

*** Autor para correspondência:**

Ricardo Ribeiro dos Santos
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
Fundação Oswaldo Cruz.
Rua Waldemar Falcão, 121 - Brotas
Salvador - BA - Brasil
CEP: 40295-001
Tel: (71) 356-4320 Ramal 260
Fax: (71) 356-4320 Ramal 292
E-mail: rrsantos@cpqgm.fiocruz.br

Atividade antioxidante de substâncias presentes em *Dioclea violacea* e *Erythroxylum nummularia*

Barreiros, A.L.B.S¹; Barreiros, M.L.¹; David, J.M.¹; David, J.P.²;
Queiroz, L.P. de³

¹Instituto de Química;

²Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, 40170-280, Salvador, BA, Brasil;

³Departamento de Ciências Biológicas - Universidade Estadual de Feira de Santana, 44031-460, Feira de Santana, BA, Brasil

Abstract

This work describes the evaluation of the antioxidant activity in the system b-carotene / linoleic acid and radical scavenging effects of the substances 2',4'-dihydroxychalcone, 2',3,4,4'-tetrahydroxychalcone (butein), 4-methoxy-2',3,4'-trihydroxychalcone, 7-hydroxyflavanone, 3',4',7-trihydroxyflavanone (butin), 7,4'-dihydroxyflavanone (liquiritigenin), 6-methoxy-7-hydroxydihydroflavonol and lasiodiplodin isolated of the extract CHCl₃ of the stem of *Dioclea violacea* and 3',4',5,7-tetrahydroxyflavanol (quercetin), 4',7-dimethoxy-3',5-dihydroxyflavanol and epicatechin isolated of the *Erythroxylum nummularia* leaves. These compounds were evaluated and compared with the antioxidant standards n-propyl gallate, BHT and α -tocopherol.

As substâncias antioxidantes estão envolvidas na prevenção do desenvolvimento de várias patologias relacionadas ao *stress oxidativo*, dentre elas o câncer, doenças cardiovasculares, além de seu papel em retardar o envelhecimento das células¹. Os flavonóides em geral se destacam por sua atividade antioxidante, e é conhecida a relação desta atividade em função da estrutura^{2,3}.

O estado da Bahia registra a ocorrência de várias espécies das famílias Leguminosae e Erythroxilaceae, sendo muitas delas endêmicas. Até o presente momento apenas duas espécies do gênero *Dioclea* foram estudadas sob o ponto de vista químico e farmacológico: as raízes de *D. grandiflora*⁴, e o caule de *D.*

lasiophylla^{5,6} donde foram isolados flavonóides entre eles a diocleína, epigalocatequina-(2 β →7,4 β →8)-epicatequina e epicatequina-(2 β →7,4 β →8)-epicatequina que apresentam significativa atividade antioxidante. Investigação da composição química do gênero *Erythroxylum* indica a ocorrência de alcalóides, terpenos e flavonóides⁷. A presença dos flavonóides quercetina e kampeferol, bem como seus 3-glicosídeos são características quimiotaxionômicas desse gênero⁸. Nas espécies estudadas na Bahia tem sido comum a presença nas folhas de flavonóides e de ácidos graxos esterificado com triterpenos^{9,10}.

Neste trabalho são avaliadas as capacidades antioxidantes de substâncias isoladas de *D. violacea* e *E. numularia* comparadas com padrões comerciais galato de *n*-propila, BHT e α -tocoferol, utilizando dois métodos: autooxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico e seqüestro do radical DPPH. Os resultados obtidos no sistema β -caroteno/ácido linoléico indicam que a epicatequina (11) e a 3',4',7-triidroxiflavanona (butina) (5) apresentaram atividades consideráveis, similares e ligeiramente inferiores ao tocoferol. Contribui para a atividade apresentada o grupo catecol no anel B destes flavonóides. A 7-hidroxiflavanona (4) e o 6-metoxi-7-hidroxiidrofavonol (7) como esperado apresentaram baixa atividade antioxidante. Nenhuma das substâncias avaliadas nesse teste teve atividade próxima ao BHT ou galato de *n*-propila. Os resultados de avaliação das atividades antioxidantes utilizando-se o sistema β -caroteno/ácido linoléico encontram-se sistematizados na Figura 2.

