto nas regiões mais pobres do país quanto nas grandes cidades brasileiras, onde são comercializadas em feiras livres, mercados populares e são até mesmo cultivadas em quintais residenciais (MACIEL, PINTO, VEIGA Jr., 2002).

Diante desse contexto, a *Schinus molle* L. ou “Anacauíta”, planta pertencente à família Anacardiaceae, a qual vem sendo usada como uma opção de tratamento para algumas enfermidades pela população. Apesar da *Schinus molle* L., ser amplamente distribuída no Rio Grande do Sul, ela é uma planta originária do Peru, entretanto encontra-se em diversos países da América do Sul, como por exemplo, no Brasil, Uruguai, Argentina entre outros (BACKES., 2002). Assim como a *Schinus terebinthifolius* R., a *Schinus molle* L., também produz, flavonóides, taninos e óleos essenciais, além de outros compostos como descrito por Santos e colaboradores (2008).

As folhas e frutos da Anacauíta são amplamente empregadas para o tratamento de diferentes enfermidades. As folhas dessa planta são ricas em óleos voláteis (MARTINS et al., 2014). O principal uso das folhas da *Schinus molle* L., pela população gaúcha é através de procedimentos de inalação, para o tratamento de infecções das vias aéreas.

O seu uso na medicina popular está relacionado a diversas atividades como antiviral, antibacteriana, diurético, digestivo, para o tratamento de infecções respiratórias e urinária, reumatismo e como antidepressivo (DUKE et al., 1985;

YELASCO-NEGUERUELA., 1995; PEREZ e ANESINI., 1994). Apesar de seu amplo emprego na medicina popular, não há estudos na literatura que relatem os seus possíveis efeitos tóxicos. Assim, como previsto na Resolução 90/2004 da ANVISA, a qual enfatiza a necessidade do desenvolvimento de ensaios pré-clínicos e clínicos de segurança e eficácia, uma vez que não existem estudos que comprovem a segurança pré-clínica, como disposto no “Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos”, publicado em 16 de março de 2004, seguindo-se as Boas Práticas de Pesquisa Clínica (BPPC) para realização de pesquisa clínica, uma vez que a presença de xenobióticos (como compostos tóxicos de plantas) proporciona a quebra da homeostasia do organismo, desencadeando assim uma resposta imunológica, podendo resultar em uma imunoestimulação ou em uma imunossupressão (VAZ, TAKEI, BUENO, 2010). Nesse contexto, a imunotoxicologia que é a área responsável por avaliar qualquer efeito adverso sobre o sistema imunológico (FRIEDRICH., 2013) demonstra-se indispensável para a avaliação do potencial toxicológico de determinadas plantas, a fim de evitar quadros graves de intoxicação. Dessa forma, fica evidente a importância de nosso trabalho, o qual tem por objetivo avaliar os possíveis efeitos imunotoxicológicos da planta em questão, corroborando com a literatura a qual carece dessas informações.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 *Objetivo Geral*

- Avaliação dos constituintes do óleo volátil de *Schinus molle* L. (Anacauíta);
- Avaliar os efeitos do óleo essencial de *Schinus molle* L. (Anacauíta) sobre parâmetros imunotoxicológicos.

### 2.2 *Objetivos Específicos*

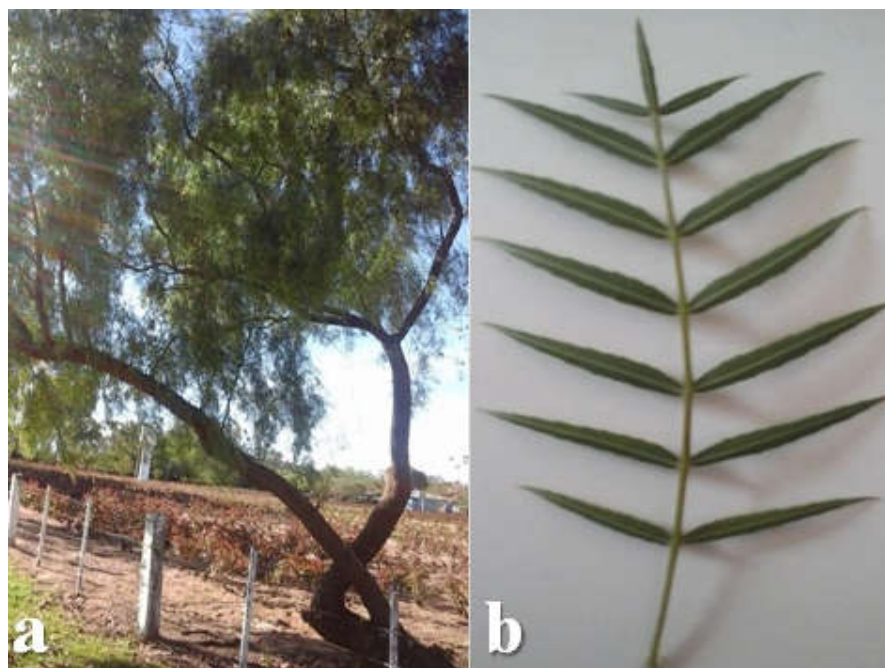
- Determinação da composição fitoquímica do óleo volátil de *Schinus molle* L. por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (CG-MS);
- Determinar os efeitos do óleo volátil de *Schinus molle* L. sobre parâmetros genotoxicológicos através do teste cometa em culturas de linfócito e macrófagos humanos;
- Determinar os efeitos do óleo volátil de *Schinus molle* L. sobre parâmetros mutagênicos através dos testes de micronúcleo e instabilidade cromossômica em culturas de linfócitos e macrófagos humanos;
- Determinar os efeitos do óleo volátil de *Schinus molle* L. sobre parâmetros citotóxicos avaliando a viabilidade e proliferação celular em culturas de linfócitos e macrófagos humanos.



### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Considerações Sobre *Schinus molle* L.

A *Schinus molle* L. é uma planta que se encontra amplamente distribuída no estado do Rio Grande do Sul, pertence à família Anacardiaceae, sendo popularmente conhecida como Anacauíta ou aroeira-mansa é uma espécie heliófita, que apresenta características xerofíticas e é usualmente empregada em paisagismo ou na arborização das ruas (SANTOS et al., 2007). A espécie *Schinus molle* L. (**Figura 01a**), apresenta hábito arbóreo com cerca de 8 a 20 m com copa globosa, densa, perenifólia, com folhas compostas e pinatífidas, diferenciando essa de outras *Schinus*, como por exemplo a *Schinus terebinthifolius* R. (AZEVEDO; QUIRINO; BRUNO., 2015) (**Figura 01b**) (PIRES., 2012). Suas folhas e frutos são ricos em óleos voláteis (OV), o qual em estudos realizados por MARTINS e colaboradores (2014), verificou-se a capacidade antioxidante e a potente ação antimicrobiana frente a bactérias gram positiva e gram negativas de seus OVs. SANTOS e colaboradores realizaram uma pesquisa comparatória *in vitro* entre *S. molle* L. e *S. terebinthifolius* para análise da capacidade antifúngica, e conseguiram obter resultados capazes de demonstrar que o mix de óleo essencial de *S. molle* L. (mistura de óleos extraídos de galhos, frutos e folhas), manifesta efeito fungicida contra *Alternaria spp.*, *Fusarium spp.*, *Collethotricum spp.* e *Botrytis spp.*, enquanto o mix do óleo essencial de *S. terebinthifolius* apresentou efeito fungicida mais pronunciado para *Botrytis spp.*



**Figura 01: Foto da Árvore Anacauíta (a) e sua folha (b). Fonte: Acervo pessoal do Autor.**

A *Schinus molle* L. na Argentina é considerada uma planta medicinal, a qual é utilizada empiricamente como antirreumática, antisséptica, anti-inflamatória, antibacteriana e cicatrizante, através da ingestão de chá (RUFFA., 2002).

Estudos realizados anteriormente demonstram que a Anacauíta é uma planta rica em OV, destacando-se os trabalhos realizados por MARTINS e colaboradores (2014) os quais investigaram a composição química dos OV de suas folhas e frutos, identificando ao final vinte e dois componentes no OV extraído da folha, onde 69,3% correspondem a monoterpenos e 17,0% aos sesquiterpenos, apresentando como característica a presença de  $\alpha$ -felandreno (25,9%), limoneno (11,7%),  $\beta$ -mirceno (11,1%),  $\beta$ -felandreno (10,5%) e elemol (9,0%). Em contrapartida, no óleo extraído do fruto foi possível identificar somente dezesseis componentes, no qual 98,0% equivalem a monoterpenos e 0,5% a sesquiterpenos, destacando-se os  $\beta$ -mirceno (51,3%), limoneno (14,1%),  $\alpha$ -felandreno (14,0%) e  $\beta$ -felandreno (11,0%), sendo que a sua composição e as concentrações de seus compostos são variáveis de acordo com a localização geográfica do seu cultivo, como descrito por GOMES e colaboradores (2013).

