

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE *in vitro* DA
Alternanthera brasiliana

MARIANA MOREIRA FIGUEIRA

VILA VELHA
MARÇO/ 2019

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE *in vitro* DA
Alternanthera brasiliana

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

MARIANA MOREIRA FIGUEIRA

VILA VELHA
MARÇO/ 2019

MARIANA MOREIRA FIGUEIRA

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE *in vitro* DA
*Alternanthera brasiliana***

Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha, como pré-
requisito do Programa de Pós-
graduação em Ciências
Farmacêuticas, para a obtenção do
grau de Mestra em Ciências
Farmacêuticas.

Aprovada em 29 de março de 2019,

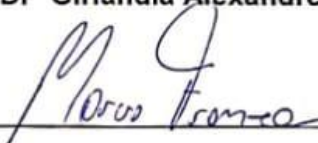
Banca Examinadora:



Prof^o Dr. Thiago Antônio Moretti de Andrade – FHO|UNIARARAS



Prof^a Dr^a Girândia Alexandre Brasil – UVV



Prof^o Dr. Marcio Fronza – UVV

Orientador

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

M835a Figueira, Mariana Moreira.
Atividade anti-inflamatória e antioxidante in vitro da
Alternanthera brasiliana / Mariana Moreira Figueira. – 2019.
51 f. : il.

Orientador: Marcio Fronza.
Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Vila Velha, 2019.
Inclui bibliografias.

1. Farmacologia terapêutica. 2. Citocinas. 3. Antioxidante.
I. Fronza, Marcio. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615

“Confie no SENHOR
de todo o coração e não se
apoie na sua própria
inteligência. Lembre de Deus
em tudo o que fizer, e ele lhe
mostrará o caminho certo. ”
Pv 3.5-6.

AGRADECIMENTOS

Para se fazer pesquisa é necessário ajudar e receber ajuda, pois ninguém possui todo conhecimento. Com certeza essa fase de agradecimento, se faz importantíssima. Aquele que abriu as portas de oportunidades de estudos desde sempre foi Deus, certamente meus primeiros agradecimentos são a Ele.

Agradeço a minha mãe, avós, pai, tios, primos, pelo suporte, apoio, paciência, pelas orações e incentivo aos estudos.

E Deus acrescentou pessoas na minha vida que foram essenciais nessa jornada.

Meu querido professor Marcio Fronza, obrigada por abrir as portas do laboratório de cultura de células, quando eu ainda estava na iniciação científica, por me apresentar a pesquisa e me estimular a me manter nela. Obrigada por todos os ensinamentos, pela paciência, dedicação, mansidão e humildade. O senhor realmente fez jus ao seu papel de orientador, além de pai científico.

Obrigada aos meus amigos do laboratório de Cultura de Células que sempre me ajudaram, compartilharam conhecimentos, experimentos e lanches: Lorena, Aline, Marcio Guidoni, Thays, Racire, Trícia, Marcella, Carol, aos alunos de iniciação científica Hugo, Júlia, Flávia Porto, Iana, Isamara, Izabelle, Mariana e Tatiana.

Em especial a minhas amigas Nathacha, Mariane, Karla L., Flávia Pimentel, Ana Cláudia, pela ajuda, risos, paciência, companhia e ensinamentos.

Ao Felipe, minha dupla de TCC.

Aos muitos amigos que fiz pelos laboratórios do Biopráticas: Ariele, Leandra, Érica, Tainã, Débora, Mayara, Thiago, Dionísio, Karla C., Raiana, Gabriely, Prof João Damasceno, Clarisse, Luciano, Valter, Cláudia, Mara, André, Zenaide, todos contribuíram de alguma forma.

Lab. peixe, muito obrigada por compartilhar o espectrofotômetro, ele foi de essencial importância.

Ao LCQ pelos socorros.

Aos professores Rodrigo, Denise, Tadeu, Girândia e Dominik.

A Fran por ter me incentivado enquanto fui aluna de iniciação científica, você me ensinou muito.

Aos meus amigos Jean, Antônio, Lisandra, Geovany, Carneiro, Rhenyer, Rose Karla e Eduardo.

Aos amigos tri legais da UNIVATES, que me receberam em seu laboratório e me ajudaram com experimentos, e pelas análises feitas por Western blot, além de me apresentarem o chimarrão. Em especial Prof Marcia, Taiane e Diorge.

Ao professor Thiago Barth da UFRJ, por ter feito a análise fitoquímica.

Aos professores Thiago Andrade (UNIARARAS) e Girlândia Brasil por aceitarem fazer parte da banca e contribuírem com esta pesquisa.

À UVV e todos os professores e funcionários do PPGCF e biopráticas; à CAPES, FAPES.

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	13
RESUMO	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. MATERIAL DE MÉTODOS	20
2.1 Reagentes químicos e bioquímicos.....	20
2.2 Linhagens celulares.....	20
2.3 Coleta e identificação do material vegetal.....	21
2.4 Obtenção dos extratos.....	21
2.5 Determinação de polifenóis, flavonoides totais e taninos.....	21
2.6 Atividade antioxidante dos extratos.....	21
2.7 Análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – com detector de arranjo de diodo e analisador quadropolo Q-Trap.....	22
2.8 Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i>	22
2.9. Atividade anti-inflamatório dos extratos.....	23
2.9.1. Determinação indireta de óxido nítrico <i>in vitro</i>	23
2.9.2 Redução da produção do ânion superóxido.....	23
2.9.3 Efeito preventivo do dano oxidativo em RAW 264.7 causado por H ₂ O ₂	24
2.9.4 Determinação de citocinas <i>in vitro</i>	24
2.9.5 Determinação da atividade do fator nuclear kappa B.....	24
2.9.6 Determinação da expressão da Proteína Quinase Ativada por Mitógeno p38 (p38 MAPK) por Western blot.....	25
2.9 Análise estatística dos dados.....	26
3. RESULTADOS	27
3.1 Determinação de flavonoides totais, polifenóis totais e taninos.....	27
3.2 Determinação da atividade antioxidante.....	28
3.3 Identificação dos compostos majoritários nos extratos EAAB e EE70AB por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – com detector de arranjo de diodo e analisador quadropolo Q-Trap.....	28
3.4. Avaliação de citotoxicidade <i>in vitro</i>	30
3.5 Métodos <i>in vitro</i> para determinação da atividade antioxidante.....	30
3.5.1 Redução da produção do ânion superóxido (O ₂ ⁻)	30
3.5.2 Efeito preventivo do dano oxidativo em RAW 264.7 provocado por H ₂ O ₂	31
3.6 Determinação da atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i>	32
3.6.1 Determinação de óxido nítrico <i>in vitro</i>	32
3.6.2 Determinação de citocinas <i>in vitro</i>	33
3.6.3 Determinação da atividade do fator nuclear kappa B.....	34
3.6.4 Determinação da p-p38/p38 MAPK.....	34
4. DISCUSSÃO	36
5. CONCLUSÕES	39
6. REFERÊNCIAS*	41

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS - Ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico)

AG - Ácido Gálico

AKT - Proteína quinase B (PKB)

ANOVA - Análise de Variância Multifatorial

AP-1 - Proteína ativadora -1

ATCC - American Type Culture Collection

BCRJ - Banco de células do Rio de Janeiro

CAT - Catalase

COX-2 – Ciclo-Oxigenase 2

DMEM - Dulbecco's modification of Eagle medium

DMSO - Dimetilsulfóxido

DP - Desvio Padrão

DPPH - 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

EAAB - Extrato aquoso *Alternanthera brasiliana*

EAG - Equivalente de Ácido Gálico

EE70AB - Extrato Etanol 70% *Alternanthera brasiliana*

EEAB - Extrato Etanólico *Alternanthera brasiliana*

EHAB - Extrato Hexânico *Alternanthera brasiliana*

ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

EPM - Erro Padrão da Média

EQ - Equivalente de Quercetina

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

FRAP - Potencial Antioxidante Redutor Férrico

GNPS - Global Natural Products Social Molecular Networking

GSH - Glutathione reductase

IC₅₀ - Concentração Inibitória 50%

IL - Interleucina

iNOS - Óxido Nítrico Sintase Induzível

IR₅₀ - Redução Inibitória 50%

KOH - Hidróxido de Potássio

LC-DAD- QTRAP– Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – com detector de arranjo de diodo e analisador quadropolo Q-Trap

L-NAME - N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride

L-NIL - L-N ϵ -(1-Iminoethyl) lysine dihydrochloride

LPS - Lipopolissacarídeo

MAPK - Proteína-quinases ativadas por mitógenos

MDA - Malondialdeído

mg/g - miligrama por grama

MTT - (3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

NBT - tetrazolium nitroblue chloride

NF- κ B - Fator Nuclear kappa B

nm - nanômetros

NO - Óxido Nítrico

OMS – Organização Mundial da Saúde

PGE₂ - Prostaglandina E₂

ps – peso seco

SFB - Soro Fetal Bovino

SOD - Superóxido Desmutase

TCA - Ácido Tricloroacético

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral- α

TPCK - Clorometil cetona de n-tosyl-l-fenilalanina

μg - microgramas

ng - nanogramas

μM - micromolar

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantificação de polifenóis totais, flavonoides totais e taninos nos extratos das folhas da <i>A. brasiliana</i>	17
Tabela 2. Atividade antioxidante do extrato aquoso, hexânico, hidroetanólico e etanólico das folhas de <i>A. brasiliana</i>	18

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cromatograma típico do Extrato aquoso das folhas da <i>A. brasiliiana</i> a 254 nm.....	13
Figura 2. Cromatograma típico do Extrato etanólico 70% das folhas da <i>A. brasiliiana</i> a 254 nm.....	13
Figura 3. Efeito dos extratos das folhas (EAAB: extrato aquoso, EHAB: extrato hexânico, EE70AB: extrato 70% etanólico, EEAB: extrato 100% etanólico) da <i>A. brasiliiana</i> na produção do ânion superóxido em macrófagos estimulados com LPS.....	15
Figura 4. Efeito dos extratos das folhas (EAAB: extrato aquoso, EHAB: extrato hexânico, EE70AB: extrato 70% etanólico, EEAB: extrato 100% etanólico) da <i>A. brasiliiana</i> na produção de óxido nítrico em macrófagos estimulados com LPS.....	16
Figura 5. Efeito dos extratos das folhas (EAAB: extrato aquoso, EHAB: extrato hexânico, EE70AB: extrato 70% etanólico, EEAB: extrato 100% etanólico) de <i>A. brasiliiana</i> na produção de TNF- α (A) e IL-6 (B) em macrófagos estimulados com LPS.....	18
Figura 6. Efeito dos extratos das folhas (EAAB: extrato aquoso, EHAB: extrato hexânico, EE70AB: extrato 70% etanólico, EEAB: extrato 100% etanólico) de <i>A. brasiliiana</i> em sobre a atividade do NF- κ B em cultura de células embrionárias renal humanas 293 HEK.....	19
Figura 7. Efeito dos extratos das folhas (EAAB: extrato aquoso, EHAB: extrato hexânico, EE70AB: extrato 70% etanólico, EEAB: extrato 100% etanólico) de <i>A. brasiliiana</i> sobre a expressão da p-p38 e p38 MAPK em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS.....	20

RESUMO

Figueira, Mariana Moreira, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, março de 2019.

Atividade anti-inflamatória e antioxidante *in vitro* da *Alternanthera brasiliana*.

Orientador: Marcio Fronza.

Este estudo teve como objetivo analisar as características fitoquímicas e investigar o potencial farmacoterapêutico das folhas da *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) relacionado as atividades antioxidante e anti-inflamatória empregando métodos químicos e bioensaios *in vitro* em cultura de células. Extratos das folhas foram preparados em ultrassom empregando hexano (EHAB), água (EAAB), etanol 70% (EE70AB) e 100% (EEAB), separadamente. O teor de polifenóis totais e flavonóides foram determinados pelo método do Folin-Ciocalteu e após reação com cloreto de alumínio, respectivamente. Os principais metabólitos secundários presentes nos extratos foram identificados em espectrômetro de massas íon trap linear (Q-Trap). A atividade antioxidante foi investigada pelos métodos químicos do sequestro do radical DPPH, ABTS e redução do ferro (FRAP), e por métodos *in vitro* de inibição da produção do ânion superóxido e efeito preventivo contra danos causados pelo peróxido de hidrogênio em cultura de macrófagos. O efeito citotóxico foi avaliado pelo método colorimétrico do MTT. As atividades anti-inflamatória e imunomoduladora foram avaliadas *in vitro* quanto à influência dos extratos sobre a produção de óxido nítrico (NO), por meio da dosagem indireta de nitrito pelo método de Griess *in vitro* na cultura de macrófagos estimulados com LPS, pela quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias como o TNF- α , IL-6 e IL-10 pela técnica de ELISA. Além disso, foi determinado a atividade do Fator de Transcrição Nuclear kappa B (NF- κ B) pela expressão de luciferase e através da expressão da Proteína Quinase Ativada por Mitógeno p38 (p38MAPK) por Western Blot. Os compostos majoritários identificados nos EAAB e EE70AB das folhas da *A. brasiliana* foram os flavonóides C-hexosil-luteolina O-hexosídeo, Hexanosídeo de (iso) vitexina, Isovitexina, Vitexina-2''-O-rhamnosídeo e Hesperedina. O EAAB apresentou maior ação antioxidante com valores de IR₅₀ para o ABTS e DPPH de 42,1 \pm 0,9 e 74,0 \pm 10,9 μ g/mL respectivamente; e o EE70AB apresentou o menor IR₅₀ no ensaio do FRAP (6,5 \pm 0,7 μ g/mL). O EE70AB apresentou maior inibição da produção de NO (IC₅₀ de 127,3 \pm 8,7 μ g/mL) em macrófagos estimulados por LPS, e em conjunto, também apresentou resultados significativos na inibição da produção do ânion superóxido (60,3 \pm 1,2%, 50 μ g/mL). O EAAB, EE70AB e EEAB demonstraram inibição significativa da citocina TNF- α em 32,6 \pm 1,9 %, 33,0 \pm 1,9 % e 66,1 \pm 2,4 %, respectivamente, na concentração de 10 μ g/mL. O ácido gálico utilizado como controle positivo obteve inibição de 21,5 \pm 2,8 %, na mesma concentração dos extratos. Na inibição de IL-6, o EE70AB e EEAB demonstraram inibição significativa da citocina em 62,6 \pm 5,0 % e 77,2 \pm 4,9 %, respectivamente, na concentração de 10 μ g/mL, também apresentando inibição mais potente do que o ácido gálico de 34,4 \pm 1,2 % na mesma concentração. Todos os extratos testados (20 μ g/mL) apresentaram de 30 a 35% de inibição sobre a atividade do NF- κ B e nenhum efeito significativo sobre a atividade de p38 MAPK. Os resultados obtidos com os extratos das folhas da *A. brasiliana* sugerem que a planta possui promissoras atividades bioativas, atuando no controle de radicais livres, estresse oxidativo e inibindo importantes mediadores inflamatórios.

