



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

**PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE PRODUTOS DE ORIGEM
NATURAL COM POTENCIAL MEDICINAL:**

**Proteção da ação de espécies reativas de Oxigênio e de Nitrogênio sobre
membranas lipídicas e ação como seqüestradores de Radicais livres.**

Aluna: Ilana Seifriz

**Orientadora: Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski-Pasa- Departamento de Ciências
Farmacêuticas – CCS.**

Co-orientador: Prof. Dr. Moacir Pizzolatti – Departamento de Química – CFM.



**PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE PRODUTOS DE ORIGEM
NATURAL COM POTENCIAL MEDICINAL:**

**Proteção da ação de espécies reativas de Oxigênio e de Nitrogênio sobre
membranas lipídicas e ação como seqüestradores de Radicais livres.**

**Tese submetida à Pós- Graduação de Química da Universidade Federal da
Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Química.**

Aluna: Ilana Seifriz

**Orientadora: Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski-Pasa- Departamento de Ciências
Farmacêuticas – CCS.**

Co-orientador: Prof. Dr. Moacir Pizzolatti – Departamento de Química – CFM.

Agradecimentos

Agradeço:

- Precisaria mais de 100 páginas para agradecer a todos que de alguma forma ou outra ajudaram na realização desta tese de doutorado. Então, simplesmente começo, agradecendo:
- A luz divina e aos meus pais pela minha existência,
- Aos meus pais, Liana e Cesar pelo apoio incondicional, financeiro e psicológico, em todas as horas,
- A Tânia, minha orientadora, pela sua orientação, paciência e horas infindáveis de explicações. Seu exemplo como profissional foi imprescindível para a minha futura carreira.
- A todos que cooperaram de alguma maneira para que esta tese se realizasse.
- A Jaqueline Oliveira, uma amiga muito antiga, que sempre esteve presente em todos os momentos, dando o seu apoio psicológico e moral,
- Aos meus amigos Marciela, Maurício, Lia, Alessandra, Sandra, Elisane, Ricardo, “Vavá”, Gilmene, Josiel e muitos outros que seria impossível listar,
- Ao pessoal do laboratório de Polímeros,
- As pessoas do meu antigo laboratório, Merlin, Suzana, Franci, Janaína, Italiano e o famoso “Bocão”, que me ajudaram a não desistir,
- As pessoas do meu atual laboratório, Carla, Vânia, Marcos, Rober e meu ex-marido e amigo Marlon, que muito contribuíram nas horas difíceis,
- As irmãs Juliana e Clarissa, ambas do meu laboratório, que me ensinaram os experimentos por mim realizados. Elas foram fundamentais, nos cálculos da montagem dos protocolos,
- Em especial ao Tiago, colega e aluno de iniciação científica, pela ajuda em todo o experimental,
- A todos os professores da Pós-graduação da Química, que sempre me apoiaram e estavam disponíveis para as explicações devidas, além da amizade e carinho que sempre tiveram por mim,

- Em especial ao professor Dr. Valdir Soldi, ex- coordenador da pós-Graduação, por me apoiar na decisão de troca de orientador,
- A Graça, secretária da Pós-graduação da Química, peça importante em todas as informações burocráticas, e a sua amizade nos momentos mais necessários,
- Em especial, a minha amiga e colega Adriana, que sempre estava disponível, pela sua compreensão, dedicação e as risadas para afastar o estresse,
- Aos meus vizinhos, “Jajá”, “Cabrito”, Karina, Jorge, “Kuki”, Maurício e Sandra, pela paciência, pelas refeições e descontração nos momentos mais difíceis.
- A minha tia Jane, pelas correções no português.
- A minha amiga Denise e o Zé que estiveram comigo na fase final da escrita e me ajudaram com a tabulação.
- Enfim, a todos os amigos, colegas, conhecidos e desconhecidos, aqui não mencionados que muito contribuíram, de uma forma ou outra, para a realização de um sonho.

RESUMO

Nesta tese de doutorado foram estudadas quatro plantas com potencial terapêutico e farmacológico, avaliando extratos brutos, frações ou compostos isolados. As plantas utilizadas foram *Bauhinia forficata* (pata-de-vaca); *Cyathea phalerata* (xaxim), *Baccharis articulata*, *Baccharis trimera*, *Baccharis spicata*, *Baccharis usterii* (carquejas) e a *Araucaria angustifolia* (pinheiro-do-paraná). Foram avaliadas as propriedades antioxidantes do material biológico, como sequestradores de espécies reativas de oxigênio (EROs), como inibidores de enzimas pró-oxidantes, bem como a ação contra a peroxidação lipídica.

O *canferol-3,7-O- α -diramnosídeo* (canf-1), isolado da *B. forficata*, apresentou alta reatividade frente ao radical DDPH ($IC_{50} = 75,45 \pm 3,42 \mu M$), inibiu a peroxidação lipídica induzida pelo radical ascorbil em três tipos de membranas: lipossomas de fosfatidilcolina de ovo, lipossomas de fosfatidilcolina de soja (asolecitina) e microsomas de fígados de ratos sendo as IC_{50} s de $156,0 \pm 5,20 \mu M$; $170,0 \pm 5,70 \mu M$ e $365,6 \pm 4,72 \mu M$ respectivamente. Este composto inibiu também a peroxidação lipídica induzida pelo radical hidroxil em microsomas ($IC_{50} = 365,6 \pm 4,72 \mu M$) e a atividade da enzima pró-oxidante mieloperoxidase ($K_{0,5} = 86,0 \pm 9,9 \mu M$). Em um trabalho paralelo foi observado que a incorporação do canf-1 em lipossomas de fosfatidilcolina resultou na otimização de seu efeito hipoglicêmico significativamente quando comparado ao composto não incorporado.

O *canferol-3-O- α -L-rhamnopyranosil(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosídeo* (canf-2), isolado da *Cyathea phalerata* apresentou potencial antioxidante frente ao radical DPPH 2,5 vezes menor do que o canf-1 ($IC_{50} = 184,32 \pm 5,34 \mu M$). Este composto também protegeu a peroxidação lipídica induzida pelo radical ascorbil em dois tipos de membranas: lipossomas de fosfatidilcolina e microsomas e as IC_{50} foram $149,15 \pm 1,40 \mu M$, $386,37 \pm 3,18 \mu M$, respectivamente.

O extrato aquoso hidroalcoólico de acículas da *A. angustifolia*, apresentou reatividade frente ao radical DPPH ($IC_{50} = 34,91 \pm 5,10 \mu g/mL$), bem como as frações derivadas das acículas, com exceção da fração éter de petróleo (FEP). Todas as IC_{50} obtidas foram abaixo de $150 \mu g/mL$. Estas frações também, apresentaram reatividade contra a atividade da xantina oxidase. A *A. angustifolia* mostrou capacidade de proteger a peroxidação lipídica em

microsomas induzida pelo radical ascorbil. Frações derivadas das grimpas e ramos também foram avaliados mostrando menor atividade antioxidante, embora também possam ser úteis.

Os extratos aquosos e etanólicos da *B. articulata*, *B. trimera*, *B. spicata* e *B. usterii* apresentaram potencial antioxidante frente ao radical DPPH, numa faixa de concentração de $\mu\text{g/mL}$. Estes materiais também protegeram a peroxidação lipídica induzida pelo radical ascorbil em dois tipos de membranas. As IC_{50}s encontradas foram no máximo de $150 \mu\text{g/mL}$, sendo que a *B. usterii* apresentou os melhores resultados. O gênero *Baccharis* não apresentou citotoxicidade.

Os resultados obtidos permitem-nos concluir que as quatro plantas apresentam propriedades antioxidantes, como seqüestradores de EROs, inibindo enzimas pró-oxidantes e protegendo as membranas lipídicas contra a peroxidação lipídica. Particularmente, o composto isolado, canf-1, com atividade hipoglicêmica comprovada, mostrou uma surpreendente atividade antioxidante, sendo muito importante no tratamento da diabetes, uma patologia fortemente relacionada com o estresse oxidativo.

ABSTRACT

In this work four plants with therapeutical and pharmacological potential were studied either with crude extracts or isolated compounds. The plants studied were *Bauhinia forficata*, *Cyathea phalerata*, *Baccharis articulata*, *Baccharis trimera*, *Baccharis spicata*, *Baccharis asterii* and *Araucaria angustifolia*. Its antioxidants properties, as reactive oxygen species (ROS) scavenging and as pro-oxidants enzymes activities inhibitors, as well as its action against lipid peroxidation were evaluated.

The *kaempferol-3,7-O- α -diramnosideo* (Kaemp 1), isolated from *B. forficata* showed high reactivity with DDPH radical ($IC_{50} = 75,45 \pm 3,42 \mu M$) inhibited the lipid peroxidation induced by ascorbyl radical in three types of membranes: liposomes from egg phosphatidylcholine, from soybean phosphatidylcholine (asolectin) and from rat liver microsomes with the IC_{50} s= $156,0 \pm 5,20 \mu M$; $170,0 \pm 5,70 \mu M$ and $365,6 \pm 4,72 \mu M$ respectively. It inhibited the lipid peroxidation induced by hidroxil radical in microsomes ($IC_{50} = 365,6 \pm 4,72 \mu M$). Kaemp 1 also strongly inhibited the myeloperoxidase activity ($K_{0,5} = 86,0 \pm 9,9 \mu M$). In a parallel work was observed that the incorporation of Kaemp 1 in phosphatidylcholine liposomes resulted in the increment of its hypoglycemic effect significantly when compared with the compound not incorporated.

The *kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranosil(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosideo* (Kaemp 2) isolated from *Cyathea palerata* showed an antioxidant potential against radical DPPH 2,5 times less than Kaenf-1 ($IC_{50} = 184,32 \pm 5,34 \mu M$). This compound also protected the lipid peroxidation induced by ascorbil radical in two types of membranes tested: phosphatidylcholine liposomes and microsomes with IC_{50} s $149,15 \pm 1,40 \mu M$; $386,37 \pm 3,18 \mu M$, respectively.

The hydroalcoholic aqueous extract of green leaves of *Araucaria angustifolia*, showed reactivity with DPPH radical ($IC_{50} = 34,91 \pm 5,10 \mu g/mL$). And the fractions derived from green leaves also presented reactivity with this radical, except the oil ether fraction (FEP). All IC_{50} showed values below of $150 \mu g/mL$. In addition, all fractions inhibited the xanthine oxidase activity. The plant material of *Araucaria angustifolia* showed also the capability to protect the lipid peroxidation in microsomes induced by ascorbil. Fractions from dry leaves

and branched of *A. angustifolia* were also evaluated showing less potent antioxidant activity, although also useful.

The aqueous and ethanolic extracts of *Baccharis articulata* (BAA and BAE), *Baccharis trimera* (BTA and BTE), *Baccharis spicata* (BSA and BSE) and *Baccharis usterii* (BUA and BUE) presented antioxidant potential against DPPH radical in a concentration of $\mu\text{g/mL}$ range. These plant materials also protected the lipid peroxidation in two types of membranes induced by ascorbyl radical. The maximal IC_{50} obtained was $150 \mu\text{g/mL}$, and the *Baccharis usterii* presented the best results. The genus *Baccharis* did not present cell toxicity.

The results obtained in this work permit us to conclude that the four plants studied presented antioxidants properties, as ROS scavengers, inhibiting pro-oxidant enzymes and protecting the lipid membranes against lipid peroxidation. Particularly the isolated compound, kaemp 1, with a confirmed hypoglycemic activity, showed a surprising antioxidant activity being important for a possible treatment of diabetes, a human pathology very strongly related with the oxidative stress.

SÚMARIO

RESUMO	3
ABSTRACT	5
SÚMARIO	7
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE EQUAÇÕES	12
LISTA DE ABREVIATURAS	14
LISTA DE TABELAS	16
LISTA DE QUADROS	17
LISTA DE ESQUEMAS	18
1. INTRODUÇÃO	19
2. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO	27
2.1. Espécies reativas- Radicais livres	27
2.1.1. Oxigênio e seus Derivados	27
2.1.1.1. Oxigênios Singlete	30
2.1.1.2. Radical Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	30
2.1.1.3. Radical Hidroxil	32
2.1.1.4. Radical Peroxil (RO_2^{\cdot}) e Radicais Alcoxil (RO^{\cdot})	36
2.1.1.5. Óxidos de Nitrogênio	40
2.2. Espécies reativas- não-radicais livres	45
2.2.1. Peroxinitrito ($ONOO^-$)	45
2.2.2. Peróxido de Hidrogênio	46
2.2.3. Ácido Hipocloroso	47
2.3. Mecanismo de Lipoperoxidação	49
3. ALGUMAS DOENÇAS HUMANAS RELACIONADAS AO ESTRESSE OXIDATIVO	57
3.1. Aterosclerose	61
3.2. Isquemia/ Reperfusão	63
3.3. Diabetes melitus	64
3.4. Doenças Inflamatórias Crônicas	67
3.5. Artrite Reumatóide	69
4. PRODUTOS NATURAIS COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE	71

4.1. <i>Bauhinia forficata</i> (canferol-3,7-O-(α)-diramnosídeo)	72
4.2. <i>Cyathea phalerata</i> (canferol-3-O- α -L-rhamnopyranosil(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosídeo)...	73
4.3 <i>Baccharis</i>	74
4.4 <i>Araucaria augustifolia</i> (BERT.) O. Kuntze	76
5. OBJETIVOS	77
5.1. Objetivos Gerais	77
5.2. Objetivos Específicos	77
6. METODOLOGIA	78
6.1. Materiais	78
6.1.1. Reagentes Sigma	78
6.1.2. Reagentes Merck	78
6.1.3. Reagentes de Outras Marcas	78
6.1.4. Produtos de Origem Natural com Potencial Medicinal	79
6.2. Equipamentos	81
6.3. Animais.....	82
6.4. Preparação de Lipossomas.....	82
6.5. Preparação de Microssomas	82
6.6. Homogenato de Cerebelo	83
6.7. Homogenato de Pulmão.....	83
6.8. Determinação da Concentração de Proteína	83
6.9. Síntese de Peroxinitrito.....	84
6.10. Atividade Antioxidante <i>in vitro</i>	84
6.10.1. Formação e Monitoramento de Radicais Hidroxila (\cdot OH) e Radicais ascorbil (ASC \cdot)- Avaliação da Lipoperoxidação.....	84
6.10.2. Monitoramento do Radical DPPH.....	85
6.10.3. Formação e Monitoramento de Radical Óxido Nítrico (NO \cdot)	85
6.10.4. Viabilidade celular	85
6.11. Atividade da Óxido Nítrico Sintase.....	86
6.12. Atividade da Mieloperoxidase.....	86
6.13. Atividade da Xantina Oxidase	86
6.14. Análise dos resultados	87
7. JUSTIFICATIVA	88
8. RESULTADOS E DISCUSSÃO	89

8.1. Avaliação do potencial antioxidante do <i>canferol-3,7-O-α-diramnosídeo</i> e incorporação em lipossomas	89
8.1.1. Monitoramento do radical DPPH.....	89
8.1.2. Análise da ação do <i>canferol-3,7-O-α-diramnosídeo</i> frente à Peroxidação Lipídica.....	90
8.1.3. Análise do efeito do <i>canferol-3,7-O-α-diramnosídeo</i> sobre enzimas pró-oxidantes e reatividade frente ao radical ânion superóxido	97
8.1.4. Incorporação do <i>canferol-3,7-O-α-diramnosídeo</i> em membranas de lipossomas de fosfatidilcolina.....	99
8.2. Avaliação do potencial antioxidante do <i>canferol-3-O-α-L-rhamnopyranosil(1\rightarrow2)-β-D-glicopiranosídeo</i>	103
8.2.1. Monitoramento do radical DPPH.....	103
8.2.2. Análise da ação do <i>canferol-3-O-α-L-rhamnopyranosil(1\rightarrow2)-β-D-glicopiranosídeo</i> frente à Peroxidação Lipídica.....	104
8.3. Avaliação do potencial antioxidante da <i>Araucaria angustifolia</i> (BERT.) O. Kuntze – acículas, grimpas e ramos	108
8.3.1. Monitoramento do radical DPPH.....	108
8.3.2. Análise da ação da <i>Araucaria angustifolia</i> de acícula, grimpas e ramos frente à Peroxidação Lipídica	113
8.3.3. Análise da ação da <i>Araucaria angustifolia</i> sobre enzimas pró-oxidantes.....	116
8.4. Avaliação do potencial antioxidante da <i>Baccharis</i>	119
8.4.1. Monitoramento do radical DPPH.....	119
8.4.2. Análise do gênero <i>Baccharis</i> frente à Peroxidação Lipídica.....	121
8.4.3. Viabilidade celular	125
9. CONCLUSÕES	126
9.1. <i>Bauhinia forficata</i> – <i>canferol-3,7-O-(α)-diramnosídeo</i>	126
9.2. <i>Cyathea phalerata</i> – <i>canferol-3-O-α-L-(1\rightarrow2)-β-D-glicopiranosí-deo</i>	126
9.3. <i>Araucaria. angustifolia</i> O (Bertz) - acículas, grimpas e ramos.....	127
9.3.1. Estudo comparativo das frações FAE e FBU originadas de acículas, grimpas e ramos da <i>Araucaria angustifolia</i>	127
9.4. <i>Baccharis</i>	128
10. PERSPECTIVAS	129
11. REFERÊNCIAS	131
12. ANEXO	143

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Alguns biomarcadores de estresse oxidativo utilizados no estudo de patologias humanas	23
Figura 2: Versão simplificada dos orbitais da molécula diatômica de oxigênio e seus derivados	29
Figura 3: Principais componentes das membranas biológicas. (A) fosfatidilcolina (B) fosfatidiletanolamina (C) esfingomiéline (D) colesterol (E) fosfatidilinositol	50
Figura 4: Representação esquemática da bicamada lipídica de lipossomas.....	51
Figura 5: Mecanismo proposto para a formação de hidroperóxidos lipídicos e peróxidos cíclicos a partir do ácido araquidônico.....	54
Figura 6: Mecanismo hipotético da iniciação da LPO induzida pelo radical ascorbil em MC, proposto por Casalino ⁵⁸	55
Figura 7: Algumas das razões pelas quais o dano ao tecido pode provocar estresse oxidativo.	57
Figura 8: Núcleo fundamental dos flavonóides.....	72
Figura 9: Estrutura química do composto isolado: canf-1.....	73
Figura 10: Composição química do composto canferol-3-O- α -L-rhamnopyranosil(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosídeo.	74
Figura 11: Estrutura química do composto isolado do extrato da <i>Baccharis articulata</i> : 4'-O- β -D-glucopiranosyl-3',5'-dimetoxi-benzyl-cafeate.	75
Figura 12: Efeito do canf-1 sobre o radical livre DPPH	89
Figura 13: Efeito do canf-1 contra LPO, induzida pelo radical ASC [•] em lipossomas de PC, ASO e MC ...	90
Figura 14: Efeito do canf-1 contra a LPO em MC induzida pelo radical [•] OH. O radical [•] OH foi gerado pelo sistema Fe ⁺² /H ₂ O ₂	91
Figura 15: Estrutura do canf-1.....	95
Figura 16: Efeito do canf-1 na atividade da XO	97
Figura 17: Efeito do canf-1 como seqüestrador do ânion superóxido.....	98
Figura 18: Efeito do canf-1 na atividade da MPO.....	99
Figura 19: Espectro do canf-1 incorporado no lipossoma de PC, após a solubilização do lipossoma de fosfatidilcolina	101
Figura 20: Espectros do canf-1 utilizados na determinação do ϵ em meio aquoso, $\lambda = 360$ nm.	102
Figura 21: Gráficos da Absorbância do canf-1 em função da concentração.....	102
As medidas foram realizadas em um meio contendo tampão e lipídeos solubilizados.	102
Figura 22: Efeito do canf-2 sobre o radical livre DPPH	103
Figura 23: Efeito do canf-2 em MC contra a LPO induzidas pelo radical ASC [•]	104
Figura 24: Efeito do canf-2 em lipossomas de PC contra a LPO induzida pelo radical ASC [•] utilizando um sistema de etanol:água 1:1 nas soluções-estoque do composto.....	105
Figura 25: Estrutura química do (A) canf-1 e (B) canf-2.....	107
Figura 26: Efeito das acúlas das frações EBHA A (extrato bruto hidroalcolico), FEP A (fração éter de petróleo), Ep/H ₂ O A (fração do precipitado éter de petróleo e água), FDM A (fração diclorometano),	

Faq A (fração aquosa), FAE A (fração acetato de etila) e FBU A (fração butanólica) da <i>A. angustifolia</i> sobre o radical livre DPPH	109
Figura 27: Efeito das frações FAE e FBU de grimpas e ramos da <i>A. angustifolia</i> sobre o radical livre DPPH	111
O radical DPPH foi incubado por 30 min na ausência (100 % DPPH) e na presença das diferentes frações, nas concentrações indicadas na Figura.	111
Figura 28: Efeito comparativo das frações FBU e FAE de acículas, grimpas e ramos da <i>A. angustifolia</i> sobre o radical livre DPPH.....	112
Figura 29: Efeito das frações FAE (A) e FBU (B) das acículas, grimpas e ramos da <i>A. angustifolia</i> na LPO induzidas pelo radical ASC [•] em MC	114
Figura 30 : Efeito das frações FAE e FBU das acículas da <i>A. angustifolia</i> contra a LPO em lipossomas de ASO induzida pelo radical ASC [•]	115
Figura 31: Efeito das frações EBHA A, Ep/H ₂ O A, FEP A, FDM A, Faq A, FAE A e FBU A de acículas da <i>A. angustifolia</i> na atividade da X.O.	116
Figura 32: Efeito das frações FAE e FBU das acículas da <i>A. angustifolia</i> na atividade da X.O.	117
Figura 33: Efeito da <i>Baccharis articulata</i> (extrato aquoso e etanólico), <i>Baccharis usterii</i> (extrato aquoso e etanólico), <i>Baccharis trimera</i> (extrato aquoso e etanólico) e <i>Baccharis spicata</i> (extrato aquoso e etanólico) sobre o radical livre DPPH	120
O radical DPPH foi incubado por 30 min na ausência (100 % DPPH) e na presença das diferentes espécies, nas concentrações indicadas na Figura. A análise espectrofotométrica foi realizada a 515 nm.....	120
Figura 34: Efeito da <i>Baccharis articulata</i> (extrato aquoso e etanólico), <i>Baccharis usterii</i> (extrato aquoso e etanólico), <i>Baccharis trimera</i> (extrato aquoso e etanólico) e <i>Baccharis spicata</i> (extrato aquoso e etanólico) contra a LPO em lipossomas de ASO induzida pelo radical ASC [•]	122
Figura 35: Efeito da <i>Baccharis articulata</i> (extrato aquoso e etanólico), <i>Baccharis usterii</i> (extrato aquoso e etanólico), <i>Baccharis trimera</i> (extrato aquoso e etanólico) e <i>Baccharis spicata</i> (extrato aquoso e etanólico) contra a LPO em MC de fígados de ratos induzida pelo radical ASC [•]	123
Figura 36: Avaliação da citotoxicidade celular das diferentes espécies da <i>Baccharis</i> pelo método de redução do MTT. CN = controle negativo, TCA 10 %; CP = controle positivo = 100 % de viabilidade celular. As concentrações utilizadas foram: BAA e BAE = 200 µg/mL; BTA e BTE = 150 µg/mL; BSA e BSE = 100 µg/mL; BUA e BUE = 150 µg/mL.....	125

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Formação de radicais livres a partir de uma espécie não-radical livre.	24
Equação 2: Formação de radicais livres por uma espécie não-radical livre através do ganho de um elétron.	24
Equação 3: Formação do radical hidroperóxido.	28
Equação 4: Formação do radical ânion superóxido.	28
Equação 5: Formação do peróxido de hidrogênio.	28
Equação 6: Formação do radical hidroxil.	28
Equação 7: Formação da água.	28
Equação 8: Reação de dismutação.	31
Equação 9: Reação de oxidação da hipoxantina a xantina catalisada pela enzima xantina oxidase.	31
Equação 10: Formação do radical hidroxil através da ionização da água.	32
Equação 11: Formação do radical derivado do enxofre (tio) através do radical hidroxil e grupos tióis de biomoléculas.	33
Equação 12: Formação de radicais centrados no carbono através da reação do radical hidroxil e ácidos graxos polinsaturados.	33
Equação 13: Formação do íon Fe^{+2} através da redução de Fe^{+3} e radical superóxido.	34
Equação 14: Reação de Fenton.	34
Equação 15: Reação de Haber-Weiss.	34
Equação 16: Regeneração de Fe^{+2} através Fe^{+3} e peróxido de hidrogênio.	35
Equação 17: Fissão homolítica da água, produção do radical hidroxil.	35
Equação 18: Formação do radical hidroxil através da reação do ácido hipocloroso e radical superóxido.	35
Equação 19: Oxidação do NADH pelo radical peróxido.	37
Equação 20: Reação de oxidação NAD^{\bullet} , com a formação do radical superóxido em presença de O_2	37
Equação 21: Reação do radical peróxido (RO_2^{\bullet}) para liberação do radical $O_2^{\bullet-}$	37
Equação 22: Reação de radicais RO^{\bullet} entre si, gerando oxigênio singlete 1O_2	37
Equação 23: Reação de formação do radical tirosil, que se ligam na forma de bitirosinas.	38
Equação 24: Reação de radicais centrados no carbono e O_2 , com formação do radical peróxido.	39
Equação 25: Reação do radical RO^{\bullet} com o oxigênio molecular.	39
Equação 26: Reação de formação de hidroperóxido lipídico.	39
Equação 27: Formação do radical peróxido, na presença de peróxidos lipídicos e Fe^{+3}	40
Equação 28: Formação do radical alcóxido, na presença de peróxidos lipídicos e Fe^{+2}	40
Equação 29: Formação do dióxido de nitrogênio.	43
Equação 30: Formação do peroxinitrito.	45
Equação 31: Reação de utilização do H_2O_2 na formação do ácido hipocloroso.	47
Equação 32: Reação da formação do ácido hipocloroso, produzido pela enzima mieloperoxidase.	48
Equação 33: Dissociação do ácido hipocloroso no pH fisiológico.	48

Equação 34: Etapa de iniciação do processo de lipoperoxidação. Abstração do hidrogênio de grupos metilênicos dos ácidos graxos polinsaturados.....	52
Equação 35: Colisão entre dois radicais centrados no carbono, formando dienos conjugados.....	52
Equação 36: Reação de formação de peroxil, através da reação de radicais centrados no carbono e oxigênio molecular.	52
Equação 37: Etapa de propagação do processo lipoperoxidativo.	53
Equação 38: Etapa de terminação do processo lipoperoxidativo.	53
Equação 39: Reação de hidroperóxidos com íon Fe^{+2} , na formação adicional de radicais centrados no carbono.	53
Equação 40: Formação do radical hidroxil ($\cdot OH$) e alcóxil ($LO\cdot$), a partir da reação do hidroperóxido e Fe^{+2}	56
Equação 41: Formação do radical hidrogênio (H^+) e peroxil ($RO_2\cdot$), a partir da reação do hidroperóxido e Fe^{+3}	56
Equação 42: Formação do ácido dialúrico a partir do agente diabetogênico aloxano.	66
Equação 43: Conversão da glicose ao poliálcool sorbitol pela redução do grupo aldeído da glicose.	66
Equação 44: Formação do radical hidroxil a partir do ânion superóxido e ácido hipocloroso.	70
Equação 45: Reação dos flavonóides com as espécies reativas para a formação de um radical centrado no flavonóide.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS

- EROs = espécies reativas de oxigênio
- ERNs = espécies reativas de nitrogênio
- ATP = adenosina trifosfato
- $O_2^{\bullet -}$ = radical superóxido
- $\bullet OH$ = radical hidroxil
- $\bullet OH_2$ = radical hidroperoxila
- RO_2^{\bullet} = radical peroxil
- RO^{\bullet} = radical alcóxil
- H_2O_2 = peróxido de hidrogênio
- HClO = ácido hipocloroso
- HBrO = ácido hipobromoso
- O_3 = ozônio
- $^1\Delta g$ = oxigênio singlete
- NO^{\bullet} = monóxido de nitrogênio
- NO_2^{\bullet} = dióxido de nitrogênio
- HNO_2 = ácido nitroso
- NO^+ = cátion nitrosônio
- NO^- = ânion nitroxil
- $ONOO^-$ = peroxinitrito
- RL = radicais livres
- SOD = superóxido dismutase
- CAT = catalase
- GPx = glutatona peroxidases
- GR = glutatona redutase
- GSTs = glutatona S-transferase
- GSH = glutatona reduzida
- LPO = lipoperoxidação lipídica ou peroxidação lipídica
- MDA = malonindialdeído
- LOOH = hidroperóxidos

- IC_{50} = inibição máxima a 50 %
- PC = fosfatidilcolina
- ASO = asolecetina de soja
- MC = microsomas de fígados de ratos
- TBA = ácido tiobarbitúrico
- TCA = ácido tricloroacético
- CN = controle negativo
- CP = controle positivo
- *A. angustifolia* = *Araucária angustifolia* (Bert) O. Kuntze
- BAA = *Baccharis articulata* aquoso
- BTA = *Baccharis trimera* aquoso
- BSA = *Baccharis spicata* aquoso
- TBARS = espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
- XO = enzima xantina oxidase
- K_i = constante de inibição máxima a 50 %
- MTT = brometo de 2-[4,5-dimetiltizol-2-il]2,5-difeniltetrazólio
- PE = fosfatidiletanolamina
- PI = fosfatidilinositol
- canf-1 = *canferol-3,7-O- α -dirhaminosídeo*
- canf-2 = *canferol-3-O- α -L-rhamnopyranosil(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosídeo*
- AGPI = ácidos graxos polinsaturados
- REA = relação estrutura-atividade
- DPPH = 1,1-difenil-2-picril hidrazil
- ASC^{\bullet} = radical ascorbil

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs) citadas na literatura.....	20
Tabela 2: Tabela comparativa do canf-1 e quercetina das IC ₅₀ contra LPO induzida pelo radical ASC [•] e [•] OH nas membranas artificiais de PC/ASO e MC.....	92
Tabela 3: Tabela comparativa do efeito do canf-1, canf-2 e quercetina sobre o radical DPPH. Índices de proteção dos antioxidantes canf-1, canf-2 e quercetina(μM) contra a LPO em lipossomas de PC e MC induzidas pelo radical ASC [•]	105
Tabela 4: Tabela comparativa entre as IC ₅₀ das frações de diferentes frações EBHA A (extrato bruto hidroalcolico), FEP A (fração éter de petróleo), Ep/H ₂ O A (fração do precipitado éter de petróleo e água), FDM A (fração diclorometano), Faq A (fração aquosa), FAE A (fração acetato de etila) e FBU A (fração butanólica) das acículas da <i>A. angustifolia</i> sobre o radical livre DPPH.....	110
Tabela 5: Tabela comparativa das IC ₅₀ das frações FAE e FBU de acículas (A), grimpas (G) e ramos (R) da <i>A. angustifolia</i> com o radical DPPH. O resultado está expresso pela média ± DP (n= 3).	113
Tabela 6: Tabela comparativa das IC ₅₀ das frações FAE e FBU de acículas, grimpas e ramos da <i>A. angustifolia</i> na LPO induzida pelo radical ASC [•] em MC.....	115
Tabela 7: Tabela comparativa das IC ₅₀ dos extratos BAA, BAE, BTA, BTE, BSA, BSE, BUA e BUE representando a reatividade com o DPPH.....	121
Tabela 8: Tabela comparativa das IC ₅₀ das espécies BAA, BAE, BTA, BTE, BSA, BSE, BUA e BUE do gênero <i>Baccharis</i> contra a LPO em lipossomas de ASO e MC induzida pelo radical ASC [•]	124

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Critérios das implicações de EROs/ERNs e outros agentes mediadores de dano como um mecanismo significativo dos tecidos danificados nas patologias humanas.....	22
Quadro 2: Algumas das condições clínicas com o envolvimento das EROs/ERNs.	58

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Reações do monóxido de nitrogênio.....	43
Esquema 2: Significado do estresse oxidativo das doenças.....	60
Esquema 3: Método da Viabilidade Celular. TCA= ácido tricloroacético; CN = controle negativo; CP = controle positivo; BAA = <i>Baccharis articulata</i> aquoso; BTA = <i>Baccharis trimera</i> aquoso; BSA = <i>Baccharis spicata</i> aquoso.	86

1. INTRODUÇÃO

As espécies reativas de oxigênio (EROs) e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são expressões utilizadas na literatura de radicais livres. Fisiologicamente, as EROs e as ERNs são originadas na produção de adenosina trifosfato (ATP). A ATP é a maior fonte de energia química de organismos vivos como bactérias, plantas e animais. O grupo fosfato terminal é transferido para uma variedade de biomoléculasceptoras, posteriormente transformadas quimicamente ¹.

A enzima citocromo oxidase, cataliticamente responsável pela redução de O₂ em H₂O nos organismos aeróbicos, através da adição de quatro elétrons, em etapas distintas, no processo de redução, consome 90 % de oxigênio. Em 1986, Jones relacionou mais de 30 diferentes enzimas além da citocromo oxidase, em rins de mamíferos, os quais necessitam de oxigênio no seu metabolismo. Cada uma destas enzimas possui uma afinidade específica com o O₂ e estão envolvidas em vários processos metabólicos. Dentro desses processos, podemos citar o metabolismo de amins biológicas, prostaglandinas, purinas, esteróides, aminoácidos e carnitina ² e de outras atividades celulares, incluindo auto-oxidação de pequenas moléculas tais como as flavinas, catecolaminas e hidroquinonas, ação das redutases de flavoproteínas e dos citocromos P₄₅₀.

As reações dos processos metabólicos, muitas vezes, geram substâncias químicas chamadas de EROs e ERNs. Frequentemente, o termo EROs é utilizado para designar radicais livres derivados do oxigênio molecular, como por exemplo, o radical superóxido (O₂[•]), radical hidroxil ([•]OH), radical hidroperoxil ([•]OH₂), radical peroxil (RO₂[•]) e o radical alcóxil (RO[•]), servindo também para designar espécies reativas derivadas do oxigênio, que não são radicais livres, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o ácido hipocloroso (HOCl), o ácido hipobromoso (HOBr), o ozônio (O₃) e os oxigênios singlete (¹Δg). Alguns óxidos de nitrogênio, como monóxido de nitrogênio (NO[•]) e dióxido de nitrogênio (NO₂[•]), também considerados radicais livres (RL), são chamados de espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Incluem-se ainda nesta classificação outras espécies do tipo não-radical livre, como por exemplo, o ácido nitroso (HNO₂), cátion nitrosônio (NO⁺), o ânion nitroxil (NO⁻), peroxinitrito (ONOO⁻), entre outros, conforme estão sumarizados na tabela 1 ³. Outra forma popularmente utilizada para designar estas espécies reativas é o termo oxidante.

ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Radicais	Não-radicais
Superóxidos, $O_2^{\cdot-}$	Peróxido de Hidrogênio, H_2O_2
Hidroxil, $\cdot OH$	Ácido hipocloroso, $HClO$
Peroxil, RO_2^{\cdot}	Ácido Hipobromoso, $HBrO$
Alcoxil, RO^{\cdot}	Ozônio, O_3
Hidroxil, HO_2^{\cdot}	Oxigênio singlete, $^1\Delta g$

ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO

Radicais	Não-radicais
Monóxido de Nitrogênio, NO^{\cdot}	Ácido Nitroso, HNO_2
Dióxido de Nitrogênio, NO_2^{\cdot}	Cátion nitrosônio, NO^+
	Ânion Nitroxil, NO^-
	Tetróxido de Dinitrogênio, N_2O_3
	Peroxinitrito, $ONOO^-$
	Ácido Peroxinitroso, $ONOOH$
	Cátion Nitril, NO_2^+
	(exemplo, NO_2Cl , cloreto nitril)
	Peroxinitritos Alquil, $ROONO$

Tabela 1: Principais Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs) citadas na literatura.

Como se pode observar, na tabela 1, as EROs e/ou ERNs são espécies químicas tipo radicais livres e não-radicais livres.

Nos organismos aeróbicos, a geração de EROs e/ou ERNs e a subsequente modificação oxidativa de biomoléculas, como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, são reações inevitáveis. Em pequenas quantidades, essas espécies estão envolvidas em importantes funções fisiológicas, mas o excesso das mesmas, pode estar relacionado a uma série de doenças humanas que vão desde inflamações, artrites reumáticas, aterosclerose, câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, dano de isquemia/reperfusão, até impotência sexual, entre muitas outras, sendo que algumas serão descritas posteriormente ^{4,5}.

Quando um organismo sofre algum tipo de injúria, seja por infecção, trauma, toxinas ou qualquer outra anormalidade, essa pode gerar espécies “mediadoras de danos” como citocinas, EROs e ERNs. Em condições fisiológicas, os diferentes organismos apresentam defesas contra esses agentes. As defesas enzimáticas ocorrem pela ação da superóxido dismutase (SOD), da catalase (CAT) e da glutathione peroxidase (GPx), que são enzimas responsáveis endogenamente pela neutralização das EROs. As células, através da ação dessas enzimas, mantêm baixos os níveis de radicais superóxido (O_2^{\bullet}) e do não-radical livre peróxido de hidrogênio (H_2O_2) de maneira a evitar a formação do radical $\bullet OH$ ⁶. As células possuem, ainda, enzimas auxiliares importantes, como a glutathione redutase (GR) e o conjunto de glutathione S-transferases (GSTs), que atuam indiretamente na neutralização de espécies reativas, podendo ser também outras fontes de defesa celulares, ligadas à biotransformação de xenobióticos, como herbicidas, inseticidas e agentes carcinogênicos. Estas últimas catalisam a reação de conjugação do tripeptídeo na sua forma reduzida (GSH) com as espécies reativas, aumentando a solubilidade e facilitando a excreção ⁷. As defesas não-enzimáticas incluem compostos endógenos, como a GSH, e exógenos, como a vitamina E, C e A (além de carotenóides, como licopeno e o β -caroteno), e compostos fenólicos, como por exemplo, os flavonóides ⁸.

Algumas patologias humanas podem ser causadas pelo estresse oxidativo. Por exemplo, a radiação ionizante pode gerar radicais $\bullet OH$, pelo desdobramento de moléculas de água, e muitas das conseqüências biológicas do excesso desta radiação são provavelmente devidas ao dano oxidativo de proteínas, DNA e lipídeos. Entretanto, na maioria das patologias humanas, o estresse oxidativo é uma conseqüência e não uma causa do processo. Quando as espécies mediadoras de danos são produzidas em quantidades crescentes maiores do que as normais, há fortes evidências de que tais espécies possuem funções específicas nas diferentes patologias humanas. As EROs e ERNs sofrem o mesmo processo, isto é, o tecido danificado pode levar à formação de maiores quantidades de espécies reativas, dependendo da patologia. Na maioria das doenças, as EROs e ERNs são produzidas em quantidades crescentes como uma conseqüência do tecido danificado. A contribuição das espécies reativas nas diferentes patologias humanas ocorre se os critérios estabelecidos no quadro 1 forem completamente preenchidos.

1. O agente deve estar sempre presente no sítio do dano.
2. O tempo de formação deve ser consistente com o tempo de formação do tecido danificado.
3. Aplicação direta de um agente para o tecido dentro de uma faixa de concentração encontrado *in vivo* deve reproduzir a maioria ou todo o prejuízo observado.
4. Removendo o agente ou inibindo a formação deverá diminuir o dano numa extensão relacionada ao grau de remoção do agente ou a inibição da formação.

Quadro 1: Critérios das implicações de EROs/ERNs e outros agentes mediadores de dano como um mecanismo significativo dos tecidos danificados nas patologias humanas.

O termo estresse oxidativo, muito empregado nos artigos relacionados a esse assunto, refere-se ao desequilíbrio entre a produção de EROs e/ou ERNs e o sistema de defesa antioxidante do organismo, podendo ser resultado da diminuição dos mecanismos de defesa antioxidantes e uma maior produção de EROs e/ou ERNs.

O estresse oxidativo pode resultar em:

- i. adaptação por elevação do sistema de defesa, que pode:
 - a. proteger completamente contra o prejuízo,
 - b. proteger, mas não completamente, contra o prejuízo,
 - c. levar à superprodução das EROs e/ou ERNs.
- ii. dano ao tecido, que pode causar prejuízos ao DNA, proteínas e lipídeos ,
- iii. morte celular ³.

No estudo de patologias humanas utilizam-se alguns biomarcadores mostrados na figura 1.

Nas últimas décadas, as EROs e ERNs, especialmente os radicais livres têm sido foco de inúmeras pesquisas, uma vez que estão envolvidos em inúmeros processos fisiopatológicos de diversas doenças humanas. Com frequência, encontram-se artigos relacionados as espécies reativas, que, por seu caráter multidisciplinar, têm atraído a atenção de uma grande parcela da comunidade científica ⁹.

Existem diversas definições na literatura para o termo radical livre. De uma maneira simplificada, é qualquer espécie capaz de existir independentemente, que contenha um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica dentro de regiões específicas denominadas orbitais. Este não-emparelhamento de elétrons da última camada eletrônica confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas ⁹. A presença de um ou mais elétrons

desemparelhados faz com que sejam levemente atraídos por um campo magnético (substâncias paramagnéticas), e, algumas vezes, essa atração pode torná-los altamente reativos. A técnica utilizada na determinação de espécies desse tipo é a espectroscopia de ressonância paramagnética (EPR), em que os radicais são detectados pela mudança de energia que ocorre no relaxamento dos elétrons desemparelhados em resposta a um campo magnético aplicado ^{10,11}. Existem espécies com elétrons emparelhados no mesmo orbital, chamados de não-radicais livres, conforme visto na tabela 1.

