

QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS E AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Alternanthera maritima* SOBRE A PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM ENSAIO COM NEUTRÓFILOS E LIVRE DE CÉLULAS

Rafael R. Tomei¹, Joel G. Souza², Alexandre Kanashiro², Luciana M. Kabeya², Yara M. Lucisano-Valim², Diones Aparecida Dias², Marcos José Salvador^{1,2*}.

¹Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D), Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, 12244-000, São José dos Campos–SP, e-mail: rafaeltomei@yahoo.com.br
mjsalvador1531@yahoo.com.br.

²Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, Av. do café, s/n, 14040903, Ribeirão Preto–SP.

Resumo- Espécies da família Amaranthaceae são capazes de acumular substâncias fenólicas e tais substâncias estão relacionadas a algumas atividades biológicas como: antiinflamatória, imunomodulatória e antioxidante. O presente trabalho teve como objetivo a quantificação de fenólicos totais e a avaliação do efeito do extrato etanólico de *Alternanthera maritima* sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em ensaio com neutrófilos e livre de células. Para a quantificação de fenólicos totais utilizou-se o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu e para a avaliação da capacidade antioxidante utilizou-se o método da quimioluminescência em sistemas celular com neutrófilos estimulados com zimozan e livre de células (HRP, *Horseradish Peroxidase*). Os resultados mostraram que o extrato etanólico e a fração butanólica deste extrato apresentaram atividade antioxidante tanto no ensaio com neutrófilos como no livre de células, sendo possível observar correlação entre o conteúdo fenólico e o potencial antioxidante destes produtos naturais.

Palavras-chave: *Alternanthera maritima*, Fenólicos totais, Quimioluminescência, neutrófilos.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde - Farmácia

Introdução

Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), produzidas por Leucócitos (Polimorfonucleares, PMNs) estimulados desempenham um importante papel na defesa do organismo contra microrganismos invasores. Sob estímulo os PMNs passam a consumir uma quantidade expressiva de oxigênio, o qual é convertido em EROs, processo conhecido como “burst” oxidativo (KANASHIRO et al. 2004). Apesar da produção de EROs por PMNs ser uma resposta fisiológica que pode ser vantajosa para o organismo este processo, muitas vezes, pode provocar danos teciduais. EROs tais como peróxido de hidrogênio e ânions superóxido são responsáveis pela patogênese de diversos processos inflamatórios. As atividades antiinflamatórias de substâncias fenólicas, dentre elas os flavonóides, têm sido explicadas, pelo menos em parte, por suas propriedades antioxidantes apresentando uma estreita relação entre a estrutura química e a atividade biológica.

Devido à estreita correlação entre o perfil de fenóis totais e a atividade antioxidante (ALONSO et al. 2002; STEVANATO et al. 2004) o ensaio Folin-Ciocalteu vem sendo utilizado como um método auxiliar na avaliação do potencial antioxidante. O ensaio Folin-Ciocalteu (FCR) foi

desenvolvido inicialmente por Singleton e colaboradores analisando a quantidade de fenóis totais contidas no vinho (SINGLETON et al. 1999), a partir daí o ensaio encontrou outras aplicações, tais como análise de produtos naturais, alimentos e fluidos biológicos (HUANG et al. 2005).

Considerando que em algumas espécies da família Amaranthaceae há a ocorrência polifenóis como metabólitos secundários (SALVADOR, et al., 2006; SALVADOR & DIAS, 2004), o presente estudo teve como objetivo a quantificação de fenólicos totais no extrato etanólico de *Alternanthera maritima* utilizando o ensaio Folin-Ciocalteu e a avaliação do efeito deste extrato sobre a produção de EROs em ensaio de quimioluminescência dependente de luminol (CL-lum) em sistema celular (PMNs estimulados com zimozan opsonizado) bem como sua propriedade “scavenger” em sistema livre de células.

Materiais e Métodos

Coleta e classificação do material vegetal

Alternanthera maritima, partes aéreas, foi coletada no seu habitat natural, Restinga de Marica, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, em dezembro de 1998 sendo identificada pelo Professor Dr. Josafá Carlos de Siqueira (“Pontifícia Universidade

Católica, Rio de Janeiro, RJ, Brasil”). Uma amostra da espécie foi depositada no Herbário do “Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, SP, Brasil”. (sob número de registro SPFR 02968).

Preparação dos extratos brutos e suas frações

O material vegetal foi seco e pulverizado, sendo o pó submetido à extração com hexano e etanol, sucessivamente, filtrado e concentrado em rotaevaporador originando os respectivos extratos brutos. O extrato etanólico foi submetido à avaliação da atividade antioxidante e mostrou-se bioativo. Sendo assim, procedeu-se a partição deste extrato como descrito por Salvador & Dias (2004), utilizando a atividade antioxidante para direcionar o estudo.