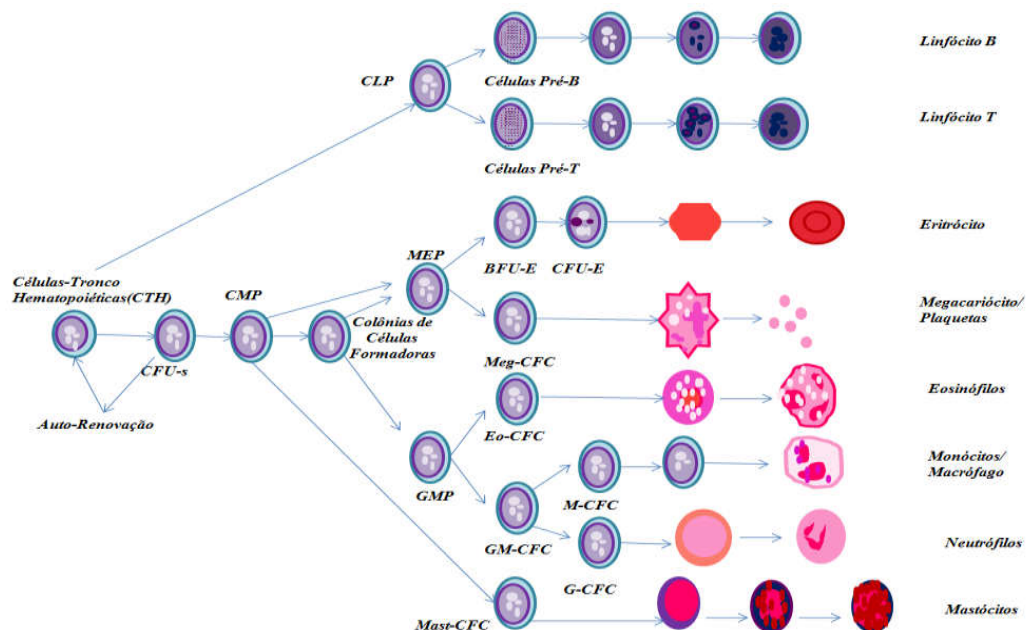
Em trabalho realizado por RUFFA e colaboradores (2002) verificou-se *in vitro* a citotoxicidade do extrato metanólico frente carcinoma hepatocelular humano, e o seu efeito demonstrou-se dose dependente nas concentrações de 100, 200 e 300µg/mL, já, FERRERO e colaboradores (2007), avaliaram *in vivo* toxicidade aguda e subaguda em ratos tratados com extrato etanólico dos frutos, onde foi possível constatar, ao final do estudo, que o extrato não proporcionava alterações histopatológicas nos tecidos que foram analisados (cérebro, fígado, rim, pulmão, coração, estômago e intestino), o que não descarta a necessidade de um estudo de toxicidade crônica para maior segurança em seu uso.

### 3.2 Sistema Imunológico

A compreensão do sistema imune (SI) é considerada uma ferramenta fundamental da biologia para a compreensão dos processos fisiológicos, o que permite ao organismo reconhecer-se, promovendo dessa forma, respostas apenas ao que é estranho (CALICH; VAZ, 2009). O SI é altamente adaptável, sendo ele o grande responsável por defesas frente a diversos antígenos (KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008). Assim, quando o organismo é exposto a determinados agentes estranhos (fungos, vírus, bactérias e parasitas), esse promove uma série de eventos com o propósito de eliminar esses agentes, caracterizando dessa forma uma resposta imune (VAZ; TAKEI; BUENO, 2010) e diferentemente de outros sistemas, as células que o compõe são móveis, propriedade essa que facilita a identificação de moléculas, microrganismos estranhos e eventuais alterações em células próprias, uma vez que, essas encontram-se circulantes pelo organismo (BALESTIERI, 2006).

As células integrantes do SI originam-se das células hematopoéticas pluripotentes (**Figura 02**), e são elas as responsáveis por atribuírem a ele, suas principais características (especificidade e a memória) sendo elas os linfócitos T, linfócitos B e células natural *killer* (NK), as células apresentadoras de antígeno (macrófago, células dendríticas, células de Langerhans e os próprios linfócitos B), e os órgãos que o compõe são classificados como órgãos linfoides primários (timo e a medula óssea) os quais são responsáveis pela geração de linfócitos e os órgãos linfoides

secundários (baço, linfonodos, tecido linfóide associado às mucosas do aparelho respiratório) (LEANDRO, 2007; CALICH; VAZ, 2009).



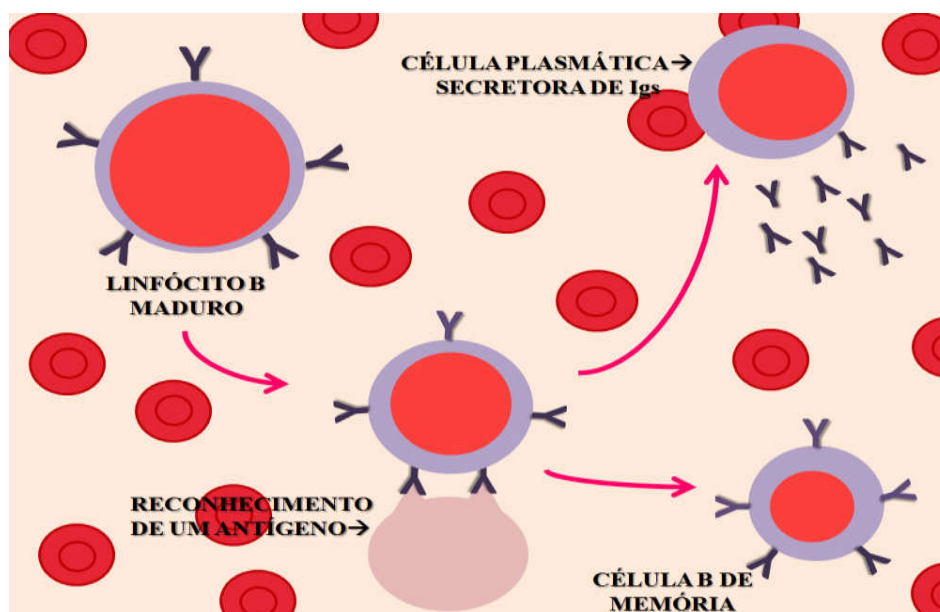
**Figura 02: Células Hematopoiéticas Pluripotentes.** Fonte: Adaptando de: <[http://www.lookfordiagnosis.com/mesh\\_info.php?term=c%C3%A9lulas+precursoras+de+mon%C3%B3citos+e+macr%C3%B3fagos&lang=3#](http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=c%C3%A9lulas+precursoras+de+mon%C3%B3citos+e+macr%C3%B3fagos&lang=3#)>. Acessado em 12 de junho de 2015.

### 3.2.1 Linfócitos B

Os linfócitos B (LB) são inicialmente produzidos no saco vitelino, posteriormente, na vida fetal, no fígado e por último na medula óssea, onde serão diferenciados como efetores, que são células produtoras de anticorpos (plasmócitos) ou de memória (**Figura 03**), com maior sobrevivência (MESQUITA, 2010; BALESTIERI, 2006, VAZ; TAKEI; BUENO, 2010, KINDT, GOLDSBY, OSBORNE; 2008). Os seus receptores interagem diretamente com as conformações moleculares especiais dos epítopos de uma molécula de antígenos (CALICH, VAZ; 2009).

A ativação de LB caracteriza uma resposta humoral, sendo mediada por imunoglobulinas com função de anticorpo os quais podem neutralizar, ou até mesmo

destruir, os antígenos contra os quais foram gerados (MESQUITA Jr., 2010; VAZ; TAKEI; BUENO, 2010), de modo que a porção humoral do sistema imune age na interação das células B com o antígeno e conseqüentemente na proliferação e diferenciação nas células plasmáticas secretoras de anticorpos (glicoproteínas), que são constituídos de duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, todas de polipeptídios, e são as suas extremidades aminoterminais que formam o sítio de ligação do antígeno (KINDT, GOLDSBY, OSBORNE; 2008).



**Figura 03: Processo de Diferenciação dos Linfócitos B.** Fonte: Adaptado de: <[http://biologiacampmorvedre.blogspot.com.br/2013/02/bloque-iv\\_7436.html](http://biologiacampmorvedre.blogspot.com.br/2013/02/bloque-iv_7436.html)>. Acessado em 12 de junho de 2015.

### 3.2.2 Linfócitos T

Os linfócitos que migram da medula óssea para o timo, se diferenciam em linfócitos T os quais podem ser divididos em linfócitos T auxiliares (ativam outras células para exercerem suas funções) ou linfócitos T citotóxicos (possuem a função de matar células tumorais e ou infectadas, mas, são dependentes de linfócitos T

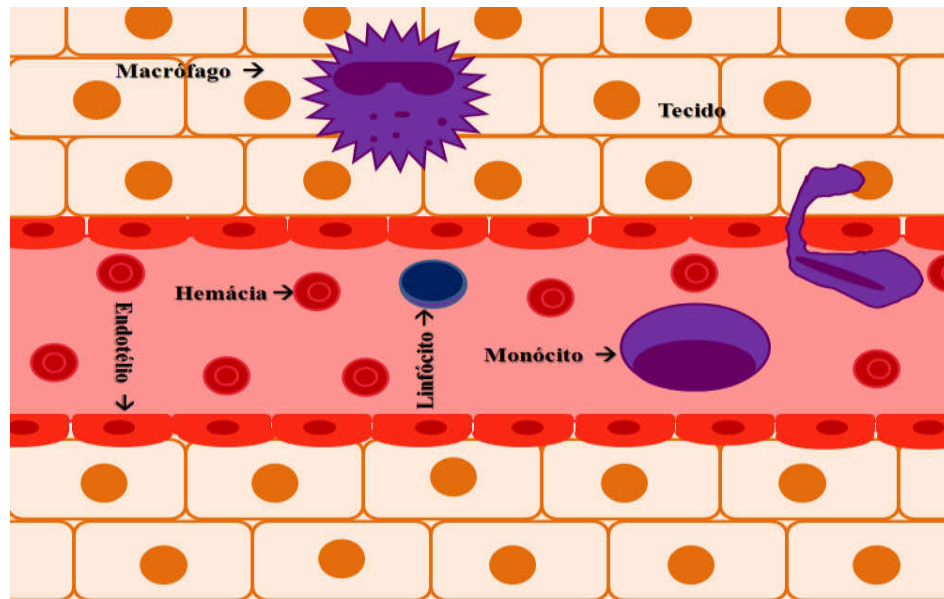
auxiliadores) (BALESTIERI., 2006). Seus receptores ao contrário dos linfócitos B, interagem com os aminoácidos de epítomos de antígenos, os quais apresentam uma variação de 12-20 aminoácidos (CALICH, VAZ., 2009).