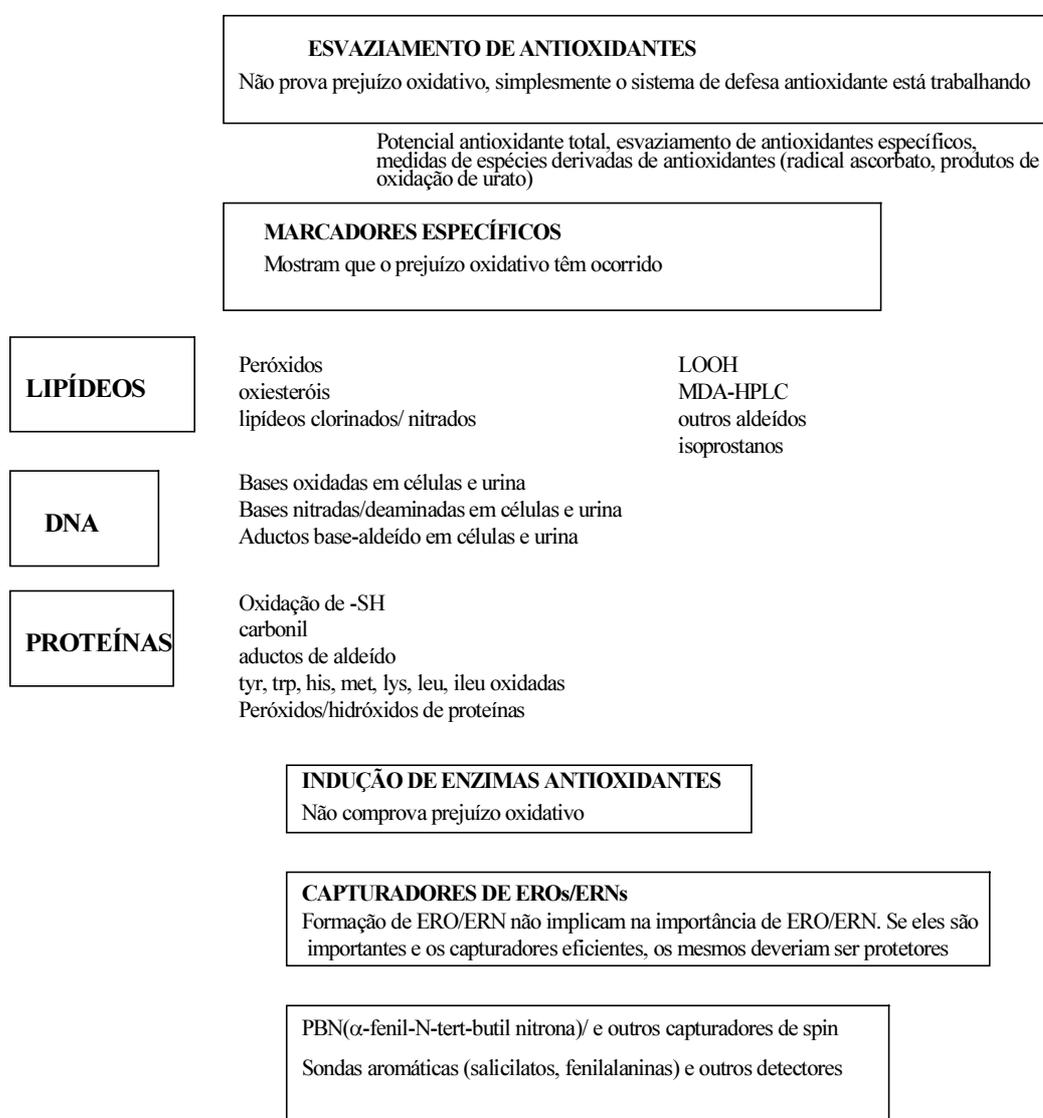
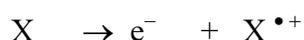


Figura 1: Alguns biomarcadores de estresse oxidativo utilizados no estudo de patologias humanas

É conveniente ressaltar que a formação destas espécies provem de reações de oxido-redução, isto é, cedem o elétron solitário, oxidando-se ou recebem outro, reduzindo-se. Portanto, os radicais livres ou provocam ou resultam dessas reações de oxido-redução ⁹.

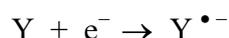
O hidrogênio atômico é o radical livre de fórmula mais simples ${}_1^1\text{H}$ que possui um elétron desemparelhado.

A espécie química não-radical livre pode perder um elétron e formar radicais livres, conforme a equação 1.



Equação 1: Formação de radicais livres a partir de uma espécie não-radical livre.

De outra forma, a espécie não-radical livre pode ganhar um elétron, conforme a equação 2.



Equação 2: Formação de radicais livres por uma espécie não-radical livre através do ganho de um elétron.

Radicais livres são formados quando uma ligação covalente é quebrada de forma que a clivagem ocorra simetricamente. É o processo conhecido como fissão homolítica ^{12,13}. A energia requerida para dissociar uma ligação covalente pode ser obtida por calor, radiação eletromagnética e outras, como as reações de oxi-redução. Muitas ligações covalentes somente se dissociam a altas temperaturas, em torno de 450-600 °C, como por exemplo, a ligação C — C, C — H ou C — O.

Há muitos anos, os químicos interessam-se por reações radicalares. Diversos plásticos, como o polietileno, são produzidos pela polimerização em cadeia, via radicais livres ^{14,15}. Muitos dos estudos das reações com radicais livres têm sido realizados em fase gasosa a altas temperaturas. Um exemplo bem conhecido é o processo de combustão, em que a queima do metano é a forma mais simples de obtenção de calor, com formação de CO₂ e H₂O ¹⁶.

Os radicais livres possuem importantes funções numa variedade de reações nos sistemas biológicos normais, existindo um interesse especial nesta classe de moléculas na

medicina clínica, uma vez que eles estão envolvidos nas diferentes patologias humanas. Existem três fontes de geração de radicais livres no ser humano:

- i. via processos biológicos intracelulares normais,
- ii. via liberação por células inflamatórias dentro de um meio ambiente apropriado,
- iii. via geração de oxidantes induzidos por xenobióticos (substâncias estranhas ao corpo humano).

O mecanismo pelo qual os radicais livres causam prejuízos é extremamente complexo. Devido a sua avidade por aceitar elétrons, podem modificar a estrutura e/ou funções de várias moléculas. Oxidantes podem causar danos às células que fazem parte do corpo humano pela interação com seus componentes estruturais, incluindo a membrana plasmática e vários processos enzimáticos e não-enzimáticos. Também podem modificar a estrutura de tecidos e moléculas que são importantes nas defesas dos mesmos ou mediadores das interações célula-célula¹⁷.

Deve-se ter em mente que os radicais livres podem iniciar uma série de eventos bioquímicos danosos, mas eles não são necessariamente responsáveis diretos por estas disfunções que ocorrem nas diferentes patologias.

Neste trabalho serão abordadas as propriedades antioxidantes de produtos de origem natural com potencial medicinal. Especificamente, será avaliada a capacidade (de diferentes extratos, frações e compostos isolados) de proteção contra a peroxidação lipídica induzida por EROs e ERNs e sua ação como seqüestradoras de radicais livres.

Para viabilizar esta abordagem, contamos com a colaboração de quatro laboratórios. Três deles prepararam os materiais derivados das plantas e um quarto viabilizou testes biológicos além dos testes por nós realizados.

- Laboratório do Prof. Dr. Eloir P. Schenkel - *Baccharis* (carqueja)

O trabalho de extração, isolamento das substâncias das espécies desta planta foram realizados no laboratório do professor Dr. Eloir Paulo Schenkel, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC, com a colaboração da estudante de Mestrado Simone Q. de Oliveira da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

- Laboratório do Prof. Dr. Moacir Pizzolatti

- *canferol-3,7-O- α -dirahaminosídeo* (pata-de-vaca)
- *canferol-3-O- α -L-rhamnopyranosil(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosídeo* (xaxim)

O trabalho de extração das frações, isolamento e purificação da pata-de-vaca e do xaxim foi realizado no grupo do Professor Dr Moacir Pizzolatti do Departamento de Química da UFSC.

- Laboratório da Profa. Dra Marení Rocha Farias – *Araucaria angustifolia*

O trabalho desta planta foi realizado em conjunto com a professora Dra Marení Rocha Farias, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC. Os resultados com propriedades antivirais estão sendo alcançados, principalmente na fração extraída com acetato de etila (FAE) e com fração butanólica (FBU).

- Laboratório da Profa. Dra. Fátima R. M. B. Silva –
Testes em modelo de diabetes.

O grupo da Prof. Dra Fátima R. M. Barreto Silva, do Departamento de Bioquímica, estudou o composto isolado da pata-de-vaca em ensaios biológicos *in vivo* e *in vitro*. A fração butanólica apresentou resultados promissores no modelo experimental de indução de diabetes tipo I por aloxano em ratos Wistar adultos ⁷².

Os capítulos subsequentes à introdução abordarão as EROs e ERNs, a peroxidação lipídica e algumas doenças relacionadas com o estresse oxidativo a fim de realçar a importância do tema.

2. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO

2.1. Espécies reativas- Radicais livres

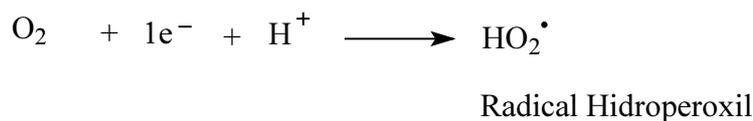
2.1.1. Oxigênio e seus Derivados

O oxigênio molecular apareceu em quantidades significativas há $2,5 \times 10^9$ anos na superfície terrestre. Evidências geológicas sugerem que o aparecimento ocorreu devido à atividade fotossintética de microorganismos (algas azuis e verdes), através da ação constante de radiação ultravioleta do sol. Sob estas condições as reações químicas começaram a produzir biomoléculas mais complexas. Foi isolado e caracterizado entre os anos de 1772 e 1774 por Priestley, Lavoisier e Scheele.¹⁸ A hipótese do surgimento dos primeiros aminoácidos e comunidade de agrupamentos mais complexos, que evoluíram posteriormente em organismos primitivos anaeróbicos, vieram da combinação de hidrogênio, amônia, metano, vapor de água sem oxigênio molecular, níveis de radiação altos (camada de ozônio ausente), temperaturas altas, água em abundância, numa atmosfera altamente reduzida. Quando a energia da luz começou a ser utilizada por estes organismos para transformar H_2O em O_2 livre, a combinação com um hidrogênio (molécula de $C_6H_{12}O_6$) ocasionou a liberação de O_2 na biosfera¹².

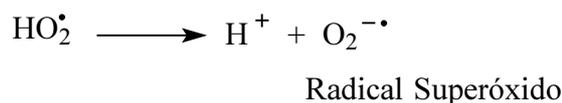
A presença de O_2 alterou a estabilidade de muitos componentes, resultando na forma mais estável de carbono, o CO_2 e na forma mais estável de nitrogênio, o N_2 . A presença de O_2 pode mudar compostos formados por carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio em CO_2 , N_2 e H_2O , os quais poderiam ocasionar o rompimento das biomoléculas da matéria viva. Quando ocorreu a mudança da atmosfera terrestre de um estado altamente redutor para um estado rico em oxigênio, como é conhecido hoje, fez-se necessária a evolução de antioxidantes especializados contra as propriedades tóxicas do oxigênio. Esta estratégia foi fundamental para a continuação da evolução¹².

O elemento oxigênio (O) existe no ar como O_2 molécula, conhecida por dioxigênio ou oxigênio molecular. O nitrogênio é o elemento mais abundante na atmosfera (78%) seguido do oxigênio (21%). A quantidade de oxigênio no ar é desprezível quando comparada a sua ocorrência nas moléculas de água dos oceanos, lagos e rios e como parte da reserva mineral

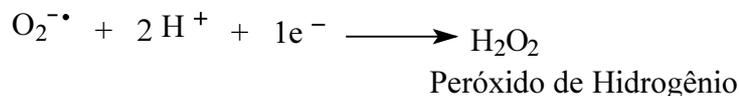
da crosta terrestre, onde ele é o elemento mais abundante. A energia química e o calor essencial à sobrevivência dos organismos aeróbicos são obtidos através da oxidação de substratos ricos em carbono e hidrogênio, oxidados ou consumidos pelo oxigênio. Todavia, quando as moléculas são oxidadas com oxigênio, este sofre redução, e formas intermediárias ocorrem; três das quais são radicais livres (equações 3-7):



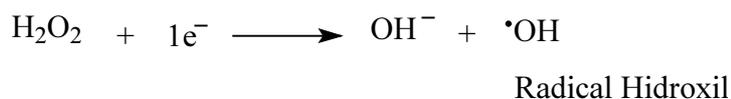
Equação 3: Formação do radical hidroperoxil.



Equação 4: Formação do radical ânion superóxido.



Equação 5: Formação do peróxido de hidrogênio.



Equação 6: Formação do radical hidroxil.



Equação 7: Formação da água.

Quando o oxigênio é reduzido pelas etapas de adição de elétrons (equações 3-6), três radicais livres (radical hidroperoxil, radical hidroxil e superóxido) são formados junto com

peróxido de hidrogênio (H_2O_2). No pH fisiológico (7,4), o radical hidroperóxido (HO_2^\bullet) dissocia-se, produzindo o radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), conforme a equação 4¹⁸.

A molécula diatômica oxigênio, segundo a definição simplificada, é considerada um radical livre, pois possui dois elétrons desemparelhados, cada um deslocalizado num orbital antiligante π diferente. Estes dois elétrons têm o mesmo número quântico spin, chamados de spins paralelos. Esse é o estado mais estável ou estado fundamental do oxigênio, segundo a figura 2.

O oxigênio atua como um agente oxidante. Os elétrons a serem recebidos pelo oxigênio molecular, quando esse oxida um átomo ou molécula, deverá ter spins anti-paralelos e ocupar espaços livres nos orbitais π , de acordo com o Princípio de Linus Pauli. Isso impõe uma restrição na transferência de elétrons que tende a fazer com que o O_2 aceite seus elétrons em um só tempo, contribuindo para explicar por que o O_2 reage lentamente com muitos não-radicaais livres. Teoricamente, os compostos orgânicos complexos do corpo humano deveriam entrar em combustão imediatamente com o O_2 do ar, mas, pela restrição de spin e outros fatores, isso não acontece¹⁹.

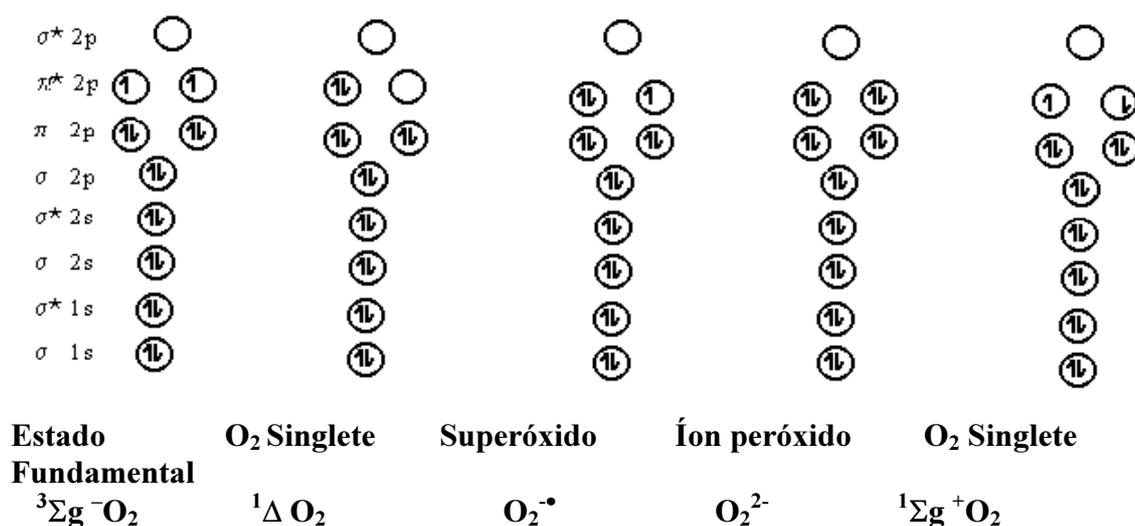


Figura 2: Versão simplificada dos orbitais da molécula diatômica de oxigênio e seus derivados

2.1.1.1. Oxigênios Singlete

É a forma no estado excitado do oxigênio molecular, conforme figura 2⁹. Existem muitas formas de oxigênio singlete, e a mais importante biologicamente é a forma em que todos os elétrons estão emparelhados²⁰.

Os oxigênios singlete podem ser gerados por uma quantidade de energia específica. O estado $^1\Delta_g$ O₂ tem uma energia de 93,6 kJ (22,4 kcal) acima do estado fundamental, e o $^1\Sigma_g^+$ O₂ é ainda mais reativo, 157 kJ (37,5 kcal) acima do estado fundamental. A forma $^1\Delta_g$ O₂ não é considerada um radical, pois não possui elétrons desemparelhados, conforme figura 2.

O oxigênio singlete, pode ser gerado tanto pela excitação eletrônica do oxigênio molecular, como a partir da reação entre o radical O₂[•] e o radical [•]OH. Na realidade, estas espécies não são radicais livres, mas EROs que podem combinar-se com moléculas maiores ou átomos, formando radicais alquil ou peroxil²¹.

O oxigênio singlete tem importância em certos eventos bioquímicos, mas poucas doenças foram relacionadas a sua presença⁹.

2.1.1.2. Radical Superóxido (O₂^{•-})

O radical superóxido é o produto da reação entre uma molécula de O₂ no estado fundamental e adição de um elétron que ocupará um orbital anti-ligante π^* , conforme equação 4. O O₂^{•-} é um radical menos reativo do que o oxigênio molecular, pois o O₂ possui dois elétrons desemparelhados e o O₂^{•-} possui um elétron desemparelhado. Ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos⁹.

A química dos superóxidos depende do meio onde são gerados. Em soluções aquosas, o radical O₂^{•-} é um fraco agente oxidante capaz de oxidar moléculas, tais como ácido ascórbico e tióis quando comparado ao radical [•]OH, sendo menos reativo que espécies não-radicaais livres. Apesar de ser considerado pouco reativo em soluções aquosas, foram observadas lesões biológicas secundárias a sistemas geradores de O₂^{•-} (seja enzimático,

fagocítico ou químico). Além disso, o $O_2^{\bullet -}$ é um agente redutor muito forte capaz de reduzir vários complexos de ferro tais como citocromo C e EDTA-férrico. Quando o radical $O_2^{\bullet -}$ é dissolvido em solventes orgânicos, é extremamente reativo⁹.

Os $O_2^{\bullet -}$ desaparecem rapidamente em soluções aquosas devido à reação de dismutação, em que o H_2O_2 e O_2 são formados. Tal reação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD). Por definição, a reação de dismutação é um tipo de reação em que a mesma espécie sofre oxidação e redução ao mesmo tempo, conforme equação 8.

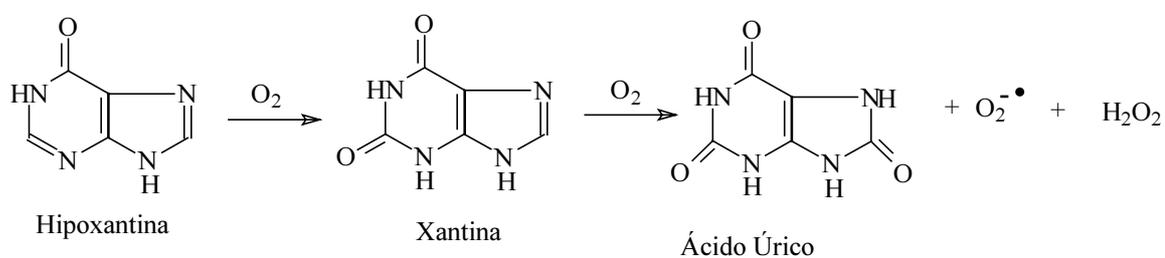


Equação 8: Reação de dismutação.

Em 1968, a enzima SOD foi caracterizada utilizando-se radicais livres como substrato específico. A descoberta dessa enzima tem-se mostrado importante uma vez que ela pode desintoxicar os organismos do radical $O_2^{\bullet -}$, produzido pelo metabolismo do oxigênio²¹.

Na ausência da SOD, a reação acima pode ocorrer, mas numa velocidade 4 ordens de magnitude menor em pH fisiológico. O descobrimento da SOD levou à conclusão de que o $O_2^{\bullet -}$ é formado *in vivo* e a SOD o remove¹⁰.

Algumas enzimas são capazes de reduzir O_2 para $O_2^{\bullet -}$. Um exemplo clássico é a reação de oxidação da hipoxantina a xantina, catalisada pela enzima xantina oxidase, com a conseqüente produção de ácido úrico e $O_2^{\bullet -}$, conforme a equação 9. A enzima xantina oxidase é responsável pela produção do ânion $O_2^{\bullet -}$, *in vivo*, em animais e tecidos de vegetais¹⁹.



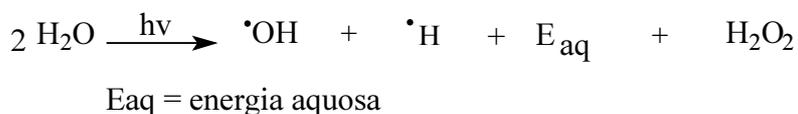
Equação 9: Reação de oxidação da hipoxantina a xantina catalisada pela enzima xantina oxidase.

2.1.1.3. Radical Hidroxil

Entre as EROs, o radical hidroxil é a molécula mais reativa dos sistemas biológicos. Os radicais $\bullet\text{OH}$ estão implicados na maioria dos fenômenos biológicos. Podemos listar como ações citotóxicas o dano celular por radiação ionizante, a destruição de microorganismos por fagócitos ativados e muitos outros^{22,23}. No início dos anos 70, os bioquímicos começaram a ter maior interesse pela geração dos radicais livres, *in vivo*, devido à exposição de organismos vivos a radiações ionizantes.

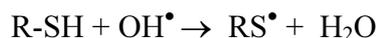
In vivo, este radical é principalmente produzido através da reação de Haber-Weiss, que envolve a reação de Fenton (catalisada por Fe^{3+} e algumas vezes por Cu^{2+}). Do ponto de vista benéfico, fisiologicamente ele é intermediário na biossíntese das prostaglandinas, mediadores da dor.¹⁹

O radical $\bullet\text{OH}$ é o maior produto resultante da reação de ionização de alta energia da água, conforme a equação 10.



Equação 10: Formação do radical hidroxil através da ionização da água.

O radical $\bullet\text{OH}$ é um oxidante extremamente agressivo, reagindo com a maioria das moléculas biológicas numa velocidade controlada por difusão. A combinação do radical $\bullet\text{OH}$ com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirma sua alta reatividade⁹. Por essa razão, a geração deste radical *in vivo* não é duradoura, (microsegundos) uma vez que ele combina-se rapidamente com outras moléculas que estejam em sua vizinhança. Reações de radicais $\bullet\text{OH}$ com moléculas biológicas são não-radicalares. Por exemplo, se o radical $\bullet\text{OH}$ for produzido próximo ao DNA e esse DNA estiver fixado a um metal, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do DNA⁹. Os radicais $\bullet\text{OH}$ podem abstrair átomos de hidrogênio de muitas moléculas biológicas, incluindo os tióis, segundo a equação 11.

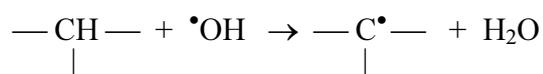


Equação 11: Formação do radical derivado do enxofre (tio) através do radical hidroxil e grupos tíois de biomoléculas.

Desse tipo de reação podem resultar a formação de radicais derivados do enxofre (radicais tio) que possuem muitas propriedades químicas interessantes como a de se combinar com o oxigênio, gerando radicais oxi-enxofre, tais como RSO_2^\bullet e RSO^\bullet , que provocam prejuízos a moléculas biológicas. Pode inativar várias proteínas (enzimas e membranas celulares) ao oxidar seus grupos sulfidrilas (—SH) a pontes dissulfeto (—S—S—), ou, ainda, iniciar a oxidação de ácidos graxos polinsaturados (AGPI) das membranas celulares⁹.

Por exemplo, radicais contendo enxofre originados a partir da penicilina parecem ser capazes de danificar certas proteínas. Quando utilizamos compostos à base de tíois como seqüestradores de radicais livres, como a penicilina, é essencial indagar o que pode ocorrer com os radicais de enxofre resultantes nos sistemas biológicos¹⁰.

A melhor caracterização do dano biológico causado pelo radical $^\bullet\text{OH}$ é a habilidade em estimular reações em cadeia junto à membrana plasmática, processo conhecido como lipoperoxidação ou peroxidação lipídica (LPO). Isso ocorre quando $^\bullet\text{OH}$ é gerado junto à membrana, atacando os AGPI de membranas fosfolipídicas. O radical $^\bullet\text{OH}$ captura um átomo de hidrogênio a partir dos átomos de carbono destes ácidos e combina-se para formar uma molécula de água e um radical centrado no carbono, segundo a equação 12.

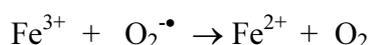


Equação 12: Formação de radicais centrados no carbono através da reação do radical hidroxil e ácidos graxos polinsaturados.

Esta reação, remove o radical $^\bullet\text{OH}$, fazendo com que a membrana plasmática fique com um radical centrado no carbono ($\text{—C}^\bullet\text{—}$). Radicais centrados no carbono formados a partir de AGPI sofrem rearranjo molecular, produzindo dienos conjugados que podem ter vários fins. Se estes radicais colidirem com a membrana, podem ocorrer entrelaçamentos entre os elétrons destes ácidos graxos, formando ligações covalentes¹⁰.

Reações de Fenton e Haber-Weiss

A maioria da produção do radical $\bullet\text{OH}$, *in vivo*, é gerada pela reação de H_2O_2 com $\text{O}_2^{\bullet-}$. *In vivo*, esse radical é principalmente produzido através da reação de Haber-Weiss, que envolve a reação de Fenton. Na realidade, apresenta dois passos e é dependente de Fe^{3+} e algumas vezes de Cu^{2+} , segundo as equações 13-15.



Equação 13: Formação do íon Fe^{2+} através da redução de Fe^{3+} e radical superóxido.



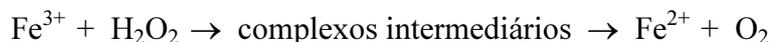
Equação 14: Reação de Fenton.



Equação 15: Reação de Haber-Weiss.

A Reação de Fenton é um exemplo clássico de reação dos radicais livres, catalizadas por metais de transição. Uma mistura de sais de Fe^{2+} e H_2O_2 oxida diferentes moléculas orgânicas nos sistemas vivos. Fenton foi o primeiro cientista a relatar a oxidação de um composto orgânico, o ácido tartárico, por este tipo de sistema, em 1876. Após 128 anos, ainda existe um debate sobre o mecanismo da oxidação de compostos orgânicos pelo sistema $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$. Provavelmente, existem muitas espécies oxidantes envolvidas, mas o que melhor caracteriza este sistema é a produção do radical $\bullet\text{OH}$, segundo a reação acima. Frequentemente, sugere-se que espécies ferril (Fe^{4+}) também estejam envolvidas no sistema de Fenton, contudo, este mecanismo ainda não está esclarecido. Possivelmente, espécies Fe^{4+} podem estar envolvidas em complexos intermediários, podendo gerar radicais $\bullet\text{OH}$. Traços de

Fe^{3+} podem ser capazes de reagir com H_2O_2 , conforme a equação 16, embora essa reação seja muito mais lenta do que com Fe^{2+} no pH fisiológico, já que depende do ferro:



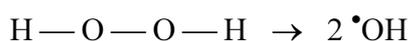
Equação 16: Regeneração de Fe^{+2} através Fe^{+3} e peróxido de hidrogênio.

A geração de radicais $\bullet\text{OH}$ por misturas de quelantes de Fe^{+3} (EDTA férrico) e H_2O_2 parece também estar envolvida na produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$, uma vez que esta produção foi inibida pela SOD, mas não existem evidências diretas que isto ocorra. No entanto, em muitos sistemas biológicos, o radical $\bullet\text{OH}$ pode provocar uma série de reações radiculares, como o processo lipoperoxidativo.

Os mecanismos das reações de Fenton e Haber-Weiss são os mais aceitos dentro da comunidade científica. Recentemente, Dunford, em 2002 publicou um artigo revendo todo o mecanismo das reações de Fenton e Haber-Weiss ²⁴.

Em sistemas biológicos, o radical $\bullet\text{OH}$ é produzido por inúmeras reações. A Reação de Fenton é uma das principais fontes. Todavia, existem outras fontes como:

a. fissão homolítica induzida por UV, em que a ligação O-O na H_2O_2 gera $\bullet\text{OH}$, segundo equação 17,



Equação 17: Fissão homolítica da água, produção do radical hidroxil.

- b. a partir do ozônio do ar,
- c. durante o metabolismo do etanol,
- d. decomposição do ácido peroxinitroso,
- e. radiação ionizante,
- f. ácido hipocloroso reagindo com $\text{O}_2^{\bullet-}$, segundo a equação 18,



Equação 18: Formação do radical hidroxil através da reação do ácido hipocloroso e radical superóxido.

Químicos e biólogos têm estudado a função das reações de radicais livres em danos gerados nos organismos vivos por radiações de alta energia, como as radiações gama (γ). Quando um tecido é exposto a este tipo de radiação, a maior parte da energia é absorvida pelas moléculas de água, que se encontram em maior proporção do que qualquer outra molécula nos organismos vivos. A radiação causa uma ruptura da ligação covalente O — H, resultando na produção de dois radicais, o radical $\bullet\text{OH}$ e o radical $\text{H}\bullet$ (ou átomo de hidrogênio) ¹⁰. Radicais produzidos por este tipo de radiação são responsáveis por uma grande parte dos danos provocados no DNA, proteínas e lipídeos.

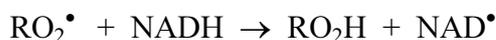
Em 1970, Rerup ²⁵ provou que o modelo experimental induzido por uma substância chamada aloxano, produto da oxidação do ácido dialúrico, destrói as células β produtoras de insulina do pâncreas, resultando numa forma experimental de diabetes, comprovando a participação do $\bullet\text{OH}$ como agente tóxico na diabetes induzida por este agente diabetogênico (agente produtor da diabetes) e outras substâncias que são capazes de reagir com ferro. A eficácia de captadores de radical $\bullet\text{OH}$ como agentes antidiabéticos em ratos foi estudada por Cohen, em 1978. Podemos citar como captadores de radicais $\bullet\text{OH}$: álcoois alifáticos, dimetilsulfóxido, tiuréia e seus análogos e a catalase.

Cohen também estudou a participação do radical $\bullet\text{OH}$ como agente citotóxico nos processos neurodegenerativos induzidos pela 6-hidroxi-dopamina e 6-aminodopamina. Resultados de estudos com captadores de radical hidroxil tanto *in vitro* como *in vivo* comprovaram a participação desse radical no processo neurodegenerativo ²².

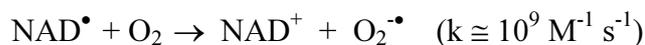
2.1.1.4. Radical Peroxil ($\text{RO}_2\bullet$) e Radicais Alcoxil ($\text{RO}\bullet$)

Os radicais peroxil ($\text{RO}_2\bullet$) e alcoxil ($\text{RO}\bullet$) geralmente são bons agentes oxidantes. Nos sistemas biológicos, radicais alcoxil ($\text{RO}\bullet$) sofrem freqüentemente rápido rearranjo molecular para outras espécies radicalares. De fato, o $\text{HO}_2\bullet$, a forma protonada do radical $\text{O}_2\bullet$, pode ser considerada a forma mais simples de radical peroxil. Existem evidências de que esse radical é mais reativo do que o $\text{O}_2\bullet$, pois possui uma maior habilidade em iniciar a destruição das membranas biológicas ⁹.

Por exemplo, o radical RO_2^\bullet oxida ascorbato e o NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), levando à formação do radical superóxido em presença de O_2 , como mostram as equações 19 e 20.

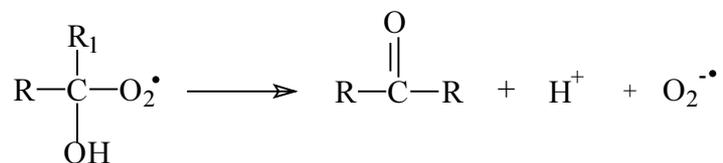


Equação 19: Oxidação do NADH pelo radical peroxil.



Equação 20: Reação de oxidação NAD^\bullet , com a formação do radical superóxido em presença de O_2 .

No processo de peroxidação lipídica, esses radicais podem arrancar o hidrogênio de outras moléculas. Radicais RO_2^\bullet podem dissociar-se, liberando o radical $\text{O}_2^{\bullet-}$, conforme equação 21.



Equação 21: Reação do radical peroxil (RO_2^\bullet) para liberação do radical $\text{O}_2^{\bullet-}$.

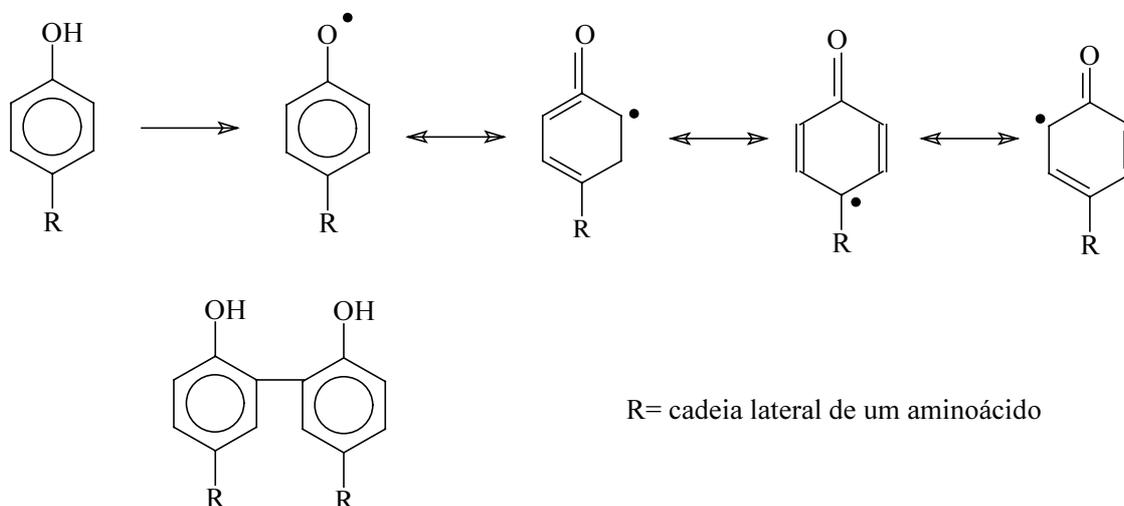
Radical RO_2^\bullet podem também reagir entre si (Mecanismo de Russell), gerando oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), conforme equação 22 ¹⁰.



Equação 22: Reação de radicais RO^\bullet entre si, gerando oxigênio singlete $^1\text{O}_2$.

O estresse oxidativo está implicado em diversas desordens neurodegenerativas, mais comumente com o “mal de Alzheimer”. Em um trabalho recente, realizado por Kanski, em 2002, foi avaliado o potencial antioxidante do ácido ferúlico, um composto fenólico, presente em frutas e vegetais, como o tomate. Nesse estudo foi verificada a capacidade do ácido ferúlico proteger culturas neuronais do ataque lipoperoxidativo do radical RO_2^\bullet . Através da técnica de EPR, adicionalmente foi estudado o efeito desse ácido na oxidação de membranas sinaptossomais *in vitro*, (que se comportam similarmente aos neurônios), provocado por radicais $^\bullet\text{OH}$ e RO_2^\bullet . Os resultados obtidos indicam que na presença do ácido ferúlico o estresse oxidativo é reduzido em células neuronais causado por estes radicais, mostrando baixos níveis de oxidação de proteínas, peroxidação lipídica e medidas de EROs²⁶.

Radicais RO_2^\bullet e RO^\bullet aromáticos tendem a ser menos reativos, desde que os elétrons possam ser deslocalizados no anel benzênico. Por exemplo, a abstração do radical H^\bullet a partir de grupos OH da tirosina gera radicais tirosil (tir- O^\bullet). Quando este tipo de radical é gerado em sistemas biológicos, freqüentemente recombina-se, produzindo bitirosinas, conforme equação 23.



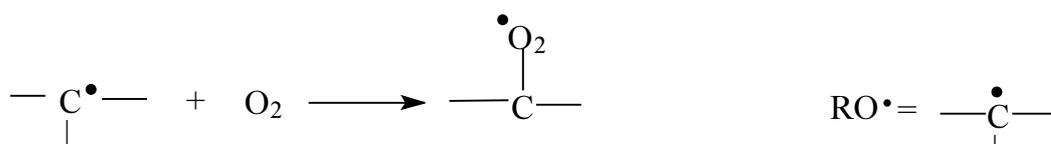
Equação 23: Reação de formação do radical tirosil, que se ligam na forma de bitirosinas.

Radicais centrados no carbono são gerados pelo ataque de radical $^\bullet\text{OH}$ a compostos orgânicos. Sob condições aeróbicas, muitos destes radicais reagem diretamente com O_2 ($k > 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), segundo equação 24.



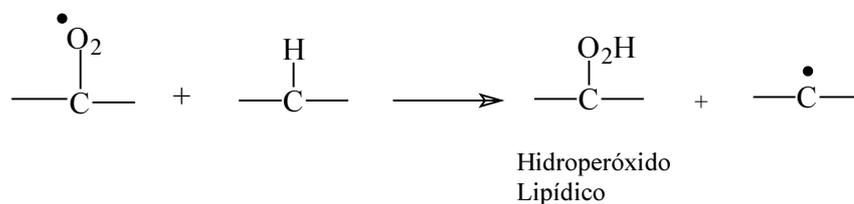
Equação 24: Reação de radicais centrados no carbono e O₂, com formação do radical peróxil.

A decomposição de peróxido orgânico (ROOH) pode gerar RO₂[•] e RO[•]. Radicais centrados no carbono formados a partir de cadeias de ácidos graxos polinsaturados podem sofrer rearranjos moleculares produzindo estruturas de dienos conjugados, podendo ter vários destinos como foi mencionado anteriormente. Desta forma, se dois radicais colidem com a membrana lipídica, os elétrons podem unir-se numa ligação covalente ao lado das cadeias de ácidos graxos polinsaturados. Reações com proteínas de membranas também são possíveis. Contudo, sob condições fisiológicas, os radicais centrados no carbono combinam-se com o oxigênio, produzindo o radical RO₂[•], conforme equação 25.



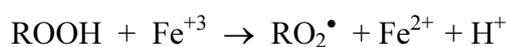
Equação 25: Reação do radical RO[•] com o oxigênio molecular.

Radical RO₂[•] são suficientemente reativos para atacar cadeias de ácidos graxos adjacentes, abstraindo um hidrogênio, conforme equação 26, e outro radical centrado no carbono é gerado, numa reação em cadeia.



Equação 26: Reação de formação de hidroperóxido lipídico.

O radical $\bullet\text{OH}$ pode ser formado a partir da conversão de ácidos graxos dentro de hidroperóxidos lipídicos. O acúmulo de hidroperóxidos lipídicos na membrana prejudica a sua funcionalidade e pode causar colapso na célula atingida. Hidroperóxidos lipídicos podem decompor-se numa grande variedade de produtos citotóxicos que são indesejáveis como no caso dos aldeídos e outros. A literatura tem focado sua atenção para a malonildialdeído (MDA). Radicais $\text{RO}_2\bullet$ e aldeídos citotóxicos podem causar danos severos às proteínas de membrana, inativando receptores e enzimas ligadas a elas ¹⁰. A maioria dos peróxidos é estável à temperatura ambiente. Assim, podem ser decompostos por aquecimento, exposição à luz UV ou à adição de íons metálicos de transição, como por exemplo, o ferro, como mostram as reações nas equações 27 e 28.



Equação 27: Formação do radical peroxil, na presença de peróxidos lipídicos e Fe^{+3} .



Equação 28: Formação do radical alcóxil, na presença de peróxidos lipídicos e Fe^{+2} .

2.1.1.5. Óxidos de Nitrogênio

O monóxido de nitrogênio, também conhecido como óxido nítrico, $\text{NO}\bullet$, é um dos compostos mais nocivos da atmosfera. É um poluente ambiental extremamente tóxico, emitido pelos escapamentos dos automóveis. Há duas décadas atrás, o $\text{NO}\bullet$ era considerado apenas mais uma molécula tóxica, destruidora da camada de ozônio, suspeita de ser carcinogênica e precursora de chuva ácida. Entretanto, nos últimos anos, diversas linhas de pesquisa estabeleceram a importância crucial do $\text{NO}\bullet$ no corpo humano. Em 1992, foi comprovado que esta molécula é essencial para o bom funcionamento do cérebro, artérias, sistema imunológico, fígado, pâncreas, útero, nervos periféricos e pulmões. Devido a esta abrangência de ação, esta molécula foi eleita no ano de 1992 pela revista Science como a molécula do ano ²⁷.

O $\text{NO}\bullet$ é sintetizado e secretado por um grande número de células de mamíferos. Em pequenas doses, é benéfica para o ser humano ²⁸.

O NO[•] é um componente essencial em muitos processos fisiológicos, tais como na regulação de funções cardiovasculares, na comunicação entre o sistema nervoso central e periférico, na mediação da defesa contra microorganismos, na aprendizagem e memória de longa duração. A atividade biológica do NO[•] parece estar relacionada à nitrosilação de proteínas contendo centros metálicos com ferro ²⁸.

Os neurotransmissores convencionais são moléculas orgânicas, como por exemplo, as aminas biogênicas, a acetilcolina, os aminoácidos e peptídeos (proteínas de baixo peso molecular). A função desses é conduzir a informação química de uma célula nervosa para outra, estimulando ou inibindo as funções das células-alvo através de uma interação com os receptores ²⁹. O NO[•], diversas vezes, pode funcionar como um neurotransmissor especial, pois seu funcionamento é diferente dos clássicos. É produzido localizadamente, no momento preciso em que ocorre a necessidade. Não apresenta mecanismos especiais de liberação, também não é armazenado em vesículas e atravessa facilmente as membranas celulares ³⁰.

O NO[•] é um gás incolor, moderadamente solúvel em água à temperatura ambiente (2mM à 20°C) e ainda mais solúvel em solventes orgânicos. Possui um par de elétrons desemparelhados no orbital anti-ligante 2p π* , sendo considerado, desta forma, um radical livre, molécula paramagnética, reagindo avidamente com outras moléculas. Na presença de oxigênio, o NO[•] pode desaparecer entre 6-10 segundos depois de formado, embora o tempo exato de meia vida no corpo humano ainda seja desconhecido ¹⁹.

O NO[•] é sintetizado no organismo por uma enzima denominada óxido nítrico sintase (NOS), através da oxidação da L-arginina pelo O₂ ^{28,31,32}. A presença de alguns co-fatores, como nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida (NADPH), flavina mononucleotídeo (FMN), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e tetrahydrobiopterina (TBH₄) é essencial na síntese do NO[•] ³³.

Primeiramente, ocorre a reação de hidroxilação da L-arginina através da oxidação direta de 1 mol de NADPH pela NOS a qual forma a N-hidroxi-L-arginina. Subseqüentemente após essa reação, ocorre a oxidação de 0,5 mol de NADPH e TBH₄ a partir da N-hidroxi-L-arginina para a formação de NO[•] e L-citrulina ³¹.

Existem diversas isoformas da NOS, que são classificadas em dois grupos. As óxido nítrico sintases constitutivas (cNOS), sintetizada pelas células endoteliais (e-NOS) e neuronais (n-NOS). Essas enzimas são dependentes da concentração intracelular de cálcio e produzem NO[•] em pequenas quantidades, para funções delicadas como a regulação da pressão

arterial e neurotransmissão, respectivamente. E a óxido nítrico sintase induzida (iNOS), sintetizada por células como os macrófagos ativados, por exemplo, na resposta a estímulos externos, produzindo NO^\bullet em quantidades relativamente maiores para funções como a defesa celular²⁷.

Bredt & Snyder, em 1990, propuseram que a enzima n-NOS é dependente da calmodulina, explicando desta maneira a função crucial do cálcio no relaxamento do músculo liso dependente do endotélio³⁴.

