



Avaliação preliminar da associação entre anfotericina e hesperina com oxidantes e células huvec

Francine Alessandra Manente¹; Ana Flavia Tostes da Silva¹; Josiane Aparecida Schemberger¹; Isabella Aparecida Heinrich¹; Antonio Carlos Mattar Munhoz¹; Flávio Luis Beltrame¹; Danielle Cardoso Geraldo Maia¹; Ana Carolina Urbaczek¹; Iracilda Zeppone Carlos¹; José Carlos Rebuglio Velloso²

¹ Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas, Laboratório de Imunologia Clínica, Araraquara-SP, Brasil.

² Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa-PR, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Laboratório de Análises Moleculares e Bioquímicas, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Ponta Grossa, PR, Brasil.

RESUMO

A anfotericina B (AmB) é fármaco “padrão ouro” para o tratamento de infecções fúngicas invasivas desde 1960. Entretanto, a anfotericina B apresenta elevada toxicidade, a qual manifesta-se mais frequentemente nos rins e no fígado. Sabe-se, desde 1985, que a auto-oxidação da AmB origina diferentes formas de espécies reativas oxidativas e estas, por serem tóxicas para a célula, seriam responsáveis, em parte, pela toxicidade. Diferentes estudos indicam que a hesperidina contribui por meio do decréscimo do estresse oxidativo, para a proteção renal e contra a injúria gerada pela isquemia. Tal fato e o envolvimento da AmB na geração de radicais livres tornam interessante a avaliação preliminar do efeito da hesperidina e AmB (isoladamente ou associadas) frente a espécies reativas do oxigênio e radicais livres, bem como o estudo das mesmas em modelos de citotoxicidade. Frente ao ABTS^{•+}, a AmB apresentou IC₅₀ igual a 0,0124mg/mL, mas quando associada a hesperidina este valor caiu para 0,0003mg/mL. Frente ao HOCl, a AmB apresentou IC₅₀ igual a 0,0056, mas quando associada a hesperidina este valor caiu para 0,0023mg/mL. No ensaio com DPPH[•] e radical ânion superóxido as amostras não foram efetivas. No ensaio com células endoteliais em cultivo (HUVEC), as associações reduziram a viabilidade celular. Estes resultados preliminares evidenciam a interação dos compostos com espécies reativas bem como indicam possibilidade de exacerbação do dano pela AmB na presença dos antioxidantes em um modelo *in vitro*.

Palavras-chave: Hesperidina. Anfotericina B. Estresse oxidativo. Citotoxicidade.

INTRODUÇÃO

A anfotericina B (AmB) é um agente antifúngico poliênico isolado pela primeira vez do *Streptomyces nodosus* em 1955 (Kleinberg, 2006). A formulação convencional da AmB (Fungizone®) é de micelas mistas com o desoxicolato de sódio, e desta forma é o fármaco de escolha para infecções sistêmicas com espécies de fungos sensíveis (Barrat; Bretagne, 2007). A anfotericina B é antifúngico “padrão ouro” para infecções fúngicas invasivas desde 1960 (Khan & Owais, 2006).

É amplamente aceito que as moléculas de AmB interagem com membranas celulares e formam canais iônicos transmembrana. De acordo com a teoria mais popular (“hipótese do esterol”), a presença de esteróis na membrana celular é necessária para a manifestação quimioterapêutica relevante da atividade formadora de canais iônicos pela AmB (Czub *et al.*, 2007).

A anfotericina B exerce efeito sobre as células fúngicas formando complexos com o ergosterol e fosfolipídios da membrana, permitindo o escape de íons (Na⁺, K⁺ e Mg²⁺) e outros componentes vitais para a célula (Lincopan *et al.*, 2005). As cadeias poli-hidroxicas formam as paredes internas hidrofílicas destes poros (Kleinberg, 2006). A aplicação terapêutica da AmB é baseada em sua maior reatividade contra membranas contendo ergosterol (principal esterol em fungos) do que membranas que contenham colesterol (esterol de mamíferos). Entretanto, este efeito diferencial da AmB entre células fúngicas e de mamíferos é muito pequeno, o que caracteriza a baixa seletividade responsável pela toxicidade da AmB (Czub *et al.*, 2007).