As células T auxiliaadoras geralmente expressam a glicoproteína de membrana CD4, essas apresentam um papel importante na resposta imune, uma vez que quando ativadas se diferenciam em células efectoras capazes de gerar citocinas com diversas funções, em contra partida as células T citotóxicas expressam a glicoproteína de membrana CD8, que, quando ativada prolifera e se diferencia em uma célula com a capacidade de destruir a célula alvo, além de secretarem citocinas promotoras da ativação de células fagocíticas que induzem a inflamação (FNT- $\gamma$ , FNT- $\alpha$  e linfotoxina) (KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008; VAZ; TAKEI; BUENO, 2010). Entretanto, um terceiro tipo de célula T vem sendo estudado, que são as células reguladoras (T<sub>reg</sub>), que apresenta CD4 em sua superfície, porém, pode diferenciar-se em auxiliador ou citotóxico pela presença de marcadores de superfície associados com o estágio de ativação (KINDT, GOLDSBY, OSBORNE; 2008).

### 3.2.3 Macrófagos

Quando os monócitos migram do sangue periférico para os diferentes tecidos, eles se diferenciam em macrófagos (**Figura 04**) (BALESTIERI., 2006). Apresentam como características a capacidade de aderência, quimiotaxia, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e citotoxicidade (SCHULENBURG et al., 2004; DI ROSA et al., 1990).

Os macrófagos estão envolvidos em processos de resposta ao stress celular na fase aguda (MEYER; DA SILVA, 1999), quando esses são ativados ocorre produção de TNF- $\alpha$ , a qual liga-se a seus receptores, e conseqüentemente estimula a transcrição e a produção da enzima I $\kappa$ Bquinase, a qual irá produzir o fator nuclear kB (NF-kB), que é considerado o centro da resposta e funções imune (VITALE; ANDRADE; RIBEIRO, 2007; HAYDEN; GHOSH, 2011).



**Figura 04: Processo de Diferenciação de Monócito em Macrófagos. Fonte: Adaptado de: <<http://ruisoares65.pbworks.com/f/Diapedese.gif>>. Acessado em 12 de junho de 2015.**

### **3.3 Importância da Pesquisas de Toxicidades pelo Uso de Plantas**

Existe uma infinidade de plantas que são potencialmente tóxicas, e frequentemente não são reconhecidas pela população, podendo prejudicar assim, a saúde dos pacientes que a usam de forma empírica, uma vez que, ao invés de auxiliar na prevenção ou no tratamento de sua enfermidade, estas estarão promovendo um quadro de intoxicação, o qual proporcionará o agravamento do quadro clínico dos pacientes (SIMÕES et al., 2010). As plantas consideradas tóxicas são as que possuem substâncias capazes de promover alterações biológicas a diversos organismos, podendo essas ser propriedades naturais, físicas, químicas ou físico-químicas (VASCONCELOS; VIEIRA; VIEIRA., 2009 ).

Anualmente, inúmeros casos de intoxicação por plantas tóxicas ornamentais são identificados, sendo as principais vítimas as crianças e animais de estimação de pequeno porte (SILVA et al., 2015). Também é comum relatos de intoxicações por plantas na

população adulta, e tem como uma das principais causas o uso impróprio de plantas consideradas e/ou classificadas como medicinais, alucinógenas e abortivas (VASCONCELOS; VIEIRA; VIEIRA., 2009 ). Por esses motivos, inúmeras pesquisas, tem buscado elucidar os possíveis efeitos toxicológicos causados por plantas empregadas empiricamente na terapêutica.

Assim, são necessários diversos estudos de avaliação toxicológica, os quais primeiramente devem ser realizados *in vitro*, uma vez que esses manifestam vantagens quando comparado ao *in vivo*. Dentre elas destacam-se a obtenção de resultados significativos, a limitação do número de variáveis experimentais e a redução de tempo para a execução das análises em alguns casos, entretanto, eles não substituem os testes *in vivo* (ROGERO et al., 2003). Dentre os testes que buscam assegurar o uso de plantas na promoção da saúde, destacando-se os ensaios de citotoxicidade (avaliação da viabilidade celular), mutagenicidade (avaliação de mutação celular) e genotóxico (avaliação de danos no material genético) em cultura (FONSECA & PEREIRA., 2004), sendo esses eficientes na investigação do perfil toxicológico das usadas pela população.



## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Identificação botânica da *Schinus molle* L.**

A obtenção de material para identificação botânica foi dada a partir da coleta do material e realização da exsicata durante o mês de junho. A exsicata foi enviada para o Herbário da UFSM, e foi devidamente identificada pelos botânicos do herbário, e catalogada sob número SMDB-13507.

### **4.2 Extração do óleo volátil da *S. molle* L.**

O material vegetal de escolha foram as folhas frescas, coletadas no interior do município de Uruguaiana no estado do Rio Grande do Sul no mês de junho de 2015. Para a extração foram utilizados 30g de folhas, que foram trituradas e submetidas à hidrodestilação em aparelho Clevenger, durante oito horas. O rendimento foi calculado levando-se em consideração o peso bruto/peso do óleo.

### **4.3 Determinação das concentrações**

Devido à falta de estudos para a planta, as doses foram escolhidas de forma a permitir um amplo espectro de avaliação a qual possibilitou a determinação das doses letais médias ( $DL_{50}$ ). Para tanto, inicialmente foram tomadas as concentrações de 100 $\mu$ g/mL, 10 $\mu$ g/mL, 1 $\mu$ g/mL, 0.1 $\mu$ g/mL e 0.01 $\mu$ g/mL para serem testadas nas culturas de linfócitos e de macrófagos, e após a análise da viabilidade celular das mesmas, determinou-se a  $DL_{50}$  para as diferentes células testadas. As  $DL_{50}$  foram determinadas através de método estatístico de regressão linear para as diferentes culturas desenvolvidas no trabalho.

#### **4.4 Análise cromatográfica do óleo volátil**

O OV foi submetido a separação por meio de cromatografia em fase gasosa, com detecção por espectrometria de massa, o qual foi desenvolvido no Centro de Análise e Pesquisa Orgânica da UFSM (NAPO) no Departamento de Química da UFSM. A análise foi realizada num cromatógrafo de modelo 6890N, acoplado com um detector de massa de modelo 5975B, tanto da Agilent Technologies. Condições cromatográficas foram como se segue: temperatura inicial do forno foi de 50°C, durante um minuto, seguido por aquecimento a uma taxa de 5°C/min até 300°C, mantendo-se esta temperatura durante 9 minutos, com um total de 60 minutos, foram executados; separação foi conseguida numa coluna DB-5MS (30m x 320µm x 0,25µm), a uma taxa constante de 1,5 ml/min de hélio; a detecção foi realizada no equipamento quadrupolo usando ionização de elétrons (CUNHA et al., 2015). Identificação dos componentes foi efetuada com base no índice de retenção (RI), determinado em função da série homóloga de n-alcanos, C7-C30, sob condições experimentais idênticas, em comparação com a busca da biblioteca espectros de massa (NIST e WILEY), e com dados na literatura de espectros de massa de ADAMS (1995).

#### **4.5 Preparação da cultura celular de linfócitos**

As culturas de linfócitos foram preparadas utilizando 0,5 mL de sangue venoso (coletado por venopunção de voluntário) e imediatamente transferidas para o meio de cultura contendo 10mL de RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de estreptomicina/penicilina, conforme descrito em trabalho prévio (SANTOS MONTAGNER et al. 2010) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Pampa (nº 27045614.0.0000.5323). As células foram mantidas em estufa a 37°C em ambiente de 5% de CO<sub>2</sub> até o momento do uso. A cada 72 horas, foi realizada a troca do meio por outro preparado da mesma forma. As células foram mantidas desta maneira até o momento do uso.

#### **4.6 Preparação da cultura celular de macrófagos**

O isolamento dos leucócitos a partir do sangue total obtido anteriormente foi realizado por centrifugação e diferença de densidade entre as células leucocitárias, utilizando métodos de centrifugação e aderência em plástico/vidro de monócitos como descrito em estudos já realizados (DAVIS., 1992; DELIREZH & SHOJAEEFAR., 2012; DELIREZH et al., 2013). Obtidos as células de interesse, a ativação dos monócitos ocorreu utilizando Lipopolissacarídeo (LPS) 1µg/mL, em meio RPMI 1640 suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina, 25% de SFB, a 37±1°C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> e umidade de 95% por 2 horas. Essa exposição acarretou na formação de células dendríticas derivadas dos monócitos que foram utilizadas nos estudos (ARNOLD et al., 2014; VOGEL et al., 2014).

