

# Avaliação da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da romã (*Punica granatum*, L.) sobre células da linhagem Caco-2

## Antioxidant activity evaluation of the pomegranate (*Punica granatum*, L.) hydroalcoholic extract at Caco-2 cell line

Fernanda Archilla JARDINI<sup>1\*</sup>, José Ricardo PINTO<sup>2</sup>, Rita Maria Zucatelli MENDONÇA<sup>2</sup>, Dalva Assunção Portari MANCINI<sup>2</sup>, Jorge MANCINI-FILHO<sup>1</sup>

### Resumo

A absorção dos compostos antioxidantes presentes no extrato hidroalcoólico da polpa da romã (*Punica granatum*, L.) foi avaliada utilizando-se o modelo de cultura de células, cuja linhagem escolhida foi a Caco-2, provenientes de um adenocarcinoma do cólon. O extrato hidroalcoólico da polpa apresentou um conteúdo de 832 µg equivalente de ácido gálico.mL<sup>-1</sup> de extrato e sua atividade antioxidante mostrou valores de 5,9% (0,1 ppm) a 93,09% (8 ppm) de capacidade de redução do radical DPPH<sup>•</sup>. As células tratadas com o extrato apresentaram uma inibição de crescimento celular de 4,16% (200 ppm), e a absorção dos compostos antioxidantes foi de 63,25%. Para o ácido gálico, os resultados mostraram uma inibição de 2,98% (400 ppm) e uma absorção de 72,54% dos compostos antioxidantes. Os resultados mostraram que o método de avaliação de absorção através de cultura de células foi eficaz, e que os compostos antioxidantes foram absorvidos pelas células, que se apresentaram viáveis, após um período de exposição prolongado aos compostos.

**Palavras-chave:** romã; extrato hidroalcoólico; ácido gálico; compostos antioxidantes; caco-2.

### Abstract

The absorption of antioxidant compounds present in hydroalcoholic extract of pomegranate pulp (*Punica granatum*, L.) was evaluated by a cell culture model, using the Caco-2 cells (from an adenocarcinoma of the colon). The hydroalcoholic extract of the pulp showed a content of reducing compounds of approximately 832 µg equivalent to gallic acid.mL<sup>-1</sup> of the extract and its antioxidant activity was from 5.9% (0.1 ppm) to 93.09% (8 ppm), measured by the capacity of reducing the DPPH<sup>•</sup> radical. The cells that were treated with the extract showed a 4.16% of growing inhibition (at a concentration of 200 ppm), and an absorption of the antioxidants compounds of approximately 63.25%. The gallic acid showed, at 400 ppm of concentration, a growing inhibition of 2.98% and an absorption of 72.54% of the antioxidant compounds. These results pointed out that the method of evaluating the absorption by using cell culture was effective, and the antioxidant compounds were absorbed by the cells, which were viable after a long period of exposure to the compounds.

**Keywords:** pomegranate; hydroalcoholic extract; gallic acid; antioxidants compounds; caco-2.

## 1 Introdução

O método de cultura de células representa uma importante contribuição para estudos de absorção, metabolismo ou toxicidade, de diferentes substâncias (TROTTER e STORCH<sup>16</sup>; DE ANGELIS et al.<sup>4</sup> e DURING e HARRISON<sup>5</sup>). As células Caco-2 são bastante requeridas para estudos de absorção, pois a linhagem é originária do epitélio do cólon humano e exibe características estruturais e funcionais in vitro muito próximas às do epitélio normal (PINTO et al.<sup>12</sup> e VAN BEERS et al.<sup>17</sup>).

As substâncias antioxidantes, exemplificadas aqui pelos compostos fenólicos, em especial da romã (*Punica granatum*, L.), constituem uma classe cujos benefícios à saúde são descritos na literatura, na prevenção de doenças cardíacas (AVIRAM et al.<sup>1</sup> e AVIRAM e DORNFELD<sup>2</sup>) e do câncer de próstata (MALIK et al.<sup>9</sup>). Apesar dos resultados positivos relatados, a biodisponibilidade dos compostos fenólicos ainda é pouco elucidada, sendo o seu conhecimento necessário para a avaliação de sua atividade biológica nos órgãos e tecidos. Sabe-se que nem todos compostos fenólicos são absorvidos com a mesma eficácia, sendo que alguns necessitam ser extensivamente metabolizados

por enzimas hepáticas e intestinais, e também pela microflora intestinal (MANACH et al.<sup>10</sup>).