Palavras chaves: Citocinas, inflamação, antioxidante, NF- κ B.

ABSTRACT

Figueira, Mariana Moreira, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, march / 2019. **In vitro anti-inflammatory and antioxidant activities of *Alternanthera brasiliana*.** Orientador: Marcio Fronza.

This study aimed to analyze the phytochemical characteristics and to investigate the pharmacotherapeutic potential of the leaves of *Alternanthera brasiliana* (Amaranthace) related to the antioxidant and anti-inflammatory activities using chemical methods and in vitro bioassays in cell culture. Leaf extracts were prepared using ultrasonic assisted maceration with hexane (EHAB), water (EAAB), 70% ethanol (EE70AB) and 100% ethanol (EEAB). The total polyphenols and flavonoids content were determined by the Folin-Ciocalteu method and after reaction with aluminum chloride, respectively. The main secondary metabolites present in the extracts were identified in a linear trap ion mass spectrometer (Q-Trap). The antioxidant activity was investigated by the chemical methods DPPH and ABTS radical scavenging activity and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay, and by in vitro methods of inhibition of superoxide anion production and preventive oxidative damage caused by hydrogen peroxide in macrophage culture. The cytotoxic effect was evaluated by the MTT colorimetric method. The *in vitro* anti-inflammatory and immunomodulatory activities were evaluated by influence of the extracts on the production of nitric oxide (NO), by indirect nitrite quantification using Griess method; by the quantification of pro-and anti-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6 and IL-10 by the ELISA technique; and by the determination of the Nuclear Transcription Factor kappa B (NF- κ B) activity and expression of Mitogen Activated Protein Kinase p38 (p38MAPK). The major compounds identified in the leaves of EAAB and EE70AB of *A. brasiliana* were C-hexosyl-luteolin O-hexoside, Hexanoside of (iso) vitexin, Isovitexin, Vitexin-2'-O-rhamnoside and Hesperedin. EAAB presented higher antioxidant action with IR50 values for ABTS and DPPH of 42.1 ± 0.9 and 74.0 ± 10.9 ; and the E70EAB presented the lowest IR50 in the FRAP test ($6.5 \pm 0.7 \mu\text{g/mL}$). The EE70AB exhibited the highest inhibition of NO production (IC50 of $127.3 \pm 8.7 \mu\text{g/mL}$) by LPS stimulated macrophages and, together, also showed significant inhibition of superoxide anion production ($60, 3 \pm 1.2\%$, at $50 \mu\text{g/ml}$). The EAAB, HEAB and EEAB demonstrated significant inhibition of cytokine TNF- α by $32.6 \pm 1.9\%$, $33.0 \pm 1.9\%$ and $66.1 \pm 2.4\%$, respectively, at of $10 \mu\text{g/mL}$ concentration, exhibiting better activity than gallic acid ($21.5 \pm 2.8\%$), also tested at $10 \mu\text{g/mL}$. EE70AB and EEAB also suppress the IL-6 production at $10 \mu\text{g/mL}$ concentration reaching inhibition rates of $62.6 \pm 5.0\%$ and $77.2 \pm 4.9\%$, respectively. All tested extracts (at $20 \mu\text{g/mL}$) exhibit between 30 to 35% inhibition on NF- κ B activity and no significant effect on p38 MAPK activity. Altogether, the results obtained with *A. brasiliana* leaf extracts suggest that the plant has promising bioactive activities, acting in the control of free radicals, oxidative stress and inhibiting important inflammatory mediators.

Keywords: Cytokines, inflammation, antioxidant, NF- κ B.

Artigo Científico

In vitro* anti-inflammatory and antioxidant activities of *Alternanthera brasiliana

Mariana Moreira Figueira^a, Mariane Fioroti Lorençon^a, Elisângela Flávia Pimentel Schmitt^a, Hugo Calvi Gava^a, Ana Cláudia Pereira Hertel^a, Taiane Schneider^b, Diorge Jônatas Marmitt^b, Tamara P. Kondratyuk^c, Denise Coutinho Endringer^a, Rodrigo Scherer^a, Thiago Barth^d, Marcia Ines Goettert^b, Marcio Fronza^{a*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Produtos Naturais, Universidade Vila Velha, Vila Velha, ES, 27290-920, Brazil

^bLaboratório de Cultura de Células, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade do Vale do Taquari, Lajeado, RS, CEP 95900-000, Brazil

^cDepartment of Pharmaceutical Sciences, Daniel K. Inouye College of Pharmacy, University of Hawaii at Hilo, Hilo, HI 96720, United States

^dLaboratório de Produtos Bioativos, Curso de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé, Macaé, RJ, CEP 27930-560 Brazil

**Corresponding author*

Prof. Dr. Marcio Fronza
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Produtos Naturais, Universidade Vila Velha, Vila Velha – Espírito Santo.
Av. Comissário José Dantas de Melo, nº21, Boa Vista, Vila Velha, ES, 29102-920, Brazil
E-mail: marcio.fronza@uvv.br
Telephone: +55 (27) 3421-2087.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo analisar as características fitoquímicas e investigar o potencial farmacoterapêutico das folhas da *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae). Extratos das folhas foram preparados empregando hexano (EHAB), água (EAAB), etanol 70% (EE70AB) e 100% (EEAB), separadamente. O teor de polifenóis totais e flavonóides foram determinados pelo método do Folin-Ciocalteu e após reação com cloreto de alumínio, respectivamente. Os principais metabólitos secundários presentes nos extratos foram identificados em um espectrômetro de massas íon trap linear (Q-Trap). A atividade antioxidante foi investigada pelos métodos químicos do sequestro do radical DPPH, ABTS e redução do ferro (FRAP), e por métodos *in vitro* de inibição da produção do ânion superóxido e efeito preventivo contra danos causados pelo peróxido de hidrogênio em cultura de macrófagos. O efeito citotóxico foi avaliado pelo método colorimétrico do MTT. As atividades anti-inflamatória e imunomoduladora foram avaliadas *in vitro* quanto à influência dos extratos sobre a produção de óxido nítrico (NO), por meio da dosagem indireta de nitrito pelo método de Griess *in vitro* na cultura de macrófagos estimulados com LPS, pela quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias como o TNF- α , IL-6 e IL-10 pela técnica de ELISA e pela determinação da atividade do Fator de Transcrição Nuclear - kappa B (NF- κ B) através da expressão de luciferase e da Proteína Quinase Ativada por Mitógeno p38 (p38MAPK) por Western blot. Os compostos majoritários identificados nos EAAB e EE70AB das folhas da *A. brasiliana* foram o C-hexosil-luteolina O-hexosídeo, Hexanosídeo de (iso) vitexina, Isovitexina, Vitexina-2''-O-rhamnosídeo e Hesperedina. O EAAB apresentou maior ação antioxidante com valores de IR₅₀ para o ABTS e DPPH de $42,1 \pm 0,9$ e $74,0 \pm 10,9$; e o EE70AB apresentou o menor IR₅₀ no ensaio do FRAP ($6,5 \pm 0,7$ μ g/mL). O EE70AB foi o extrato que melhor inibiu a produção de NO (IC₅₀ de $127,3 \pm 8,7$ μ g/mL) pelos macrófagos estimulados por LPS, e em conjunto, também apresentou resultados significativos na inibição da produção do ânion superóxido ($60,3 \pm 1,2\%$ na concentração de 50 μ g/mL). O EAAB, HEAB e EEAB demonstraram inibição significativa da citocina TNF- α em $32,6 \pm 1,9\%$, $33,0 \pm 1,9\%$ e $66,1 \pm 2,4\%$, respectivamente, na concentração de 10 μ g/mL, uma atividade melhor do que o ácido gálico ($21,5 \pm 2,8\%$), também testado na concentração de 10 μ g/mL. Na inibição de IL-6, o EE70AB e EEAB demonstraram inibição significativa da citocina em $62,6 \pm 5,0\%$, $77,2 \pm 4,9\%$, respectivamente, na concentração de 10 μ g/mL, também apresentando inibição mais potente do que o ácido gálico de $34,4 \pm 1,2\%$ na concentração de 10 μ g/mL. Todos os extratos testados (20 μ g/mL) apresentaram de 30 a 35% de inibição sobre a atividade do NF- κ B e nenhum efeito significativo sobre a atividade de p38 MAPK. Os resultados obtidos com os extratos das folhas da *A. brasiliana* sugerem que a planta possui promissoras atividades bioativas, atuando no controle de radicais livres, estresse oxidativo e inibindo importantes mediadores inflamatórios.

Palavras chaves: Citocinas, inflamação, antioxidante, NF- κ B, RAW.

1. INTRODUÇÃO

A inflamação consiste em uma reação protetora do hospedeiro frente aos danos teciduais infecciosos ou estéreis, com o objetivo de restaurar a homeostase do tecido (Chiang and Serhan 2017). Todavia, quando o processo inflamatório ocorre sem controle, de maneira exacerbada, evoluindo para um processo inflamatório crônico ele poderá provocar danos ao hospedeiro comumente conhecidas como doenças inflamatórias crônicas, como as doenças reumáticas, Alzheimer, aterosclerose, doenças cardiovasculares, e neoplasias (Sugimoto et al. 2016). Dentre as células ativadas na fase aguda do processo inflamatório, estão os neutrófilos, fibroblastos, monócitos e em destaque os macrófagos, que são células com alta taxa de adaptabilidade em resposta a diferentes estímulos, como os lipopolissacarídeos (LPS), que poderá estimular a produção de mediadores inflamatórios, como citocinas, espécies reativas de oxigênio (ERO's), e ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) (Arulselvan et al. 2016; Sartori et al. 2018).

A resposta inicial aguda vem de uma fase vascular, que fora iniciada por células residentes no tecido, principalmente leucócitos, com a liberação diversos mediadores como as aminas vasoativas (histamina e serotonina), peptídeos vasoativos (bradicinina), fragmentos do sistema complemento (C3a, C4a e C5a -anafilatoxinas), mediadores lipídicos (eicosanoides), citocinas (Fator de Necrosa Tumoral- α (TNF- α), Interleucinas (IL-) 1 e 6, quimiocinas (IL-8) (Arulselvan et al. 2016; Tursun et al. 2016). Esses mediadores promovem a vasodilatação local e aumento da permeabilidade, aumento da sensibilidade para estímulos de dor, quimiotaxia e aumento da adesão de leucócitos e ativação de macrófagos (Fullerton e Gilroy 2016).

Os fosfolipídios da membrana das células também são liberados, com o estímulo inflamatório, por ação da enzima fosfolipase A2 ocasionando a liberação do ácido araquidônico no citoplasma, e este serve de substrato para duas enzimas: ciclo-oxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX) (Gandhi et al. 2017; Hu et al. 2017). Pela ação da COX é gerado a Prostaglandina H₂ (PGH₂), que irá estimular vários tipos de prostanoídes, incluindo outras prostaglandinas – PGI₂, PGD₂, PGE₂, PGF₂ e Tromboxano A₂ (TXA₂). Pela ação da LOX formam-se os leucotrienos, as lipoxinas e outros produtos (Gandhi et al. 2017; Hu et al. 2017).

A enzima COX possui duas isoformas que têm estrutura proteica primária similar, estão presentes em diversos órgãos e tecidos normais e estão envolvidas em processos fisiológicos e patológicos. A COX-1 é expressa de forma constitutiva e está presente em quase todos os tecidos, sendo primordial para a manutenção das funções

fisiológicas normais, como proteção da mucosa intestinal, controle do fluxo sanguíneo renal e hemostasia (Marsico et al. 2017). A COX-2, é induzida e encontra-se aumentada nos processos inflamatórios sendo estimada por citocinas, endotoxinas e fatores de crescimento, originando prostaglandinas indutoras e prostaciclina que são encontradas nas células vasculares endoteliais normais (Marsico et al. 2017).

Entre as principais células ativadas na fase aguda do processo inflamatório, destacam-se os macrófagos. Estas são células com alta taxa de adaptabilidade em resposta a estímulos, como os PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) que podem ser citocinas, células ativadas ou danificadas, quimiocinas, LPS e as DAMPs (Padrões Moleculares Associados a Danos). DAMPs são detritos de células do hospedeiro, vindo de danos, traumatismos, isquemias ou necrose induzida por infecções (Vorobjeva e Pinegin 2015; Choi and Klessig 2016).