#### **4.7 Tratamentos das culturas**

Todas as culturas receberam a adição do composto teste em um volume final de 100µL. Os grupos a serem testados são: controle negativo (CN) com tampão fosfato pH 7.4, Controle Positivo Genotóxico (CPG) com Bleomicina 3µg/mL, OV de *Schinus molle* L. em cinco concentrações que variam de suas respectivas DL<sub>50</sub> até a DL<sub>50/10000</sub> para cada uma das células testadas.

#### **4.8 Análise da citotoxicidade do óleo de *S. molle* L.**

O parâmetro analisado para avaliação da citotoxicidade foi a viabilidade celular, através da perda da integridade da membrana, utilizando o método do Azul de Tripán (BUROW et al., 1998). Para isso, foi tomada uma alíquota da amostra e colocada em contato com o corante Azul de Tripán, o qual cora as células inviáveis de azul. A análise foi realizada através da visualização em microscópio em aumento de 400x. Foram contadas 100 células por lâminas.

#### **4.9 Análise da genotoxicidade do óleo de *S. molle* L.**

A genotoxicidade foi avaliada através do Teste Cometa, como descrito por SINGH (1995). Para tanto, preparou-se as lâminas previamente cobertas com agarose de alto ponto de fusão, com uma tomada de amostra homogeneizada com agarose de baixo ponto de fusão. As mesmas, após secagem, foram dispostas em uma cuba contendo solução de Lise por uma semana. Depois desse processo, as lâminas foram submetidas à corrida eletroforética – 20min, 300mA, 25V; em tampão NaOH 300mM e pH >13. Realizada a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas e secas em temperatura ambiente. Posteriormente a secagem, as lâminas foram fixadas, secadas novamente, reidratadas e coradas com solução de nitrato de prata, e secas a temperatura ambiente. Os danos ao DNA foram classificados de acordo com o índice de dano, avaliado a partir da migração das proteínas do DNA, que pode variar de 0 – não há dano, até 4 –há o máximo de dano. Os danos de DNA foram avaliados como índice de dano ao DNA (ID). O dano ao DNA foi calculado a partir das células com diferentes classificações de danos; o índice de dano varia de 0 (100 células x 0 quando não ocorreu dano) a 400 (100 células x 4, quando ocorreu o máximo de dano).

#### **4.10 Análise da mutagenicidade do óleo de *S. molle* L.**

O teste de formação de Micronúcleos foi o parâmetro empregado para avaliação de mutagenicidade. Para isso, foram utilizadas as culturas descritas anteriormente e o método foi realizado segundo a técnica descrita por SCHMID (1975) e apresentada na forma de índice como descrito por FENECH (2000). Além deste, foi realizado o teste de Instabilidade Cromossômica Numérica. A instabilidade cromossômica foi avaliada pela técnica de Citogenética da Banda G descrita por YUNIS (1996), a qual prevê a adição de 10µL/mL de Colchicina em cada cultura celular devidamente tratada. Depois da adição, seguiu-se a incubação por 1 hora, a 37°C. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1800 RPM. Posterior a centrifugação, o sedimento celular foi ressuscitado em solução hipotônica de KCl e incubados a 37°C por 16 minutos. Realizou-se outra centrifugação, e o sedimento foi ressuscitado em ácido acético/metanol (1:3) e novamente submetido a sucessivas centrifugações. Por último os sedimentos obtidos foram colocados em lâminas previamente limpas com álcool 70% e

a secagem foi feita a temperatura ambiente. A coloração foi feita com corante Giemsa e a análise das lâminas em microscópio no aumento de 1000x.

#### **4.11 Análise estatística**

Todas as análises foram realizadas em software estatístico específico. As análises foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) seguida de teste *Post-Hoc* de Bonferroni. Foram considerados significativos os resultados com valor de  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rendimento alcançado na extração do OV das folhas de *Schinus molle* L. no mês de junho foi de 0.36%. Após a determinação do rendimento, deu-se início a avaliação da composição fitoquímica do mesmo por CG-MS, a qual forneceu no final da análise a detecção de trinta compostos (**Tabela01**), e desses apenas 23% apresentaram percentual maior que cinco por cento, sendo esses o  $\alpha$ -Pineno, Sabineno,  $\beta$ -Pineno, Limoneno,  $\beta$ -Cariofileno, Bicyclogermacreno e Espotulenol com percentual de 23,49; 11,36; 6,09; 9,02; 5,28; 10,13 e 6,59 respectivamente (**Tabela02**), sendo o  $\alpha$ -Pineno o composto de maior percentual. Estudos demonstram que o  $\alpha$ -Pineno também foi identificado como composto majoritário presente no OV das folhas das *Schinus terebinthifolius* R. e *Schinus lentiscifolius* M. (PAWLOWSKI et al., 2012; PAWLOWSKI et al., 2013). O  $\alpha$ -Pineno (2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] hept-2-eno) é um monoterpene (AYDIN; TURKEZ; GEYIKOGLU., 2013) que pode ser encontrado em diferentes OV e apresenta diversas atividades biológicas como larvicida, detergente, inseticida dentre outras (SOBRAL-SOUZA et al., 2014) e atualmente inúmeros trabalhos tem buscado elucidar o seu perfil toxicológico.

Além disso, dentre os compostos identificados, mais de 65% desses já estavam descrito na literatura, como compostos presentes no OV das folhas das folhas de *Schinus molle* L. (MARTIS et al., 2014; SANTOS et al., 2007; PAWLOWSKI et al., 2012; GOMES et al., 2013), porém, o composto Verbenene foi identificado anteriormente somente no OV de seus frutos e não em suas folhas (BENDAOU et al., 2010) e outros não estão relatados nesses trabalhos de caracterização fitoquímica dispostos na literatura como a citronela, o Acetato de Citronela, o Eugenol e o Hexadecane.

**Tabela01: Caracterização fitoquímica do óleo volátil de *Schinus molle* L.**

<b>Compostos</b>	<b>RI<sup>a</sup></b>	<b>RI<sup>b</sup></b>	<b>Porcentagem</b>
$\alpha$ -Thujene	930	931	0.08
$\alpha$ -Pineno	941	939	23.49
Canfeno	953	953	0.27
Verbenene	969	967	0.74
Sabineno	978	976	11.36
$\beta$ -Pineno	980	980	6.09
Mirceno	991	991	2.83
$\alpha$ -Terpineno	1019	1018	1.46
p-Cimeno	1023	1026	0.25
Limoneno	1030	1031	9.02
1.8 Cineol	1035	1033	2.04
(E)- $\beta$ -cimeno	1052	1050	0.16
$\delta$ -Terpineno	1063	1062	0.38
Citronela	1153	1153	1.05
Terpinen-4-ol	1177	1177	1.74
$\alpha$ -Terpineol	1191	1189	0.07
Acetato de Citronela	1354	1354	0.83
Eugenol	1356	1356	2.96
$\beta$ -Cariofileno	1417	1418	5.28
Aromadendreno	1442	1439	0.65
$\alpha$ -Humeleno	1451	1454	1.73
Germacreno-D	1480	1480	4.21
Biciclogermacreno	1495	1494	10.13
$\alpha$ -Bisabolene	1504	1504	2.57
$\gamma$ -Cadineno	1523	1521	0.09
$\alpha$ -Cadideno	1538	1538	0.35
Germacreno-B	1557	1556	1.02
Espatuleno	1576	1576	6.59
Óxido de Cariofileno	1580	1581	0.25
Hexadecane	1600	1601	1.07
<b>Total Identificado (%)</b>			<b>97.69</b>

**Proporções relativas dos constituintes dos óleos essenciais foram expressos em porcentagem. Índices de Retenção (RI<sup>a</sup>) experimentais (com base na série homóloga de n-alcenos C<sub>7</sub>-C<sub>30</sub>). Índices de Retenção da literatura (RI<sup>b</sup>) (ADAMS, 1995).**

**Tabela 02: Classificação dos compostos majoritários do óleo volátil de *Schinus molle* L.**

<b>Compostos</b>	<b>Porcentagem</b>	<b>Classificação</b>	<b>Referências</b>
$\alpha$ -Pinoeno	23.49	Monoterpeno	MØLHAVE et al., 2000
Sabineno	11.36	Monoterpenos	VALTER et al., 2008
Biciclogermacreno	10.13	Sesquiterpeno	VALTER et al., 2008
Limoneno	9.02	Monoterpeno	MØLHAVE et al., 2000
Espatuleno	6.59	Sesquiterpeno	VALTER et al., 2008
$\beta$ -Pinoeno	6.09	Monoterpeno	KØPPEL et al., 1986
$\beta$ -Cariofileno	5.28	Sesquiterpeno	ALCÂNTARA et al., 2010

**Classificação dos compostos com percentual superior a cinco por cento identificados no óleo volátil de *Schinus molle* L.**

A determinação da DL<sub>50</sub> foi realizada de acordo com os resultados encontrados na análise da proliferação celular, a qual foi avaliada pelo método estatístico de regressão linear para ambas as células estudadas. Para isso, partiu-se inicialmente de uma curva com cinco concentrações do OV nas culturas celulares, sendo elas de 100, 10, 1, 0,1 e 0,01  $\mu\text{g/mL}$ , obtendo-se assim no final da análise as DL<sub>50</sub> de 30,07  $\mu\text{g/mL}$  para linfócitos humanos (**LH**) (**Figura05**) e de 42,07  $\mu\text{g/mL}$  para macrófagos humanos (**MH**) (**Figura06**). As DL<sub>50</sub> variam de acordo com a célula de interesse e amostra, de modo que, trabalhos realizados por RUFFA e colaboradores (2002), os quais investigaram os efeitos citotóxicos e a IC<sub>50</sub> do extrato metanólico da *Schinus molle* L. em concentrações que variaram de 15 a 100  $\mu\text{g/mL}$  para cultura celular de carcinoma hepático, constataram que esse promove efeito citotóxico dose dependente e a DL<sub>50</sub> encontrada para a célula estudada foi de 50 $\pm$ 7  $\mu\text{g/mL}$ . Assim, para o desenvolvimento dos demais testes, determinaram-se as concentrações a serem testadas, partindo das DL<sub>50</sub> encontradas para LH e MH, sendo essas DL<sub>50</sub>, DL<sub>50/10</sub>, DL<sub>50/100</sub>, DL<sub>50/1000</sub> e DL<sub>50/10000</sub>.



