



# Avaliação do sequestro do óxido nítrico (NO) pelo extrato metanólico da alga *Bryothamnion triquetrum* (Gmelin) Howe

Robinson M. Maia,<sup>2</sup> Carlos W. N. Moura,<sup>3</sup> Vanderson S. Bispo,<sup>1</sup> João L. A. Santos,<sup>1</sup>  
Rafael S. Santana,<sup>1</sup> Humberto R. Matos<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Estresse Oxidativo e Patologias Relacionadas, Universidade Federal de Sergipe. Av. Marechal Rondon s/n, Rosa Elze, 49100-000 São Cristóvão-SE, Brasil,

<sup>2</sup>Faculdade Metropolitana de Camaçari, Av. Eixo Urbano Central s/n, Centro, 42800-000 Camaçari-BA, Brasil,

<sup>3</sup>Laboratório de Ficologia da Universidade Estadual de Feira de Santana. Av. Transnordestina s/n, Novo Horizonte, 44036-900 Feira de Santana-BA, Brasil.

**RESUMO:** O excesso de óxido nítrico (NO) produzido por indução da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) participa do desenvolvimento de inúmeras desordens que conduzem à perda da homeostasia. O estresse oxidativo gerado pelo aumento da produção endógena de NO pode levar a efeitos de toxicidade induzida, tais como peroxidação lipídica, nitratação de proteínas e danos ao DNA. Compostos que sejam capazes de sequestrar o radical NO podem diminuir a toxicidade das espécies reativas de nitrogênio (RNS), atuando na modulação de processos inflamatórios. Trabalhos realizados com alga da espécie *Bryothamnion triquetrum* (Gmelin) Howe, demonstraram que a mesma apresenta ação antioxidante, tendo sido eficiente no sequestro do radical DPPH, além de inibição da peroxidação lipídica, com uma atividade comparável ao ácido ascórbico e ao  $\alpha$ -tocoferol. Este estudo objetivou avaliar a capacidade de sequestro do radical NO *in vitro* pelo extrato metanólico da *Bryothamnion triquetrum*. Os resultados obtidos revelaram a presença de polifenóis sendo que todas as concentrações testadas (1,0; 2,5; 7,5; 10,0 mg/mL) foram capazes de inibir a formação de nitrito a partir de uma solução de nitroprussiato de sódio 5 mM sendo a concentração de 7,5 mg/mL a que apresentou maior percentual de inibição com 46,6%.

**Unitermos:** óxido nítrico, *Bryothamnion triquetrum*, estresse oxidativo.

**ABSTRACT:** "Evaluation of nitric oxide (NO) scavenging for the methanol extract of the alga *Bryothamnion triquetrum* (Gmelin) Howe". The excess of nitric oxide (NO) produced by induction of nitric oxide synthase enzyme (iNOS) participates in the development of countless disorders that lead to the loss of homeostasis. The oxidative stress generated by the increase of endogenous production of NO can lead to some effects of induced toxicity, such as fatty per oxidation, nitration of proteins and DNA damages. Compounds that scavenge the NO radical can reduce the toxicity of reactive nitrogen species (RNS), and act in the modulation of inflammatory processes. Works accomplished with the alga species *Bryothamnion triquetrum* (Gmelin) Howe demonstrated that it presents an antioxidant action, and it is efficient in the scavenging of DPPH radical and in the inhibition of fatty per oxidation, with activity comparable to the ascorbic acid and  $\alpha$ -tocoferol. This study aimed to evaluate the capacity of NO radical scavenging *in vitro* for the methanol extract of the alga *Bryothamnion triquetrum*. The results revealed that the presence of polyphenol in all tested concentrations (1,0; 2,5; 7,5; 10,0 mg/mL) was capable to inhibit the nitrite formation, starting from a solution of sodium nitroprussiate 5 mM whose concentration of 7,5 mg/mL presented the largest inhibition percentage of 46,6%.

