

MARIANA APPEL HORT

**ESTUDO DAS ATIVIDADES VASODILATADORA E ANTIOXIDANTE DE
Cyathea phalerata Mart. (CYATHEACEAE)**

Florianópolis - SC

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

ESTUDO DAS ATIVIDADES VASODILATADORA E ANTIOXIDANTE DE
***Cyathea phalerata* Mart. (CYATHEACEAE)**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau

MARIANA APPEL HORT

Florianópolis - SC

2006

HORT, Mariana Appel . Estudo das atividades vasodilatadora e antioxidante de *Cyathea phalerata* Mart. (Cyatheaceae). Florianópolis, 2004. 114p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadora: Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau.

Defesa: 03/07/2006.

A espécie *Cyathea phalerata* é uma Pteridófita conhecida popularmente como xaxim e encontrada em Santa Catarina. A FAE obtida do caule de *Cyathea phalerata* apresentou um relevante potencial antioxidante *in vitro*, sendo capaz de captar o radical OH[•] e inibir a peroxidação lipídica. O tratamento com a FAE foi capaz de reduzir o estresse oxidativo em camundongos expostos ao tetracloreto de carbono (CCl₄), reduzindo a fragmentação do DNA, carbonilação de proteínas e lipoperoxidação de membranas, e melhorando as defesas antioxidantes (atividades de Catalase e Glutathione-S-transferase). O importante potencial antioxidante apresentado pela FAE de *Cyathea phalerata* levou ao estudo desta fração em um modelo de reatividade vascular *in vitro* (aorta torácica isolada de ratos). A FAE apresentou um efeito vasodilatador dependente da camada de células endoteliais, principalmente nas menores concentrações, com participação da via NO/GMPc e de prostaciclina. O relevante potencial antioxidante e a atividade vasodilatadora de *Cyathea phalerata* podem estar relacionados à sua composição química, rica em flavonóides.

Palavras-chave: *Cyathea phalerata*, antioxidante, estresse oxidativo, vasodilatação.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Augusto e Ligia, pelo amor, carinho e incentivo, por estarem sempre presentes nos bons e maus momentos, e por me ensinarem que é preciso luta e dedicação para ser alguém na vida.

Ao meu irmão Alexandre, por ser meu querido irmãozinho, pelo amor e carinho.

À minha tia Talia, por ser a minha segunda mãe, por me “paparicar” muito.

Ao Gabriel, por todo amor, compreensão e carinho, por tornar minha vida mais feliz e sempre me incentivar a continuar.

À minha orientadora, Rosa Maria, pelos ensinamentos e oportunidades de crescer e aprender desde a minha iniciação científica, pelo seu bom humor, paciência e incentivo durante esses cinco anos de convivência.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, pelos ensinamentos durante o mestrado.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, especialmente à Diana, Goretti, Rita e Pedro.

Ao Prof. Moacir Geraldo Pizzolatti, pelo fornecimento dos extratos e frações de *Cyathea phalerata*, bem como sua caracterização química.

À Profa Rozangela Curi Pedrosa, pelo auxílio na realização dos experimentos bioquímicos, bem como os seus alunos que sempre estiveram prontos para ajudar.

Aos colegas do laboratório Sofia, Jarbas, Ângela, Fernanda, Karin, Rodrigo, Regina, Paulinho, Juliana, Elke, Geisson e especialmente à Sílvia, pela troca de conhecimento e por tornarem meus dias mais felizes.

Aos amigos da Farmacologia, em especial à Rafaela, por tornaram minha vida mais agradável e divertida.

Aos amigos da faculdade, em especial à Letícia, Mariana, Alexandra, Marianinha, Patrícia Trentin, Patrícia Serpa, Mônica e Ângela pela amizade e companheirismo desde à época da graduação.

Às minhas amigas, Clarissa, Ana, Karina, Patrícia e Eloisa, porque vocês são especiais e estarão sempre guardadas no meu coração.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada

Mariana

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. <i>Cyathea phalerata</i> Mart.....	2
1.2. Flavonóides.....	5
1.3. Radicais livres.....	7
1.4. Defesas antioxidantes.....	10
1.4.1. Flavonóides como antioxidantes.....	12
1.5. Estresse oxidativo.....	14
1.6. Endotélio e regulação do tônus vascular	18
1.6.1. Óxido Nítrico	19
1.6.2. Outros mediadores derivados do endotélio: prostaciclina e EDHF.....	21
1.7. Estresse oxidativo e doenças cardiovasculares.....	22
1.7.1. Flavonóides e doenças cardiovasculares	24
2. OBJETIVOS.....	27
2.1. Objetivos gerais	27
2.2. Objetivos específicos	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1. Materiais	29
3.1.1. Animais	29
3.1.2. Fármacos e Reagentes.....	30
3.1.3. Material Botânico	31
3.2. Métodos	32
3.2.1. Preparo do extrato bruto e das frações <i>Cyathea phalerata</i>	32
3.2.2. Caracterização química de <i>Cyathea phalerata</i>	33
3.2.3. Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> de <i>Cyathea phalerata</i>	35
3.2.3.1. Determinação da atividade sequestradora do EB e das frações de <i>Cyathea phalerata</i> sobre o radical DPPH	35

3.2.3.2. Determinação da capacidade seqüestradora do EB e das frações de <i>Cyathea phalerata</i> sobre o radical Ânion Superóxido ($O_2^{\bullet-}$).....	36
3.2.3.3. Inibição dos danos oxidativos à desoxirribose induzidos pelo radical $^{\bullet}OH$, pelo EB e frações de <i>Cyathea phalerata</i>	37
3.2.3.4. Avaliação da inibição da peroxidação lipídica pelo EB e frações de <i>Cyathea phalerata</i>	39
3.2.4. Atividade antioxidante de <i>Cyathea phalerata in vivo</i> e indicadores de estresse oxidativo	40
3.2.4.1. Avaliação do dano à membrana celular	41
3.2.4.1.1. Medida da peroxidação lipídica pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	41
3.2.4.1.2. Medida da concentração de hidroperóxidos lipídicos pelo método do FOX (oxidação do ferro pelo xilenol laranja).....	42
3.2.4.2. Determinação do dano ao DNA através do teste do COMETA	43
3.2.4.3. Avaliação do dano oxidativo a proteínas.....	46
3.2.4.4. Avaliação da concentração de glutathiona reduzida (GSH).....	47
3.2.4.5. Atividade da enzima catalase (CAT)	48
3.2.4.6. Atividade da enzima glutathiona S-transferase (GST)	48
3.2.5. Avaliação do efeito de <i>Cyathea phalerata</i> na reatividade vascular em anéis de aorta isolada de ratos.....	49
3.2.5.1. Montagem das preparações isoladas de anel de aorta torácica de rato.....	49
3.2.5.2. Caracterização do efeito vasorrelaxante do EB e da FAE de <i>Cyathea phalerata</i>	50
3.2.5.3. Verificação da influência da FAE de <i>Cyathea phalerata</i> na via NO/GMPc.....	51
3.2.5.4. Verificação da participação de prostaciclina no efeito vasodilatador da FAE de <i>Cyathea phalerata</i>	52
3.2.5.5. Verificação da influência da FAE de <i>Cyathea phalerata</i> na contração induzida pela fenilefrina	52
3.2.5.6. Influência da FAE de <i>Cyathea phalerata</i> no vasorrelaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio (SNP)	52
3.3. Apresentação dos resultados e análise estatística	53
4. RESULTADOS	54
4.1. Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> de <i>Cyathea phalerata</i>	54
4.1.1. Determinação da atividade seqüestradora do EB e das frações de <i>Cyathea phalerata</i> sobre o radical DPPH.....	54