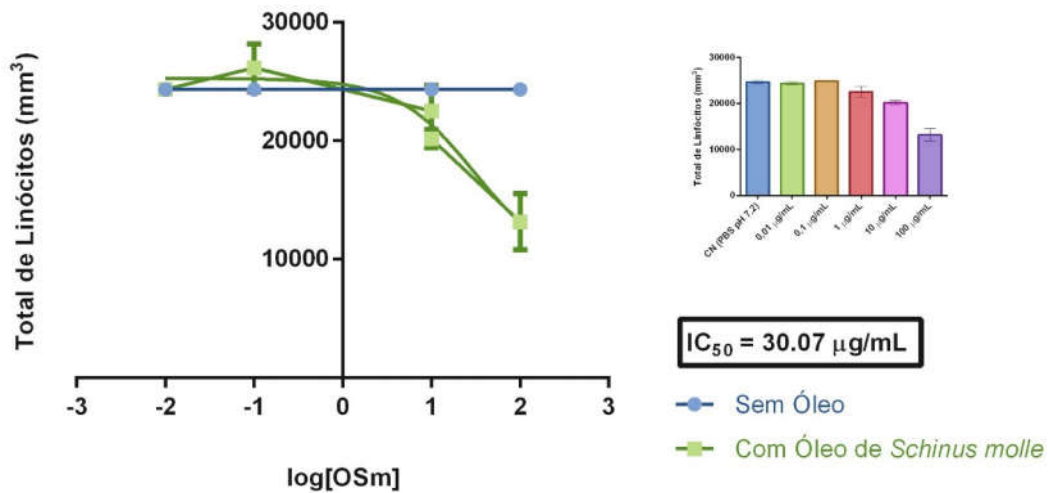


Figura05: Avaliação da proliferação celular para a determinação da DL50 do óleo volátil de *Schinus molle* L. em cultura de linfócitos humanos por regressão linear.

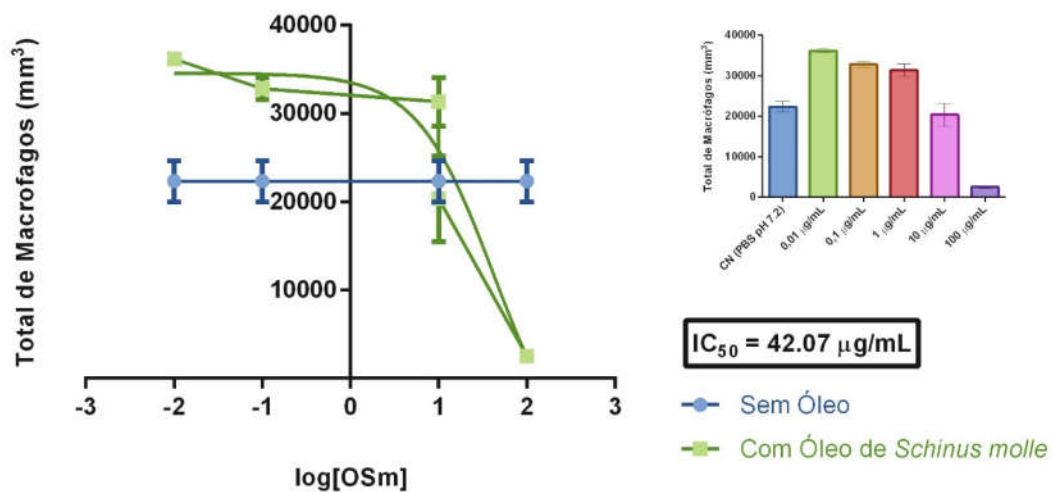
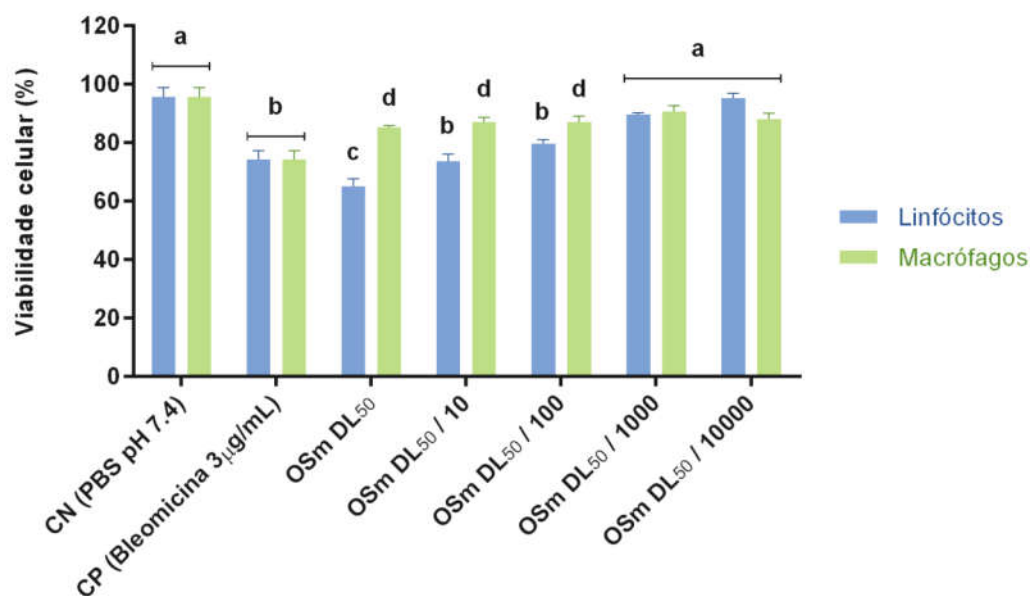


Figura06: Avaliação da proliferação celular para a determinação da DL50 do óleo volátil de *Schinus molle* L. em cultura de macrófagos humanos por regressão linear.

Na Figura 07, podemos observar os resultados da viabilidade celular para as células estudadas, sendo que, para os MH, o OV promove mais de 10% de inviabilidade celular para as DL<sub>50</sub>, DL<sub>50/10</sub> e a DL<sub>50/100</sub> quando comparados ao CN. Já

para as culturas de LH, verificou-se que a DL<sub>50</sub> apresentou inviabilidade maior que o CP, e para a DL<sub>50/10</sub> e a DL<sub>50/100</sub> essa foi superior a 20%. Entretanto, as DL<sub>50/1000</sub> e DL<sub>50/10000</sub> tanto para MH quanto para LH, apresentaram viabilidade celular semelhante ao CN, demonstrando assim, que o OV promove efeito citotóxico a partir de concentrações acima da DL<sub>50/1000</sub> para ambas as células testadas.

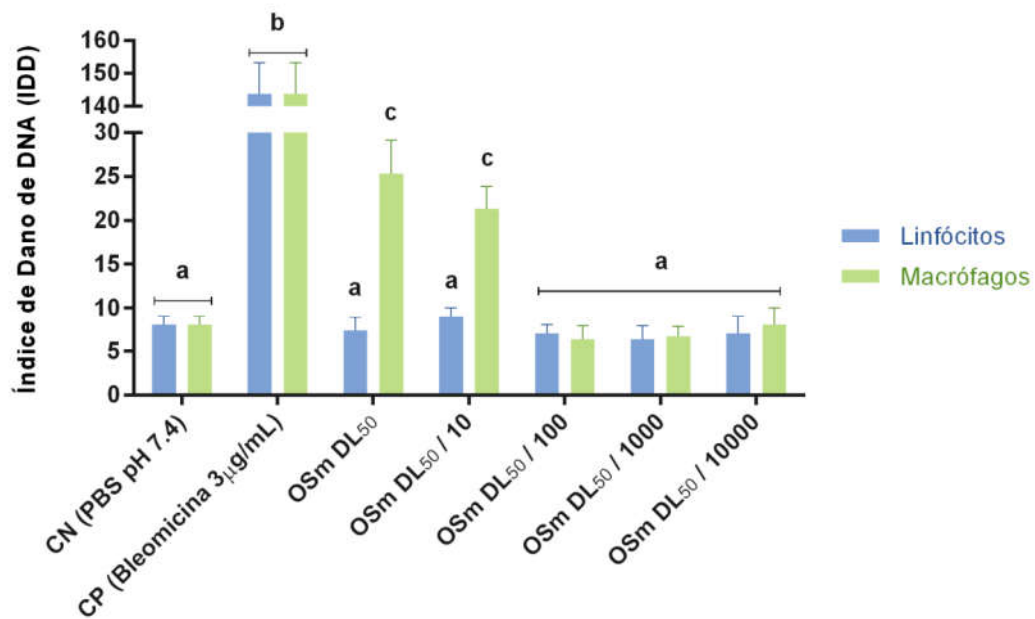


**Figura07: Avaliação da viabilidade celular em culturas de linfócitos e macrófagos humanos expostos a diferentes concentrações do óleo volátil de *Schinus molle* L. Os dados expressos pela média±desvio padrão e para isso foi realizado a triplicada de cada teste. Em cada gráfico as letras diferentes representam uma diferença estatística significativa para  $p < 0,05$ .**

