

Atividade anti-inflamatória e antioxidante de extratos hidroalcóolicos de rizomas de *Limonium brasiliense*.

Eloisa Lorenzi da Silva (PIBIC/CNPq/UEM), Augusto Santos Borges, Mariana Nascimento de Paula, Ana Carolina Guidi (Coorientadora), João Carlos Palazzo de Mello (Orientador), e-mail: mello@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR.

Farmácia/Farmacognosia

Palavras-chave: Inflamação, oxidação, *Limonium brasiliense*.

Resumo:

Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, podem ocasionar o estresse oxidativo, o qual proporciona diversos danos celulares, além de influenciar na resposta inflamatória, a qual quando exacerbada, pode causar dano tecidual e funcional. Estudos sugerem uma eficácia da espécie vegetal *Limonium brasiliense* contra substâncias inflamatórias e oxidantes. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anti-inflamatória e antioxidante de extratos hidroalcóolicos de *L. brasiliense*. Foram preparados extratos brutos hidroalcóolicos 50 e 70% (v/v, EB50 e EB70), com rizomas secos e fragmentados de *L. brasiliense* pelo método de turbo-extração. Para os ensaios de atividade biológica, foi cultivada a linhagem celular de macrófagos murinos J774A.1 para avaliação da citotoxicidade dos extratos, por meio da metodologia do MTT-tetrazólio, e quantificação de citocinas através do método de ELISA sanduiche. Para os ensaios de atividade antioxidante, foram realizados ensaios de inibição dos radicais ânion superóxido e óxido nítrico. A avaliação da citotoxicidade dos extratos indicou que doses $\leq 100 \mu\text{g/mL}$ não influenciavam no crescimento das células. Os EB50 e 70 apresentaram valores de IC_{50} de 89,92 e $< 25 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, para a IL-6. Para o TNF- α , os extratos apresentaram valores de $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$. Para a inibição do $\text{O}_2^{\cdot-}$, os EB50 e 70 apresentaram valores de IC_{50} de 51,58 e 54,97 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Já para a inibição do NO, os valores de IC_{50} foram de 132,64 e 139,53 $\mu\text{g/mL}$ para o EB50 e 70, respectivamente. Pode-se concluir que os EB de *L. brasiliense* apresentam possível atividade anti-inflamatória e antioxidante.

Introdução

O estresse oxidativo implica no dano celular, no desenvolvimento de diversas patologias que atingem grande parte da população, tais como doenças autoimunes, cardiopatias, doenças pulmonares, disfunções cerebrais e até mesmo câncer, e agravam processos inflamatórios. A intensificação de processos inflamatórios pode ocasionar destruição tecidual e perda de função, sendo que isso pode ser evitado com a utilização de medicamentos anti-inflamatórios, que podem apresentar diversos efeitos adversos e ser de alto custo. Considerando que estes são

moduladores dessa resposta, a utilização de fármacos com capacidade antioxidante é de grande importância. Dessa forma, terapias alternativas, como a utilização de fitomedicamentos, podem ser viáveis, do ponto de vista farmacológico e econômico (QASIM et al., 2017; VASCONCELOS et al., 2007).

A espécie vegetal *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, Plumbaginaceae, conhecida popularmente como “baicuru”, é encontrada nas regiões costeiras desde o nordeste da Argentina até o estado da Bahia, estando principalmente em zonas de restinga no sul do Brasil. Sua fitoquímica é caracterizada pela presença de ácido 4-metóxi-gálico, cumarinas, flavonoides, leucoantocianidinas, saponinas, β -sitosterol e taninos condensados e hidrolisados (BLAINSKI; LOPES; DE MELLO, 2013).

O presente trabalho teve como objetivo quantificar citocinas pró-inflamatórias, interleucina-6 e fator de necrose tumoral alfa (IL-6 e TNF- α) e avaliar a atividade antioxidante, através da inibição do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e óxido nítrico (NO), a partir do extrato hidroalcolico de *L. brasiliense*.

Materiais e Métodos

Preparação de extrato

A preparação do extrato foi realizada utilizando rizomas secos e fragmentados de *L. brasiliense* pelo método de turbo-extração, com solventes etanol:água (50 e 70%, v/v). Depois, o extrato foi filtrado, removida a fase orgânica por rotaevaporação sob pressão reduzida e, em seguida, liofilizado, produzindo o extrato bruto (EB).

Linhagem e cultura celular

Foi utilizada a linhagem celular de macrófagos murinos J774A.1 (ATCC® TIB-67), cultivadas em garrafas contendo meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino e mantidas em estufa a 37,0 °C e atmosfera de 5,0% de CO₂.

Avaliação de citotoxicidade

A avaliação de citotoxicidade foi realizada pela metodologia do MTT-tetrazólio (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*), conforme Mosmann (1983), com modificações. Foram plaqueadas 2×10^5 células viáveis por mL e incubadas por 24 h a 37,0 °C/5,0% CO₂. Passado esse tempo, as células foram tratadas com diferentes doses dos extratos e novamente incubadas por 24 h. Após esta última incubação, o sobrenadante contendo o tratamento foi removido e foram adicionados 200 μ L da solução de MTT-tetrazólio na concentração de 0,5 mg/mL de DMEM (não suplementado) em cada poço, sendo a placa incubada por 3 h. Passado esse tempo, a placa foi vertida para a remoção da solução e adicionados 200 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço. Após isso, foi realizada leitura em comprimento de onda de 540 nm com filtro de referência em 620 nm.