O LPS é considerado um dos principais iniciadores do processo inflamatório responsável pela promoção de um fenótipo M1 (ativação clássica) nos macrófagos. Entre suas principais ações no destaca-se o aumento de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria, de citocinas com ação pró-inflamatórias, de quimiocinas, ativação de fatores de transcrição como o NF- κ B (Chen e Zhang 2017). O NF- κ B é um importante fator de transcrição envolvido na ativação celular, resposta imune, proliferação celular e processo inflamatório. A sua cascata de sinalização está relacionada com a resposta inflamatória dos macrófagos. Quando ativado, o NF- κ B induz a expressão de genes pró-inflamatórios, incluindo quimiocinas, citocinas tais como TNF- α e IL-1, e a codificação de enzimas como a COX-2 e a Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOS) (Ling e Kumar 2012).

As células que chegam ao local da injúria iniciam a fagocitose para que haja o reparo tecidual. Quando a inflamação se encontra no início, ou seja, na fase aguda, há a predominância de elementos que fazem parte da imunidade inata, e as principais células envolvidas são neutrófilos e macrófagos. Se o estímulo nocivo persistir, chegando a fase crônica da inflamação, ocorrem alterações nos elementos celulares e a destruição e reparo do tecido ocorre de forma concomitante, com angiogênese, fibrose e infiltrado de células mononucleares (Cruvinel et al. 2010).

De acordo com Sugimoto et al. (2016), o processo inflamatório tem como objetivo remover o estímulo, iniciar o reparo e estabelecer a homeostase tecidual. Todavia, quando o processo inflamatório ocorre sem controle pode provocar danos, que será o princípio de uma grande quantidade de doenças inflamatórias crônicas.

Diante disso, a resolução inflamatória aguda é primordial, para que seja evitado a cronicidade e se assegure o regresso à homeostasia (Serhan 2017).

O estresse oxidativo se desenvolve quando a produção de ERO's aumenta significativamente ocasionando danos celulares (Staerck et al. 2017). Os radicais livres são espécies químicas que contém um ou mais elétrons desemparelhados, são altamente instáveis e causam danos a outras moléculas oxidando-as, a fim de alcançar a estabilidade. As ERO's são produzidas por uma ampla gama de mecanismos, incluindo o metabolismo aeróbio gerado pela cadeia respiratória mitocondrial, irradiações de luz UV, raios-X ou raios gama. Eles também são gerados por poluentes do ar, ou durante o processo inflamatório que os macrófagos e os neutrófilos conduzem como mecanismo de defesa contra agentes patogênicos (Alpay et al. 2015; Dietl and Maack 2017; Saha et al. 2017; Staerck et al. 2017; Poprac et al. 2017)

Há evidências que mostram a participação destes radicais livres em uma variedade de doenças, como Alzheimer e Parkinson, câncer, doenças cardiovasculares, e diabetes tipo 2 (Tangvarasittichai 2015). Os radicais livres podem causar danos às biomoléculas celulares tais como o ácido nucléico, as proteínas, os lipídios e os carboidratos, e conseqüentemente podem adversamente afetar funções imunes (Chung 2017; Saha et al. 2017).

A grande variabilidade dos metabólitos das plantas medicinais, propicia diferentes vias de ação para tratar diferentes problemas de saúde, como por exemplo a inflamação (Figueiredo et al. 2017). Mesmo com novos medicamentos, boa parte da população ainda depende quase que exclusivamente das plantas medicinais para promoção da saúde, seja associado ou não ao medicamento (Nascimento et al. 2016). O conhecimento sobre o uso de plantas medicinais, norteia o desenvolvimento de pesquisas, que tem com o objetivo o tratamento e a prevenção de doenças (Coutinho et al. 2018). Dentre as plantas medicinais, podemos destacar a *Alternanthera brasiliana* (Amaranthace), que é conhecida popularmente como 'penicilina', 'terramicina', 'doril' ou 'perpétua-do-mato', e é nativa da zona tropical e subtropical da América do Sul (Pereira et al. 2008; Kumar et al. 2011), mas também é encontrada na Austrália e Índia (Samudrala et al. 2015). Popularmente, as folhas são utilizadas pelas comunidades rurais com objetivo de curar inflamações, processos dolorosos, infecciosos, antitussígeno e antidiarreico, além de serem utilizadas como diurética, digestiva e depurativa, e o pigmento avermelhado para tratar lesões na pele (Kumar et al. 2011).

Estudos dos fitoquímicos realizados com extratos das folhas da *A. brasiliiana*, demonstraram a presença de terpenos, esteroides, polifenóis e flavonoides (De Souza et al. 1998). Brochado et al. (2003) identificaram seis derivados di- e triglicosilados de kaempferol e quercetina. Estudos recentes identificaram a presença de ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafeico, orientina, vitexina, quercetina, luteolina e apigenina no extrato etanólico das folhas de *A. brasiliiana* (Coutinho et al. 2018). Betalaínas pertencentes ao grupo das betaxantinas também foram detectadas nas folhas da *A. brasiliiana* (Deladino et al. 2017).

Apesar da *A. brasiliiana* ser amplamente utilizada na medicina popular, poucos estudos científicos têm demonstrado suas propriedades biológicas. Dentre os principais efeitos biológicos descritos na literatura destacam-se a ação analgésica do extrato etanólico das folhas comparada com ácido acetilsalicílico, dipirona e indometacina (De Souza et al. 1998), ação anti-inflamatória *in vitro*, atribuída a inibição da proliferação de linfócitos (Brochado et al. 2003) e *in vivo* pela capacidade de reduzir a migração de linfócitos (Formagio et al. 2012) e pela atividade antiedematogênica (Coutinho et al. 2017), além da ação cicatrizante de feridas *in vivo* e *in vitro* (Barua et al. 2009, 2012b, a, c). Atividades antibacteriana (Pereira et al. 2007; Coutinho et al. 2017), antiviral (Lagrota et al. 1994), antioxidante e antitumoral (Samudrala et al. 2015) também são descritas na literatura para as folhas da *A. brasiliiana*.

Diante do exposto e da necessidade de investigações científicas mais consistentes e detalhadas para comprovar seu uso medicinal e esclarecer o possível mecanismo de ação anti-inflamatória proposta na literatura, este estudo teve como objetivo principal determinar o perfil fitoquímico e investigar a atividade anti-inflamatória de diferentes extratos das folhas de *A. brasiliiana* empregando diferentes ensaios químicos e biológicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Reagentes químicos e bioquímicos

Kits de ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção da citocina TNF- α foi adquirido da eBioscience, San Diego, Califórnia, EUA e IL-6 foi adquirido da Invitrogen – Thermo Fischer Scientific. Outros reagentes, como Lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* O111:B4, N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME), ácido gálico, quercetina, Np-Tosil-L-fenilalanina clorometilcetona (TPCK), 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), tetrazolium nitroblue chloride (NBT), foram adquiridos da Sigma Aldrich® Chemical Co, St. Luís, MO, EUA. Dual-Luciferase® Reporter Assay System 10-Pack foi obtido na (Promega Corporation, EUA) E1501. E o L-N6-(1-Iminoethyl) lysine dihydrochloride (L-NIL) foi adquirido da Cayman Chemical Company. Todos os demais reagentes utilizados apresentavam grau analítico e foram obtidos a partir de várias fontes comerciais.

2.2. Linhagens celulares

As linhagens celulares utilizadas foram MV3 melanoma (0284 – BCRJ) obtido de linfonodos humanos (*Homo sapiens*), L929 fibroblasto (ATCC® CCL-1™) obtido de tecido subcutâneo, areolar e adiposo de ratos (*Mus musculus*), RAW 264.7 macrófagos (ATCC® TIB-71™) de camundongo e a HEK (célula embrionária renal humana transfectada com o gene que expressa a luciferase (Panomic, Fremont, CA) (retrovirus). As células foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas em meio de cultura Eagle modificado (DMEM) e suplementados com 100 UI/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina (Dulbecco Sigma Aldrich® Chemical Co, St. Luís, MO, EUA) ou meio de cultura modificado com alto teor de glicose (DMEM) e todos suplementados com 10% de soro fetal bovino (FBS) da Gibco-BRL Life Biotechnologies, Grand Island, Nova Iorque, EUA, a 37 °C, numa atmosfera umidificada contendo 5 % de CO₂.

2.3. Coleta e identificação do material vegetal

As folhas de *Alternanthera brasiliana* utilizadas no estudo foram coletadas no mês de agosto/2017, no Parque Municipal de Tabuazeiro – Vitória (20°17'34.0"S 40°19'26.4"W), no estado do Espírito Santo, e foram devidamente identificadas pela Botânica Ms Solange Schneider. Uma exsicata da planta foi preparada e depositada no herbário da Universidade Vila Velha, sob o número 1367.

2.4. Obtenção dos extratos

As folhas foram separadas, devidamente selecionadas e desidratadas em estufa a 50 °C. Posteriormente, foram pulverizadas em moinho de facas e de bolas e então submetidas ao processo de extração. O material pulverizado foi extraído em aparelho ultrassom, por dois ciclos de 30 min, empregando-se 150 mL de hexano (EHAB), etanol puro (EEAB), etanol 70 % (EE70AB) e água (EAAB) como solventes, separadamente, em cada ciclo. Após extração, os solventes foram removidos a 55 °C com auxílio de rota-vapor e para a desidratação completa do extrato, sendo submetido à liofilização. Em seguida foi armazenado em congelador à -20 °C até o momento do uso.

2.5. Determinação de polifenóis totais, flavonóides totais e taninos

As quantificações de polifenóis totais, flavonóides totais e taninos foram realizados de acordo com descrito por Krepesky et al. (2012). A determinação de polifenóis totais foi realizada pelo método Folin-Ciocalteu e o teor de flavonóides foram determinados por método espectrofotométrico após reação com Cloreto de Alumínio. Para ambos foi construída uma curva padrão de quercetina (1-12 µg/mL) e ácido gálico (6,2 – 150,0 µg/mL) e os resultados foram expressos em miligrama equivalentes de quercetina/ácido gálico por grama de extrato seco das folhas, respectivamente.

A leitura realizada em espectrofotômetro (Multi-Mode Microplate Reader, Filter Max F5, Molecular Devices Spectra, USA) a 425 nm. Os experimentos foram feitos em triplicata, em pelos menos dois dias diferentes.

2.6. Atividade antioxidante dos extratos

A atividade antioxidante dos extratos foi determinada pelo método colorimétrico do sequestro do radical livre ABTS (Re et al. 1999) e DPPH (Scherer and Godoy 2009) e pela atividade redutora do íon ferro pelo método do FRAP (Potencial

Antioxidante Redutor Férrico) (Benzie and Strain 1996). Ácido gálico e quercetina foram usados como controle positivo. Pelo menos dois experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em IR₅₀ (µg/mL).

2.7. Análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – com detector de arranjo de diodo e analisador quadropolo Q-Trap

As análises dos extratos EAAB e EE70AB das folhas de *A. brasiliiana* foram realizadas utilizando um Dionex Focused Ultimate 3000 equipado com um detector DAD acoplado a um espectrômetro de massas LCQ Fleet Ion Trap ThermoFisher Scientific, (Waltham, MA, EUA). As condições cromatográficas foram uma coluna Ascentis Express C18 (100 mm x 4,6 mm; tamanho de partícula de 2,7 µm) Supelco (Bellefonte, PA, EUA). Os eluentes foram 0,1% de solução de ácido fórmico (A) e metanol (B) como a fase móvel a um caudal de 0,5 mL/min a uma temperatura de 35°C. A eluição da fase móvel foi realizada no modo de gradiente de seguimento: 0 - 50 min (10 - 100% de B); 50 - 55 min (100% de B) e 55 - 60 min (10% de B). Uma coluna de proteção C18 (5 mm x 4,6 mm id, tamanho de partícula 2,7 µm, Supelco (Bellefonte, PA, EUA) foi utilizada para proteger a coluna analítica. Os parâmetros de espectrometria de massa foram os seguintes: tensão capilar 36 V, nebulização 5,5 Bar, fluxo de gás de secagem 10 L/min, temperatura de secagem 250 °C e energia de colisão de 35 Ev. A aquisição do sinal foi realizada em modo iônico positivo em m/z entre 100 a 1000 e MS2 dos íons picos de base. Os arquivos .raw de resultados foram convertidos para .mzML usando o MSConvert, do ProteoWizard. Os cromatogramas foram processados usando MzMine, e o processamento de desreplicação foi feito no Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) (Wang et al. 2016). As amostras foram preparadas a 2 mg/mL em metanol HPLC grau. Tedia (Fairfield, OH, EUA) e 3 µL foram injetados.

2.8. Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

Para a análise da citotoxicidade dos extratos, foi utilizado o método do MTT proposto por (Mosmann 1983; Marques et al. 2018). Para esta análise, as células de fibroblasto (L929), melanona (MV3) e macrófagos (RAW 264.7) foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h com diferentes concentrações dos extratos (15,6 – 500 µg) e a doxorrubicina, que foi utilizada como controle positivo. A absorbância foi quantificada em espectrofotômetro a 595 nm. Os experimentos foram

realizados em triplicata, em pelos menos dois dias diferentes e os resultados foram expressos como viabilidade celular.