Alguns estudos demonstraram que a capacidade antifúngica da anfotericina B é muito mais complexa do que a simples formação de poros na membrana celular do microrganismo, indicando que a formação destes poros não é essencial para o efeito fungicida da AmB, enquanto outros estudos concluíram que a ocorrência de estresse oxidativo por meio da liberação de espécies reativas de oxigênio melhora a ação da AmB no dano celular à *C. albicans* e *C.*

neoformans (González-Párraga *et al.*, 2011). A geração em excesso de radicais livres e acúmulo de cálcio, conseqüentes da ação da AmB, desencadeia a morte celular via apoptose e necrose (Berdichevski & Manfro, 2003).

Desta forma, é objetivo deste trabalho uma avaliação preliminar da associação de um antioxidante natural à AmB na ação contra agentes oxidantes *in vitro* bem como sobre células endoteliais HUVEC em cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Ação scavenger sobre o radical ABTS•+

A ação das amostras frente ao radical ABTS•⁺ (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6'-sulfonic acid) - Sigma-Aldrich) foi verificada segundo metodologia descrita por Pellegrini *et al.* (1999), com pequenas modificações. Os ensaios foram realizados em tampão fosfato de sódio 10mM (pH 7,0) por meio do decréscimo da absorbância em 734 nm, de acordo com Velloso *et al.* (2007).

Ação scavenger sobre radical DPPH•

A ação das amostras sobre radicais livres foi avaliada por meio do decréscimo da absorbância em 531nm da solução de DPPH• (2,2 Diphenyl-1-picrylhydrazyl - Sigma-Aldrich) na concentração de 60 µM em etanol absoluto, segundo Soares *et al.* (1997).

Atividade scavenger sobre o HOCl

As reações foram feitas de acordo com Costa *et al.* (2004), com algumas modificações. A concentração da solução de HOCl (Ácido Hipocloroso) é determinada espectrofotometricamente em 295nm. As reações foram realizadas em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4 com incubação de 10 minutos das amostra com HOCl (30 µM) e por mais 5 minutos após adição de TMB (3',5',5'-Tetramethyl-benzidine - Sigma-Aldrich) na concentração de 2,8 mM. A leitura das absorbâncias foi feita em 652nm.

Atividade scavenger sobre o ânion superóxido

Este ensaio foi realizado de acordo com Kakkar (1984). O ânion superóxido reage com o NBT (Nitro blue tetrazolim - Sigma Chemical) para formar o cromóforo (formazana) cuja intensidade de cor, medida em 560 nm, é diretamente proporcional à concentração do radical.

Citotoxicidade: células endoteliais HUVEC (ATCC® CRL-2873™)

As células HUVEC (células endoteliais de veia umbilical humana), gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Dúlcinéia Saes Parra Abdalla da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo – USP, foram mantidas em meio RPMI (RPMI Medium 1640 – Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de solução de antibióticos/antimicóticos (Sigma), 1% de L-glutamina 200mM, 2g de bicarbonato de sódio e 4,68g de HEPES, e mantidas em estufa de 5% CO₂ à temperatura de

37°C. Para o ensaio de citotoxicidade, em uma placa de microtitulação de 96 cavidades de fundo plano (Corning, Inc.), utilizou-se 5x10⁵ céls HUVEC (células aderentes)/mL, dispersas em meio de cultura completo apropriado (RPMI-1640-C) (C = completo - contendo soro fetal bovino e mix de antibióticos e antimicóticos) por cavidade. O método baseado na capacidade que as células viáveis têm em clivar o anel tetrazólico presente no MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) pela ação de enzimas desidrogenases contidas na mitocôndria ativa, formando cristais de formazana (Mosmann, 1983).

Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados são apresentados como Média ± DP. Foram realizadas as análises de Teste t para as amostras isoladas, e quando estas estavam associadas em diferentes concentrações foi realizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, considerando-se p<0,05.

RESULTADOS

Avaliação antioxidante

Foi possível observar que a atividade da hesperidina (IC₅₀ = 0,0044mg/mL) foi maior que a da anfotericina (IC₅₀ = 0,0124mg/mL, Gráfico 1 e Tabela 1), sendo que as duas substâncias obtiveram uma boa ação na captura do radical ABTS•⁺.

Quando foram associadas diferentes concentrações de hesperidina com diferentes concentrações de anfotericina B (Tabela 2) também se pôde notar que as duas substâncias em conjunto foram capazes de capturar o radical ABTS•⁺ mais eficientemente, quando comparados com os dados da tabela 1. A associação da hesperidina à anfotericina reduziu o IC₅₀ desta última para 0,0003mg/mL.