Com o objetivo de verificar se os compostos antioxidantes presentes no extrato hidroalcoólico da polpa da romã são absorvidos pelas células e se apresentariam uma ação benéfica sobre elas, o presente trabalho foi executado utilizando as células Caco-2.

## 2 Material e métodos

As romãs foram abertas e seu conteúdo interno foi retirado. A polpa (parte rósea) foi separada das sementes e coletada na forma de suco, que foi liofilizado e mantido sob congelamento (-20 °C). A partir da polpa liofilizada, foi obtido o extrato hidroalcoólico (80%), na proporção de 1:5 (massa/volume), a seguir o material foi agitado (1 hora) e filtrado em funil de Büchner. O material a ser colocado na cultura de células teve o solvente eliminado em rotaevaporador (40 °C) e ressuspenso em PBS, seguido de filtração em membrana de poro 45 µm.

Conteúdo de compostos fenólicos totais: As concentrações foram ajustadas pelo conteúdo de compostos fenólicos presentes no extrato, que foi realizado empregando-se o reagente de Folin-Ciocalteu (SINGLETON, ORTHOFER e LAMUELA-RAVENTÓS<sup>15</sup>). Foi utilizado o ácido gálico para obtenção da curva padrão e o resultado foi expresso em µg equivalente de ácido gálico.mL<sup>-1</sup> da amostra.

<sup>1</sup> Laboratório de Lípidos, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo – USP, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 14, Butantã, CEP 05508-900, São Paulo - SP, Brasil, E-mail: f\_archilla@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Laboratório de Virologia, Instituto Butantan, Av. Vital Brasil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo - SP, Brasil

\*A quem a correspondência deve ser enviada

Atividade antioxidante método DPPH: A atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da polpa da romã foi avaliada pela sua capacidade em reduzir o radical DPPH<sup>•</sup> (1,1- diphenyl- 2-picryl- hydrazy), segundo o método original de BLOIS (1958). Em tubos de ensaio, foram adicionados 1,5 mL da solução metanólica do radical DPPH<sup>•</sup> (concentração de  $6 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>) e, em seguida, 0,5 mL do extrato. O extrato foi testado nas concentrações de 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; e 8,0 ppm, e os resultados expressos em porcentagem de redução do radical DPPH<sup>•</sup>.

Cultura de células: As células da linhagem Caco-2 (número ATCC = HTB 37) foram cultivadas em meio de cultura DMEM com 1% de solução de aminoácidos não essenciais e 10% de soro fetal bovino (SFB), mantidas em estufa (37 °C). As células, após atingirem confluência de 80%, foram descoladas (solução tripsina 0,25%) e o *pellet* celular submetido à contagem em hemacitômetro, utilizando-se corante azul de Trypan a 0,5%, na proporção de 1:5 (amostra: corante). O *pellet* foi então ressuspensão e realizou-se um novo cultivo em placas de 24 cavidades, estabelecendo-se o valor de  $5 \times 10^5$  células/cavidade. As placas permaneceram em estufa (37 °C) durante 7 dias.

Absorção de compostos antioxidantes através de cultura de células: O ensaio da atividade antioxidante foi realizado baseado no trabalho de LIU, GLAHN e LIU<sup>8</sup>. Ao sétimo dia, o meio de cultura foi removido das cavidades das placas e foi adicionado novo meio. As cavidades foram separadas em três grupos que receberam diferentes amostras: a) extrato hidroalcoólico da romã; b) solução de ácido gálico (padrão de comparação positivo); e c) PBS (padrão de comparação negativo), nas concentrações de 100, 200 e 400 ppm, no volume fixo de 0,5 mL. O material foi mantido em estufa durante 10 dias. Ao término, as células foram descoladas com tripsina e ressuspensas em PBS, sendo centrifugadas (1000 rpm/minuto) durante 10 minutos, para as análises subsequentes.