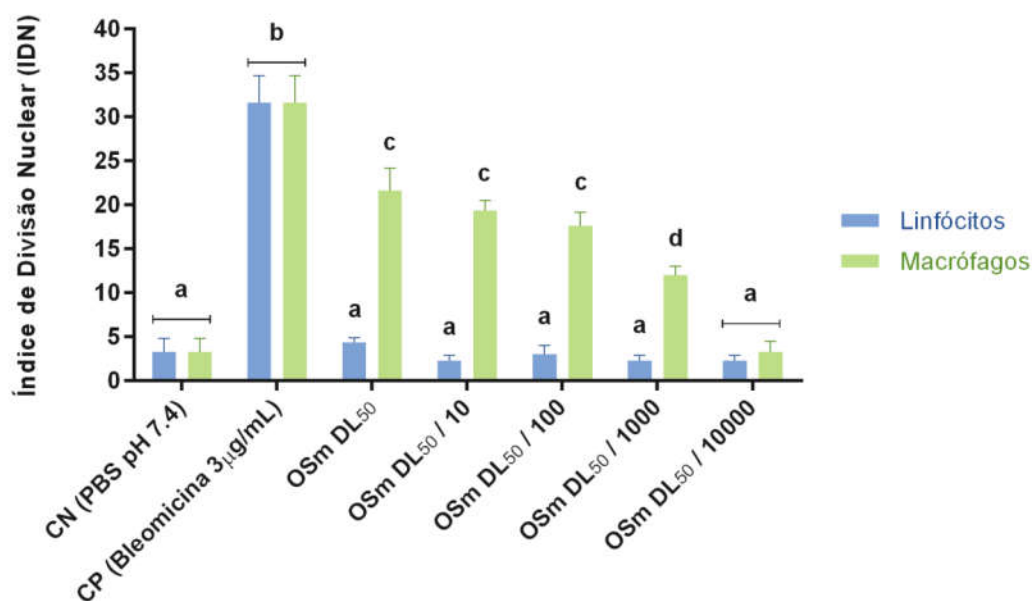
A citotoxicidade encontrada pode estar relacionada com a presença de determinados compostos no OV, podendo esses promover efeitos citotóxicos em conjunto e/ou isolados, como descrito em estudo desenvolvido por SOBRAL-SOUZA e colaboradores (2014), o qual investigou efeito citotóxico do composto  $\alpha$ -Pineno, frente a culturas de fibroblastos nas concentrações de 50 e 100 µg/mL. Neste estudo, constataram uma baixa citotoxicidade na concentração de 50 µg/mL em culturas de fibroblastos. Assim, a citotoxicidade encontrada pode estar relacionada com a presença de determinados compostos como, por exemplo, o  $\alpha$ -Pineno, sendo esse o composto

majoritário do OV, entretanto não podemos descartar a possibilidade de outros compostos estarem contribuindo para esse efeito.

Ao analisarmos a **Figura 08**, a qual avalia o índice de dano de DNA através do teste cometa, apenas a  $DL_{50}$  e a  $DL_{50/10}$  apresentaram dano significativo para os MH quando comparados ao grupo CN, de modo que essas apresentam mais de 20% de dano no DNA. Em contrapartida, o OV não provocou danos de DNA significativos em nenhuma das concentrações testadas na cultura de LH, do mesmo modo que não promoveu alterações na frequência de micronúcleo para LH, como pode ser observado na **Figura09**, certificando que, o OV nas concentrações testadas não apresentou efeito mutagênico para os LH. Já para os MH apresentou alterações significativas concentração-dependente, apresentando frequência de micronúcleo superiores ao CN para as  $DL_{50}$ ,  $DL_{50/10}$ ,  $DL_{50/100}$  e  $DL_{50/1000}$ . Esses resultados, podem estar relacionados com a presença do  $\alpha$ -Pino, o qual nas concentrações de 25, 30 e 35 $\mu$ M, é capaz de promover alterações significativa na frequência de micronúcleos e genotoxicidade concentração-dependente em cultura de células de hamster (V79-C13), como descrito em pesquisa realizada por CATANZARO e colaboradores (2012).

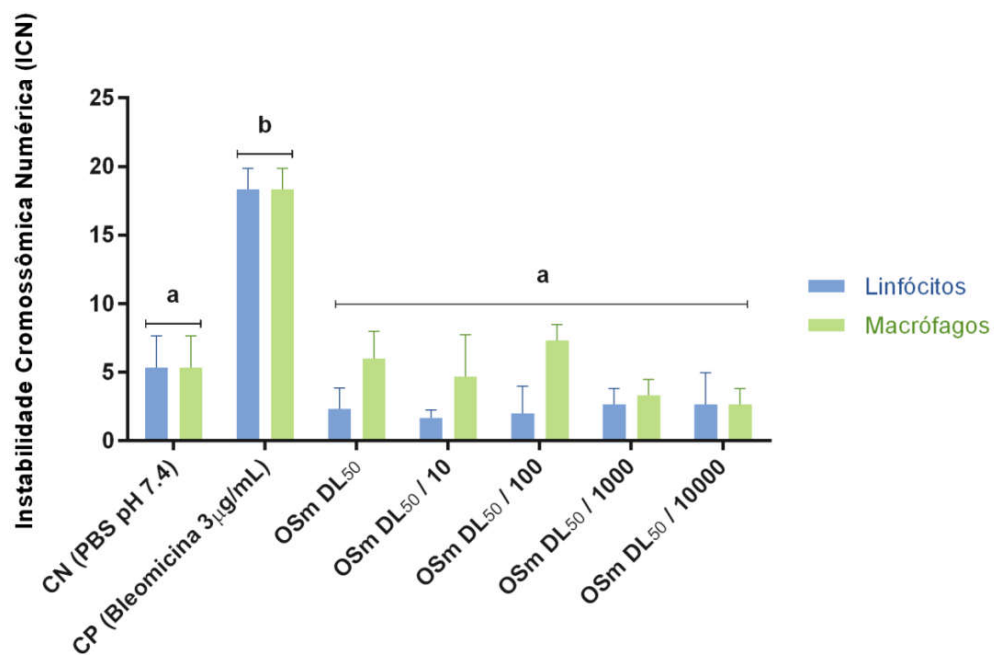


**Figura08:** Avaliação do índice de dano de DNA pelo ensaio cometa em culturas de linfócitos e macrófagos humanos tratados com diferentes concentrações do óleo volátil de *Schinus molle* L. Os dados expressos pela média±desvio padrão e para isso foi realizado a triplicada de cada teste. Em cada gráfico as letras diferentes representam uma diferença estatística significativa para  $p < 0,05$ .

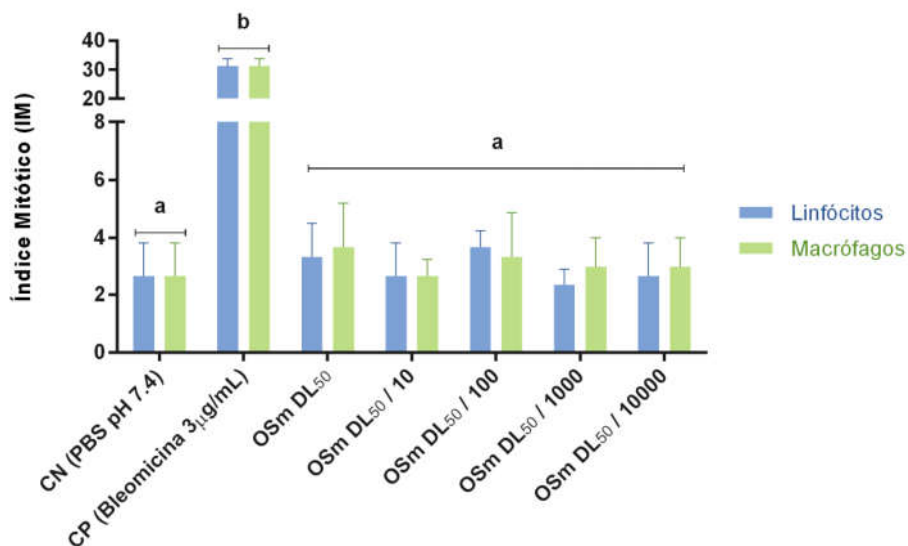


**Figura09:** Avaliação da frequência de micronúcleo em culturas de linfócitos e macrófagos humanos tratados com diferentes concentrações do óleo volátil de *Schinus molle* L. Os dados expressos pela média±desvio padrão e para isso foi realizado a triplicada de cada teste. Em cada gráfico as letras diferentes representam uma diferença estatística significativa para  $p < 0,05$ .

TÜRKEZ E AYDIN (2016), avaliaram o efeito da exposição de linfócitos humanos ao  $\alpha$ -Pinoeno (10-200µg/mL) frente a parâmetros mutagênicos (teste de micronúcleo e aberrações cromossômicas), e concluíram no final do estudo, que a célula analisada não sofreu alterações significativas comparado ao controle. Assim como, para a análise da instabilidade cromossômica desenvolvida nesse trabalho (**Figura10**), onde verificamos que as concentrações testadas não promoveram alterações em nenhuma das células estudadas, de modo que também não provocaram alterações no índice mitótico tanto para LH quanto para MH quando comparados ao CN, como é possível observar na **Figura11**.