2.9. Atividade anti-inflamatório dos extratos

2.9.1. Determinação indireta de óxido nítrico *in vitro*

A quantificação indireta de óxido nítrico foi realizada pela determinação da influência sobre a produção de óxido nítrico em cultura de macrófagos RAW 264.7 ativados por LPS (Park al. 2014; Marques et al. 2018). Os macrófagos foram plaqueados em placas de 96 poços e incubados overnight. As células foram expostas ou não a diferentes concentrações (1 – 200 µg/mL) dos extratos (EAAB, EHAB, EE70AB, EEAB) e LPS (1 µg/mL). Foi utilizado L-NAME, L-NIL, ácido gálico e quercetina como controles positivo. O sobrenadante celular foi utilizado para a quantificação de nitrito através da reação com reagente de Griess (1% sulfanilamida em ácido fosfórico 5 % e 0,1% de diidrocloreto de naftiletlenodiamina em água; 1:1) (Green et al. 1982). A absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 540 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata, em pelos menos dois dias diferentes e os resultados foram expressos em IC₅₀ (µg/mL).

2.9.2. Redução da produção do ânion superóxido

O potencial efeito inibitório dos extratos sobre a produção do radical superóxido (O₂⁻) em cultura de macrófagos RAW 264.7 ativados por LPS foi avaliado pelo ensaio do superóxido (Hyung et al. 2006; Marques et al. 2018). Foram plaqueados macrófagos RAW 264.7 em placas de 96 poços e pré-tratados com concentrações (1 – 200 µg/mL) crescentes dos extratos (EAAB, EHAB, EE70AB, EEAB) e estimuladas com LPS (1 µg/mL). Após incubação (5 % de CO₂ a 37 °C) o sobrenadante foi removido e foi adicionado NBT (1 mg/mL). Em seguida, as células foram lavadas com metanol e submetidas à secagem em temperatura ambiente, e então os cristais de formazana foram dissolvidos em DMSO e KOH (2 M). A absorbância foi quantificada em espectrofotômetro a 540 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata, em pelos menos dois dias diferentes e os resultados foram expressos em IC₅₀ (µg/mL).

2.9.3 Efeito preventivo do dano oxidativo em RAW 264. 7 causado por H₂O₂

O efeito preventivo dos extratos frente ao dano oxidativo do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em macrófagos foi analisado pelo método do peróxido de hidrogênio modificado (Adetutu et al. 2011). Os macrófagos RAW 264.7 foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas. Passado o período de incubação, os extratos (EAAB, EHAB, EEAB, EE70AB) foram adicionadas a placa em concentrações crescentes (1–200 µg), aguardou-se 30 min e foi adicionado H₂O₂ 750 µM, e novamente foram incubadas por 4 horas. Como controle positivo utilizou-se a catalase, ácido gálico e quercetina (0,1 - 10 µg/mL). Após o período de incubação a viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico do MTT. Os experimentos foram realizados em triplicata, em pelos menos dois dias diferentes e os resultados foram expressos em IC₅₀ (µg/mL).

2.9.4 Determinação de citocinas *in vitro*

Para a quantificação de citocinas, foi utilizada a cultura de macrófagos (RAW 264.7) estimulados com LPS. As células foram expostas a diferentes concentrações dos extratos (EAAB, EHAB, EE70AB, EEAB) e estimuladas com LPS (1 µg/mL). O sobrenadante celular foi utilizado para quantificação das citocinas TNF-α e IL-6 empregando o ensaio imunoenzimático (ELISA – do inglês “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”), com anticorpos específicos e padrões para cada citocina testada conforme as instruções do fabricante (eBioscience®). A absorbância foi quantificada em espectrofotômetro a 450 nm. Os níveis de citocinas foram expressos em pg/mL e as sensibilidades foram > 10 pg/mL.

2.9.5 Determinação da atividade do fator nuclear kappa B

Para determinar a atividade do NF-κB, foi avaliado a capacidade dos extratos da *A. brasiliensis* de inibir o NF-κB através da expressão de luciferase (Morais et al. 2010; Kondratyuk et al. 2012). As células renais embrionárias humanas HEK 293 transfectadas com a adição do gene do NF-κB-luciferase foram plaqueadas e incubadas durante 48 h. Na sequência, foi testada a concentração de 20 µg de cada extrato (EAAB, EHAB, EE70AB, EEAB), seguido pela adição de TNF-α (0,5 ng/mL) e

incubação por mais 6 h. Em seguida, o ensaio da luciferase foi realizado utilizando o kit de ensaio Luc da Promega seguindo as instruções do fabricante. Foi utilizado TPCK (clorometil cetona de n-tosyl-l-fenilalanina) como controle positivo (4 μ M). A atividade da luciferase foi monitorada através de um leitor de luminescência com microplacas (Mults-Mode, Filter Max F5, Molecular Devices Spectra, EUA). Os resultados foram expressos como percentagem da atividade inibidora de NF- κ B. Os experimentos foram realizados em triplicata, em pelos menos dois dias diferentes. Em paralelo, sob as mesmas condições experimentais, foi examinada a viabilidade celular pelo ensaio SRB que se liga eletrostaticamente aos resíduos de aminoácidos básicos das proteínas, após a fixação com ácido tricloroacético (TCA). A absorbância é determinada no comprimento de onda 515 nm.

2.9.6 Determinação da expressão da Proteína Quinase Ativada por Mitógeno p38 (p38 MAPK) por western blot

Para determinar a expressão da proteína p38 MAPK, foram plaqueados macrógrafos RAW 264.7 na concentração de 1×10^6 células/mL. Após aproximadamente 7 h as células foram pré-tratadas com os extratos durante 1 h e posteriormente foi adicionado o LPS (1 μ g/mL) por 24 h. Após 24 h, foi realizada a extração das proteínas empregando tampão RIPA sob refrigeração (em banho de gelo) e agitação por 30 minutos. Com auxílio de scraper, as células foram raspadas e removidas juntamente com o tampão RIPA e centrifugadas a 11000 rpm (rotações por min) por 30 min, a 4 °C, para obtenção da fração citosólica.

O sobrenadante foi coletado e a fração de proteínas totais foi determinada utilizando método de LOWRY, com albumina bovina sérica (BSA) 2 mg/mL como padrão e as amostras lidas em espectrofotômetro à 750 nm. Após normatização das concentrações de proteínas em todas as amostras, as mesmas foram desnaturadas a 90 °C por 10 min. A eletroforese das amostras foi realizada em gel de poliacrilamida-12% SDS-PAGE seguido de transferência para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas, durante 1 h com solução basal (1M Tris-HCl, pH 7.5; 5M NaCl; 0,05% Tween 20) contendo 10 % de leite em pó desnatado. Em seguida, a membrana foi incubada com os anticorpos primários (1:250) anti-p38 (Santa Cruz Biotechnology e anti-beta actina (Santa Cruz Biotechnology) overnight a 4 °C com agitação. Em seguida, as membranas foram lavadas com solução basal e incubadas com o anticorpo secundário (1:4000), em temperatura ambiente com agitação suave, durante 2 h. A detecção das bandas imunorreativas foi realizada com Opti-4CN (Bio Rad

Laboratories, Inc. ®) e as intensidades das bandas foram obtidas usando o programa ImageJ 3.0.

2.9. Análise estatística dos dados

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad 5 (San Diego, CA, EUA 176). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). Variações estatísticas entre os grupos serão determinadas usando a análise de variância multifatorial (ANOVA) seguido por pós teste de Tukey e/ou teste t, onde valores de $p < 0,05$ serão considerados significativos.

3. RESULTADOS

3.1 Determinação de flavonoides totais, polifenóis totais e taninos

Análise quantitativa das principais classes de metabólitos secundários presentes nos diferentes extratos (EAAB, EHAB, EE70AB, EEAB) das folhas de *A. brasiliiana* evidenciou a presença de compostos fenólicos, flavonoides e taninos em diferentes proporções de acordo com o solvente empregado no processo de extração, conforme observado na tabela 1. O EAAB e o EE70AB apresentaram as maiores concentrações de polifenóis totais ($38,3 \pm 3,9$ mg EAG/g e $38,1 \pm 4,2$ mg EAG/g, respectivamente) e taninos ($8,6 \pm 0,3$ mg/g e $7,2 \pm 2,0$ mg/g respectivamente), com diferença significativa para os demais extratos. As maiores concentrações de flavonóides foram encontradas no EHAB ($10,2 \pm 0,7$ mg EQ/g), EE70AB ($10,9 \pm 3,1$ mg EQ/g) e no EEAB ($9,0 \pm 1,4$ mg EQ/g), respectivamente

Tabela 1. Quantificação de polifenóis totais, flavonoides totais e taninos nos extratos das folhas da *A. brasiliiana*.

Extratos	Polifenóis totais*	Flavonoides totais*	Taninos
	(mg EAG/g)	(mg EQ/g)	(mg/g)
EAAB	$38,3 \pm 3,9^a$	$3,9 \pm 0,2^a$	$8,6 \pm 0,3^a$
EHAB	$5,1 \pm 0,3^b$	$10,2 \pm 0,7^b$	$0,4 \pm 0,4^b$
EE70AB	$38,1 \pm 4,2^a$	$10,9 \pm 3,1^b$	$7,2 \pm 2,0^a$
EEAB	$16,1 \pm 1,2^c$	$9,0 \pm 1,4^b$	$4,9 \pm 1,9^a$

EAAB: extrato aquoso da folha; EHAB: extrato hexânico da folha; EE70AB: extrato 70% etanólico das folhas; EEAB: extrato 100% etanólico das folhas; EQ: Equivalente de quercetina; EAG: Equivalente de ácido gálico. Letras diferentes na mesma coluna correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$). Testes foram realizados em triplicata e expresso em média \pm DP. *Os resultados foram expressos como equivalentes em mg de quercetina/ácido gálico por g de extrato seco.

3.2. Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos das folhas da *A. brasiliiana*, foi determinada preliminarmente utilizando os métodos químicos do sequestro dos radicais ABTS e DPPH, e avaliação da capacidade de redução do ferro (FRAP). O EAAB foi o extrato que apresentou melhor atividade antioxidante nos três testes com valores de IR₅₀ de 42,1 ± 0,9; 74,0 ± 10,9 e 22,6 ± 3,2 µg/mL para o teste do ABTS, DPPH e FRAP, respectivamente, conforme observado na tabela 2.

Tabela 2. Atividade antioxidante do extrato aquoso, hexânico, hidroetanólico e etanólico das folhas de *A. brasiliiana*.

Extratos	IR ₅₀ (µg/mL)		
	ABTS	DPPH	FRAP
EAAB	42,1 ± 0,9 ^a	74,0 ± 10,9 ^a	22,6 ± 3,2 ^a
EHAB	307,8 ± 4,1 ^b	> 1000	168,1 ± 17,4 ^b
EE70AB	76,8 ± 0,8 ^c	219,5 ± 18,7 ^b	26,5 ± 0,7 ^a
EEAB	253,9 ± 2,5 ^d	339,9 ± 0,1 ^c	52,6 ± 17,4 ^c
QR	5,5 ± 0,0 ^e	3,3 ± 0,1 ^d	3,59 ± 0,1 ^d
AG	4,7 ± 0,0 ^e	1,1 ± 0,1 ^d	3,32 ± 0,1 ^d

EAAB: extrato aquoso da folha; EHAB: extrato hexânico da folha; EE70AB: extrato 70% etanólico das folhas; EEAB: extrato 100% etanólico das folhas; QR: Quercetina; AG: ácido gálico. Letras diferentes na mesma coluna corresponde a diferenças significativas ($p < 0,05$). Testes foram realizados em triplicata e expresso em média ± DV.

3.3. Identificação dos compostos majoritários nos extratos EAAB e EE70AB por HPLC-DAD-QTRAP

Os principais constituintes dos extratos EAAB e o EE70AB de folhas de *A. brasiliiana* foram identificados em um espectrômetro de massas ion trap linear (QTrap). As figuras 1 e 2 mostram os cromatogramas representativos do EAAB e o EE70AB, respectivamente. Em ambos os extratos foram identificados 5 compostos fenólicos majoritários, denominados de C-hexosil-luteolina-O-hexido, hexanosídeo de (iso)vitexina, isovitexina, vitexina-2"-O-rhamnosídeo e

hesperidina, conforme demonstrado na tabela 3. Em ambos os extratos os mesmos compostos foram detectados e identificados como sendo os compostos majoritários.

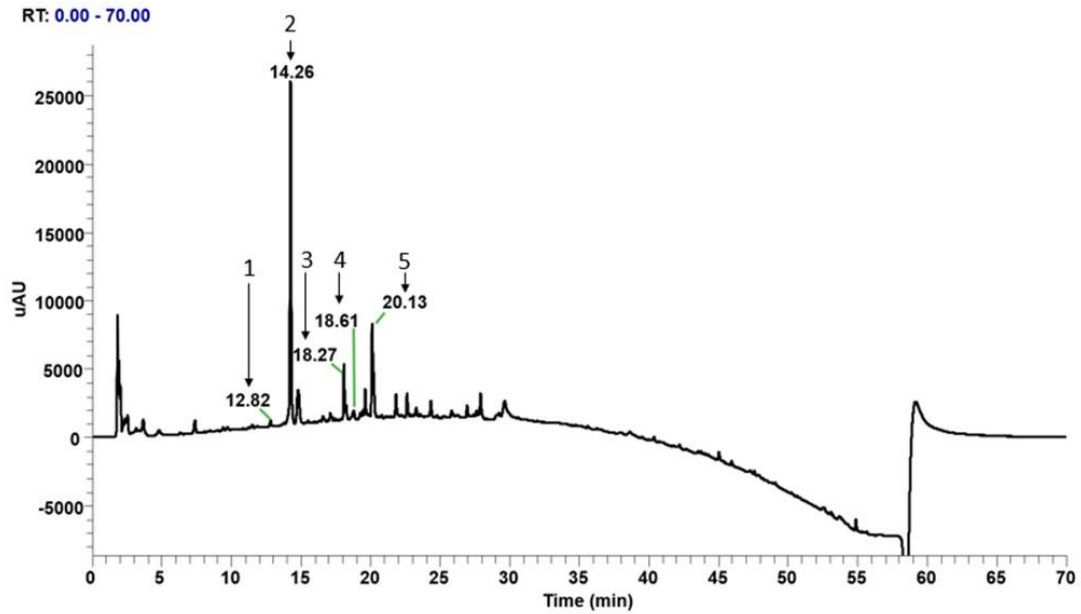


Figura 1. Cromatograma típico do Extrato aquoso das folhas da *A. brasiliana* à 254 nm.