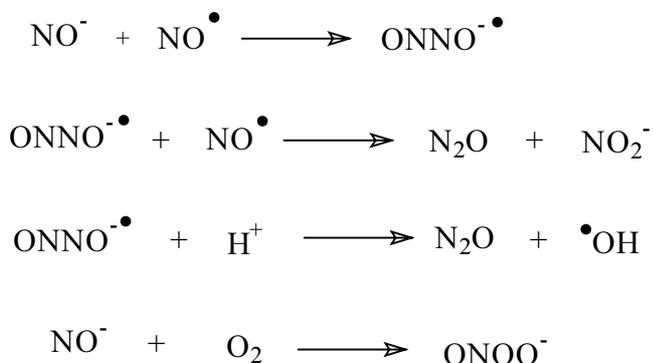
Em 1992, Wolff & Datto utilizaram o sistema das células pituitárias GH₃, ideais no estudo da verificação e comprovação da regulação da NOS por cálcio e o seu potencial de modulação de proteínas dependente de fosforilação³⁵.

As três isoformas da enzima NOS apresentam em sua estrutura química sítios de ligação do grupo heme, TBH₄, FMN, FAD e interagem com a calmodulina. As seqüências de aminoácidos presentes em suas estruturas apresentam similaridade de uma forma que explica a semelhança na função catalítica e a necessidade de co-fatores³⁶.

O desenvolvimento de fármacos capazes de inibir seletivamente a iNOS é um dos campos de trabalho mais desafiadores para a química medicinal. Um grande avanço nesta área foi relatado pelo Grupo Biomédico da Johnson Matthey o qual é responsável por uma das maiores contribuições na pesquisa e desenvolvimento de fármacos baseada em metais, no campo de fármacos inibidores iNOS. A maior contribuição desse grupo foi sintetizar complexos de rutênio, capazes de inibir seletivamente a iNOS²⁸.

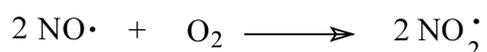
O monóxido de nitrogênio (NO^\bullet) e o dióxido de nitrogênio (NO_2^\bullet) possuem número ímpar de elétrons e são considerados radicais livres. O mesmo não ocorre com o óxido nitroso (N_2O), que é um gás denso e tóxico e um forte agente oxidante. Já o NO^\bullet é um gás incolor e um fraco agente redutor. O interesse por este óxido cresceu devido ao seu envolvimento em muitos processos biológicos²⁷.

O NO^\bullet possui um elétron desemparelhado no orbital anti-ligante $2\pi^*$, sendo desta maneira considerada uma molécula paramagnética e um radical livre. Se esse elétron desemparelhado é removido pelo processo de oxidação, produz o cátion nitrosônio, NO^+ . Ou se ocorrer a redução desse elétron, poderá produzir o ânion nitroxil, NO^- . O ânion nitroxil possui um tempo de meia-vida curto e reage com NO^\bullet , produzindo o óxido nitroso, N_2O e possivelmente o radical $^\bullet\text{OH}$. O NO^- pode reagir também com O_2 , produzindo um intermediário reativo, o peroxinitrito (ONOO^-), segundo esquema 1^{18,37}.



Esquema 1: Reações do monóxido de nitrogênio.

O NO^\bullet reage também com O_2 , quando exposto ao ar podendo formar um gás dióxido de nitrogênio (NO_2^\bullet), constituindo-se em um radical livre mais reativo do que o NO^\bullet . A reação global pode ser descrita como segue abaixo, na equação 29.



Equação 29: Formação do dióxido de nitrogênio.

O NO^\bullet é também um mediador da neurotoxicidade do glutamato. A produção no cérebro ocorre quando um neurônio emissor (neurônio pré-sináptico) libera um mensageiro químico, o glutamato, difundindo-se pelo espaço sináptico e ligando-se a um receptor especializado, o receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) em um neurônio receptor (neurônio pós-sináptico). Quando uma excessiva quantidade de glutamato é liberada, ocorre um acidente vascular cerebral, que através de receptores NMDA proporciona a produção de grandes quantidades de NO^\bullet , ocasionando a morte neuronal. Queiroz & Batista, em 1999, propuseram

que a morte neuronal ocorre devido à reação do NO^\bullet com o radical O_2^\bullet formando o ONOO^- , sendo este considerado um agente neurotóxico ³⁸.

2.2. Espécies reativas- não-radicais livres

2.2.1. Peroxinitrito (ONOO⁻)

A formação biológica do peroxinitrito (ONOO⁻) ocorre principalmente pela reação do NO[•] com O₂^{-•}, segundo a equação 31. A reação entre estes dois radicais é de segunda ordem, com constantes de velocidade determinadas independentemente, nos valores de $k = 4,3; 6,7$ e $19 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, estando na ordem de grandeza de $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, indicando uma reação controlada por difusão ³⁷.

O ONOO⁻ é uma ERN, tipo não-radical livre com poderosa ação oxidante que atua principalmente na oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), o colesterol, estando assim envolvido em doenças coronárias cardíacas, o que é considerado o ponto de partida na formação de placas ateroscleróticas ^{44,45,46}.



Equação 30: Formação do peroxinitrito.

O peroxinitrito é capaz de decompor-se para liberar o radical [•]OH independente da catálise metálica.

Em sistemas biológicos, um importante aspecto a ser considerado é a diferença de reatividade entre o ONOO⁻ e NO[•] sobre células e tecidos. O NO[•] é um fraco agente oxidante e também um fraco agente nitrante. Ele participa principalmente nas interações reversíveis com centros metálicos, nas reações de combinação radical-radical e reações de nitrosilação via formação do intermediário trióxido de nitrogênio (N₂O₃). O ONOO⁻, ao contrário do radical NO[•], é um forte agente oxidante e nitrante e um fraco agente nitrosilante ³⁷.

A geração do ONOO⁻, contra microorganismos invasores em pequenas doses, é benéfica ao organismo, mas quando gerado excessivamente pode danificar muitas moléculas biológicas. A bioquímica deste não-radical livre é pesquisada exaustivamente. No processo inflamatório, é capaz de nitrar e oxidar biomoléculas, compostos fenólicos, tais como a tirosina, implicando um impacto considerável sobre a estrutura celular ⁴⁷.

2.2.2. Peróxido de Hidrogênio

O peróxido de hidrogênio é uma molécula biologicamente importante, produzida principalmente pela reação do ânion $O_2^{\bullet-}$ através da reação de dismutação. Apesar de não ser um radical livre, o H_2O_2 é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o radical $\bullet OH$. Possui vida longa, sendo capaz de atravessar as camadas lipídicas, podendo reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas a Fe^{+3} , por exemplo. Desta maneira, é altamente tóxico para as células; e esta toxicidade aumenta de dez para mil vezes quando em presença de ferro ⁹.

A propriedade redox desta molécula e sua capacidade de formar radicais livres altamente reativos na presença de íons metálicos de transição, fazem com que o organismo tenha desenvolvido mecanismos de defesa contra o excesso da mesma. O H_2O_2 indesejado é removido das células pela ação de enzimas como a catalase, glutathione peroxidase e outras peroxidases. A decomposição do H_2O_2 , catalisada por íons metálicos e outras reações, leva à formação de radicais livres como o HO_2^{\bullet} e $\bullet OH$. Muitas enzimas, como a urato oxidase, a glicose oxidase e as D-aminoácidos oxidases produzem H_2O_2 diretamente pela transferência de dois elétrons para o O_2 .

O H_2O_2 é um agente oxidante fraco e um fraco redutor, relativamente estável na ausência de íons metálicos de transição ¹⁸. Por exemplo, nenhuma oxidação ocorre quando o DNA, lipídeos ou a maioria das proteínas são incubadas com H_2O_2 mesmo em concentrações na faixa de milimolar. Esta oxidação somente ocorrerá se o H_2O_2 atravessar a membrana lipídica e reagir com íons ferro ou cobre, produzindo espécies muito mais danosas como o radical $\bullet OH$. O H_2O_2 é capaz de inativar poucas enzimas diretamente, usualmente pela oxidação de grupos tióis ($-SH$) lábeis no sítio ativo. A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, uma enzima de caminho glicolítico, é aparentemente inativada, em células tratadas com H_2O_2 exógeno¹⁹.

O peróxido de hidrogênio, freqüentemente utilizado como desinfetante, ainda pode oxidar certos ácidos em altas concentrações, como por exemplo, o piruvato ($CH_3COCOOH$) e o 2-oxoglutarato,. Algumas classes de bactérias e muitas células de animais em cultura são

injurizadas ou mortas se o H_2O_2 for adicionado ao meio de cultura em concentrações na faixa de 10- 100 μM .

A enzima mieloperoxidase utiliza o H_2O_2 produzido pela reação de dismutação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ para oxidar íons cloreto, produzindo o ácido hipocloroso, conforme equação 31, ¹⁰.



Equação 31: Reação de utilização do H_2O_2 na formação do ácido hipocloroso.

A atividade anti-séptica do mel, que é utilizado desde os tempos antigos no tratamento de ferimentos, ocorre parcialmente devido a enzimas específicas que produzem o H_2O_2 .

O H_2O_2 e a H_2O misturam-se facilmente e difundem-se dentro das células *in vivo*. Fisiologistas reconheceram há muitos anos que água atravessa a camada bilipídica das membranas celulares muito mais rapidamente do que seria esperado por simples difusão de uma molécula polar. De forma similar o H_2O_2 difunde-se através da membrana lipídica ¹⁹.

O H_2O_2 juntamente com o radical $\bullet\text{OH}$ podem ser produzidos por plaquetas ativadas.

A literatura tem mostrado que as plaquetas também produzem EROs, ânions $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 ³⁹. Alguns autores comprovaram que H_2O_2 aumenta os efeitos de ativadores plaquetários ⁴⁰, enquanto outros mostraram inibição ^{41,42}. O H_2O_2 parece atuar sinergicamente com NO^{\bullet} na inibição da agregação plaquetária, funcionando como um agente da vasodilatação na parede arterial ⁴³.

2.2.3. Ácido Hipocloroso

O ácido hipocloroso, HClO , é um ácido produzido fisiologicamente pela enzima mieloperoxidase, presente principalmente em neutrófilos ativados. A atividade fisiológica predominante desta enzima é converter H_2O_2 e íons Cl^- em HClO , embora ela também seja capaz de degradar H_2O_2 à O_2 e H_2O ⁴⁸. Cerca de 5% do H_2O_2 consumido por esta enzima é

utilizado na produção de radicais tirosil. A principal função dessa enzima é eliminar infecções.

A mieloperoxidase está relacionada com numerosas doenças inflamatórias, tais como artrites reumatóides, síndrome de sofrimento respiratório de adultos, esclerose múltipla, fibrose cística, injúria de pulmão neonatal. Também é apontada que ela pode oxidar lipoproteínas de baixa densidade na aterosclerose e leucemia mielóide aguda⁴⁸.

O HClO possui uma vital importância na função de morte de microorganismos invasores, tendo alta reatividade e habilidade de danificar biomoléculas por oxidação direta ou por decomposição para formar o gás cloro, Cl₂. O uso do H₂O₂ produzido pela reação de dismutação do O₂^{•-} oxida íons cloreto a ácido hipocloroso (HClO) é realizado pela enzima mieloperoxidase, conforme equação 32¹⁹.



Equação 32: Reação da formação do ácido hipocloroso, produzido pela enzima mieloperoxidase.

O HClO é um ácido fraco com pka de 7,5 no pH fisiológico (pH 7,4) está 50 % ionizado, conforme equação 33.



Equação 33: Dissociação do ácido hipocloroso no pH fisiológico.

O HClO em concentrações abaixo de 10-20 μM oxida os grupos sulfidril (-SH) das proteínas da membrana plasmática. Nestas concentrações, o ácido causa distúrbios nas funções da camada externa da membrana. Pode, ocorrer, também, a inativação de transportadores de glicose e aminoácidos e a perda da capacidade de bombeamento do K⁺. Altas quantidades de HClO (> 50 μM) causam danos oxidativos generalizados do grupo SH e a formação do grupo carbonil das proteínas associadas a células lisas, processo conhecido como carbonilação de proteínas¹⁰.

2.3. Mecanismo de Lipoperoxidação

Os componentes celulares são suscetíveis à ação das EROs, porém a membrana é um dos alvos mais atingidos em decorrência do processo peroxidação lipídica, já que ocasiona alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. A perda de seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos, como o malonilaldeído, culminando com a morte celular, são algumas das conseqüências do processo lipoperoxidativo. Pode estar associado aos mecanismos de envelhecimento, câncer, exacerbação de toxicidade por xenobióticos entre outras patologias. Tanto a formação das EROs quanto o processo de lipoperoxidação nem sempre são prejudiciais, uma vez que seus produtos são importantes nas reações em cascata que ocorrem a partir do ácido araquidônico, responsável pela formação das prostaglandinas, mediadoras da dor e, portanto, na resposta inflamatória. Entretanto, o excesso de tais produtos pode ser lesivo ⁹.

As organelas celulares como a mitocôndria, lisossomos e peroxissomos são rodeadas por membranas que contém grande quantidade de ácidos graxos polinsaturados (AGPI). As membranas biológicas são formadas por lipídeos e proteínas. Dependendo do número de funções que a membrana exerce, a quantidade de proteínas aumenta. Em membranas celulares animais, os lipídeos dominantes são os fosfolipídeos ¹⁹.

Os fosfolipídeos são os principais componentes das membranas biológicas ⁴⁹, sendo ésteres do álcool glicerol. Como a fosfatidilcolina, a fosfatidiletanolamina, a esfingomiéline, o colesterol e o fosfatidilinositol, conforme figura 3 a seguir. O lipídeo mais comum em células animais é a fosfatidilcolina.

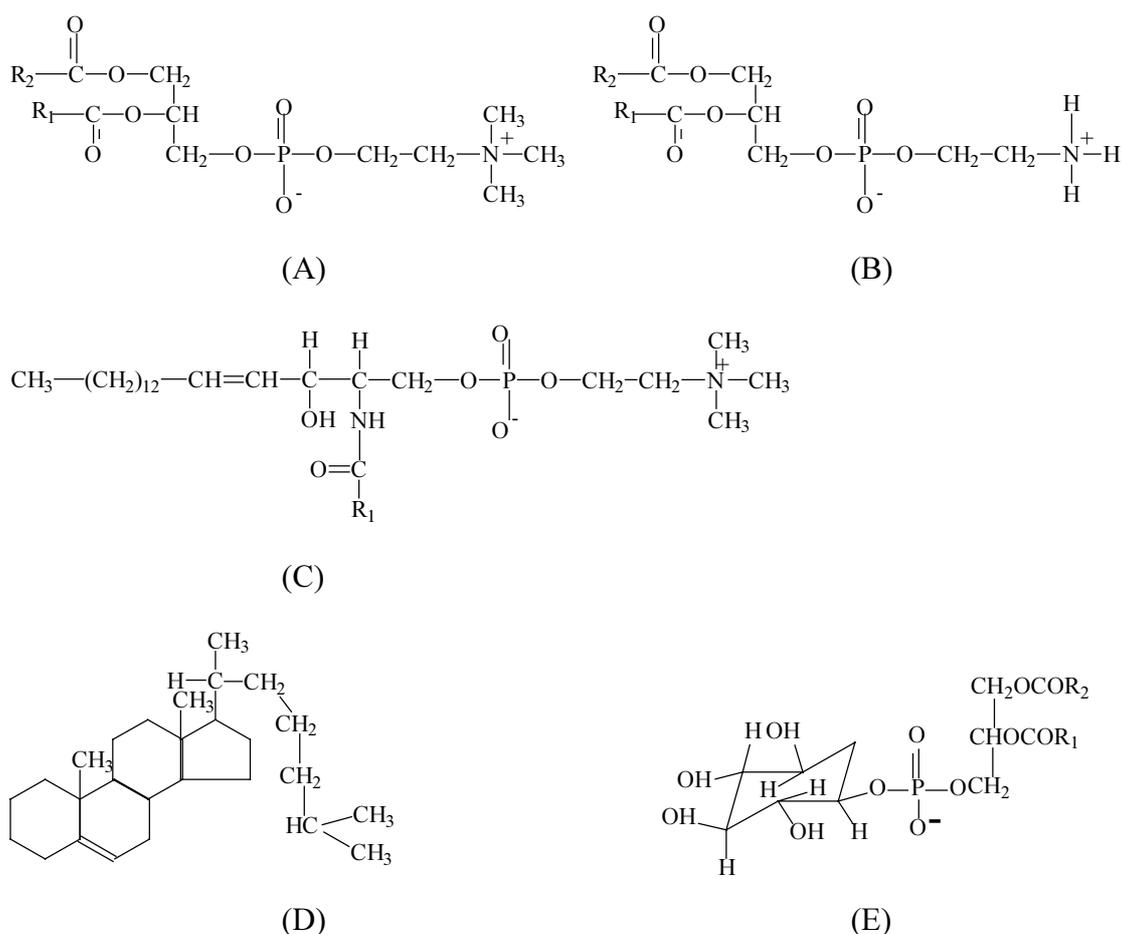


Figura 3: Principais componentes das membranas biológicas. (A) fosfatidilcolina (B) fosfatidiletanolamina (C) esfingomiélna (D) colesterol (E) fosfatidilinositol.

O mecanismo de lipoperoxidação (LPO) é um processo complexo conhecido por ocorrer em plantas e animais. Envolve a formação e propagação de radicais lipídicos, o aumento de oxigênio, o rearranjo das ligações duplas dos ácidos graxos polinsaturados e a eventual destruição das membranas lipídicas, produzindo uma variedade de produtos de decomposição, incluindo alcoóis, cetonas, aldeídos e éteres^{50,51}. Esse processo foi definido por A. L. Tapel como “a deterioração oxidativa de lipídeos polinsaturados”¹⁹.

A LPO pode ser compreendida ainda como uma auto-oxidação iniciada por EROs dos AGPI. É um mecanismo comum em condições patológicas em que existe um estresse oxidativo. Pode ser descrita como uma reação de propagação por si mesma, que pode resultar em dano ao tecido, se não controlada por antioxidantes⁵².

As membranas lipídicas são moléculas anfipáticas, isto é, moléculas que contêm grupos polares ou ionizados em uma de suas extremidades e um grupo apolar na região

oposta. Estas moléculas, quando colocadas em contato com a água, formam agrupamentos esféricos conhecidos por micelas, nas quais as regiões polares estão localizadas na superfície e as regiões apolares são orientadas em direção ao centro da mesma. Esta orientação é muito importante na estrutura das membranas celulares, como veremos posteriormente, nos resultados e discussão ⁵³. Mas, quando a concentração de fosfolípídeos aumenta, formam-se os lipossomas, isto é, vesículas de soluções aquosas rodeadas por uma bicamada lipídica. Lipossomas podem ser rodeados por uma bicamada lipídica simples (vesícula unilamelar) ou muitas bicamadas (multilamelares). Existem fortes evidências de que todas as membranas celulares são constituídas por camadas bilipídicas. A representação esquemática do lipossoma é demonstrado na figura 4 ¹⁹.

Os lipossomas são artificialmente produzidos, utilizados como modelo de estudo, uma vez que são estruturalmente similares à matriz lipídica das células ^{54,55}. Possuem a habilidade de translocar macromoléculas através das membranas plasmáticas, por mecanismos ainda desconhecidos ⁵⁶.

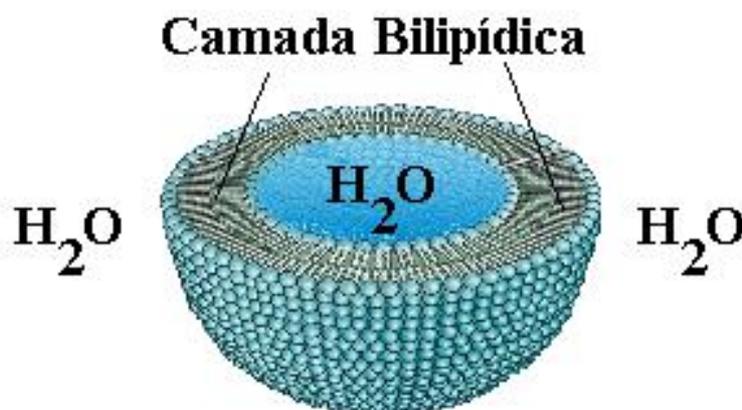
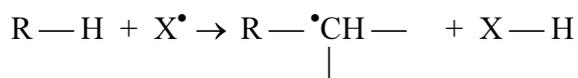


Figura 4: Representação esquemática da bicamada lipídica de lipossomas.

A LPO é um processo que envolve três etapas:

i. iniciação – Esta etapa pode ser realizada por qualquer espécie que tenha reatividade suficiente para abstrair o átomo de H de grupos metileno ($\text{—CH}_2\text{—}$) dos ácidos graxos polinsaturados (AGPI), conforme equação 34. Um átomo adjacente à ligação dupla dos AGPI enfraquece a energia de ligação do átomo de H no próximo carbono, ao lado do grupo

metileno, produzindo hidrogênio bis-alílico, formando radicais centrados no carbono. O potencial de redução de $AGPI^{\bullet}/AGPI$ é cerca de 0,6 V.

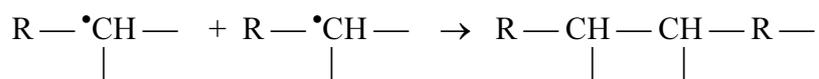


R—H = fosfolípídeo, geralmente ácidos graxos polinsaturados.

Equação 34: Etapa de iniciação do processo de lipoperoxidação. Abstração do hidrogênio de grupos metilênicos dos ácidos graxos polinsaturados.

Termodinamicamente, radicais como $\bullet OH$, HO_2^{\bullet} , RO^{\bullet} e RO_2^{\bullet} são capazes de oxidar os AGPI (potenciais de redução, respectivos = 2,31; 1,06; 1,60 ; 0,77 / 1,44 V). O radical $\bullet OH$ é o mais conhecido e mais importante por iniciar este processo. É um oxidante extremamente agressivo, pois reage com a maioria das moléculas biológicas numa velocidade controlada por difusão, conforme mencionado no item 2.1.1.3.¹⁹.

ii. propagação- Nesta etapa, os radicais centrados no carbono são usualmente estabilizados numa estrutura de ressonância, formando dienos conjugados. Estes radicais podem sofrer várias reações. Por exemplo, se dois destes radicais colidem entre si dentro da membrana plasmática, eles podem ligar-se às cadeias laterais dos AGPI, conforme a equação 35.



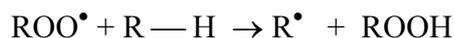
Equação 35: Colisão entre dois radicais centrados no carbono, formando dienos conjugados.

Contudo, sob condições aeróbicas, estes radicais combinam-se com O_2 , especialmente por ser uma molécula hidrofóbica que se concentra no interior da membrana, resultando em radicais peroxil, RO_2^{\bullet} , conforme equação 36.



Equação 36: Reação de formação de peroxil, através da reação de radicais centrados no carbono e oxigênio molecular.

Radicais RO_2^\bullet são capazes de abstrair o hidrogênio de outra molécula lipídica, o de uma outra cadeia lateral dos AGPI, produzindo novamente radicais centrados no carbono. Na realidade, este é o estágio de propagação da LPO. O radical centrado no carbono pode reagir com o O_2 para formar mais radicais RO_2^\bullet numa reação em cadeia, formando hidroperóxidos lipídicos (LOOH), conforme equação 37, que inclui os peróxidos cíclicos.



Equação 37: Etapa de propagação do processo lipoperoxidativo.

iii. terminação- Nesta etapa, radicais centrados no carbono, como o radical RO_2^\bullet , formam produtos de decomposição, conforme equação 38.

2 (ROO^\bullet) \rightarrow produtos de decomposição (MDA = malonildialdeído e 4-hidroxy-2-trans-nonenal)

Equação 38: Etapa de terminação do processo lipoperoxidativo.

Os hidroperóxidos formados também podem servir como precursores numa iniciação adicional ou eventos de propagação de cadeia, conforme equação 39^{19,57}.



Equação 39: Reação de hidroperóxidos com íon Fe^{+2} , na formação adicional de radicais centrados no carbono.

O mecanismo de LPO está ilustrado na figura 5, a partir do ácido araquidônico, mostrando a formação de hidroperóxidos lipídicos e peróxidos cíclicos.

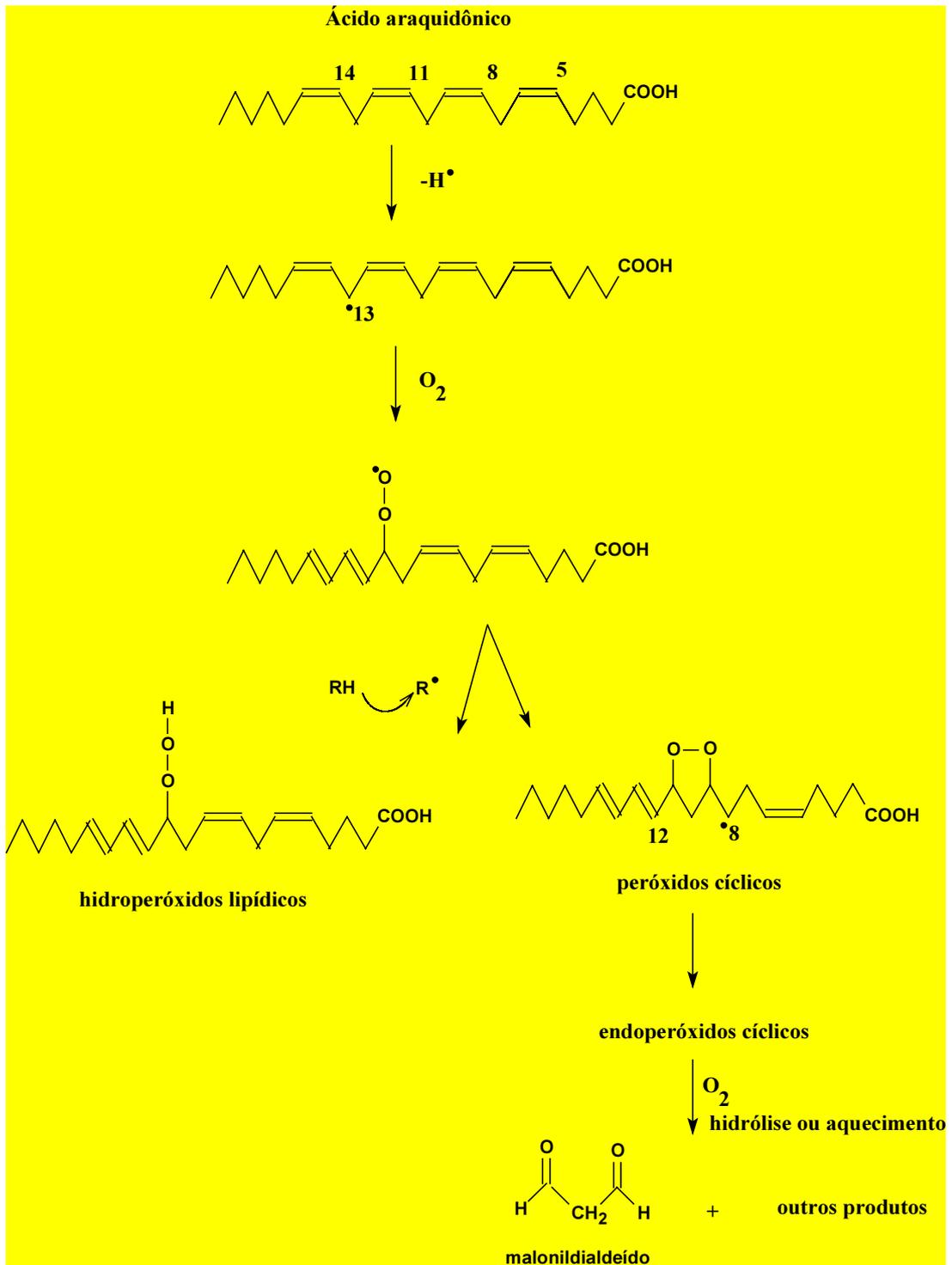


Figura 5: Mecanismo proposto para a formação de hidroperóxidos lipídicos e peróxidos cíclicos a partir do ácido araquidônico.

A abstração do H alílico foi realizada a partir do C-13. O H pode também ser abstraído do C-10 ou C-7, produzindo muitos outros radicais peróxidos e produtos finais. Radicais peróxido podem atacar a ligação dupla na mesma cadeia e gerar radicais peróxidos cíclicos, que podem abstrair H e também levar a formação de isoprostanas¹⁹.

Como se pode observar na figura 5, um dos produtos majoritários de decomposição é o malonildialdeído (MDA), utilizado na detecção da LPO pelo método de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico).

Como neste trabalho o mecanismo de LPO foi induzido pelo radical ascorbil, este está ilustrado na figura 6. Na geração do radical ascorbil, ocorre a redução de um elétron a partir do ascorbato (ácido ascórbico) que forma um complexo estável íon ferroso-ascorbil. Este complexo catalisa a reação de LPO devido ao potencial de redução acompanhado da transferência de um elétron a partir dos ácidos graxos polinsaturados das membranas biológicas⁵⁸.

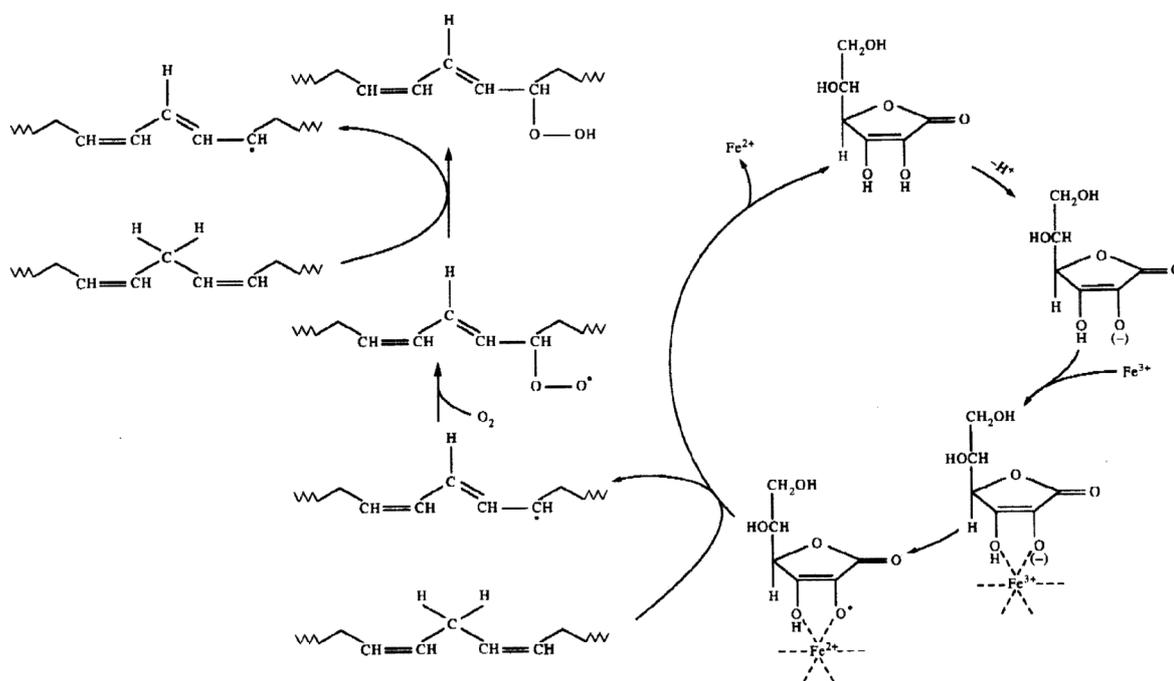


Figura 6: Mecanismo hipotético da iniciação da LPO induzida pelo radical ascorbil em MC, proposto por Casalino⁵⁸.

Estudos sobre os mecanismos de lesão oxidativa têm mostrado que o ferro pode catalisar as reações de oxidação das biomoléculas. Segundo a Reação de Fenton e a Reação de Haber-Weiss está biologicamente capacitado a catalisar estas reações, uma vez que é um metal abundante no organismo.

A lipoperoxidação pode ser catalisada por íons ferro, por conversão de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em radicais altamente reativos (radicais alcóxil- RO• e peróxil- RO₂•), que

por sua vez podem desencadear nova série de reações, denominada ramificação. A velocidade dessas reações dependem da valência do ferro, segundo as equações 40 e 41:



Equação 40: Formação do radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$) e alcóxil (LO^{\bullet}), a partir da reação do hidroperóxido e Fe^{2+} .



Equação 41: Formação do radical hidrogênio (H^{\bullet}) e peróxil (RO_2^{\bullet}), a partir da reação do hidroperóxido e Fe^{3+} .

O papel do ferro na peroxidação lipídica é determinante na iniciação do processo. Assim sendo, uma relação equimolar $\text{Fe}^{+3} : \text{Fe}^{+2}$, no meio, parece ser necessária para que o mesmo ocorra ⁹.

3. ALGUMAS DOENÇAS HUMANAS RELACIONADAS AO ESTRESSE OXIDATIVO

O “estresse oxidativo” provocado por uma superprodução de EROs e/ou ERNs está freqüentemente implicado em muitas patologias humanas, conforme figura 7.

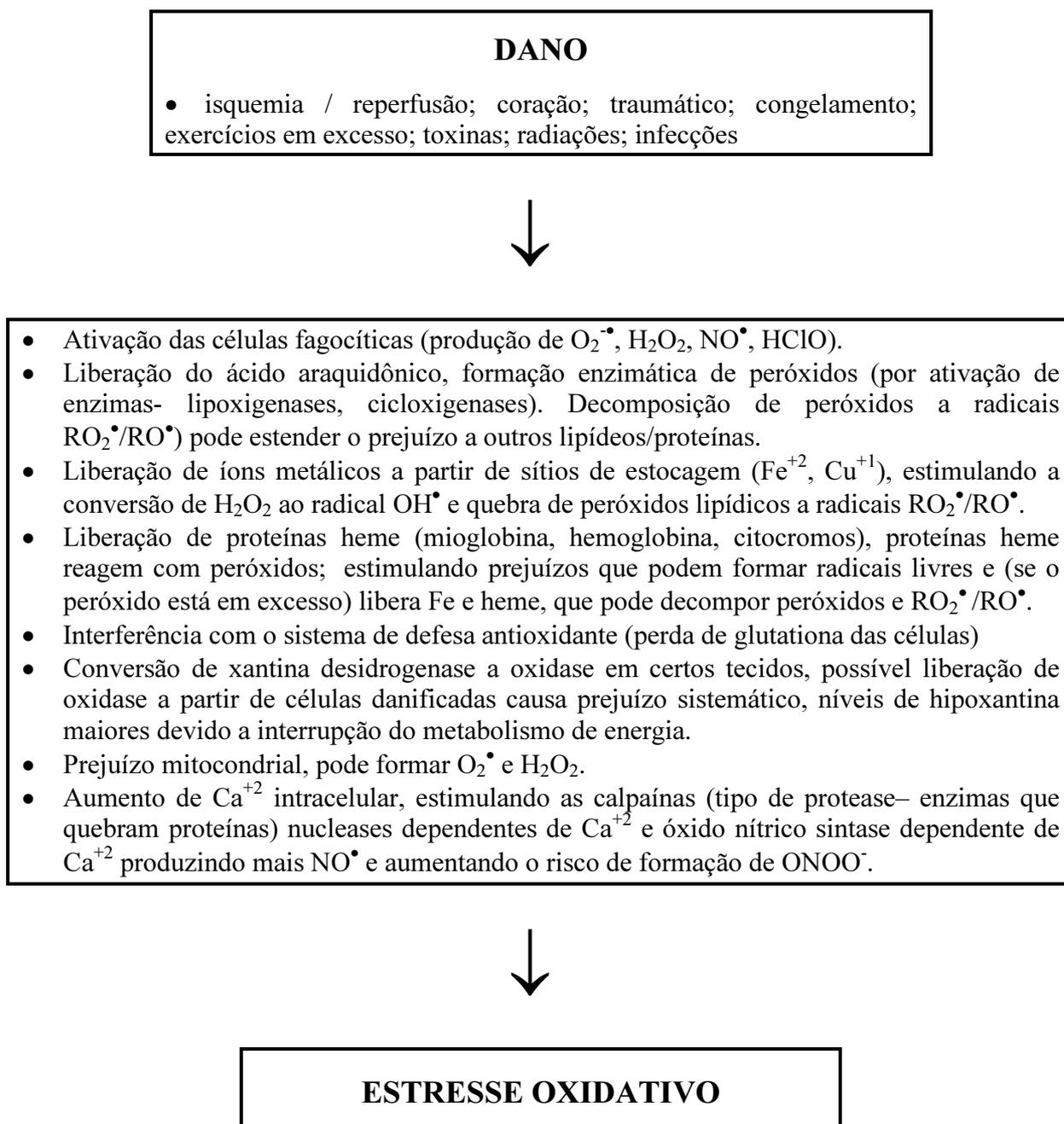


Figura 7: Algumas das razões pelas quais o dano ao tecido pode provocar estresse oxidativo.

Como pode-se observar, existem várias razões para o aparecimento do prejuízo oxidativo nos tecidos danificados. Os radicais livres estão envolvidos em mais de 200 diferentes tipos de doenças humanas. A literatura biomédica está repleta de exemplos, como mostrado no quadro 2 abaixo ¹⁹.

Quadro 2: Algumas das condições clínicas com o envolvimento das EROs/ERNs.

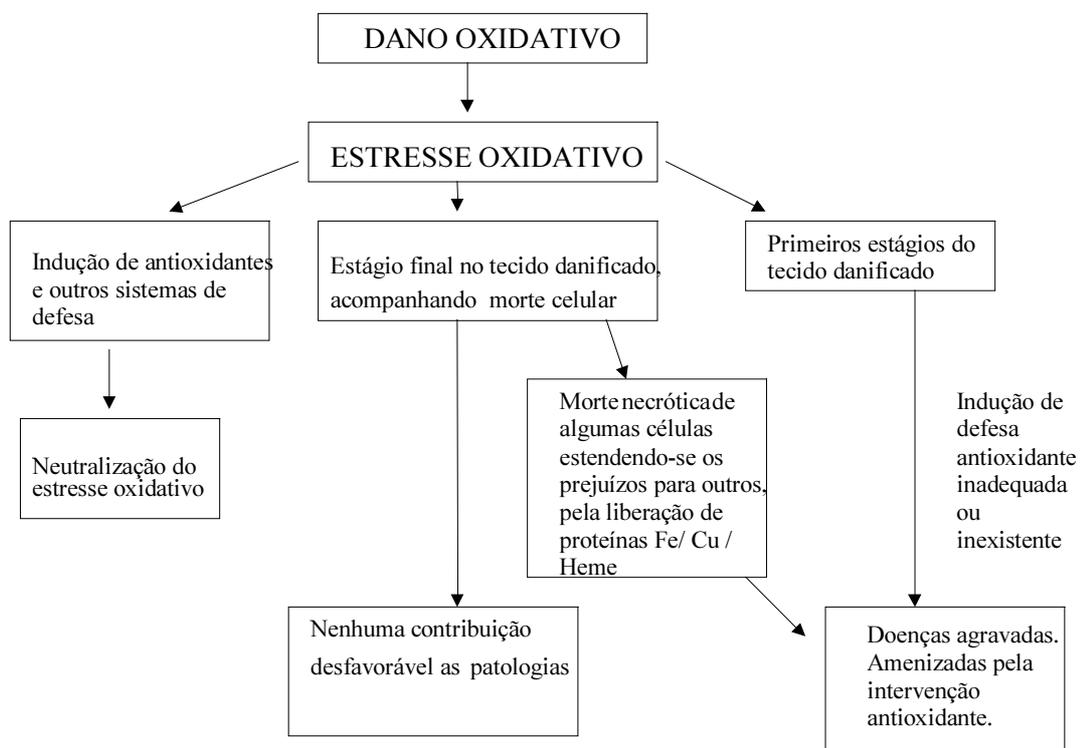
CATEGORIA	EXEMPLOS
Danos imunes/ inflamatórios	Glomerulonefrites, vasculites, doenças auto-imunes, artrite reumatóide, hepatites
Isquemia- estado de refluxo	Derrame cerebral, infarto do miocárdio/ arritmias/ angina/ choque (perda temporária da função do miocárdio), transplante de órgãos, junta reumatóide inflamada, frosbite (inflamação causada pelo frio), contratura de “Dupuytren”, prejuízo fetal induzido por cocaína
Compostos químicos e reações induzidas por toxinas	Tetracloro de carbono, bromotriclorometano, herbicidas, bromometano, clorofluorcarbono, bromobenzeno, pentaclorofenol, clorofórmio
Superprodução de ferro (tecido e plasma)	Hemocromatose idiopática, sobrecarga de ferro na dieta, talassemia e outras anemias crônicas tratadas com transfusões múltiplas de sangue, deficiências nutricionais, alcoolismo, deficiências múltiplas de órgãos, desvios cardiopulmonares, deficiência hepática fulminante, prematuridade, quimioterapia e radioterapia do câncer
Prejuízos radioativos	Conseqüências de explosões nucleares, explosões acidentais, radioterapia ou células hipóxicas sensibilizadas ou gás radon; catarata
Rins	Síndromes nefróticas auto-imunes, nefrotoxicidade de metais pesados (Pb, Cd, Hg), prejuízo hemoglobina/mioglobina, hemodiálise, rejeição / armazenamento de transplantes
Olhos	Catarata, hemorragia ocular, prejuízo retinal degenerativo / degeneração de manchas, retinopatia de prematuridade, penetração de objetos metálicos
Envelhecimento	Desordem prematura do envelhecimento, envelhecimento propriamente dito, doenças

	relacionadas à idade, câncer.
Células vermelhas do sangue	Fenilhidrazinas, primaquina (fármaco para tratamento de malária) e outros fármacos relacionados, foto-oxidação de protoporfirinas, malária, anemia celular, favismo, anemia Fanconi, anemia hemolítica de prematuridade, quimioterapia
Trato respiratório	Efeitos da fumaça do cigarro, inalações de poeira e outros tipos de inalações de fumaça, enfisema, hiperoxia, displasia bronco-pulmonar, exposições a poluentes do ar (O ₃ , NO ₂ , SO ₂ , escapamento de motores a diesel), síndrome de esgotamento respiratório de adultos, pneumoconioses de pós-minerais, carcinogenicidade de asbestos, toxicidade de bleomicina, toxicidade pelo paraquat, toxicidade de escatol, asma, fibrose cística
Coração e sistema cardiovascular	Cardiomiopatia do álcool, doenças de Keshan (deficiência de selênio), aterosclerose, cardiotoxicidade de antraciclina, sobrecarga de ferro cardíaca
Trato gastrointestinal	Danos do fígado causado por endotoxinas ou hidrocarbonetos halogenados (bromobenzeno, CCl ₄) exposições a agentes diabetogênicos, pancreatites, lesões de tratos gastrointestinais induzidas por fármacos antiinflamatórios não-esteróides, intoxicação oral de ferro
Pele	Radiação UV, danos térmicos, porfiria, hipericina, exposições a outros fotosensibilizantes, dermatites de contato, calvície

Em 1984, ficou comprovado que, na maioria das patologias humanas, ocorre um aumento de EROs/ERNs, causando processos danosos aos tecidos, fenômeno conhecido como estresse oxidativo ³. Embora o mecanismo pelo qual as EROS e/ou ERNs estão envolvidas nas diferentes patologias ainda não está completamente entendido. A peroxidação lipídica da membrana celular tem sido considerada um fator crítico para a compreensão mecanística. Existem muitos caminhos para o monitoramento desse processo que incluem desde medidas de captação de oxigênio, perda de substratos de lipídeos, como os ácidos graxos polinsaturados e acúmulo de produtos de peroxidação, tais como hidroperóxidos e aldeídos.