Teste de viabilidade celular: As células foram contadas em hemacitômetro utilizando-se o corante azul de Trypan e calculando-se a porcentagem de células viáveis após o tratamento.

Avaliação dos compostos redutores nas células: Os ependorfes contendo as suspensões de células foram submetidos a aparelho ultrasonicador, para rompimento da membrana celular. Em seguida, foi realizado o teste de conteúdo de compostos fenólicos totais, como já citado anteriormente.

Análise estatística: Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo os resultados expressos em média  $\pm$  desvio-padrão. As análises de variância (valor fixado = 5%) foram realizadas pelo método ANOVA *one way* e teste *t-Student*, utilizando-se o programa GraphPad Prism<sup>®</sup> versão 3.02

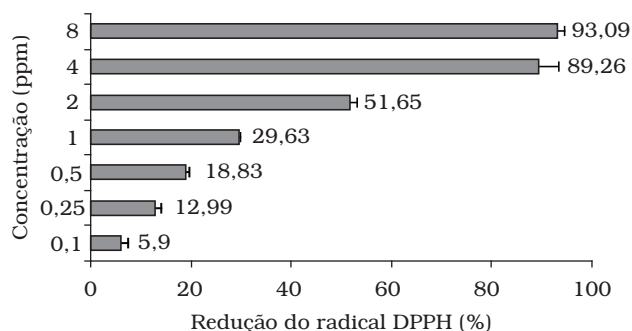
### 3 Resultados e discussão

#### 3.1 Conteúdos de compostos fenólicos e atividade antioxidante

A atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da polpa da romã mostrou que, em baixas concentrações, este apresentou grande capacidade na redução do radical DPPH<sup>•</sup>. A concen-

tração máxima testada (8 ppm) apresentou uma porcentagem redutora de 93,09 ( $\pm 1,42$ ) sobre o radical. (Figura 1)

Observando-se os resultados obtidos na contagem realizada após a adição das amostras (Tabela 1), verificamos que as células que receberam o extrato hidroalcoólico da polpa da romã apresentaram diferença significativamente menor na porcentagem de inibição do crescimento das células em relação ao grupo controle. Para o grupo tratado com o ácido gálico, a inibição do crescimento celular foi tanto maior quanto o aumento da concentração testada. Estes dados indicam que os compostos testados não apresentaram toxicidade às células.



**Figura 1.** Gráfico da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da polpa da romã. Os resultados foram expressos em porcentagem de capacidade redutora do radical DPPH<sup>•</sup>.

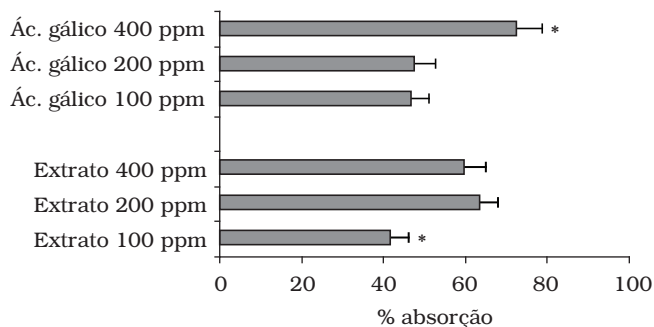
**Tabela 1.** Valores relativos à inibição do desenvolvimento celular, após o tratamento do extrato hidroalcoólico da romã e do ácido gálico, em comparação às células sem tratamento.

Amostra	cel.mL <sup>-1</sup>	% de inibição do crescimento
Extrato 100 ppm	$3,25 \times 10^4$	$6,5 \pm 0,44^a$
Extrato 200 ppm	$2,08 \times 10^4$	$4,16 \pm 1,53^a$
Extrato 400 ppm	$2,33 \times 10^4$	$4,66 \pm 1,38^a$
Ác. gálico 100 ppm	$2,12 \times 10^4$	$4,24 \pm 3,55^a$
Ác. gálico 200 ppm	$2,54 \times 10^4$	$5,08 \pm 2,42^a$
Ác. gálico 400 ppm	$1,49 \times 10^4$	$2,98 \pm 0,90^a$
Controle (PBS)	$8,83 \times 10^4$	$17,66 \pm 5,75$

Média  $\pm$  desvio-padrão; teste *t-Student*; e <sup>a</sup>amostra difere estatisticamente ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (PBS).