4.1.2. Determinação da capacidade seqüestradora do EB e das frações de <i>Cyathea phalerata</i> sobre o radical ânion Superóxido ($O_2^{\bullet-}$).....	56
4.1.3. Inibição dos danos oxidativos à desoxirribose induzidos pelo radical $^{\bullet}OH$, pelo EB e frações de <i>Cyathea phalerata</i>	57
4.1.4. Avaliação da inibição da peroxidação lipídica pelo EB e frações de <i>Cyathea phalerata</i>	58
4.2. Atividade antioxidante de <i>Cyathea phalerata in vivo</i> e indicadores de estresse oxidativo	59
4.2.1. Avaliação do dano à membrana celular	60
4.2.1.1. Medida da peroxidação lipídica pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	60
4.2.1.2. Medida da concentração de hidroperóxidos lipídicos pelo método de FOX (oxidação do ferro pelo xilenol laranja).....	61
4.2.2. Determinação do dano ao DNA através do teste do COMETA ..	62
4.2.3. Avaliação do dano oxidativo a proteínas	64
4.2.4. Avaliação da concentração de glutathiona reduzida (GSH).....	65
4.2.5. Atividade da enzima catalase (CAT).....	66
4.2.6. Atividade da enzima glutathiona S-transferase (GST).....	67
4.3. Avaliação do efeito de <i>Cyathea phalerata</i> na reatividade vascular em anéis de aorta isolada de ratos	68
4.3.1. Caracterização do efeito vasorelaxante do EB e da FAE de <i>Cyathea phalerata</i>	68
4.3.2. Verificação da influência da FAE de <i>Cyathea phalerata</i> na via do NO/GMPc	70
4.3.3. Verificação da participação de prostaciclina no efeito vasodilatador da FAE de <i>Cyathea phalerata</i>	73
4.3.4. Verificação da influência da FAE de <i>Cyathea phalerata</i> na contração induzida pela fenilefrina	74
4.3.5. Influência da FAE de <i>Cyathea phalerata</i> no vasorrelaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio (SNP).....	76
5. DISCUSSÃO	78
6. CONCLUSÕES.....	97
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS

•OH	Radical Hidroxil
¹ Δ _g	Oxigênio singlete
AA	Atividade Antioxidante
Ach	Acetilcolina
ADP	Adenosina difosfato
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AMPc	Monofosfato de Adenosina Cíclico
ATP	Adenosina Trifosfato
BHT	Hidroxitolueno butilado
CAT	Catalase
CCl ₃ •	Radical Triclorometil
CCl ₃ O ₂ •	Radical Triclorometilperoxil
CCl ₄	Tetracloroeto de carbono
CCR	Curva Concentração Resposta
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CE50	Concentração Efetiva que promove 50% do Efeito Máximo
CHPE	Cumeno Hidroperóxido
CI50	Concentração Inibitória que promove 50% do Efeito Máximo
CN	Grupo Controle Normal
COX	Ciclooxigenase
CT	Grupo Controle Tetracloroeto
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DPPH	1,1-difenil-2-picril hidrazina
DTNB	5,5'-ditiois-2-ácido nitrobenzóico
EB	Extrato Bruto
ECSOD	Superóxido Dismutase Extracelular
EDHF	Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio
EDRF	Fator Relaxante Derivado do Endotélio
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial

EPM	Erro Padrão da Média
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
FAE	Fração Acetato de Etila
FAQ	Fração Aquosa
FBU	Fração n-butanol
FMN	Flavina Mononucleotídeo
FOX	Oxidação do Ferro pelo Xilenol Laranja
GMPc	Monofosfato Cíclico de Guanosina
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione Reduzida
GST	Glutathione S-transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HNO ₂	Ácido Nitroso
HO ₂ •	Radical Hidroperóxil
HOCl	Ácido Hipocloroso
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzida
IV	Infravermelho
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LMPA	Agarose de baixo ponto de fusão
L-NOARG	N ^W -nitro-L-arginina
LOO•	Radical Lipoperóxido
LOOH	Hidroperóxido lipídico
MDA	Malondialdeído
N ₂ O ₃	Trióxido de dinitrogênio
N ₂ O ₄	Tetróxido de dinitrogênio
NADH	β-nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADPH	Dinucleotídeo fosfato de nicotinamida adenina reduzida
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NMPA	Agarose de ponto de fusão normal
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NO	Óxido Nítrico
NO ₂ •	Dióxido de nitrogênio
NO ₂ ⁺	Cátion Nitrônio

NOS	Óxido Nítrico Sintase
NTA	Ácido Nitrilotriacético
$O_2^{\bullet-}$	Radical Ânion Superóxido
O_3	Ozônio
ODQ	1H-[1,2,4]oxidiazolol[4,3- α]quinoxalin-1-one
$ONOO^-$	Peroxinitrito
ONOOH	Ácido peroxinitroso
PGI_2	Prostaciclina
Phe	Fenilefrina
PPT	Precipitado
RE	Retículo Endoplasmático
RNA	Ácido Ribonucléico
RO^\bullet	Radical Alcoxil
RO_2^\bullet	Radical Peroxil
ROONO	Alquil peroxinitrito
RUT	Rutina
SH	Grupamento Sulfidril
SNP	Nitroprussiato de Sódio
SOD	Superóxido Dismutase
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TBH ₄	Tetrahidrobiopterina
TCA	Ácido Tricloroacético
TNB	Ânion tiolato
UTP	Trifosfato de Uracila

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio, formas radicalares e não radicalares.	8
Tabela 2: Pontuação e exemplos de cada classe de cometa visualizada.	45
Tabela 3: Valores de CE50 e seus respectivos intervalos de confiança no ensaio da capacidade seqüestradora do radical DPPH do EB, PPT, FAQ, FBU e FAE de <i>Cyathea phalerata</i>	55
Tabela 4: Valores de CI50 e seus respectivos intervalos de confiança no ensaio da inibição da degradação da desoxirribose do EB, PPT, FAQ, FBU e FAE de <i>Cyathea phalerata</i>	58
Tabela 5: Porcentagem de distribuição dos cometas em diferentes classes analisados no sangue total de camundongos	63
Tabela 6: Valores de CI50 e de Relaxamento Máximo induzido pelo EB e pela FAE de <i>Cyathea phalerata</i> , na presença ou na ausência de endotélio, em preparações isoladas de aorta torácica de rato.....	70
Tabela 7: Efeito de diferentes drogas que atuam na via NO/GMPc sobre a CI50 e Relaxamento Máximo induzido pela FAE de <i>Cyathea phalerata</i> em aorta torácica isolada de rato.	72
Tabela 8: Efeito da indometacina sobre a CI50 e o Relaxamento Máximo induzido pela FAE de <i>Cyathea phalerata</i> em aorta torácica isolada de rato. ...	74
Tabela 9: Efeito de incubações isoladas de FAE de <i>Cyathea phalerata</i> sobre a CE50 e o efeito máximo induzido pela fenilefrina em preparações isoladas de aorta torácica de rato.	75
Tabela 10: Efeito de incubações isoladas de FAE de <i>Cyathea phalerata</i> sobre a CI50 e o Relaxamento Máximo induzido pelo SNP em preparações isoladas de aorta torácica de rato.	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Espécie vegetal <i>Cyathea phalerata</i> Mart.....	3
Figura 2: Estrutura básica dos flavonóides.....	5
Figura 3: Seqüestro de EROs por flavonóides.	13
Figura 4: Reações de iniciação e propagação da peroxidação lipídica.....	17
Figura 5: Esquema resumido representando a liberação de fatores vasodilatadores derivados do endotélio e seu efeito na célula muscular lisa vascular.....	22
Figura 6: Fluxograma de preparo do extrato bruto e das frações de <i>Cyathea phalerata</i>	33
Figura 7: Estruturas químicas dos compostos presentes na FAE de <i>Cyathea phalerata</i>	35
Figura 8: Atividade seqüestradora do radical DPPH de EB, PPT, FAQ, FBU e FAE de <i>Cyathea phalerata</i>	55
Figura 9: Efeito do EB, PPT, FAQ, FBU e FAE de <i>Cyathea phalerata</i> na redução do NBT.	56
Figura 10: Efeito do EB, PPT, FAQ, FBU e FAE de <i>Cyathea phalerata</i> na degradação da desoxirribose induzida pelo radical OH [•]	57
Figura 11: Efeito do EB, PPT, FAQ, FBU e FAE de <i>Cyathea phalerata</i> sobre a peroxidação lipídica.....	59
Figura 12: Índice de peroxidação lipídica (TBARS) em fígados de camundongos não tratados, tratados com CCl ₄ , pré-tratados com FAE ou rutina e posteriormente tratados com CCl ₄	61
Figura 13: Índice de hidroperóxido lipídico (FOX) em fígados de camundongos não tratados, tratados com CCl ₄ , pré-tratados com FAE e posteriormente tratados com CCl ₄	62
Figura 14: Dano ao DNA em sangue total de camundongos não tratados, tratados com CCl ₄ , pré-tratados com FAE) ou rutina e posteriormente tratados com CCl ₄ avaliado no teste do COMETA.....	64
Figura 15: Concentração de proteínas carboniladas em fígados de camundongos não tratados, tratados com CCl ₄ , pré-tratados com FAE ou rutina e posteriormente tratados com CCl ₄	65
Figura 16: Concentração de GSH em fígados de camundongos não tratados, tratados com CCl ₄ , pré-tratados com FAE ou rutina e posteriormente tratados com CCl ₄	66
Figura 17: Atividade de CAT em fígados de camundongos não tratados, tratados com CCl ₄ , pré-tratados com FAE ou rutina e posteriormente tratados com CCl ₄	67
Figura 18: Atividade de GST em fígados de camundongos não tratados, tratados com CCl ₄ , pré-tratados com FAE ou rutina e posteriormente tratados com CCl ₄	68

