



## **UTILIZAÇÃO DO EXTRATO DE EUTERPE EDULIS M. EM SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E APLICAÇÃO EM MODELO ANIMAL DE FERIDA CRÔNICA**

*Luana Budny Niero, Laíse Dimer Sant'ana da Rosa, Carolini Mendes, Deise Parolo Tramontin, Paulo Cesar Lock Silveira, Patrícia de Aguiar Amaral*

Área: Fitoquímica, Biotecnologia e Farmacologia de Plantas Mediciniais

**Introdução:** A espécie *Euterpe edulis* Martius é conhecida popularmente na região Sul do Brasil como juçara. É uma planta nativa brasileira, encontrada desde o estado da Bahia até o Rio Grande do Sul, típica do bioma Mata Atlântica. A juçara é uma planta ameaçada, pois vem sendo submetida à exploração para a extração do palmito, sendo preciso cortar a palmeira adulta e após o corte, a espécie não é capaz de realizar rebrotamento (1). Os frutos produzidos pela *E. edulis* são muito semelhantes aos da palmeira *E. oleracea*, comum na região Amazônica. Os frutos das duas espécies (Açaí) são muito semelhantes sensorialmente, mas nutricionalmente, os frutos de *E. edulis* apresentam um perfil nutricional mais interessante, o que justifica o aumento do interesse no seu potencial e que contribui para a exploração sustentável da espécie. As antocianinas são os principais constituintes do fruto dessa espécie, responsáveis pela sua coloração roxo intenso e seus efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (2). Atualmente, diversos extratos de plantas têm sido usados para sintetizar nanopartículas metálicas (NPs), o que garante uma redução significativa da toxicidade em tecidos biológicos, segurança e maior aplicabilidade. As plantas medicinais têm sido utilizadas devido aos seus efeitos fitoquímicos de alto valor terapêutico e também devido ao seu papel vital na síntese de NPs, pois atuam como agentes capeadores/estabilizadores e redutores. Estudos indicam que as nanopartículas de ouro sintetizadas a partir de plantas medicinais demonstraram notável potencial de cicatrização de feridas (3). As feridas crônicas são caracterizadas por uma inflamação prolongada e representam um desafio para a área da saúde. Estratégias alternativas devem ser desenvolvidas para um tratamento custo-efetivo e direcionado e, nesse cenário, o campo emergente da nanobiotecnologia aliada aos produtos naturais pode fornecer uma plataforma alternativa para desenvolver novos agentes terapêuticos.

**Objetivos:** Considerando o exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a composição nutricional e fitoquímica do fruto de *Euterpe edulis* e utilizar seu extrato na síntese verde de nanopartículas de ouro, a fim de propor um tratamento para feridas crônicas em modelo animal.

**Metodologia:** Os frutos de *E. edulis* foram colhidos em junho de 2021 por um produtor em Urussanga/SC. A polpa recebida foi liofilizada. A determinação de proteínas da polpa foi avaliada utilizando método de Kjeldahl (4). Os lipídios foram determinados através da extração por Soxhlet, seguido da remoção do solvente e determinação da massa por gravimetria (4). Para as análises fitoquímicas, preparou-se um extrato por maceração na proporção 1:10 (m/v) com etanol 70% durante 14 dias. Posteriormente, os extratos foram liofilizados. O teor de polifenóis totais foram determinados utilizando método de



Folin-Ciocalteu (5). Os flavonoides totais foram determinados empregando-se o método de cloreto de alumínio (6). O teor de antocianinas foi determinado através do método de pH diferencial (7). Cianidina 3-glicosídeo foi quantificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a um detector UV/Vis. A absorvância foi monitorada em 530 nm (8). Nanopartículas de ouro (GNPs) foram sintetizadas a partir do ácido cloroáurico e reduzidas pelo método de síntese verde com o extrato etanólico de *E. edulis* (Açaí). Para o modelo de ferida crônica foram utilizados ratos Wistar machos (CEUA/UNESC n. 75/2022), distribuídos em 5 grupos (n=15): I. Ferida Aguda (FA) - sem tratamento local ou sistêmico; II. Ferida Crônica induzida com Resiquimod (FC) - sem tratamento local ou sistêmico; III. FC + tratamento com GNPs (12,5 ug/mL) 1mL/dia (FC-GNPs-Açaí); IV. FC + controle positivo com SafGel 1 mL/dia (FC-SafGel); V. FC + controle positivo com laser 660 nm, 2J (FC-FBM). O modelo foi induzido com Resiquimod aplicado topicamente durante seis dias. Os tratamentos foram iniciados no 8º dia após a última aplicação do Resiquimod e realizados diariamente por dez dias. Realizou-se análise macroscópica, análise do tamanho das feridas e escore inflamatório. Após 12h da última aplicação, foi realizada a eutanásia dos animais, retirando-se o tecido para as análises histológicas e bioquímicas.