**Figura10:** Avaliação de alterações na instabilidade cromossômica numérica em culturas de linfócitos e macrófagos humanos tratados com diferentes concentrações do óleo volátil de *Schinus molle* L. Os dados expressos pela média±desvio padrão e para isso foi realizado a triplicada de cada teste. Em cada gráfico as letras diferentes representam uma diferença estatística significativa para  $p < 0,05$ .



**Figura11: Análise do índice mitótico em culturas de linfócitos e macrófagos humanos tratados com diferentes concentrações do óleo volátil de *Schinus molle* L. Os dados expressos pela média±desvio padrão e para isso foi realizado a triplicada de cada teste. Em cada gráfico as letras diferentes representam uma diferença estatística significativa para  $p < 0,05$ .**

Um trabalho desenvolvido por PAWLOWSKI e colaboradores (2012), o qual comparou os efeitos dos OV extraídos das folhas de *S. terebinthifolius* e de *S. molle* em meristemas radiculares de cebola e alface (tratadas com 100µL de cada OV), constataram que os OV reduzem o índice de metáfases. Além disso, evidenciaram que os grupos tratado com OV de *S. terebinthifolius* em comparação com o CN promove redução no índice mitótico na cebola e alface, correspondendo a 82,03% e 76,81%, respectivamente. Já, para os grupos tratados *S. molle*, esses reduziram o índice mitótico em cebola e alface em 21,05% e 35,18%, respectivamente, e quando avaliado alterações no índice metafásico em comparação com o controle negativo, observou-se que ambos promovem redução, sendo elas de 26,45% e 84,42% em cebola e 32,76% e 62,41% em alface, respectivamente.

É descrito na literatura que os compostos (+)- e (-)- $\alpha$ -pineno (1-5000µg/placa),  $\beta$ -mirceno (1-5000µg/placa) e  $\alpha$ -terpineno (5-5000µg/placa), não causam mutagenicidade pelo teste de Ames para cepas de *Salmonella* (TA100, TA98, TA97a

and TA1535) (GOMES-CARNEIRO et al., 2005), assim como, o o 1.8-cineol (250-2500µg/placa), citronela (1-300µg/placa) para as cepas de *Salmonella* (TA97a, TA98, TA100 e TA102), no entanto, o contrario é evidenciado para o comosto terpineol (25-2500µg/placa) pelo mesmo teste, o qual promoveu baixa mutagenicidade para a cepa TA102 (GOMES-CARNEIRO et al., 1998), demonstrando dessa forma que, cada composto apresenta um determinado perfil toxicológico para cada cepa testada, no entanto, cabe resaltar que a literatura carece de estudos voltados para a avaliação de associações desses, uma vez que, os extratos e/ou OV das plantas apresentam inúmeros constituintes e a população utiliza-se desse conjunto.



## 6. CONCLUSÕES

O OV das folhas de *Schinus molle* L., apresenta diversos compostos, sendo o  $\alpha$ -Pineno o composto majoritário. No entanto, o composto Verbenene foi identificado pela primeira vez no OV das folhas da *Schinus molle* L. O óleo estudado promoveu citotoxicidade em concentrações acima de  $DL_{50/1000}$ , para ambas as células testadas, e os efeitos genotóxicos foram detectados apenas em culturas de macrófagos humanos, e somente para as duas maiores concentrações testadas. Entretanto, em relação aos efeitos mutagênicos, verificou-se que, o OV não promoveu alterações cromossômicas assim como não alterou o índice de divisão celular, porém, proporcionou aumento na frequência de micronúcleo concentração-dependente MH. Entretanto, cabe ressaltar a importância de conhecimento dos constituintes do OV da *Schinus molle* L., a fim de, obter maiores esclarecimentos referente a sua toxicidade, uma vez que, essa planta é amplamente empregada na medicina popular para o tratamento de diversas enfermidades. Dessa forma, os resultados encontrados nesse trabalho, vem a contribuir com a literatura. Contudo, estudos complementares são necessários para auxiliar na construção completa do perfil toxicológico do OV da planta em estudo.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation: Illinois USA, p. 456, 1995.

ALCÂNTARA, J.M., YAMAGUCHI, K.K.L, SILVA, J.R.A., VEIGA JUNIOR, V.F. Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais das folhas e caules de *Rhodostemonodaphne parvifolia* Madriñán (Lauraceae). **Acta Amazonica**. v.40(3) p. 567 – 572, 2010.

ARNOLD, C. E.; GORDON, P.; BARKER, R. N.; WILSON, H. M. The activation status of human macrophages presenting antigen determines the efficiency of Th17 responses. **Immunobiology**. DOI: 10.1016/j.imbio.2014.09.022.

AZEVEDO, C.F.; QUIRINO, Z.G.M.; BRUNO, R.L.A. Estudo farmacobotânico de partes aéreas vegetativas de aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.17 (1), p.26-35, 2015.

AYDIN, E., TÜRKEZ, H., GEYIKOGLU, F. Antioxidative, anticancer and genotoxic properties of  $\alpha$ -pineneon N2a neuroblastoma cells. **Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences**, v. 68(5), p. 1004 - 1009, 2013.

BACKES, P.; NARDINO, M. Árvores, arbustos e algumas lianas nativas no Rio Grande do Sul. São Leopoldo, Editora Unisinos. 2002.

BALESTIERI, F. M. P. Imunologia. Barueri, São Paulo: Manole, 2006.

BENDAOU, H., ROMDHANE, M., SOUCHARD, J. P., CAZAUX, S., BOUAJILA, J. Chemical Composition and Anticancer and Antioxidant Activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi Berries Essential Oils. **Journal of Food Science**. v.75 (6), 2010.

BUROW, M.E, WELDON, C.B, TANG, Y, NAVAR, G.L., KRAJEWSKI, S., REED, J.C., et al. Differences in Susceptibility to Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ -induced Apoptosis

among MCF-7 Breast Cancer Cell Variants<sup>1</sup>. **Cancer Research**. v.58, p. 4940 – 4946, 1998.

CALICH, V., VAZ, P. *Imunologia*. Revinter Ltda, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2<sup>o</sup>Ed, 2009.

CATANZARO, I., CARADONNA, F., BARBATA, G., SAVERINI, M., MAURO, M., SCIANDRELLO, G. Genomic instability induced by  $\alpha$ -pinene in Chinese hamster cell line. **Mutagenesis**, v. 27(4), p. 463 - 469, 2012.

CUNHA, F.A.B., WALLAU, G.L., PINHO, A.I., NUNES, M.E.M., LEITE, N.F., TINTINO, S.R., COSTA, G.M., ATHAYDE, M.L., BOLIGON, A.A., COUTINHO, H.D.M., PEREIRA, A.B., POSSER, T., FRANCO, J.L. Eugenia uniflora leaves essential oil induces toxicity in Drosophila melanogaster: involvement of oxidative stress mechanisms. **Toxicology Research**, v.4, p.634-644, 2015.

DA FONSECA, C. A., PEREIRA, D. G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Infarma**, v.16, (7-8), p. 51-54, 2004.

DELIREZH, N.; SHOJAEEFAR, E. Phenotypic and functional comparison between flask adherent and magnetic activated cell sorted monocytes derived dendritic cells. *Iran J Immunol*. 2012; 9 (2): 98-108.

DELIREZH, N.; SHOJAEEFAR, E.; PARVIN, P.; ASADI, B. Comparison The Effects of Two Monocyte Isolation Methods, Plastic Adherence and Magnetic Activated Cell Sorting Methods, on Phagocytic Activity of Generated Dendritic Cells. *Cell Journal*. 2013; 15 (3): 218-223.

DI ROSA, M., RADOMSKI, M., CARNUCCIO, R., MONCADA, S. 1990. Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages. **Biochem Biophys Res Commun**. v.172, p.1246- 1252.

DUKE, J.A. *Handbook of Medicinal Herbs*. CRC Press, Boca Raton, FL. 1985.

FERRERO, A.A., WERDIN GONZALEZ, J.O., SANCHEZ CHOPA, C.. Biological activity of *Schinus molle* (Anacardiaceae) on Triatomini, Klug 1834 (*Hemiptera Reduviidae*). **Fitoterapia**, v.77, p.381 – 383, 2006.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**. v.455, (1-2), p. 81-95, 2000.

FERRERO, A., MINETTI, A., BRAS, C., ZANETTI, N. Acute and subacute toxicity evaluation of ethanolic extract from fruits of *Schinus molle* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v.113. p.441 - 447, 2007.

FONSECA, C.A., PEREIRA, D.G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Infarma**, v.16(7-8), 2004.

GOMES, V. AGOSTINI, G., AGOSTINI, F., ATTI DOS SANTOS, A.C., ROSSATO, M. Variation in the essential oils composition in Brazilian populations of *Schinus molle* L. (Anacardiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**.v.48, p.222 – 227, 2013.

GOMES-CARNEIRO, M.R., FELZENSZWALB, I., PAUMGARTTEN, F.J.R., Mutagenicity testing of (±)-camphor, 1,8-cineole, citral,citronellal, (-)-menthol and terpineol with the Salmonella/microsome assay. **Mutation Research**. v.416, p. 129 - 136, 1998.

GOMES-CARNEIRO, M.R.,VIANA,M.E.S., Felzenszwalb, I., PAUMGARTTEN, F.J.R.Evaluation of  $\beta$ -myrcene,  $\alpha$ -terpinene and (+)- and (-)- $\alpha$ -pinenein the Salmonella/microsome assay. **Food and Chemical Toxicology**,v.43,p.247 - 252, 2005.

HAYDEN, M. S., GHOSH, S. 2011. NF-kappaB inimmunobiology. **Cell Res**. v.21, p.223 - 244.