**Keywords:** nitric oxide, *Bryothamnion triquetrum*, oxidative stress.

## INTRODUÇÃO

Vários trabalhos relatam a busca de substâncias bioativas com atividade antioxidante em algas marinhas (Vidal et al., 2001; Tannin-Spitz et al., 2005; Vidal et al., 2006; Zubia et al., 2007; Rocha et al., 2007), dos mais

diferentes gêneros e espécies, tendo sido crescente o número de autores que acreditam na flora marinha como fonte de fármacos e insumos farmacêuticos diversificados, principalmente no que diz respeito às diversas patologias associadas ao estresse oxidativo (Rocha et al., 2007.).

Dentre as algas pesquisadas, as da família *Rhodophytae* (algas vermelhas) têm despontado por sua ação antioxidante (Vidal et al., 2001; Vidal et al., 2006; Rocha et al., 2007; Zubia et al., 2007).

As algas vermelhas apesar de possuírem um grande número de espécies, geralmente são menores em tamanho e as espécies individuais são menos abundantes que as algas verdes (*Chlorophytae*) e pardas (*Phaeophytae*) (Norris et al., 1982). As algas da espécie *Bryothamnion triquetrum* são compostas de talo ereto, rígido, grosseiro, de coloração vermelho escura, medindo até 15 cm, crescendo de forma geral, rapidamente em ambientes de pouca profundidade fixa ao substrato, não apresentando toxicidade e sendo amplamente distribuída (Areces et al., 1995).

Extratos de algas da família *Rhodophytae* coletadas na costa do México demonstraram ser eficientes no sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazina), do ânion superóxido e na inibição da peroxidação lipídica (Zubia et al., 2007). Dentre as espécies analisadas, constava a *Bryothamnion triquetrum* que apresentou atividade antioxidante semelhante a compostos comerciais como o butilhidroxitolueno (BHT), o ácido ascórbico e o  $\alpha$ -tocoferol (Zubia et al., 2007). Em trabalho realizado com extratos de algas dessa espécie Vidal et al. (2001) demonstrou a presença de três constituintes fenólicos majoritários: o ácido *trans*-cinâmico, o ácido *p*-cumárico, e o ácido ferúlico, atribuindo, em trabalho anterior a esses compostos parte da capacidade antioxidante observada frente ao sequestro do radical hidroxila, ânion superóxido e do radical DPPH, além de inibição da lipoperoxidação pelo teste do ácido linoléico (Vidal et al., 2006). Lima et al. (2004) demonstrou que uma lectina extraída da *Bryothamnion triquetrum* induziu o relaxamento de seguimento da aorta torácica de ratos por ativação da eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) e consequente liberação de NO.

O radical óxido nítrico é uma molécula endógena envolvida em inúmeros processos fisiológicos que variam desde a neurotransmissão (Katzung, 2006; Yuan et al., 2009) até modulação do estado inflamatório, agindo na agregação plaquetária, vasodilatação (Saha et al., 2006), quimiotaxia e possuindo ação bactericida (Katzung, 2006). Em altas concentrações o NO pode reagir com o ânion superóxido produzindo o potencialmente danoso peroxinitrito (Peluffo & Radi, 2007), aumentando o estado de estresse oxidativo, induzindo peroxidação lipídica, desestabilidade nas membranas, oxidação e nitração de proteínas e danos ao DNA (Robinson et al., 2001, Virág et al., 2003; Ippoushi, 2009; Yuan et al., 2009). Devido a isto, tem sido aceito que a formação de peroxinitrito e sua subsequente reação com produtos endógenos podem estar envolvidos na patogênese de doenças, incluindo algumas desordens neurodegenerativas (Saha et al., 2006), complicações do estado diabético (a exemplo da retinopatia) (Yuan et al., 2009) e a gênese de processos

cancerígenos (Radi & Peluffo, 2001). Assim, substâncias que sequestram o radical óxido nítrico podem desempenhar um importante papel citoprotetor, agindo nos processos de toxicidade induzida por espécies reativas de nitrogênio (RNS), modulando os processos inflamatórios, diminuindo o estado de estresses oxidativo e podendo apresentar-se como alternativa terapêutica para algumas dessas desordens (Saha et al., 2006).