Figura 19: Curvas concentração resposta cumulativas ao EB e à FAE de <i>Cyathea phalerata</i>	69
Figura 20: Curvas concentração resposta cumulativas à FAE de <i>Cyathea phalerata</i> na presença e ausência de endotélio funcional.....	70
Figura 21: Curvas concentração resposta cumulativas à FAE de <i>Cyathea phalerata</i> na ausência e na presença de L-NOARG, L-arginina + L-NOARG e ODQ	72
Figura 22: Curvas concentração resposta cumulativas à FAE de <i>Cyathea phalerata</i> na ausência e na presença de indometacina	73
Figura 23: Curvas concentração resposta cumulativas à fenilefrina na ausência e na presença de incubações isoladas da FAE de <i>Cyathea phalerata</i>	75
Figura 24: Curvas concentração resposta cumulativas ao SNP na presença de incubações isoladas da FAE de <i>Cyathea phalerata</i>	76
Figura 25: Curvas concentração resposta cumulativas ao SNP na ausência e na presença de superóxido dismutase	77

RESUMO

O estresse oxidativo desempenha um importante papel na patogênese de várias doenças humanas, tais como injúria por isquemia e reperfusão, aterosclerose, doenças neurodegenerativas e câncer. No sistema cardiovascular, os radicais livres estão envolvidos principalmente no desenvolvimento da hipertensão e aterosclerose. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo investigar, *in vitro* e *in vivo*, a atividade antioxidante de *Cyathea phalerata*, além de sua atividade vasodilatadora em anéis de aorta torácica isolada de rato. A atividade antioxidante *in vitro* foi avaliada através da medida da capacidade seqüestradora do Extrato Bruto (EB), Precipitado (PPT), Fração Aquosa (FAQ), Fração n-Butanol (FBU) e Fração Acetato de Etila (FAE), sobre os radicais DPPH, $O_2^{\bullet-}$ e OH^{\bullet} , e sobre a peroxidação lipídica. Nestes ensaios foi possível observar o relevante potencial antioxidante da FAE, principalmente a sua capacidade de captar o radical OH^{\bullet} e inibir a peroxidação lipídica. A avaliação *in vivo* do estresse oxidativo foi realizada em camundongos pré-tratados com a FAE (10, 30 ou 100 mg/kg) e posteriormente expostos ao tetracloreto de carbono (CCl_4), através da medida *ex vivo* de fragmentação do DNA, carbonilação de proteínas e lipoperoxidação de membranas, e das defesas antioxidantes (concentração de GSH e atividades de CAT e GST). A FAE foi capaz de reduzir o dano induzido pelo agente estressor (CCl_4) ao DNA, lipídeos e proteínas e aumentar a atividade das enzimas CAT e GST. O importante potencial antioxidante apresentado pela FAE de *Cyathea phalerata* levou ao estudo desta fração em um modelo de reatividade vascular *in vitro* (aorta torácica isolada de ratos). A FAE apresentou

um efeito vasodilatador dependente da camada de células endoteliais, principalmente nas menores concentrações. A incubação prévia com L-NOARG e ODQ demonstrou a participação da via NO/GMPc no efeito vasodilatador desta fração. Além disso, prostaciclina produzida pelas células endoteliais também parece participar desta atividade. A FAE não alterou a contração induzida pela fenilefrina e nem o relaxamento induzido pelo SNP. O relevante potencial antioxidante e a atividade vasodilatadora de *Cyathea phalerata* podem estar relacionados à sua composição química, rica em flavonóides. Esta planta pode ser importante para o tratamento de patologias que envolvem estresse oxidativo, podendo diminuir os danos causados às macromoléculas (lipídeos, proteínas e DNA) e aumentar as defesas antioxidantes. Destaca-se a importância da FAE de *Cyathea phalerata*, rica em flavonóides, para a prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares.

ABSTRACT

Oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of several human diseases, such as in ischemia and reperfusion, atherosclerosis, neurodegenerative diseases and cancer. In the cardiovascular system, free radicals are involved mainly in the genesis of hypertension and atherosclerosis. The objective of the present study was to investigate the antioxidant activity of *Cyathea phalerata* (*in vitro* and *in vivo*), and its vasodilator activity in rat thoracic aorta. The *in vitro* antioxidant potential of the Crude Extract (CE), Precipitate (PPT), Aqueous Fraction (AF), n-Butanolic Fraction (BF) and Ethyl Acetate Fraction (EAF) were evaluated through the scavenging of DPPH, $O_2^{\bullet-}$ and OH^{\bullet} radical, and lipid peroxidation. In these assays, it was observed that EAF has marked antioxidant potential, especially as a scavenger of the OH^{\bullet} radical and at inhibiting lipid peroxidation. The *in vivo* evaluation of oxidative stress (DNA fragmentation, membrane lipoperoxidation and carbonyl protein formation) and the antioxidant defenses (concentration of GSH and CAT and GST activities) was measured in mice pre-treated with EAF (10, 30 or 100 mg/kg) and later exposed to carbon tetrachloride (CCl_4). The EAF was capable to prevent the induced damage to DNA, lipids and proteins, as well as increase the enzymatic activity of CAT and GST. The important antioxidant potential showed by EAF led to evaluation of its influence on vascular reactivity *in vitro* (rat thoracic aorta). EAF has an endothelium-dependent vasodilator effect, especially in lower concentrations. The pre incubation with L-NOARG and ODQ demonstrated the participation of the NO/GMPc pathway in the vasodilatation induced by this fraction. Moreover, prostacilin produced by endothelial cells

seems to participate in this activity. The EAF did not alter the contraction induced by phenylephrine or the relaxation induced by SNP. The relevant antioxidant potential and the vasodilator effect of *Cyathea phalerata* may be due to its chemical composition, which is rich in flavonoids. This plant may be important for the treatment of pathological conditions that involve the oxidative stress, by decreasing the damage caused to macromolecules and increasing the endogenous antioxidant defenses. Therefore, we believe that the EAF from *Cyathea phalerata*, which is rich in flavonoids, may be an important tool to prevent and treat cardiovascular diseases.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (Veiga Júnior et al., 2005). Plantas medicinais contêm compostos farmacologicamente ativos, mas em muitos casos os compostos responsáveis pelo efeito terapêutico não são conhecidos (Ernst, 2005).

Poucas plantas têm sido estudadas cientificamente para assegurar sua qualidade, segurança e eficácia (Calixto, 2005). Dentre as 250 a 500 mil espécies vegetais existentes no planeta, apenas cerca de 15% foi estudada e somente para algum efeito específico (Ferreira, 1998). O Brasil possui cerca de 20 a 22% de todas as plantas e microorganismos, entretanto estima-se que não mais de 25 mil espécies de plantas sejam objeto de alguma investigação científica (Calixto, 2005).

Embora cerca de 100 mil compostos oriundos de plantas tenham sido determinados, as fontes de metabólitos secundários parecem ser inesgotáveis em relação às possibilidades de se encontrar novos fármacos e diferentes estruturas com atividade de extrema importância à terapêutica (Yunes e Cechinel Filho, 2001).

A comprovação científica do uso popular, através de ensaios biológicos, pode trazer informações importantes para o uso correto e seguro de plantas medicinais. Além disso, a pesquisa parece ser essencial para a descoberta de novos fármacos com potencial terapêutico, possuindo importante interesse na clínica.

1.1. *Cyathea phalerata* Mart.

As espécies da família Cyatheaceae estão distribuídas em seis gêneros (*Sphaeropteris*, *Alsophila*, *Nephelea*, *Trichipteris*, *Cnemidaria* e *Cyathea*), dos quais *Alsophila* e *Cyathea* são os mais comuns. A maioria das plantas são samambaias arborescentes e tem ampla dispersão nas matas montanhosas de todos os países intertropicais e sub-tropicais (Joly, 1967; Tryon e Tryon, 1982).

