

$\alpha$ -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

- <sup>1</sup>Ho, 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.
- <sup>2</sup>Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. *Free Radical Biology & Medicine*, v.20, p.933-956, 1996.
- <sup>3</sup>Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. *Trends in Plant Science*, v.2, p.152-159, 1997.
- <sup>4</sup>Bhattacharya J.; Majetich G.; Jenkins T.M.; Almida R.N. *Journal of Natural Products*, v.61, p.413-414, 1998.
- <sup>5</sup>Barreiros, A.L.B.S.; David, J.P.; Queiroz, L.P.; David, J.M. *Phytochemistry*, v.55, p.805-808, 2000.
- <sup>6</sup>David, 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.
- <sup>7</sup>Hegnauer, R. *Journal of Ethnopharmacology*, v.3, p.279-292, 1981.
- <sup>8</sup>Inigo, R.P.A.; Pomilio, A.B. *Phytochemistry*, v.24, p.347-349, 1985.
- <sup>9</sup>Chávez, J.P.; Dos Santos, I.D.; Cruz, F.G.; David, J.M. *Phytochemistry*, v.41, p.941-943, 1996.
- <sup>10</sup>Barreiros, 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.
- <sup>11</sup>Hidalgo, M.E.; Fernández, E.; Quilhot, W.; Lissi, E. *Phytochemistry*, v.37, p.1585-1587, 1994.
- <sup>12</sup>Malterud, 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.<sup>1</sup>, Placeres, M.P.<sup>1</sup>, Moreira, R.R.D.<sup>2\*</sup>, Santos, L.E. dos<sup>2</sup>, Carlos, I.Z.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Análises Clínicas, UNESP-Araraquara, SP, Brasil

<sup>2</sup>Departamento 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

estimulação de macrófagos, que são células conhecidas por terem uma importante função de defesa do organismo quando são estimuladas. O óxido nítrico tem sido identificado como molécula de multifunções envolvendo um número grande de processos fisiológicos tais como, regulação do sistema imune<sup>1,2,4,5,6,7,8,9,10,11</sup>. *Achillea millefolium* L. (Asteraceae), popularmente conhecida como "mil-folhas" é usada na medicina popular como antiinflamatória e adstringente. Contém óleos essenciais (principalmente azuleno)<sup>12</sup> e flavonóides. O presente trabalho teve como objetivos avaliar a atividade imunológica do óleo essencial bruto e do extrato etanólico 70% bruto de *A. millefolium* L. (Asteraceae) utilizando-se métodos colorimétricos *in vitro* de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos através da liberação de compostos reativos de nitrogênio (NO).

A produção de NO pelos macrófagos ocorre em resposta a um estímulo antigênico. O aumento na produção de óxido nítrico pelos macrófagos pode alterar o equilíbrio entre os mecanismos de defesa do hospedeiro e a virulência do patógeno, diminuindo a suscetibilidade a infecções. Observando-se a Figura 1, pode-se notar que ocorreu uma pequena produção de óxido nítrico quando o óleo essencial estava diluído a 1:50, enquanto que houve uma produção mais relevante, quando o óleo essencial estava diluído a 1:100. Com relação ao extrato etanólico 70%, pode-se observar na Figura 2 que a produção de óxido nítrico é maior nos extratos mais concentrados.

Analisando-se os resultados pode-se sugerir que tanto o óleo essencial da *Achillea millefolium* L. quanto o extrato etanólico 70% são agentes moduladores da ativação de macrófagos. Pretendemos dar continuidade a este trabalho, buscando caracterizar quais componentes presentes na "mil-folhas" podem apresentar efeitos mais específicos no sistema imunológico, através de outros testes que possam, assim, esclarecer essa delicada relação no organismo hospedeiro.