Conforme apresentado no gráfico 2 e tabela 3, anfotericina B e hesperidina praticamente não apresentaram ação sobre o radical DPPH• e quando associadas (Tabela 4) observa-se ligeira alteração na captura do radical.

No ensaio frente o ácido hipocloroso, tanto a anfotericina quanto a hesperidina apresentaram ação na captura do oxidante, apresentando IC₅₀ de 0,0056mg/mL e 0,0109mg/mL, respectivamente (Gráfico 3, Tabela 5).

Na associação entre a hesperidina e a anfotericina (tabela 6), frente à hesperidina 0,004mg/mL e 0,002mg/mL a AmB apresentou valores de IC₅₀ de 0,0023mg/mL e 0,0043mg/mL, respectivamente, aumentando a ação antioxidante da anfotericina neste modelo de estudo.

As inibições máximas pelas amostras frente ao radical ânion superóxido foram alcançadas na concentração de 0,167mg/mL sendo que a hesperidina alcançou 25,7% de inibição (Gráfico 4, Tabela 7).

A anfotericina, na maior concentração testada, alcançou inibições de 26% na ausência de hesperidina (tabela 7) e 36,3% (tabela 8) quando associada à mesma, indicando que, quando associadas, apresentam ação *scavenger* de radical superóxido potencializada.

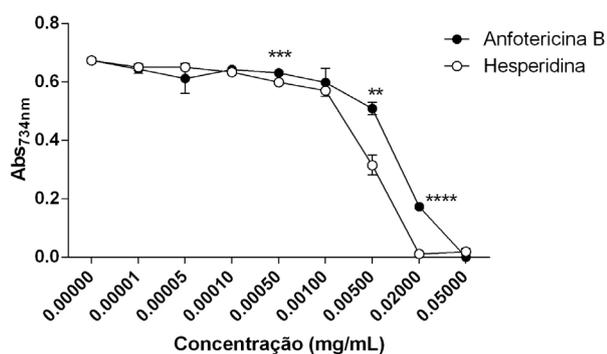


Gráfico 1 - Ação *scavenger* da anfotericina e hesperidina sobre o radical ABTS•+, em tampão fosfato de sódio 10mM, pH 7,0.

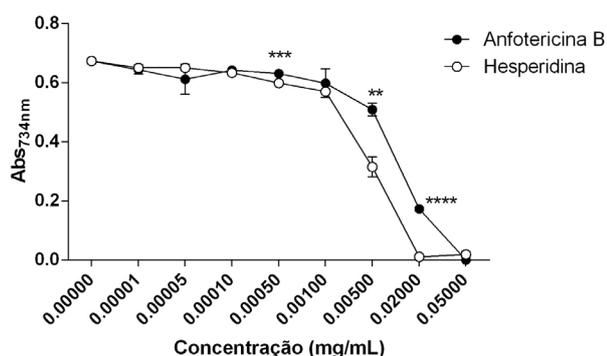


Gráfico 2 - Ação *scavenger* da anfotericina e hesperidina sobre o radical DPPH• (60µM), em etanol absoluto.

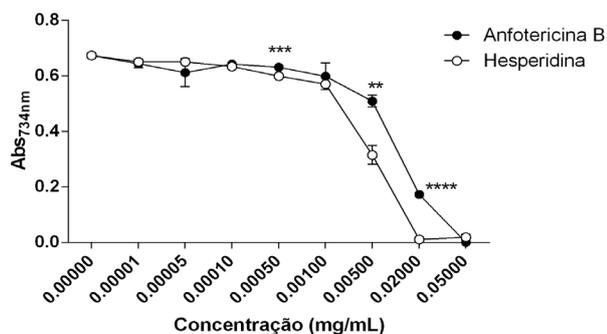


Gráfico 3 - Ação *scavenger* da anfotericina e hesperidina sobre o HOCl (**** p<0,0001, *** p<0,001, **p<0,01).