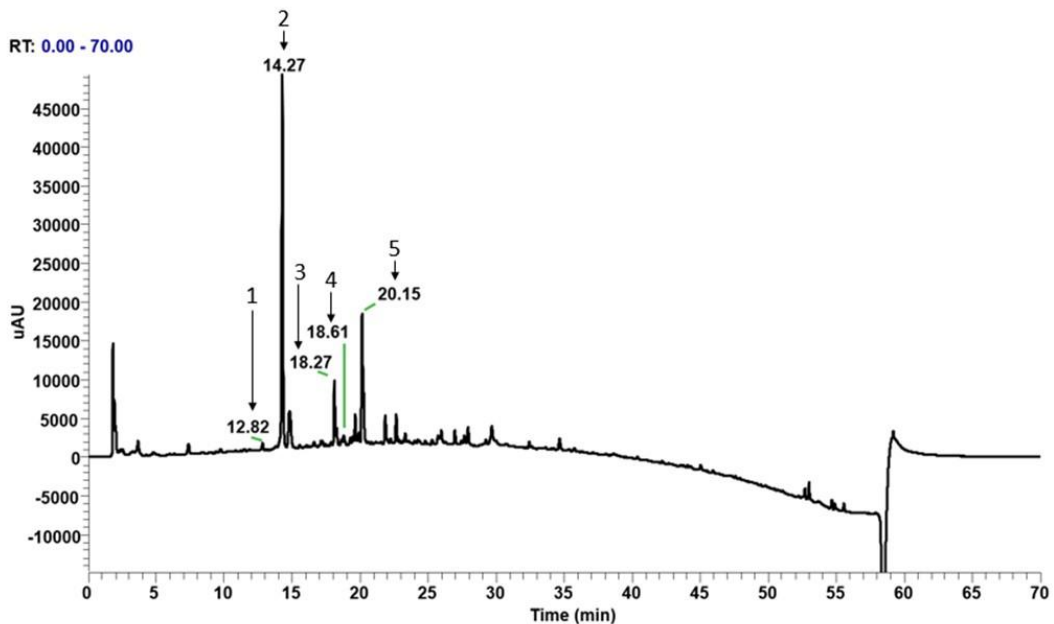


Figura 2. Cromatograma típico do Extrato Etanólico 70 % das folhas da *A. brasiliana* à 254 nm.

Tabela 3. Substâncias identificadas no Extrato aquoso e Extrato etanólico 70 % das folhas da *A. brasiliiana*.

Compostos ^(#)	t _R (min)	[M + H]	Fragmentos de íons	λ _{MAX} (nm)
1. C-hexosil-luteolina O-hexosídeo	12,82	611	449, 431, 353, 329, 311, 287	Baixa intensidade
2. Hexanosídeo de (iso)vitexina	14,26/14,27*	595	433, 415, 397, 313, 295, 271	269, 339
3. Isovitexina	18,27	433	415, 297, 379, 367, 351, 337, 313, 295, 283	267, 339
4. Vitexina-2''-O- rhamnosídeo	18,61	579	433, 415, 397, 367, 313, 295, 271	Baixa intensidade
5. Hesperidina	20,13/20,15*	611	465, 447, 303	259, 354

* Tempo de retenção obtido em Extrato etanólico 70 %; (#) Wang et al. 2016.

3.4. Avaliação de citotoxicidade *in vitro*

Os efeitos citotóxicos dos diferentes extratos das folhas de *A. brasiliiana* foram avaliados em cultura celular utilizando-se as linhagens de fibroblastos (L929) macrófagos (RAW 264.7) e melanoma (MV-3) em concentrações de 7,8 a 500 µg/mL. Observou-se que todos os extratos (EAAB, EHAB, EEAB, EE70AB) de *A. brasiliiana* não foram citotóxicos até a concentração de 100 µg/mL (dados não mostrados). Portanto, as concentrações de 1, 10, 50, 100 µg/mL foram selecionadas para os estudos posteriores.

3.5. Métodos *in vitro* para determinação da atividade antioxidante

3.5.1 Redução da produção do anion superóxido (O₂⁻)

Na análise da inibição da produção do ânion superóxido produzido por macrófagos após estimulação com LPS, o EAAB, EHAB, EE70AB e EEAB, apresentaram inibição significativa de 48,0 ± 4,1 %; 46,9 ± 0,4 %; 60,3 ± 1,2 % e 46,3 ± 0,3 % na concentração de 50 µg/mL, respectivamente. Os controles positivos, ácido gálico (60 µg/mL) e

tempol (12,5 mM), apresentaram inibição de $54,2 \pm 2,5\%$ e $59,8 \pm 4,5\%$, respectivamente (figura 3).

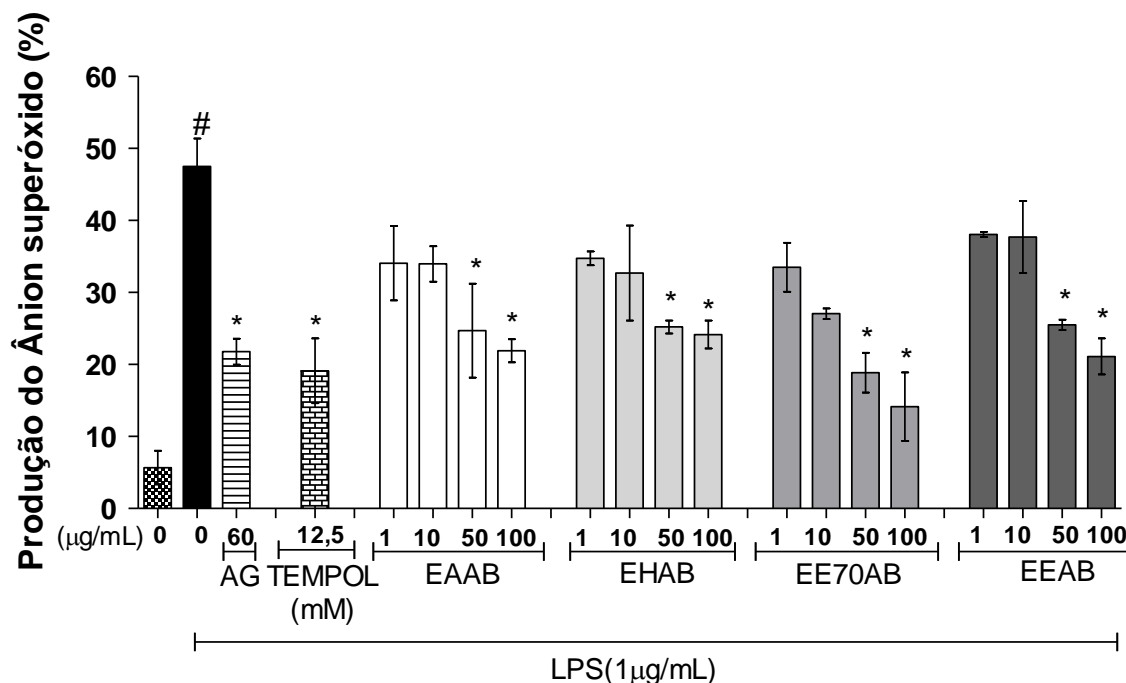


Figura 3. Efeito dos extratos das folhas da *A. brasiliana* na produção do $O_2^{\cdot-}$ em macrófagos estimulados com LPS. Macrófagos RAW 264.7 foram tratados com 1, 10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ dos extratos e após 30 min receberam ou não estímulo com LPS. Após incubação por 24h, o sobrenadante foi descartado e a produção de $O_2^{\cdot-}$ intracelular foi determinado utilizando o NBT. Os resultados foram expressos como média \pm DV de três experimentos independentes. *Significativo quando $p < 0,05$ comparado com o controle + LPS. # controle *versus* controle + LPS. AG: ácido gálico, EAAB: extrato aquoso, EHAB: extrato hexânico, EE70AB: extrato 70% etanólico, EEAB: extrato 100% etanólico.

3.5.2 Efeito preventivo do dano oxidativo em RAW 264.7 provocado por H_2O_2

Os extratos não proporcionaram proteção antioxidante frente ao peróxido de hidrogênio, apesar de terem apresentado atividade antioxidante significativa como demonstrado nos outros ensaios.

3.6 Determinação da atividade anti-inflamatória *in vitro*

3.6.1 Determinação de óxido nítrico *in vitro*

Na avaliação dos efeitos dos extratos sobre a produção de NO em macrófagos estimulados por LPS observou-se que todos os extratos exibiram propriedades inibitórias significativas sobre a produção de NO de forma dose-dependente (figura 4). O extrato EE70AB apresentou a maior capacidade de inibir a produção de NO com IC₅₀ de 127,3 ± 8,7 µg/mL, seguido pelo EEAB que apresentou um IC₅₀ de 136,0 ± 7,1 µg/mL.

Os quatro extratos EAAB, EHAB, EE70AB e EEAB testados demonstraram atividade inibitória na produção de NO comparáveis ao inibidor seletivo da iNOS, o L-NIL que exibiu um IC₅₀ de 47,0 ± 2,5 µg/mL na concentração de 0,1 mM, o ácido gálico 12,2 ± 4,9 µg/mL e quercetina 39,9 ± 0,3 % na concentração de 10 µg/mL, usados com controle positivo.

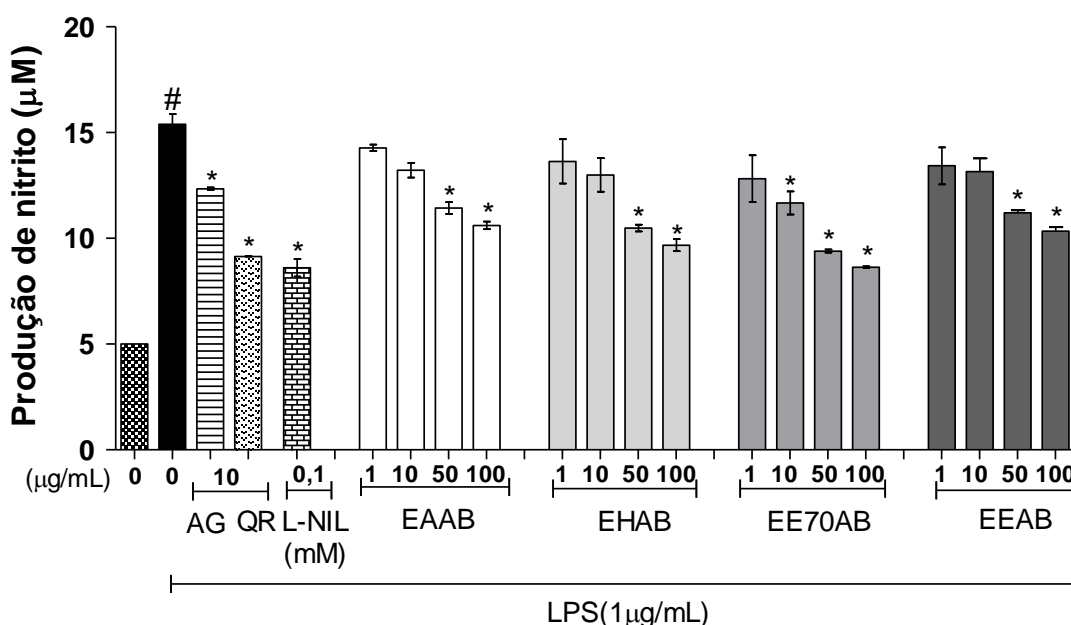


Figura 4. Efeito dos extratos das folhas da *A. brasiliiana* na produção de NO em macrófagos estimulados com LPS. Macrófagos RAW 264.7 foram tratados com várias concentrações dos extratos e após 30 min receberam ou não LPS como estímulo. Após incubação por 20 h, o sobrenadante foi coletado e a produção de NO foi determinada utilizando o Reagente de Griess. Os resultados foram expressos como média ± DV de três experimentos independentes. *Significativo quando $p < 0,05$ comparado com o controle com células induzidas por LPS. # controle versus controle + LPS. QR: quercetina; AG: ácido gálico; EAAB: extrato aquoso, EHAB: extrato hexânico, EE70AB: extrato 70% etanólico, EEAB: extrato 100% etanólico.

Os efeitos anti-inflamatórios dos extratos EAAB, EHAB, EE70AB e EEAB em macrófagos estimulados por LPS foram avaliados pela sua capacidade de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α). Como observado na figura 5, a estimulação com LPS por 24 h aumentou significativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α), indicando a ativação das células RAW 264.7. Os quatro extratos apresentaram efeito inibitório significativo na produção de IL-6 e TNF- α em macrófagos estimulados com LPS.

No ensaio da dosagem de TNF- α (figura 5 A), todos os extratos apresentaram inibição significativa e em dose dependência desta citocina pró-inflamatória. Os EAAB ($34,0 \pm 1,9$ %), EHAB ($45,4 \pm 1,9$ %), EE70AB ($85,8 \pm 2,2$ %) EEAB ($67,3 \pm 2,4$ %) na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. O ácido gálico testado na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ apresentou inibição de $21,5 \pm 2,8$ %.