Isolamento de leucócitos polimorfonucleares (PMN) humanos

O sangue de doadores saudáveis foi retirado por punção venosa em solução Alsewer (v/v) como anticoagulante. Os PMN foram isolados segundo método de Lucisano & Mantovani (1984) com modificações (KABEYA et al. 2002). Os “pellets” de célula foram suspensos em *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) contendo 0,1% de gelatina (w/v) (HBSS-gel). As células foram >90% viáveis como determinado pelo teste *Trypan blue exclusion* e 80-90% eram PMN. O procedimento experimental foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital Clínico da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, campus Ribeirão Preto (SP, Brasil), sob o protocolo HCRP 10097/2002.

Ensaio celular de quimioluminescência

Este ensaio foi realizado como descrito por Kanashiro & colaboradores (2004). Suspensões de PMN (1×10^6 células/mL) foram adicionadas com luminol (160 $\mu\text{mol/L}$) e DMSO (diluente, controle negativo) ou as amostras (6.25-100 $\mu\text{g/mL}$ do extrato etanólico bruto ou sua fração butanólica) dissolvidas em DMSO. Os tubos foram incubados por 3 min. a 37°C e o zimozan opsonizado (ZO, 1mg/mL) foi adicionado para iniciar a geração das EROs. ZO foi preparado segundo método de Cheung et al. (1983) com pequenas modificações (KANASHIRO et al. 2004). A produção de quimioluminescência (CL-lum) foi mensurada em um luminômetro (AutoLumat LB953, EG&G Berthold, Germany) durante 15 min. a 37°C. A área sob a curva da CL-lum (AUC) foi usada para calcular a atividade inibitória de cada amostra, como segue: porcentagem de inibição = $100 - (\text{AUC amostra}/\text{AUC controle}) \times 100$. A atividade relativa de cada amostra analisada foi comparada através de seus valores de IC_{50} (concentração necessária para promover 50% de

inibição da CL-lum). Todos os procedimentos foram realizados pelo menos em triplicata.

Ensaio de quimioluminescência livre de células

Este ensaio foi desenvolvido segundo Krol et al. (1994) com modificações. No tubo reacional, alíquotas de solução de H_2O_2 (50 $\mu\text{mol/L}$) foram adicionadas, juntamente com a solução de luminol (160 $\mu\text{mol/L}$) e DMSO (diluente, controle negativo) ou as amostras (6.25-100 $\mu\text{g/mL}$) do extrato etanólico bruto ou da fração butanólica dissolvidos em DMSO. Os tubos foram incubados por 3 min. a 30°C e a geração das EROs foi iniciada pela adição da HRP (*Horseradish Peroxidase*) (0.2 IU/mL). HRP e H_2O_2 foram preparados em tampão sódio fosfato pH 7.4 (0.1mol/L). A quimioluminescência (CL-lum) foi mensurada em luminômetro por 15 min. a 30°C. A inibição da CL-lum foi expressa em porcentagem, como no ensaio celular. Determinaram-se também os valores de IC_{50} . Os experimentos foram realizados pelo menos em triplicata.

Ensaio de fenóis totais por Folin-Ciocalteu

O extrato etanólico e a fração butanólica foram analisados quanto ao seu conteúdo de fenólicos totais solúveis utilizando o método colorimétrico Folin-Ciocalteu (PICCINELLI et al., 2004; WU et al., 2004). Para tanto, o extrato e a fração foram solubilizados em metanol, sendo preparadas diluições com concentrações entre 20 e 200 ppm. Para a substância de referência (ácido gálico) foi elaborada curva analítica na concentração de 20, 40, 60, 80, 100 e 200 ppm. A absorbância das amostras e amostra-padrão foi medida em espectrofotômetro ($\lambda=730$ nm) e os resultados foram expressos como mg de ácido gálico equivalentes (GAE) por grama de extrato ou fração em base seca (mg de GAE/g). Como controle negativo foi utilizado o diluente das amostras (metanol) e como controle positivo o flavonóide quercetina (40 ppm). Os experimentos foram realizados em triplicata.

Análise estatística

Os dados obtidos pelos ensaios foram analisados pela análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Os valores de $P < 0.05$ foram considerados significativos.

Resultados

Inibição da quimioluminescência celular

As propriedades de inibição das amostras de *A. maritima* no metabolismo oxidativo dos PMN ZO-estimulados foram investigadas através do ensaio da CL-lum do luminol. O extrato etanólico bruto e sua fração butanólica mostraram-se ativos, sendo a fração butanólica mais ativa que o extrato etanólico bruto (Figura 1 e Tabela 1).