O presente estudo objetivou avaliar a concentração de polifenóis totais e o efeito sequestrante do radical óxido nítrico *in vitro* pelo extrato metanólico da alga *Bryothamnion triquetrum* (Gmelin) Howe (EMBT).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta e identificação da alga

As algas foram coletadas na Ilha de Itaparica, Município de Vera Cruz, Praia da Enseada do Pedrão, Bahia, Brasil em abril de 2005, coletor C.W.N Moura (HUEFS 136683). O material foi encontrado crescendo aderido sobre substrato rochoso, borda do corpo recifal, em local de arrebentação de ondas.

Cerca de 200 g (peso úmido), foram coletados com auxílio de espátula metálica, para a obtenção de exemplares inteiros, os quais foram limpos em água do mar (para retirada de organismos epífitos e sedimento aderido ao talo) e acondicionados em sacos de polietileno devidamente etiquetados. As amostras foram imediatamente armazenadas em recipiente de isopor contendo gelo e transferidas para o Laboratório de Ficologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, onde foram lavadas com água destilada para remoção de sal, partículas de areia e novamente triadas em cuba plástica para retirada de eventuais epífitas e verificação de estágio reprodutivo. Em seguida, o material foi armazenado em freezer a -20 °C até o processo de extração.

### Preparação do extrato metanólico de *Bryothamnion triquetrum* (EMBT)

#### *Extração contínua a quente com metanol*

O material foi pesado (150 g) e transferido para um extrator de Soxhlet, em seguida extraído com 1 L de metanol (PA) a uma temperatura de 50 °C por 12 h. O extrato obtido foi rotaevaporador e seco a 50 °C. Ao final, obteve-se 0,6 g de extrato bruto concentrado (rendimento de 0,4%).

### Determinação de polifenóis totais

Para determinação do teor de polifenóis totais no EMBT foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu feito segundo Slinkard (1977) com modificações. As concentrações de polifenóis foram calculadas a partir de

uma curva padrão de ácido gálico ( $r = 0,99509$ ) e os dados foram expressos em mg/L.

### Análise do sequestro do óxido nítrico (NO) *in vitro*

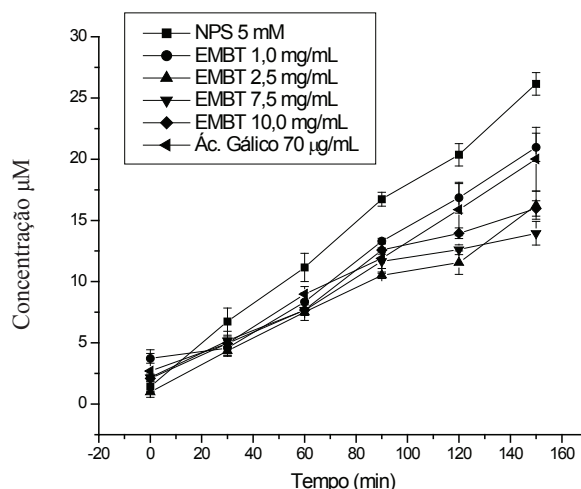
Para avaliação do sequestro do NO *in vitro* foi utilizada solução de nitroprussiato de sódio (NPS), seguindo método descrito por Griess (1879). Solução de NPS 5 mM foi diluído em tampão fosfato (0,1 M, pH 7) e misturado com diferentes concentrações do EMBT (1; 2,5; 7,5; 10 mg/mL) dissolvido em etanol e incubados a 24 °C por 150 min. Foi conduzido um experimento controle em paralelo utilizando tampão fosfato pH 7 0,1 M em lugar das amostras, feito em quintuplicata, utilizado como curva da cinética de formação de nitrito a partir de nitroprussiato de sódio 5 mM nas condições descritas (curva NPS do gráfico). Em intervalos de 30 min, 1 mL das amostras incubadas foram retiradas e misturadas com 1 mL reagente de Griess (sulfanilamida 1% em  $H_3PO_4$  5% e cloridrato de naftiletlenodiamino 0,1%). A absorvância do cromóforo formado durante a diazotação do nitrito com a sulfanilamida e subsequente complexação com o naftiletlenodiamino foi medido por espectrofotometria a 546 nm.