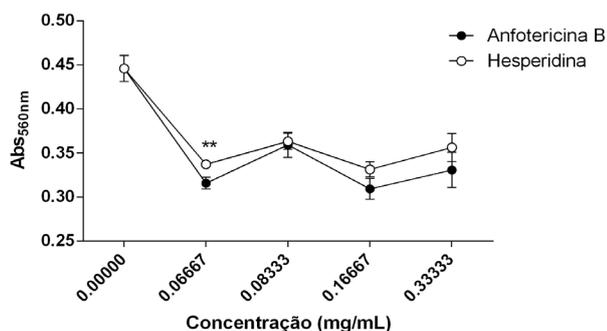


Gráfico 4 - Ação *scavenger* da anfotericina e hesperidina sobre o ânion superóxido (**p<0,01).

Tabela 1 - Ação *scavenger* da anfotericina e hesperidina sobre o radical ABTS•+.

Concentração (mg/mL)	Anfotericina B		Hesperidina	
	Média	±DP	Média	±DP
0,00001	0,6434	0,0140	0,6503	0,0110
0,00005	0,6117	0,0507	0,65	0,0076
0,0001	0,6423	0,0042	0,6337	0,0012
0,0005***	0,6313	0,0015	0,599	0,0061
0,001	0,5987	0,0479	0,5707	0,0025
0,005**	0,5093	0,0214	0,3153	0,0346
0,02****	0,173	0,0061	0,0107	0,0078
0,05	0	0	0,0193	0,0104

concentrações em que houve diferença estatística entre os grupos (**** p<0,0001, *** p<0,001, **p<0,01)

Tabela 3 - Ação *scavenger* da anfotericina e hesperidina sobre o radical DPPH•.

Concentração (mg/mL)	Anfotericina B		Hesperidina	
	Média	±DP	Média	±DP
0,00001	0,576	0,010 ^s	0,578	0,007
0,00005	0,5793	0,0125	0,578	0,0044
0,0001	0,5733	0,0159	0,5757	0,0086
0,0005	0,5717	0,0051	0,5743	0,0091
0,001	0,576	0,0104	0,5713	0,0081
0,005	0,554	0,0147	0,566	0,0165
0,01	x	x	0,564	0,0118
0,02	0,5253	0,0067	0,5523	0,0117
0,05	0,486	0,0042	0,4893	0,0125

não houve diferença estatística entre os grupos.

Tabela 5 - Ação *scavenger* da anfotericina e hesperidina sobre o HOCl.

Concentração (mg/mL)	Anfotericina B		Hesperidina	
	Média	±DP	Média	±DP
0,0002	0,4212	0,0120	0,4822	0,0078
0,0004	0,4657	0,0170	0,5067	0,0042
0,002	0,4135	0,0021	0,417	0,0190
0,004**	0,3145	0,0064	0,3777	0
0,02	0,1085	0,0332	0,1415	0,0035
0,04 ***	0,0093	0,002	0,0533	0,0014
0,06	0,0612	0,0050	0,0392	0,0219

concentrações em que houve diferença estatística entre os grupos (*** p<0,001, **p<0,01)

Tabela 7 - Ação *scavenger* da anfotericina e hesperidina sobre o ânion superóxido.

Concentração (mg/mL)	Anfotericina B		Hesperidina	
	Média	±DP	Média	±DP
0,33333	0,3307	0,0200	0,3563	0,0159
0,16667	0,3093	0,0120	0,3313	0,0085
0,08333	0,3593	0,0141	0,3633	0,0092
0,06667**	0,3157	0,0066	0,3372	0,0021
0	0,4460	0,0148	0,4460	0,0148

concentração em que houve diferença estatística entre os grupos (**p<0,01).

Tabela 2 - Ação *scavenger* sobre o radical ABTS•+: hesperidina associada com Anfotericina em diferentes concentrações.

ConC. Anfo. (mg/mL)	Hesperidina 0mg/mL(A)		Hesperidina 0,005mg/mL(B)		Hesperidina 0,001mg/mL(C)		Hesperidina 0,0005mg/mL(D)		Significância*
	Média	±DP	Média	±DP	Média	±DP	Média	±DP	
0,001	0,5987	0,0479	0,203	0,01769	0,556	0,01	0,586	0,008	* (A e C) ****(A e B, B e C, B e D)
0,005	0,5093	0,0214	0,14833	0,01097	0,41967	0,02359	0,432	0,01908	**** (A e B, B e C, B e D, A e C, A e D)
0,01	0,173	0,0061	0,073	0,01179	0,29267	0,02259	0,31	0,02227	**** (A e B, A e C, A e D, B e C, B e D)

(**** p<0,0001, *** p<0,001, **p<0,01)

Tabela 4 - Ação *scavenger* sobre o radical DPPH•: hesperidina associada com Anfotericina em diferentes concentrações.