As plantas do gênero *Cyathea* podem ser chamadas de samambaias arbóreas e possuem importante interesse ornamental. O gênero compreende cerca de 300 espécies com predominância no hemisfério Sul, com cerca de 50 espécies na América Central, 25 na África e mais de 40 na região do Pacífico e Ásia Austral (Gola et al., 1965; Sehnem, 1978). No Brasil pode-se citar algumas espécies descritas na literatura, e que tem dispersão em várias regiões. *Cyathea schanschin* e *Cyathea hirtula*, por exemplo, crescem nas matas serranas com predominância nos estados da Bahia, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. As espécies *Cyathea vestita* e *Cyathea feei* encontram-se em matas de morro e capoeira, preferencialmente à beira de cursos de água. *Cyathea vestita* tem ampla dispersão em São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Mato Grosso, Bahia, Goiás, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, e *Cyathea feei* no Rio de Janeiro, São Paulo, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. *Cyathea arborea* também é comumente encontrada nas regiões elevadas do país (Sehnem, 1978).

Cyathea phalerata é conhecida popularmente como xaxim. Como todas as Pteridófitas, ela é considerada uma planta inferior, arborescente de tamanho médio, apresentando até 3 metros de altura com folhas de cerca de 1,5 metros de comprimento (Figura 1). Típica nas matas primitivas, com dispersão na América Tropical, Antilhas, Colômbia, Guiana, e no Brasil nos estados do Rio de Janeiro, Mato Grosso, Paraná e Santa Catarina, principalmente nas regiões mais elevadas. Em Santa Catarina, é encontrada nos municípios de Antônio Carlos, Luís Alves, Presidente Nereu, Santo Amaro da Imperatriz e Blumenau, podendo existir em outras regiões do estado (Sehnen, 1978).



Figura 1: Espécie vegetal *Cyathea phalerata* Mart.

Os estudos fitoquímicos do gênero *Cyathea* são escassos. A primeira investigação sobre os constituintes fenólicos do gênero *Cyathea* foi realizada por Harada e colaboradores (1955; 1958), que analisaram folhas de *Cyathea faurieri* e *Cyathea hancockii* durante um levantamento sobre a distribuição de flavonas, flavonóis e flavanonas nas samambaias japonesas. Estas espécies

contêm kanferol, cirtominetina e farrerol e uma flavona caracterizada como vitexina (Hiraoka e Hasegawa, 1975).

De acordo com a literatura, os flavonóides das samambaias são primariamente restritos a quatro grupos principais: flavonóis, glicosilflavonas, flavonas e flavanonas. Outros tipos de flavonóides também são encontrados nas samambaias, porém de forma mais esporádica como antocianinas, xantonas, flavanonóis e as biflavonas (Wallace, 1989).

Espécies representantes da família Cyatheaceae acumulam flavonóis O-glicosídeos, predominantemente 3-O-glicosídeos do kanferol e quercetina e C-glicosilflavonas e flavanonas (Hiraoka e Hasegawa, 1975; Hiraoka e Maeda, 1979; Wallace, 1989). Estudos de *Cyathea podophylla* e *Cyathea spinulosa* detectaram a presença de constituintes triterpenóides nestas espécies (Arai et al., 1994; 2003).

Existem poucos dados na literatura a respeito das atividades biológicas das espécies de *Cyathea*. Em Taiwan, o broto da espécie *Cyathea fauriei*, é utilizado na medicina popular para o tratamento de tumores (Graham et al., 2000). No Brasil, *Cyathea phalerata* têm uso na medicina popular no combate as varizes, tratamento de afecções renais, amarelão, reumatismo e o chá das folhas para tosse e gripes. Tais informações foram obtidas a partir de pessoas de comunidades do interior e grupos indígenas (Verdi, 2005). Recentemente, Cazarolli (2004) demonstrou que o flavonóide kanferol 3-O-(α)-L-ramnopiranosil (1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosídeo isolado de *Cyathea phalerata* apresentou atividade hipoglicemiante em animais diabéticos induzidos com aloxana.

1.2. Flavonóides

Os flavonóides, biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides, constituem uma importante classe de polifenóis, presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais. O termo “fenólico” ou “polifenol” pode ser definido como sendo uma substância que tem um ou mais núcleos aromáticos contendo hidroxilas e/ou seus derivados funcionais (ésteres, metoxilas, glicosídeos e outros). Entretanto, uma definição levando em conta somente a estrutura química não é apropriada, pois existem compostos contendo hidroxilas fenólicas, fazendo parte de outras classes metabólicas (Zuanazzi, 2001).

Pode-se encontrar flavonóides em diversas formas estruturais. Entretanto, a maioria dos representantes dessa classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, arranjados em 3 anéis, chamados núcleos A, B e C. Os átomos de carbono recebem a numeração com números ordinários para os núcleos A e C e os mesmos números seguidos de linha (') para o núcleo B (Figura 2) (Pietta, 2000; Beecher, 2003).

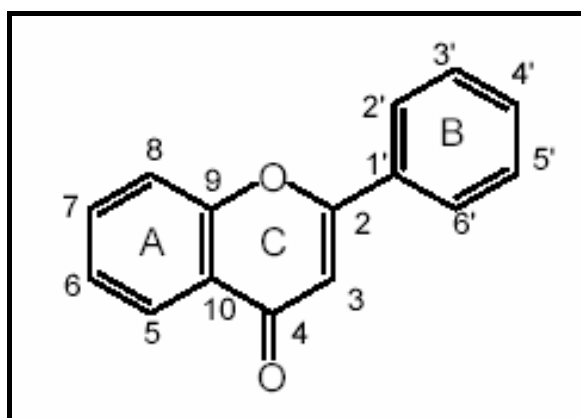


Figura 2: Estrutura básica dos flavonóides (Pietta, 2000).

As várias classes de flavonóides diferem no nível e padrão de oxidação do anel C, enquanto compostos individuais dentro de uma classe diferem nas substituições dos anéis A e B. Dentre as classes de flavonóides de interesse particular estão flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonols, flavanonols, flavan-3-ols, e antocianidinas. Outras classes incluem biflavonas, chalconas, auronas e cumarinas (Pietta, 2000; Wilhem Filho et al., 2001). Os flavonóides de origem natural apresentam-se freqüentemente oxigenados e um grande número ocorre conjugado com açúcares, sendo chamados de heterosídeos ou glicosídeos. Quando o metabólito encontra-se sem o açúcar, é chamado de aglicona ou forma livre (Zuanazzi, 2001).

Nas plantas, os flavonóides possuem diferentes funções: proteção contra raios ultravioleta e visível; proteção contra insetos, fungos, vírus, e bactérias; atraentes de animais para polinização; antioxidantes; controle de ação de hormônios vegetais; agentes alelopáticos e inibição de enzimas (Zuanazzi, 2001; Havsteen, 2002).

Os flavonóides estão presentes em alimentos vegetais e bebidas, tais como chás e vinho, principalmente na forma de conjugados β -glicosídicos. (Tapiero, 2005). Quando ingeridos, os flavonóides são absorvidos no trato gastrointestinal, os glicosídeos são liberados das agliconas pela ação de hidrolases da microflora ou hidrolases localizadas nas membranas da borda em escova da mucosa intestinal. Depois disso, a aglicona pode se difundir através da membrana para o interior da célula. Alternativamente, os flavonóides podem entrar na célula como glicosídeos intactos através do transportador de glicose dependente de sódio (Havsteen, 2002; Tapiero, 2005).

Os flavonóides possuem uma grande variedade de efeitos biológicos incluindo antibacteriano, antiinflamatório, antialérgico, hepatoprotetor, antitrombótico, antiviral, anticarcinogênico e vasodilatador. Muitas destas atividades podem estar associadas à sua atividade antioxidante (Williams et al., 2004; Soobrattee et al., 2005).

1.3. Radicais livres

Segundo Halliwell e Gutteridge (1999), radicais livres são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital externo. Um radical pode ser formado pela perda ou ganho de um elétron de um não radical, ou através de fissão homolítica de uma ligação covalente (Southorn, 1988; Halliwell e Gutteridge, 1999).

Espécies Reativas é um termo coletivo utilizado para designar espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) (Tabela 1). São espécies químicas altamente reativas, geralmente com propriedades oxidantes, mas que não apresentam necessariamente elétrons desemparelhados (Bast et al., 1991; Halliwell, 1996).

Tabela 1: Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio, formas radicalares e não radicalares. Adaptado de Halliwell (1996).

