

## POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO EXTRATO DA CASCA DE ACÁCIA NEGRA (ACACIA MEARNsii) IN VITRO UTILIZANDO CÉLULAS RENAIIS DE CÃES

LIEGE TEIXEIRA, JÉSSICA NETO D'AVILA, LARISSA GIMENEZ DELFINO, MARIA PAULA HUTH, MURILLO ORSATTO HASS, ALINE RIGON ZIMMER, LUCIANO TREVIZAN

Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil  
Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Contato: lialumel@gmail.com / Apresentador: LARISSA GIMENEZ DELFINO

**Resumo:** O extrato de Acácia negra (*Acacia mearnsii*) (EAN) possui alta atividade antioxidante e estudos recentes têm demonstrado que o extrato pode proteger o alimento. Presume-se que tenha efeito sobre os tecidos animais atuando como um antioxidante tecidual. O estudo investiga a citotoxicidade e citoproteção do EAN em células renais de cães (MDCK), empregando o ensaio de MTT para avaliar a viabilidade celular. A citotoxicidade foi medida pelo acréscimo EAN sobre as células nas concentrações de 1.000 µg/ml, 750 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml e 25 µg/ml. Após incubação das células com o EAN a viabilidade celular foi realizada. No estudo de citoproteção o EAN foi adicionado sobre as células nas concentrações de 3,125 µg/mL, 6,25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL e 400 µg/mL por 20h previamente a exposição ao peróxido de hidrogênio. Na sequência a viabilidade celular foi determinada. Os resultados indicam uma resposta dose-dependente do extrato, com efeitos citotóxicos em concentrações acima de 500 µg/ml, efeito citoprotetor frente a insulto oxidativo em concentrações acima de 50 µg/ml, e estímulo da proliferação celular em concentrações entre 200 e 400 µg/ml. Esses achados sugerem o potencial do EAN como agente citoprotetor.

**PalavrasChaves:** taninos condensados; citoproteção; citotoxicidade; animais de companhia;

## ANTIOXIDANT EFFECTS OF BLACK WATTLE BARK EXTRACT (ACACIA MEARNsii) IN VITRO ON DOG KIDNEY CELLS

**Abstract:** The extract of Black Wattle (*Acacia mearnsii*) (EBW) has high antioxidant activity, and recent studies have shown that the extract can protect food. It is presumed to have effect on animal tissues acting as an antioxidant in the body. The study investigates the cytotoxicity and cytoprotection of EAN in dog kidney cells (MDCK), employing the MTT assay to assess cell viability. Cytotoxicity was measured by adding EBW to the cells at concentrations of 1,000 µg/ml, 750 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, and 25 µg/ml. After incubating the cells with EAN, cell viability was performed. In the cytoprotection study, EBW was added to the cells at concentrations of 3.125 µg/mL, 6.25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, and 400 µg/mL for 20 hours prior to hydrogen peroxide exposure. Cell viability was then determined. The results indicate a dose-dependent response of the extract, with cytotoxic effects at concentrations above 500 µg/ml, a cytoprotective effect against oxidative insult at concentrations above 50 µg/ml, and cell proliferation stimulation at concentrations between 200 and 400 µg/ml. These findings suggest the potential of EBW as a cytoprotective agent.

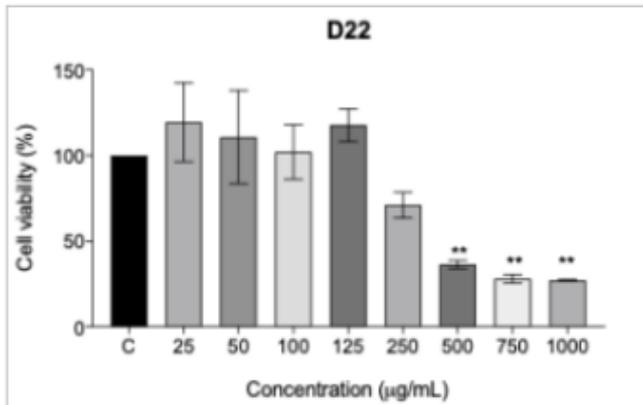
**Keywords:** condensed tannins, cytotoxicity, cytoprotection, company animals

**Introdução:** O gênero Acácia se destaca como fonte de taninos condensados (Garcia et al., 2015) que são compostos fenólicos, derivados de flavan-3-ol, cuja ação antioxidante é reconhecida (Chen et al., 2018) com potencial ação sobre alimentos e sobre o metabolismo animal. Uma forma de estudar o potencial destes extratos previamente ao uso na alimentação animal é através de testes in vitro. A avaliação do efeito citoprotetor em células ou efeito citotóxico produzido pelo extrato, podem revelar o potencial do extrato como aditivo nutricional (Grasel et al., 2019). Ainda não há estudos com aplicação do extrato de acácia sobre células saudáveis in vitro, não sendo definida dosagens de taninos condensados que podem ser usados na indústria alimentícia. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito citoprotetor e a citotoxicidade do extrato de casca de Acácia negra em células renais saudáveis de cães, com vistas em identificar dosagens que não sejam tóxicas e que ao mesmo tempo tragam benefícios as células.