Inibição da quimioluminescência livre de células

Neste ensaio a capacidade das amostras de *A. maritima* em seqüestrar radicais livres foi avaliada através da inibição da CL-lum produzida pela oxidação do luminol na presença de H₂O₂ catalisada pela HRP. A fração butanólica apresentou-se cerca de seis vezes mais ativa que o extrato etanólico bruto (Figura 1 e Tabela 1).

Tabela 1: Efeitos inibitórios do extrato etanólico bruto de *Alternanthera maritima* e sua fração butanólica no ensaio de quimioluminescência em sistemas celular e livre de células.*

Amostra	Sistema celular IC ₅₀ [†]	Sistema livre de células IC ₅₀ [‡]
Extrato etanólico bruto (µg/mL)	57,09 ± 4,27	11.90 ± 0.44
Fração butanólica (µg/mL)	30,45 ± 5,42 ^γ	1.88 ± 0.05 ^γ

* Dados expressos como médias ± EPM (erro padrão da média).

‡ Quimioluminescência produzida pela reação luminol-HRP-H₂O₂ (n=3).

† Quimioluminescência produzida por neutrófilos humanos estimulados pelo zimozan (n = 4-6).

IC₅₀: concentração que inibe 50% da quimioluminescência.

Estatísticas: (β ≠ γ), P < 0.001. (ANOVA and Tukey's post-hoc test)

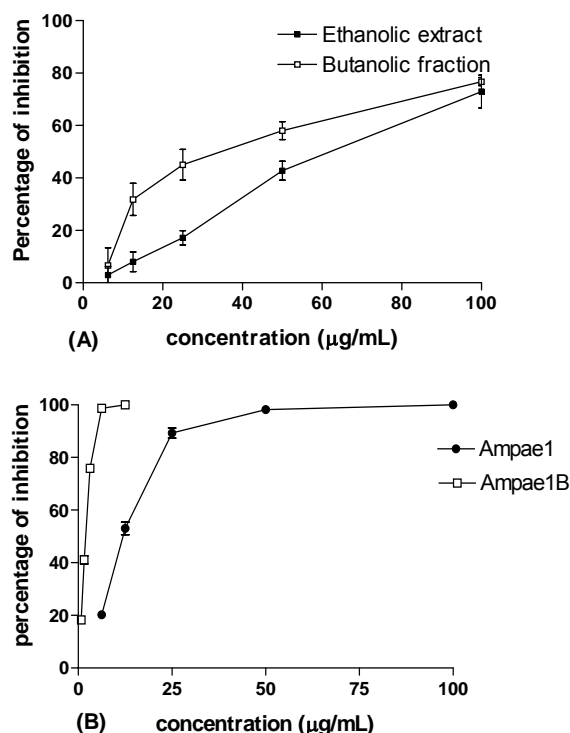


Figura 1: Efeito do extrato etanólico bruto de *Alternanthera maritima* e de sua fração butanólica na quimioluminescência celular (A) ou livre de células (B). Dados foram expressos como porcentagem de inibição da quimioluminescência versus concentração final das amostras na reação.

Ensaio de fenóis totais por Folin-Ciocalteu

Neste ensaio avaliou-se o conteúdo fenólico das amostras. A fração butanólica teve a maior capacidade em acumular fenóis em relação ao extrato etanólico (Tabela 2).

Tabela 2: Conteúdo de fenóis total do extrato etanólico bruto de *Alternanthera maritima* e sua fração butanólica.

Amostra	Conteúdo fenólico ^a (mg of GAE/g do extrato ou fração) ^b
Extrato etanólico bruto	305.00 (1.60)
Fração butanólica	390.00 (0.76)

^a Média (%DPR, desvio padrão relativo) do ensaio em triplicata.

^b Dados de fenóis total expressos como miligramas de ácido gálico equivalente por grama do extrato ou fração (mg of GAE/g).

Discussão

Pelos dados obtidos nos ensaios de quimioluminescência observou-se que o extrato etanólico de *A. maritima* apresentou-se ativo quanto a atividade antioxidante tanto em sistema celular quanto em sistema livre de células visto sua capacidade de inibição da CL-lum (Tabela 1).

No fracionamento biomonitorado do extrato notou-se que sua fração butanólica mostrou-se mais ativa que o extrato etanólico bruto tanto no ensaio em sistema celular como no ensaio livre de células (Tabela 1), com uma relação de dose-resposta (Figura 1).