ConC. Anfo. (mg/mL)	Hesperidina 0mg/mL(A)		Hesperidina 0,05mg/mL(B)		Hesperidina 0,02mg/mL(C)		Hesperidina 0,01mg/mL(D)		Significância*
	Média	±DP	Média	±DP	Média	±DP	Média	±DP	
0,001	0,576	0,0104	0,623	0,0072	0,655	0,0045	0,674	0,0118	*** (B e C) **** (B e D, A e B, A e C, A e D)
0,005	0,554	0,0147	0,631	0,0081	0,663	0,0066	0,659	0,0093	** (B e D) *** (B e C) **** (A e B, A e C, A e D)
0,02	0,5253	0,0067	0,594	0,003	0,6257	0,0065	0,6293	0,0071	*** (B e C, B e D) **** (A e B, A e C, A e D)

(**** p<0,0001, *** p<0,001, **p<0,01)

Tabela 6 - Ação *scavenger* sobre o HOCl: hesperidina associada com Anfotericina em diferentes concentrações.

Concentração Anfotericina (mg/mL)	Hesperidina 0mg/mL(A)		Hesperidina 0,002mg/mL(B)		Hesperidina 0,04mg/mL(C)		Significância*
	Média	±DP	Média	±DP	Média	±DP	
0,002	0,4135	0,0021	0,4243	0,0530	0,3713	0,003	* (A e C) ** (B e C)
0,004	0,3145	0,0064	0,432	0,0297	0,364	0,0014	** (B e C) *** (A e C)
0,02	0,1085	0,0332	0,3557	0,0141	0,2997	0,0014	* (A e B, B e C) **** (A e C)
0,04	0,0093	0,002	0,2853	0,0239	0,064	0	**** (A e C, B e C)
0,06	0,0612	0,0050	0,0447	0,0355	0,0192	0,0021	* (A e B) *** (A e C)

(**** p<0,0001, *** p<0,001, **p<0,01, *p<0,05)

Tabela 9 - Viabilidade (%) de células endoteliais (HUVEC) frente à anfotericina e suas associações com hesperidina, na ausência de estímulo LPS.

ConC. mg/mL	Anfotericina (A)		Hesperidina (B)		Anfo + Hesp (0,07810mg/mL) (C)		Significância*
	Média	±DP	Média	±DP	Média	±DP	
0,3125	34,80	5,54	59,97	9,68	29,07	8,19	* (A e C) *** (A e B)
0,0391	83,03	5,33	90,67	16,17	36,93	3,72	**** (A e C, B e C)
0,0195	94,55	6,29	93,23	8,24	38,90	0,46	**** (A e C, B e C)
0,0098	93,03	8,46	99,83	0,29	50,57	0,76	**** (A e C, B e C)

(**** p<0,0001, *** p<0,001, **p<0,01, *p<0,05)

Tabela 10 - Viabilidade (%) de células endoteliais (HUVEC) frente à anfotericina e suas associações com hesperidina, na presença de estímulo LPS.

ConC. mg/mL	Anfotericina (A)		Hesperidina (B)		Anfo + Hesp (0,07810mg/mL) (C)		Significância*
	Média	±DP	Média	±DP	Média	±DP	
0,3125	33,26	4,12	54,46	3,82	10,56	2,13	** (B e C) *** (A e C)
0,0391	88,93	4,99	84,72	2,57	51,87	1,63	**** (A e C, B e C)
0,0195	98,68	1,40	96,10	4,55	61,33	3,16	**** (A e C, B e C)
0,0098	99,27	0,89	96,16	1,57	88,89	1,68	**** (A e B, A e C, B e C)

(**** p<0,0001, *** p<0,001, **p<0,01, *p<0,05)

Tabela 8 - Ação *scavenger* sobre o ânion superóxido: hesperidina associada com anfotericina em diferentes concentrações.