De maneira similar, nos resultados obtidos no teste do seqüestro de radical utilizando-se DPPH a epicatequina (IC₅₀ = 171,68 mg/L) (11) demonstrou maior atividade, superando o BHT (IC₅₀ = 480,69 mg/L). A quercetina (IC₅₀ = 184,41 mg/L) (10), 2',3,4,4'-tetraidroxichalcona (buteína) (IC₅₀ = 279,49 mg/L) (2) e 3',4',7-triidroxiflavanona (butina) (IC₅₀ = 318,89 mg/L) (5) também apresentaram atividade considerável. A ligeira superioridade da buteína em relação a butina provavelmente deve-se a conjugação do anel B com a insaturação $\Delta^{2,3}$ da chalcona². A baixa atividade apresentada por 9 em relação a 10 pode ser explicada devido a presença das metoxilas que além de reduzir o número de hidroxilas fenólicas disponíveis para doar H radicalar para o radical, também dificultam a estabilização por ressonância do radical livre flavanoil formado. Os demais flavonóides 2',4'-diidroxichalcona (1), 4-metoxi-2',3,4'-triidroxichalcona (3), 7-hidroxiflavanona (4), 6-metoxi-7-hidroxiidrofavonol (7) e a lactona lasiodiplodina (8) não apresentaram atividade observável nas concentrações estudadas (Figura 3).