**Resultados:** A polpa liofilizada do fruto de *E. edulis* possui um teor de proteínas de 7,62%  $\pm$ 0,6. Em relação aos lipídios, a polpa apresentou 33,89%  $\pm$ 0,93. A análise fitoquímica do extrato etanólico demonstrou que a planta é rica em compostos fenólicos, apresentando 39,33  $\pm$  0,9 mg de polifenóis totais equivalentes de ácido gálico por grama de extrato. O extrato também apresentou 25,94  $\pm$  0,77 mg de flavonoides totais equivalentes de quercetina em um grama de extrato. As antocianinas monoméricas foram quantificadas em 5,15 $\pm$ 0,34 mg equivalentes de cianidina-3-O-glucosídeo por um grama de extrato. Por CLAE, a dosagem de cianidina-3-O-glucosídeo isoladamente no extrato foi de 0,413 $\pm$ 0,22 mg/g de extrato. Após a síntese de nanopartículas de ouro com o extrato etanólico de *E. edulis*, estas foram aplicadas no modelo animal de ferida crônica. Dez dias após o início dos tratamentos, os grupos Ferida Crônica (FC) e FC-Safgel apresentaram escore inflamatório aumentado quando comparados ao grupo Lesão Aguda (LA) (p<0,05). Já os grupos tratados com as GNPs-Açaí (p<0,001) e o grupo Fotobiomodulação (FC-FBM) (p<0,01) apresentaram menor escore inflamatório quando comparados ao grupo FC e esta diferença foi maior para o grupo GNPs-Açaí. Em relação à área de contração da ferida, no 14º dia após a indução do modelo de ferida crônica e antes do início dos tratamentos, observou-se que todos os grupos apresentaram menor área de contração da ferida quando comparados ao grupo FA (p<0,05). No décimo dia após os devidos tratamentos, observou-se que o grupo FC apresentou menor área de contração da ferida quando comparado com o grupo FA (p<0,05). Os grupos tratados com GNPs-Açaí (p<0,01), Safgel (p<0,05) e FBM (p<0,0001) apresentaram maior área de contração da ferida, no entanto a diferença foi maior para o grupo FC-FBM. Nas análises histológicas, foi possível observar que houve diminuição do infiltrado inflamatório comparado ao grupo FC em todos os grupos tratados, no qual o grupo FC-GNPs-Açaí apresentou menor número de infiltrado (p<0,01) que os grupos FC-Safgel e FC-FBM (p<0,05). Os grupos FC-GNPs-Açaí e FC-FBM



