

- Stafford, H.A. eds. Recent Advances in Phytochemistry - Modern Phytochemical Methods, New York: Plenum Press, v. 25, p. 319-345, 1991.
- ⁷ Le Van N.; Fischer, N.H. Three new melampolide sesquiterpenes, polymatin A, B and C, from *Polymnia maculata* Cav. var. *maculata*. Phytochemistry, v. 18, p. 851-854, 1979.
- ⁸ Seaman F.C. Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. Botanical Review, v. 48, p. 123-551, 1982.
- ⁹ Spring, O. Chemotaxonomy based on metabolites from glandular trichomes. Advances in Botanical Research, v. 31, p. 153-174, 2000.

* **Corresponding author:**

Prof. Dr. Fernando B. Da Costa
Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Laboratório de Farmacognosia
Av. do Café s/n , 14040-903 - Ribeirão Preto - SP - Brazil
Fax: +55-16-633-1941
E-mail: febcosta@fcfrp.usp.br

Ação de extratos do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) sobre a produção de óxido nítrico em células RAW 264.7

Matheus, M.E.¹; Mantovani, I.S.B.²; Santos, G.B.²; Fernandes, S.B.O.²; Menezes, F.S.²; Fernandes, P.D.^{1*}

¹Departamento de Farmacologia Básica e Clínica, ICB, Universidade Federal do Rio de Janeiro

²Departamento de Produtos Naturais e Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Resumo

Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), é uma palmeira tropical muito apreciada por sua beleza e valor nutricional. Estudos químicos revelaram a presença de ácidos graxos e esteróides. No presente trabalho foi avaliada a ação de extratos obtidos dos frutos e flores sobre a produção de óxido nítrico (ON), molécula que apresenta várias atividades fisiológicas, tais como vasodilatação, neurotransmissão, além de atividades tumoricidas e citotóxicas. Células Raw 264,7 estimuladas com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS, 100 ng/ml) e interferon-alfa (IFN-alfa, 10 U/ml) produziram grande quantidade de óxido nítrico (35 µM) quando comparadas com as células não estimuladas (3 µM). Os extratos com hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol apresentaram alta capacidade de inibição em células ativadas com LPS e IFN-alfa, de acordo com a concentração, sendo que na concentração mais alta ocorreu uma inibição de quase 100 %. Também avaliamos se o efeito inibitório seria devido a seqüestro do radical livre (ON), através do uso do SNAP (um doador de ON). Somente o extrato em acetato de etila mostrou atividade sequestrante. Esforços estão sendo empregados na tentativa de compreender os possíveis mecanismos associados ao efeito inibitório destes extratos.

Abstract

Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) is a tropical palm tree appreciated for its attractive beauty and for nutritional purposes. Chemical studies have revealed the presence of fatty acids and steroids. In the present work, it has been tested the action of the extracts obtained from the fruits and flowers on the nitric oxide (NO) production, a very important molecule with a lot of physiological rules such as vasodilatation, neurotransmission, tumoricidal and cytotoxic activity. Cells RAW 264.7 stimulated with bacterial lipopolysaccharide (LPS, 100 ng/ml) and interferon-alpha (IFN-alpha, 10 U/ml) produce large amounts of nitric oxide (35 µM) when compared with non-stimulated cells (3µM). The hexane, dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol extracts have shown high inhibition capacity, concentration-dependent in the cells activated with LPS and IFN-alpha, and the highest concentration has promoted almost 100 % of inhibition. We also have tested if the inhibitory effect was due to a scavenger

action using a NO donor, the SNAP. Only the ethyl acetate extract has shown significant scavenger action. At this moment an effort is going on to try to understand the possible mechanisms associated to the inhibition of those extracts.