Uma vez que há trabalhos sugerindo relação, por exemplo, entre a ocorrência de polifenóis, propriedades farmacológicas (antiinflamatória, imunomodulatória e antioxidante) e a capacidade de seqüestrar radicais livres (KIM et al., 2004; HAVSTEEN, 2002; PICCINELLI et al., 2004), procedeu-se a quantificação de fenólicos totais solúveis utilizando o ensaio Folin-Ciocalteu verificando-se uma correlação entre a atividade antioxidante do extrato e da fração butanólica e o conteúdo fenólico destas amostras (Tabela 2). Estes resultados corroboram dados da literatura (CAO et al., 1997; RICE-EVANS et al., 1996) que relatam a existência de correlação entre compostos fenólicos em plantas e as seguintes atividades: seqüestro de radicais livres, ação inibitória de enzimas, proteção contra a lipoperoxidação e eliminação de EROs.

A fração butanólica apresentou-se mais ativa e teve maior concentração fenólica, porém estudos

futuros e mais detalhados fazem-se necessários visando a identificação das substâncias presentes nesta fração e que contribuem para a atividade antioxidante.

Conclusão

Os resultados mostraram que o extrato etanólico bruto de *A. maritima* e a fração butanólica deste extrato apresentaram considerável atividade antioxidante tanto em ensaio com neutrófilos como em sistema livre de células, sendo possível observar correlação entre o conteúdo fenólico e o potencial antioxidante destes produtos naturais.

Referências

ALONSO, A.M.; DOMINGUEZ, C.; GUILLEN, D.A.; BARROSO, C.G. Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content. **J. Agric. Food Chem.** V.50, p.3112-3115, 2002.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R.L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biol. Med.** V.22, p.749-760, 1997.

CHEUNG, K.; ARCHIBALD, A.C.; ROBINSON, M.F. The origin of chemiluminescence produced by neutrophils stimulated by opsonized zymosan. **J. Immunol.** V.130, p.2324-2329, 1983.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharm. Ther.**, V.96, p.67-202, 2002.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J. Agric. Food Chem.** V.53, p.1841-1856, 2005.

KABEYA, L.M.; KANASHIRO, A.; AZZOLINI, A.E.C.S.; SORIANI, F.M.; LOPES, J.L.C.; LUCISANO VALIM, Y.M. Inhibitory effect of eight simple coumarins on the lucigenin enhanced chemiluminescence of rabbit neutrophils. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology** V.111, p.103-113, 2002.

KANASHIRO, A.; KABEYA, L.M.; POLIZELLO, A.C.M.; LOPES, N.P.; LOPES, J.L.C.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Inhibitory activity of flavonoids from *Lychnophora* sp. on generation of reactive oxygen

species by neutrophils upon stimulation by immune complexes **Phytother. Res.** V.18, p.61-65, 2004.

KIM, H.P.; SON, K.H.; CHANG, H.W.; KANG, S.S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **J. Pharmacol. Sci.**, V.96, p.229-245, 2004.

KROL, W.; CZUBA, Z.; SCHELLER, Z.; SHANI, J. Structure-activity relationship in the ability of flavonols to inhibit chemiluminescence. **J. Ethnopharmacol.** V.41, p.121-126, 1994

LUCISANO, Y.M.; MANTOVANI, B. **J. Immunol.**, V.132, p.2015-20, 1984.

PICCINELLI, A.L.; DE SIMONE, F.; PASSI, S.; RASTRELLI, L. Phenolic constituents and antioxidant activity of *Wendita calysina* leaves (burrito), a folk Paraguayan tea. **J. Agric. Food Chem.** V.52, p.5863-5868, 2004.

SALVADOR, M.J.; FERREIRA, E.O.; MERTENS-TALCOTT, S.U.; CASTRO, W.V.; BUTTERWECK, V.; DERENDORF, H.; DIAS, D.A. Isolation and HPLC quantitative analysis of antioxidant flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. **Z. Naturforschung.** V.61, p.19-25, 2006.

SALVADOR, M.J.; DIAS, D.A. Flavone C-glycosides from *Alternanthera maritima* (Mart.) St. Hil. (Amaranthaceae). **Biochem. Syst. Ecol.**, V.32, p.107-110, 2004.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods Enzymol.** V.299, p.152-178, 1999.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biol. Med.** V.20, p.933-956, 1996.

STEVANATO, R.; FABRIS, S.; MOMO, F. New enzymatic method for determination of total phenolic content in tea and wine. **J. Agric. Food Chem.** V.52, p.6287-6293, 2004.

WU, X.; BEECHER, G.R.; HOLDEN, J.M.; HAYTOWITZ, D.B.; GEBHARDT, S.E.; PRIOR, R.L. Lipophilic and hydrophilic capacities of common foods in the United States. **J. Agric. Food Chem.**, V.52, p.4026-4037, 2004.