O principal ácido fenólico encontrado na polpa da romã é o ácido gálico, razão pela qual foi escolhido como padrão positivo de comparação. O ácido gálico apresentou importante ação sobre o ciclo celular (SALUCCI et al.<sup>13</sup>). As células Caco-2, tratadas com 100  $\mu$ M de ácido gálico e viáveis após o tratamento, estariam mais presentes na fase G2/M e menor na fase G1, ocorrendo conseqüentemente uma diminuição no crescimento celular. SEERAM et al.<sup>14</sup> observaram que, após 24 horas de tratamento com o suco da romã ou frações purificadas de elagiotaninos e do ácido elágico, células de outras linhagens também provenientes de tumores do cólon (HT 29 e HC T116) apresentaram apoptose celular. Tanto a capacidade de diminuição do ciclo celular quanto a apoptose são eventos importantes para a proteção das células contra a carcinogênese.

Os resultados obtidos no ensaio de compostos redutores totais, expostos na Figura 2, mostraram que o ácido gálico na concentração de 400 ppm apresentou maior absorção (72,54%)



**Figura 2.** Gráfico de porcentagem de absorção dos compostos antioxidantes, medido através do ensaio de compostos redutores totais. \*amostras apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre si (teste ANOVA *one-way*).

e que nas concentrações de 100 e 200 ppm não houve diferença significativa (46,8 e 47,31%, respectivamente). Já para as células tratadas com o extrato, houve uma menor absorção dos compostos antioxidantes. O extrato, nas concentrações de 200 e 400 ppm, apresentaram as respectivas porcentagens de absorção de 63,25 e 59,12% e, na concentração de 100 ppm, a absorção foi de 41,52%.

Estudos realizados com compostos antioxidantes sobre as células Caco-2 mostraram resultados positivos em relação à sua absorção. A presença dos carotenóides luteína,  $\alpha$ - e  $\beta$ -carotenos e licopeno, extraídos de alimentos fonte (espinafre, cenoura e tomate) foi detectada por HPLC em células submetidas ao tratamento com eles, após um período de 6 horas, como verificado por GARRET, FAILLA E SARAMA<sup>6</sup>. Entretanto, não foi verificada, após este período, uma efetiva proteção sobre as células em relação ao grupo controle, através da medida de viabilidade celular (95,1% para o grupo tratado e 95,5% para o grupo controle), realizando-se o teste com o corante azul de Trypan. LIU, GLAHN E LIU<sup>8</sup> analisaram a absorção também de carotenóides (luteína, zeaxantina e  $\beta$ -caroteno) durante um período de 1 a 12 horas de exposição das células ao tratamento com os compostos na forma purificada ou de carotenóides extraídos dos alimentos após um tratamento digestório *in vitro*. Foi observado que, em ambas as formas de carotenóides analisadas, a absorção iniciou após 1 hora e que níveis estáveis de absorção foram alcançados após 4 horas.

#### 4 Conclusão

Frente aos resultados obtidos e aqui apresentados, conclui-se que o extrato hidroalcoólico da polpa da romã apresenta boa atividade antioxidante *in vitro*, e que as células Caco-2 tratadas com este extrato apresentaram baixa inibição do crescimento durante um período de exposição prolongado. Ainda, conclui-se que tanto os compostos do extrato quanto o ácido gálico foram absorvidos pelas células. O método de cultura celular apresenta boa alternativa para estudos de absorção de compostos fenólicos, em relação aos testes utilizando-se animais.

#### Agradecimentos

À CAPES (concessão de bolsa e suporte ao projeto), ao CNPq e à FAPESP (suporte ao projeto).