Concentração Anfotericina (mg/mL)	Hesperidina 0mg/mL		Hesperidina 0,167mg/mL	
	Média	±DP	Média	±DP
0,33333	0,3307	0,0200	0,285	0,0050
0,16667	0,3093	0,0120	0,2843	0,0154
0,08333**	0,3593	0,0141	0,307	0,0072
0	0,4460	0,0148	0,4460	0,0148

concentração em que houve diferença estatística entre os grupos (**p<0,01)

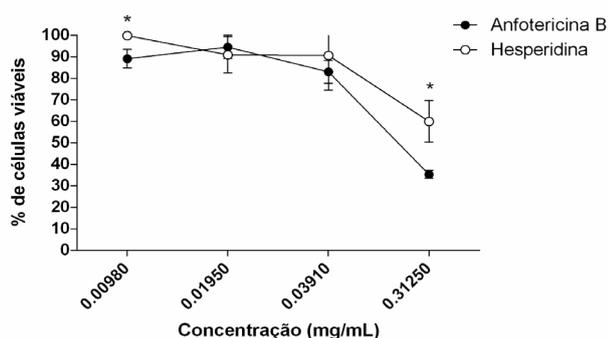


Figura 5 - Efeito das amostras sobre células endoteliais (HUVEC) nativas (sem estímulo) (*p<0,05).

Avaliação da citotoxicidade frente a células endoteliais: HUVEC (ATCC® CRL-2873™)

No teste de avaliação de citotoxicidade das amostras pelo MTT, a AmB e a hesperidina apresentaram citotoxicidade considerável à medida que, com o aumento da concentração, houve redução no número de células viáveis (Gráfico 5). Quando as amostras foram associadas (tabela 9) houve diminuição do número de células viáveis quando comparado às amostras sozinhas, demonstrando que quando associada à hesperidina, a AmB apresenta maior potencial de citotoxicidade.

Além disso, como pode ser observado na tabela 10, quando se estimula as células com LPS, e, portanto, se induz a produção de ERO/ERN, há ligeira alteração na morte celular promovida pelas amostras isoladamente, mas essa citotoxicidade é alterada significativamente quando as amostras são associadas, o que parece indicar um envolvimento importante das ERO neste processo.

DISCUSSÃO

A AmB é tida como agente pró-oxidante de membranas que causa estresse oxidativo devido à geração de radicais livres (Osaka *et al.*, 1997). De acordo com Wilson *et al.* (1991), a anfotericina também é uma substância pró-oxidante na medida em que é capaz de ativar macrófagos e aumentar a produção de ânion superóxido. O estímulo deste “burst” oxidativo em macrófagos pode sugerir que anfotericina B ativaria estas células via efeito direto na

membrana plasmática (Fillipin & Souza, 2006). Kudva *et al.* (2011) verificaram que a presença do produto natural curcumina reduziu significativamente a lise dos glóbulos vermelhos promovidos pela anfotericina B, indicando a possibilidade de moderar os efeitos tóxicos da mesma. Desta forma, a associação de um agente *scavenger* de radicais livres ou antioxidante, tal como a hesperidina, poderia reduzir a atividade citotóxica da AmB.

A anfotericina quando associada às diferentes concentrações de hesperidina - 0,005mg/mL, 0,001mg/mL e 0,0005mg/mL - apresentou alteração no valor de sua IC₅₀ contra o radical ABTS•+ respectivamente para 0,0003mg/mL, 0,0074mg/mL e 0,0083mg/mL. Isto demonstra que a presença do produto natural melhora a ação na captura de radicais livres pelo antifúngico. Essa ação em que a AmB associada a um antioxidante poderia ter sua atividade favorecida já havia sido proposta por Lamy-Freund *et al.* (1985).

Conforme obtido a partir da tabela 3, as inibições máximas pelas amostras frente ao DPPH• foram alcançadas na concentração de 0,05 mg/mL sendo que a hesperidina e anfotericina alcançaram 22% de inibição. Com 0,02 mg/mL, anfotericina e hesperidina promoveram respectivamente 15,8% e 11,5% de inibição. Jain e Parmar (2011) em seus estudos já haviam demonstrado que a hesperidina não possuía ação na captura do radical DPPH•. A anfotericina 0,02 mg/mL quando associada à hesperidina (tabela 4) alcançou 10%, 5% e 4% de inibição estando a hesperidina nas concentrações 0,05, 0,02 e 0,01mg/mL, respectivamente, indicando que, quando associadas, anfotericina e/ou hesperidina não apresentaram o mesmo potencial individual.