Uma variedade de métodos tem sido desenvolvido para a determinação de hidroperóxidos ou produtos finais na forma de aldeídos, como o malonaldeído em materiais biológicos. O ensaio que envolve substâncias de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) é o tipo mais utilizado para produtos de peroxidação lipídica. Para a quantificação de hidroperóxidos lipídicos utilizam-se ensaios de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com detecção de quimiluminescência e detecção de fluorescência. Estes últimos métodos são mais sensíveis. Atualmente, também tem-se monitorado a peroxidação lipídica através de sondas fluorescentes. Como exemplo, podemos citar o ácido cis-parinárico, tendo efeito prático somente em organismos vivos. Contudo, existe uma grande limitação na utilização dessa técnica, uma vez que estas sondas geralmente são citotóxicas ou afetam a atividade fisiológica das células⁴. Por estas razões, nenhuma sonda pode estar disponível por muito tempo.

Algumas vezes as EROs/ERNs dão uma contribuição significativa nas patologias humanas, outras vezes não, de acordo com o esquema 2.



Esquema 2: Significado do estresse oxidativo das doenças.

3.1. Aterosclerose

As doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade na população com estilo de vida ocidental nos Estados Unidos e na Europa. A maioria dos ataques de coração (enfartes do miocárdio) e muitos casos de isquemia cerebral (derrames) são decorrências secundárias da aterosclerose. As doenças cardiovasculares são a causa mais comum de mortalidade em deficientes renais crônicos⁵⁹.

A aterosclerose é uma doença das artérias, caracterizada pelo espessamento localizado das paredes das mesmas, desenvolvendo uma camada própria com conseqüente endurecimento. Os efeitos clínicos são principalmente evidentes em artérias musculares de tamanho médio, como por exemplo, coronária, carótida, femural, ilíaca e aorta.

Em geral, existem três tipos de espessamento das artérias:

i. Camadas de ácidos graxos são levemente aumentadas, amareladas e afinadas. Elas são caracterizadas pela presença de células espumosas, que são células distorcidas carregadas de lipídeos que podem originar-se de células do músculo liso endógeno ou de macrófagos. Camadas de ácidos graxos provavelmente são as precursoras das placas fibrosas.

ii. Placas fibrosas são de forma aproximadamente circular, já possuem lesões elevadas, usualmente incolores e freqüentemente com alguns centímetros de diâmetro, obstruindo levemente o lúmen vascular. Uma placa fibrosa típica consiste de um recobrimento de fibras (composta de células do músculo liso e tecidos conjuntivos densos, contendo colágeno, elastina, proteínas e membranas), cobrindo uma área rica em macrófagos, células do músculo liso e linfócitos T. Existe uma parte central necrótica intensa que contém células mortas, depósitos de lipídeos extracelulares e cristais de colesterol.

iii. Placas complicadas são placas fibrosas alteradas por necroses, depósitos de cálcio, sangramento e trombozes. Causam doenças por limitação do fluxo sanguíneo de um órgão, como o coração ou o cérebro. Um derrame ou infarto do miocárdio ocorre quando o lúmen de uma artéria essencial começa a ficar completamente ocluída, usualmente pela formação de trombos (coágulos sanguíneos formados num vaso ou artéria). A formação de trombos na placa quase sempre ocorre pela ruptura da mesma, liberando produtos nocivos dentro do fluxo

sangüíneo. A interrupção da placa aparece mais freqüentemente onde as capas fibrosas estão afinadas e onde existe uma maior quantidade infiltrada de células espumosas.

Durante toda a década passada muitos estudos experimentais mostraram que o estresse oxidativo tem uma função chave nas vias fisiopatológicas de uma variedade muito ampla de doenças experimentais e clínicas e, em particular, da aterosclerose acelerada. A principal contribuição do estresse oxidativo nesse tipo de patologia é a produção anormal de EROs sob estímulos exógenos e endógenos. Em alguns estudos, têm-se associado o aumento desse estresse oxidativo ao processo de uremia (aumento do ácido úrico). Existem evidências sugerindo que o estresse oxidativo estaria ligado à toxicidade urêmica. A atividade prejudicial das EROs parece depender de suas interações com outros radicais reativos. Muitos estudos têm indicado que pacientes que fazem hemodiálise mostraram a participação indireta da presença do NO^\bullet em doenças cardiovasculares. A possível participação do NO^\bullet e o ONOO^- metabólito resultante da reação com O_2^\bullet parecem estar comprovados⁵⁹.

A origem da aterosclerose é incerta, mas a teoria mais aceita é de que ocorra um prejuízo do endotélio vascular - revestimento de células simples, compactas dos vasos sangüíneos. Esses danos podem incluir prejuízos mecânicos, infecções virais (como o herpes viral e citomegalovirus), exposições a toxinas próprias no sangue, incluindo xenobióticos, como a fumaça do cigarro, e níveis elevados de metabólitos normais, tais como a glicose ou homocisteína.

Os prejuízos endoteliais são acompanhados por monócitos vindos da circulação, que entram nas paredes dos vasos e diferenciam-se em macrófagos. Estes monócitos e macrófagos ativados podem danificar células vizinhas através da secreção de O_2^\bullet , H_2O_2 , enzimas hidrolíticas e possivelmente NO^\bullet . Como o NO^\bullet é produzido pelo endotélio vascular, também é possível que o endotélio gere baixos níveis de O_2^\bullet (pelas enzimas xantina oxidase, NADH ou NADPH oxidases). A xantina oxidase tem sido identificada em lesões de aterosclerose. Quando o O_2^\bullet surge a partir de células endoteliais e/ou monócitos e macrófagos, pode ocorrer reação com NO^\bullet , produzindo ONOO^- .

Evidências químicas consideráveis estabelecem a mieloperoxidase como um mecanismo promotor de modificações oxidativas de proteínas e lipídeos nos sítios de doenças cardiovasculares, mas, a função que essa possui nesse tipo de patologia ainda não foi esclarecida. Estudos recentes estão tentando desembaraçar os processos envolvidos na

oxidação de proteínas e lipídeos em doenças cardiovasculares. Um deles seria o envolvimento da enzima mieloperoxidase (MPO) em lesões cardiovasculares⁶⁰.

Nos últimos anos, muitas propriedades do NO[•] foram descobertas. Entre elas, está a habilidade do mesmo em inibir a ativação de plaquetas por moléculas fisiológicas, como o colágeno e a trombina. A função do NO[•] derivado das plaquetas parece limitar-se ao processo de ativação e formação de trombos e aumentar a ação do NO endotelial. Conforme mencionado anteriormente, no item 3.1, o NO[•] e H₂O₂ parecem atuar sinergicamente na inibição plaquetária⁴³. Conclui-se então que o estresse oxidativo está fortemente associado à aterosclerose.

3.2. Isquemia/ Reperfusão

A isquemia é o tipo de patologia em que ocorre a suspensão da circulação sanguínea. Os prejuízos causados ao coração e/ou cérebro por falta de uma pequena quantidade de O₂ no tecido são a maior causa de morte na sociedade moderna. Aterosclerose, trombozes e bloqueios de artérias cerebrais ou coronárias são normalmente as causas dessa patologia. As restrições severas de fluxo sanguíneo levam a concentrações menores de O₂ (chamado quadro de hipóxia). Os termos hipóxia e isquemia são utilizados na literatura como sinônimos¹⁹.

Os tecidos isquêmicos sobrevivem por um tempo variável, dependendo do tecido em questão e das espécies que formam. O músculo esquelético, por exemplo, é mais resistente ao dano hipóxico do que o cérebro. As células que sofrem isquemia por um determinado período de tempo (exceção - eritrócitos) serão irreversivelmente injuriadas. Se o período de hipoxia ou isquemia não for muito prolongado para danificar irreversivelmente o tecido, esses podem ser salvos por reoxigenação com sangue ou reintrodução de O₂ e nutrientes. Nessa situação, a reperfusão pode ser um processo benéfico. Entretanto, alguns cientistas como Parks, Granger e McCord mostraram no início dos anos 80 que a reintrodução de O₂ ao tecido isquêmico ou hipóxico poderia causar um dano adicional ao tecido (dano de reoxigenação) que, em parte, é mediado por EROs¹⁹.

A importância relativa da reoxigenação depende do tempo de isquemia/hipoxia. Se o tecido morto ou em estado mórbido for reoxigenado, *in vivo*, pode haver liberação de agentes potencialmente tóxicos, incluindo a xantina oxidase e íons metálicos de transição na circulação, causando conseqüências a outros tecidos do organismo. Por exemplo, a isquemia

no intestino pode levar ao abatimento das funções do coração, e a xantina oxidase pode ligar-se às células endoteliais. A xantina oxidase pode produzir $O_2^{\bullet-}$ para antagonizar a produção de NO^{\bullet} , bem como gerar espécies citotóxicas, tais como $ONOO^-$ e H_2O_2 . Embora esta enzima seja freqüentemente utilizada nos experimentos *in vivo* para gerar radicais $O_2^{\bullet-}$, quase toda a atividade da xantina oxidase presente nos tecidos de animais saudáveis é da enzima xantina desidrogenase que transfere elétrons não para o O_2 , mas para o NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleotídeo) que oxida a xantina ou a hipoxantina à ácido úrico. Quando um tecido é cortado, uma quantidade de xantina desidrogenase pode ser convertida para xantina oxidase pela oxidação de grupos -SH essenciais ou por proteólise. A xantina oxidase produz $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 quando a xantina ou hipoxantina são oxidadas. O esgotamento de ATP no tecido hipóxico causa acúmulo de hipoxantina. Esta hipoxantina pode ser oxidada quando o tecido é reoxigenado, causando uma rápida geração $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , levando a prejuízos muito severos ao tecido. Íons metálicos de transição liberados podem promover a formação de $^{\bullet}OH$ ¹⁹.

3.3. Diabetes melitus

É uma doença crônica marcada por níveis de glicose elevada e excreção da mesma pelo sistema urinário. A palavra “melitus” vem do grego, significando “doçura” - refere-se ao cheiro doce da urina do diabético. Causadas pela falta de produção ou resposta do tecido à insulina, os diabéticos podem sofrer muitas complicações, que vão desde doenças vasculares sistêmicas (aterosclerose acelerada), doenças micro-vasculares dos olhos causando sangramento e degeneração da retina (chamada de retinopatia diabética), catarata, prejuízos nos rins desencadeando insuficiência renal, até danos aos nervos periféricos (chamada de neuropatia periferal).

Existem dois tipos de diabéticos: tipo I e II.

No tipo I, o paciente é dependente de insulina, isto é, a secreção da insulina está ausente ou prejudicada. Esse tipo normalmente ocorre no início da juventude. No tipo II, o paciente não é dependente de insulina (tipo mais comum), os níveis de insulina são normais ou elevados, ainda que a resposta do tecido à insulina seja insatisfatória; esse tipo de resposta é chamada de resistência periférica ⁹.

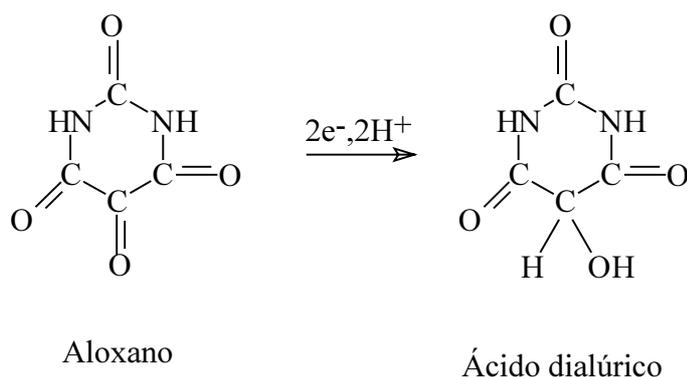
O estresse oxidativo em pacientes diabéticos pode ser resultado de exposições dos tecidos do corpo humano a elevados níveis de glicose sangüínea, contribuindo com os efeitos da hiperglicemia. A glicação (adição de glicose) de proteínas pode envolver não somente uma reação direta com os açúcares, mas também reações com os radicais livres ¹⁰.

A função do estresse oxidativo na diabetes está constantemente sob discussão. Muitas alterações em indivíduos diabéticos são oxidativas naturalmente, ou podem depender de um maior estresse oxidativo. Diversos autores consideram que uma das conseqüências dessa patologia está estritamente interligada com o mecanismo oxidativo. Estudos mostraram que pacientes diabéticos apresentam altos níveis de hidroperóxidos, indicando um marcado processo lipoperoxidativo ⁶¹.

As complicações dos diabéticos parecem estar correlacionadas com altas concentrações de glicose no sangue, consideradas como a possível maior causa do dano ao tecido, além do colesterol.

No estudo da diabetes, são utilizados modelos experimentais. Os animais são tratados com compostos diabetogênicos desenvolvendo a patologia. Uma das maneiras de indução da diabetes é a administração da substância aloxano. Esse composto causa a degeneração das células β nas ilhotas de Langerhans do pâncreas, órgão responsável pela produção do hormônio insulina. Rerup *et al.* ²⁵, em 1970, provaram que ocorre a participação do radical $\bullet\text{OH}$ como agente tóxico nesse tipo de modelo experimental.

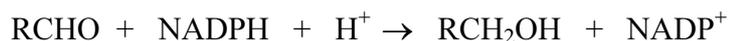
O aloxano é um composto cíclico redox que sofre redução de dois elétrons, originando o ácido dialúrico, uma pirimidina citotóxica, conforme equação 42. O ácido dialúrico é instável; em soluções aquosas sofre oxidação, acompanhada, eventualmente, da redução de O_2 à $\text{O}_2\bullet^-$. A oxidação do ácido dialúrico é acelerada por traços de íons metálicos de transição, e a presença destes íons pode levar à geração de $\text{O}_2\bullet^-$, H_2O_2 e $\bullet\text{OH}$ (este último, provavelmente, pela Reação de Fenton.). Têm sido observado que soluções de ácido dialúrico estimulam a peroxidação lipídica *in vivo* ¹⁹.



Equação 42: Formação do ácido dialúrico a partir do agente diabético aloxano.

A maneira como ocorre o estresse oxidativo na diabetes em seres humanos ainda é objeto de estudo. Os pacientes diabéticos estão frequentemente sob estresse oxidativo. A relação do estresse oxidativo com esta patologia tem sido exaustivamente estudada há muitos anos. Os peróxidos lipídicos (LOOH) do plasma aparecem em maiores quantidades em diabéticos do que em pessoas normais, embora a maioria destas notáveis diferenças tenha sido encontrada através de ensaios de TBARS do plasma. Uma observação interessante é que ratos tratados com estreptozotocina (outro agente diabético) absorvem peróxidos a partir de gorduras numa extensão muito maior do que em ratos-controle, sugerindo que ocorre uma diminuição na habilidade do intestino em desintoxicar peróxidos lipídicos¹⁹.

Nishinaka *et al* (2001) propuseram que a enzima aldose redutase, encontrada nos tecidos de diferentes mamíferos incluindo o cristalino e a retina, contribui para o desenvolvimento da catarata e em muitas outras complicações de pacientes diabéticos. Essa enzima converte a glicose ao poliálcool sorbitol pela redução do grupo aldeído da glicose, conforme equação 43, acompanhada da conversão dependente- NAD^+ para frutose, pela enzima sorbitol desidrogenase⁶².



Equação 43: Conversão da glicose ao poliálcool sorbitol pela redução do grupo aldeído da glicose.

Sob condições hiperglicêmicas, a aceleração do caminho poliálcool leva a um excesso de produtos e a um esvaziamento de $NADPH$ e NAD^+ nas células. A proporção aumentada de $NADPH/ NAD^+$ nestas células leva a condições similares de hipoxia, designada de

“pseudohipoxia”. Tais mudanças no estado redox e a perturbação metabólica resultante são postuladas por provocar danos aos tecidos de forma precoce em órgãos alvo associadas a complicações de pacientes diabéticos. Numerosos inibidores da enzima aldose redutase tem sido desenvolvidos como possíveis agentes terapêuticos nas complicações dos diabéticos. Embora estes inibidores sejam eficazes em modelos experimentais, a eficácia clínica não tem sido demonstrada de uma maneira consistente ¹⁹. A geração de radicais livres pela auto-oxidação da glicose é facilitada sob condições hiperglicêmicas. O esvaziamento do NADPH causado pela aceleração do caminho poliol atenua a atividade da glutathione redutase, e o nível da forma reduzida da glutathione diminui, resultando numa redução da atividade glutathione peroxidase e em um nível maior de H₂O₂ ⁶².

A glicose também pode ser tóxica na medida que se comporta quimicamente como um aldeído. Os aldeídos são substâncias reativas e podem ligar-se a proteínas, a grupos amino de fosfolípidos e ao DNA. Embora a maioria da glicose em solução exista como estrutura de anéis não-aldeídos.

Fontes possíveis de estresse oxidativo em pacientes diabéticos incluem o deslocamento no balanço redox resultante de carboidratos alterados e do metabolismo de lipídeos, geração de EROs em níveis decrescentes de defesas antioxidantes como a glutathione ¹⁹.

Parece que as evidências indicam que o estresse oxidativo está associado a essa patologia.

3.4. Doenças Inflamatórias Crônicas

A resposta inflamatória é um processo muito complexo em que uma série de eventos bioquímicos estão envolvidos. Kehrer, em 1993 ⁶³, através de revisões bibliográficas, que as EROs, prostanoídes, leucotrienos, ERNs e enzimas hidrolíticas produzidas por neutrófilos, macrófagos e monócitos, estariam envolvidas nesse processo. As células fagocíticas, na maior parte neutrófilos, produzem, quando ativadas, O₂[•] e H₂O₂. Essas EROs, podem reagir com o ferro livre e produzir [•]OH, causando um dano ainda maior ⁶³.

As inflamações são normalmente limitantes e os efeitos benéficos são mais importantes do que o próprio dano. Contudo quando ocorre uma ativação anormal do sistema

de defesa as conseqüências são desvantajosas. Por exemplo, no caso da doença gota, a maior característica desta patologia, é a elevada concentração de urato (sal do ácido úrico) no sangue. O processo inflamatório inicia pela precipitação de cristais de urato de sódio nas articulações. Estes cristais provocam a inflamação por uma variedade de mecanismos, estimulando o rompimento respiratório nos neutrófilos, causando a produção de leucotrienos B₄, que atrairão mais neutrófilos. A gota é tratada com alopurinol, um inibidor da xantina desidrogenase/oxidase.

Talvez, as conseqüências mais notáveis da ativação de fagócitos anormais sejam as defesas auto-ímmunes. O corpo tem mecanismos para prevenir a formação de anticorpos contra seus próprios componentes. Qualquer destes mecanismos acompanha a formação de auto-anticorpos que se podem ligar a biomoléculas normais e provocar um ataque ao sistema de imunidade¹⁹.

Em doenças auto-ímmunes tais como lupus eritematoso sistêmico, escleroderma, dermatomiositis e vasculites auto-ímmunes, as lesões são comuns, e os anticorpos estão presentes contra muitos tecidos. O lupus freqüentemente afeta mulheres jovens e produz uma variedade de lesões na pele, rins, músculos, articulações, coração e vasos sangüíneos. Uma ampla variedade de anticorpos é produzida e ataca diretamente o DNA, RNA, eritrócitos e ainda organelas subcelulares e proteínas do plasma.

Existem evidências de que as EROs/ERNs e a liberação de algumas enzimas parecem ser mediadoras no prejuízo ao tecido em doenças auto-ímmunes. Os níveis de nitrato e nitrito tendem a ser maiores em pacientes com doenças auto-ímmunes, indicando talvez uma geração maior de NO•.

Anticorpos, aparentemente diretos contra fosfolipídeos, são detectados em pacientes com lupus eritematoso sistêmico e outras doenças auto-ímmunes. É possível que reajam diretamente contra a peroxidação lipídica *in vivo*¹⁹.

A “reação de Arthus” é um tipo de sistema modelo, utilizado pelos pesquisadores dessa área, em que a inflamação é causada por injeções de antígeno dentro da pele do animal, que possui altos níveis de anticorpos circulantes contra esse antígeno. Tal tipo de reação é largamente mediada por neutrófilos. Tem-se observado que as inflamações decorrentes desse sistema decrescem com injeções de SOD e outros seqüestradores de EROs. Esta reação ocorre se um anticorpo é injetado no animal, ao invés de ser formado pelo próprio. Na reação inversa, o antígeno é injetado intravenosamente e o anticorpo, localizadamente. Do mesmo modo, quando experimentos com injeções de linfa humana na corrente sangüínea de ratos são

realizados, seguidos por injeções de anticorpos na pele, aparecem inchamento e aquecimento, fenômenos largamente mediados por neutrófilos. Injeções intravenosas de SOD em animais têm um pequeno efeito antiinflamatório, possivelmente por que a SOD é eliminada da circulação dentro de minutos pelos rins. Entretanto, se esta eliminação é prevenida por ligações da SOD a polímeros de alto peso molecular, o efeito antiinflamatório é aumentado. Foi observado que a SOD nativa protege contra prejuízos aos rins induzido por injeções de complexos anticorpos-antígenos em ratos. A eficiência da SOD nativa nesse sistema pode ser devido ao rápido acúmulo nos rins, prioritariamente para remoção do anticorpo. Esses resultados podem ser atribuídos à ação da SOD na remoção de $O_2^{\bullet-}$ ¹⁹.

3.5. Artrite Reumatóide

A artrite reumatóide é caracterizada por inflamação crônica nas articulações, especialmente na região dos pés e mãos. Existe uma hipótese de que essa doença ocorra devido a uma persistente resposta imunológica celular contra um antígeno desconhecido. O plasma e o fluido das articulações de pacientes com artrite reumatóide freqüentemente contêm anticorpos diretos contra imunoglobina G ¹⁹.

As articulações sinoviais normais e as cartilagens articulares recobrem o osso, e ambos são recobertos por uma fina membrana sinovial. As cartilagens contêm colágeno e outras células embebidas numa matriz de proteoglicanos. As cartilagens não contêm vasos sanguíneos e recebem O_2 por difusão a partir dos ossos e dos fluidos sinoviais. O revestimento sinovial sintetiza um polímero, o ácido hialúrico ou hialurônico e o secreta dentro do fluido sinovial. O ácido hialúrico é o responsável pela viscosidade do fluido sinovial. O revestimento sinovial também atua como uma barreira para movimento das proteínas a partir do plasma dentro do fluido sinovial. McCord notou um decréscimo na viscosidade do líquido sinovial em pacientes com artrite reumatóide e mostrou que um decréscimo similar poderia ser produzido por exposição do líquido sinovial ou soluções de ácido hialúrico para um sistema de geração de $O_2^{\bullet-}$ (xantina/xantina oxidase). Trabalhos posteriores mostraram que a degradação do hialuronato não é causada por $O_2^{\bullet-}$, mas por OH^{\bullet} gerado pela Reação de Fenton. Existem evidências de que os danos oxidativos em pacientes

desse tipo de patologia são muito fortes. Em líquidos sinoviais frescos não é possível detectar OH^\bullet , mas o ferro “catalítico” pode ser medido por ensaios de bleomicina. Este ensaio foi desenvolvido como uma primeira tentativa de medir a disponibilidade de ferro em fluidos de corpos de animais que poderiam promover reações via radicais livres. O antibiótico bleomicina requer sais de ferro na degradação do DNA. Se outros reagentes estiverem presentes em excesso, a extensão da degradação do DNA será proporcional à quantidade de ferro que pode estar ligado pela bleomicina. Esse ferro tem-se mostrado capaz de estimular a peroxidação lipídica *in vivo*. Soluções de fenilalanina e salicilato produzem exemplos de produtos de hidroxilações características do ataque de OH^\bullet sobre o anel aromático, sugerindo que os constituintes do líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide podem levar à formação de OH^\bullet ¹⁹.

O efeito catalítico do ferro, na Reação de Fenton, poderia aparecer pela liberação de células necróticas, por degradação mediada por H_2O_2 da hemoglobina, e pela ação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ no fluido sinovial ferritina. A liberação do ferro é demonstrada pela exposição do $\text{O}_2^{\bullet-}$ ao líquido sinovial. Outra possível fonte de OH^\bullet é a reação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ com o HClO , ambos produzidos por neutrófilos, conforme a equação 44.



Equação 44: Formação do radical hidroxil a partir do ânion superóxido e ácido hipocloroso.

As reações de $\text{O}_2^{\bullet-}$ com NO^\bullet para formar ONOO^- são outra fonte potencial importante de dano ao paciente com essa doença, uma vez que esses pacientes mostraram altos níveis de nitrato/nitrito no plasma e líquido sinovial, indicando a geração de NO^\bullet ¹⁹.

4. PRODUTOS NATURAIS COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE

Neste trabalho foram utilizadas quatro plantas: a *Bauhinia forficata* (composto isolado: canferol-3,7-O-(α)-dirhamnosídeo), a *Cyathea phalerata* (composto isolado: canferol-3-O-(α)-L-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosídeo), a *Araucaria angustifolia* (Bertz O.) Kuntze, a *Baccharis articulata* (composto majoritário: 4'-O- β -D-glicopiranosyl-3',5'-dimethoxy-benzyl-caffeate), a *Baccharis trimera*, a *Baccharis spicata* e a *Baccharis usterii*.

As quatro plantas sob investigação científica neste trabalho possuem uma característica em comum, todas apresentam flavonóides em sua composição química⁶⁴. Na dieta humana, ocorrem na forma de glicosídeos e polímeros degradáveis pelo trato digestivo. A propriedade de um flavonóide inibir eventos mediados por radicais livres é uma consequência da estrutura química. Os grupos hidroxil múltiplos existentes nestas moléculas conferem as capacidades antioxidante, quelante e, eventualmente, a atividade pró-oxidante. Os grupos metoxi introduzem um efeito estérico desfavorável, um aumento da lipofilicidade e a ação de separar a membrana. As ligações duplas e o grupo carbonil no heterocíclico ou polimerização da estrutura nuclear aumenta a atividade por um radical flavonóide mais estável através de conjugação e deslocalização do elétron⁶⁵.

Os flavonóides (flavonas, flavonóis, isoflavonas, catequinas, flavanonas e chalconas) constituem uma importante classe de polifenóis, presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais. São derivados do ácido cinâmico (ácido caféico, ferúlico, clorogênico e vários outros, além de ácidos orgânicos fosfatados e polifuncionais). Apresentam um núcleo fundamental com 15 átomos de carbono, formado por dois anéis aromáticos ligados entre si por uma cadeia de três átomos de carbono (C₆-C₃-C₆). A figura 8 mostra o núcleo fundamental dos flavonóides e a numeração dos átomos de carbono com a denominação de cada anel.

De um modo geral, estes compostos diferem entre si pelo número e pela posição dos grupos substituintes nos anéis A, B e C, além da presença ou não da dupla ligação e da carbonila no anel C. Além disso, podem ser encontrados derivados glicosilados, metilados, prenilados, acetilados ou sulfatados⁶⁶.

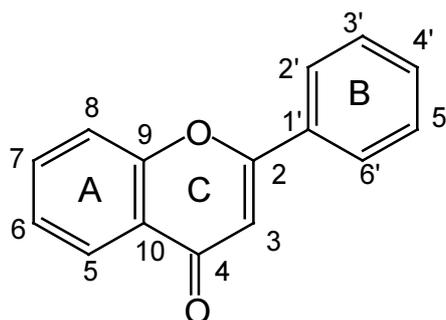


Figura 8: Núcleo fundamental dos flavonóides

O interesse por esta classe de polifenóis, os flavonóides, vêm crescendo muito nas últimas décadas, uma vez que são facilmente isolados por técnicas cromatográficas. A indústria farmacêutica têm dado uma especial atenção devido aos efeitos benéficos destes compostos,⁶⁴.

A capacidade de complexar ferro⁶⁷, a capacidade de inibir a oxidação da LDL (lipoproteína de baixa densidade) em doenças cardiovasculares, a inibição da peroxidação lipídica⁶⁸ são alguns exemplos das comprovações benéficas dos flavonóides na dieta do ser humano. Podem ser encontrados em frutas, vegetais, vinhos, chás e chocolate.

A quercetina, um exemplo de flavonóide em que o potencial antioxidante já é bem estabelecido na literatura, é encontrada em frutas e vegetais, especialmente no brócolis, olivas, vinho tinto, entre outros. O consumo da quercetina é inversamente proporcional a incidência de doenças cardíacas coronárias. São potentes inibidores da lipoperoxidação e seqüestrantes de EROs e ERNs¹⁹. Além disso, existem evidências de que os flavonóides diminuem o risco de catarata em seres humanos⁶⁹.

4.1. *Bauhinia forficata* (canferol-3,7-O-(α)-diramnosídeo)

A espécie vegetal *Bauhinia forficata*, conhecida como pata de vaca, unha de boi, pata de boi e unha de vaca. É uma árvore de porte pequeno, podendo ter uma altura entre 5-9 m. Encontrada desde do Rio Grande do Sul até o Rio de Janeiro, freqüentemente em vegetações

secundárias; ocorre também no Uruguai, Argentina e Paraguai. Popularmente, as folhas são utilizadas como hipoglicemiante, hipocolesteremiante e diurética ⁷⁰.

As plantas do gênero *Bauhinia* (Leguminosae) são empregadas principalmente na medicina popular devido as propriedades hipoglicêmicas no tratamento da diabetes ^{71,72}. Segundo, De Sousa *et al.* em 2000, o estudo fitoquímico das folhas desta planta resultou no isolamento e identificação de um flavonóide glicosilado, o *canferol-3,7-O- α -diramnosídeo*, e de um fitoesterol, o β -sitosterol ^{71,73}.

O trabalho de extração das frações, isolamento e purificação dos compostos foi realizado no grupo de Prof. Dr. Moacir Pizzolatti do Departamento de Química da UFSC. O grupo da Prof. Dra. Fátima R.M. Barreto Silva, do Departamento de Bioquímica, estudou as frações desta planta em ensaios biológicos *in vivo* e *in vitro*.

A estrutura química do composto canf-1 está representado na figura 9.

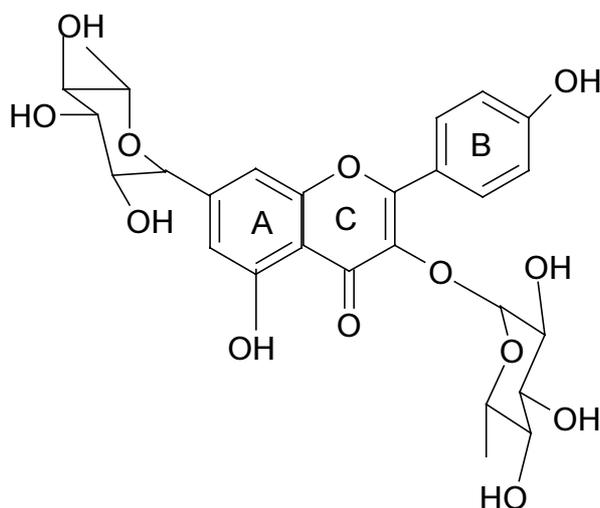


Figura 9: Estrutura química do composto isolado: canf-1.

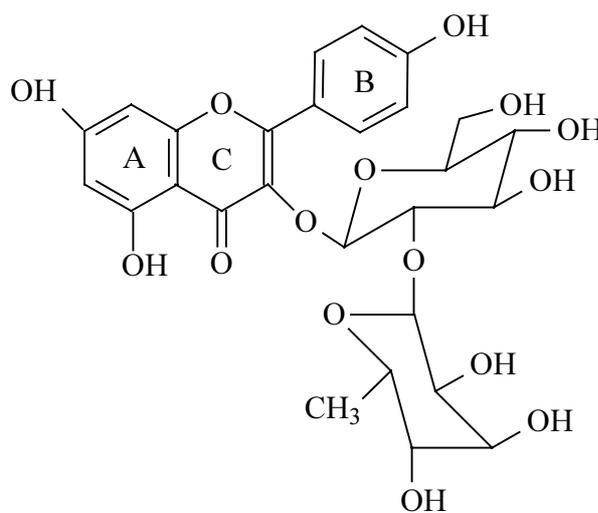
4.2. *Cyathea phalerata* (*canferol-3-O- α -L-rhamnopyranosil(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosídeo*)

É conhecida popularmente como xaxim, pertencendo a família phalerata. A fitoquímica desta planta é pouco conhecida, apresentando poucos relatos na literatura a respeito. Os poucos estudos realizados mostram que o gênero é caracterizado fitoquimicamente pelo acúmulo de triterpenos hopanóides e fERNANOS, apresentando também na composição química flavonóides glicosilados.

Na medicina popular tradicional é utilizada no tratamento de afecções renais, amarelão, reumatismo e gripes.

O trabalho de extração foi realizado pelo grupo do professor Dr. Moacir G. Pizzolatti do Departamento de Química da UFSC.

A estrutura química do composto 2, que foi utilizado neste trabalho, o *canferol-3-O- α -L-rhamnopyranosil(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosí-deo* está representado na figura 10 ⁷⁴.



composto ii

Figura 10: Composição química do composto canferol-3-O- α -L-rhamnopyranosil(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosí-deo.

4.3 *Baccharis*

O gênero *Baccharis* pertence à família Asteraceae é composto por mais de 400 espécies, despertando grande interesse científico, uma vez que muitas destas espécies são amplamente empregadas na medicina popular. As denominações populares compreendem carqueja, carqueja-doce, carqueja-crespa, carqueja-branca entre outros nomes. É um arbusto nativo do sul do Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina. Floresce na primavera em solos rochosos e em campos argilosos. Sua parte aérea é usada como digestivo, diurético, tônico hepático, estimulante da fertilidade feminina, contra a impotência masculina, anti-reumático e antiséptico de uso externo, antiespasmódico e antitérmico. No Paraguai, o decocto ou a infusão dos talos são utilizados para combater diabetes e diminuir o colesterol. Na natureza essa planta vive em locais muito secos e compactados. Entre o solo de mais ou menos 5 a 15 cm e na parte compactada existe acúmulo de água que fica represada quando chove. As raízes

da carqueja não penetram profundamente no solo compactado, mas crescem acompanhando a superfície do solo onde ocorre acúmulo de água estagnada durante a chuva e secura no período de tempo sem chuvas. Existem evidências de seus efeitos fisiológicos nos sistemas biológicos, contudo não há comprovações científicas ainda a respeito das mesmas.

Estudos anteriores investigaram o extrato clorofórmico da *Baccharis articulata*, sendo evidenciado a presença de flavonóides e diterpenos^{75,76,77a}. A fração etanólica desta espécie ainda não foi investigada.

Esta espécie contém:

- a) na planta inteira: ácido crisosapônico, santonina, absintina, ácido resínico, luteolina, quercitina, articulina I e acetato articulina, genkwanina, acacetina, 7,4'-dimetilapigenina, circimaritina, salvigenina, jaceidina, jaceosidina, ácido oleanólico, lupeol e chondrillasterol;
- b) nas flores: barticulidiol, diéster malonato acetato, bacchotricuneatina A;
- c) no óleo volátil: α -pineno, ciscariofileno, γ -elemento, β -guaieno, δ -cadineno e aromadendreno;
- d) em partes não indicadas ácidos, α - γ - β -resínicos.

Quanto a atividade biológica, há relatos de que o extrato aquoso quando tomada por 10 a 15 dias tem efeito abortivo pela ação direta de seu princípio ativo sobre o útero e, no Brasil, há relatos de ter causado morte em cobaias^{77b}.

A estrutura química do composto isolado do extrato etanólico da *Baccharis articulata* está representada na figura 11.

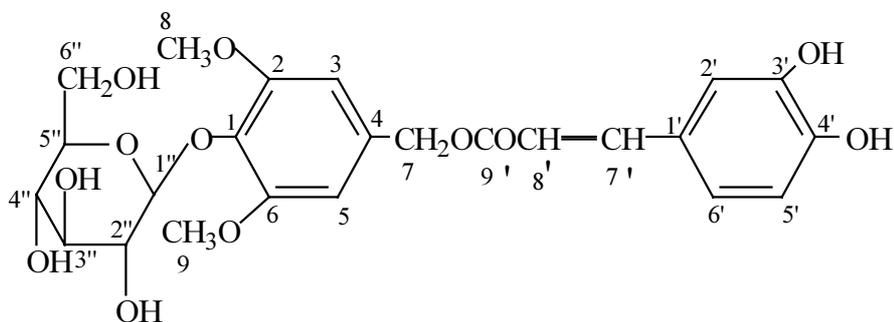


Figura 11: Estrutura química do composto isolado do extrato da *Baccharis articulata*: 4'-O- β -D-glucopiranosyl-3',5'-dimetoxi-benzyl-caffeate.

4.4 *Araucaria augustifolia* (BERT.) O. Kuntze

É uma árvore de grande porte, da família *Araucariaceae*, ordem *Coniferae* característica da região sul do Brasil. Conhecida popularmente como pinheiro, pinheiro-do-paraná, pinheiro-brasileiro, parana-pine, curi, curiúva, pinho, cori, pinheiro-são-josé, pinheiro-macaco, pinheiro-caiová, pinheiro-das-missões ou araucária⁷⁸.

No início deste século, ocupava uma área de 20 milhões de hectares⁷⁹. Na década de 70 as reservas praticamente se esgotaram. Hoje, existem em áreas isoladas, de altitudes acima de 900 m, nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais, e acima de 500m na região sul⁷⁸. A extinção quase total desta espécie foi devido a utilização na indústria madeireira e na fabricação de papel. As sementes, o pinhão, são utilizadas ainda na fabricação caseira de álcool e forragem⁸⁰. O pinhão é comestível, sendo consumido por várias espécies da fauna brasileira, como a gralha azul, além do homem. Além disso, a planta é ornamental podendo ser empregada em paisagismo⁷⁸.

Na medicina popular a *A. augustifolia* é empregada como emoliente, anti-séptica das vias respiratórias, tratamento de reumatismo e dores ciáticas. Apesar de existirem poucos estudos com esta planta, avaliações fitoquímicas mostram a presença de alguns compostos como monoterpenos no óleo volátil das folhas e brotos, lignanas, ciclolignanas e norlignanas, presentes principalmente nas resinas das árvores. As atividades antivirais e antineoplásicas já foram demonstradas em derivados desta planta^{81,82,83}.

As acículas (folhas) da *Araucaria augustifolia* (Bertze) foram coletadas no município de Urubici, Santa Catarina, identificadas pelo Professor Dr. Maurício Reis. A identificação botânica foi realizada pelos agrônomos do Curso de Pós- Graduação em Recursos Genéticos da UFSC.

Neste trabalho também foram investigadas outras partes da árvore, as grimpas e os ramos onde o processo de extração foi similar ao das acículas. As grimpas, parte seca da planta que cai naturalmente no inverno e os ramos, parte mais lenhosa, sendo que não foram encontrados descrições na literatura quanto as suas utilizações. As grimpas e os ramos são normalmente descartados e queimados.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivos Gerais

- Avaliar a capacidade de plantas da flora brasileira, a *Bauhinia forficata*, a *Cyathea phalerata*, a *Araucaria angustifolia* e as quatro espécies do gênero *Baccharis* como antioxidantes naturais, pela ação contra a peroxidação lipídica e atuação como seqüestradores de EROs e ERNs .

5.2. Objetivos Específicos

a. Avaliação do potencial antioxidante de extratos, frações ou compostos isolados de plantas em relação ao radical DPPH;

b. Avaliação da proteção de extratos, frações ou compostos isolados de plantas contra a peroxidação lipídica induzida pelos radicais $\cdot\text{OH}$, ascorbil e $\text{ONOO}\cdot$, em:

- Lipossomas de fosfatidilcolina,
- Lipossomas de asolecitina,
- Microsomas de fígado de rato,

c. Avaliação da ação de extratos, frações ou compostos isolados de plantas como seqüestradores de: $\text{O}_2\cdot^-$ e $\text{NO}\cdot$,

d. Avaliação da ação de extratos, frações ou compostos isolados de plantas sobre atividades de enzimas pró-oxidantes como:

- Óxido Nítrico Sintase,
- Mieloperoxidase,
- Xantina Oxidase.

6. METODOLOGIA

6.1. Materiais

6.1.1. Reagentes Sigma

- DPPH (1,1-difenil-2-picril hidrazil), “Nitrobluetetrazolium” (NBT), dimetilsulfóxido (DMSO), Tricina, Ácido tiobarbitúrico (TBA), Ácido ascórbico, KH_2PO_4 (dihidrogeno fosfato de potássio), Na_2HPO_4 (monohidrogeno fosfato de sódio), Fosfatidilcolina, Xantina oxidase (XO), Xantina, mioglobina, mieloperoxidase (MPO).

6.1.2. Reagentes Merck

- Ácido clorídrico (HCl), Cloreto de cálcio (CaCl_2), Cloreto de magnésio (MgCl_2), Cloreto de sódio (NaCl), Éter etílico, Etanol, Cloreto férrico (FeCl_3), Sulfato ferroso (FeSO_4).
- Fosfato dibásico de sódio (Na_2HPO_4), Fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4), Fosfato monobásico de sódio (NaH_2PO_4), Hidróxido de sódio (NaOH), Nitrato de sódio (NaNO_3), Nitrito de sódio (NaNO_2), Nitroprussiato de sódio ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$), Peróxido de hidrogênio (H_2O_2), Sacarose, Sulfanilamida, α -naftiletilenodiamina, Fosfato tribásico de potássio (K_3PO_4), Tris, Cloreto de magnésio (MgCl_2), 1-dianisidina-2HCl.

6.1.3. Reagentes de Outras Marcas

- Ácido tricloroacético (TCA) - **Synth® ou Quimilabor®**
- Carbonato de sódio (Na_2CO_3) - **Ecibra®**
- Tricina - **Roth®**
- Asolecitina de soja - **Fluka®**
- Membrana de diálise - **Dianorm®**

6.1.4. Produtos de Origem Natural com Potencial Medicinal

1. *Bauhinia forficata*- *canferol-3,7-O-(α)-dirhamnosídeo*- isolado do flavonóide da pata de vaca

As amostras da *Bauhinia forficata* utilizados neste trabalho foram coletadas no município de Orleans, no estado de Santa Catarina, sendo taxonomicamente identificadas pelo professor Daniel de Barcelos Falkenberg. No Departamento de Botânica da UFSC, a excicata foi depositada sob o número FLOR- 31271.

Basicamente, o processo de extração foi realizado com um sistema de solvente etanol-água na proporção 8:1 durante 120 horas (este processo foi repetido duas vezes). O extrato hidroalcoólico foi concentrado e estocado a 4°C por 24 horas, sendo filtrado posteriormente, produzindo um resíduo orgânico oleoso e uma suspensão aquosa, que foi sucessivamente extraída com CH₂Cl₂, EtOAc e BuOH. A fração CH₂Cl₂ produziu um resíduo verde escuro, a fração EtOAc e a BuOH produziram resíduos marrom escuro. A fração BuOH foi separada por coluna cromatográfica em sílica gel 60, usando um sistema de gradiente de solventes de EtOAc a MeOH, produzindo três frações diferentes. Estas três frações foram posteriormente purificadas por cromatografia de coluna em sílica 60 (400 mesh) produzindo o *canferol-3,7-O-(α)-diramnosídeo*; *canferol-3-O-(α)- glicosídeo(1'',6'')*-*raminosídeo-7-(α)-raminosídeo* e o *canferol-7-O-(α)- ramnosídeo* ⁷³.