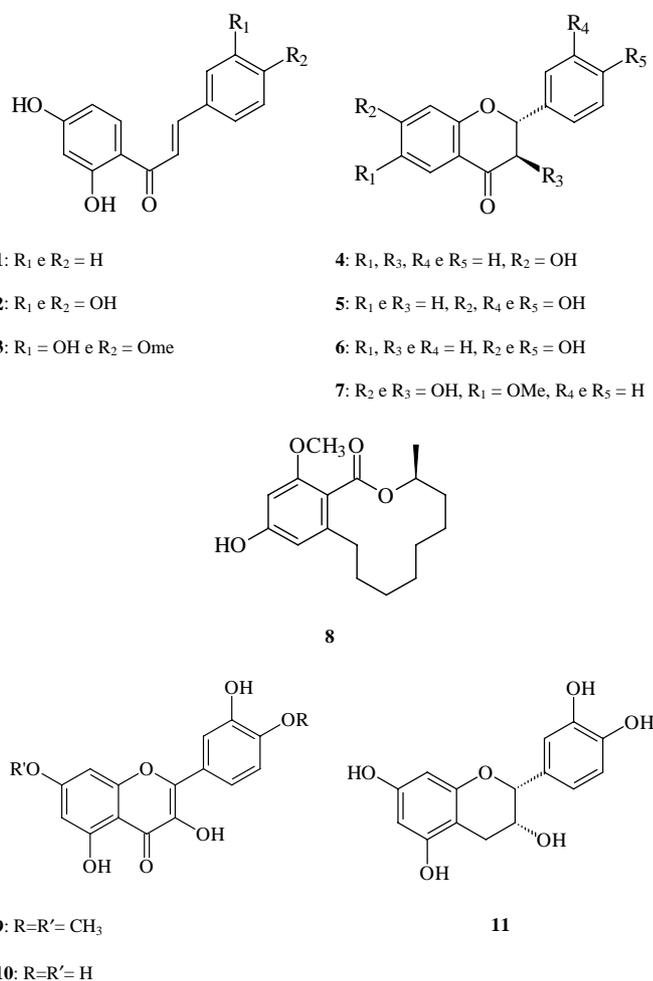


Figura 1. Substâncias isoladas de *Dioclea violacea*

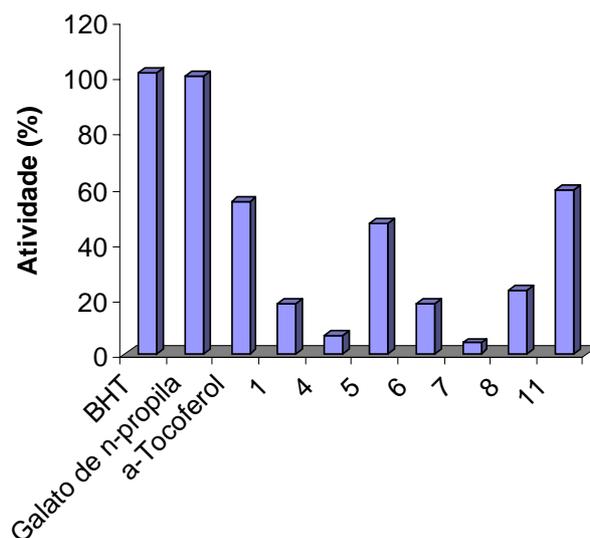


Figura 2. Atividade antioxidante pelo método da auto-oxidação do β -caroteno

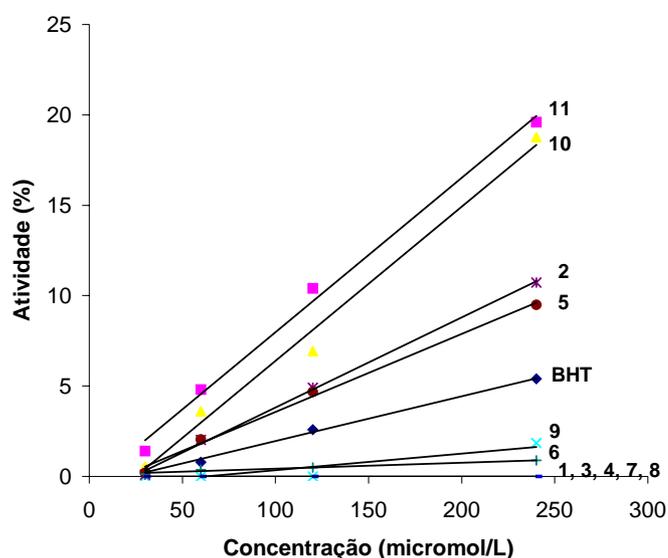


Figura 3. Atividade antioxidante pelo método do seqüestro do radical DPPH

Material e Métodos

Geral: Para a realização dos testes de atividade antioxidante foram utilizados padrões p.a. de galato de *n*-propila (Merk), BHT (Merk) e α -tocoferol isolado de *Moldenhawera nutans*, além dos reagentes ácido linoléico (Aldrich), DPPH (Aldrich) e pirogalol (Merk). As medidas foram feitas em espectrofotômetro Spectronic 20 Genesys.

Isolamento e identificação das substâncias a partir do material vegetal: O caule de *Dioclea violacea* Mart. foi coletado na caatinga da Bahia, seco, moído e em seguida submetido à maceração com MeOH. O extrato metanólico obtido (69,61g) foi então particionado entre hexano/MeOH:H₂O (9:1), CHCl₃/MeOH:H₂O (6:4), AcOEt/H₂O e BuOH/H₂O. O extrato clorofórmico (6,32g) foi submetido à CC sob sílica-gel 60 (Merk) e eluído com sistema CHCl₃/MeOH em ordem crescente de polaridade. A fração eluída em CHCl₃/MeOH 95:5, seguida de nova CC sob sílica-gel 60H (Merk) sob pressão de N₂ eluindo-se com hexano/AcOEt 8:2, forneceu as substâncias 2',4'-diidroxichalcona (1), 7-hidroxi-flavanona (4) e lasiodiplodina (8). O 6-metoxi-7-hidroxi-diflavonol (7) foi obtido a partir CC utilizando CHCl₃/MeOH 95:5, seguida de CE sob gel de Sephadex LH-20 eluindo com sistema CHCl₃/MeOH 1:1. A 4-metoxi-2',3,4'-triidroxichalcona (3) foi isolada a partir de CC eluída com CHCl₃/MeOH 9:1, e posteriormente nova CC sob sílica-gel 60H sob pressão de N₂ eluindo com sistema CHCl₃/AcOEt 9:1. A 4',7-diidroxiflavanona (liquiritigenina) (6) foi isolada através de CC eluída com