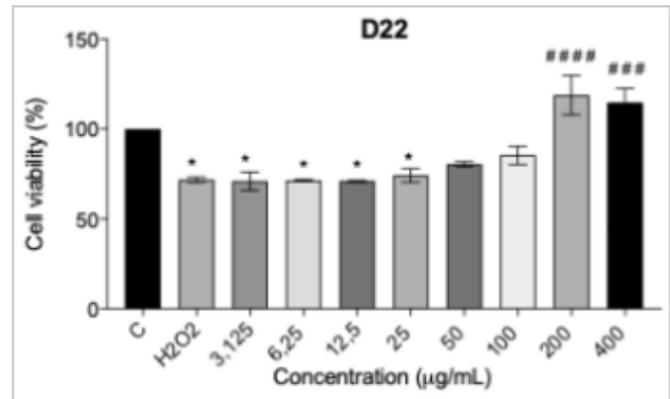
**Material e Métodos:** Citotoxicidade: Foi utilizada a metodologia do sal de tetrazólio usando MTT em células epiteliais renais de cães (MDCK). O método mede a viabilidade celular. As células renais de cães (MDCK) foram semeadas em microplacas de 96 poços contendo 20.000 células/poço, cultivadas em DMEM-LOW suplementado com 10% soro fetal bovino, 1% Penicilina, 0,2% Anfotericina-B, mantidas em temperatura de 37°C, incubadas por 24 horas. O extrato da casca de Acácia negra foi diluído em meio de cultivo DMEM-LOW nas concentrações de 1.000 µg/ml, 750 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml e 25 µg/ml, colocado em contato com as células por 24 h, e a viabilidade celular foi analisada. Citoproteção: O efeito citoprotetor foi determinado através da pré-exposição das células de cães (MDCK) aos extratos da casca de Acácia negra em diferentes diluições: 3,125 µg/mL, 6,25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL e 400 µg/mL, por 20 horas, seguida da exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas concentrações entre 6,25 e 3000 µM. Após 24 horas, a viabilidade celular foi avaliada por MTT. Ambos os experimentos foram repetidos três vezes de forma independente, sendo cada um realizado em triplicata. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 8.0. A análise de variância foi realizada, com posterior teste de Dunnett para comparações múltiplas. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de P < 0,05. Para determinar a concentração citotóxica para 50% das células (IC<sub>50</sub>) de cada composto testado, foi utilizada análise de regressão não linear.

**Resultado e Discussão:** A viabilidade celular foi prejudicada nas concentrações entre 500 µg/mL e 1000 µg/mL do extrato de

casca de acácia negra (Figura 1), indicando um efeito citotóxico do extrato nessa faixa. Porém, em concentrações mais baixas, a viabilidade celular foi mantida ou aumentada. Observou-se em torno de 125% de viabilidade celular, sugerindo um possível efeito estimulante a proliferação. Na Figura 2, observa-se uma relação entre a concentração do extrato e a viabilidade celular após o insulto oxidativo com (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Em concentrações a partir de 50 µg/mL não se observa redução significativa da viabilidade celular, e concentrações superiores a 200 µg/mL demonstram um aumento gradual na viabilidade celular, alcançando valores superiores ao controle e ao grupo de insulto com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Essa tendência crescente sugere um efeito dose-dependente do extrato de casca de Acácia negra na proteção contra o estresse oxidativo, corroborando para utilidade como agente citoprotetor. Os resultados deste estudo demonstraram que o extrato de acácia negra apresentou efeitos citoprotetores nas células renais de cães. Concentrações crescentes do extrato resultaram em uma maior viabilidade celular após o insulto oxidativo, sugerindo um efeito dose-dependente na proteção celular. No entanto, em concentrações acima de 500 µg/mL mostraram induzir citotoxicidade, causando danos celulares substanciais e diminuição na viabilidade.



**Figura 1.** Viabilidade celular em resposta a concentrações crescentes de extrato de casca de Acácia negra em linhagem celular MDCK. Todos os valores são as médias  $\pm$  EPM (erro padrão da média) de pelo menos três experimentos independentes em triplicado. \*\* $p < 0.01$  para tratamentos em comparação com o controle (C) contendo apenas o meio de cultura.



**Figura 2.** Avaliação do efeito citoprotetor *in vitro* dos extratos de Acácia negra frente ao insulto oxidativo com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em células MDCK. Todos os valores são as médias  $\pm$  EPM (erro padrão da média) de pelo menos três experimentos independentes em triplicado. \* $p < 0.05$  para tratamentos em comparação com o controle (C) contendo apenas o meio de cultura; \*\*\*\* $p < 0.001$ ; ##### $p < 0.0001$  para

**Conclusão:** O extrato de Acácia negra nas dosagens entre 200 e 400 µg/ml revela efeito citoprotetor, inclusive com estímulo a proliferação celular. Esses achados sugerem que a citoproteção é alcançada em dosagens que devem estar entre 200 e 400 µg/ml. As dosagens dietéticas ainda precisam ser ajustadas, mas os efeitos citotóxicos foram observados em concentrações acima de 500 µg/ml.

**Agradecimentos:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e a empresa SETA® (Estância Velha, RS, Brasil).

**Referências Bibliográficas:** García, D. E., et al. (2016). Modification of condensed tannins: from polyphenol chemistry to materials engineering. *New J. Chem.*, <https://doi.org/10.1039/C5NJ02131F> Chen, X., et al. (2018). Analytical profiling of proanthocyanidins from *Acacia mearnsii* bark and *in vitro* assessment of antioxidant and antidiabetic potential. *Molecules*, 23(11), 2891. <https://doi.org/10.3390/molecules23112891> Grasel, F. dos S., et al. (2019). Synthesis, characterization and *in vitro* cytotoxicity of *Acacia mearnsii* proanthocyanidin loaded PLGA microparticles. *Brazilian Journal Of Chemical Engineering*, 36(1), 239-250. <http://dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20190361s20170154>.