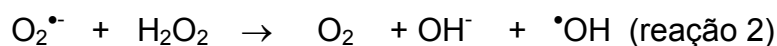
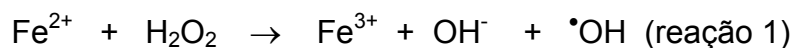
	Radicais	Não radicalais
EROs	Ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) Hidroxil ($\bullet OH$) Peroxil (RO_2^{\bullet}) Alcoxil (RO^{\bullet}) Hidroperoxil (HO_2^{\bullet})	Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) Ácido Hipocloroso ($HOCl$) Ozônio (O_3) Oxigênio singlete ($^1\Delta_g$)
ERNs	Óxido Nítrico (NO^{\bullet}) Dióxido de nitrogênio (NO_2^{\bullet})	Ácido Nitroso (HNO_2) Tetróxido de dinitrogênio (N_2O_4) Trióxido de dinitrogênio (N_2O_3) Peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$) Ácido peroxinitroso ($ONOOH$) Cátion Nitrônio (NO_2^+) Alquil peroxinitrito ($ROONO$)

Com exceção de situações incomuns como radiação ionizante, luz ultravioleta e outras formas de exposição à alta energia, os radicais livres são produzidos nas células geralmente por reações de transferência de elétrons, que podem ser ou não catalisadas por enzimas (Valko et al., 2004).

As EROs são formadas pela redução parcial do oxigênio até água, através de sucessivas reações. O $O_2^{\bullet-}$ é formado pela redução univalente do oxigênio molecular (O_2). Esse processo é mediado por enzimas tais como NADPH oxidases, xantina oxidase e citocromo P-450 ou não enzimaticamente por compostos redox-reativos tais como semi-ubiquinona, componente da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Em condições fisiológicas cerca de 1 a 3% de moléculas de oxigênio são convertidas em radical $O_2^{\bullet-}$ na mitocôndria. A enzima superóxido dismutase (SOD) converte enzimaticamente o $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 . Em tecidos biológicos, o $O_2^{\bullet-}$ pode ser convertido não

enzimaticamente às espécies não radicalares H_2O_2 e $^1\Delta_g$ (Dröge, 2002, Valko et al., 2004).

O $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 podem reagir com metais de transição tais como ferro e cobre para formar o radical $\bullet\text{OH}$ através das reações de Fenton (reação 1) e de Haber-Weiss (reação 2) (Sorg, 2004).



O $\bullet\text{OH}$ é o mais potente oxidante, podendo iniciar a peroxidação lipídica, causar quebras nas cadeias de DNA, e oxidar indiscriminadamente qualquer molécula orgânica (McCord, 2000).

O radical NO^{\bullet} é produzido pela oxidação do átomo de nitrogênio guanidino terminal da L-arginina, sendo esta reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Dependendo do microambiente, o NO^{\bullet} pode ser convertido a várias outras ERNs tais como NO^+ , NO^- ou ONOO^- (Dröge, 2002).

Pequenas quantidades de radicais livres são constantemente geradas em organismos aeróbios em resposta a estímulos externos e internos. Baixos níveis de radicais livres são indispensáveis em muitos processos bioquímicos, incluindo sinalização intracelular, na diferenciação celular e progressão do crescimento, apoptose, imunidade e defesa contra microorganismos (Matés et al., 1999).

Os organismos aeróbios possuem sistemas de defesa antioxidante, a fim de minimizar os efeitos deletérios produzidos pelas EROs e ERNs. Halliwell e Gutteridge (1999) definiram antioxidante como “uma substância que, quando presente em baixas concentrações comparada ao substrato oxidável, diminui significativamente ou previne a oxidação deste substrato”.

1.4. Defesas antioxidantes

As defesas antioxidantes compreendem: agentes capazes de remover cataliticamente radicais livres ou outras espécies reativas (SOD, catalase, peroxidase, etc); proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes tais como íons ferro e cobre (transferrinas, haptoglobulinas, etc.); proteínas que protegem biomoléculas de danos (*heat shock proteins*); e agentes de baixo peso molecular que seqüestram radicais livres de nitrogênio e oxigênio (α -tocoferol, glutathione, etc.) (Halliwell e Gutteridge, 1999).

A SOD é uma metaloenzima que catalisa a dismutação de $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 e O_2 . Nas células eucarióticas, existem 2 tipos de SOD intracelular: a CuZnSOD, que contém cobre e zinco no seu sítio ativo e é encontrada na mitocôndria, e a MnSOD, que contém manganês no seu sítio ativo e está localizada no citosol (Miller, 2004; Johnson e Giulivi, 2005). Além destas, existe a ECSOD, que está localizada na matriz extracelular e contém cobre e zinco no seu sítio ativo, sendo responsável por prevenir o dano celular e tecidual iniciado pelas EROs produzidas fora do ambiente celular (Fattman et al., 2003).

Nos animais, o H_2O_2 é detoxificado pelas enzimas catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (Matés et al., 1999). Catalases convertem H_2O_2 em água e O_2 e estão localizadas nos peroxissomos da maioria das células dos mamíferos, provavelmente servindo para destruir H_2O_2 gerado em grande quantidade pelas oxidases localizadas nestas organelas (Halliwell, 1996). A GPx catalisa a degradação do H_2O_2 , nos eritrócitos e outros tipos celulares, e é uma enzima dependente de selênio, contém um único resíduo seleno-cisteína em cada uma das 4 subunidades, que é essencial para a atividade enzimática.

Esta enzima catalisa também a redução de hidroperóxidos, utilizando a GSH, protegendo as células de danos oxidativos (Chaudière e Ferrari-Iliou, 1999; Matés et al., 1999).

A glutathione transferase (GST, também conhecida como glutathione-S-transferase) é a principal enzima de detoxificação de fase II de biotransformação encontrada principalmente no citosol. Além disso, catalisa a conjugação de substratos eletrofílicos à glutathione (GSH), podendo exercer ainda uma série de outras funções (Sheehan, 2001). Estes substratos eletrofílicos são citotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos e as GSTs constituem o maior sistema de defesa contra este tipo de substâncias (Josephy, 1997, Hayes et al., 2005).

Além das enzimas, as células também contêm outros antioxidantes que incluem compostos endógenos como a GSH, ácido úrico, ubiquinona e bilirrubina, e outros exógenos como as vitaminas E, C e A (Scandalios, 1997; Halliwell e Gutteridge, 1999). Os antioxidantes hidrofílicos, tais como a GSH e o ascorbato, são encontrados nos compartimentos citosólicos, mitocondrial e nuclear. Os antioxidantes hidrofóbicos (vitamina E, carotenóides, ubiquinol, etc.) são encontrados em lipoproteínas e membranas, onde limitam a extensão da peroxidação lipídica (Chaudière e Ferrari-Iliou, 1999).

A GSH é um tripeptídeo e possui um papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa da célula contra o estresse oxidativo (Josephy, 1997). Pode exercer efeitos antioxidantes diretos, pois reage lentamente com $O_2^{\bullet-}$ ou H_2O_2 e rapidamente com radicais peroxil, e é um poderoso seqüestrador de radicais livres de nitrogênio, tais como $ONOO^-$ (Halliwell, 1996). As propriedades seqüestradoras de radicais livres da GSH

são devidas à sua capacidade de transferir um átomo de hidrogênio do seu grupo sulfidril (SH) (Chaudière e Ferrari-Iliou, 1999).

1.4.1. Flavonóides como antioxidantes

Uma das mais proeminentes propriedades dos flavonóides é a sua excelente atividade antioxidante (Havsteen, 2002). Os flavonóides podem inibir enzimas responsáveis pela produção de $O_2^{\bullet-}$, tais como a xantina oxidase e proteína quinase C. Além disso, podem inibir a ciclooxigenase, lipoxigenase, monooxigenase microssomal e NADH oxidase, todas envolvidas na geração de EROs. Um grande número de flavonóides é capaz de quelar eficientemente traços de metais que possuem um importante papel no metabolismo do oxigênio (Pietta, 2000; Cotelle, 2001).

Devido ao seu reduzido potencial redox, flavonóides são termodinamicamente capazes de reduzir radicais livres altamente oxidados, tais como o $O_2^{\bullet-}$, peroxil, alcoxil e $\bullet OH$ pela doação de um átomo de hidrogênio. O radical flavonóide pode reagir com um segundo radical, adquirindo uma estrutura de quinona estável (Figura 3) (Pietta, 2000).