2. *canferol-3-O- α -L-rhamnopyranosil(1→2)- β -D-glicopiranosídeo*- isolado do flavonóide do xaxim

O extrato etanólico desta planta foi preparado a partir do caule fresco, sendo submetido a um parcionamento líquido-líquido com acetato de etila. O extrato acetato de etila foi levado ao fracionamento através de sucessivas cromatografias em coluna de sílica gel, utilizando como eluente da mistura hexano- acetato de etila e etanol utilizando gradiente de polaridade crescente. As frações foram reunidas por similaridade em cromatografia de camada fina, seguida de purificação por recristalização em solvente apropriado, obtendo-se dois compostos: i. solvente = metanol (*ácido-3-O- β -D-glicopiranosilcafeico*) e ii. solvente =

metanol-água (*canferol-3-O- α -L-rhamnopyranosil(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosídeo*), os quais foram caracterizados por análises espectroscópicas.

3. Carqueja-

3.a- *Baccharis articulata*

- Extrato etanólico
- Extrato aquoso

3.b- *Baccharis trimera*

- Extrato etanólico
- Extrato aquoso

3.c- *Baccharis spicata*

- Extrato etanólico
- Extrato aquoso

3.d- *Baccharis usterii*

- Extrato etanólico
- Extrato aquoso

Partes áreas da *Baccharis articulata* foram coletadas no município de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, em março de 2000. No depósito do Departamento Botânico da UFRGS, a excicata foi depositada sob o número Sobral 9057.

Os extratos foram obtidos da planta (1,5 Kg) macerada em etanol numa proporção planta/solvente 1:10(p/v) (2 x 10 dias).

O extrato etanólico bruto foi obtido após a filtração e evaporação sob vácuo do etanol. O extrato aquoso foi obtido por decocção da planta do material (1g, 2 x 100mL) durante 30 min. O extrato diclorometano foi obtido por refluxo da planta (1g, 2 x 100mL) durante 4 horas. Depois de ensaios preliminares, o extrato aquoso foi parcionado com diclorometano, acetato de etila e n-butanol produzindo 3 frações diferentes (20,0 mg, 3,0 mg, e 178 mg, respectivamente), juntamente com um resíduo aquoso (6 mg). Cada extrato ou fração foi evaporado para secagem sob vácuo à pressão reduzida. Para análise fitoquímica, o extrato etanólico foi preparado como mencionado acima. O extrato etanólico foi suspenso em água e extraído sucessivamente com diclorometano, acetato de etila e n-butanol. A fração n-butanol

(12 g) foi levada a cromatografia de coluna em sílica gel utilizando como gradiente de solvente acetato de etila- etanol produzindo o composto *4'-O-β-D-glucopiranosyl-3',5'-dimetoxi-benzyl-caffeate*.

4. *Araucária augustifolia* (Bertze) O. Kuntze

- EBHA- extrato bruto hidroalcoólico,
- FEP- fração éter de petróleo,
- Ep/H₂O- fração do precipitado éter de petróleo e água
- FDM- fração diclorometano,
- FAE- fração acetato de etila,
- FBU- fração butanólica
- Faq- fração aquosa

O processo de obtenção das frações foi realizado a partir das acículas secas em estufa de ar circulante, a temperatura de 30-35 °C por 5 dias. A moagem foi feita em moinho de facas. O extrato obtido por maceração foi a temperatura ambiente, ao abrigo da luz com uma mistura de EtOH:H₂O numa proporção 70:30 (v/v) durante 5 dias, na primeira maceração, resultando na solução extrativa de 1:7 (m/v). Novamente o extrato foi filtrado e colocado no processo de maceração por 7 dias (remaceração), reunida com a maceração, dando origem ao extrato Bruto Hidroalcoólico (EBHA A). O EBHA A obtido foi concentrado até a eliminação de todo o álcool, resultando num Extrato Bruto Hidroalcoólico Concentrado (EBHAC), o qual foi submetido ao processo de partição, com éter de petróleo, diclorometano, acetato de etila, butanol, restando a fração aquosa. Foi obtido a fração éter de petróleo (FEP A), a fração diclorometano (FDM A), a fração acetato de etila (FAE A), a fração butanólica (FBU A), a fração aquosa (Faq A) e a fração do precipitado éter de petróleo e água (Ep/H₂O A).

6.2. Equipamentos

- Espectrofotômetro-Pharmacia®,
- Espectrofotômetro HP 8452 A Perkin Elmer

6.3. Animais

Os órgãos serão obtidos dos animais (ratos Wistar adultos machos) de descarte do laboratório da Profa. Dra. Fátima Regina M. B. da Silva para preparação dos microssomas de fígados de ratos.

6.4. Preparação de Lipossomas

Os lipossomas foram preparados conforme o método previamente descrito na literatura por Sone *et al*⁸⁴, posteriormente adaptado por Creczynski-Pasa *et al.*, 1994 e 1997^{85,86}, o qual baseia-se na preparação de micelas (fosfolípideo + detergente) em um tampão de solubilização. O tampão de solubilização é composto por tricina 10 mM, colato de sódio 20 g/L e desoxicolato de sódio 10 g/L. Os lipídeos utilizados foram asolecitina de soja (composto por fosfatidilcolina, fosfatidilinositol e fosfatidil etanolamina) e de fosfatidilcolina. Esta mistura (tampão de solubilização + lipídeos) é submetida a diálise em um banho-maria 30°C por 5 horas contra o tampão de reconstituição de lipossomas que contém com MgCl₂ + tricina (pH 8,0). Os lipossomas foram submetidos a ensaios de danos oxidativos provocados por radicais superóxido, hidroxil/ascorbil.

6.5. Preparação de Microssomas

Os microssomas de fígado de rato (MC) foram obtidos por homogeneização de fígado de rato, em um homogenizador de tecidos, e posterior centrifugação diferencial pelo método de agregação com cálcio, descrito por Cinti, D.L. *et. al*⁸⁷. A homogeneização foi realizada em um tampão contendo 17g de tecido por 100mL de tampão, 10 mM de Tris em 250 mM de sacarose pH 7,4 e centrifugados a 600g por 5 min a 0 °C. A fração mitocondrial foi obtida do sobrenadante e centrifugada a 12000g por 10 min. A fração microssomal resultou da decantação da fração mitocondrial obtida com 80 mM de CaCl₂. O decantado é lavado com 15 mM de KCl / 10 mM de Tris pH 7,4 e centrifugado a 25000g por 15 min. Depois de lavados os MC foram ressuspensos em 20 % de glicerol em tampão fosfato 25 mM⁸⁷. A

fração foi congelada em nitrogênio líquido para posterior análise e determinação da concentração de proteína.

6.6. Homogenato de Cerebelo

Os cerebelos foram homogeneizados sob banho de gelo, em um triturador de tecidos na proporção de 1:4 (p/v) em tampão tris – HCl, pH 7,6, com PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila) 200mM. O homogenato é centrifugado por 10 min a 4 °C, sendo o sobrenadante utilizado para dosagem da atividade da óxido nítrico sintase neuronal ⁸⁸. A determinação das proteínas foi obtida pelo método de Lowry descrito posteriormente, no item 6.8..

6.7. Homogenato de Pulmão

Pulmões de ratos não-tratados foram homogeneizados em tampão fosfato 0,1 M (gelado) a pH 7,4, contendo brometo de trimetilamônio, como descrito anteriormente por Rao *et al.* ⁹⁰, em 1994, congelado e descongelado por três vezes. As amostras centrifugadas a 12000 g, a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a dosagem da atividade da mieloperoxidase, conforme descrito posteriormente no item 6.12.

6.8. Determinação da Concentração de Proteína

Este método tem como objetivo determinar a concentração de proteínas totais de amostras biológicas, através do Método de Lowry ⁸⁹. A albumina bovina 1 mg/ mL em H₂O é utilizada como padrão, uma solução alcalina composta por: 10g de Na₂CO₃ + 2g de NaOH (v = 500 mL), tartarato de sódio 2%, CuSO₄ 1%, Reagente de Folin (2N) diluído em H₂O 1:3 (v/v) e a amostra desconhecida de proteína. Basicamente, ocorrendo uma reação entre Cu⁺² com as ligações peptídicas das proteínas e a redução dos sais de fosfomolibdato-fosfotungstato do “reagente de Folin”, resultando numa cor azulada, analisada espectrofotometricamente a 660nm.

6.9. Síntese de Peroxinitrito

Esta síntese é gerada a partir de uma solução de nitrito de sódio e uma solução de peróxido de hidrogênio em ácido nítrico, utilizando um conector tipo T, sendo o produto coletado sobre uma solução de hidróxido de sódio. O resíduo da reação é removido através da adição de óxido de manganês. A concentração final do peroxinitrito é determinada pela absorvância a 302 nm em hidróxido de sódio utilizando um coeficiente de extinção molar de $1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ^{91,92}.

6.10. Atividade Antioxidante *in vitro*

6.10.1. Formação e Monitoramento de Radicais Hidroxila ($\bullet\text{OH}$) e Radicais ascorbil ($\text{ASC}\bullet$)- Avaliação da Lipoperoxidação

Este método baseia-se na oxidação provocada por radicais $\bullet\text{OH}$ e $\text{ASC}\bullet$, em biomoléculas como lipídeos, carboidratos, ácidos nucléicos, levando à formação de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA) monitoradas espectrofotometricamente a 535 nm ^{91,92}. Os resultados foram expressos em percentagem, tomando-se os valores médios das absorvâncias dos ensaios controle com 100% de LPO.

O nível de LPO foi indicado pela formação de malonilaldeído (MDA) e outras substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). O teste avalia o dano celular e foi baseado no trabalho descrito por Ohkawa *et al* (1979) ⁹⁵ e Bird & Draper (1984) ⁹⁶.

Os lipossomas obtidos foram tratados com o radical $\bullet\text{OH}$, pelo sistema $[\text{FeCl}_3 + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{ascorbato}]$ e o radical $\text{ASC}\bullet$, através do sistema $[\text{FeSO}_4 + \text{ascorbato}]$. Após pré-incubação a 37°C por 1 hora, foram adicionados em cada amostra TCA 12% e TBA 0,73% e incubados por 30 min, a 100°C, formando uma coloração rósea. Nessas condições o fenoxil foi a forma de radical livre predominante no meio ⁹⁶.

Paralelamente, foi analisada a LPO provocada pelo radical $\bullet\text{OH}$ e pelo radical $\text{ASC}\bullet$ em MC, para um exame comparativo posterior aos danos oxidativos provocados pelas estas espécies reativas em lipossomas de asolecetina e fosfatidilcolina.

6.10.2. Monitoramento do Radical DPPH

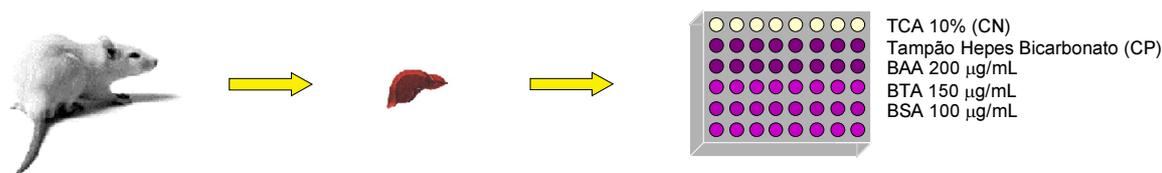
O radical DPPH (1,1-difenil-2-picril hidrazil) é considerado um radical estável e tem sua absorção máxima a 515 nm. É utilizado como ferramenta para estudar a ação de compostos como possíveis seqüestradores de radicais livres, sendo uma técnica independente de qualquer atividade enzimática. O percentual de inibição da amostra testada sobre os radicais DPPH foi calculado através de comparação com o grupo controle, considerando esse como 100% de radicais DPPH no meio de reação⁹⁷.

6.10.3. Formação e Monitoramento de Radical Óxido Nítrico (NO•)

Óxido nítrico foi obtido pela incubação de nitroprussiato de sódio em um meio contendo NaH₂PO₄ em pH 8,0 a 37 °C. O monitoramento do radical foi realizado indiretamente pelo método de Griess (reagente de Griess α -naftiletlenodiamina e ácido sulfanílico) para detecção de NO₂⁻ (correspondente ao NO• formado no meio de reação) em análise espectrofotométrica a 543 nm⁹⁸.

6.10.4. Viabilidade celular

O método baseia-se na utilização de um corante, o MTT (brometo de 2-[4,5-dimetiltizol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), que permite determinar a viabilidade celular através da atividade mitocondrial. O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em um formaz púrpura insolúvel após a clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais. O formazan púrpura formado é determinado espectrofotometricamente a 550 nm, sendo esse proporcional à viabilidade celular. A seguir está representado o esquema 3 da técnica^{99,100}.



Esquema 3: Método da Viabilidade Celular. TCA= ácido tricloroacético; CN = controle negativo; CP = controle positivo; BAA = *Baccharis articulata* aquoso; BTA = *Baccharis trimera* aquoso; BSA = *Baccharis spicata* aquoso.

6.11. Atividade da Óxido Nítrico Sintase

Este método baseia-se no monitoramento espectrofotométrico da oxidação da mioglobina pelo NO^\bullet , determinado espectrofotometricamente a 405 nm. A mioglobina adquirida comercialmente é reduzida pelo tratamento prévio com ditionite. A formação do NO^\bullet é iniciada pela adição de 10 μL do homogenato de cerebelo (anteriormente preparado), onde existe uma maior quantidade de nNOS. A taxa de mudança em A_{405} é avaliada continuamente em intervalos de 30 segundos por 10 minutos. A taxa de oxidação in D.O. por minuto é convertida em nmol NO por minuto, utilizando um fator de conversão previamente estabelecido ¹⁰¹.

6.12. Atividade da Mieloperoxidase

O sobrenadante, do homogenato de pulmão, é ensaiado num meio de reação contendo 50 mM de tampão fosfato (NaH_2PO_4) a pH 6,0 a 25 °C, com 1-dianisidina- 2 HCl (0,167 mg/mL) e H_2O_2 (0,005 %). A atividade da enzima é determinada pela inclinação da curva de absorção a 450 nm, utilizando-se uma curva-padrão obtida com a atividade da enzima purificada usada comercialmente ¹⁰².

6.13. Atividade da Xantina Oxidase

O radical ânion superóxido é gerado através da reação catalizada pela enzima xantina oxidase, utilizada como substrato, levando à formação de radical superóxido e ácido úrico. O

monitoramento do ácido úrico é realizado espectrofotometricamente a 295 nm para avaliar a atividade da enzima xantina oxidase. Já o monitoramento da produção do superóxido é realizado espectrofotometricamente a 560 nm pela redução do nitrobluetetrazolium (NBT) em uma solução contendo xantina, tampão fosfato em pH 7,8, NBT e xantina oxidase, formando uma solução de coloração azulada¹⁰³.

6.14. Análise dos resultados

Os resultados foram expressos pela média \pm desvio padrão. O n variou 3 a 7 conforme o experimento.

7. JUSTIFICATIVA

A justificativa deste trabalho foi apoiado no fato de que essas plantas, a pata-de-vaca, o xaxim, o pinheiro-do-paraná e a carqueja são utilizadas como medicamentos na medicina popular há muito tempo e a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem incentivado a utilização de plantas como recurso no tratamento de doenças como uma alternativa mais econômica, de maneira que possa beneficiar um maior número da população. O Brasil apresenta um grande potencial neste sentido, pois é mantenedor da flora com a maior diversidade do mundo.

Este estudo realizado teve como objetivo comprovar cientificamente as propriedades antioxidantes destas quatro plantas.

A *Bauhinia forficata*, conhecida popularmente como pata-de-vaca, é utilizada principalmente no tratamento da diabetes e nas infecções urinárias. Dessa planta foi isolado o composto *canferol-3,7-O- α -diramnosídeo*.

A *Cyathea phalerata*, conhecida por xaxim, é utilizada no tratamento de afecções renais, amarelão, reumatismo e gripes. Dessa planta foi isolado o composto *canferol-3-O- α -L-rhamnopyranosil(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosídeo*.

Quanto à *Baccharis articulata*, conhecida por carqueja, foram investigados os extratos aquoso e etanólico. As partes aéreas desta planta são empregadas como digestivo, diurético, tônico hepático, estimulante da fertilidade feminina, contra a impotência masculina, anti-reumática e anti-séptica de uso externo, antiespasmódica e antitérmica. E a infusão de seus talos, no tratamento da diabetes e na redução do colesterol. Foram avaliados, também os extratos aquosos e etanólico das espécies *B. trimera*, *B. usteri* e *B. spicata*, já que existem poucos relatos na literatura quanto suas utilizações.

A *Araucaria angustifolia* (Bertze) O. Kuntze, conhecida como pinheiro-do-paraná, é usada como emoliente, anti-séptico das vias respiratórias, tratamento de reumatismo e de dores ciáticas.

As plantas medicinais são a base terapêutica em muitos países em que existe dificuldade de recursos financeiros. Atualmente, cerca de 25 % dos fármacos utilizados são de origem vegetal, enquanto que 50 % são de origem sintética, mas relacionados aos princípios isolados de plantas medicinais ¹³⁶.

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1. Avaliação do potencial antioxidante do *canferol-3,7-O- α -diramnosídeo* e incorporação em lipossomas

8.1.1. Monitoramento do radical DPPH

Na figura 12, estão representados os resultados experimentais relacionados à reatividade do *canferol-3,7-O- α -diramnosídeo* (canf-1) nas diferentes concentrações indicadas na figura com o radical DPPH (1,1-difenil-2-picril hidrazil). Observa-se que à medida em que a concentração do composto é aumentada de 10 até 150 μM , ocorre uma diminuição da absorção do DPPH. O radical DPPH absorve fortemente a 515 nm, apresentando uma coloração violeta. Como este radical apresenta elétrons desemparelhados, na presença de seqüestradores de radicais livres, a absorção decresce, e a descoloração resultante está estequiometricamente relacionada com o número de elétrons capturados. No caso desse composto, a concentração que causou a diminuição de 50 % (IC_{50}) da absorção do DPPH é de $75,45 \pm 3,42 \mu\text{M}$.

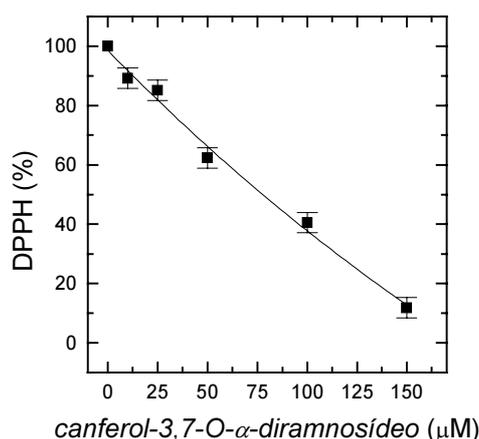


Figura 12: Efeito do canf-1 sobre o radical livre DPPH

O radical DPPH foi incubado durante 30 min na ausência (100 % DPPH) e na presença de canf-1, nas concentrações indicadas na figura. A análise espectrofotométrica foi realizada a 515 nm. O resultado está expresso pela média \pm DP ($n = 3$).

8.1.2. Análise da ação do *canferol-3,7-O- α -diramnosídeo* frente à Peroxidação Lipídica

A ação do canf-1 foi testada frente à LPO em lipossomas de PC, ASO e em MC. A LPO foi induzida pelo radical ASC[•] e detectado nos três casos pelo método de TBARS.

Também foram realizados testes frente ao radical [•]OH na LPO em lipossomas de PC e ASO. Todavia, a grande interferência dos solventes (DMSO e etanol: água (1:1)) utilizados na preparação da solução do canf-1, impossibilitou a obtenção dos resultados com este radical. No caso da avaliação do canf-1 a LPO induzida pelo radical ASC[•] nos lipossomas de PC, o composto foi dissolvido em DMSO. Para microssomas (MC) e lipossomas de ASO, o solvente utilizado na preparação do composto foi etanol: água (1:1). Os ensaios controle foram realizados para subtrair a interferência dos solventes (etanol: água (1:1) e DMSO, sem canf-1) na LPO.

A figura 13 mostra o efeito do canf-1 contra a LPO induzida pelo radical ASC[•] em lipossomas de PC / ASO e MC. Como se pode verificar pela figura 13 e pelas IC₅₀ sumarizadas na tabela 2, o canf-1 protegeu a LPO induzida pelo radical ASC[•] nos três tipos de membranas estudadas, apresentando um efeito protetor similar nas membranas artificiais de lipossomas de PC e ASO e um efeito menor nos MC.

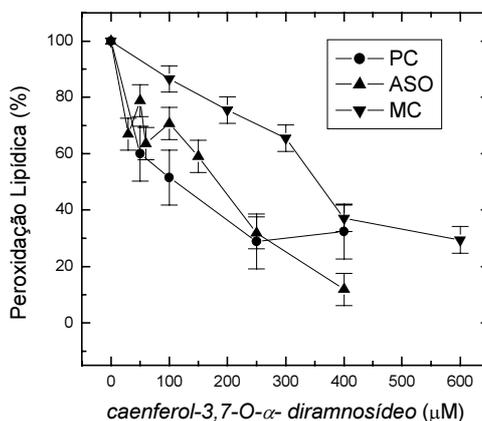


Figura 13: Efeito do canf-1 contra LPO, induzida pelo radical ASC[•] em lipossomas de PC, ASO e MC
O radical ASC[•] foi gerado pelo sistema Fe⁺²/ ácido ascórbico. A concentração dos lipídeos de PC e ASO foi mantida em 2,5 mg/mL. A concentração de proteína em MC foi mantida em 2,0 mg/mL, analisados espectrofotometricamente a 535 nm, conforme descrito nos itens 6.4 e 6.5. Os resultados estão expressos pela média ± DP (n = 3) e comparados ao controle 100 % peroxidação lipídica. (■) PC, (●) ASO e () MICROSSOMA.

A figura 14 mostra o efeito do canf-1 contra a LPO induzida pelo radical $\bullet\text{OH}$ em MC onde a IC_{50} foi de $85,0 \pm 3,5 \mu\text{M}$. Entretanto, nas concentrações testadas, o composto não é capaz de inibir completamente a LPO.

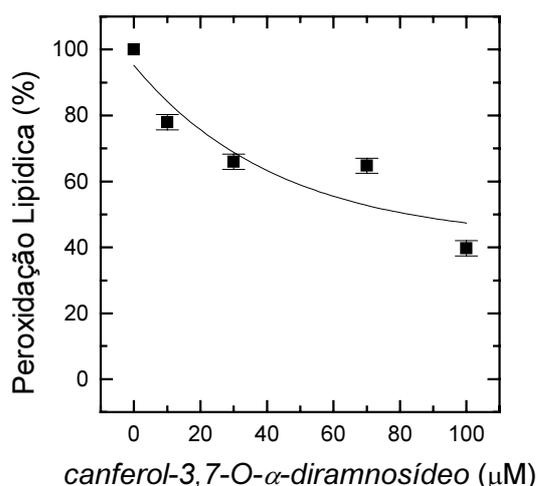


Figura 14: Efeito do canf-1 contra a LPO em MC induzida pelo radical $\bullet\text{OH}$. O radical $\bullet\text{OH}$ foi gerado pelo sistema $\text{Fe}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$

A concentração de proteínas em MC foi mantida em 2,0 mg/mL analisadas espectrofotometricamente a 535 nm, conforme descrito nos itens 6.4 e 6.5. Os resultados estão expressos pela média \pm DP (n = 3) e comparados ao controle 100 % peroxidação lipídica.

A tabela 2 também mostra o efeito de proteção contra LPO da quercetina, outro flavonóide cujo potencial antioxidante já é conhecido. Verifica-se que o canf-1, apesar de menos potente, apresenta um potencial protetor comparável ao da quercetina, provavelmente devido às interações com as membranas lipídicas conforme já relatadas na literatura ⁵⁴.

Tabela 2: Tabela comparativa do canf-1 e quercetina das IC₅₀ contra LPO induzida pelo radical ASC[•] e [•]OH nas membranas artificiais de PC/ASO e MC.

MEMBRANAS	IC ₅₀ (μM) radical ASC [•]		IC ₅₀ (μM) radical [•] OH	
	canf-1	quercetina	canf-1	quercetina
PC	156,0 ± 5,20	80,0 ± 6,0	n.r.	150,0 ± 2,0
ASO	170,0 ± 5,70	80,0 ± 5,7	n.r.	100,0 ± 1,0
MC	365,6 ± 4,72	125,0 ± 5,0	85,0 ± 3,5	7,5 ± 0,5

n.r. = não realizados.

Comparando os dados obtidos na LPO induzida pelo radical ASC[•] e [•]OH em MC, pode-se constatar que o canf-1 apresentou um efeito de proteção maior na LPO induzida pelo radical [•]OH do que na LPO induzida pelo radical ASC[•]. De uma forma geral, como o radical [•]OH é extremamente reativo, os parâmetros antioxidantes obtidos com este radical são menores.

A LPO induzida pelo radical ASC[•] ocorre devido à redução de um elétron do ascorbato (ácido ascórbico), resultando no radical, podendo formar um complexo íon ascorbil-ferroso (ASC[•]-Fe⁺²) com o ferro ligado na membrana. O complexo íon ascorbil-ferroso (ASC[•]-Fe⁺²) atua como um catalisador da LPO, sem oxidar o ascorbato durante o processo. Isso ocorre devido ao potencial de redução, permitindo a transferência de um elétron dos ácidos graxos polinsaturados (AGPI) em direção ao complexo^{58,103,104}. O possível mecanismo pelo qual a iniciação da LPO é induzida pelo ascorbato em MC foi bem estabelecido por Casalino *et.al.*, em 1996.

As EROs e ERNs são iniciadores do processo de LPO pois possuem reatividade suficiente para abstrair o átomo de H das cadeias laterais dos AGPI que constituem as membranas biológicas. Estão envolvidas em diversas patologias uma vez que podem causar alterações significativas na estrutura das membranas biológicas através da oxidação dos AGPI, conforme descrito no item 2.1.1.3, 2.1.1.4 e 2.3 da introdução. Estas alterações geram

produtos de decomposição que interferem no metabolismo celular ⁵⁸, como o esvaziamento da glutathione hepática ¹⁰⁵.

É proposto na literatura que as EROs são responsáveis pelas alterações nas membranas celulares, uma vez que podem induzir mudanças na fluidez causando alterações na permeabilidade das células, atividades enzimáticas e não-enzimáticas e ainda podem causar mutações no DNA ⁵⁵. A fluidez das membranas biológicas está relacionada com a presença de insaturações nas cadeias laterais dos AGPI, as quais baixam o ponto de fusão do interior das membranas. Por esta razão, danos como a LPO nos ácidos graxos polinsaturados, ocasionam um decréscimo de fluidez.

A capacidade protetora de compostos fenólicos contra o dano lipoperoxidativo é atribuída a capacidade deles em doar hidrogênios dos grupos hidroxil inerentes a sua composição química. Contudo, a efetividade de proteção de antioxidantes fenólicos está relacionada também a velocidade de incorporação dentro das células e a orientação nas biomembranas ^{106,107,108}.

Os flavonóides podem interagir com os lipídeos dos lipossomas, intercalando-se entre as cadeias acila e diminuindo a fluidez das membranas ⁵⁴. Esta interação pode ainda depender da habilidade da molécula de assumir uma conformação planar e de outros fatores, como por exemplo, a presença de diferentes substituintes na estrutura química ⁶⁵.

Os efeitos protetores dos flavonóides em sistemas biológicos são atribuídos a capacidade de transferir elétrons para os radicais livres, complexar catalisadores metálicos ¹⁰⁹, ativar enzimas antioxidantes ¹¹⁰, reduzir radicais α -tocoferóis ¹¹¹, inibir oxidases ¹¹² entre outras propriedades. A forte afinidade por íons ferro, conhecidos como catalisadores de muitos processos que induzem ao aparecimento de radicais livres pela reação de Fenton, está também relacionada as atividades anti-peroxidativas dos flavonóides.

O arranjo espacial dos substituintes e dos grupos funcionais na estrutura nuclear são determinantes no potencial antioxidante *in vitro* de compostos fenólicos como os flavonóides. Os grupos fenólicos, podem atuar como doadores de elétrons, os quais são os responsáveis pela atividade de sequestradores de radicais livres ⁶⁵.

Estudos sobre a relação estrutura-atividade (REA) mostra que a capacidade antioxidante e metabolismo *in vitro* dos mesmos depende fundamentalmente da estrutura química. A capacidade antioxidante dos flavonoídes é atribuída primariamente à reatividade dos substituintes OH que participam da reação com as espécies reativas, conforme ilustrado na equação 45 ⁶⁵.



Equação 45: Reação dos flavonóides com as espécies reativas para a formação de um radical centrado no flavonóide.

Os grupos OH do anel B dos flavonóides, conforme ilustrado na figura 15 (canf-1), são capazes de doar um elétron as EROs como o $\bullet OH$, RO_2^{\bullet} e $ONOO^-$, estabilizando-os em uma espécie de radical estável ligado ao flavonóide (equação 45). A estabilidade é proporcional ao número de OH presentes na sua estrutura química. Este radical, por sua vez é estabilizado numa estrutura de ressonância. O grupo 5-OH no anel A e o grupo 3-OH no anel C influenciam na atividade antioxidante dos flavonóides. O canf-1, por sua vez, possui um destes substituintes OH, no anel B, a qual pode estar contribuindo na sua atividade antioxidante como proposto na literatura ⁶⁵.

Flavonas (flavonóides heterocíclicos) que possuem hidroxilas no carbono C_3 conferem planaridade a essas moléculas permitindo uma maior conjugação entre os anéis aromáticos aumentando a deslocalização eletrônica com conseqüente maior aumento na estabilização dos radicais fenoxil-flavonóides ¹¹³. Areais *et al*, demonstrou numa análise da atividade antioxidante-estrutura de flavonóides, como quercetina, luteolina, eriodictioiol e taxofolina, em estudos de culturas de células retiniais, que o estresse oxidativo induzido pelo sistema ascorbato/ Fe^{+2} , é altamente reduzido na presença destes flavonóides. No entanto, o eriodictioiol que não tem a ligação dupla C_2-C_3 , e o grupo OH em C_3 no anel B, apresentou os melhores resultados. A estereo estrutura dos flavonóides afeta a eficiência de sua absorção e metabolismo em células epiteliais ¹²⁰. Ainda que o canf-1 tenha uma raminose ligada ao oxigênio de C_3 , o respectivo radical fenoxil pode também ser estabilizado pela conjugação do anel aromático B com a porção aglicona da molécula.

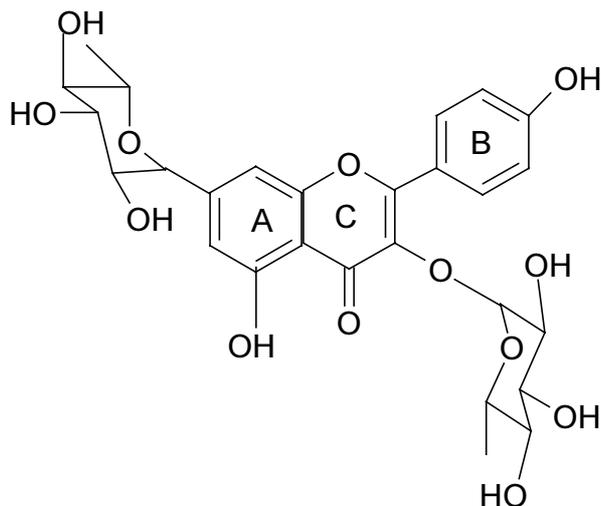


Figura 15: Estrutura do canf-1

Numerosos estudos *in vitro* revelam os efeitos biológicos da quercetina, como a indução da apoptose, a antimutagenese, a inibição de lipooxigenases, a ativação da atividade da SOD, entre outras ¹¹⁴. O efeito antioxidante da quercetina ocorre devido a vários fatores, como os substituintes OH, citados nesta secção.

A literatura também relata que, na prevenção da LPO em lipoproteínas de baixa densidade, a quercetina-4'-O- β -glicosídeo, é muito inferior à quercetina-3-O- β -glicosídeo, uma vez que esta última preserva na composição química a estrutura catecol ^{115,120}.

Os flavonóides estão presentes na natureza em maior quantidade na sua forma glicosilada, na qual um ou mais grupos de açúcares estão ligados aos grupos fenólicos pela ligação glicosídica ^{116,120}. Como a quercetina também é encontrada na forma glicosilada na dieta humana, pode-se relacionar a efetividade da sua atividade antioxidante *in vitro* com a biodisponibilidade da forma aglicona e seu glicosídeo ^{117,120}. Estudos realizados em culturas de células para a absorção intestinal da quercetina e seu glicosídeo, mostraram que a hidrólise das glicoses acelera a absorção no intestino delgado. Os autores sugerem que este fator parece ocorrer devido aos grupos de açúcares ligados aos grupos fenólicos.

Em estudos anteriores, foi demonstrado que quercetinas glicosiladas possuem menor lipofilicidade e menor afinidade com membranas lipossomais do que a aglicona ^{118,119,120}. O canf-1 é também um glicosídeo e como tal certamente possuirá uma menor lipofilicidade e, portanto, menor afinidade com as membranas lipossomais. De fato, mostrou-se menos ativo que a quercetina, conforme tabela 2 demonstra.

A quercetina é capaz de atuar como pró-oxidante, induzindo a danos biológicos^{120,121,122}, ao invés de atuar como um antioxidante.

As membranas celulares possuem composição química distinta. Por exemplo, os neurônios são principalmente ricos em colesterol e esfingomielina e as membranas da mitôcondria de fígados possuem PC, diacilglicerol e fosfatidiletanolamina.

Os lipossomas são estruturalmente semelhantes à matriz lipídica das células, artificialmente produzidas, servindo como modelos para simular e quantificar os danos causados pelas EROs e ERNs em estruturas biológicas, assim como a utilização para avaliar a eficiência de compostos antioxidantes.

Os lipossomas de PC são compostos por fosfolipídeos de PC e os lipossomas de ASO são formados por uma mistura de três fosfolipídeos, a PC, o PI e a PE^{55,123,124}.

Os MC de células hepáticas, material utilizado neste trabalho, contêm uma mistura de ácidos graxos polinsaturados incluindo o ácido palmítico, o ácido esteárico e o ácido araquidônico; os fosfolipídeos de fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina e esfingomielina; colesterol; citocromo P-450 e enzimas citocromo B₅.^{125,126,127}

Paul Cos e col.sugerem que os testes de lipoperoxidação e de citotoxicidade em fibroblastos de pele humana, por substâncias exógenas, devam ser realizados em concentrações na faixa μM , pois níveis iguais ou superiores a mM não são obtidos pelo plasma⁶⁸.

O composto majoritário desta fração (canf-1), não interferiu na absorção de glicose, e reduziu a glicemia de ratos normais e diabéticos, mostrando-se eficiente como agente antioxidante *in vitro*. (artigo aceito pela revista *Journal of Natural Products*, em anexo)

8.1.3. Análise do efeito do *canferol-3,7-O- α -diramnosídeo* sobre enzimas pró-oxidantes e reatividade frente ao radical ânion superóxido

Atividade da Xantina Oxidase

O ensaio envolvendo o sistema Xantina / Xantina Oxidase (XO) permitiu a obtenção de dois parâmetros de atividade antioxidante:

- i. efeito sobre a enzima pró-oxidante XO uma vez que o produto desta enzima é o radical ânion $O_2^{\bullet-}$ e ácido úrico.
- ii. reatividade da substância testada com o radical ânion $O_2^{\bullet-}$ pela adição de azul de nitrotetrazólio.

Nas figuras 16 e 17 estão representados esses parâmetros. Na figura 16 observa-se que o canf-1 e o solvente não influenciam na atividade da enzima.

Na figura 17 observa-se que o canf-1, excluindo-se o efeito do solvente, apresenta baixa reatividade com o ânion $O_2^{\bullet-}$.

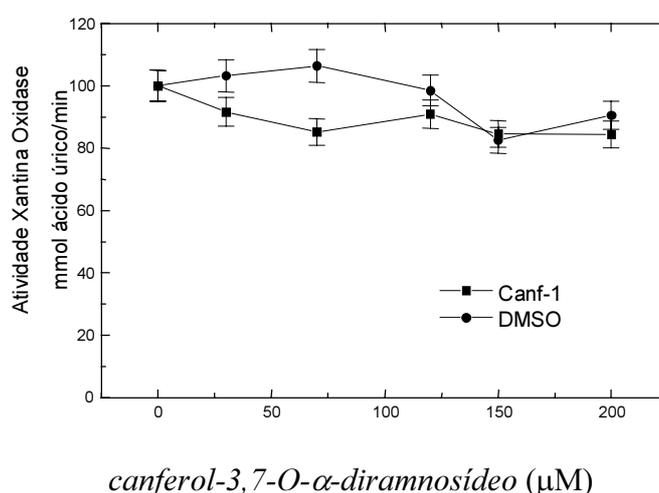


Figura 16: Efeito do canf-1 na atividade da XO

A atividade da enzima XO medida espectrofotometricamente a 295 nm, na ausência e na presença do canf-1 nas concentrações indicadas na Figura. A atividade foi calculada em mmol ácido úrico/min. O resultado foi expresso pela média \pm DP (n= 3).

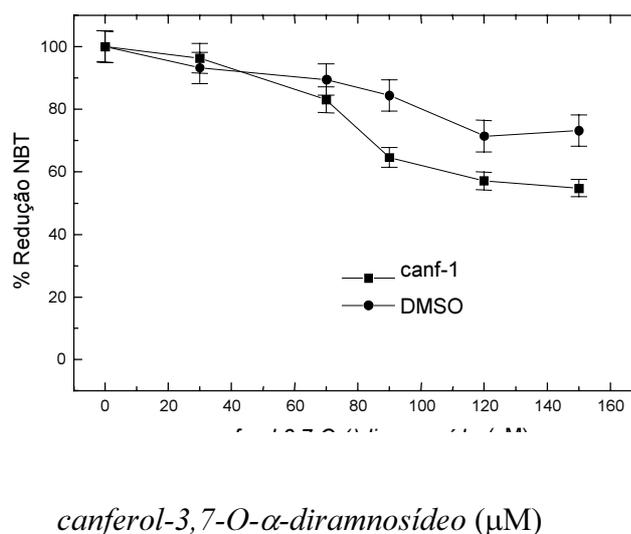


Figura 17: Efeito do canf-1 como sequestrador do ânion superóxido

Atividade da Mieloperoxidase

Na figura 18 está representada a cinética de inibição da atividade da MPO pelo canf-1. A enzima foi inibida em função do aumento da concentração de canf-1. No gráfico inserido na figura 18, observa-se a cinética da inibição da enzima MPO avaliada em intervalos de 5 s, durante 90 s, conforme inclinação da reta obtida. A $K_{0,5}$ foi de $86,0 \pm 9,9 \mu\text{M}$.

A MPO é uma enzima presente em neutrófilos ativados em processos inflamatórios, conforme descrito no item 2.2.3 na introdução. A ação desta em pH fisiológico é converter H_2O_2 e íons Cl^- a HClO , capaz de degradar H_2O_2 a O_2 e água, por uma reação de dismutação³⁹, sendo cerca de 5 % do H_2O_2 consumido pela enzima para produzir os radicais tirosil^{48,128,129}. O canf-1 inibiu fortemente a MPO como mostrado na figura 18. Embora esta enzima seja considerada antioxidante, devido a sua reação de dismutação do H_2O_2 , também possui atividade pró-oxidante, pois leva à formação de HClO , o qual possui alta reatividade e habilidade para danificar biomoléculas por oxidação, direta ou indiretamente¹⁰.

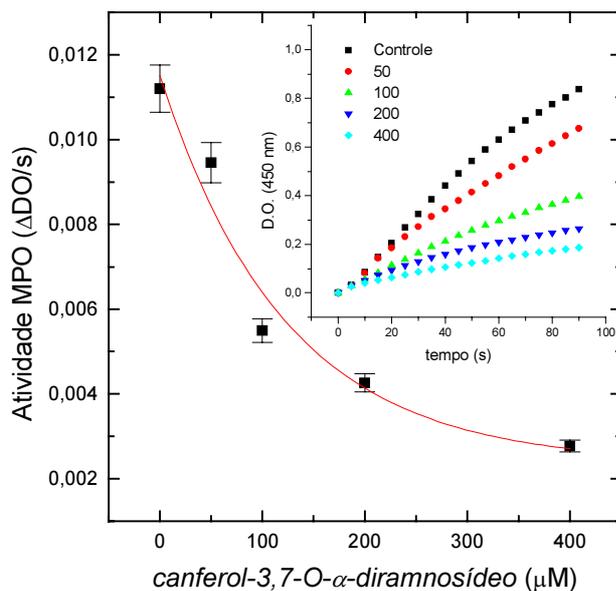


Figura 18: Efeito do canf-1 na atividade da MPO

A atividade enzimática foi avaliada espectrofotometricamente a 450 nm através da formação do ácido hipocloroso a partir de H_2O_2 e 1-dianisidina-2HCl presente no meio de reação. A reação foi iniciada pela adição de 5 μ L de homogenato de pulmão de rato na ausência e na presença de canf-1, nas concentrações indicadas. O gráfico inserido representa a cinética da enzima MPO (90 s) e a inibição pelo canf-1. O resultado está expresso pela média \pm DP (n= 3).

Atividade da Enzima n-NOS

A atividade da enzima n-NOS também foi avaliada. No entanto, como o composto é solúvel em solventes orgânicos, não foi possível determiná-la devido a forte influência dos mesmos, como ocorreu na atividade da enzima X.O..

8.1.4. Incorporação do *canferol-3,7-O- α -diramnosídeo* em membranas de lipossomas de fosfatidilcolina

Conforme já mencionado anteriormente, o trabalho com o canf-1 está sendo realizado em colaboração com outros dois grupos. Neste sentido, avaliou-se as propriedades antioxidantes, como mostrado na seção 8.1.3, e numa segunda etapa foi realizada a incorporação do composto, canf-1, em lipossomas de fosfatidilcolina. Os lipossomas incorporados com o canf-1 foram testados em animais que foram submetidos a um modelo

experimental de diabetes e comparados com os resultados deste não incorporado. Os testes com a diabetes então foram coordenados pela professora Dr Fátima M.B. Silva, sendo este estudo parte da dissertação de mestrado de Ana Paula Jorge, do Departamento de Bioquímica da UFSC ¹³⁰.

O canf-1 foi incorporado em lipossomas de PC pelo método de diálise, conforme descrito nos item 6.4. As concentrações iniciais do composto utilizadas na incorporação foram 15, 30 e 50 mM, na proporção 1:1 (canf-1: lipossoma de PC). A preparação realizada com canf-1 15 mM inicial, apresentou um rendimento muito baixo (6 %), sendo descartada. E a preparação realizada com canf-1 50 mM inicial, apresentou um precipitado após o processo de diálise, também, descartada. O canf-1, na concentração inicial 30mM, incorporado em lipossomas foi testado em ratos diabéticos e normais (sem indução da diabetes).