#### Referências bibliográficas

1. AVIRAM, M.; DORNFELD, L.; ROSEMBLAT, M.; VOLKOVA, N.; KAPLAN, M.; COLEMAN, R.; HAYEK, T.; PRESSER, D.; FUHRMAN, B. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 71, p. 1062-1076, 2000.
2. AVIRAM, M.; DORNFELD, L. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. **Atherosclerosis**. v. 158, p. 195-198, 2001.
3. BLOIS, M. S. Antioxidants determinations by the use of a stable free radical. **Nature**. v. 181, n. 26, p. 1199-1200, 1958.
4. DE ANGELIS, I.; HOOGENBOON, L.A. P.; HUVENEERS-OORSRONG, M.B.M.; ZUCCOT, F.; STAMMATI, A. Established cell lines for safety assessment of food contaminants: differing furazolidone toxicity to V79, Hep-2 and Caco-2 cells. **Food Chemistry and Toxicology**. v. 32, n.5, p. 481-488, 1994.
5. DURING, A.; HARRISON, E. H. Intestinal absorption and metabolism of carotenoids: insights from cell culture. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 430, p. 77-88, 2004.
6. GARRET, D. A.; FAILLA, M. L.; SARAMA, R. J. Estimation of carotenoid bioavailability from fresh stir-fried vegetables using an *in vitro* digestion/Caco-2 cell culture model. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 11, p. 574-580, 2000.
7. LI, Y.; GUO, C.; YANG, J.; WEI, J.; XU, J.; CHENG, S. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. **Food Chemistry**. v. 96, p. 254-260, 2006.
8. LIU, C. S.; GLAHN, R. P.; LIU, R. H. Assessment of carotenoid bioavailability of whole foods using a Caco-2 cell culture model coupled with *in vitro* digestion. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v. 52, p. 4330-4337, 2004.
9. MALIK, A.; AFAQ, F.; SARFARAZ, S.; ADHAMI, V. M.; SYED, D. N.; MUKHTAR, H. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. **PNAS**. v. 102, n. 41, p. 14813-14818, 2005.
10. MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 79, p. 727-747, 2004.
11. PELLEGRINA, C. D.; PADOVANI, G.; MAINENTE, F.; ZOCCATELLI, G.; BISSOLI, G.; MOSCONI, S.; VENERI, G.; PERUFFO, A.; ANDRIGHETO, G.; RIZZI, C.; CHIGNOLA, R. Anti-tumour potential of a gallic acid-containing phenolic fraction from *Oenothera biennis*. **Cancer Letters**. v. 226, p. 17-25, 2005.
12. PINTO, M.; ROBINE-LEON, S.; APPAY, M. D.; KEDINGER, M.; TRIADOU, N.; DUSSAULX, E.; LACROIX, B.; SIMON-ASSMAN, P.; HAFEN, K.; FOGH, J.; ZWEIBAUM, A. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. **Biol. Cell**. v. 47, p. 323-330, 1983.
13. SALUCCI, M.; STIVALA, L. A.; MAIANI, G.; BUGIANESI, R.; VANNINI, V. Flavonoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cells (Caco 2). **British Journal of Cancer**. v. 86, p. 1645-1651, 2002.
14. SEERAM, N. P.; ADAMS, L. S.; HENNING, S. M.; NIU, Y.; ZHANG, Y.; NAIR, M. G.; HEBER, D. *In vitro* antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with

- other polyphenols as found in pomegranate juice. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 16, p. 360-367, 2005.
15. SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. In: *Methods in Enzymology Vol.299: Oxidants and Antioxidants Part A* (L. Packer, ed.), p. 152-178, **Academic Press**, New York, 1999
  16. TROTTER, P. J.; STORCH, J. Fatty acid esterification during differentiation of the human intestinal cell line Caco-2. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 268, n.14, P. 10017-10023, 1993.
  17. VAN BEERS., E. H.; AL, R. H.; RINGS, E. H. H. M.; EINERHAND, A. H. C.; DEKKER, J.; BÜLLER, H. A. Lactase and sucrase-isomaltase gene expression during Caco-2 cell differentiation. **Biochemichal Journal**. v. 308, p. 769-775, 1995.