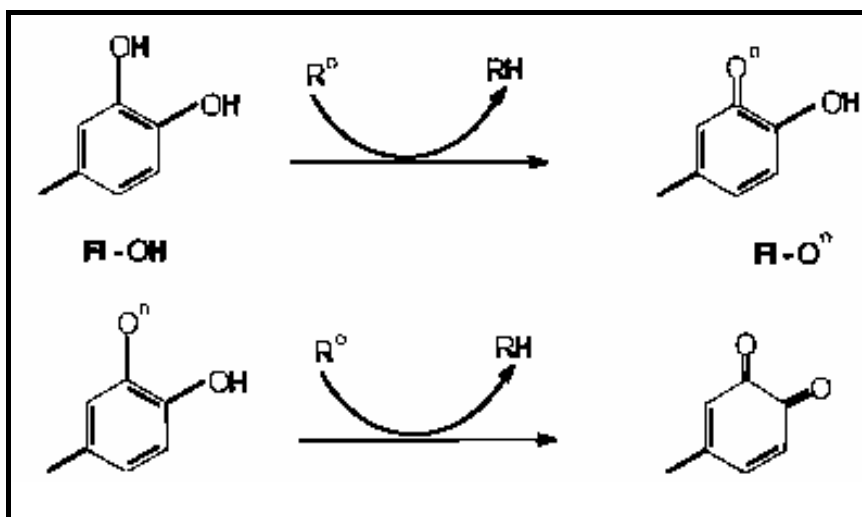


Figura 3: Seqüestro de EROs por flavonóides (Pietta, 2000).

O anel B (porção polifenólica com melhor propriedade doadora de elétrons) dos flavonóides parece ser essencial para uma boa atividade antioxidante, enquanto o anel A possui uma fraca contribuição nesta atividade (Cotelle, 2001). Flavonols e flavonas contendo um grupamento catecol no anel B são altamente ativos, sendo os flavonols mais potentes que as flavonas devido à presença do grupamento 3-hidroxil. A glicosilação deste grupo, como no caso da rutina, reduz fortemente a capacidade seqüestradora de radicais (Pietta, 2000).

Dados da literatura demonstram a atividade antioxidante de flavonóides provenientes de plantas em modelos *in vitro*, seqüestrando EROs e ERNs. (Nardi et al., 2003; Braca et al., 2003; Aniya et al., 2005). Polifenóis provenientes de chás possuem importante atividade antioxidante *in vitro*, por seqüestrar EROs e ERNs e quelar metais de transição (Frei e Higdon, 2003).

Modelos animais utilizando ratos ou camundongos também são utilizados para demonstrar a atividade de plantas ricas em flavonóides. Diversos pesquisadores avaliaram a capacidade de flavonóides em diminuir os

danos à macromoléculas e aumentar as defesas antioxidantes (Ilavarasan et al., 2003; Farombi et al., 2004; Choi et al., 2005; Ha et al., 2005; Tirkey, et al., 2005). Estudos em humanos também demonstraram importantes efeitos antioxidantes de flavonóides. Boyle e colaboradores (2000) observaram que a ingestão de flavonóides glicosilados em refeições contendo cebolas por mulheres entre 22 e 40 anos, diminuiu os níveis de biomarcadores de estresse oxidativo, especialmente o dano ao DNA.

1.5. Estresse oxidativo

As EROs existem em células e tecidos biológicos em concentrações baixas, mas mensuráveis. Suas concentrações são determinadas pelo balanço entre as taxas de produção e de degradação (*clearance*) pelos compostos antioxidantes e enzimas (Dröge, 2001).

O estresse oxidativo pode ser definido como um distúrbio entre o balanço pró-oxidante/antioxidante em favor da situação pró-oxidante, levando a um dano potencial. Esta situação pode ser resultado de uma diminuição dos antioxidantes ou aumento da produção de EROs (Halliwell e Gutteridge, 1999).

O estresse oxidativo pode contribuir significativamente para doenças inflamatórias (artrite, vasculite, glomerulonefrite, lupus eritematoso, aterosclerose), doenças isquêmicas (infarto, isquemia intestinal), hemocromatose, AIDS, enfisema, transplante de órgãos, úlcera gástrica, hipertensão e pré-eclampsia, doenças neurológicas (esclerose múltipla, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose amiotrófica lateral), alcoolismo,

diabetes, câncer e muitas outras (Matés et al., 1999; McCord, 2000; Madamanchi et al., 2005).

As células podem tolerar um leve estresse oxidativo aumentando a síntese dos sistemas de defesa antioxidante na tentativa de restaurar o balanço. Entretanto, o estresse oxidativo severo produz dano ao DNA, elevação do Ca^{2+} intracelular e ferro, dano às proteínas (incluindo transportadores de íons na membrana) e peroxidação lipídica, podendo resultar em injúria e morte celular (Halliwell, 1996).

O alvo celular primário do estresse oxidativo depende do tipo celular, da natureza do estresse imposto (oxidante radical ou não radical), local de geração (intra ou extracelular), proximidade das espécies reativas do local específico e severidade do estresse (Dalle-Donne et al., 2003a).

Espécies reativas podem reagir diretamente com as proteínas ou com moléculas tais como açúcares e lipídeos, gerando produtos que então reagem com as proteínas. Podem ocorrer oxidações e clivagem das ligações peptídicas ou modificações nas cadeias laterais das proteínas. As modificações oxidativas, originando grupos carbonil (aldeídos e cetonas), geralmente causam perda da estrutura e função catalítica das proteínas afetadas, levando à efeitos deletérios na função das células e órgãos (Levine, 2002; Stadtman e Levine, 2003). O conteúdo de proteína carbonilada é atualmente um indicador geral e por muito tempo utilizado como marcador da oxidação protéica, e o acúmulo destas proteínas tem sido observado em várias doenças incluindo doença de Alzheimer, diabetes, aterosclerose, artrite reumatóide, catarata, entre outras (Dalle-Donne et al., 2003b, Requena et al., 2003, Halliwell e Whiteman, 2004).

Ácidos graxos insaturados são altamente susceptíveis ao ataque de radicais livres (Rice-Evans, 1995). O processo de peroxidação lipídica está dividido em três fases: iniciação, propagação e degradação (Figura 4). Iniciação é o ataque a um ácido graxo por qualquer espécie química, como o radical hidroxil, que possui reatividade suficiente para abstrair um átomo de hidrogênio (H) do grupo metileno ($-\text{CH}_2-$), levando à formação de um radical centrado em carbono ($-\dot{\text{C}}\text{H}-$). Em seguida, ocorre um rearranjo molecular deste radical com formação de um produto mais estável, o dieno conjugado, que por sua vez, pode sofrer várias reações. A mais provável é a reação com o oxigênio que forma um radical peroxila ($\text{RO}_2\cdot$). Os radicais peroxila também são capazes de abstrair átomos de hidrogênio de moléculas lipídicas, formando novos radicais peroxila e lipoperóxidos, o que é conhecido como fase de propagação. Em situações de dano celular, a peroxidação também é favorecida pela síntese enzimática de lipoperóxidos pelas ciclooxigenases e lipoxigenases. Os lipoperóxidos são compostos bastante estáveis. No entanto, na presença de complexos de metais de transição, como os sais de cobre e ferro, sua decomposição é acelerada e leva à formação de radicais alcoxil ($\text{RO}\cdot$), pela quebra da ligação O-O, e peroxila, pela abstração de um hidrogênio (Halliwell e Gutteridge, 1999).

As potenciais consequências da peroxidação em membranas lipídicas incluem a perda de ácidos graxos poliinsaturados, diminuição da fluidez lipídica, alteração da permeabilidade da membrana, efeitos em enzimas associadas a membranas, alterações no transporte de íons, liberação de matérias de compartimentos celulares e geração de metabólitos citotóxicos de hidroperóxidos lipídicos (Rice-Evans, 1995; Niki et al., 2005).