A composição, estrutura e dinâmica dos lipossomas podem ser controladas completamente conforme o método utilizado na sua preparação. Devido a esta característica, são empregados como carregadores, particularmente em terapias anti-câncer, anti-fungicida e anti-bactericida ^{131,132}.

Os fosfolípeos, em particular a PC e o colesterol são os principais componentes das membranas biológicas sendo estes muito comuns no estudo para liberação de novos fármacos⁴⁹.

Os lipossomas são estudados porque possuem a habilidade de transportar macromoléculas através das membranas plasmáticas, contudo por mecanismos ainda desconhecidos. A efetividade de proteção antioxidante de compostos fenólicos pode estar relacionada à velocidade de incorporação dentro das células, à orientação em biomembranas, às ligações químicas entre os grupos cabeça de fosfolípeos e às características estruturais dos flavonóides. As características estruturais, requisitos determinantes dos flavonóides em relação à reatividade, incluem o grupo catecol no anel B, a ligação dupla 2,3 em conjugação com a função 4-oxo e a presença de substituintes OH nos carbonos 5, 3 e 7 ⁶⁵.

O estudo da interação entre os flavonóides (quercetina, hesperetina, naringenina, rutina) e lipossomas de DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina) foi realizado por outros pesquisadores com o objetivo de elucidar esta interação, que pode ser explicada em termos de efeito de fluidez. A introdução de moléculas lipofílicas, como DPPC, numa estrutura ordenada da bicamada lipídica, faz com que estas moléculas interajam com os lípeos dos lipossomas intercalando-se entre as cadeias acila flexíveis. Os flavonóides, ao serem absorvidos podem interagir com os fosfolípeos que compõem o lipossoma formando

complexos intermediários reversíveis. A quercetina apresentou os três requisitos estruturais, exibindo a maior propriedade antioxidante para radicais $\cdot\text{OH}$, $\text{RO}\cdot_2$ e $\text{O}_2\cdot^-$, que foram atribuídos as características estruturais⁵⁴.

No intuito de verificar se o canf-1 foi incorporado na membrana lipídica, logo após ao processo de diálise, os lipossomas foram centrifugados e dissolvidos em detergente (colato e deoxicolato de sódio) para posterior análise espectrofotométrica.

Na figura 19 está representado o perfil espectrofotométrico do canf-1 após a dissolução dos lipossomas preparados a partir de solução estoque.

A concentração de canf-1 incorporado no lipossoma foi calculada depois da determinação do ϵ nas mesmas condições, conforme mostrado na próxima seção. A concentração calculada foi 0,26 mM, com um rendimento de 45,8 %.

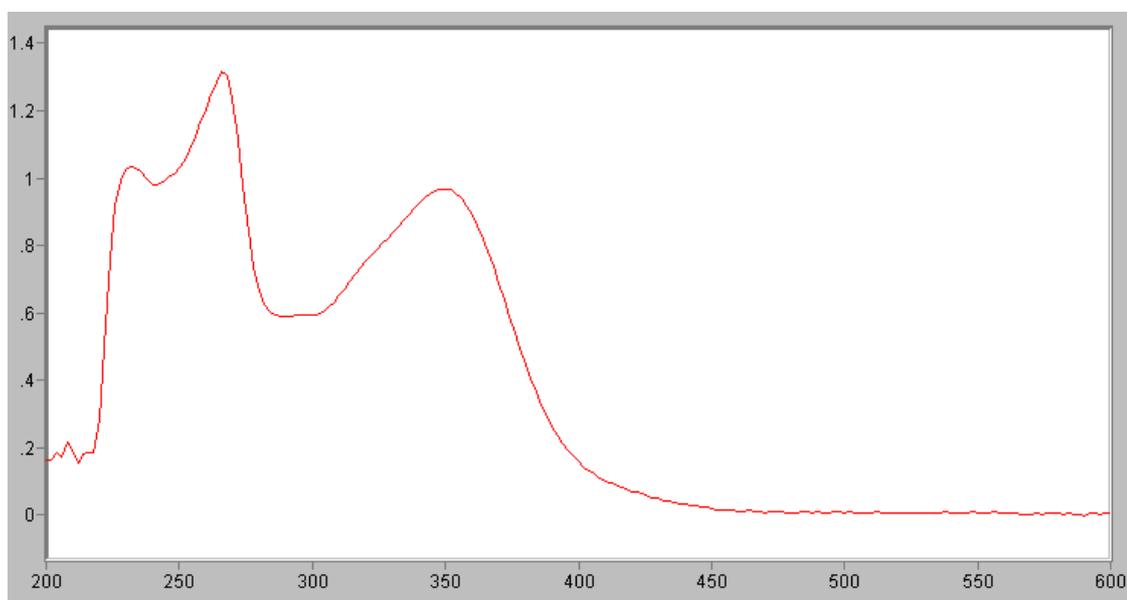


Figura 19: Espectro do canf-1 incorporado no lipossoma de PC, após a solubilização do lipossoma de fosfatidilcolina

Determinação do ϵ em meio aquoso

O coeficiente de extinção molar (ϵ) foi determinado pela Lei de Lambert-Beer ($A = \epsilon \cdot b \cdot c$), utilizando o coeficiente angular da reta, com o intuito de calcular posteriormente no meio a concentração do canf-1 incorporado nos lipossomas de fosfatidilcolina.

A figura 20 mostra os perfis espectrofotométricos das diferentes concentrações, na faixa de 5- 75 μM para a determinação do ϵ .

Na determinação do ϵ , os lipossomas foram preparados e dissolvidos com o mesmo tampão que os mesmos foram incorporados com canf-1 na concentração estoque 30 mM na proporção 1:1 (canf-1: lipossoma de PC).

O ϵ do canf-1 foi $14800\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ em meio aquoso, a $\lambda = 360\text{ nm}$, determinado nesta tese de doutorado.

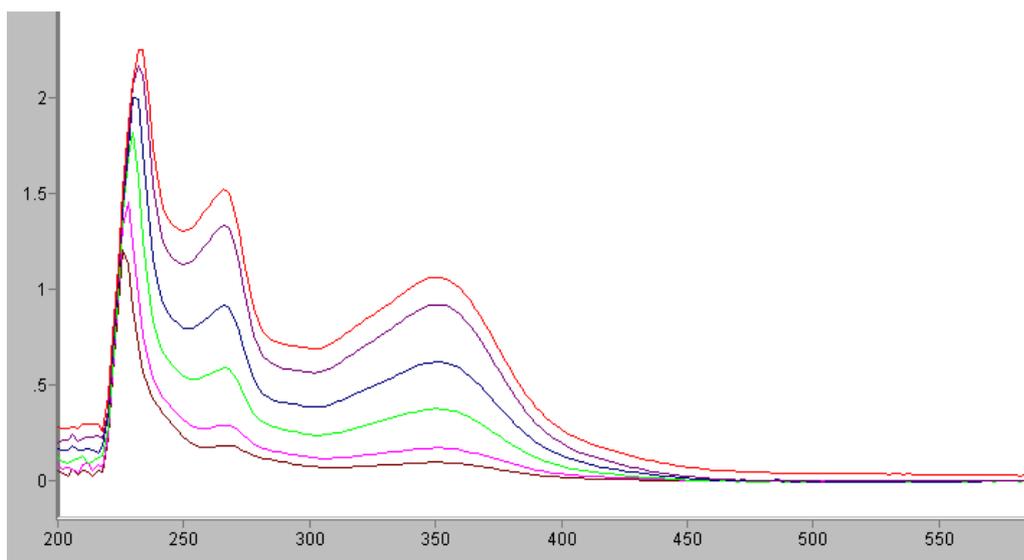


Figura 20: Espectros do canf-1 utilizados na determinação do ϵ em meio aquoso, $\lambda = 360\text{ nm}$.

E através do gráfico da figura 21 foi calculado o ϵ do canf-1 no meio estudado. O ϵ determinado nestas condições foi $13640\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

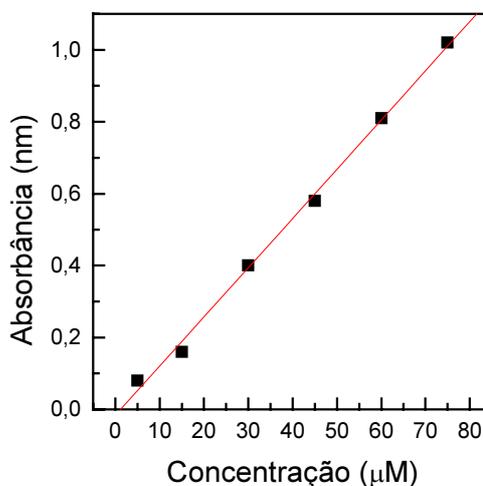


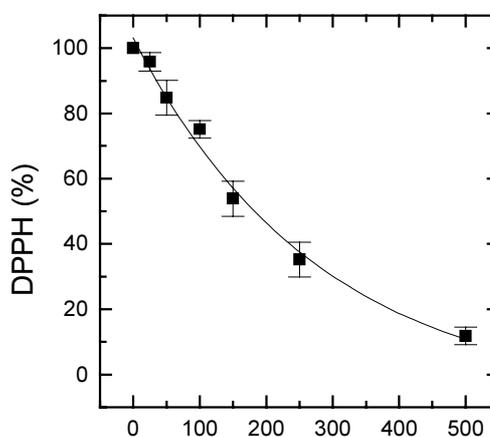
Figura 21: Gráficos da Absorbância do canf-1 em função da concentração. As medidas foram realizadas em um meio contendo tampão e lipídeos solubilizados.

8.2. Avaliação do potencial antioxidante do *canferol-3-O- α -L-rhamnopyranosil(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosídeo*

8.2.1. Monitoramento do radical DPPH

Uma segunda molécula, análoga ao canferol-1, também de origem vegetal (xaxim), foi avaliada em relação ao potencial antioxidante, o qual poderá ser utilizado para análise de relação estrutura e atividade.

Na figura 22 estão representados os resultados experimentais relacionados à reatividade do *canferol-3-O-(α)-L-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosídeo* (canf-2) nas diferentes concentrações indicadas na figura com o radical DPPH. Observou-se que, quando aumenta-se a concentração do composto de 10 até 500 μ M, a absorção do radical DPPH diminui. A IC_{50} observada do composto foi de $184,32 \pm 5,34 \mu$ M.



canferol 3-O- α -L-rhamnopyranosil (1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosídeo (μ M)

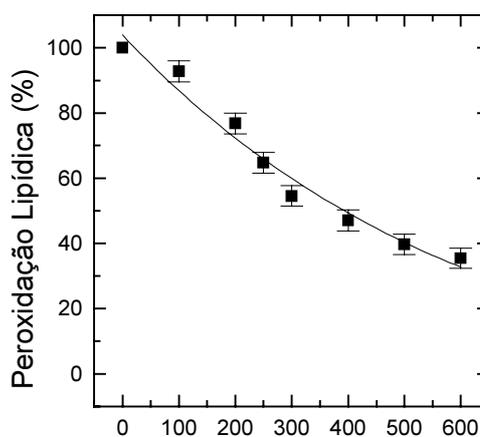
Figura 22: Efeito do canf-2 sobre o radical livre DPPH

O radical DPPH foi incubado por 30 min na ausência (100 % DPPH) e na presença do canf-2, nas concentrações indicadas na Figura. A análise espectrofotométrica foi realizada a 515 nm. O resultado está expresso pela média \pm DP (n = 3).

8.2.2. Análise da ação do *canferol-3-O- α -L-rhamnopyranosil(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosídeo* frente à Peroxidação Lipídica

A ação do canf-2 foi testada contra a LPO em MC induzida pelo radical ASC[•]. Foi utilizado um sistema de solvente nas soluções-estoque do composto etanol: água (1:1).

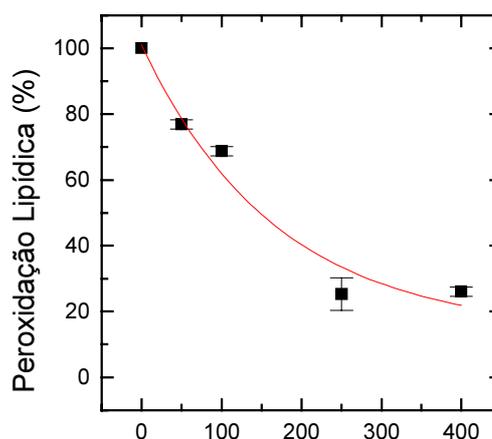
A figura 23 representa a LPO induzida pelo radical ASC[•] na fração microsomal. A IC₅₀ observada do composto foi de 386,37 \pm 3,18 μ M .



canferol 3-O- α -L-rhamnopyranosil (1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosídeo (μ M)

Figura 23: Efeito do canf-2 em MC contra a LPO induzidas pelo radical ASC[•]. O resultado está expresso pela média \pm DP (n= 5).

Na figura 24 está representada a ação protetora do canf-2 contra a LPO induzida pelo radical ASC[•] em lipossomas de PC. A IC₅₀ observada do composto foi de 149,15 \pm 1,40 μ M. Pode-se constatar que o mesmo apresentou um efeito significativo de proteção contra a LPO induzida pelo radical ASC[•].



canferol 3-O-α-L-rhamnopyranosil (1→2)-β-D-glicopiranosídeo (μM)

Figura 24: Efeito do canf-2 em lipossomas de PC contra a LPO induzida pelo radical ASC• utilizando um sistema de etanol:água 1:1 nas soluções-estoque do composto

O radical ASC• foi gerado pelo sistema Fe⁺²/ácido ascórbico. A concentração do fosfolípido foi mantida em 2,5 mg/mL analisados espectrofotometricamente a 535 nm, conforme descrito no item 6.4. Os resultados estão expressos pela média ± DP (n = 2) e comparado com 100 % de peroxidação lipídica.

Os resultados referentes aos canferóis glicosilados (canf-1 e canf-2) testados estão resumidos na tabela 3. Observa-se que esses glicosídeos apresentam capacidade similar frente à peroxidação lipídica em ambas membranas utilizadas, microsomas e lipossomas de PC. Todavia, em relação à reatividade com o DPPH o canf-1 mostrou-se aproximadamente 2,5 vezes mais potente.

Tabela 3: Tabela comparativa do efeito do canf-1, canf-2 e quercetina sobre o radical DPPH. Índices de proteção dos antioxidantes canf-1, canf-2 e quercetina(μM) contra a LPO em lipossomas de PC e MC induzidas pelo radical ASC•.

TIPOS	DPPH IC ₅₀	LPO (MC) IC ₅₀	LPO (PC) IC ₅₀
canf-1	75,45 ± 3,42	365,64 ± 4,72	156,45 ± 5,20
canf-2	184,32 ± 5,34	386,37 ± 3,18	149,15 ± 1,40
quercetina	13,76 ± 1,05	125,0 ± 5,0	80,0 ± 6,0

O ensaio com o radical DPPH é proposto pela literatura como sendo o primeiro a ser realizado no estudo de novas moléculas com potencial antioxidante. Nesse trabalho, observou-se que algumas moléculas que mostraram baixa atividade com este radical, podem apresentar reatividade com outras espécies reativas, como por exemplo, a melatonina, que apresentou-se muito potente como seqüestrador do radical ASC[•], •OH e ONNO[•] em todas os tipos de membranas testadas, apresentando efeito protetor contra a LPO¹³³. Contudo, para canf-2 mais estudos serão necessários para evidenciar o potencial antioxidante.

Comparando-se os resultados referentes aos canferóis glicosídicos aqui mostrados com os obtidos com a quercetina (IC₅₀ em LPO com lipossomas de PC induzida por ascorbil = 80,0 ± 6,0 µM e em LPO com MC induzida pelo mesmo radical = 125,0 ± 5,0 µM), considera-se que estes compostos apresentam ação antioxidante semelhantes, na faixa de concentração de µM.

Observa-se na figura 25 que os dois canferóis glicosilados apresentam estruturas químicas similares, apresentando grupamentos OH no carbono 5 no anel A e no carbono 4' do anel B. Estudos sobre a relação estrutura- reatividade (REA) mostraram que a capacidade dos flavonóides atuarem como antioxidantes está fundamentalmente ligada aos substituintes OH. Os dois canferóis glicosilados possuem grupamentos OH fenólicos livres, capazes de atuar como doadores de elétrons, que são responsáveis pela atividade de seqüestradores de EROs. Provavelmente a capacidade protetora contra o dano lipoperoxidativo pode estar associada a esta propriedade⁶⁵. Os flavonóides glicosídicos podem interagir com a porção hidrofóbica dos fosfolipídeos, no modelo de membranas lipossomais formando complexos físico-químicos reversíveis, de tal forma a influenciar de algum modo na fluidez das membranas⁵⁴. O canf-1 possui OH no C₇ substituído e somente OH nos C₅ e C₄' substituído. E a quercetina possui 2 OH livres no anel B.

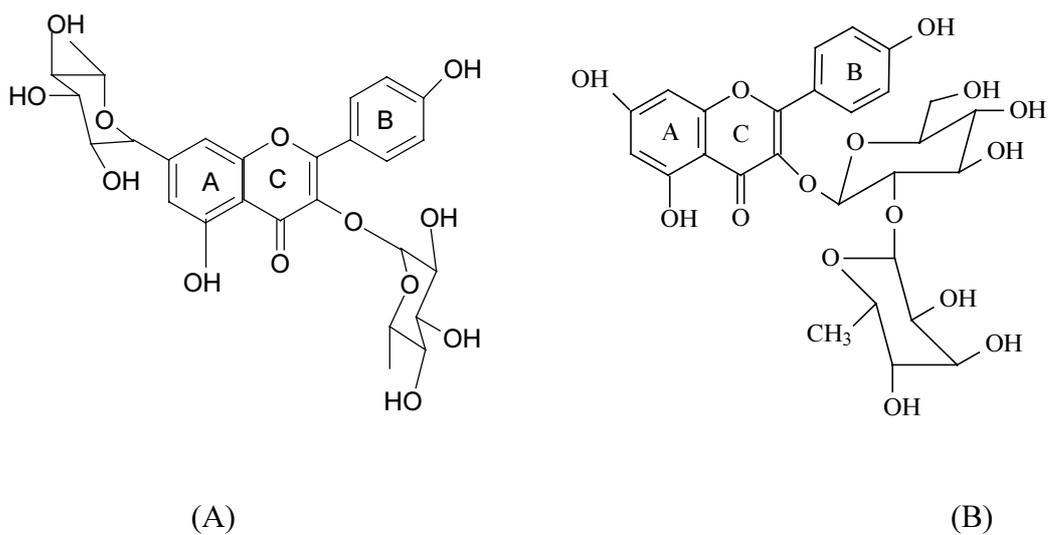


Figura 25: Estrutura química do (A) canf-1 e (B) canf-2

8.3. Avaliação do potencial antioxidante da *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. Kuntze – acículas, grimpas e ramos

8.3.1. Monitoramento do radical DPPH

Na figura 26 estão representados os dados relacionados a reatividade das diferentes frações das acículas da *A. angustifolia*, nas concentrações indicadas na figura, com o radical DPPH. O extrato utilizado foi o EBHA (extrato bruto hidroalcoólico) e as frações FEP (fração éter de petróleo), FDM (fração diclorometano), FAE (fração acetato de etila), FBU (fração n-butanólica) e Faq (fração aquosa) e Ep/H₂O (fração do precipitado éter de petróleo e água).

Verifica-se que todas as frações e o extrato apresentaram reatividade frente a este radical, com exceção da fração FEP que não atingiu os 50 % de inibição nas condições testadas. Observa-se também que a absorção do radical DPPH diminui conforme o aumento das concentrações, sendo que a maioria das frações e o extrato fizeram com que a absorbância do DPPH fosse zero, com exceção do FEP.

As IC₅₀ estão resumidas na tabela 4 e através delas observa-se que a ordem de reatividade frente ao radical DPPH foi: FAE A > Faq A > FBU A > Ep/H₂O A > EBHA A > FDM A > FEP A. As frações FAE A e FBU A apresentaram um potencial antioxidante significativo frente ao radical DPPH. Estudos paralelos, a fim de avaliar as propriedades antivirais¹³⁵, também apresentaram resultados promissores, nestas frações. Sendo assim, a continuidade da avaliação do potencial antioxidante foi direcionada para as mesmas.

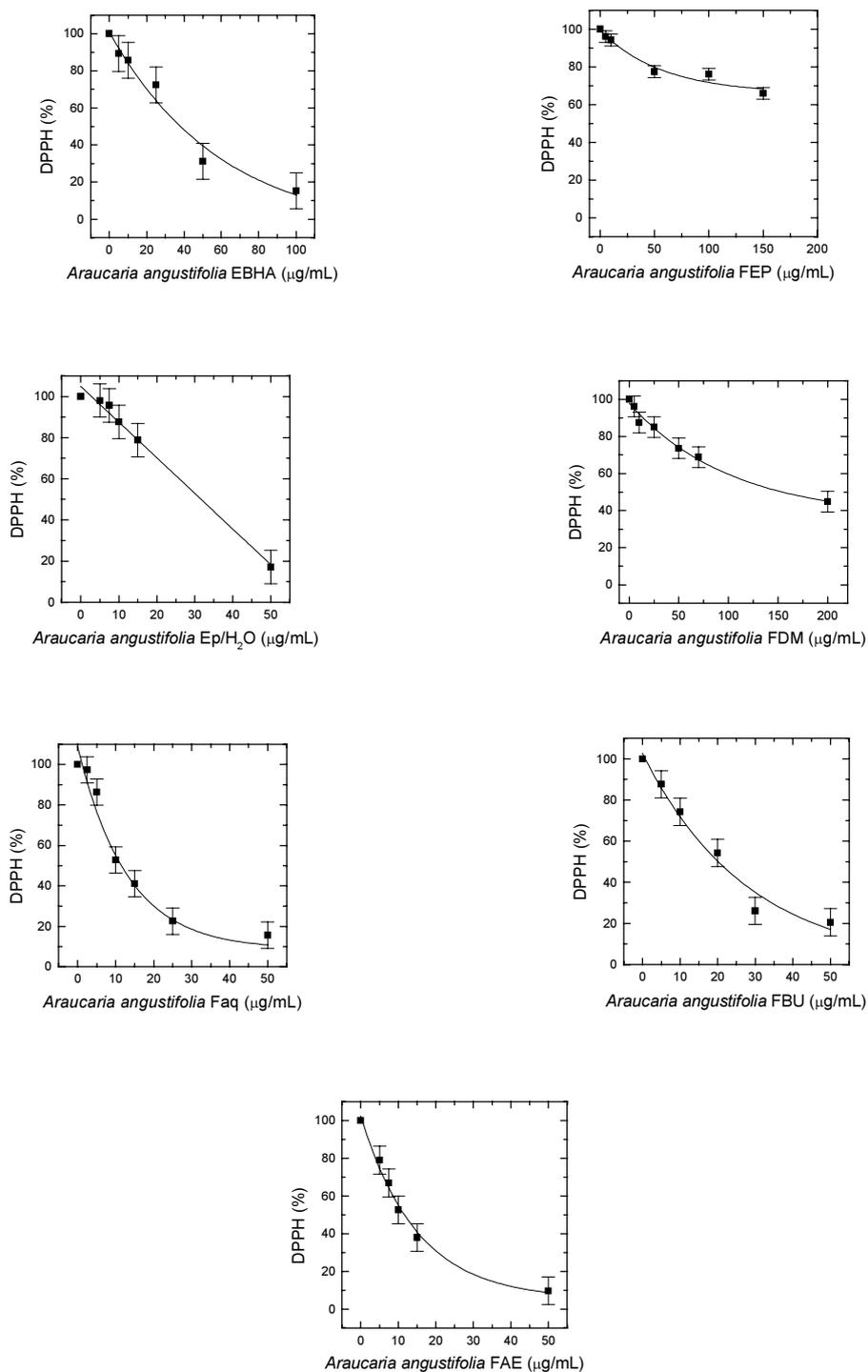


Figura 26: Efeito das acículas das frações EBHA A (extrato bruto hidroalcoólico), FEP A (fração éter de petróleo), Ep/H₂O A (fração do precipitado éter de petróleo e água), FDM A (fração diclorometano), Faq A (fração aquosa), FAE A (fração acetato de etila) e FBU A (fração butanólica) da *A.angustifolia* sobre o radical livre DPPH

O radical DPPH foi incubado por 30 min na ausência (100 % DPPH) e na presença das diferentes frações, nas concentrações indicadas na Figura. A análise espectrofotométrica foi realizada a 515 nm. O resultado está expresso pela média \pm DP (n = 3) .

Tabela 4: Tabela comparativa entre as IC₅₀ das frações de diferentes frações EBHA A (extrato bruto hidroalcolico), FEP A (fração éter de petróleo), Ep/H₂O A (fração do precipitado éter de petróleo e água), FDM A (fração diclorometano), Faq A (fração aquosa), FAE A (fração acetato de etila) e FBU A (fração butanólica) das acículas da *A. angustifolia* sobre o radical livre DPPH.

O resultado está expresso pela média \pm DP (n= 3) quando comparado com o controle 100 % de DPPH.

	ACÍCULAS	IC ₅₀ (µg/mL)
EXTRATO	EBHA A	34,91 \pm 5,10
	Ep/H ₂ O A	31,60 \pm 5,63
FRAÇÕES	Faq A	11,70 \pm 2,46
	FDM A	150,35 \pm 5,53
	FEP A	não atingiu
	FBU A	20,11 \pm 6,62
	FAE A	11,60 \pm 5,00

No estudo comparativo das frações FAE e FBU avaliou-se também a reatividade frente ao radical DPPH, das mesmas frações originadas das grimpas e ramos. O objetivo de estudar-se compostos originários de grimpas e ramos está relacionado ao aproveitamento das partes da planta que são normalmente descartadas.

Na figura 27 estão representados os dados relacionados à reatividade das frações FAE e FBU das grimpas e dos ramos da *A. angustifolia*, nas concentrações indicadas na figura com o radical DPPH. Pode-se observar que a absorção do radical DPPH diminui conforme o aumento das concentrações utilizadas, mostrando que as frações originadas das grimpas e ramos também apresentaram reatividade frente a este radical.

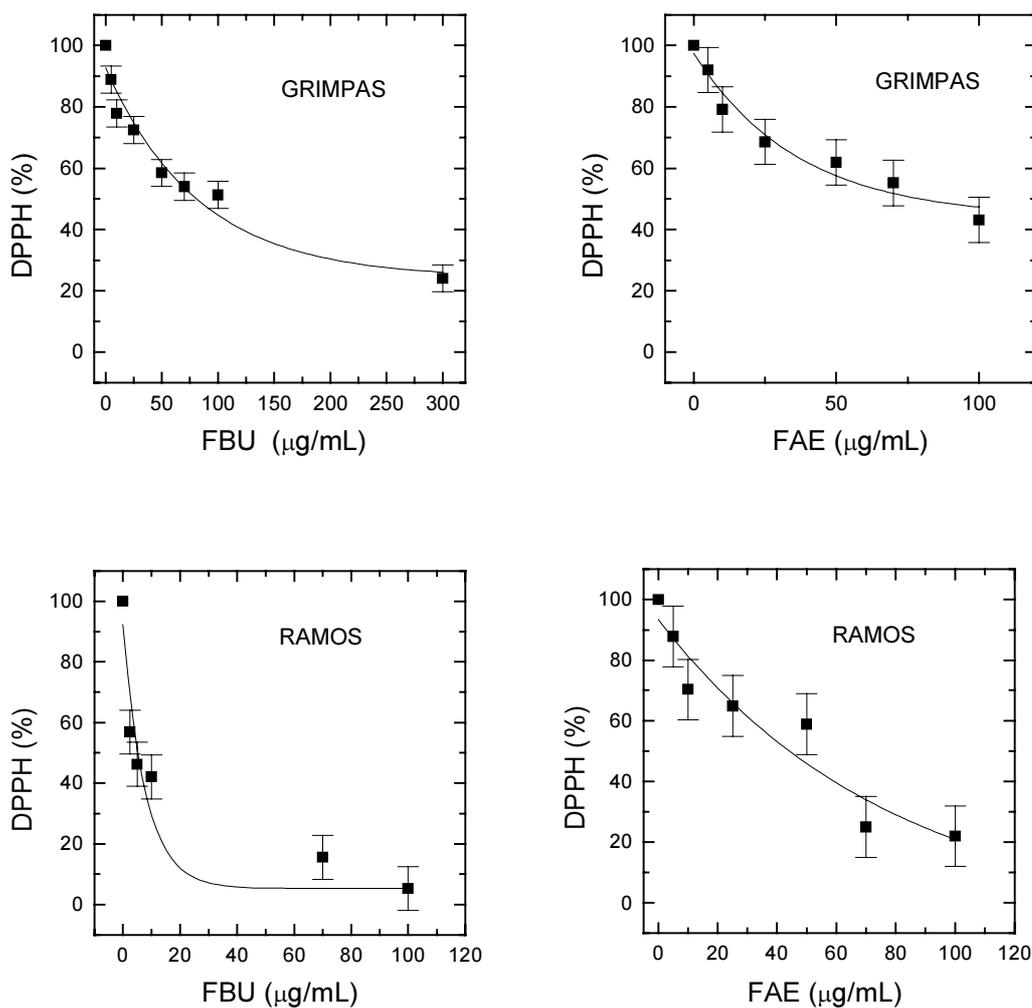


Figura 27: Efeito das frações FAE e FBU de grimpas e ramos da *A. angustifolia* sobre o radical livre DPPH

O radical DPPH foi incubado por 30 min na ausência (100 % DPPH) e na presença das diferentes frações, nas concentrações indicadas na Figura. A análise espectrofotométrica foi realizada à 515 nm. O resultado está expresso pela média \pm DP (n = 3).

Na figura 28 estão representados os dados referentes a reatividade das frações FAE e FBU de acículas, grimpas e ramos da *A.angustifolia* com o radical DPPH para efeito comparativo.

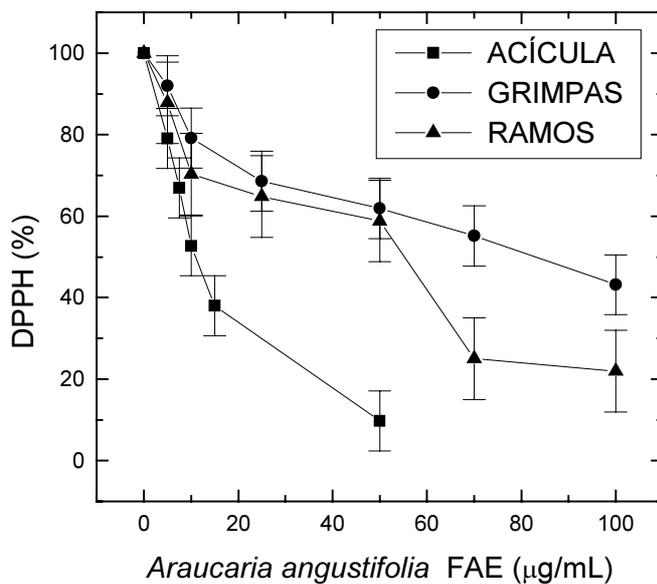
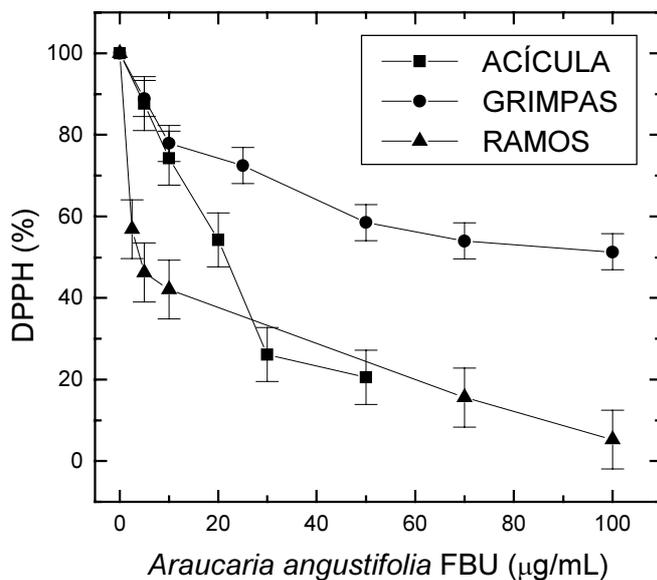


Figura 28: Efeito comparativo das frações FBU e FAE de acículas, grimpas e ramos da *A. angustifolia* sobre o radical livre DPPH

O radical DPPH foi incubado por 30 min na ausência (100 % DPPH) e na presença das frações FAE e FBU de acículas, grimpas e ramos, nas concentrações indicadas na Figura. A análise espectrofotométrica foi realizada à 515 nm. O resultado está expresso pela média \pm DP (n = 3).

A comparação dos resultados obtidos com as frações FAE e FBU de acículas, grimpas e ramos da *A. angustifolia* estão sumarizados na tabela 5. Pode-se constatar que as frações originadas das acículas apresentaram uma maior reatividade com o radical DPPH[•]. No entanto, as frações originadas das grimpas e ramos também apresentaram reatividade com o radical DPPH[•], sendo que todas as IC₅₀ foram menores que 100 µg/mL. A ordem crescente de reatividade foi: FBU G > FAE G > FAE R > FBU A > FAE A > FBUR.

Tabela 5: Tabela comparativa das IC₅₀ das frações FAE e FBU de acículas (A), grimpas (G) e ramos (R) da *A. angustifolia* com o radical DPPH. O resultado está expresso pela média ± DP (n= 3).

FRAÇÕES	IC ₅₀ (µg/mL)
FBU A	20,11 ± 6,62
FAE A	11,60 ± 5,20
FBU R	5,62 ± 0,30
FAE R	43,61 ± 5,20
FBU G	77,02 ± 4,42
FAE G	74,9 ± 3,20

8.3.2. Análise da ação da *Araucaria angustifolia* de acícula, grimpas e ramos frente à Peroxidação Lipídica

As frações FAE e FBU de acículas, grimpas e ramos da *A. angustifolia* foram testadas em relação à capacidade de proteção antioxidante contra a LPO em MC induzida pelo radical ASC[•]. Os resultados estão apresentados na figura 29. Observa-se que quando aumenta-se as concentrações da fração (figura 29 A), na faixa de 10- 300 µg/mL, a LPO diminuiu de modo significativo e o efeito protetor ocorreu na seguinte ordem: FAE A > FAE G > FAE R.

E a LPO também diminuiu significativamente com a fração FBU (figura 29 B), na faixa de 10- 500 $\mu\text{g/mL}$, sendo que a fração derivada das acículas, novamente foi a mais potente. A ordem de proteção da LPO foi: FBU A > FBU G > FBU R).

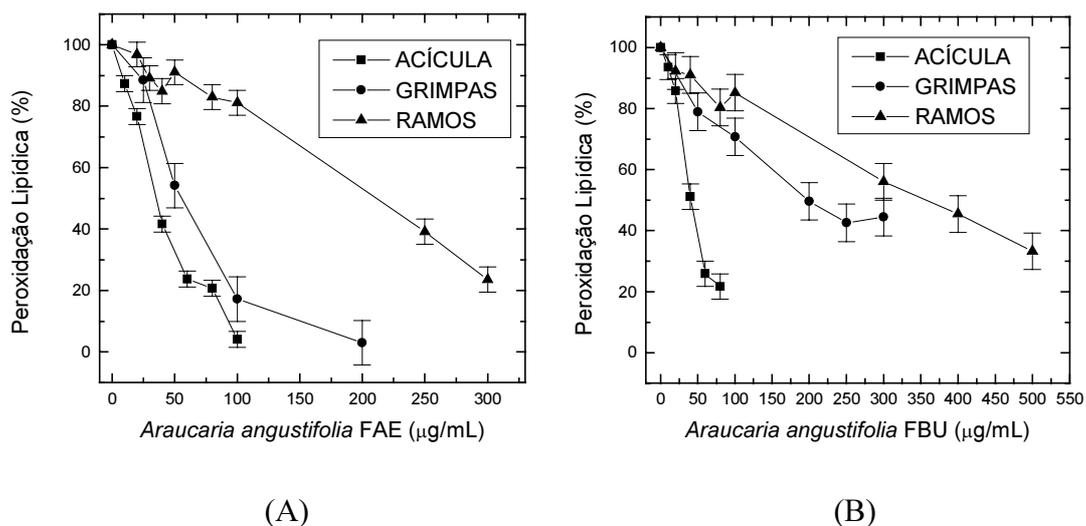


Figura 29: Efeito das frações FAE (A) e FBU (B) das acículas, grimpas e ramos da *A. angustifolia* na LPO induzidas pelo radical ASC^\bullet em MC
O resultado está expresso pela média \pm DP (n= 5).

Na tabela 6 estão sumarizadas as IC_{50} obtidas com as frações FAE e FBU das acículas, grimpas e ramos da *A. angustifolia* em MC sobre a LPO induzidas pelo radical ASC^\bullet , onde pode-se avaliar que as frações FAE e FBU das acículas apresentaram um maior efeito protetor, seguido das grimpas e ramos, conforme curvas dose-resposta obtidas na figura 29.

Tabela 6: Tabela comparativa das IC_{50} das frações FAE e FBU de acículas, grimpas e ramos da *A. angustifolia* na LPO induzida pelo radical ASC^{\bullet} em MC. O resultado está expresso pela média \pm DP (n = 5).

FRAÇÕES	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
FBU A	$40,03 \pm 4,12$
FAE A	$33,35 \pm 2,62$
FBU R	$346,86 \pm 5,98$
FAE R	$204,45 \pm 5,01$
FBU G	$201,83 \pm 6,16$
FAE G	$53,33 \pm 5,30$

A figura 30 mostra a LPO induzida pelo radical ASC^{\bullet} em lipossomas de ASO. Consta-se que as duas frações apresentaram um efeito protetor na LPO induzida pelo radical ASC^{\bullet} em lipossomas de ASO sendo que o maior efeito observado com a fração FAE A.

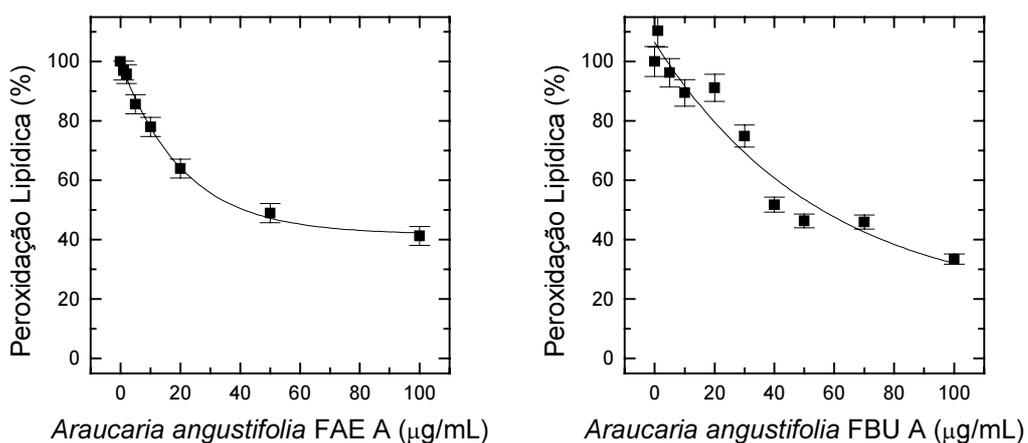


Figura 30 : Efeito das frações FAE e FBU das acículas da *A. angustifolia* contra a LPO em lipossomas de ASO induzida pelo radical ASC^{\bullet}

O radical ASC^{\bullet} foi gerado pelo sistema Fe^{+2} / ácido ascórbico. A concentração de fosfolípidos foi mantida em 2,5 mg/mL. O resultado está expresso pela média \pm DP (n= 3).

É interessante observar que as frações FAE A e FBU A das acículas da *A. angustifolia* protegeram contra a ação de EROs nos dois tipos de membranas preparados: os MC (membranas com defesas antioxidantes endógenas), e os lipossomas de ASO (membranas artificiais com três fosfolipídeos, PC, PE e PI).

Verifica-se que as frações derivadas de grimpas e ramos embora com menor reatividade, poderiam ser utilizadas ainda como fonte de moléculas úteis.

8.3.3. Análise da ação da *Araucaria angustifolia* sobre enzimas pró-oxidantes

Atividade da Xantina Oxidase

A figura 31 mostra o efeito das diferentes frações da *A. angustifolia* das acículas na atividade da enzima X.O., nas concentrações indicadas. A XO foi incubada durante 60 segundos na ausência (controle) e na presença das diferentes frações, nas concentrações de FEP em 160 $\mu\text{g/mL}$, FDM em 170 $\mu\text{g/mL}$, Faq em 12,5 $\mu\text{g/mL}$, FAE em 10,0 $\mu\text{g/mL}$, FBU em 20 $\mu\text{g/mL}$ e Ep/H₂O em 30,0 $\mu\text{g/mL}$ e o extrato EBHA em 50 $\mu\text{g/mL}$. As concentrações utilizadas foram as IC₅₀ do monitoramento do radical DPPH.

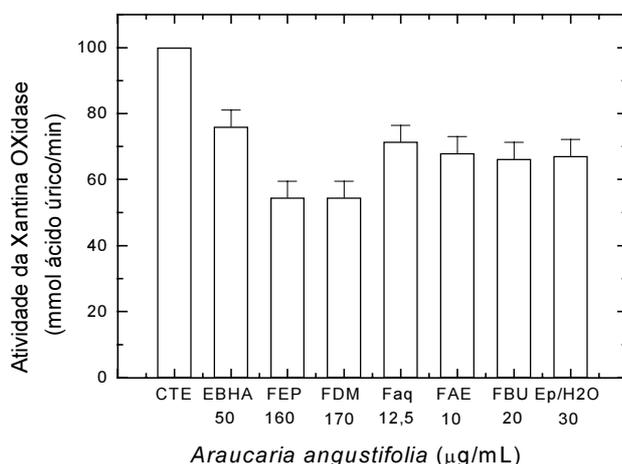


Figura 31: Efeito das frações EBHA A, Ep/H₂O A, FEP A, FDM A, Faq A, FAE A e FBU A de acículas da *A. angustifolia* na atividade da X.O.

A atividade da enzima XO foi medida pela detecção espectrofotométrica do ácido úrico a 295 nm, na ausência (controle) e na presença das diferentes frações nas concentrações indicadas na figura. A atividade foi calculada em mmol de ácido úrico/min. O resultado foi expresso pela média \pm DP (n= 3).

Nas frações FAE A e FBU A foram realizadas curvas de dose-resposta apresentadas na figura 32. A XO foi incubada durante 60 segundos na ausência e na presença das frações FAE A e FBU A. As concentrações utilizadas na fração FAE A foram: 50, 100, 150 e 200 $\mu\text{g/mL}$. E as concentrações utilizadas na fração FBU A foram: 5, 10, 20, 30, 60 e 200 $\mu\text{g/mL}$.