A palmeira *Euterpe oleracea* Mart. é uma espécie nativa dos trópicos e predomina nos solos hidromórficos, nos quais a utilização agrícola é bastante restrita, servindo de proteção para solos por apresentar uma disposição constante de folhas e sistema radicular abundante. Possui característica de cultura permanente com possibilidades de desenvolvimento de uma fruticultura regional e exploração florestal, apresentando brotação constante. O trabalho desenvolvido por Melo e cols.¹ com a finalidade de contornar o problema de entressafra e conservação do suco ou "vinho de açai", que é muito perecível, demonstrou os seguintes resultados, após análise química do pó: 7,45 % de voláteis a 105 graus Celsius; 4,50 % de resíduo mineral fixo; 45,0 % de extrato etéreo; 9,4 % de proteína bruta; 3,20 % de fibra bruta; 0,72 % de CaO; 0,30 % de P₂O₅; 0,89 % de K₂O e 0,27 % de MgO. Recente trabalho desenvolvido por Santos em 2000², revelou a composição química dos extratos apolares de folhas e frutos do Açai.

O óxido nítrico (ON) é um gás lipossolúvel, produzido pelas células do sistema imune através da ação de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS) sobre o ácido aminado L-arginina. Estas enzimas podem ser divididas em dois grupos, um constitutivo, onde as células (do sistema endotelial, neuronal, entre outros) apresentam as NOS, as quais produzem baixas quantidades de ON e são responsáveis pela manutenção do tônus vascular, entre outros efeitos. O outro grupo é denominado de induzido, onde a NOS induzida não é encontrada em situações fisiológicas, somente quando as células são devidamente estimuladas (com uma combinação de lipopolissacarídeo bacteriano e citocinas). Nesta situação o ON começa a ser produzido em grandes quantidades e sua produção é importante em situações patológicas onde o sistema imune é estimulado (choque séptico, infecção bacteriana)². O objetivo do presente trabalho foi estudar um possível efeito dos extratos de açai na produção de óxido nítrico de células mantidas em cultura.

Para avaliar um possível efeito dos extratos do açai na produção de ON por células em cultura, foram incubadas doses crescentes de cada um dos extratos com macrófagos ativados com LPS e IFN-gama (LI). Pode-se observar que o grupo controle (células somente com LI) atingiu uma produção de ON em torno de 35 µM de nitrito. A presença de doses crescentes dos extratos adicionados no momento da ativação resultou em uma redução na produção de ON somente em alguns dos extratos. Como pode ser observado na figura 1 o extrato EOFB não reduziu os níveis de ON. Já EOFa só mostrou redução significativa com a maior dose (de 100 µg/ml). Os extratos de folhas em diclorometano e em hexano mostraram uma redução maior e um efeito significativo, sendo o mesmo observado a partir da dose de 25 µg/ml. O teste com extratos de frutos mostrou que EOFrD, assim como EOFrA também reduziram significativamente a produção de ON a partir de 25 µg/ml. O fato de os extratos em

hexano e em diclorometano terem mostrado maior efeito do que os outros poderia ser explicado por sua polaridade. Como esses solventes tem uma menor polaridade, tem uma maior facilidade de permear a membrana das células, tendo assim um acesso mais fácil ao interior celular, reduzindo então com doses menores a produção de ON (figura 1). Para se ter certeza de que a redução na produção de ON não era decorrente de morte celular, um teste de viabilidade das células foi realizado após o ensaio e observou-se que em todos os grupos avaliados a viabilidade das células sempre foi acima de 95 % (dados não mostrados).

Para certificar que o efeito dos extratos era decorrente de inibição nas vias de produção de ON da célula e não um efeito "sequestrante" do radical livre, resolveu-se então incubar os extratos, nas doses de 50 e 100 µg/ml, com uma substância denominada "doadora de ON", o SNAP (S-nitroso-n-acetil DL-penicilamina). Uma vez em solução, esta substância tem a capacidade de liberar somente moléculas de ON para o meio, que rapidamente decai ao seu metabólito, o nitrito². Se os extratos fossem capazes de se ligar diretamente ao ON, assim o fariam também neste modelo e poderia-se observar uma redução nos valores de nitrito. Entretanto, quando os extratos foram incubados (50 µg/ml) com 1 mM de SNAP, só observou-se redução nos níveis de nitrito quando o extrato era o EOFrA (figura 2).