ainda apresentaram menor número de infiltrado inflamatório quando comparados ao grupo FA ( $p < 0,05$ ). Em relação aos níveis proteicos de citocinas pró-inflamatória TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , observa-se que o grupo FC apresentou aumento significativo dos níveis de TNF- $\alpha$  quando comparados ao grupo FA ( $p < 0,05$ ). Já nos grupos tratados com Safgel e FBM os níveis proteicos dessa citocina diminuíram quando comparados ao grupo FC ( $p < 0,05$ ). Para o grupo FC-GNPs-Açaí, não houve diferença significativa. O grupo FC e FC-FBM apresentaram aumento dos níveis proteicos de IL-1 $\beta$  ( $p < 0,05$ ) comparados ao grupo FA. No entanto, o grupo FC-Safgel apresentou diminuição nos níveis de IL-1 $\beta$  comparados ao grupo FC ( $p < 0,05$ ), e o grupo FC-GNPs-Açaí não apresentou diferença. Para as citocinas anti-inflamatórias, houve um aumento significativo de IL-10 ( $p < 0,001$ ) e IL-4 ( $p < 0,01$ ) no grupo tratado com GNPs-Açaí quando comparado ao grupo FC. Não houve diferença nos grupos FC-Safgel e FC-FBM. Na análise dos níveis do fator de crescimento TGF- $\beta$  (figura 11C), o grupo FC apresentou diminuição significativa quando comparado ao grupo FA ( $p < 0,05$ ). Já os grupos tratados apresentaram aumento nos níveis desse marcador quando comparados ao grupo FC, sendo que os grupos FC-Safgel e FC-FBM apresentaram valor de  $p < 0,05$ . O grupo tratado com GNPs-Açaí apresentou aumento significativo nos níveis de TGF- $\beta$  quando comparado ao grupo FC ( $p < 0,0001$ ) e quando comparado ao grupo FA ( $p < 0,05$ ). Como marcadores de dano oxidativo, foram analisados os níveis de carbonil e o conteúdo de sulfidrina. Em relação a carbonilação de proteínas o grupo FC apresentou aumento significativo em relação ao grupo FA ( $p < 0,05$ ). Já os grupos tratados apresentaram diminuição significativa nos níveis desse marcador sendo os grupos FC-GNPs-Açaí e FC-Safgel ( $p < 0,01$ ) e o grupo FC-FBM ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao grupo FC. O conteúdo de sulfidrina apresentou-se diminuído em todos os grupos (FC; FC-GNPs-Açaí; FC-Safgel; FC-FBM) quando comparados ao grupo FA ( $p < 0,05$ ). A defesa antioxidante foi medida através da atividade de superóxido dismutase (SOD) e glutathiona reduzida (GSH). A atividade da SOD estava diminuída nos grupos FC, FC-Safgel e FC-FBM comparados ao grupo FA ( $p < 0,05$ ). Já no grupos FC-GNPs-Açaí apresentou-se aumentada ( $p < 0,05$ ), quando comparados ao grupo FC. A atividade de GSH apresentou-se diminuída nos grupos FC e FC-Safgel comparados ao grupo FA ( $p < 0,05$ ) e os grupos FC-GNPs-Açaí e FC-FBM não apresentaram aumento dessa atividade enzimática quando comparados ao grupo FC.

**Considerações finais:** Propõe-se que o modelo de inflamação prolongada com Resiquimod apresentou bons resultados, demonstrando parâmetros inflamatórios superiores ao grupo Lesão Aguda. Em complemento, as GNPs sintetizadas a partir da síntese verde com *Euterpe edulis*, se mostram promissoras e eficazes para tratamentos de feridas crônicas, apresentando resultados semelhantes ou superiores aos padrões utilizados na prática clínica, principalmente na diminuição do escore inflamatório, dos níveis de carbonil e sulfidrina e de infiltrado inflamatório, aumento de contração da ferida, de citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-4, do fator de crescimento TGF- $\beta$  e de SOD. Sugere-se, ainda, que os efeitos das GNPs se somam aos efeitos do extrato da planta, que se apresentou rico em polifenóis, flavonoides e antocianinas, além de alto conteúdo proteico e lipídico, que juntos, possuem alto efeito antioxidante e anti-inflamatório.



*Financiamento ou apoio:* Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Laboratório de Plantas Medicinais (LaPlaM/UNESC); Laboratório de Fisiopatologia Experimental (UNESC).

### **Referências**

1) LORENZI, H. Palmeiras no Brasil: exóticas e nativas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 1996. 2) SCHULZ, M. et al. Juçara fruit (*Euterpe edulis* Mart.): sustainable exploitation of a source of bioactive compounds. *Food Research International*, v. 89, p. 14-26, 2016. 3) AMJED, S. et al. Detection of antibacterial activities of Miswak, Kalonji and Aloe vera against oral pathogens & anti-proliferative activity against cancer cell line. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2017. 4) INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p. E-Book. 5) MARSOUL, A. et al. Phytochemical screening, total phenolic and flavonoid methanolic extract of pomegranate bark (*Punica granatum* L.). *Materials Today: Proceedings*, v. 27, p. 3193-3198, 2020. 6) ALVES, E.; KUBOTA, E. H. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, v. 34, n. 1, 2013. 7) GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, n. 1, p. F1.2-F1.2.13, 2001. 8) INADA, K. O. P. et al. Screening of the chemical composition and occurring antioxidants in jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and jussara (*Euterpe edulis*) fruits and their fractions. *Journal of Functional Foods*, v. 17, p. 422-433, 2015.