O método de avaliação da atividade da enzima XO foi realizado pela oxidação da xantina à superóxido e ácido úrico, conforme demonstrado no item 6.3. A fração FBU A não atingiu $K_{0,5}$, inibindo somente 34,26 %, quando utilizou-se a concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, mostrando baixa reatividade por esta enzima. A fração FAE A atingiu $K_{0,5}$ numa concentração de 115,25 $\mu\text{g/mL}$, conforme pode-se verificar pela figura 32, mostrando potencial como inibidor desta enzima.

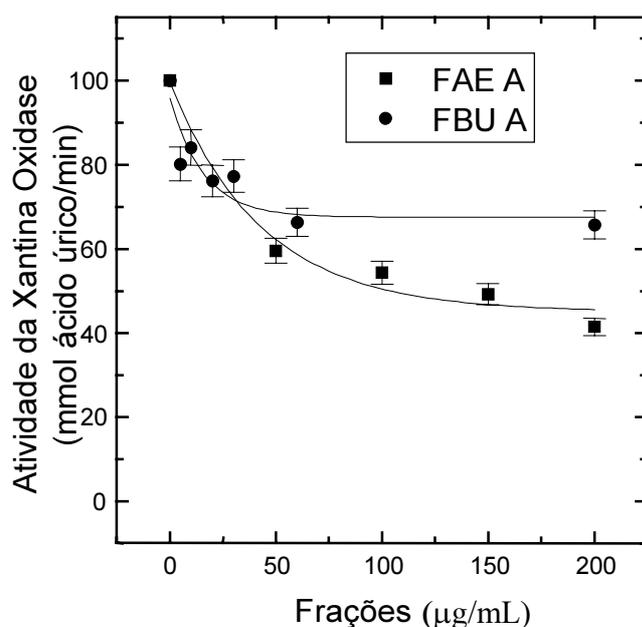


Figura 32: Efeito das frações FAE e FBU das acículas da *A. angustifolia* na atividade da X.O.

A atividade da enzima XO foi medida pela detecção espectrofotométrica do ácido úrico a 295 nm na ausência (controle) e na presença das frações da *A. angustifolia* das acículas nas concentrações indicadas na Figura. A atividade foi calculada em mmol de ácido úrico/min. O resultado foi expresso pela média \pm DP (n= 3).

A principal função da enzima XO é catalisar a oxidação da hipoxantina e xantina a ácido úrico e conseqüentemente produzir o radical superóxido. Inibidores da atividade desta

enzima são conhecidos como antioxidantes pois previnem a produção de muitas moléculas deletérias. O ácido úrico é encontrado no organismo na forma de urato, com propriedades antioxidantes. No entanto, apresenta baixa solubilidade em água, o que leva a sua cristalização, provocando a inflamação nas articulações, características da doença gota. O radical ânion superóxido, por sua vez, pode causar a formação do radical hidroxil, molécula altamente reativa, conforme já mencionado na introdução no item 2.1.1.3. Embora as frações testadas apresentaram baixa capacidade de inibição desta enzima, esta característica, somada à reatividade com algumas EROs e à ação protetora contra a LPO, pode ser um efeito importante no estudo de novos fármacos no futuro.

8.4. Avaliação do potencial antioxidante da *Baccharis*

A análise dos extratos das quatro espécies do gênero *Baccharis* será abordado juntamente no intuito de facilitar a discussão dos resultados obtidos.

- *Baccharis articulata*- extrato aquoso e etanólico (BAA, BAE)
- *Baccharis trimera*- extrato aquoso e etanólico (BTA, BTE)
- *Baccharis spicata*- extrato aquoso e etanólico (BSA, BSE)
- *Baccharis usterii*- extrato aquoso e etanólico (BUA, BUE)

8.4.1. Monitoramento do radical DPPH

Na figura 33 estão representados os resultados experimentais sobre a reatividade dos extratos aquosos e etanólico das espécies listadas acima frente ao radical DPPH nas concentrações indicadas na figura. Como pode-se observar, as quatro espécies do gênero *Baccharis* apresentaram reatividade com o radical DPPH.

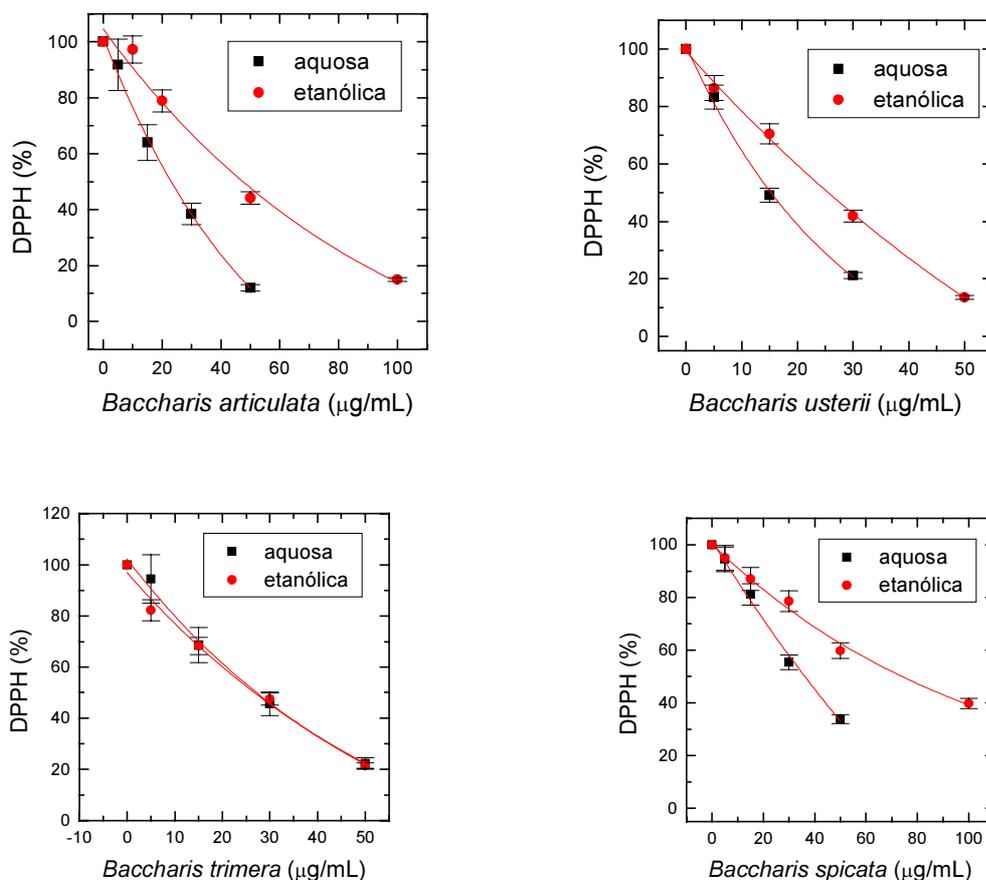


Figura 33: Efeito da *Baccharis articulata* (extrato aquoso e etanólico), *Baccharis usterii* (extrato aquoso e etanólico), *Baccharis trimera* (extrato aquoso e etanólico) e *Baccharis spicata* (extrato aquoso e etanólico) sobre o radical livre DPPH

O radical DPPH foi incubado por 30 min na ausência (100 % DPPH) e na presença das diferentes espécies, nas concentrações indicadas na Figura. A análise espectrofotométrica foi realizada a 515 nm. O resultado está expresso pela média \pm DP (n = 3).

Pode-se observar pela figura 33 e tabela 7 que a espécie BU (extrato aquoso e etanólico) apresentou a maior reatividade frente ao radical DPPH, mostrando um potencial antioxidante mais baixo. No entanto, todos os extratos são potentes pois as IC_{50} são menores que 100 μ M.

Pode-se observar pelas IC_{50} sumarizadas na tabela 7, que a ordem crescente de reatividade frente ao radical DPPH é: BSE > BAE > BSA > BTA \cong BTE > BAA \cong BUE > BUA.

Tabela 7: Tabela comparativa das IC₅₀ dos extratos BAA, BAE, BTA, BTE, BSA, BSE, BUA e BUE representando a reatividade com o DPPH.

O resultado está expresso pela média \pm DP (n= 3).

EXTRATOS	DPPH
BAA	26,0 \pm 2,0
BAE	54,0 \pm 5,0
BTA	30,0 \pm 1,0
BTE	29,0 \pm 2,0
BSA	36,0 \pm 4,0
BSE	78,0 \pm 4,0
BUA	18,0 \pm 3,0
BUE	27,0 \pm 3,0

A = aquoso E = etanólico

8.4.2. Análise do gênero *Baccharis* frente à Peroxidação Lipídica

A figura 34 representa a ação dos extratos aquosos e etanólico das quatro espécies do gênero *Baccharis* frente a LPO induzida pelo radical ASC[•] em lipossomas de ASO. As concentrações variaram entre 10 e 300 μ g/mL, conforme as curvas dose-resposta mostradas. Pode-se observar que todas as espécies protegem contra a LPO nas condições mencionadas.

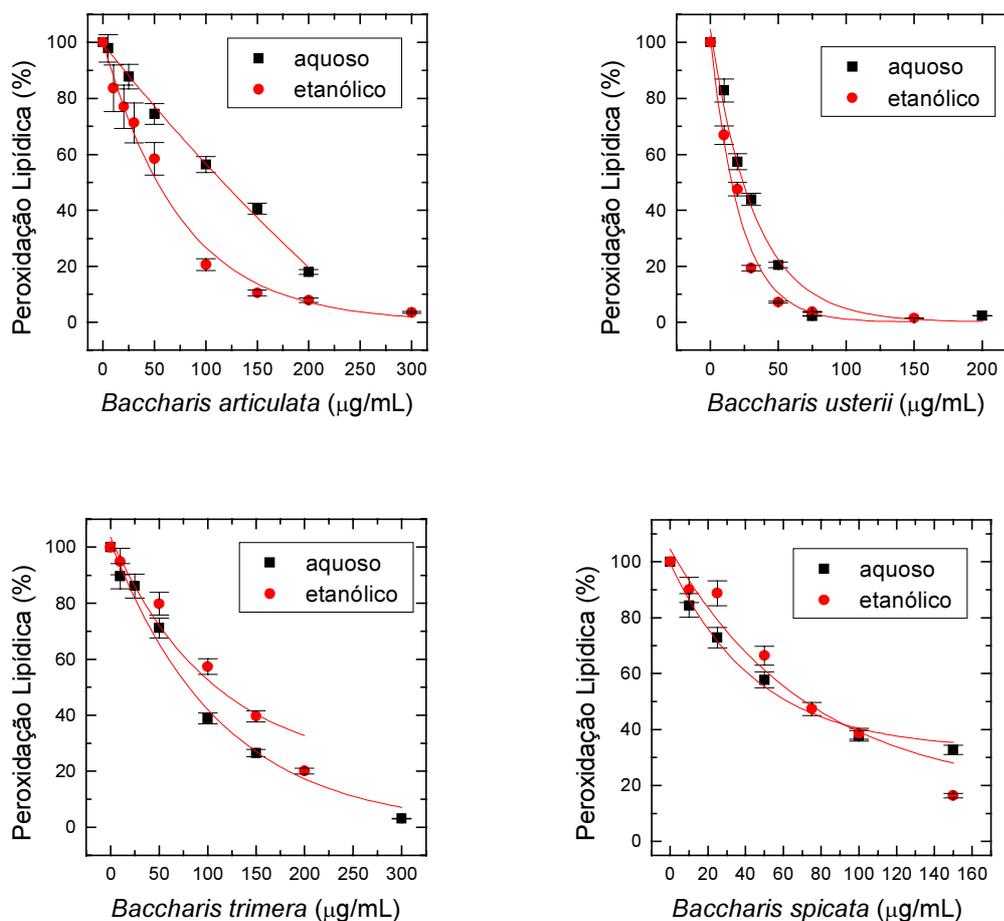


Figura 34: Efeito da *Baccharis articulata* (extrato aquoso e etanólico), *Baccharis usterii* (extrato aquoso e etanólico), *Baccharis trimera* (extrato aquoso e etanólico) e *Baccharis spicata* (extrato aquoso e etanólico) contra a LPO em lipossomas de ASO induzida pelo radical ASC^\bullet . O radical ASC^\bullet foi gerado pelo sistema Fe^{+2} / ácido ascórbico. A concentração de fosfolipídeos foi mantida em 2,5 mg/mL. O resultado está expresso pela média \pm DP (n= 3).

A figura 35 mostra o efeito dos extratos BAA, BAE, BTA, BTE, BSA, BSE, BUA e BUE do gênero *Baccharis* contra a LPO em MC induzida pelo radical ASC^\bullet . As concentrações variaram de 10 a 400 $\mu\text{g/mL}$ conforme curvas de dose-resposta dependentes.

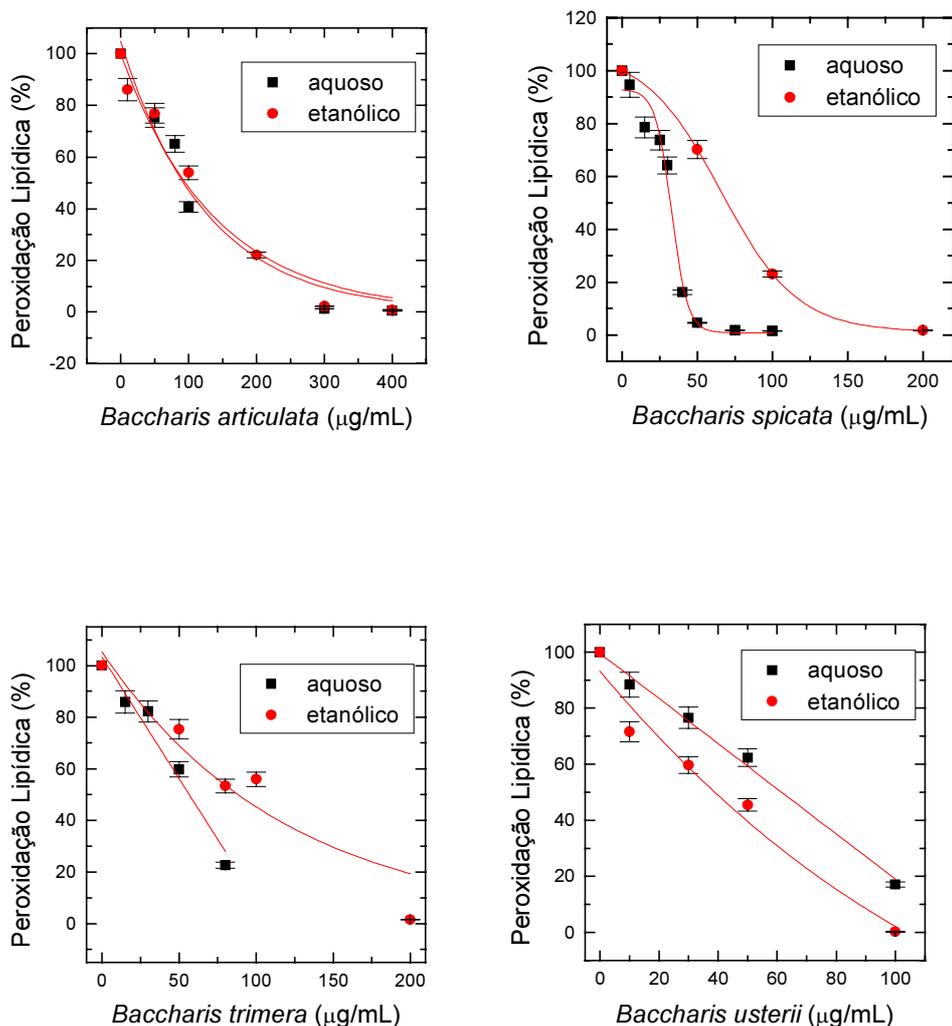


Figura 35: Efeito da *Baccharis articulata* (extrato aquoso e etanólico), *Baccharis usterii* (extrato aquoso e etanólico), *Baccharis trimera* (extrato aquoso e etanólico) e *Baccharis spicata* (extrato aquoso e etanólico) contra a LPO em MC de fígados de ratos induzida pelo radical ASC•

O radical ASC• foi gerado pelo sistema Fe^{+2} / ácido ascórbico. O resultado está expresso pela média \pm DP (n= 3).

A tabela 8 sumariza as IC_{50} dos extratos estudados contra a LPO induzida pelo radical ASC• em lipossomas de ASO e MC.

Pode-se observar pela tabela 8 que todas as espécies estudadas do gênero *Baccharis* apresentam um efeito protetor na LPO induzida pelo radical ASC• em lipossomas de ASO e em MC, sendo que a espécie que apresentou o maior efeito protetor foi a *Baccharis usterii*.

Tabela 8: Tabela comparativa das IC₅₀ das espécies BAA, BAE, BTA, BTE, BSA, BSE, BUA e BUE do gênero *Baccharis* contra a LPO em lipossomas de ASO e MC induzida pelo radical ASC[•].

ESPÉCIES	LIPOSSOMA (ASO)	MICROSSOMAS
BAA	118,0 ± 5,0	95,0 ± 10,0
BAE	60,0 ± 7,0	130,0 ± 5,0
BTA	85,0 ± 3,0	59,0 ± 4,0
BTE	122,0 ± 5,0	81,0 ± 8,0
BSA	61,0 ± 5,0	32,34 ± 5,0
BSE	78,0 ± 8,0	68,93 ± 3,0
BUA	24,0 ± 1,0	60,57 ± 2,0
BUE	18,0 ± 2,0	34,46 ± 2,0

Os extratos aquosos, de uma maneira geral, apresentaram um efeito protetor na LPO maior do que os extratos etanólicos, o que pode ser benéfico na sua utilização como um novo fármaco. Os solventes orgânicos, de uma maneira geral, interferem neste processo, pois também possuem a habilidade de seqüestrar espécies reativas.

Considerando a composição química dos lipossomas de ASO, uma mistura de três fosfolípídeos, incluindo fosfatidilinositol fosfato, formam uma barreira eletrostática, em que os lipídeos e os radicais, ambos carregados negativamente, aumentam as forças de repulsão entre radicais, antioxidantes e lipídeos. Estudos cinéticos com trolox, um antioxidante solúvel em água, indicaram que a repulsão eletrostática dentro da superfície e as cargas de antioxidantes têm uma função importante na ação dos mesmos para capturar radicais peroxil, que estão envolvidos no processo de LPO¹³².

8.4.3. Viabilidade celular

As quatro espécies de *Baccharis* não apresentaram citotoxicidade celular nas concentrações estudadas, conforme figura 36, pode-se observar que a percentagem de sobrevivência celular foi similar ao controle. As concentrações utilizadas no ensaio foram: BAA e BAE = 200 µg/mL; BTA e BTE = 150 µg/mL; BSA e BSE = 100 µg/mL; BUA e BUE = 150 µg/mL.

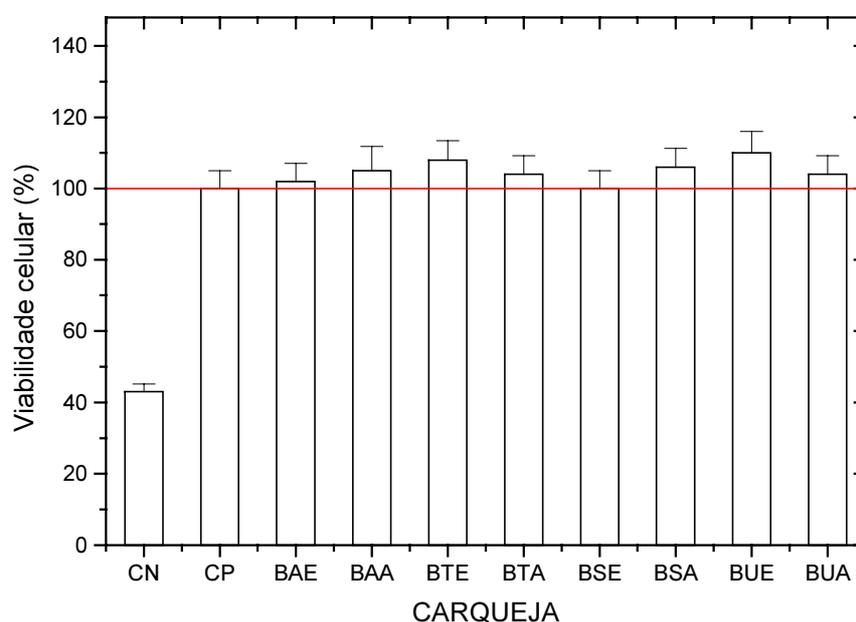


Figura 36: Avaliação da citotoxicidade celular das diferentes espécies da *Baccharis* pelo método de redução do MTT. CN = controle negativo, TCA 10 %; CP = controle positivo = 100 % de viabilidade celular. As concentrações utilizadas foram: BAA e BAE = 200 µg/mL; BTA e BTE = 150 µg/mL; BSA e BSE = 100 µg/mL; BUA e BUE = 150 µg/mL

9. CONCLUSÕES

9.1. *Bauhinia forficata* – canferol-3,7-O-(α)-diramnosídeo

- ♣ Significativo potencial antioxidante frente ao radical DPPH;
- ♣ Capacidade de proteção antioxidante contra o dano lipoperoxidativo induzido pelo radical ascorbil em membranas artificiais, constituídas por lipossomas de fosfatidilcolina;
- ♣ Capacidade de proteção antioxidante contra o dano lipoperoxidativo induzido pelo radical ascorbil em membranas artificiais, constituídas por lipossomas de asolecetina;
- ♣ Capacidade de proteção antioxidante contra o dano lipoperoxidativo induzido pelo radical ascorbil e hidroxil em membranas naturais de microsomas de fígados de ratos;
- ♣ Forte inibição da atividade da enzima pró-oxidante mieloperoxidase;
- ♣ Incorporação de 45,8 % do canf-1 em lipossomas de fosfatidilcolina;
- ♣ No estudo comparativo entre o canf-1 não incorporado e incorporado dos níveis glicêmicos, houve uma redução significativa, resultado da Tese de Mestrado de Ana Paula Jorge¹³⁰;
- ♣ Todos os parâmetros foram obtidos na faixa de concentração de μM .

A administração do canf-1, como um novo potencial farmacológico, aliada à proteção contra o dano lipoperoxidativo, pode ter propriedades benéficas ao ser humano no futuro, em patógeneses como a diabetes e eventualmente em outras patologias onde o estresse oxidativo é comprovado.

9.2. *Cyathea phalerata*– canferol-3-O- α -L-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosí-deo

- ♣ Potencial antioxidante frente ao radical DPPH 2,5 vezes maior que o canf-1, entretanto na faixa μM ;
- ♣ Efeito similar ao canf-1 frente ao dano lipoperoxidativo induzido pelo radical ascorbil em lipossomas de fosfatidilcolina e asolecetina e microsomas de fígados de ratos;
- ♣ Parâmetros obtidos na faixa de concentração de μM .

Pode ser benéfico ao ser humano, como um novo potencial farmacológico, para estudos visando o desenvolvimento como um novo fármaco, uma vez que, em concentrações plasmáticas, faixas maiores são difíceis de serem alcançadas.

9.3. *Araucaria. angustifolia* O (Bertz) - acículas, grimpas e ramos

♣ Extrato EBHA (extrato bruto hidroalcoólico) e as frações FEP (fração éter de petróleo), FDM (fração diclorometano), FAE (fração acetato de etila), FBU (fração n-butanólica) e Faq (fração aquosa) e Ep/H₂O (fração do precipitado éter de petróleo e água) originadas das acículas com potencial antioxidante frente ao radical DPPH;

♣ Frações originadas das acículas com reatividade frente à enzima pró-antioxidante mieloperoxidase, inibindo-a de maneira significativa.

9.3.1. Estudo comparativo das frações FAE e FBU originadas de acículas, grimpas e ramos da *Araucaria angustifolia*

♣ Frações das acículas com potencial antioxidante maior frente ao radical DPPH, seguidas dos ramos e grimpas.

♣ Fração FBU de ramos com um significativo potencial DPPH numa concentração muito baixa. Este resultado pode ser um bom indicativo de uma futura utilização como novo potencial farmacológico, uma vez que, normalmente, essa fração é descartada.

Paralelamente, os resultados obtidos com o radical DPPH também permitem concluir que, se compararmos as frações extraídas com os solventes acetato de etila e n-butanol, a fração FAE teve um maior potencial antioxidante frente a este radical do que a fração FBU.

♣ Frações das acículas, grimpas e ramos com capacidade de proteção antioxidante contra o dano lipoperoxidativo induzido pelo radical ascorbil em microsomas de fígados de ratos. A ordem de efeito de proteção foi: acículas, grimpas e ramos.

♣ Frações de grimpas e ramos com bons resultados contra a ação de EROs, sendo estes na faixa µg/mL.

De maneira similar, se comparadas as frações FAE e FBU das acículas, grimpas e ramos. A fração FAE novamente apresentou maior efeito protetor contra o dano na peroxidação lipídica induzida pelo radical ascorbil em microsomas de fígado de rato.

- ♣ Frações originadas das acículas da FAE e FBU com capacidade de proteção antioxidante contra o dano lipoperoxidativo induzido pelo radical ascorbil em lipossomas de asolecitina, a fração FAE com um efeito de proteção maior do que a fração FBU.

- ♣ Fração FAE das acículas com um efeito de proteção maior do que a fração FBU em todos os parâmetros avaliados.

- ♣ Fração FAE das acículas com uma inibição da atividade da enzima xantina oxidase. Essa fração pode ser benéfica, como um novo potencial farmacológico em patógeneses como a isquemia e aterosclerose, em que ocorre uma superprodução de ânion superóxido.

- ♣ Parâmetros obtidos na faixa $\mu\text{g/mL}$.

A utilização das frações FAE e FBU originadas das grimpas e ramos podem ser promissoras como fontes de novos potenciais farmacológicos, com potencial antioxidante, uma vez que essas partes da planta são normalmente descartadas. Podem constituir uma fonte alternativa útil, em países onde a utilização de novos fitoterápicos sejam necessárias e os recursos financeiros sejam escassos.

9.4. *Baccharis*

- ♣ Quatro espécies do gênero *Baccharis* com reatividade frente ao radical DPPH, sendo potentes antioxidantes. Os resultados obtidos foram na faixa de $\mu\text{g/mL}$. A *Baccharis usterii* (extrato aquoso e etanólico) com um maior potencial antioxidante frente ao radical DPPH.

- ♣ Efeito protetor contra o dano lipoperoxidativo induzido pelo radical ascorbil em lipossomas de asolecitina e microsomas de fígados de ratos.

- ♣ Sem citotoxicidade celular nas concentrações testadas.

De maneira geral, os extratos aquosos apresentaram um efeito de proteção maior do que os extratos etanólicos. Esse resultado pode ser vantajoso como um novo potencial farmacológico, já que existe grande interferência de solvente orgânico na ação de sequestrar EROs.

10. PERSPECTIVAS

Ao finalizar o presente trabalho, torna-se necessário examinar a trajetória percorrida e o ponto de chegada. Tal retrospectiva, no sentido de retomar os objetivos propostos e a amplitude do horizonte no qual se inscrevem, faz emergir um misto de exclamação e juízo de valor. Afinal, de que serviriam todos os saberes parciais sobre os achados encontrados nesta pesquisa, senão para formar uma configuração que subsidie propostas de ação que fortaleçam a competência dos avanços científicos do século XXI ?

O estudo do potencial antioxidante destas quatro plantas permitiu avaliar a capacidade protetora contra a ação de EROs e verificar a capacidade de inibir a atividade de enzimas pró-oxidantes como a mieloperoxidase e a xantina oxidase. A utilização destas novas moléculas como fonte de novos fármacos pode levar à cura de doenças como a diabetes, a isquemia, a aterosclerose, o Mal de Alzheimer, e muitas outras patologias, onde o estresse oxidativo seja evidente. Neste sentido faz-se necessárias maiores investigações.

De maneira geral, pode-se fazer:

- ♣ Estudos complementares com os compostos isolados, frações ou extratos com outros sistemas de solventes, minimizando a influência dos mesmos, na atividade de enzimas pró-oxidantes como a n-NOS e a xantina oxidase;

- ♣ Avaliação da ação como seqüestradores de outras EROs e ERNs, como radical $\cdot\text{OH}$ e ONOO^- ,

- ♣ Avaliação da sobrevivência celular, através do ensaio de citotoxicidade celular.

- ♣ Avaliação do efeito genérico em animais, experimentos *in vivo*.

- ◆ Na etapa de incorporação do canf-1 em lipossomas de fosfatidilcolina, poderão ser realizadas outras técnicas de incorporação, e compará-las com os resultados obtidos nesta tese, no tratamento da diabetes:

- i. microincorporação- onde a cinética de liberação do composto e a caracterização da distribuição composto na membrana poderão ser estudadas, em diferentes concentrações de canf-1;
- ii. modificações de lipossomas com surfactantes como o polietilenoglicol (PEG),
- iii. utilização do método de extrusão na preparação de lipossomas com o canf-1 incorporado,

- iv. utilização de agentes indutores de carga negativa como o ácido fosfatídico, com o objetivo de aumentar a repulsão eletrostática das vesículas aumentando a estabilidade de agregação,
- iv. utilização da técnica de DSC na análise do comportamento de interação canf-1 e membranas artificiais de fosfatidilcolina.

◆ Na comparação entre os dois canferóis, poderão ser realizados outros estudos complementares sobre a relação estrutura-reatividade.

Enfim, de que serviriam todos estes achados se não houver uma perspectiva de que todos os saberes, um dia, futuramente, estarão integrados a várias áreas do conhecimento e as contemporâneas formas de tratá-los, configurando um novo modelo paradigmático de interações interdisciplinares?

11. REFERÊNCIAS

- 1 LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L. and COX, M.M. **Principles of Biochemistry**. 2rd Edition. New York; Worth Publishers Inc; 1993.
- 2 JONES, D.P. Renal metabolism during normoxia, hypoxia, and ischemic injury. *Ann. Ver. of Physiol.* **48**: 33-50; 1986.
- 3 THOMAS, C.E. and KAKYANARAMAN, B. **Oxygen Radicals and the Disease Process**. Edited by Craing E. Thomas and Balaraman Kakyanaraman; USA; 1997.
- 4 TAKAHASHI, M.; SHIBATA, M.; NIKI, Estimation of lipid peroxidation of live cells using a fluorescent probe, diphenyl-1-pyrenylphosphine. *Free Radical Biology & Medicine*. **31**(2): 164-174; 2001.
- 5 STEGHENS, J.-P.; KAPPEL. A.L.; DENIS, I.; COLLOMBEL, C. Diaminonaphtalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde In human plasma or serum. *Free Radical Biology & Medicine*. **31** (2): 242-249; 2001.
- 6 BOVERIS, A.; CADENAS, E. Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. In: CLERCH, L.B.; MASSARO, D.J. *Oxygen, Gene Expression and Cellular Function*. New York; Marcel Decker Inc.; 1-25; 1997.
- 7 JOSEPHY, P.D. **Molecular Toxicology**. Oxford; Oxford University Press; 1997.
- 8 SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress and defense mechanisms in plants: introduction. *Free Radical Biology & Medicine*. **23** (3): 471-2; 1997.
- 9 FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Ver. Ass. Med. Brasil*. **43**(1): 61-8; 1997.
- 10 HALLIWELL, B. Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry, and Role in Human Disease. *The Amer. J. of Med.* **91** (suppl 3C): 3C-22S; 1991.
- 11 VÁSQUEZ-VIVAR, J.; WHITSETT, J.; MARTÁSEK, P.; HOGG, N.; KALYANARARAMAN, B. Reaction of tetrahydrobioterin with superoxide: EPR-

- Kinetic analyses and Characterization of the Pteridine radical. *Free Radical Biology & Medicine*. **31** (8): 975-985; 2001.
- 12 DEL MAESTRO, R. Uma abordagem aos Radicais livres em Medicina e Biologia. *Acta Physiol Scand.* (suppl.492): 153-168; 1980.
- 13 VON SONNTAG, C. **The Chemical Basis of Radiation Biology**. Taylor & Francis; London; 1987.
- 14 BILLMEYER, F.W. **Textbook of Polymer Science**. 3rd. New York; John Wiley & Sons; 1984.
- 15 SCOTT G. Potencial toxicological problems associated with antioxidants in plastic and rubber consumables. *Free Radic Res Commun*. **5**: 141-147; 1988.
- 16 ALLINGER, N.L. **Química Orgânica**. 2^{ed}. Rio de Janeiro; Editora Guanabara; 1978.
- 17 CRISTAL, R.G. Introduction. *The Amer. J. of Med.* **91**(suppl 3C): 3C-13S; 1991.
- 18 GUTTERIDGE, J.M.C. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico-Biological Interactions*. **91**:133-140; 1994.
- 19 HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals In Biology And Medicine**. 3rd edition. New York; Oxford University Press; 2000.
- 20 BAST, A.; HAENEN, G.R.M.M.; DOELMAN, C.J.A. Oxidants and antioxidants: State of the Art. *The Amer. Journal of Medicine*. **91**(suppl 3C): 3C- 13C; 1991.
- 21 BERGENDI, L.; BENES, L.; DURACKOVA, Z.; FERENCICK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sciences*. **65** (18/19): 1865-1874; 1999.
- 22 COHEN, G. The generation of hydroxyl radicals in biologic systems: Toxicological aspects. *Photochemistry and Photobiology*. **28**: 669-675; 1978.
- 23 KLEINVELD, H. A.; SWAAGA, J.G.; HACK, C.E. Interactions between oxygen free radicals and proteins. Implications for rheumatoid arthritis. An overview. *Scand. J. of Rheumatol*. **18**:. 341-52,1989.
- 24 DUNFORD, H.B. Oxidations of iron (II)/(III) by hydrogen peroxide: from aquo to enzyme. *Coordination Chemistry Reviews* **233-234**: 311-318; 2002.
- 25 RERUP, C.C. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacology Reviews*. **22**(4): 485-519; 1970.

- 26 KANSKI, J.; AKSENOVA, M.; STOYANOVA, A.; BUTTERFIELD, D.A. Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: structure-activity studies. *The Journal Nutritional Biochem.* **13**: 273-281; 2002.
- 27 KOSHLAND, D.E.Jr. *Science.* **258**: 1861-1865; 1992.
- 28 FRICKER, S.P. Ruthenium, Nitric Oxide and Disease. A novel inorganic chemistry approach to drug design. *Platinum Metals Rev.* **39**(4): 150-159; 1995.
- 29 SUNDBERG, D.K. Chemical messenger systems. In: **Neuroscience In Medicine.** Philadelphia: J.B. Lippincott Company; 403-26; 1995.
- 30 RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. *Farmacologia.* 3^{ed} Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 409-10; 1997.
- 31 AOKI, .E.; TAKEUCHI, I.K.; SHOJI, S. Nitric Oxide: An Attractive Signaling Molecule. *Acta Histochem Cytochem.* **28**(2): 97-106; 1995
- 32 MINISCI, F. Free Radicals in Biology and Environment, *Kluwer Academic Publisher*; 1-27; 1997.
- 33 KNOWLES, R.G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. *The Biochem. Journal.* **298**; 249-58; 1994.
- 34 BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* **87**: 682-5; 1990.
- 35 WOLFF, D.J.; DATTO, G. A. Identification and characterization of a calmodulin-dependent nitric oxide synthase from GH₃ pituitary cells. *The Biochem. Journal.* **285**: 201-6; 1992.
- 36 LOWE, P.N.; SMITH, D.; STAMMERS, D.K.; RIVEROS MORENO, V.; MONCADA, S.; CHARADICAIS LIVRESES, I.; BOYHAN, A. Identification of domains of neuronal nitric oxide synthase by limited proteolysis. *The Biochem. Journal.* **314**: 55-62; 1996.
- 37 RADI, R.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, N.; NAVILIAT, M.; CAYOTA, A. Unraveling peroxynitrite formation in biological Systems. *Free Rad. & Med.* **30**(5): 463-488; 2001.
- 38 QUEIROZ, S.L.; BATISTA, A. ANGUSTIFOLIA Funções biológicas do óxido nítrico. *Química Nova.* **22**(4): 1-18; 1999.
- 39 MARESCA, M.; COLAO, C.; LEONCINI, G. Generation of hydrogen in resting

- and activated platelets. *Cell Biochem. Funct.* **10**: 79-85; 1992
- 40 PRACTTICO, D.; IULIANO, L.; PULCINELLI, F.M.; BONAVIDA, M.S.;
GAZZNIGA, P.P.; VIOLI, F. Hydrogen peroxide triggers activation of human
platelets selectively exposed to non-aggregating concentrations of arachidonic
acid and collagen. *J. Lab. Clin. med.* **119**: 364-370; 1992.
- 41 CANOSO, R.T. ; RODVIEN, R.; SCOON, K.; LEVINE, H. Hydrogen peroxide
and platelet function. *Blood* **43**: 645-656; 1974.
- 42 STUART, M.J.; HOLMSEN, H. Hydrogen peroxide as an inhibitor of platelet
function: effect on adenine nucleotide metabolism, and the release reaction. *Am.
J. Hematol.* **2**: 53-63; 1977.
- 43 SABETKAR, M.; LOW, S.Y.; NASEEM, K.M. ; BRUCKDORFER, R. The
nitration of proteins in platelets: significance in platelet function. *Free Radical
Biology & Medicine.* **33** (6): 728-736; 2002.
- 44 BECKMAN, J.S.; BECKMAN, T.W.; CHEN J.; MARSHALL, P.A.. Apparent
hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury
from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**:1620-1624; 1990.
- 45 SARAN, M.; MICHEL, C.; BORS, W. Reaction of NO^\bullet with $\text{O}_2^{\bullet-}$. Implications
for the action of endothelium-derived relaxing factor (edrf). *Free Rad. Res.
Commun.* **10**: 221-226; 1990.
- 46 STAMBRO, W.O. Modeling the interaction of peroxynitrite with low-density
lipoproteins. I: Plasma levels of peroxynitrite. *J. Theor. Biol.* **205**: 457-464; 2000.
- 47 KLOTZ, L.-O.; SCHROEDER, P.; SIES, H. Peroxynitrite signaling: receptor
tyrosine kinases and activation of stress-responsive pathways. *Free Radical
Biology & Medicine.* **33**(6):737-743; 2002.
- 48 KETTLE AJ, WINTERBOURN CC A Kinetic Analysis of the Catalase Activity
of Myeloperoxidase. *Biochemistry.* **40**: 10204-10212; 2001.
- 49 SAMUNI, A.M.; MICHEL, C.; BORS, W. Reaction of NO^\bullet with $\text{O}_2^{\bullet-}$,
implications for the action of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). *Free
Rad. Res. Commun.* **10**: 221-226; 1990.
- 50 GARDNER, H.W. *J. Agric. Food Chem.* **23**: 129, 1975.
- 51 BUEGE, J.A. & AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods
Enzymol.* **52**: 302-310, 1978.

- 52 MYLONAS, C.; KOURETAS, D. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo*. **13**: 295-310; 1999.
- 53 VANDER, A.J.; SHERMAN, J.H.; LUCIANO, D.S. **Os mecanismos da função de órgãos e sistemas**. Ed. Mcgraw-Hill do Brasil., 1981.
- 54 SAIJA, A.; SCOLLESE, M.; LANZA, M.; MARZULLO, D.; BONINA, F. and CASTELLI, F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radical Biology & Medicine*. **19**(4) :481-486; 1995.
- 55 CASTELLI, F.; TROMBETTA, D.; TOMAIANO, A.; BONINA, F.; ROMEO, GUCCELLA, N.; SAIJA, A. Dipalmitoylphosphatidylcholine/ linoleic acid mixed unilamellar vesicles as model membranes for studies on novel free-radical sequestrators. *J. Pharmacol. Toxicol.* **37**: 135-41; 1997
- 56 SHIBATA, A.; SYUICHI, M.; SATORU, U.; LIU, S.; FUTAKI, S.; BABA, Y. Synthetic copoly(Lys/Phe) and poly(lys) translocate through lipid bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta*. **785**: xxx-xxx; 2003.
- 57 WAGNER, B.A.; BUETTNER, G.R. & BURNS, P.C. . Free Radical-mediated Lipid Peroxidation in cells: Oxidizability is a function of Cell lipid bis-Allylic Hydrogen Content. *Biochem.* **33**: 4449- 4453; 1994.
- 58 CASALINO, E.; SBLANO, C.; LANDRISCINA, C.. A possible mechanism for inhibition of LPO by ascorbate In rat liver microsomes. *Int. J. Biochem. Cell Biol* . **28**: 137-49,1996.
- 59 CLERMONT, G.; LECOUR, S.; CABANNE, J.-P.; MOTTE, G. Vitamin E-coated dialyzer reduces oxidative stress in hemodialysis patients. *Free Radical Biology & Medicine*. **31**(2): 242-249; 2001.
- 60 PODREZ, E.A.; ABU-SOUD, H.M.; HAZEN, S.L. Myeloperoxidase-Generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radical Biology & Medicine*. **28**(12): 1717-1725; 2000.
- 61 TRAVERSO, N.; MENINI, S.; ODETTI, P.; PRONZATO, A.; COTTALASSO, D.; MARINARI, U.M. Diabetes impairs the enzymatic disposal of 4-hydroxynonenal in rat liver. *Free Radical Biology & Medicine*. **32**(4): 350-359; 2002.
- 62 NISHINAKA, T.; YABE-NISHIMURA, C. EGF Receptor- ERK pathway is the major signaling pathway that mediates upregulation of aldose reductase expression under oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*. **31** (2):

- 205-216; 2001.
- 63 KEHRER, J. P. Free Radicals as Mediators of Tissue Injury and Disease. *Critical Reviews in Toxicology*. **23**(1): 21-48; 1993.
- 64 HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. & Therapeutics*. **96**: 67-202; 2002.
- 65 HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure- activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* **13**:572-584; 2002.
- 66 SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento 3^o edição ver. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed.da UFSC, 2001.
- 67 AREIAS, F.M.; REGO, A.C.; OLIVEIRA, C.R.; SEABRA, R.M. Antioxidant effect of flavonoids after ascorbate/ Fe⁺²- induced oxidative stress in cultured retinal cells. *Biochem. Pharmacol.* **62**: 111-118; 2001.
- 68 COS, P.; CALOMME, M.; SINDAMBIWE, J.B.; DE BRUYNE, T.; CIMANGA, K.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J.; BERGHE, D.V. Citotoxicity and Lipid Peroxidation- Inhibiting Activity of Flavonoids. *Planta Medica*. **67**: 515-519; 2001.
- 69 CORNISH, K.M.; WILLIAMSON, G.; SANDERSON, J. Quercetin metabolism in the lens: role In inhibition of hydrogen peroxide induced cataract. *Free Radical Biology & Medicine*. **33**(1): 63-70; 2002.
- 70 SIMÕES *et al.* **Plantas da Medicina Popular do Rio Grande do Sul**. Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1998.
- 71 CECHINEL FILHO, V.; Da SILVA , K.L.; BIAVATTI, M.W.; LEITE, S.N.; YUNES, R.A. Z. *Naturforsch.* **55c**: 478-480; 2000.
- 72 SILVA, F.R.M.B; SZPOGANICZ, B.; PIZZOLATTI, M.G.; WILLRICH, M.A.V.; SOUZA, E. Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* **83**: 33-37; 2002.
- 73 PIZZOLATTI, M.G.; CUNHA Jr., A.; SZPOGANICZ, B.; SOUZA, E. Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae). *Química Nova*. **26** (4): 466-469; 2003.