Para certificar que não ocorria efeito direto dos extratos na liberação do ON, aumentou-se as doses dos extratos para 100 µg/ml e os mesmos foram incubados com o SNAP (1 mM), seguindo o protocolo utilizado na figura 2. Novamente observou-se que o único extrato que foi capaz de reduzir significativamente os níveis de nitrito, foi o EOFrA (figura 3). Esses resultados indicam que no modelo experimental utilizado, o único extrato que parece possuir um efeito de "sequestrador" do radical livre ON é o EOFrA (em acetato de etila), porque mesmo no ensaio livre de células, houve uma redução significativa nos níveis de ON liberado. De forma interessante, os outros extratos só mostraram atividade quando a produção do ON era proveniente de células. Esses resultados são indicativos de que o efeito destes extratos deve estar ocorrendo diretamente nas células, mais especificamente na via de produção do ON, inibindo a enzima óxido nítrico sintase induzida. Experimentos já estão sendo realizados para se comprovar esta hipótese.

Os extratos de *Euterpe oleracea* Mart. foram capazes de inibir a produção de óxido nítrico a partir de células em cultura. Este efeito parece ser decorrente de ação direta dos extratos na via de produção do ON, visto que no sistema livre de células não houve redução nos níveis de ON. A única exceção a esta observação é com relação ao extrato dos frutos em acetato de etila, que reduziu os níveis de ON tanto nas células em cultura quanto quando incubado com o doador de ON.

Material e Métodos

As folhas e os frutos da *Euterpe oleracea* Mart. foram coletadas em Imperatriz, Maranhão, Brasil. Após secos e moídos foram extraídos com etanol. Este extrato foi evaporado sob pressão reduzida, suspenso em água e partições foram obtidas sucessivamente com solventes de polaridades crescentes

originando os extratos denominados EOFH (em hexano, das folhas), EOFD (em diclorometano, das folhas), EOFA (em acetato de etila, das folhas), EOFB (em *n*-butanol, das folhas), EOFrD (em diclorometano, dos frutos) e EOFrA (em acetato de etila, dos frutos). A partir de cada um dos extratos foram feitas soluções estoque, a 1 mg/ml, em RPMI estéril e armazenadas à -8°C até o momento do uso. No dia de cada ensaio, os extratos eram diluídos com RPMI. Cada extrato foi testado em doses que variaram de 50 a 100 µg/ml.

A linhagem de células RAW 264.7 foi comprada na ATCC (American tissue collection) (cat # ATCC TIB-71) e depositada no Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram mantidas em meio de cultura RPMI suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 100 U/ml de Penicilina, 10 mg/ml de estreptomicina e 2 mg/l de glutamina. As células foram postas a aderir em placas de 96 poços, na densidade de 2×10^5 por poço, volume final de 250 µl de RPMI, e permaneceram por 24 horas, a 37 °C e 5 % de CO₂. Após esse período, os extratos foram adicionados juntamente com a ativação das células com LPS e IFN- γ (100 ng/ml e 10 U/ml; LI). Vinte e quatro horas após a ativação, o sobrenadante foi retirado e o nitrito acumulado quantificado através da técnica de Griess⁴. Os extratos (50 e 100 µg/ml) foram incubados com 1mM de SNAP (S-nitroso-n-acetil DL-penicilamina). Após 0, 30, 60, 120 e 240 minutos, foram retirados 100 µl do sobrenadante. O nitrito acumulado foi quantificado pela técnica de Griess. A produção de ON foi estimada pela quantificação do metabólito estável de ON, o nitrito (NO₂-), usando o método de Griess. Um volume de 100 µl do sobrenadante era retirado e a ele adicionado igual volume do reagente de Griess (sulfanilamida 1 % p/v, em H₃PO₄ 5 % + alfa-naftil-etilenodiamina 0,1 % v/v, em água). A absorbância a 540 nm foi medida em leitor de Elisa SPECTRA SOFTMAX. A concentração de nitrito no sobrenadante foi calculada a partir de uma curva padrão com concentrações conhecidas de NaNO₂. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da concentração do nitrito para pelo menos 3 experimentos realizados em separado. Cada grupo experimental foi analisado em triplicata.