## Material e Métodos

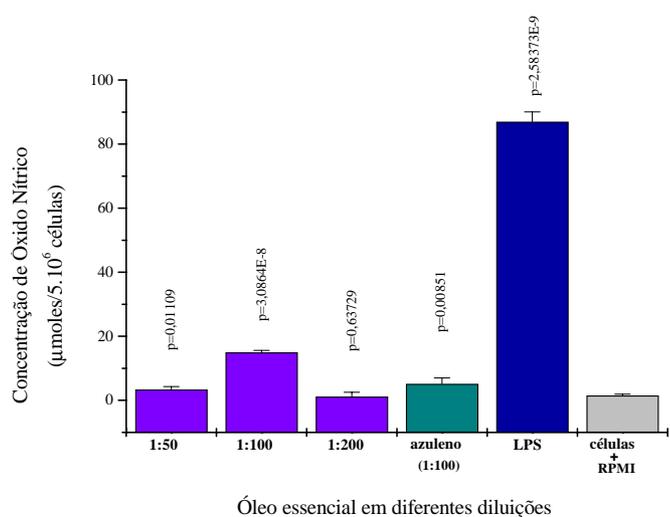
**Preparação do óleo essencial e do extrato etanólico 70%:** Pelo processo de arrastamento com vapor de água foi obtido o óleo essencial de *A. millefolium* L. [13], que foi sonicado em RPMI-1640 durante 6 minutos, em banho de gelo, e posteriormente esterilizado em membrana de 0,45 µm. Foram analisadas diluições de 1:50, 1:100 e 1:200 do óleo essencial. O extrato etanólico 70% bruto foi obtido por turbo-extração utilizando-se etanol 70%. E a solução resultante foi liofilizada. O extrato etanólico bruto foi diluído em DMSO, obtendo-se uma solução-mãe (50mg/mL) a qual foi diluída novamente em RPMI-1640. Obtiveram-se, assim, os extratos nas

concentrações de 10 mg/mL, 8 mg/mL, 6 mg/mL, 4 mg/mL, 2 mg/mL e 1 mg/mL, de modo que nenhuma concentração testada tivesse mais do que 20% de DMSO.

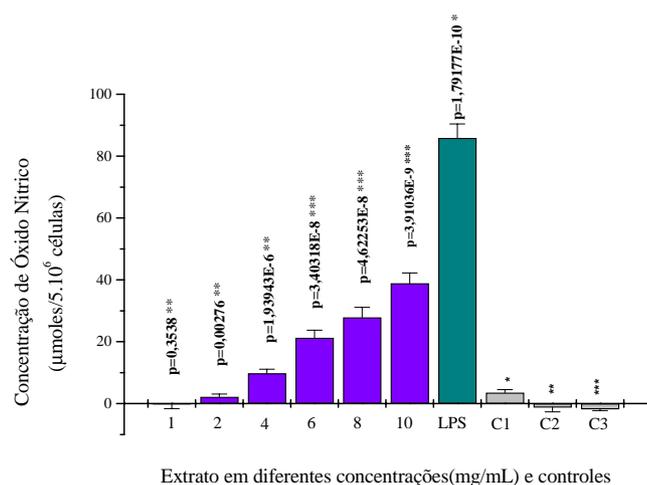
**Obtenção dos macrófagos:** Foram obtidos de camundongos Swiss fêmeas de 6 a 8 semanas de idade, pesando entre 18 e 25 g, provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP-Câmpus de Araraquara. E receberam ração balanceada e água *ad libitum*. Na cavidade peritoneal de cada animal foram inoculados 3,0 mL de tioglicolato de sódio (Difco) a 3%, três dias antes da coleta de células. O sacrifício dos animais foi realizado 72 h após, separadamente, por asfixia, em cuba de vidro contendo algodão embebido em éter sulfúrico. Os animais foram colocados em suporte onde ficaram imobilizados pelas patas com o abdome voltado para cima. Dentro da câmara de fluxo laminar (Veco), após a anti-sepsia do abdome com álcool iodado a 0,3% o peritônio dos camundongos foi exposto com o auxílio de duas pinças. A seguir foi injetada intraperitonealmente, 5,0 mL da solução salina tamponada de fosfatos (PBS), pH 7,4 estéril (Difco). Os abdômens foram suavemente massageados e a suspensão celular foi coletada com o auxílio de uma seringa e agulha descartáveis. O material obtido foi colocado em tubos plásticos e centrifugados a 225 x g durante 10 min e ressuspensos na mesma solução, sempre mantida à 4 oC.

**Determinação de óxido nítrico (NO)<sup>3</sup>:** O óxido nítrico quantificado pelo acúmulo de nitrito em meio de cultura foi medido espectrofotometricamente usando reação de Griess com NaNO<sub>2</sub> como padrão. Foi preparada uma suspensão de células a 5x10<sup>6</sup>/mL de RPMI -1640 (Sigma), contendo penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 U/mL, glutamina 2 mM e soro fetal bovino à 5%. A cada escavação da placa de cultura de tecido foram transferidas alíquotas de 0,1 mL da suspensão de células, 0,1 mL da solução dos extratos bruto (20; 10; 5 mg/mL). Após incubação por 24 h a 37 oC em atmosfera úmida, alíquotas de 50 µL do sobrenadante foram misturadas com 50 mL da solução de Griess (sulfanilamida 0,1% em solução de ácido fosfórico a 50% e N-1 naftilenodiamina a 0,1%). A absorbância foi lida após 15 min a 540 nm, contra branco constituído e RPMI-1640 e dimetilsulfóxido (DMSO). Os resultados foram expressos em micromoles de nitrito/5x10<sup>6</sup> células peritoneais a partir de uma curva padrão previamente estabelecida, constituída de concentrações molares de nitrito de sódio conhecidas em RPMI-1640.