Os extratos EHAB, EE70AB e EEAB foram capazes de inibir a produção de IL-6 de maneira dose-dependente, com concentrações semelhantes aos níveis basais de IL-6 (figura 5 B). Na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, os EE70AB ($62,6 \pm 5,0$ %) e EEAB ($77,2 \pm 4,9$ %) apresentaram maior inibição quando comparado ao ácido gálico usado como controle positivo na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, que apresentou inibição de $34,4 \pm 1,2$ %.

Apesar dos extratos da *A. brasiliensis* terem apresentado inibição significativa na produção das citocinas pró-inflamatórias testadas, não se observou nenhum efeito sobre a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 (resultados não apresentados).

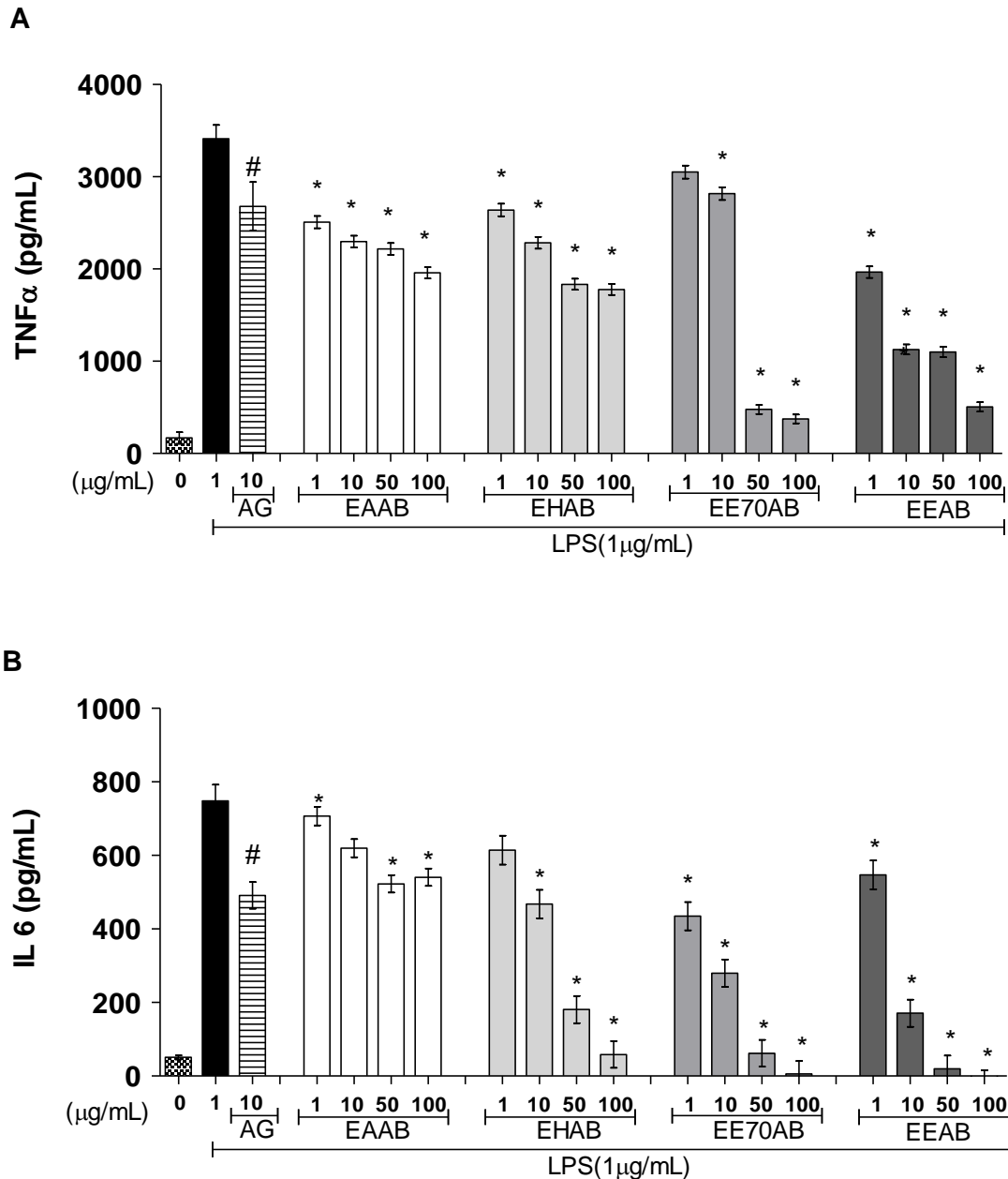


Figura 5. Efeito dos extratos das folhas de *A. brasiliiana* na produção de TNF- α (A) e IL-6 (B) em macrófagos estimulados com LPS. Macrófagos RAW 264.7 foram tratados com várias concentrações dos extratos e após 30 min receberam ou não estímulo com LPS. Após 24h de incubação, o sobrenadante foi coletado e a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF α e IL-6 foi determinada utilizando kits por ELISA seguindo as especificações do fabricante. Os resultados foram expressos como média \pm DV de três experimentos independentes. *Significativo quando $p < 0,05$ comparado com o controle com células induzidas por LPS. # controle versus controle + LPS. EAAB: extrato aquoso, EHAB: extrato hexânico, EE70AB: extrato 70 % etanólico, EEAB: extrato 100 % etanólico.

3.6.3 Determinação da atividade do fator nuclear kappa B

Como os extratos apresentaram satisfatória atividade antioxidante e capacidade de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, foi investigado o possível efeito inibitório dos extratos da *A. brasiliiana* sobre o fator de transcrição NF- κ B. Conforme observado na figura 6, os quatros extratos testados na concentração de 20 μ g/mL apresentaram um efeito inibitório em torno de 35 %. Resultados semelhantes foi observado com o TPCK (833,3 μ M), utilizado como controle positivo.

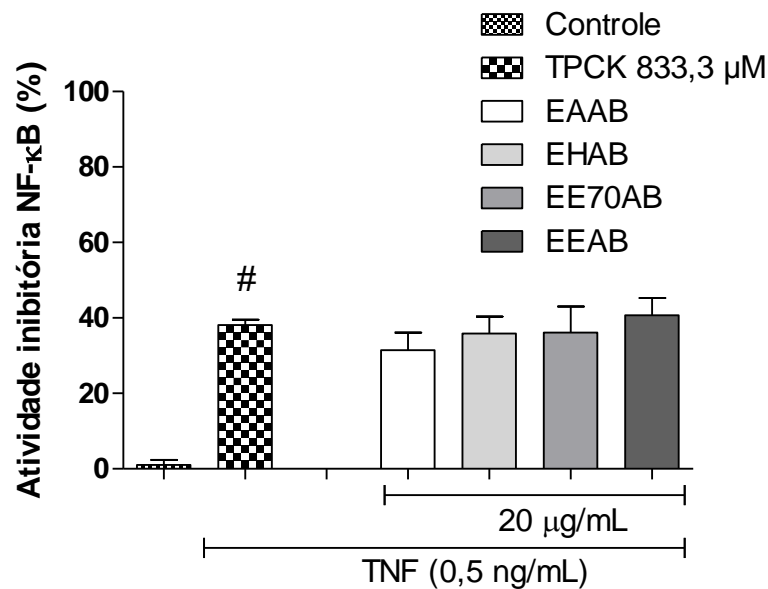


Figura 6. Efeito dos extratos da folha de *A. brasiliiana* sobre a atividade do NF- κ B em cultura de células embrionárias renal humanas 293 HEK. As células foram estimuladas com TNF- α e após 24 h de incubação o sobrenadante foi coletado e a atividade do NF- κ B determinada utilizando kit de ensaio Luc da Promega. Os resultados foram expressos como média \pm DV de três experimentos independentes. # Significativo quando $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (basal). EAAB: extrato aquoso, EHAB: extrato hexânico, EE70AB: extrato 70 % etanólico, EEAB: extrato 100 % etanólico.

3.6.4 Determinação da p-p38/p38 MAPK

Para avaliar a expressão de p-p38/p38 MAPK, foi utilizado a análise de Western blot, em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados ou não com LPS. Como observado na figura 7 A, a estimulação com LPS aumentou significativamente a produção de p-

p38, indicando a ativação das células RAW 264.7. Os quatro extratos não apresentaram efeito inibitório significativo na produção de p-p38MAPK (forma ativa da p38) na concentração testada de 50 µg/mL.

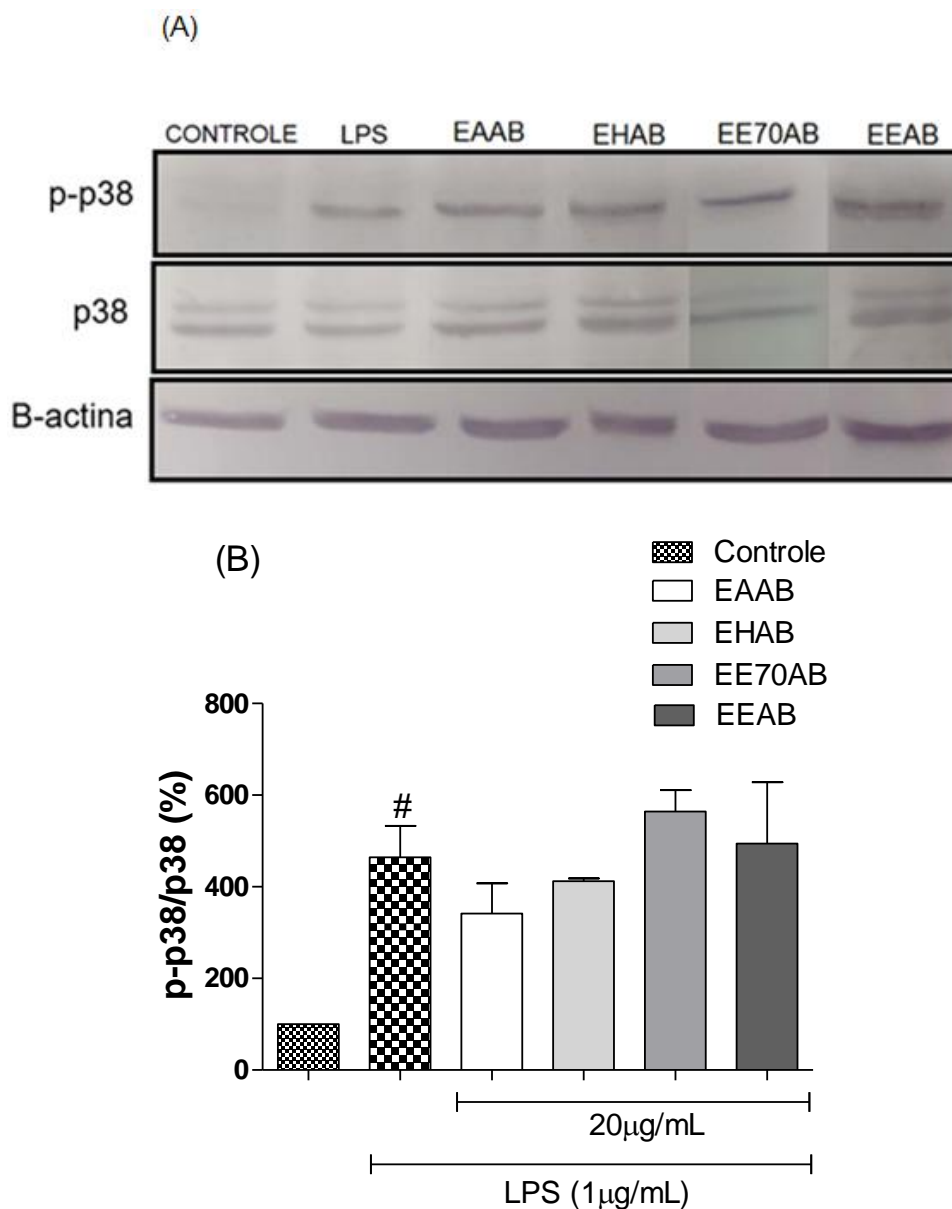


Figura 7. Efeito dos extratos das folhas de *A. brasiliiana* sobre a expressão da p-p38 e p38 MAPK em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS. (A) Análise de Western blot representativas da expressão de p38 e p-p38 MAPK em macrófagos RAW 264.7. (B) Expressão relativa de p38 e p-p38 MAPK em macrófagos RAW 264.7 expressas em unidades densitométricas padronizadas. Os Macrófagos RAW 264.7 foram tratados com os extratos (50 µg/mL) e/ou LPS (1 µg/mL) por 24h. Foi realizada a extração de proteínas e foram quantificadas pelo método de Lowry. A beta-actina foi usada como controle interno. Os resultados foram expressos como média ± DV de três experimentos independentes. *Significativo quando $p < 0,05$ comparado com o controle com células induzidas por LPS. EAAB: extrato aquoso, EHAB: extrato hexânico, EE70AB: extrato 70 % etanólico, EEAB: extrato 100 % etanólico.

4. DISCUSSÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) cerca de 75% da população mundial depende ou faz uso de alguma planta medicinal, seus extratos vegetais e/ou seus princípios ativos na composição de medicamentos (Sagnia et al. 2014; Prasansuklab et al. 2018). A *A. brasiliiana* é considerada uma planta medicinal amplamente utilizada pela população para tratar diferentes enfermidades devido a suas propriedades cicatrizantes (Barua et al. 2012b), diurética, digestiva, depurativa, analgésica (De Souza et al. 1998), antibacteriana (Pereira et al. 2007; Coutinho et al. 2018) e anti-inflamatória (Kumar et al. 2011). Essas atividades tem sido atribuídas as principais classes de metabólicos secundários identificados na planta, com destaque para os polifenóis (Costa et al. 2012; Sdayria et al. 2018).