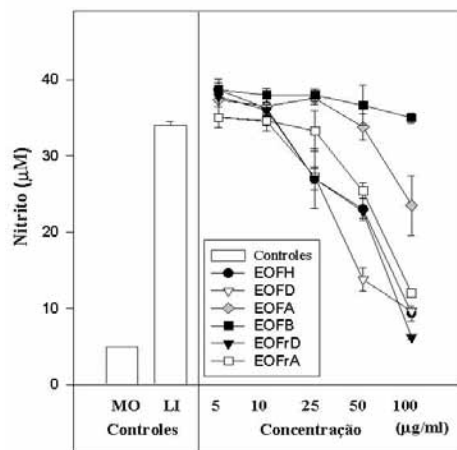


Figura 1. Efeito dos extratos de *Euterpe oleracea* Mart. na produção de óxido nítrico por macrófagos RAW 264.7

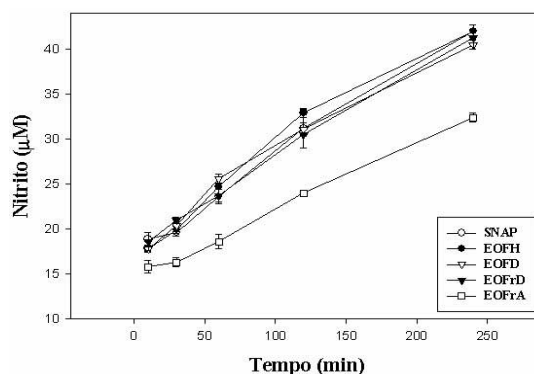


Figura 2. Efeito dos extratos de *Euterpe oleracea* Mart. (50 µg/ml) sobre a liberação de ON a partir de SNAP (1 mM).

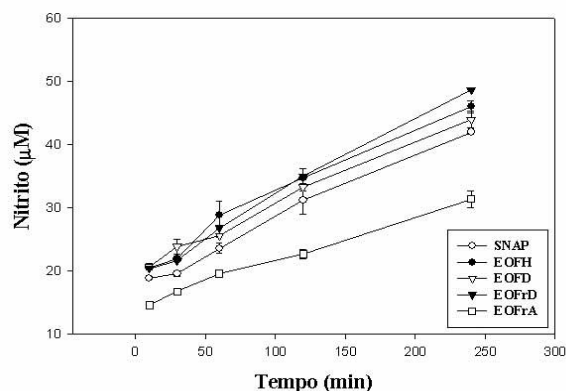


Figura 3. Efeito dos extratos de *Euterpe oleracea* Mart. (100 µg/ml) sobre a liberação de ON a partir de SNAP (1 mM).

Apoio Financeiro: FAPERJ, CAPES, PRONEX, FUJB

Referências

- Melo, C.F.M.;Barbosa, W.C.; Alves, S.M. Obtenção de Açai desidratado. EMBRAPA - CPATU, Belém, 1988.
- Santos,G.B. Açai (*Euterpe oleracea*): Aspectos Químicos e Farmacológicos. Rio de Janeiro, Dissertação de Mestrado, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2000.
- Fernandes, P.D.; Araújo H.M.; Riveros-Moreno, V.; Assrey J. Depolymerisation of macrophage filaments prevents induction and inhibits activity of nitric oxide synthase. *European Journal of Cell Biology.* n. 71, p. 356-362, 1996.
- Green, L.C.; Wagner, D.A.; Glogowski, J.; Shipper, P.L.; Wishnok, J.S.; Tannenbaum, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids, *Analytical Biochemistry,* v. 126, p. 131-138, 1982.

*Autor para correspondência:

Profa. Patrícia D. Fernandes
Departamento de Farmacologia Básica e Clínica, ICB
Faculdade de Farmácia
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Rio de Janeiro
E-mail: patfern@farmaco.ufrj.br