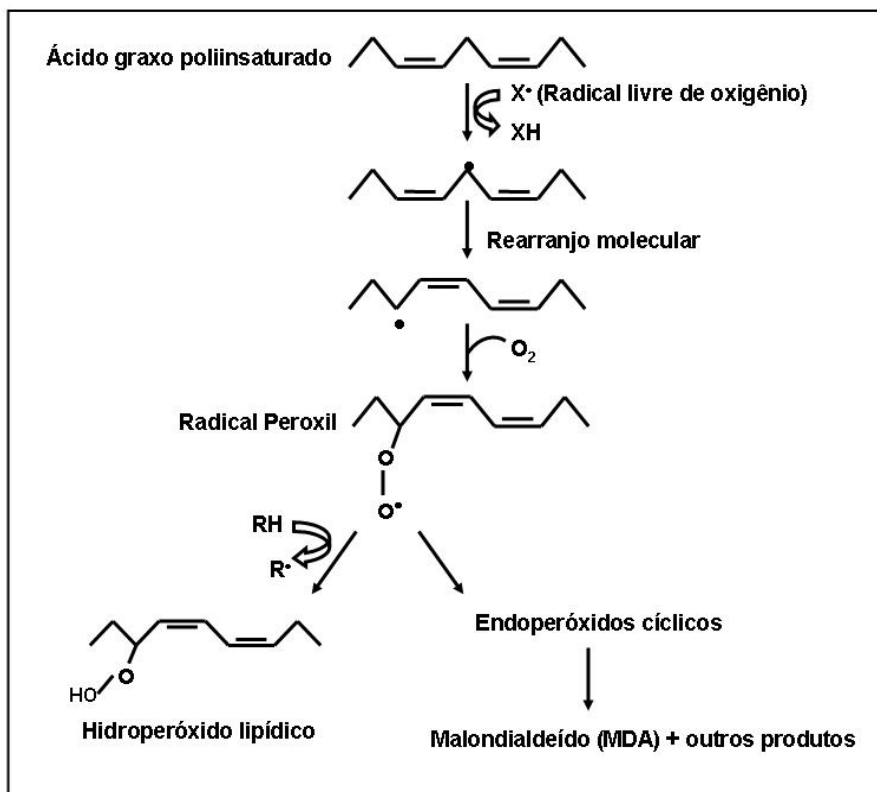


Figura 4: Reações de iniciação e propagação da peroxidação lipídica. Adaptado de Halliwell e Gutteridge (1999).

O dano ao DNA, produzido por radicais livres, inclui modificações de todas as bases, deleções, mudança na estrutura, quebra de cadeias, ligações cruzadas entre proteínas e DNA e rearranjo cromossomal (Higuchi, 2003). O radical $\bullet OH$ é o principal responsável pelo dano, reagindo com todos os componentes do DNA: as bases, purina e pirimidina, e a desoxirribose (Dizdaroglu et al., 2002; Valko et al., 2004). Este radical se liga às duplas ligações das bases de DNA e abstrai um átomo de hidrogênio do grupamento metil da tiamina e de cada uma das ligações C-H da desoxirribose (Evans et al., 2004).

O dano oxidativo ao DNA parece estar relacionado ao aumento do risco de câncer (Halliwell, 2002). Estudos têm demonstrado níveis elevados de DNA modificado oxidativamente em muitos tumores, reforçando o fato de que

eventos oxidativos são responsáveis por mutações espontâneas sendo implicados na etiologia do câncer (Evans et al., 2004).

1.6. Endotélio e regulação do tônus vascular

O endotélio vascular consiste em uma única camada de células endoteliais que reveste a superfície luminal de todos os vasos do sistema vascular (Michiels et al., 2003; Bryan et al., 2005). Hoje é reconhecido não somente como uma barreira física entre o sangue e a parede vascular, mas também como um importante e estrategicamente localizado órgão com múltiplas funções endócrinas e parácrinas (Rubio e Morales-Segura, 2004). Em condições fisiológicas, o endotélio atua como um regulador inibitório da contração vascular, adesão de leucócitos, crescimento do músculo liso vascular e agregação plaquetária, através da produção de várias moléculas biologicamente ativas (Landmesser et al., 2004; Rubio e Morales-Segura, 2004).

As células endoteliais secretam mediadores vasodilatadores em resposta a substâncias liberadas de nervos sensoriais e autonômicos (acetilcolina, noradrenalina, ATP, substância P), hormônios circulantes (catecolaminas, vasopressina, angiotensina II, insulina), derivados da coagulação e produtos plaquetários (serotonina, ADP, trombina) ou produtos autacóides produzidos pelo endotélio e músculo liso vascular (bradicinina, ADP/ATP/UTP, angiotensinas, endotelina). Além disso, mudanças no estresse de cisalhamento provocam vasodilatação dependente do endotélio (Mombouli e Vanhoute, 1999).

1.6.1. Óxido Nítrico

Furchgott e Zawadzki (1980) foram os primeiros a descrever o relaxamento vascular dependente do endotélio, através do qual acetilcolina relaxa preparações isoladas de vasos sanguíneos somente se a camada de células endoteliais estiver presente e intacta. Estudos subsequentes demonstraram que a acetilcolina e outros agentes (incluindo bradicinina, histamina, e serotonina) liberam um fator (Fator Relaxante Derivado do Endotélio - EDRF) instável, que atua via ativação da guanilato ciclase solúvel e é inibido pela hemoglobina e pelo azul de metileno (Furchgott et al., 1984). Em 1987, Furchgott propôs que o EDRF poderia ser o NO e neste mesmo ano, Palmer e colaboradores (1987) conseguiram detectar baixas quantidades de NO geradas nas células endoteliais vasculares quando estimuladas com bradicinina.

O NO é sintetizado por muitos tipos celulares pela conversão de L-arginina à L-citrulina, pela ação da enzima NO sintase (NOS). Existem 2 isoformas de NOS constitutivas, dependentes de cálcio/calmodulina, a NOS neuronal (nNOS) e a NOS endotelial (eNOS), e uma isoforma induzível (iNOS), não dependente de cálcio, que é expressa em macrófagos e outros tecidos após estímulos imunológicos (Moncada e Higgs, 2006). Todas as isoformas das NOS descritas requerem dinucleotídeo fosfato de nicotinamida adenina reduzida (NADPH), L-arginina e oxigênio molecular como substratos e flavina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e tetrahydrobiopterina (TBH₄) como cofatores, liberando NO e L-citrulina como produtos (Schulz e Triggle, 1994).

Nas células endoteliais, a NOS está ligada à membrana celular, associada às cavéolas, sendo negativamente regulada pela caveolina (Gewaltig e Kojda, 2002). A estimulação das células endoteliais por agonistas provoca dissociação do complexo NOS/caveolina e permite a ligação e ativação da NOS por Ca^{2+} /calmodulina (Fleming e Busse, 1999; Mombouli e Vanhoutte, 1999). Nas células endoteliais, a ativação da eNOS é estimulada por vários mediadores físicos e bioquímicos, como forças hemodinâmicas (estresse de cisalhamento), trombina, bradicinina, substância P, ADP, acetilcolina e insulina (Naderali e Williams, 2003).

O relaxamento do músculo liso vascular pelo NO envolve a estimulação da guanilato ciclase solúvel e conseqüentemente aumento na formação de GMPc. O GMPc ativa um proteína quinase que aumenta na extrusão de Ca^{2+} do citosol no músculo liso vascular, inibindo da maquinaria contrátil (Figura 5) (Mombouli e Vanhoutte, 1999).

Além de seu efeito vasodilatador, o NO inibe a agregação plaquetária e a proliferação do músculo liso vascular e regula a interação entre os leucócitos e a parede do vaso sanguíneo. O NO é considerado um regulador da homeostase vascular e sua ausência contribui de modo importante para um grande número de condições e estados patológicos, tais como hipertensão e vasoespamos (Rubio e Morales-Segura, 2004; Moncada e Higgs, 2006).

1.6.2. Outros mediadores derivados do endotélio: prostaciclina e EDHF

A prostaciclina é produzida no endotélio vascular, a partir do ácido araquidônico, pela ação da enzima ciclooxigenase (COX). Seus receptores na célula muscular lisa vascular estão acoplados à adenilato ciclase, aumentando os níveis de AMPc. Este por sua vez estimula canais de K^+ sensíveis ao ATP e causa hiperpolarização da membrana celular e inibição do desenvolvimento da contração. O AMPc também aumenta a extrusão de Ca^{2+} do citosol no músculo liso vascular e inibe a maquinaria contrátil. Além disso, a ação da prostaciclina pode ser potencializada pelo NO (Salvemini et al., 1997; Ding e Triggle, 2004; Parkington et al., 2004).

Além da prostaciclina e do NO, o Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio (EDHF) também está envolvido no relaxamento do músculo liso vascular (Félétou e Vanhoutte, 2004). Existem evidências de que as respostas mediadas pelo EDHF são iniciadas por um aumento na concentração de Ca^{2+} endotelial e conseqüente ativação de canais de K^+ de baixa e média condutância, que leva à hiperpolarização das células musculares lisas (Figura 5) (Busse et al., 2002).