Corroborando com os achados na literatura, as análises dos extratos das folhas da *A. brasiliiana* evidenciaram a presença de polifenóis, flavonoides e taninos em diferentes concentrações em função do solvente empregado no processo extrativo. As oscilações nas proporções dos compostos encontradas, ocorreu principalmente devido à diferença polaridade do solvente empregado. Diferentes combinações de solventes têm sido amplamente utilizadas para a extração de polifenóis (Pinelo et al. 2004; Enechi et al. 2013).

Os polifenóis são compostos fitoquímicos bem conhecidos encontrados em muitas plantas e compartilham efeitos benéficos contra uma ampla variedade de patologias, incluindo inflamação, câncer, diabetes e doenças cardiovasculares. Entretanto, geralmente cada polifenol possui um determinado alvo molecular específico e distinto modulando diferentes processos biológicos. Dos cinco fenólicos identificados nos extratos EAAB e EE70AB das folhas da *A. brasiliiana*, todos apresentam atividades biológicas distintas e comprovadas na literatura. A luteolina (C-hexosil-luteolina-O-hexido), possui inúmeras propriedades biológicas descritas na literatura, destacando-se a sua capacidade de modular o Akt, Proteína-quinases ativadas por mitógenos (MAPK), NF- κ B, Proteína ativadora -1 (AP-1) (Ziyan et al. 2007; Seelinger et al. 2008), além da propriedade de reduzir a produção de NO, aumentar a expressão de enzimas antioxidantes, e suprimir a expressão de citocinas pró-inflamatórias (Harris et al. 2006; Chen et al. 2007; Kanai et al. 2016). A vitexina (apigenina-8-C-glucosideo) e seu isômero, a isovitexina (apigenina-6-C-glucosideo), também possuem

inúmeras atividade biológicas descritas na literatura como antioxidante, antinoceptiva, e anti-inflamatória, com comprovada eficácia na inibição de diferentes mediadores inflamatórios como a IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17, IL-33, TNF- α , COX-2, NF- κ B, iNOS, NO, PGE2, e aumento de IL-10 (He et al. 2016; Lv et al. 2016; Hu et al. 2018; Mu et al. 2018). A hesperidina, comumente encontrada em frutas cítricas, apresenta comprovadas atividades anti-inflamatória, imunomoduladora, antioxidante, anti-hipertensiva, antimicrobiana, anticarcinogênica, vasodilatadoras, anti-hipercolesterolipêmica, e neuroprotetora (Eghbaliferiz e Iranshahi, 2016)(Maneesai et al. 2018).

Nas plantas, os fenólicos geralmente encontram-se na forma de glicosídeos, conferindo, portanto, boa hidrossolubilidade a estes compostos (Proestos et al. 2006). Estudos realizados com as folhas da *A. brasiliana* também identificaram a presença dos fenólicos luteolina e a vitexina (Coutinho et al. 2018), e das flavonas glicopiranosil 1-vitexina, 2'-O-rhamnpiranosil-vitexina, pentosil-8-C-hexosil-apigenina (pentolsil-vitexina), pentosil-hexosil-apigenina (pentosil-isovitexina), vitexina (apigenina-8-C-glucosídeo) e derivados da vitexina (Deladino et al. 2017).

Dentre as diversas propriedade biológicas atribuídas aos fenólicos, destaca-se a atividade antioxidante, sendo esta devida às propriedades redox que permitem aos fenólicos agirem como agentes redutores e doadores de hidrogênio, sequestrantes de oxigênio singlete, hidroxila e quelantes de metais pesados.

Os resultados da análise fitoquímica correlacionaram-se positivamente com efeitos antioxidantes dos extatos da *A. brasiliana*. Os EAAB e EE70AB que apresentaram maior atividade antioxidante, também foram os que apresentaram maior concentração de polifenóis e taninos. Os resultados obtidos neste estudo demonstram que os extratos da *A. brasiliana* têm a capacidade de atuar como antioxidante por meio de redução do radical, doando hidrogênio, elétrons, e inibindo oxigênio. Ou seja, os compostos presentes nos extratos das folhas da *A. brasiliana*, estabilizam radicais livres para eliminar o dano potencial de sistemas biológicos, prevenindo o estresse oxidativo que acarretará em uma doença (Birasuren et al. 2013). Corroborando com os achados no presente estudo, Deladino et al. (2017) demonstraram que o extrato das folhas e caule da *A. brasiliana* exibiram capacidade de redução do ferro com valores de $190,6 \pm 8,4 \mu\text{M Fe}^{+2}/\text{g ps}$ e $74,1 \pm 5,6 \mu\text{M Fe}^{+2}/\text{g ps}$, respectivamente. Os autores

concluíram que esses resultados não se devem aos fenólicos, pois na folha e caule apresentaram baixas concentrações de fenólicos de $18,1 \pm 0,6$ mg EAG/g ps e $5,3 \pm 0,2$ mg EAG/g ps, respectivamente. Empregando o ensaio do DPPH, Pereira et al. (2013) demonstraram que extrato bruto e frações (acetato de etila, diclometano e butanol) das folhas de *A. brasiliiana* apresentaram atividade antioxidante sendo que a fração de acetato de etila foi a que apresentou maior atividade ($IC_{50} = 163,0$ μ g/mL). Enechi e colaboradores (2013), analisaram o extrato etanólico das folhas da *A. brasiliiana*, onde a concentração de $0,1$ μ g/mL inibiu 99,5% do radical DPPH; no FRAP a concentração de 100 μ g/mL inibiu 78,4%.

A produção espontânea de radicais livres constitui-se de um processo contínuo e fisiológico, e está envolvido na participação de inúmeros processos metabólicos contribuindo com os mecanismos de defesa do organismo. Porém, a produção excessiva conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos. (Sugimoto et al. 2016). A cronicidade do processo em questão desencadeia diferentes eventos patológicos como a inflamação, que por sua vez, está envolvida nos processos cardiovasculares, carcinogênicos e neurodegenerativos. No processo inflamatório, células são ativadas, dentre elas o macrófago. Essas células produzirão mediadores inflamatórios, sendo alguns deles o óxido nítrico, ânion superóxido, fatores de transcrição, e citocinas (Arulselvan et al. 2016).

O LPS faz com que vias de sinalização sejam ativadas, como o NF- κ B, e conseqüentemente estimula a liberação de citocinas com ação inflamatória IL-1 β , TNF- α , IL-6, entre outras além de mediadores como o NO. As citocinas são responsáveis pela sinalização do agente causador da lesão e promover a quimiotaxia e vasodilatação. Todavia, uma regulação da sua produção se faz necessário para evitar a cronicidade do processo inflamatório (Muniandy et al. 2018). O óxido nítrico também faz parte de numerosas condições fisiopatológicas sendo gerado pela iNOS e atuando contra agentes infecciosos, além de regular a imunidade. Entretanto quando presente em excesso, leva a morte celular e perturbação da homeostase tecidual. O controle da geração de NO é portanto considerado outro importante ponto de controle e regulação para o tratamento da inflamação (Min et al. 2009).

Em especial o EE70AB e o EAAB foram os extratos que exibiram os melhores resultados na inibição da produção de NO pelos macrófagos estimulados por LPS, e em conjunto, também apresentaram resultados significativos na inibição da produção do ânion superóxido e citocinas. Conforme a análise fitoquímica, a presença dos flavonoides luteolina, vitexina e hesperidina proporcionam um sinergismo de suas atividades, dentre elas a inibição da iNOS, a produção de NO e citocinas inflamatórias. Igualmente, no estudo da inibição da produção das citocinas inflamatórias IL-6 e TNF- α , os extratos apresentaram porcentagem de inibição próximas aos níveis basais, evidenciando a efetividade dos flavonóides na supressão destes mediadores inflamatórios, contribuindo para a resolução do processo inflamatório, impedindo a cronicidade e os agravos provocados por este processo.

Dos vários fatores transcricionais ativados pelas respostas inflamatórias, o NF- κ B e p38 MAPK são conhecidos por induzirem a transcrição de mediadores pró-inflamatórios, tais como indutores iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 e IL-6. Assim, consideramos que a via de sinalização do NF- κ B e/ou p38 poderiam estar envolvidas no mecanismo pelo qual os extratos suprimiram de forma significativa a produção do ânion superóxido, NO, TNF- α e IL-6. Neste contexto, os efeitos dos extratos das folhas da *A. brasiliiana* foram investigados sobre a sinalização de NF- κ B e p38 MAPK. Os resultados evidenciaram que o mecanismo molecular pelo qual os extratos das folhas inibem a expressão desses mediadores inflamatórios parece ser parcialmente dependente da ativação do NF- κ B e independente da via de sinalização do p38.

5. CONCLUSÕES

O presente estudo sugere que os extratos da *A. brasiliiana*, em especial o extrato EAAB e o extrato EE70AB têm a capacidade de inibir a produção de mediadores pró-inflamatórios como O₂⁻, NO, IL-6 e TNF- α em macrófagos estimulados por LPS e esta ação depende apenas parcialmente da sinalização de NF- κ B e independe da via do p38 MAPK. Além disso os extratos possuem a capacidade de eliminação de radicais livres diminuindo o estresse oxidativo. Estas propriedades biológicas podem ser atribuídas aos polifenóis e flavonoídes identificados como principais metabólitos

secundários presentes nos extratos estudados. Em conclusão, estes dados preliminares *in vitro* são considerados promissores e motivadores para futuros estudos biológicos e fitoquímicos para isolar e identificar os princípios ativos, que poderiam fornecer evidências científicas para uso popular da *A. brasiliiana* e contribuir para o desenvolvimento de novas terapias contra os distúrbios inflamatórios.

6. AGRADECIMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES).

7. REFERÊNCIAS*

*As referências listadas neste trabalho foram formatadas segundo as normas da revista *Inflammopharmacology*.

Adetutu A, Morgan WA, Corcoran O (2011) Antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation activity of crude extracts of *Bridelia ferruginea* leaf, a wound-healing plant of Nigeria. *J Ethnopharmacol* 133:116–119. doi: 10.1016/j.jep.2010.09.011

Alpay M, Backman LRF, Cheng X, et al (2015) Oxidative stress shapes breast cancer phenotype through chronic activation of ATM-dependent signaling. *Breast Cancer Res Treat* 151:75–87. doi: 10.1007/s10549-015-3368-5

Arulselvan P, Tan WS, Gothai S, et al (2016) Anti-inflammatory potential of ethyl acetate fraction of *moringa oleifera* in downregulating the NF- κ B signaling pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Molecules* 21:1–13. doi: 10.3390/molecules21111452

Barua CC, Ara Begum S, Talukdar A, et al (2012a) Influence of *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze on Altered Antioxidant Enzyme Profile during Cutaneous Wound Healing in Immunocompromised Rats. *ISRN Pharmacol* 2012:1–8. doi: 10.5402/2012/948792

Barua CC, Begum SA, Sarma DK, et al (2012b) Healing efficacy of methanol extract of leaves of *Alternanthera brasiliana* Kuntze in aged wound model. *J basic Clin Pharm* 3:341–5. doi: 10.4103/0976-0105.105336

Barua CC, Talukdar A, Begum SA, et al (2009) Wound healing activity of methanolic extract of leaves of *Alternanthera brasiliana* Kuntz using in vivo and in vitro model. *Indian J Exp Biol* 47:1001–1005

Barua CC, Talukdar A, Begum SA, et al (2012c) Effect of *Alternanthera brasiliana* (L) Kuntze on healing of dermal burn wound. *Indian J Exp Biol* 50:56–60

Benzie IFF, Strain JJ (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal Biochem* 239:70–76. doi: 10.1006/abio.1996.0292

- Birasuren B, Kim NY, Jeon HL, Kim MR (2013) Evaluation of the Antioxidant Capacity and Phenolic Content of *Agriophyllum pungens* Seed Extracts from Mongolia. *Prev Nutr food Sci* 18:188–95. doi: 10.3746/pnf.2013.18.3.188
- Brochado CDO, Almeida AP De, Barreto BP, Costa LP (2003) Flavonol Robinobiosides and Rutinosides from. 14:449–451
- Chen CY, Peng WH, Tsai KD, Hsu SL (2007) Luteolin suppresses inflammation-associated gene expression by blocking NF- κ B and AP-1 activation pathway in mouse alveolar macrophages. *Life Sci* 81:1602–1614. doi: 10.1016/j.lfs.2007.09.028
- Chen Y, Zhang X (2017) Pivotal regulators of tissue homeostasis and cancer: Macrophages. *Exp Hematol Oncol* 6:1–8. doi: 10.1186/s40164-017-0083-4
- Chiang N, Serhan CN (2017) Structural elucidation and physiologic functions of specialized pro-resolving mediators and their receptors. *Mol Aspects Med* 58:114–129. doi: 10.1016/j.mam.2017.03.005
- Choi HW, Klessig DF (2016) DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. *BMC Plant Biol* 16:1–10. doi: 10.1186/s12870-016-0921-2
- Chung WH (2017) Unraveling new functions of superoxide dismutase using yeast model system: Beyond its conventional role in superoxide radical scavenging. *J Microbiol* 55:409–416. doi: 10.1007/s12275-017-6647-5
- Costa G, Francisco V, C. Lopes M, et al (2012) Intracellular Signaling Pathways Modulated by Phenolic Compounds: Application for New Anti-Inflammatory Drugs Discovery. *Curr Med Chem* 19:2876–2900. doi: 10.2174/092986712800672049
- Coutinho, Marcela A. S.; Muzitano, Michele F.; Costa SS (2009) Flavonoides: Potenciais Agentes Terapêuticos para o Processo Inflamatório. *Rev virtual química* 1:241–256. doi: 10.5935/1984-6835.20090024
- Coutinho HDM, de Moraes Oliveira-Tintino CD, Tintino SR, et al (2018) Toxicity against *Drosophila melanogaster* and antiedematogenic and antimicrobial activities of *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze (Amaranthaceae). *Environ Sci Pollut Res* 25:10353–10361. doi: 10.1007/s11356-017-9366-x
- Coutinho PN, Pereira BP, Hertel Pereira AC, et al (2017) Chronic administration of