- 74 CUNHA, P.; VERDI, L.G.; PIZZOLATTI, M. G.; MONACHE, F.D.; Livro De Resumos Da 26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ- 26 a 29 de maio de 2003.
- 75 STAPEL, G.; MENßEN, H. G.; SNATZKE, G. Isolierung und Strukturaufklärung von Zwei Diterpenen aus *Baccharis articulata*. *Planta Medica*, **39**: 366-374; 1980.
- 76 DAI, J.; SUTTISRI, R.; BORDAS, E. *et al.* Clerodane Diterpenoids from *Baccharis articulata*. *Phytochemistry*. **34**: 1087-1090, 1993.
- 77a GIANELLO, J. C.; GIORDANO, O. S. Examen quimico en seis especies del genero *Baccharis*. *Revista Latinoamericana de Química*. **15**: 84-86, 1984.
- 77b De Oliveira, S.Q.; DAL-Pizzol, F.; Gosmann, G.; Guillaume, D.; Moreira, J.C.F.; Schenkel, E.P. Antioxidant Activity of *Baccharis articulata* Extracts: Isolation of a New Compound with Antioxidant Activity. *Free Radical Research*. **37**(5): 555- 559, 2003.
- 78 LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil**. v. 1; Editora Nova Odessa: Plantatarum; 1998.
- 79 FATMA. Cobertura vegetal de Santa Catarina. Cd Rom. Fatma/ CIASC; 1997.
- 80 GEMTCHÚJNICOV, I.D. **Manual de Taxonomia Vegetal: Plantas de Interesse Econômico**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1976.
- 81 CASTRO, M. A.; GORDALIZA, M.; DEL CORRAL, J.M.; SAN FEICIANO, A. The distribution of lignanoids in the Order Coniferae. *Phytochemistry*. **41**(4): 995-1011; 1996.
- 82 OHASHI *et al.* *Phytochemistry* **31**: 1371; 1992.
- 83 FONSECA, G.; NIELSEN, L.T.; RUVEDA, E.A. Lignans of *Araucaria augustifolia* and ¹³C NMR Analisis of Some Phenyltetralin Lignans. *Phytochemistry*. **18**: 1703-1708; 1979.
- 84 SONE, N.; YOSHIDA, M.; HIRATA, H.; KAGAWA, Y. Reconstitution of vesicles capable of energy transformation from phospholipids and adenosine triphosphatase of thermophilic bacterium. *J. Biochem.* **81**: 519-528; 1977.
- 85 CRECZYNSKI-PASA, T.B.; GRÄBER, P. ADP binding and ATP synthesis by reconstituted H⁺-ATPase from chloroplasts. *FEBS Let.* **350**: 195-198, 1994.
- 86 CRECZYNSKI-PASA, T.B.; GRÄBER, P. Phosphatase activity of H⁺-ATPase

- from chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* **1320**: 58-64; 1997.
- 87 CINTI, D.L. SCHENKMAN, J.B. Preparation of microsomes with calcium. *Methods in Enzymology.* **52**: 83-89; 1978.
- 88 KNOWLES, R.G.; MERRET, M.; SALTER, M.; MONCADA, S. Differential induction of brain, lung and liver nitric oxide synthase by endotoxin in the rat. *The Biochemical Journal.* **270**: 833-6; 1990.
- 89 LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry.* **193**: 265-75, 1951.
- 90 RAO TS, YU SS, DJURIC SW, ISAKSON PC. Phorbol ester-induced dermal inflammation in mice: evaluation of inhibitors of 5-lipoxygenase and antagonists of leukotriene B₄ receptor *J. Lipid Mediators Cell Signalling.* **10**: 213-28; 1994
- 91 RADI, R.; BECKMAN, J.S.; BUSH, K.M.; FREEMAN, B.A. Peroxynitrite oxidation of sulphhydryls -the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **266** (7): 4244-50; 1991.
- 92 KU, D.D. Nitric oxide and nitric oxide donor induced relaxation. *Meth. Enzymol.* **269**: 107-19; 1996.
- 93 HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Formation of thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts: the role of superoxide and hydroxyl radicals. *FEBS Letters.* **128**: 347-352; 1981.
- 94 NISHIDA, Y.; YOSHIZAWA, K.; AKAMATSU, T. Preparation of iron (III) complex with nitrilotriacetic acid and origin of its unique reactivity. *Chemistry Letters.* 1521-1524: 1991.
- 95 OHKAWA, H.; OSHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal-tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* **95**(2): 351-358, 1979.
- 96 BIRD, R.P.; DRAPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. *Meth. Enzymol.* **105**: 295-305, 1984.
- 97 VIVOT, E.; MUÑOZ, J.D.; CRUAÑES, M.C.; CRUAÑES, M.J.; TAPIA, A.; HIRSCHMANN, G.S.; MARTÍNEZ, E.; SAPIO, O.D.; GATTUSO, M.; ZACCHINO, S. Inhibitory activity of xanthine-oxidase and superoxide sequestrator properties of *Inga verna* subsp. *affinis*. Its morphological and

- micrographic characteristics. *Journal of Ethnopharmacology*. **76**: 65-71 ; 2001.
- 98 GREEN, L. C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**: 131-138; 1982.
- 99 SZABÓ C, SOUTHAN GJ, THIEMERMANN C and VANE JR, The mechanism of the inhibitory effect of the induction of nitric oxide synthase. *Br. J. Pharmacol.* **11**, 757-766, 1994.
- 100 JACOBSON, S.O. and FOWLER, C.J. Dopamine and glutamate neurotoxicity in cultured chick telencephali cells: effects of NMDA antagonists, antioxidants and MAO inhibitors. *Neurochem. Int.* **34**, 49-62, 1999.
- 101 GROSS, S.S. Microtiter plate assay for determining kinetics of nitric oxide synthesis. *Methods in Enzymol.* **268**, 159-68, 1996.
- 102 ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R.J. Flavonoids are sequestradors of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.* **37**: 837-841; 1998.
- 103 MILLER, D.M. & AUST, S.D. Studies of ascorbate-dependent, iron catalyzes lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **271**: 113-119; 1989.
- 104 FREI, B.; ENGLAND, L.; ARNES, B.N.; Ascorbate is outstanding antioxidant In human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 6377-6381; 1989.
- 105 COMPORTI, M. Glutathione depleting agents and lipid peroxidation. *Chem. and Physics of lipids.* **45**: 143-169; 1987.
- 106 BARCLAY,L.R.C; LOCKE, S.J.; MACNEIL, J.M.; VANKESSEL, J. Autoxidation of micelles and model membranes. Quantitative kinetic measurements can be made by using either water-soluble or lipid-soluble chain-breaking antioxidant. *J. Am. Chem. Soc.* **106**: 2479-2481; 1994.
- 107 KANEKO, T.; KAJI, K.; MATSUO, M. Protection of linoleic acid hydroperoxide-induced cytotoxicity by phenolic antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine.* **16**: 405-409; 1994.
- 108 THOMAS, C. E.; MCLEAN, L. R.; PARKER, R.A. Ascorbate and phenolic antioxidants interactions in prevention of liposomal oxidation. *Lipids* **27**: 543-550; 1992.
- 109 FERRALI, M.; SIGNORINI, C.; CALCIOTTI, B.; SUGHERINI, L.; CICCOLI, L.; GIACHETTI, D. Protection against oxidative damage of erythrocyte membranes by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity.

- FEBS Lett* **416**:123-129; 1197.
- 110 ELLIOTT, A.J.; SCHEIBER, S.A.; THOMAS, C.; PARDINI, R. S. Inhibition of glutathione reductase by flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* **44**: 1603-1608; 1992.
- 111 HIRANO, R.; SASAMOTO, W.; MATSUMOTO, A.; ITAKURA, H.; IGARASHI, O.; KONDO, K. Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* (Tokyo) **47**: 357-362; 2001.
- 112 COS, P.; YING, L.; CALOMME, M.; HU, J.P.; CIMANGA, K.; POEL, B.V.; PIETERS, L.; VLIETNCK, A.J. BERGHE, D.V. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.* **61**: 71-76; 1988.
- 113 HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. Reviews: Current Topics. *J. Nutrit. Biochem.* **13**: 572-584; 2002.
- 114 BURDA, S.; OLESZEK, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 2774-2779; 2001.
- 115 FORMICA, J.V.; REGELSON, W. *Food Cosmet. Technol.* **33**: 1061-1080; 1995.
- 116 IOKU, K.; TSUSHIDA, T.; TAKEI, Y.; NAKATANI, N.; TERAQ, J. *Biochim. Biophys. Acta* **1234**: 99-104; 1995.
- 117 HERRMANN, K. *J. Food Technol.* **11**: 433-448; 1976.
- 118 SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. *J. Nutr.* **130**: 2073s-2085s; 2000.
- 119 MUROTA, K.; SCHIMIZU, S.; CHUJO, H.; MOON, J.-H.; TERAQ, J. *Arch. Biochem. Biophys.* **384**: 391-397; 2000.
- 120 MUROTA, K.; SCHIMIZU, S.; MIYAMOTO, S.; IZUMI, T.; OBATA, A.; KIKUCHI, M.; TERAQ, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism *J.Nutr.* **132**: 1956-1961; 2002.
- 121 MUROTA, K. and TERAQ, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Arc. of Biochem. and Bioph.* **417**:12-17; 2003.
- 122 MOTODIEWA, D.; JAISWAL, A.K.; CENAS, N.; DICKANCAITE, E.; SEGURA-AGULAR, J. *Free Radical Biology & Medicine.* **26**: 107-116; 1999.
- 123 YAMASHITA, N.; TANAMURA, H.; KAWANISHI, S. *Mutat. Res.* **425**: 107-

- 115; 1999.
- 124 YEAGLE, P.L. **The membranes of cells** 2nd edition. California; Academic Press; 1993.
- 125 AHSAN, H.; ALI, A.; ALI, R. Oxygen free radicals and systematic autoimmunity. *Clin. Exp. Immunol.* **130**: 398-404; 2003.
- 126 LEIKIN, A.I; BRENNER, R.R. In vivo cholesterol removal from liver microsomes induces changes in fatty acid desaturase activities. *Biochim. Biophys. Acta.* **963**: 311-319; 1988.
- 127 SHIRES, T.K.; EKREN, T.; HINDERAKER, P.; PITOT, H.C.. Effect of ribosome removal on rough microsomal composition and polysome attachment In vitro: comparison of liver and kidney. . *Biochim. Biophys. Acta.* **374**: 59-75; 1974.
- 128 BETZ, G.; MICHELS, D. Steroid 20-lyase: The effect of detergents on enzymic activity and microsomal composition. *Steroids* **21**: 785-800; 1973.
- 129 MARQUEZ, L. A.; DULFORD, H.B. Kinetics of oxidation of tyrosine and dityrosine by myeloperoxidase compounds I and II. *J.Biol. Chem.* **270**: 434-440; 1996.
- 130 JORGE, A.P. Efeito insulino-mimético do canferol 3,7-o-(a)-l-diramnosídeo na glicemia e na captação da 2-[¹⁴C (u)]-deoxi-d-glicose em músculo sóleo de ratos. Dissertação de Mestrado – UFSC, Florianópolis, 2003.
- 131 OJA, C.D.; SEMPLE, S.C.; CHONN, A.; CULLIS, P.R. Influence of dose on liposome clearance: critical role of blood proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1291**: 31-37; 1996.
- 132 KONG, G.; ANYARAMBHATLA, G.; PETROS, W.P.; BRAUN, R.D.; COLVIN, O.M.; NEEDHAM, D. and DEWHIRST, M.W. Efficacy of liposomes and Hyperthermia in a Human Tumor Xenograft Model: Importance of triggered Drug Release. *Cancer Research* **60**: 6950-6957; 2000.
- 133 TEIXEIRA, A.; MORFIM, P.M.; CORDOVA, C. A. S.; CHARÃO, C.C.T.; LIMA, V.R.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; Melatonin protects against pro-oxidant and reduces lipid peroxidation In distinct membranes induced by hydroxyl and ascorbyl radicals and by peronitrite. *Journal of Pineal Research.* **35**: 1-7; 2003.
- 134 BARCLAY, L.R.C. & VINQUIST, M.R. Membrane peroxidation: Inhibiting

- effects of water-soluble antioxidants on phospholipids of different charge types. *Free Radical Biology & Medicine*. **16**: 779-788; 1994.
- 135 ALMEIDA, M.T.R. Isolamento e identificação de substâncias ativas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze com potencial atividade antiviral. Dissertação de Mestrado do Departamento de Bioquímica- UFSC, Florianópolis, 2002.

12. ANEXO

Artigo intitulado “ Hypoglycemic effect and antioxidant potencial of *kaempferol-3,7-O-(α)-dirhaminoside* from *Bauhinia forficata* leaves” aceito pela revista *Journal of Natural Productos* em janeiro de 2004.

Hypoglycemic effect and antioxidant potential of *kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside* from *Bauhinia forficata* leaves

Eliandra de Sousa^a, Leila Zanatta^a, Ilana Seifriz^a, Tânia Beatriz Creczynski-Pasa^b, Moacir Geraldo Pizzolatti^a, Bruno Szpoganicz^a, Fátima Regina Mena Barreto Silva^{c,*}

^a*Departamento de Química - Centro de Ciências Físicas e Matemáticas;* ^b*Departamento de Ciências Farmacêuticas – Centro de Ciências da Saúde and* ^c*Departamento de Bioquímica - Centro de Ciências Biológicas, Campus Universitário, Bairro Trindade. Cx. Postal 5069, CEP: 88040-970 - Florianópolis, SC, Brazil*

*Corresponding author: e-mail: mena@mbox1.ufsc.br, Tel/Fax: +55-48.331.96.72/+55-48.225.20.79

Abstract

In vivo and *in vitro* treatments were carried out to investigate the effects of *kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside*, a major flavonoid compound of the *n*-butanolic fraction from *Bauhinia forficata* (BF) leaves, on the serum glucose levels, as well as its antioxidant potential. Oral administration of *kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside* led to a significant hypoglycemic effect in normal and in alloxan-induced diabetic rats. In normal rats, blood-glucose lowering was observed only with the higher dose of *kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside* (200 mg/kg) at 1 h after treatment. However, the hypoglycemic effect of *kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside* in diabetic rats was evident at all doses tested (50, 100 and 200 mg/kg) and this profile was maintained throughout the period studied for both higher doses. Additionally, in glucose-fed hyperglycemic normal rats, the *kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside* failed to decrease blood glucose levels. *In vitro* antioxidant properties or action against reactive oxygen species (ROS) of this compound was also evaluated. The compound showed high reactivity with 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH), IC_{50} of $84.0 \pm 7.8 \mu\text{M}$, inhibited myeloperoxidase activity with $K_{0.5} = 86 \pm 9.9 \mu\text{M}$, as well as decreased lipid peroxidation, induced by ascorbyl radical either in microsomes or in asolectin and phosphatidylcholine liposomes, with IC_{50} s of $320 \pm 14.1 \mu\text{M}$, $223 \pm 8.3 \mu\text{M}$ and $112 \pm 8.8 \mu\text{M}$, respectively.

Keywords: *Kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside*; Diabetes; *Bauhinia forficata*; Medicinal plants; Alloxan; Oxidative stress

1. Introduction

Diabetic disease is increasing rapidly and consumes vast amounts of resources in all countries. Both types of diabetes, mellitus and insulin resistance, are complex traits in which multiple gene effects, metabolic and environmental factors combine to contribute to the overall pathogenesis of these conditions. Type 1 diabetes results from β -cell destruction that is generally considered to be a multifactorial autoimmune process [1]. Plants used in folk medicine to treat diabetes mellitus represent a viable alternative for the control of this disease. Thus, the screening of plant compounds for an antidiabetic effect is mandatory.

Bauhinia forficata is one of the *Bauhinia* species most used as an antidiabetic herbal remedy in Brazil. This species is an arboreal plant of Asiatic origin that adapts well to the Brazilian climate [2]. Our earlier studies confirmed the hypoglycemic effect of the *n*-butanolic fraction of *Bauhinia forficata* Link (Leguminosae) (BF) leaves in alloxan-induced diabetic rats [3]. However, in this fraction we have identified four different flavonoid and *kaempferol-3,7-O-(\alpha)*-*dirhamnoside* (Fig. 1), among these, is predominant [4].

Flavonoids are polyphenolic phytochemicals found in almost all types of plants from stems to roots to fruit. In *Bauhinia forficata* Link (Leguminosae), phytochemical and pharmacognostic investigation have demonstrated that *kaempferol-3,7-O-(\alpha)*-*dirhamnoside* is present only in the leaves of BF and absent from other parts of this plant [5]. Most studies have examined the effects of natural flavonoids in physiological and pathological conditions of glucose metabolism [6,7,3] as well as in lipid peroxidation [8,9]. Although not considered nutrients and thus essential for life, flavonoids have gained increasing recognition for their health-related qualities.

The relationship between reactive oxygen species (ROS) and many human diseases is becoming well established. ROS have been implicated in over 200 disorders, including diabetes. It is still uncertain as to whether oxidative stress contributes to the origin of diabetes in humans, however, there is some evidence that in the diabetic or hyperglycemic state the antioxidant defenses are in a vulnerable condition [10].

The present study was carried out to elucidate the acute effect of *kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside* on blood glucose lowering in normal, normal hyperglycemic and alloxan-induced diabetic rats. Also, the *in vitro* antioxidant potential of *kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside* was analyzed by scavenging of free radicals, inhibition of a pro-oxidant enzyme, myeloperoxidase (MPO) and prevention of lipid peroxidation.

2. Methodology

2.1. Drugs

The substances used in this study were purchased from Sigma Chemical Company[®] (St. Louis, MO, USA), except the salts, H₂O₂, and solvents which were purchased from Merck[®] AG, (Darmstadt, Germany); dialysis membrane was obtained from DIANORM GMBH, Munich, Germany.

2.2. Plant material

The leaves of *Bauhinia forficata* Link were collected in Summer 1999 at Orleans, Brazil, and identified by Prof. Daniel de Barcelos Falkenberg. A voucher specimen of the plant (FLOR-31271) has been deposited in the herbarium of the Botany Department at Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

2.3. Extraction and isolation

The air-dried plant material was ground to a powder and extensively extracted with 8:1 ethanol-water by maceration at room temperature. The hydroalcoholic extract was concentrated to the desired level and stored at 4 °C for 24 h, before being filtered to withdraw a waxy residue and an aqueous suspension that was successively extracted with *n*-hexane, CH₂Cl₂, EtOAc and *n*-BuOH. The *n*-BuOH fraction was subjected to column chromatography over silica gel 60, eluting with gradient EtOAc to MeOH, to give three fractions that showed a positive reaction to FeCl₃ on TLC. These fractions were then purified by elution through a further flash column chromatography step over silica gel to give *kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside* as a pale yellow amorphous powder [4].

2.4. Experimental animals

Males Wistar rat (160-190 g) were used. They were bred in our animal facility and housed in an air-conditioned room (approximately 24 °C) with controlled lighting (lights on from 06:00 to 20:00 h). All the animals were maintained with pelleted food (Nuvital, Nuvilab CR1, Curitiba, PR, Brazil) and tap water available *ad libitum*. Fasted animals were deprived of food for at least

16 h but allowed free access to water. All the animals were carefully monitored and maintained in accordance with ethical recommendations of the Brazilian Veterinary Medicine Council and the Brazilian College for Animal Experimentation. Rats fasted for 16 h received 60 mg/kg body weight of alloxan (Sigma, St. Louis, MO, USA) by a single intravenous injection. We assessed the diabetic state by measuring body weight and blood glucose levels at 3 days thereafter.

2.5. *Kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside from Bauhinia forficata in normal rats*

Animals fasted overnight were randomly divided into three groups of six rats: Group I served as control; Group II received the vehicle, 0.5 ml of 1 % ethanol/H₂O, p.o; Group III received *kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside* at the following doses: 50, 100 and 200 mg/kg, p.o. The serum glucose was measured before the animals received the compound and 1, 2 and 3 h subsequent to the treatment.

2.6. *Kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside of Bauhinia forficata in diabetic rats*

Diabetes was induced by a single intravenous injection of 60 mg/kg of alloxan monohydrate (dissolved just before use in 0.9 % NaCl) to overnight fasted rats [3]. A blood glucose range of 450 – 550 mg/dl was used for the experiment. Animals for which development of hyperglycemia was confirmed (around 95 %) 72 h after the alloxan injection were randomized into three groups of six rats: Group I, diabetic rats; Group II diabetic rats that received vehicle (0.5 ml of 1 % ethanol/H₂O, p.o) and Group III, diabetic rats that received the *kaempferol-3,7-O-(α)-*

dirhamnoside at the following doses: 50, 100 and 200 mg/kg, p.o. Serum glucose levels were measured at zero time (before receiving the compound) and 1, 2 and 3 h following the treatment.

2.7. *Kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside and tolbutamide in normal glucose-fed hyperglycemic rats*

Fasted rats were divided into four groups of six animals: Group I, control rats; Group II, rats receiving glucose (4 g/kg, p.o); Group III, rats receiving glucose (4 g/kg, p.o) plus *kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside* (100 mg/kg) and Group IV, rats receiving glucose (4 g/kg, p.o) plus tolbutamide (100 mg/kg, p.o). Blood samples were collected just prior to and at 30, 60, 90 and 180 min after the glucose loading and blood glucose levels were measured.

2.8. *Determination of serum glucose levels*

Blood samples from the retro-orbital vein plexus were collected, centrifuged and blood glucose levels were determined by using the glucose oxidase method [11].

2.9. *DPPH reactivity*

This assay was carried out with a medium containing an ethanolic solution of 200 μ M DPPH. The free radical exhibits a potent absorption at 515 nm and the antioxidants decrease the amount of the free radical, as described by Vivot et al. [12].

2.10. Assay for myeloperoxidase activity

Biological material, such as rat lungs was homogenized in an ice-cold phosphate buffer as previously described by Rao et al. [13], as a source of the enzyme. The enzyme activity was determined by the slope of the absorption curve set at 450 nm in the presence of *o*-dianisidine-2HCl and H₂O₂, and calculated based on a standard curve obtained for a commercial enzyme.

2.11. Liver microsomal preparations

Liver microsomes were obtained from rat liver by differential centrifugation with calcium aggregation, according to Schenkman and Cinti [14]. The fractions obtained were immediately placed in a freezer at -70 °C for the later determination of antioxidant activity. The protein concentration was determined according to Lowry et al. [15].

2.12. Liposomes preparation

Bilayer liposomes were prepared by cholate dialysis as described previously by Creczynski-Pasa et al. [16]. The method consists of the solubilization of the phospholipids with cholate and deoxycholate followed by a dialysis procedure. PC = L- α -phosphatidylcholine from fresh egg yolk; ASO = Asolectin = L- α -phosphatidylcholine + another lipid such as phosphatidylinositol or phosphatidylethanolamine, from soybean.

2.13. Lipid peroxidation induced by ascorbyl radical

Lipid peroxidation was induced by the addition of 25 μM FeSO_4 and 500 μM ascorbate according to Sanz et al. [8]. The amount of TBARS was measured according to Bird and Draper [17] and calculated using an extinction coefficient of $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. When the lipid peroxidation was assayed in liposomes the lipid concentration was 12.5 mg/ml and in microsomes protein concentration was fixed at 2 mg/ml.

2.14. Lipid peroxidation induced by hydroxyl radical

Lipid peroxidation was induced by the addition of 25 μM FeCl_2 , 2.8 mM H_2O_2 , 100 μM sodium ascorbate in a medium containing 2 mg microsomal protein/ml 0.1 M KH_2PO_4 at pH 7.4. When the lipid peroxidation was assayed in liposomes the lipid concentration was 12.5 mg/ml. The amount of TBARS was then calculated.

2.15. Data and statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SEM. Statistical evaluation was done using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni post-test using the software GraphPAD InStat – Version 1.12^a. Differences were considered to be significant at $P \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Effect of kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside on blood glucose levels in normal rats

Table 1 shows the effect over time of 50, 100 and 200 mg/kg of kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside on blood glucose levels in normal fasted rats. Only the higher dose of kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside showed a hypoglycemic effect at 1 h after treatment. This dose led to a significant lowering of blood glucose as compared to the respective zero time.

3.2. Effect of kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside on blood glucose levels in alloxan-induced diabetic rats

The administration of alloxan (60 mg/kg) to the fasted rats markedly increased blood glucose levels as compared to both Groups I in Tables 1 and 2. The vehicle group did not show a significant difference in blood glucose levels as compared with diabetic animals (Table 2). However, oral administration with doses of 50, 100 and 200 mg/kg of kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside significantly reduced the hyperglycemia in alloxan-induced diabetic rats. The hypoglycemic effect was observed with all doses studied when compared to the respective zero time. Both doses 100 and 200 mg/kg of kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside caused a significant lowering of blood glucose levels throughout the period studied. The maximum hypoglycemic effect was observed with 100 and 200 mg/kg at 2 h after kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside treatment (Table 2).

3.3. Effect of kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside and tolbutamide on normal glucose-fed hyperglycemic rats

Within 30 min of starting the glucose tolerance test, blood glucose concentration was significantly increased from its initial level. This hyperglycemia was maintained until 90 min and then started to decrease, returning to its initial value at 180 min (Table 3). The 100 mg/kg dose of *kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside*, that produced a hypoglycemic effect in diabetic animals, was tested against a glucose tolerance curve. The hyperglycemic time-course (from zero to 180 min) observed on the glucose tolerance curve was unchanged in the presence of *kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside*. Tolbutamide (100 mg/kg) administered to normal glucose-fed rats showed a typical hypoglycemic effect from 60 to 180 min producing lower glucose levels than the control group.

3.4. *Kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside reactivity with DPPH*

The antioxidant potential was first analyzed by observing the reactivity of the compound with DPPH, a stable radical (violet colored). As this electron becomes paired off in the presence of a free radical scavenger, the absorption decreases, and the resulting decolorization is stoichiometrically related to the number of electrons taken up. The compound showed a very high reactivity with this radical with an IC_{50} of $84 \pm 7.8 \mu M$ (Table 4).

3.5. *Effect of kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside on MPO activity*

Kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside inhibited the enzyme activity with a $K_{0.5}$ of $86 \pm 9.9 \mu M$ (Table. 4). The 100 % of enzyme activity was determined as 4.0 ± 0.5 Units/min/mg protein. Each point of the curve was monitored kinetically. The maximal enzyme inhibition was obtained

with 400 μM of the compound.

3.6. Effect of *kaempferol-3,7-O-(\alpha)*-dirhamnoside on lipid peroxidation

The results shown in Table 5 represent the protection indices of lipid peroxidation for *kaempferol-3,7-O-(\alpha)*-dirhamnoside in membranes of endoplasmic reticulum (microsomes), asolectin and phosphatidylcholine liposomes. Peroxidation was induced by ascorbyl and hydroxyl radicals as described in Methodology. The compound protected against lipid peroxidation, although with a different potency for each of the membranes tested with both free radicals. Comparing the IC_{50} s of *kaempferol-3,7-O-(\alpha)*-dirhamnoside against lipid peroxidation induced by ascorbyl and hydroxyl, we observed that the antioxidant potential of the compound was much higher against the latter. The IC_{50} s for ascorbyl radical were $320 \pm 14.1 \mu\text{M}$, $223 \pm 8.3 \mu\text{M}$ and $112 \pm 8.8 \mu\text{M}$, respectively, and for hydroxyl radical in liver microsomes it was $85 \pm 3.5 \mu\text{M}$ (Table 5). The data shown in Table 5 indicate that the protective potential of the antioxidant is dependent on the lipid membrane constitution as clearly shown through the IC_{50} of *kaempferol-3,7-O-(\alpha)*-dirhamnoside against lipid peroxidation induced by ascorbyl in three different lipid bilayers. In parallel, as a positive control of lipoperoxidation protection we measured the effect of quercetin, a flavonoid with known antioxidant properties as described by Saija et al. [18] and references therein, also shown in Table 5. As expected, quercetin showed a strong action against lipid peroxidation with an IC_{50} in liver microsomes of $125.0 \pm 5.0 \mu\text{M}$ and essentially the same value, $80 \pm 6.0 \mu\text{M}$, in ASO and PC liposomes. This indicates that *kaempferol-3,7-O-(\alpha)*-dirhamnoside is only two to three times less potent than this strong, well-characterized antioxidant.

4. Discussion and conclusion

Acute administration of *kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside* produced hypoglycemia in both normal and alloxan-induced diabetic rats (Tables 1 and 2). It is, therefore, conceivable that the hypoglycemic principle(s) of *kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside* exert a prominent and direct effect in diabetic animals.

In diabetic groups, *kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside* cannot act indirectly by stimulating the release of insulin since alloxan treatment causes destruction of β cells. These results are in agreement with Russo et al. [19] who observed no differences in insulin levels between normal and diabetic patients in response to either acutely or chronically administered *Bauhinia forficata* leaf extracts. However, the hypoglycemia produced by the higher dose of *kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside* in normal animals may be due to a slight potentiation of the insulin action.

It is generally accepted that the sulphonylureas, including tolbutamide produce hypoglycemia in normal animals by stimulating the pancreatic β cells to release more insulin. These drugs, however, do not decrease blood glucose in alloxan-diabetic animals [20]. In glucose-fed hyperglycemic normal rats, tolbutamide (100 mg/kg) was able to return the glycemia to control levels (Table 3). Also, *kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside* had no influence over the glucose intestinal absorption. Considering together the results from Tables 1, 2, and 3 we propose that the *kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside* hypoglycemic mechanism involves an insulin-like effect on peripheral glucose consumption, inhibition of glucose reabsorption by the kidney, a delay in insulin catabolism (inhibition of insulinases) and/or potentiation of the effect of residual insulin.

Another relevant point is that the hypoglycemic effect of *kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside* in diabetic rats was markedly more potent (around four times) when compared to the *n*-butanolic *Bauhinia forficata* fraction using a similar protocol, see Silva et al. [3] and Table 2, thus emphasizing the importance of *kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside* in that fraction.

Kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside also presents an antioxidant potential at very low concentrations compared to the doses used in the *in vivo* analysis of its hyperglycemic effect: i) it inhibited the lipid peroxidation in different membrane models, indirectly demonstrating that distinct tissues, containing membranes of distinct lipid composition, can be protected, which may be of particular importance in some pathological conditions, including diabetes; ii) it also inhibited a pro-oxidant enzyme, myeloperoxidase, which plays a central role in infection and inflammation, converting hydrogen peroxide and chloride to hypochloric acid (HOCl), and although HOCl has an important role in killing microorganisms, it also possesses high reactivity and the ability to damage biomolecules by oxidation, both directly and in its decomposed form, chlorine gas (Cl₂) [10]; iii) it reacted with DPPH, as expected for flavonoids [12].

The antioxidant potential of flavonoids is particularly important because they are easily available in the plant kingdom and are able to protect against stress phenomena such as lipid peroxidation, as shown for a variety of *kaempferol* having high antioxidant selectivity [9] and for quercetin, which was able to protect cells against H₂O₂ – induced oxidative stress and calcium dysregulation [21]. Table 5 also shows that *kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside* has an antioxidant potential comparable to that of quercetin. The effectiveness of the protection against lipid peroxidation is probably because flavonoids, in general, are able to interact with lipid membranes, as shown by Saija et al. [18].

Since we were convinced regarding the importance of a drug treatment against multiple targets, in this case with hypoglycemic and antioxidant actions, and also considering that the model used in this work provokes an artificial oxidative stress in the animals [22,10] and references therein, we evaluated the antioxidant potential of *kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside* only *in vitro*.

We conclude that *kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside*, purified from the *n*-butanolic fraction of BF leaves, was effective in decreasing the blood glucose level in normal and diabetic rats after an acute treatment and this effect was not related to reduced intestinal absorption. A further conclusion is that the fraction possesses a strong antioxidant potential, preventing the *in vitro* lipid peroxidation in different lipid bilayers, induced by hydroxyl and ascorbyl radicals, as well as acting as a free radical scavenger and inhibitor of pro-oxidant enzymes.

Since the *n*-butanolic fraction contains at least three different glycosylated *kaempferols*, studies are underway, with isolated compounds, to elucidate the structure-function relationships.

Review

Acknowledgements

This work was supported by grants from Funpesquisa, Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-Brasil (CNPq) and Biobrás Bioquímica do Brasil S/A. Eliandra de Sousa and Leila Zanatta received master's degree studentships from CAPES and CNPq, and Ilana Seifriz held a doctoral studentship; all three were registered on the Chemistry post-graduate program at UFSC. The authors express their appreciation to Dr. Gareth Paul Cuttle for assistance with the English correction of the manuscript.

Review Copy

References

- [1] C.F. Verge, R. Gianani, L. Yu, M. Pietropaolo, T. Smith, R.A. Jackson, J.S. Soelder, G.S. Eisenbarth, Late progression to diabetes and evidence for chronic β -cell autoimmunity in identical twins of patients with type 1 diabetes, *Diabetes* 44 (1995) 1176-1179.
- [2] E.T. Miyake, G. Akisue, M.K. Akisue, Pharmacognostic Characterization of Pata-de-Vaca (*Bauhinia forficata*), *Rev. Bras. Farm.* 1 (1986) 56-68.
- [3] F.R.M.B. Silva, B. Szpoganicz, M.G. Pizzolatti, M.A.V. Willrich, E. De Sousa, Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats, *J. Ethnopharmacol.* 83 (2002) 33-37.
- [4] M.G. Pizzolatti, J.A. Cunha, B. Szpoganicz, E. De Sousa, R. Braz-Filho, J. Schripsema, Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae), *Quím. Nova* 26 (2003) 466-469.
- [5] K.L. Da Silva, M.W. Biavatti, S.N. Leite, R.A. Yunes, F.D. Monache, V. Cechinel-Filho, Phytochemical and pharmacognostic investigation of *Bauhinia forficata* Link (Leguminosae), *Z. Naturforsch.* 55 (2000) 478-480.
- [6] A. Zarzuelo, I. Jiménez, M.J. Gámez, P. Utrilla, I. Fernandez, M.I. Torres, I. Osuma, Effects of luteolin 5-O- β -rutinoside in streptozotocin-induced diabetes rats, *Life Sci.* 58 (1996) 2311-2316.

- [7] M.T. Pepato, E.H. Keller, A.M. Baviera, I.C. Kettelhut, R.C. Vendramini, I.L. Brunetti, Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats, *J. Ethnopharmacol.* 81 (2002) 191-197.
- [8] M.J. Sanz, M.L. Ferrandiz, M. Cejudo, M.C. Terencio, B. Gil, G. Bustos, A. Ubeda, R. Gunasegaran, M.J. Alcaraz, Influence of a series of natural flavonoids on free radical generating systems and oxidative stress, *Xenobiotica* 24 (1994) 589-599.
- [9] P. Cos, M. Calomme, J.B. Sindambiwe, De T. Bruyne, K. Cimanga, L. Pieters, A.J. Vlietinck, D.V. Berghe, Cytotoxicity and lipid peroxidation-inhibiting activity of flavonoids, *Planta Med* 67 (2001) 515-519.
- [10] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*, 3rd edition, New York, Oxford University Press, 2000.
- [11] H. Varley, A.H. Gowenlock, M. Bell, In: Heinemann IW (Ed), *Practical Biochemistry*, 5th edition, vol. 1, London, pp. 389-391, 1976.
- [12] E. Vivot, J.D. Munoz, M.C. Cruanes, M.J. Cruanes, A. Tapia, G.S. Hirschmann, E. Martinez, O. Di Sapio, M. Gattuso, S. Zacchino, Inhibitory activity of xanthine-oxidase and superoxide scavenger properties of *Inga verna* subsp. *affinis*. It's morphological and micrographic characteristics, *J. Ethnopharmacol.* 76 (2001) 65–71.
- [13] T.S. Rao, S.S. Yu, S.W. Djuric, P.C. Isakson, Phorbol ester-induced dermal inflammation in mice: evaluation of inhibitors of 5-lipoxygenase and antagonists of leukotriene B4 receptor, *J. Lipid Mediators Cell Signal.* 10 (1994) 213-228.
- [14] J.B. Schenkman, D.L. Cinti, Preparation of microsomes with calcium, *Methods Enzymol.* 52 (1978) 83-89.

- [15] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265-275.
- [16] T.B. Creczynski-Pasa, P. Gräber, ADP binding and ATP synthesis by reconstituted H⁺-ATPase from chloroplasts, *FEBS Lett.* 350 (1994) 195-198.
- [17] R.P. Bird, A.H. Draper, Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 295-305.
- [18] A. Saija, M. Sclese, M. Lanza, D. Marzullo, F. Bonina, F. Castelli, Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes, *Free Radic. Biol. Med.* 9 (1995) 481-486.
- [19] E.M.K. Russo, A.J. Reichelt, J.R. De-Sá, R.P. Furnaletto, R.C.S. Moisés, T.S. Kasamatsu, A.R. Chacra, Clinical trial of *Myrcia uniflora* and *Bauhinia forficata* leaf tracts in normal and diabetic patients, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 23 (1990) 11-20.
- [20] M.D. Goth, *Medical Pharmacology*, 9th edition. C.V Mosby, Saint Louis, MO, pp. 471-480, 1985.
- [21] H. Wang, J. Joseph, Structure activity relationships of quercetin in antagonizing hydrogen peroxide induced calcium dysregulation in PC12 cells, *Free Radic. Biol. Med.* 87 (1999) 683-694.
- [22] C.C. Rerup, Drugs producing diabetes through damage of insulin secreting cells, *Pharmacol. Rev.* 22 (1970) 485-519.

Legends

Fig. 1 Chemical structure of *kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside* from the *n*-butanolic fraction of *Bauhinia forficata* Link (Leguminosae) leaves

Table 1

Acute effect of *kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside* in normal rats^a

^a Values are expressed as mean \pm SEM; n=6 in duplicates for each group.

^b Statistically significant difference to the corresponding zero time value, $P \leq 0.05$.

Table 2

Acute effect of *kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside* in diabetic rats^a

^a Values are expressed as mean \pm SEM; n=6 in duplicates for each group.

^b Statistically significant difference to the corresponding zero time value, $P \leq 0.05$.

Table 3

Acute effect of *kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside* on oral glucose tolerance^a

^a Values are expressed as mean \pm SEM; n= 6 in duplicates for each group.

^b Statistically significant difference to the corresponding normal group; $P \leq 0.05$.

Table 4

Inhibition of MPO activity by *kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside* and action as DPPH scavenger^a

^a Values are expressed as mean \pm SEM; n= 3 in duplicates for each group.

Table 5

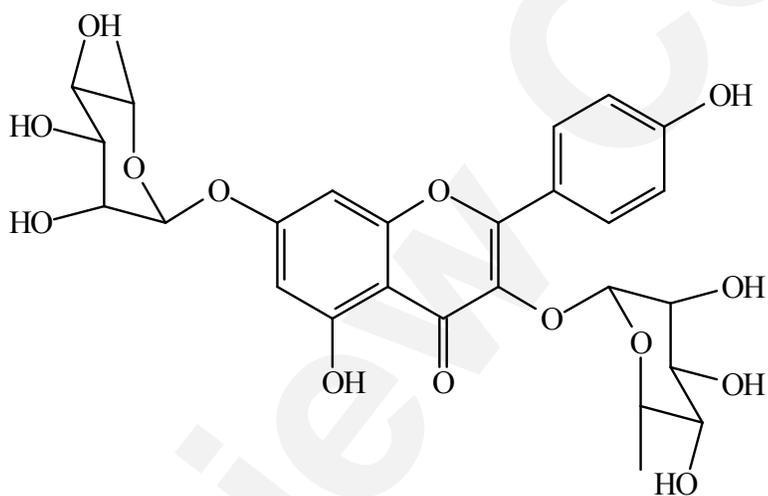
Action of *kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside*. Action against lipid peroxidation^a

^a Values are expressed as mean \pm SEM; n= 3 in duplicates for each group.

n.d= not determined.

Review Copy

Fig. 1



Review Copy

Table 1

Time Hour	Blood Glucose Level (mg/dl)				
	Group I Control	Group II Vehicle ethanol/H ₂ O	Group III Kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside		
			50 mg/kg	100 mg/kg	200 mg/kg
0	130.6 \pm 2.3	110.8 \pm 3.4	111.4 \pm 4.2	107.2 \pm 3.7	106.5 \pm 12.1
1	117.1 \pm 1.7	108.9 \pm 2.7	99.8 \pm 3.8	97.1 \pm 6.3	81.3 \pm 6.1 ^b
2	114.8 \pm 6.3	106.2 \pm 4.1	106.4 \pm 3.5	99.6 \pm 6.1	91.0 \pm 1.6
3	130.4 \pm 3.9	114.3 \pm 3.4	112.5 \pm 2.3	112.6 \pm 4.1	91.3 \pm 4.9

Table 2

Time Hour	Blood Glucose Level (mg/dl)				
	Group I	Group II	Group III		
	Diabetic	Vehicle ethanol/H ₂ O	Kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside		
			50 mg/kg	100 mg/kg	200 mg/kg
0	504.6 \pm 2.7	511.0 \pm 7.2	488.5 \pm 8.2	542.7 \pm 9.6	511.8 \pm 7.4
1	487.3 \pm 11.0	515.5 \pm 13.8	423.8 \pm 8.0 ^b	436.9 \pm 3.5 ^b	402.5 \pm 7.9 ^b
2	536.6 \pm 5.4	512.0 \pm 6.7	452.3 \pm 7.8 ^b	432.9 \pm 12.0 ^b	399.4 \pm 14.9 ^b
3	524.3 \pm 3.8	497.7 \pm 25.3	454.9 \pm 9.9	425.9 \pm 13.0 ^b	403.0 \pm 6.5 ^b

Table 3

Time Minutes	Blood Glucose Level (mg/dl)			
	Group I Control	Group II Glucose 4 g/kg	Group III Glucose + Kaempferol 100 mg/kg	Group IV Glucose + Tolbutamide 100 mg/kg
0	125.2 ± 4.2	128.3 ± 3.5	116.4 ± 13.6	120.6 ± 3.4
30	119.7 ± 7.6	158.7 ± 6.7 ^b	171.3 ± 22.0 ^b	140.3 ± 6.4 ^b
60	117.1 ± 1.9	158.4 ± 5.3 ^b	158.6 ± 8.0 ^b	113.8 ± 2.3
90	118.9 ± 3.2	165.4 ± 5.6 ^b	148.3 ± 5.4 ^b	105.8 ± 5.8
180	126.0 ± 4.2	142.6 ± 2.3	120.1 ± 12.8	93.7 ± 5.3 ^b

Table 4

Assay	K _{0.5} (μM)	IC ₅₀ (μM)
DPPH reactivity	-	84.0 ± 7.8
MPO activity	86.0 ± 9.9	-

Review Copy

Table 5

Membranes	Ascorbyl radical		Hydroxyl radical	
	IC ₅₀ (μM)		IC ₅₀ (μM)	
	Kaempferol	Quercetin	Kaempferol	Quercetin
Liver microsomes	320.0 ± 14.1	125 ± 5	85.0 ± 3.5	7.5 ± 0.7
ASO liposomes	223.0 ± 8.3	80 ± 5.7	n.d.	n.d.
PC liposomes	112.0 ± 8.8	80 ± 6.0	n.d.	n.d.

Review Copy