**Análise estatística:** Os dados experimentais foram tratados estatisticamente pelo teste - t de Student através do programa estatístico Microcal Origin 5.0.



**Figura 1.** Produção de óxido nítrico (NO) em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos estimulados com diferentes concentrações do óleo essencial da *Achillea millefolium* L.



**Figura 2.** Produção de óxido nítrico (NO) em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos estimulados com o extrato etanólico 70% bruto da *Achillea millefolium* L. e com solução de lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS) e com as amostras testadas (1 mg/mL, 2 mg/mL, 4 mg/mL, 6 mg/mL, 8 mg/mL e 10 mg/mL)

## Referências

- <sup>1</sup>Bagchi, D.; Kuszynski, C.; Balmoori, J.; Bagchi, M.; Stohs, S.J. Hydrogen peroxide-induced modulation of intracellular oxidized states in cultured macrophage J7774A.1 and neuroactive PC-12 cells, and protection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Phytotherapy Res.*, v.12, p.568-571, 1998.
- <sup>2</sup>Barsukov, A.; Vetoshkin, A.; Vorontsov, E.; Dubichev,

A. Macrophage activation by sanquirythrine. *Planta Med.*, v.56, p.696-697, 1990.

- <sup>3</sup>Feder, L.S.; Laskin, D.L. Regulation of hepatic endothelial cell and macrophage proliferation and nitric oxide production by GM-CSF, M-CSF AND IL-1 b following acute endotoxemia. *J. Leukoc. Biol.*, v.55, p.507-513, 1994.
- <sup>4</sup>Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.*, v.219, p.1-14, 1984.
- <sup>5</sup>Hase, K.; Basnet, P.; Kadota, S.; Namba, T. Immunostimulating activity of Celosian, an antihepatotoxic polysaccharide isolated from *Celosia argentea*. *Planta Med.*, v.63, p.216-219, 1996.
- <sup>6</sup>Kiechle, F.L.; Malinski, T. Nitric oxide: Biochemistry, pathophysiology, and detection. *Clin. Chem.*, p.567-574, 1993.
- <sup>7</sup>Kim, H.M.; OH, D.I.; Chung, C.K. Production of nitric oxide in mouse peritoneal macrophages priming with interferon- $\gamma$  by the stem of *Sinomenium acutum*. *J. Ethnopharmacol.*, v.66, p.311-317, 1999a.
- <sup>8</sup>Kim, N.Y.; Kang, T.H.; Pae, H.O.; Choi, B.M.; Chung, H.T.; Myung, S.W.; Song, Y.S.; Sohn, D.H.; Kim, Y.C. *In vitro* inducible nitric oxide synthesis inhibitors from *Alismatis rhizoma*. *Biol. Pharm. Bull.*, v.22, p.1147-1149, 1999b.
- <sup>9</sup>Puri, A.; Saxena, R.P.; Saxena, K.C. Immunostimulant agents from *Andrographis paniculata*. *J. Nat. Prod.*, v.56, p.995-999, 1993.
- <sup>10</sup>Roit, I.; Brostoff, J.; Male, D. *Imunologia*, 5. ed. Grã-Betanha: Manole, 1999. 423p.
- <sup>11</sup>Shinde, U.A.; Phadke, A.S.; Nair, A.M.; Mungantiwar, A.A.; Dikshit, V.J.; Saraf, M.N. Preliminary studies on the immunomodulatory activity of *Cedrus deodora* wool oil. *Fitoterapia*, v.70, p.333-339, 1999.
- <sup>12</sup>Teske, M.; Trentini, A.M.M. *Herbarium compêndio de fitoterapia*. Curitiba: Ed. Herbarium, p. 217-219, 1997.
- <sup>13</sup>Wasicky, R. Uma modificação do aparelho de Clevenger para extração de óleos essenciais. *Rev. Fac. Farm. Bioquim.*, v.1, p.7-81, 1963.

## \* Autora para correspondência:

Profa. Dra. Raquel Regina Duarte Moreira  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Departamento de Princípios Ativos Naturais  
UNESP - Rodovia Araraquara-Jaú Km 1  
Campus Universitário  
CEP 14.801-902 - Araraquara-SP