CHCl₃/MeOH 9:1, CC sob sílica-gel 60 usando CHCl₃/AcOEt e em seguida CCDP com sistema CHCl₃/AcOEt 8:2. As substâncias 2',3,4,4'-tetraidroxichalcona (buteína) (2) e a 3',4',7-triidroxiflavanona (butina) (5) foram obtidas através de CC eluída com CHCl₃/MeOH 8:2 e recristalização em MeOH, seguida de nova CC da água mãe sob sílica-gel 60 em CHCl₃/AcOEt 1:1, CE sob gel de Sephadex LH-20 em sistema CHCl₃/MeOH 4:6 e CCDP em sistema CHCl₃/AcOEt/AcOH 1:1:2gotas. As folhas de *Erythroxylum nummularia* Peyer. foram coletadas na Reserva do Campus da Universidade Estadual de Feira de Santana, e após secagem foram moídas e submetidas a maceração e partição seguindo procedimento idêntico a *Dioclea violacea*. A fase CHCl₃ (1,34 g) submetida a CC sob sílica gel 60 em sistema CHCl₃/MeOH. O 4',7-dimetil-3',5-diidroxiflavonol (9) foi isolado por CC eluída com CHCl₃ seguida de CE em gel de Sephadex LH-20 em sistema CH₂Cl₂/MeOH (1:1). As substâncias quecertina (10) e da epicatequina (11) foram isoladas da fase AcOEt submetida a CC sob sílica-gel 60 em sistema CHCl₃/MeOH (8:2), seguida de nova CC sob sílica-gel 60 em sistema CHCl₃/MeOH. Todas as estruturas foram identificadas através da análise dos dados de RMN ¹H, ¹³C (PND e DEPT), EMIE, UV e comparações com dados descritos na literatura.

Testes de atividade antioxidante: A metodologia utilizada no teste de atividade antioxidante foi adaptada daquela descrita por Hidalgo et al.¹¹. Este método de avaliação da atividade antioxidante é baseado na inibição da reação de auto-oxidação do β -caroteno, a qual é provocada pela adição de ácido linoléico e aeração do meio levando à formação de agente oxidante radicalar. A reação foi acompanhada por espectrofotometria no visível em $\lambda = 470$ nm, tendo sido utilizadas soluções 1mg/mL em MeOH tanto dos padrões quanto das substâncias testadas. Os padrões foram os antioxidantes comerciais: galato de *n*-propila e BHT e o α -tocoferol. A porcentagem de atividade foi calculada em relação ao galato de *n*-propila, considerando a atividade deste como 100%.

O segundo teste desenvolvido avalia a habilidade da substância testada de seqüestrar o radical livre relativamente estável DPPH (Difenilpicrilhidrazil)¹². Para sua realização foram preparadas uma solução de DPPH 45 μ g/mL e soluções com as substâncias testes e padrões em 4 concentrações diferentes (240, 120, 60 e 30 μ mol/L) em MeOH. Neste ensaio utilizou-se pirogalol (0,5% em MeOH) como substância referência com poder de seqüestrar 100% dos radicais. As atividades antioxidantes das substâncias testadas foram comparadas com aquelas dos padrões galato de *n*-propila, BHT e

α -tocoferol, e o declínio da concentração do radical foi monitorado por espectrofotometria no visível em $\lambda = 517$ nm, após 15 min.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao CNPq e CAPES pelo suporte financeiro e bolsas.