**Tabela 1.** Efeito inibitório do extrato metanólico da alga *Bryothamnion triquetrum* na produção de nitrito a partir de nitroprussiato de sódio e concentração de polifenóis.

Amostras	Concentração $NO_3$ ( $\mu M$ )	IP %	Polifenóis ( $\mu g/mL$ )
Nitroprussiato	26,2 $\pm$ 0,9	----	----
EMBT (1,0 mg/mL)	20,9 $\pm$ 1,2*	19,8	56,6 $\pm$ 8,1
EMBT (2,5 mg/mL)	16,2 $\pm$ 1,2*	37,9	57,2 $\pm$ 9,1
EMBT (7,5 mg/mL)	13,9 $\pm$ 1,0*	46,7	53,9 $\pm$ 11,1
EMBT (10,0 mg/mL)	15,9 $\pm$ 0,6*	38,9	60,6 $\pm$ 11,6
Ácido gálico 100 $\mu g/mL$	14,4 $\pm$ 0,1	42,5	----

Dados: média $\pm$ desvio padrão (n = 5). Nas comparações estatísticas foi utilizado o teste t-Student \* $p < 0,05$  são significativamente diferentes quando comparadas com o grupo nitroprussiato.

Soluções crescentes do extrato metanólico foram adicionadas a solução de nitroprussiato de sódio (5 mM) em PBS (solução tampão fosfato) e incubadas a 24 °C por 150 min. Em intervalos de 30 min 1,0 mL da solução incubada foi removida e misturada com 1,0 mL do reagente de Griess e a absorvância foi lida a 546 nm. Os resultados obtidos foram extrapolados para uma curva padrão de nitrito de potássio obtida sob as mesmas condições. Para os cálculos de percentual de inibição e concentração de nitrito utilizou-se o tempo de 150 min. As concentrações de polifenóis relatadas foram obtidas pelo método de Folin-Ciocalteu (1999) em experimento a parte. Ácido gálico foi utilizado como controle positivo.



**Figura 1.** Produção de nitrito a partir de solução de 5 mM de nitroprussiato de sódio (NPS) na presença e na ausência do extrato metanólico da alga *Bryothamnion triquetrum*. Soluções crescentes do extrato metanólico foram adicionadas a solução de nitroprussiato de sódio (5 mM) em PBS (solução tampão fosfato) e incubadas a 24 °C por 150 min. Em intervalos de 30 min 1,0 mL da solução incubada foi removida e misturada com 1,0 mL do reagente de Griess e a absorvância foi lida a 546 nm. Os resultados obtidos foram extrapolados para uma curva padrão de nitrito de potássio obtido sob as mesmas condições.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar de seu papel endógeno essencial, diversos estudos já demonstram que o excesso de NO pode estar envolvido na gênese e desenvolvimento de inúmeras patologias (Robinson et al., 2001; Virág et al., 2003; Ippoushi, 2009; Yuan et al., 2009), por exemplo, da retinopatia diabética (Yuan et al., 2009) e desordens neurodegenerativas (Saha et al., 2006) como a esclerose múltipla (Horsssen et al., 2008). Dessa forma, compostos que sejam capazes de sequestrar o NO podem ser alternativas para a prevenção e terapia dessas desordens.