Quantificação de citocinas em macrófagos ativados

Para a quantificação de IL-6, foram adicionadas 5×10^6 células viáveis/mL de meio DMEM suplementado. Já para a quantificação de TNF- α , foram adicionadas 2×10^5 células viáveis/mL de meio. As células foram incubadas por 24 h (37,0 °C e 5,0% de CO₂) para adesão celular. Após isso, foi descartado o sobrenadante, as

células foram estimuladas com Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS) na concentração de 1 µg/mL e foi adicionado diferentes concentrações dos extratos, sendo incubadas por 24 h. Em seguida, coletou-se os sobrenadantes utilizados para a detecção e quantificação das citocinas, através do método imunoenzimático (eBioscience ELISA Ready-SET-Go!®, San Diego, CA, USA).

Atividade antioxidante: inibição do ânion superóxido e óxido nítrico

Para o ensaio de inibição do $O_2^{\bullet-}$, foi utilizada a metodologia descrita por Suzumura et al. (1999), com modificações. Foram adicionados 225 µL de tampão fosfato-salino (PBS) (50 mM e pH 7,4), 30 µL do extrato, 7,5 µL do metassulfato de fenazina (PMS) (0,5 mM) e 30 µL de cloreto de tetrazólio-nitrozol (NBT) (0,045 mM), em placa de 96 poços. Após 2 min, foram adicionados 7,5 µL de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) (0,125 mM) e, após 10 min de incubação à temperatura ambiente e ao abrigo de luz, foi realizada a leitura espectrofotométrica em 540 nm.

Para o ensaio de inibição do NO, de acordo com Bates et al. (1991), preparou-se o nitroprussiato de sódio (NPS) (1,25 mM) em PBS (0,1 M e pH 7,0) com total ausência de luz e, em seguida, foram adicionados 50 µL dessa solução e 50 µL de extrato em diferentes concentrações em placa de 96 poços, sendo incubadas por 1 h à temperatura ambiente com exposição à luz. Após isso, foram adicionados 100 µL do reagente de Griess e realizado a leitura em 540 nm.

Resultados e Discussão

Avaliação de citotoxicidade

Os ensaios de avaliação de citotoxicidade dos EB50 e EB70 de *L. brasiliense* para a linhagem celular J774A.1 demonstraram valores de CC_{50} (µg/mL) de: 166,33 ± 34,80 e 119,83 ± 22,25, respectivamente.

Quantificação de citocinas em macrófagos ativadas

Para a IL-6, o valor de IC_{50} do EB50 foi inferior a menor concentração testada (< 25 µg/mL), o que indica ação inibidora desta citocina evidente. Já o EB70 apresentou dose-resposta e valor de IC_{50} de 89,93 µg/mL.

Para o TNF- α , o EB50 apresentou valor de IC_{50} de > 100 µg/mL, sendo que nesta concentração o extrato apresentou inibição de 30,78% na produção da citocina. Já o EB70 não apresentou eficiência frente a inibição do TNF- α .

Atividade antioxidante: inibição do $O_2^{\bullet-}$ e NO

Para o ensaio de inibição do $O_2^{\bullet-}$, os extratos apresentaram valores de IC_{50} inferiores aos padrões de atividade antioxidante testados, sendo os valores de IC_{50} (µg/mL) de: 75,45 ± 3,08 (4,08%), > 100, 51,58 ± 2,82 (5,47%) e 54,97 ± 2,70 (4,91%) para o ácido gálico, trolox, EB50 e EB70, respectivamente. Com isso, os extratos podem impedir a formação de outras espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

Para o ensaio de inibição do NO, os extratos apresentaram valores de IC_{50} superiores aos padrões de atividade antioxidante testados, sendo os valores de IC_{50}

($\mu\text{g/mL}$) de: $29,71 \pm 1,38$ (4,65%), $66,30 \pm 2,08$ (3,06%), $132,64 \pm 1,35$ (1,02%) e $139,53 \pm 3,11$ (2,23%) para o ácido gálico, trolox, EB50 e EB70, respectivamente. Ainda, o extrato apresenta potencial de inibição deste radical, impedindo a ação deste em moléculas de formação do DNA e proteínas de reparo.

Conclusões

Os EB de *L. brasiliense* apresentam possível atividade anti-inflamatória, através da inibição das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α , e possível atividade antioxidante, devido a inibição dos radicais $\text{O}_2^{\bullet-}$ e NO.

Agradecimentos

Agradeço à Universidade Estadual de Maringá (UEM), ao Laboratório de Biologia Farmacêutica – Palafito, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

Referências

- BATES, J. N.; BAKER, M. T.; GUERRA Jr., R.; HARRISON, D. G. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. **Biochemical Pharmacology**, v. 42, p. 157–165, 1991.
- BLAINSKI, A.; LOPES, G. C.; DE MELLO, J. C. P. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. **Molecules**, v. 18, n. 6, p. 6852–6865, 2013.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- QASIM, M.; ABIDEEN, Z.; ADNAN, M. Y.; GULZAR, S.; GUL, B.; RASHEED, M.; KHAN, M. A. Antioxidant properties, phenolic composition, bioactive compounds and nutritive value of medicinal halophytes commonly used as herbal teas. **South African Journal of Botany**, v. 110, p. 240–250, 2017.
- SUZUMURA, K.; YASUHARA, M.; NARITA, H. Superoxide anion scavenging properties of fluvastatin and its metabolites. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, n. 10, p. 1477–1480, 1999.
- VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, 2007.