KINDT, T. J., GOLDSBY, R. A., OSBORNE, B. A. 6° Ed. Proto Alegre: Artmed, 2008.

KÖPPEL, C.; TENCZER, J.; TÖNNESMANN, U.; SCHIROP, T.; IBE, K. Acute poisoning with pine oil - metabolism of monoterpenes. **Arch Toxicol**. v. 49(1), p. 73-8, 1981.

MACIEL, M. A. M., PINTO, A. C., VEIGA JR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. v.25(3), p.429 – 438, 2002.

MARPHY, K., TRAVERS, P., WALPORT, M. Imunologia de Janeway. 7° Ed. Porto Alegre; Artmed, 2010.

MARTINS, M. R., ARANTES, S., CANDEIAS, F., TINOCO, M. T., MORAIS, J. C. Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**. v.151, p.485 – 492, 2014.

MEYER, T. N., DA SILVA, A. L. Resposta celular ao estresse. *Revista Assinatura Medica do Brasil*. v.45(2), p.181-8, 1999.

MØLHAVE, L.; KJÆRGAARD, S. K.; HEMPEL-JØRGENSEN, A.; JUTO, J. E.; ANDERSSON, K.; STRIDH, G.; FALK, J. The Eye Irritation and Odor Potencies of Four Terpenes which are Major Constituents of the Emissions of VOCs from Nordic Soft Woods. *Indoor Air. Journals munksgaard*. v. 10(4), p. 315-8, 2000.

PARHAM, P. Sistema Imune. 3º Ed. Porto Alegre, Rio Grande do Sul: Artimed, 2011.

PAWLOWSKI, Â., KALTCHUK-SANTOS, E. ZINI, C.A., CARAMÃO, E.B., SOARES, G.L.G., Essential oils of *Schinus terebinthifolius* and *S. molle* (Anacardiaceae): Mitodepressive and aneugenic inducers in onion and lettuce root meristems. *South African Journal of Botany*. v.80 p.96 - 103, 2012.

PAWLOWSKI, Â., KALTCHUK-SANTOS, E., BRASIL, M.C., CARAMÃO, E.B., ZINI, C.A., SOARES, G.L.G. Chemical composition of *Schinus lentiscifolius* March. essential oil and its phytotoxic and cytotoxic effects on lettuce and onion. *South African Journal of Botany*. v.88, p.198 - 203, 2013.

PEREZ, C., ANESINI, C., 1994. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by Argentinean medicinal plants. *Fitoterapia*. v.65, p.169–172, 1994.

PIRES, M. F., PEREIRA, M. P., CASTRO, E. M., BARBOSA, S., PEREIRA, F. J. Micromorfometria foliar de *Schinus molle* L. (Anacardiaceae) em diferentes alturas na copa. *CERNE*. v.21(1), p.17 – 25, 2012.

ROGEROA, S. O., LUGÃO, A. A. B., IKEDAB, T. I., CRUZ, A. S. Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. *Materials Research*, v. 6, (3), p. 317-320, 2003.

RUFFAA, M. J., FERRARO, G., WAGNER, M. L., CALCAGNO, M. L., CAMPOS, R. H., CAVALLARO, L. 2002. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. *Journal of Ethnopharmacology*. v.79, p.335 – 339.

SANTOS-MONTAGNER, G.F.F., SAGRILLO, M., MACHADO, M.M., ALMEIDA, R.C., MASTARDEIRO, C.P., DUARTE, M.M.M.F, CRUZ, I.B.M. Toxicological

effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. **Toxicology In Vitro**. v.24, p.1410-1416,2010.

SANTOS, A.C. A., ROSSATO, M., AGOSTINI, F., ALMEIDA, M. L., PAULETTI, G. F., SERAFINI, L. A., MOYNA, P., DELLACASSA, E. Caracterização química de populações de *Schinus molle* L. Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Biociências**.v5(2), p.1014-1016, 2007.

SCHMID, W. The Micronucleus Test. **Mut. Res**. v.31, p. 09-15, 1975.

SCHULENBURG, H., KURZ, C. L., EWBANK, J. J. Evolution of the innate immune system: the worm perspective. **Immunol Rev**. v.198, p.36-58, 2004.

SILVA, P. H. da., OLIVEIRA, Y. R., SILVA, A. P. J., MEIRELES, V. J. S., ABREU, M. C. Entre a beleza e o perigo:uma abordagem sobre as plantas tóxicas ornamentais. **Revista Intertox - Eco Advisor de Toxicologia Risco Ambiental e Sociedade**. v.8(1), p. 19-44, 2015.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P.R. Farmacognosia da Planta ao Medicamento. 6ªEd. Porto Alegre: editora UFRGS; Florianópolis: Editora UFSC, 2010.

SINGH, N., MCCOY, M., TICE, R., SCHNEIDER, E., A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells. **Exp. Cell Res**. v.175, p.84–191, 1995.

SOBRAL-SOUZA, C.E., LEITE, N.F., BRITO, D.I.V.; LAVOR, A.K.L.S., ALENCAR, L.B.B., ALBUQUERQUE, R.S., FERREIRA, J.V.A., FREITAS, M.A., MATIAS, E.F.F., ANDRADE,J.C., TINTINO, S.R., MORAIS-BRAGA, M.F.B., VEGA, C., COUTINHO, H.D.M.Avaliação da atividade citotóxica e potencial antiparasitário in vitro do  $\alpha$ -pineno e carvacrol. **Acta Toxicológico Argentino**. v. 22(2), p. 76-80, 2014.

TÜRKEZ, H., AYDIN, E. In vitro assessment of cytogenetic and oxidative effects of  $\alpha$ -pinene. **Toxicology and Industrial Health**, v. 32, n. 1, p. 168–176, 2016.

VALTER, J. L.; ALENCAR, K. M. C.; SARTORI, L.B.A.; NASCIMENTO, E. A.; CHANG, R.; DE MORAIS, S.A. L.; LAURA, V.A.; YOSHIDA, N.C.; CAROLLO,

C.A.; DA SILVA, D.B.; GRASSI, R. F.; FABRI, J. R.; DE SIQUEIRA, J. M. Variação química no óleo essencial das folhas de seis indivíduos de *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v 18(3) p. 373-378, 2008.

VASCONCELOS, J.; VIEIRA, J. G. de P.; VIEIRA, E. P. de P. Plantas Tóxicas: Conhecer para Prevenir. **Revista Científica da UFPA**.v. 7(01), p. 01-10, 2009.

VAZ, A. J., TAKEI, K., BUENO, C. **Imunoensaios: Fundamentos e Aplicação**. Guanabarra- Rio de Janeiro. Koogau, 2010.

VIEGAS JR, C., BOLZANI, V. S. 2006. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**.v.29(2), p.326-337.

VITALE, R. F., ANDRADE, F., RIBEIRO, Q. O papel do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*. v.73(1), p.123-127, 2007.

VOGEL, D. Y. S.; GLIM, J. E.; STAVENUITER, A. W. D.; BREUR, M.; HEIJNEN, P.; AMOR, S. DIJKSTRA, C. D.; BEELEN, R. H. J. Human macrophage polarization in vitro: Maturation and activation methods compared. *Immunobiology*. 2014; 219(9): 695-703.

YELASCO-NEGUERUELA, A. Medicinal plants from Pampallakta: an Andean Community in Cuzco (Peru). **Fitoterapia**.v.66, p.447-462, 1995.

YUNIS, J.J., High resolution of human chromosomes. **Science**.v.1976, p.1268-1270, 1996.

## ANEXO

04/11/2016

Gmail - Submission JEP\_2016\_826 received by Journal of Ethnopharmacology



Michel Machado <micmanmac@gmail.com>

---

### Submission JEP\_2016\_826 received by Journal of Ethnopharmacology

1 mensagem

Journal of Ethnopharmacology <EvisSupport@elsevier.com>

4 de novembro de 2016 09:53

Responder a: ethnopharmacology@elsevier.com

Para: michelmachado@unipampa.edu.br

*This message was sent automatically. Please do not reply.*

Ref: JEP\_2016\_826

Title: Immunotoxicological Evaluation of Schinus molle L. (Anacardiaceae) Essential Oil in Cultures of Lymphocytes and Macrophages

Journal: Journal of Ethnopharmacology

Dear Dr. Machado,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Journal of Ethnopharmacology. Your submission was received in good order.

What happens next: Your paper will undergo a screening process by the managing editors of the journal. During this stage the manuscript is rigorously checked for alignment with aims and scope of the journal, plagiarism, checking the completeness of the general submission, adherence to authors guidelines etc. Due to the high influx of papers, please allow 2-3 weeks for this process to be completed. Once the pre-screen is completed the paper will either be returned to you or be assigned to an Associate Editor.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: [http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL\\_ACR=JEP](http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=JEP) and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Journal of Ethnopharmacology

**Have questions or need assistance?**

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

---

Copyright © 2016 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radanweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.





Home

Reports



Due to iThenticate maintenance work, plagiarism check reports might become available with a slight delay, on 5 November 2016.

### My Author Tasks

[Start New Submission](#)

Click [here](#) to view your submissions with a final decision

### My Submissions with Journal (1)

[Immunotoxicological Evaluation of Schinus molle L. \(Anacardiaceae\) Essential Oil in Cultures of Lymphocytes and Macrophages](#)

Current status: With Editor (04/Nov/2016)

JEP\_2016\_828

Managing Editor: Lyndy McGaw

Article Type: Research Paper

Initial submission : 04/Nov/2016