No estudo da ação contra o ácido hipocloroso, pode-se notar que a anfotericina apresentou melhor ação que a hesperidina, podendo isso ser explicado pela própria estrutura da anfotericina (sete ligações duplas conjugadas) (Osaka *et al.*, 1997). Ainda assim, a hesperidina apresenta boa ação que pode contribuir com a ação antioxidante das frutas cítricas em que a hesperidina está presente. No estudo de Ramful *et al.* (2010) para a laranja foi encontrada IC₅₀ de 3,98mg/mL e para o limão IC₅₀ de 10,70mg/mL, valores que quando comparados ao produto natural isolado são relativamente ruins, mas que podem ser explicados pelo processamento da fruta, conservação ou ainda pela presença de outros constituintes da mistura que podem interferir na ação final.

Na ação sobre o ânion superóxido, as duas substâncias testadas isoladamente ou associadas não apresentaram uma atividade considerável, discordando de Jovanovic *et al.* (1994), em que afirmaram que a hesperidina teria a propriedade de neutralizar o ânion superóxido.

As células endoteliais vasculares foram escolhidas devido a seu envolvimento na troca de metabólitos nos tecidos e por apresentarem papel fundamental na fisiologia normal e fisiopatologia do corpo humano (Bala *et al.*, 2011). A AmB como sendo agente pró-oxidante de membranas, causa estresse oxidativo devido à geração de

radicais livres (Osaka *et al.*, 1997). Desta forma, de acordo com os ensaios antioxidantes realizados, a associação da anfotericina com um produto natural promove uma boa ação antioxidante o que poderia alterar os efeitos nocivos da anfotericina relacionados a radicais livres (Osaka *et al.*, 1997). Entretanto, o contrário foi observado em nossos ensaios com células endoteliais, os quais evidenciaram a exacerbação da citotoxicidade da anfotericina quando da associação com a hesperidina. Este efeito pode ser consequência da ação de um possível produto formado da interação dos dois compostos e estudos mais aprofundados da interação entre as moléculas tornam-se necessários e estimulam a continuidade desta linha de pesquisa.

Yen *et al.* (2003) descreveram que flavonoides induziram dano no DNA de linfócitos por estimularem o estresse oxidativo nestas células, com redução dos níveis de antioxidantes, tais como grupos tiol da membrana e por induzirem lipoperoxidação. Ainda neste mesmo artigo, os autores relatam que alguns flavonoides poderiam se auto-oxidar e, desta forma, gerar radical anion superóxido e peróxido de hidrogênio. Desta forma, os resultados apresentados neste trabalho estariam coerentes com este mecanismo auto-oxidativo dos flavonóides.

Sendo assim, este estudo proporcionou uma avaliação prévia dos efeitos da associação da anfotericina com um antioxidante natural sobre agentes oxidantes. Esta alteração no processo oxidativo relacionado à anfotericina pode vir a ser considerada um mecanismo relevante no desenvolvimento de novas formulações contendo o antifúngico. Por outro lado, nossos resultados preliminares indicam elevação da citotoxicidade sobre células endoteliais quando da associação do antifúngico com a hesperidina e, portanto, novos estudos são necessários para esclarecer *in vivo*, as doses, a geração de produtos e possíveis consequências decorrentes desta associação.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Araucária pela bolsa concedida.

ABSTRACT

Preliminary assessment of the association between amphotericin and hesperetin with oxididants and huvec cells

Amphotericin B (AmB) is drug “gold standard” for the treatment of invasive fungal infections since 1960. However, amphotericin B has high toxicity, which manifests itself most often in the kidneys and in the liver. It is known, since 1985, that self-oxidation of AmB gives different forms of reactive oxidative species and these, being toxic to the cell, would be responsible, in part, by its toxicity. Different studies indicate that hesperidin contributes, through the reduction of oxidative stress, to protect against renal injury generated by ischemia. This fact and the involvement of AmB in the generation of free

radicals make it interesting the preliminary evaluation of the effect of hesperidin and AmB (alone or associated) against reactive oxygen species and free radicals, as well as the study on models of cytotoxicity. Front ABTS•+, AmB presented IC₅₀ equal to 0.0124 mg/mL, but when it was associated to hesperidin this value has decreased to 0.0003 mg/mL. Front HOCl, AmB presented IC₅₀ equal to 0.0056, but when it was associated to hesperidin this value has decreased to 0.0023 mg/mL. In the trials with DPPH• and the superoxide anion radical samples were not effective. In the assay with endothelial cell culture (HUVEC cells), the association has decreased cell viability. These preliminary results demonstrate the interaction of the compounds with reactive species as well as indicate the possibility of damage exacerbation by AmB in the presence of antioxidants in an *in vitro* model.