- antioxidant resin from *Viola oleifera* attenuates atherogenesis in LDLr^{-/-} mice. *J Ethnopharmacol* 206:65–72. doi: 10.1016/j.jep.2017.05.015
- De Souza MM, Kern P, Floriani AEO, Cechinel-Filho V (1998) Analgesic properties of a hydroalcoholic extract obtained from *Alternanthera brasiliana*. *Phyther Res* 12:279–281. doi: 10.1002/(SICI)1099-1573(199806)12:4<279::AID-PTR224>3.0.CO;2-G
- Deladino L, Alvarez I, De Ancos B, et al (2017) Betalains and phenolic compounds of leaves and stems of *Alternanthera brasiliana* and *Alternanthera tenella*. *Food Res Int* 97:240–249. doi: 10.1016/j.foodres.2017.04.017
- Dietl A, Maack C (2017) Targeting Mitochondrial Calcium Handling and Reactive Oxygen Species in Heart Failure. *Curr Heart Fail Rep* 14:338–349. doi: 10.1007/s11897-017-0347-7
- Eghbaliferiz S, Iranshahi M (2016) Prooxidant Activity of Polyphenols, Flavonoids, Anthocyanins and Carotenoids: Updated Review of Mechanisms and Catalyzing Metals. *Phyther Res* 1391:1379–1391. doi: 10.1002/ptr.5643
- Enechi OC, Odo CE, Wuave CP (2013) Evaluation of the in vitro anti-oxidant activity of *Alternanthera brasiliana* leaves. *J Pharm Res* 6:919–924. doi: 10.1016/J.JOPR.2013.09.006
- Eun-Jung Park, Li Shen, Dianqing Sun and JMP (2014) NIH Public Access. 6:790–795. doi: 10.1016/j.pmrj.2014.02.014.Lumbar
- Figueiredo CSSES, Branco Santos JC, Castro Junior JA de A, et al (2017) *Himatanthus drasticus* Leaves: Chemical Characterization and Evaluation of Their Antimicrobial, Antibiofilm, Antiproliferative Activities. *Molecules* 22:. doi: 10.3390/molecules22060910
- Fullerton JN, Gilroy DW (2016) Resolution of inflammation: A new therapeutic frontier. *Nat Rev Drug Discov* 15:551–567. doi: 10.1038/nrd.2016.39
- Gandhi J, Khera L, Gaur N, et al (2017) Role of modulator of inflammation cyclooxygenase-2 in gammaherpesvirus mediated tumorigenesis. *Front Microbiol* 8:1–12. doi: 10.3389/fmicb.2017.00538
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, et al (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and

- [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131–138. doi: 10.1016/0003-2697(82)90118-X
- Harris G, Qian Y, Leonard S, et al (2006) Nutrition and disease luteolin and chrysin differentially inhibit cyclooxygenase-2 expression and scavenge reactive oxygen species but similarly inhibit. *J Nutr* 136:1517–1521
- He M, Min JW, Kong WL, et al (2016) A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. *Fitoterapia* 115:74–85. doi: 10.1016/j.fitote.2016.09.011
- Hu J jian, Wang H, Pan C wei, Lin M xiang (2018) Isovitexin alleviates liver injury induced by lipopolysaccharide/D-galactosamine by activating Nrf2 and inhibiting NF- κ B activation. *Microb Pathog* 119:86–92. doi: 10.1016/j.micpath.2018.03.053
- Hu Z, Yang Y, Zhao Y, Huang Y (2017) The prognostic value of cyclooxygenase-2 expression in patients with esophageal cancer: Evidence from a meta-analysis. *Onco Targets Ther* 10:2893–2901. doi: 10.2147/OTT.S134599
- Hyung SC, Jun WK, Cha YN, Kim C (2006) A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *J Immunoass Immunochem* 27:31–44. doi: 10.1080/15321810500403722
- KANAI K, HATTA T, NAGATA S, et al (2016) Luteolin attenuates endotoxin-induced uveitis in Lewis rats. *J Vet Med Sci* 78:1229–1235. doi: 10.1292/jvms.16-0118
- Kondratyuk TP, Park E-J, Yu R, et al (2012) Novel marine phenazines as potential cancer chemopreventive and anti-inflammatory agents. *Mar Drugs* 10:451–64. doi: 10.3390/md10020451
- Krepesky PB, Isidório RG, De Souza Filho JD, et al (2012) Chemical composition and vasodilatation induced by *Cuphea carthagenensis* preparations. *Phytomedicine* 19:953–957. doi: 10.1016/j.phymed.2012.05.011
- Kumar S, Singh P, Mishra G, et al (2011) Phytopharmacological review of *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae). *Plant Sci* 1:41–47
- Lagrotta MHC, Wigg MD, Santos MMG, et al (1994) Inhibitory activity of extracts of *Alternanthera brasiliana* (amaranthaceae) against the herpes simplex virus. *Phyther Res* 8:358–361. doi: 10.1002/ptr.2650080609

- Ling J, Kumar R (2012) Crosstalk between NFκB and glucocorticoid signaling: A potential target of breast cancer therapy. *Cancer Lett* 322:119–126. doi: 10.1016/j.canlet.2012.02.033
- Lv H, Yu Z, Zheng Y, et al (2016) Isovitexin exerts anti-inflammatory and anti-oxidant activities on lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting MAPK and NF-κB and activating HO-1/Nrf2 pathways. *Int J Biol Sci* 12:72–86. doi: 10.7150/ijbs.13188
- Maneesai P, Bunbupha S, Potue P, et al (2018) Hesperidin Prevents Nitric Oxide Deficiency-Induced Cardiovascular Remodeling in Rats via Suppressing TGF-β1 and MMPs Protein Expression. *Nutrients* 10:1549. doi: 10.3390/nu10101549
- Marques FM, Figueira MM, Schmitt EFP, et al (2018) In vitro anti-inflammatory activity of terpenes via suppression of superoxide and nitric oxide generation and the NF-κB signalling pathway. *Inflammopharmacology* 1–9. doi: 10.1007/s10787-018-0483-z
- Marsico F, Paolillo S, Filardi PP (2017) NSAIDs and cardiovascular risk. *J Cardiovasc Med* 18:e40–e43. doi: 10.2459/JCM.0000000000000443
- Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, et al (2010) Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Rev Bras Reumatol* 50:552–580. doi: 10.1590/S0482-50042010000500008
- Min HY, Kim MS, Jang DS, et al (2009) Suppression of lipopolysaccharide-stimulated inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression by a novel humulene derivative in macrophage cells. *Int Immunopharmacol* 9:844–849. doi: 10.1016/j.intimp.2009.03.005
- Morais MCC, Luqman S, Kondratyuk TP, et al (2010) Suppression of TNF-α induced NFκB activity by gallic acid and its semi-synthetic esters: possible role in cancer chemoprevention. *Nat Prod Res* 24:1758–1765. doi: 10.1080/14786410903335232
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63
- Mu D, Xiang H, Dong H, et al (2018) Isovitexin, a potential candidate inhibitor of sortase

- a of staphylococcus aureus USA300. J Microbiol Biotechnol 28:1426–1432. doi: 10.4014/jmb.1802.02014
- Muniandy K, Gothai S, Badran KMH, et al (2018) Suppression of Proinflammatory Cytokines and Mediators in LPS-Induced RAW 264.7 Macrophages by Stem Extract of *Alternanthera sessilis* via the Inhibition of the NF- κ B Pathway. J Immunol Res 2018:1–12. doi: 10.1155/2018/3430684
- NASCIMENTO JÚNIOR, B.J.1*; TÍNEL, L.O.2; SILVA, E.S.2; RODRIGUES, L.A.2; FREITAS TON 2. N, X.P.1; AMORIM ELC. (2016) Avaliação do conhecimento e percepção dos profissionais da estratégia de saúde da família sobre o uso de plantas medicinais e fitoterapia em Petrolina-PE, Brasil. doi: 10.1590/1983-084X/15
- Ngwoke KG, Akwagbulam AG, Erhirhie EO, et al (2018) Antioxidant, Anti-inflammatory, Analgesic Properties, and Phytochemical Characterization of Stem Bark Extract and Fractions of *Anthocleista nobilis*. Pharmacognosy Res 10:81–87. doi: 10.4103/pr.pr_73_17
- Pelisoli Formagio EL, Mendel MT, Fracasso R, et al (2012) Evaluation of the pharmacological activity of the *Alternanthera brasiliana* aqueous extract. Pharm Biol 50:1442–1447. doi: 10.3109/13880209.2012.688058
- Pereira DF, Santos M, Pozzatti P (2007) Antimicrobial Activity of a Crude Extract and Fractions from *Alternanthera brasiliana* (L.) O. Kuntze Leaves. Lat Am J Pharm 26:893–896
- Pereira DF, Zanon RB, Dos Santos M, et al (2013) Antioxidant activities and triterpenoids isolated from *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze leaves. Nat Prod Res 27:1660–1663. doi: 10.1080/14786419.2012.750313
- Pereira DF, Zanon RB, Zanetti GD, et al (2008) e *Alternanthera dentata* (Amaranthaceae). 27:178–184
- Pinelo M, Rubilar M, Sineiro J, Núñez MJ (2004) Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). Food Chem 85:267–273. doi: 10.1016/j.foodchem.2003.06.020
- Poprac P, Jomova K, Simunkova M, et al (2017) Targeting Free Radicals in Oxidative

- Stress-Related Human Diseases. *Trends Pharmacol Sci* 38:592–607. doi: 10.1016/j.tips.2017.04.005
- Prasansuklab A, Theerasri A, Payne M, et al (2018) Acid-base fractions separated from *Streblus asper* leaf ethanolic extract exhibited antibacterial, antioxidant, anti-acetylcholinesterase, and neuroprotective activities. *BMC Complement Altern Med* 18:1–13. doi: 10.1186/s12906-018-2288-4
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26:1231–7
- Saeed N, Khan MR, Shabbir M (2012) Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complement Altern Med* 12:1. doi: 10.1186/1472-6882-12-221
- Sagnia B, Fedeli D, Casetti R, et al (2014) Antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from *Cassia alata*, *Eleusine indica*, *Eremomastax speciosa*, *Carica papaya* and *Polyscias fulva* medicinal plants collected in Cameroon. *PLoS One* 9:1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0103999
- Saha SK, Lee S Bin, Won J, et al (2017) Correlation between oxidative stress, nutrition, and cancer initiation. *Int J Mol Sci* 18:. doi: 10.3390/ijms18071544
- Samudrala P, Augustine B, Kasala E, et al (2015) Evaluation of antitumor activity and antioxidant status of *Alternanthera brasiliensis* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. *Pharmacognosy Res* 7:66. doi: 10.4103/0974-8490.147211
- Sartori T, Galvão dos Santos G, Nogueira-Pedro A, et al (2018) Effects of glutamine, taurine and their association on inflammatory pathway markers in macrophages. *Inflammopharmacology* 26:829–838. doi: 10.1007/s10787-017-0406-4
- Scherer R, Godoy HT (2009) Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chem* 112:654–658. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.06.026
- Sdayria J, Rjeibi I, Feriani A, et al (2018) Chemical Composition and Antioxidant, Analgesic, and Anti-Inflammatory Effects of Methanolic Extract of *Euphorbia retusa* in Mice. *Pain Res Manag* 2018:. doi: 10.1155/2018/4838413

- Seelinger G, Merfort I, Schempp CM (2008) Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin. *Planta Med* 74:1667–77. doi: 10.1055/s-0028-1088314
- Serhan CN (2017) Treating inflammation and infection in the 21st century: New hints from decoding resolution mediators and mechanisms. *FASEB J* 31:1273–1288. doi: 10.1096/fj.201601222R
- Staerck C, Gastebois A, Vandeputte P, et al (2017) Microbial antioxidant defense enzymes. *Microb Pathog* 110:56–65. doi: 10.1016/j.micpath.2017.06.015
- Sugimoto MA, Sousa LP, Pinho V, et al (2016) Resolution of inflammation: What controls its onset? *Front Immunol* 7:. doi: 10.3389/fimmu.2016.00160
- Tangvarasittichai S (2015) Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes* 6:456. doi: 10.4239/wjd.v6.i3.456
- Tsimogiannis DI, Oreopoulou V (2006) The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3',4'-hydroxy substituted members. *Innov Food Sci Emerg Technol* 7:140–146. doi: 10.1016/j.ifset.2005.09.001
- Tursun X, Zhao Y, Alat Z, et al (2016) Anti-Inflammatory Effect of Rosa rugosa Flower Extract in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW264.7 Macrophages. *Biomol Ther (Seoul)* 24:184–190. doi: 10.4062/biomolther.2015.090
- Vorobjeva N V, Pinegin B V (2015) Effects of the antioxidants Trolox, Tiron and Tempol on neutrophil extracellular trap formation. *Immunobiology*. doi: 10.1016/j.imbio.2015.09.005
- Wang M, Carver JJ, Phelan V V, et al (2016) Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat Biotechnol* 34:828–837. doi: 10.1038/nbt.3597
- Ziyan L, Yongmei Z, Nan Z, et al (2007) Evaluation of the anti-inflammatory activity of luteolin in experimental animal models. *Planta Med* 73:221–6. doi: 10.1055/s-2007-967122