Pelos dados expressos na Tabela 1 notamos que todas as concentrações testadas do EMBT foram capazes de diminuir a formação de nitrito a partir de uma solução de NPS 5 mM, sendo a dose de 7,5 mg/mL a mais eficiente com um IP de 46.6%. Tal decréscimo também pode ser observado na Figura 1, que mostra a relação entre a concentração de nitrito ( $\mu M$ ) formado a partir de uma solução de NPS 5 mM ao longo de 150 min e as diversas concentrações do EMBT. Ambos os resultados sugerem que o EMBT esteja sequestrando o radical NO liberado no meio aquoso pelo nitroprussiato, impedindo com isso a formação do cromóforo detectado por espectrofotometria, através da diazotação do nitrito com sulfanilamida e posterior complexação com naftiletlenodiamino (Griess, 1879). Em 2001, trabalhando com extratos da *Bryothamnion triquetrum*, Vidal demonstrou que seus constituintes majoritários são o ácido *trans*-cinâmico, *p*-cumário

e ferúlico. Estes dois últimos apresentam estruturas semelhantes ao ácido gálico, que como demonstrado pelos dados na Tabela 1 possui uma potente capacidade de inibir a formação de nitrito, sendo que numa concentração de 100 µg/mL apresentou IP de 42,5% e na dose de 70 µg/mL atividade semelhante à concentração de 2,5 mg/mL de EMBT (Figura 1). Tal observação nos permite atribuir a esses compostos (ácido ferúlico e *p*-cumárico), parte da atividade antioxidante observada pelo EMBT. Utilizando frações da LDL *in vitro* Hseu You-Cheng et al. (2008) demonstrou que o ácido gálico foi eficiente na inibição da oxidação do mesmo pelo NPS, e em outro trabalho *in vivo* o ácido ferúlico apresentou atividade hepatoprotetora frente ao tetracloreto de carbono (Srinivasan et al., 2005).

Analisando-se as estruturas do ácido gálico, ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico, percebemos que todos pertencem à ampla classe dos compostos fenólicos, que como já foi comprovado por vários estudos possuem atividade antioxidante (Karakaya et al., 2004). Pelos dados expressos na Tabela 1, percebemos que o EMBT apresentou em sua composição polifenóis totais e que as concentrações dos mesmos não foram significativamente diferentes entre as doses analisadas (1,0; 2,5; 7,5; 10,0 mg/mL -cerca de 54 µg de polifenóis/mL). Esse resultado se deve provavelmente às limitações do método de Folin-Ciocalteu, que como comentado por Appel et al. (2001), dosagens feitas por esse método podem ser influenciadas por variações estruturais, bem como por metabólitos interferentes na amostra. Assim, sendo esse método baseado na oxidação-redução dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico pelas hidroxilas aromáticas dos fenóis (Swain & Goldesteins, 1964), alguma substância presente no extrato pode, com o aumento da concentração do mesmo, estar impedindo esta reação e consequentemente a formação do cromóforo detectável.

Trabalhos anteriores demonstram que algas vermelhas possuem em sua composição bromofenóis e compostos aromáticos poli-hidroxilados (Whitfield et al., 1999) e que extratos obtidos a partir da *Bryothamnion triquetrum* apresentaram em sua composição polifenóis (Vidal et al., 2001; Vidal et al., 2006; Zubia et al., 2007), identificados, como já mencionado, como sendo o ácido trans-cinâmico, *p*-cumárico e ferúlico (Vidal et al., 2001). Zubia et al. (2007) provou que extratos obtido a partir da *Bryothamnion triquetrum* possuem atividade antioxidante comparável à compostos comerciais como o BHT e o ácido ascórbico.

A ação observada do EMBT, frente à inibição da formação de nitrito pode ser interpretada como um indicativo de uma possível capacidade anti-inflamatória, uma vez que compostos que sequestram o NO, podem agir modulando o processo inflamatório, diminuindo seus efeitos danosos ao organismo e auxiliando na manutenção da homeostase. Pelos resultados obtidos com o ácido gálico frente à inibição da formação de nitrito, podemos supor que os componentes do EMBT responsáveis por essa atividade são ácido ferúlico e o *p*-cumárico, substâncias

estruturalmente semelhantes ao ácido gálico. Contudo, mais pesquisas devem ser realizadas, a fim de melhor caracterizar os componentes do EMBT, de forma a definir se tais respostas encontradas *in vitro*, se manifestam *in vivo*.