Referências

- ¹Ho, C.T.; Ferraro, T.; Chen, Q.; Hosen, R.T.; Huang, M.T. Em *Phytochemicals in Teas and Rosemary and their Cancer-Preventive Properties in: Food Phytochemicals for Cancer Prevention II*. Ho, C.T.; Osawa, T.; Huang, M.T.; Hosen, R.T. American Chemical Society: Washington Dc, 1994.
- ²Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. *Free Radical Biology & Medicine*, v.20, p.933-956, 1996.
- ³Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. *Trends in Plant Science*, v.2, p.152-159, 1997.
- ⁴Bhattacharya J.; Majetich G.; Jenkins T.M.; Almida R.N. *Journal of Natural Products*, v.61, p.413-414, 1998.
- ⁵Barreiros, A.L.B.S.; David, J.P.; Queiroz, L.P.; David, J.M. *Phytochemistry*, v.55, p.805-808, 2000.
- ⁶David, J.P.; dos Santos, E.O.; Miranda, M.S.; Barreiros, A.L.B.S.; dos Santos, I.D.; David, J.M. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.12, Supl., p.5-6, 2002.
- ⁷Hegnauer, R. *Journal of Ethnopharmacology*, v.3, p.279-292, 1981.
- ⁸Inigo, R.P.A.; Pomilio, A.B. *Phytochemistry*, v.24, p.347-349, 1985.
- ⁹Chávez, J.P.; Dos Santos, I.D.; Cruz, F.G.; David, J.M. *Phytochemistry*, v.41, p.941-943, 1996.
- ¹⁰Barreiros, M.L.; David, J.M.; Pereira, P.A.; Guedes, M.L.S.; David, J.P. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.13, p.669-673, 2002.
- ¹¹Hidalgo, M.E.; Fernández, E.; Quilhot, W.; Lissi, E. *Phytochemistry*, v.37, p.1585-1587, 1994.
- ¹²Malterud, K.E.; Farbrot, T.L.; Huse, A.E.; Sund, R.B. *Pharmacology*, v.47, p.77-85, 1993.

Avaliação da atividade imunológica de *Achillea millefolium* L. ("mil-folhas")

Lopes, F.C.M.¹, Placeres, M.P.¹, Moreira, R.R.D.^{2*}, Santos, L.E. dos², Carlos, I.Z.¹

¹Departamento de Análises Clínicas, UNESP-Araraquara, SP, Brasil

²Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, 14801-902, Araraquara, SP, Brasil

Resumo

Macrófagos são as primeiras células a participarem da resposta imunológica, e quando são ativados liberam mais de cem compostos ao meio extracelular, entre os compostos reativos intermediários de nitrogênio (NO). Neste trabalho determinou-se a liberação de óxido nítrico em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos em presença de óleo essencial bruto e extrato etanólico 70% bruto obtidos a partir de folhas de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). Diferentes diluições do óleo essencial foram testadas (1:50, 1:100 e 1:200). Apenas a diluição 1:100 produziu uma maior quantidade de óxido nítrico (NO). Em relação ao extrato etanólico 70%, observou-se nas amostras mais concentradas (6 mg/mL, 8 mg/mL e 10 mg/mL) maior produção de NO. Analisando-se os resultados obtidos no presente trabalho, pode-se sugerir que tanto o óleo essencial quanto o extrato etanólico 70% bruto de *A. millefolium* L são agentes moduladores da ativação de macrófagos, nas concentrações de 20, 10 e 5 mg/mL, quando comparado com LPS (lipopolissacarídeo-potente estimulador da produção de NO).

Atualmente, uma variedade de materiais derivados de plantas pertencendo a diferentes classes de princípios ativos têm sido relatados como sendo agentes imunoestimulantes, e muitos dizem respeito à