Keywords: Hesperidin. Amphotericin B. Oxidative stress. Cytotoxicity.

REFERÊNCIAS

Bala K, Ambwani K, Gohil NK. Effect of different mitogens and serum concentration on HUVEC morphology and characteristics: Implication on use of higher passage cells. *Tissue and Cell*, 2011;43:216-22.

Barrat G, Bretagne S. Optimizing efficacy of Amphotericin B through nanomodification. *Int J Nanomed*. 2007;2(3):301–13.

Berdichevski RH, Manfro RC. Nefrotoxicidade associada à anfotericina B em pacientes de baixo risco. [Dissertação] Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina, 2003.

Czub J, Borowski E, Baginski M. Interactions of amphotericin B derivatives with lipid membranes - A molecular dynamics study. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1768(10):2616–26.

Filippin FB, Souza LC. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *Rev Bras Ciênc Farm*. 2006;42(2):167-94.

González-Párraga P, Sánchez-Fresneda R, Zaragoza O, Argüelles J. Amphotericin B induces trehalose synthesis and simultaneously activates an antioxidant enzymatic response in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1810(8):777–83.

Jain M, Parmar HS. Evaluation of antioxidative and anti-inflammatory potential of hesperidin and naringin on the rat air pouch model of inflammation. *Inflamm Res*. 2011;60:483-91.

Jovanovic SV, Steenken S, Tosic M, Marjanovic B, Simic MG. Flavonoids as antioxidants. *J Am Chem Soc*. 1994; 116:4846–51.

Kakkar P, Das B, Viswanathan P N. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. *Ind J Biochem Biophys.* 1984; 21:130-2.

Khan MA, Owais M. Toxicity, stability and pharmacokinetics of amphotericin B in immunomodulator tuftsin-bearing liposomes in a murine model. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58(1):125-32.

Kleinberg M. What is the current and future status of conventional amphotericin B? *Int J Antimicrob Agents.* 2006;27:S12-S16.

Kudva AK, Manoj MN, Swamy BM, Ramadoss CS. Complexation of amphotericin B and curcumin with serum albumins: solubility and effect on erythrocyte membrane damage. *J Exp Pharmacol.* 2011;3:1-6.

Lamy-Freund MT, Ferreira VFN, Schreier S. Mechanism of inactivation of the polyene antibiotic amphotericin B. *J Antibiotic (Tokyo)* 1985;38:753-7.

Lincopan N, Mamizuka EM, Carmona-Ribeiro AM. Low nephrotoxicity of an effective amphotericin B formulation with cationic bilayer fragments. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55(5):727-34.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Method.* Amsterdam. 1983;65:55-63.

Osaka K, Tyurina YY, Dubey RK, Tyurin VA, Ritov VB, Quinn PJ, Branch RA, Kagan VE. Amphotericin B as an Intracellular Antioxidant. Protection against 2,2' - azobis (2,4 - dimethylvaleronitrile) - induced peroxidation of membrane phospholipids in rat aortic smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol.* 1997;54(8):937-45.

Ramful D, Baborun T, Bourdon E, Tarnus E, Aruoma OI. Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavonoid extracts of Mauritian citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology.* 2010;278:75-87.

Soares J R, Dinis TC, Cunha AP, Almeida LM. Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis*. *Free Rad Res.* 1997;26:469-78.

Velloso JCR, Barbosa VF, Khalil NM, Santos VAFFM, Furlan M, Brunetti IL, Oliveira OMMF. Profile of *Maytenus aquifolium* action over free radicals and reactive oxygen species. *Braz J Pharm Sci.* 2007;43:447-53.

Wilson E, Thorson L, Speert DP. Enhancement of Macrophage Superoxide Anion Production by Amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;35(5):796-800.

Yen GC, Duh PD, Tsai HL, Huanf SL. Pro-oxidative properties of flavonoids in human lymphocytes. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2003;67(6):1215-22.

Recebido em 25 de agosto de 2013

Aceito em 27 de janeiro de 2014