## CONCLUSÃO

O extrato metanólico da *Bryothamnion triquetrum* (EMBT) apresentou em sua composição a presença de polifenóis e foi eficiente na inibição da formação de nitrito a partir de uma solução de nitroprussiato de sódio 5 mM, através do sequestro do radical NO, o que é atribuído aos compostos fenólicos encontrados no EMBT. Entretanto, mais estudos necessitam ser realizados para verificar se a ação obtida *in vitro* se manifesta *in vivo*, avaliar o efeito de outras frações, além de determinar possíveis efeitos tóxicos por parte de EMBT ou mesmos outros efeitos ainda não relatados na literatura.

## REFERÊNCIAS

- Appel H 2001. Limitations of folin assays of foliar phenolics in ecological studies. *J Chem Ecol* 27: 761-778.
- Areces A 1995. *Biocología de agarofitas del género Bryothamnion kutzing*. p. 30-64. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas, Instituto de Oceanografia de Habana, Universidad de La Haban, Cuba.
- Griess P 1879. Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt .Ueber einige azoverbindungen. *Chem Ber* 12: 426-428.
- Horssen J 2008. Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesions coincides with enhanced antioxidant enzyme expression. *Free Radical Bio Med* 45: 1729-1737.
- Hseu You-Cheng 2008. Antioxidant activities of *Toona sinensis* leaves extracts using different antioxidant models. *Food Chem Toxicol* 46: 105-114
- Ippoushi K 2009. Prevention of peroxynitrite-induced oxidation and nitration reactions by ellagic acid. *Food Chem* 112: 185-188.
- Karakaya S 2004. Bioavailability of phenolic compounds. *Crit Rev Food Sci* 44: 453-464.
- Katzung BG 2006. *Farmacologia básica e clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Lima RF 2004. Red marine alga *Bryothamnion triquetrum* lectin induces endothelium-dependent relaxation of the rat aorta via release of nitric oxide. *J Pharm Pharmacol* 56: 1415-1421.
- Norris JN 1982. Chemical defense in tropical marine algae. *Smithson Contrib Mar Sci* 12: 417-31.
- Peluffo G, Radi R 2007. Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. *Cardiovasc Res* 75: 291-302.
- Radi R, Peluffo G 2001. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radical Bio Med* 30: 463-488
- Robinson VK 2001. Peroxynitrite inhibits inducible (Type 2) nitric oxide synthase in murine lung epithelial cells *in vitro*. *Free Radical Bio Med* 30: 986-91.
- Rocha FD 2007. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. *Rev Bras Farmacogn* 17: 631-639.
- Saha RN 2006. Signals for the induction of nitric oxide synthase in astrocytes. *Neurochem Int* 49:154-163.

- Slinkard K 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *Am J Enol Viticult* 28: 49-55.
- Srinivasan M 2005. Ferric acid, a natural protector against carbon tetrachloride-induced toxicity. *Fundam Clin Pharm* 19: 491-496.
- Swain T, Goldstein J 1964. The quantitative analysis of phenolics compounds. In: Phytochemical Group. *Methods in Polyphenol Chemistry*. New York: Symposium Publications Division, Pergamon Press by Macmillan, p. 131-145.
- Tannin-Spitz T 2005. Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp. *J Appl Phycol* 17: 215-222.
- Vidal A 2001. Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe. *Rev Bras Cienc Farm* 37: 373-382.
- Vidal A 2006. Composición química y actividad antioxidante del alga marina roja *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe. *Rev Bras Cienc Farm* 42: 509-600.
- Virág LE 2003. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett* 140-141:113-124.
- Whitfield FB 1999. Distribution of bromophenols in species of marine algae from eastern Australia. *J Agric Food Chem* 47: 2367-2373.
- Yuan Z 2009. p38MAPK and ERK promote nitric oxide production in cultured human retinal pigmented epithelial cells induced by high concentration glucose. *Nitric Oxide* 20: 9-15.
- Zubia M 2007. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, México. *J Appl Phycol* 19: 449-458.