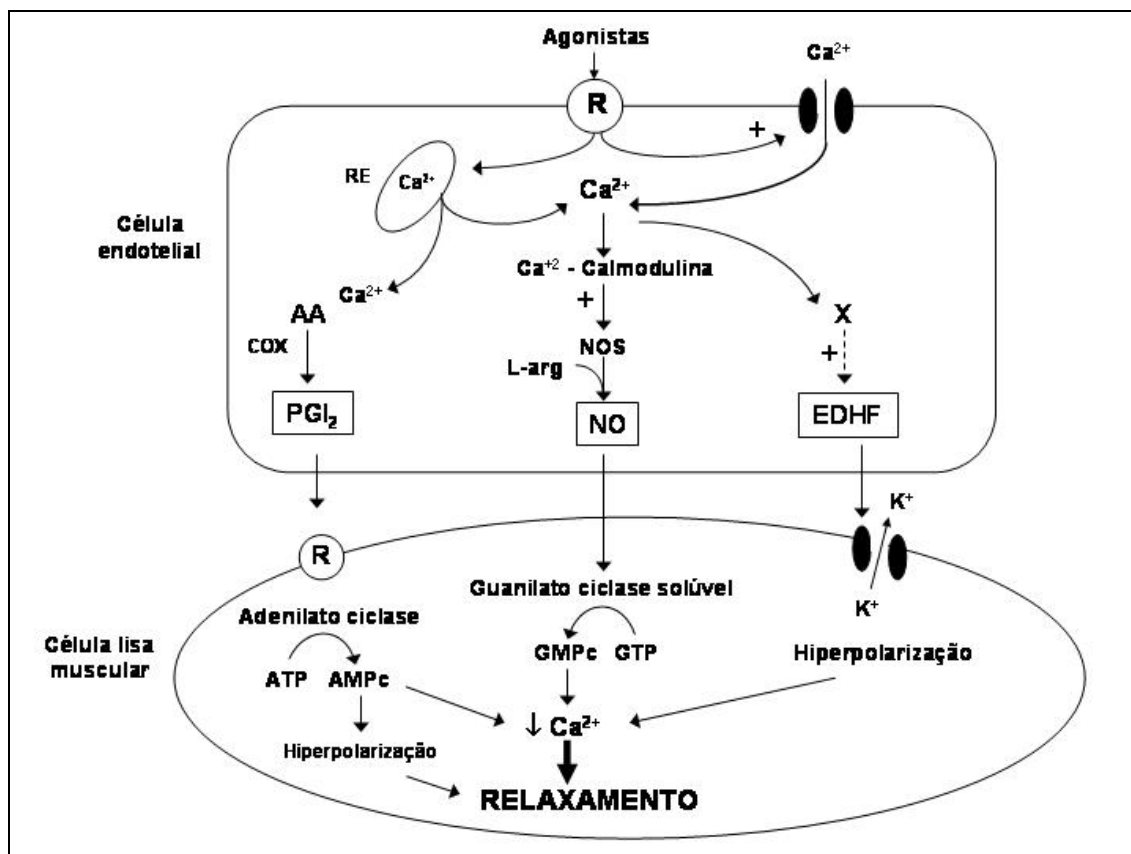


Figura 5: Esquema resumido representando a liberação de fatores vasodilatadores derivados do endotélio e seu efeito na célula muscular lisa vascular. RE = retículo endoplasmático, R = receptor, PGI_2 = prostaciclina, NO = óxido nítrico, EDHF = Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio, COX = ciclooxigenase. Adaptado de Mombouli e Vanhoute (1999) e Vanhoute (2004).

1.7. Estresse oxidativo e doenças cardiovasculares

Em condições fisiológicas, EROs são produzidas de maneira controlada, em baixas concentrações, e funcionam como moléculas sinalizadoras regulando a contração e o relaxamento das células do músculo liso vascular e o seu crescimento. Sob condições patológicas a produção aumentada de EROs leva à disfunção endotelial, aumentando a contratilidade, o crescimento e a apoptose do músculo liso vascular, migração de monócitos, peroxidação lipídica, inflamação, e aumentando a deposição de proteínas da

matriz extracelular, contribuindo para o dano vascular na doença cardiovascular (Griendling e Fitzgerald, 2003; Touyz e Schiffrin, 2004).

EROs vasculares são produzidas no endotélio, adventícia e célula muscular lisa e derivadas predominantemente da NADPH oxidase, que é uma enzima que catalisa a produção de $O_2^{\bullet-}$ pela redução de um elétron do oxigênio, usando NADPH como doador de elétron (Stocker e Keaney Jr, 2005). Outras fontes capazes de gerar EROs são a NOS, xantina oxidase, citocromo P450, enzimas da cadeia respiratória mitocondrial e mieloperoxidase derivada de fagócitos (Taniyama e Griendling, 2003).

As EROs possuem um papel fisiopatológico importante no desenvolvimento da hipertensão, em parte devido ao excesso de $O_2^{\bullet-}$ e diminuição da biodisponibilidade do NO na vasculatura e rins e ao remodelamento cardiovascular mediado pelas EROs. O tratamento com antioxidantes melhora a estrutura e função vascular, prevenindo o dano ao órgão alvo, e reduzindo a pressão arterial em modelos animais e na hipertensão humana (Sato et al., 2002; Touyz, 2004; Touyz e Schiffrin, 2004).

O prejuízo da vasodilatação mediada pelo endotélio na hipertensão está ligado à diminuição da biodisponibilidade do NO. Isso pode ser secundário à diminuição da síntese de NO e/ou ao aumento da sua degradação devido à interação com $O_2^{\bullet-}$ para formar $ONOO^-$. O $ONOO^-$, uma espécie reativa altamente tóxica, é um fraco vasodilatador comparado ao NO e tem propriedades pró-inflamatórias (Ceconi et al., 2003; Ogita e Liao, 2004).

O $O_2^{\bullet-}$, além de inativar diretamente o NO, na presença de metais de transição, pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados na molécula LDL (Carr e Frei, 2000). LDLs modificadas podem ser facilmente

absorvidas por macrófagos e tornarem-se tóxicas para o endotélio vascular. Este processo pode desencadear a formação de placas ateroscleróticas (Moline et al., 2000; Stocker e O'Halloran, 2004).

Sabe-se que a aterosclerose desempenha um papel determinante no desenvolvimento de infarto do miocárdio, derrame cerebral, falência renal e gangrena, além de estar associada à perda de função nas extremidades, fatos estes que evidenciam o grau de importância desta patologia no contexto médico atual (Ross, 1993; Glass e Witztum, 2001).

1.7.1. Flavonóides e doenças cardiovasculares

Devido à relação entre o aumento do estresse oxidativo na vasculatura e o prejuízo da função vasodilatadora endotelial, pesquisadores têm considerado a possibilidade de que o aumento das defesas antioxidantes poderia ser benéfico. Nos últimos anos, um grande número de estudos tem examinado o efeito de suplementações com antioxidantes, tais como vitaminas E e C, na função endotelial (Tomasian et al., 2000).

Crescentes evidências epidemiológicas sugerem a existência de uma correlação negativa entre o consumo de alimentos (frutas, vegetais, chocolate, etc.) e bebidas (vinho, especialmente vinho tinto, suco de uva, chás, etc.) ricos em polifenóis e a incidência de doenças cardiovasculares e infarto (Stoclet et al., 2004).

A pesquisa de flavonóides foi impulsionada com a descoberta do Paradoxo Francês, isto é, o baixo índice de mortalidade por doenças cardiovasculares observado em populações do Mediterrâneo em associação

com o consumo de vinho tinto e uma dieta rica em gordura saturada. Os efeitos benéficos do vinho tinto podem ser atribuídos em grande parte ao seu conteúdo de compostos fenólicos, principalmente os flavonóides (Estruch, 2000; Nijveldt et al., 2001; Iijima et al., 2002; Schuldt, 2005).

Várias propriedades químicas e efeitos biológicos dos polifenóis da dieta podem estar envolvidos na proteção contra o risco cardiovascular. Uma hipótese é que as propriedades antioxidantes dos flavonóides podem proteger os vasos sanguíneos das conseqüências deletérias do estresse oxidativo associado a muitos se não todos os fatores de risco cardiovasculares (Stoclet et al., 2004).

O estresse oxidativo está envolvido na patogenia da aterosclerose, assim a utilização de flavonóides antioxidantes pode ser benéfica (Morton et al., 2000). Estudos têm demonstrado que flavonóides podem inibir a modificação oxidativa das LDLs através de dois mecanismos: inibindo a hidroxilação da LDL ou prevenindo a oxidação do α -tocoferol, que está presente nas lipoproteínas. Assim, bloqueando a oxidação da LDL, diminui a formação de placas ateroscleróticas e reduz o espessamento da parede arterial. Além disso, flavonóides podem diminuir a agregação plaquetária, diminuindo os riscos de trombose (Moline et al., 2000).

Ao lado da sua atividade antioxidante direta ou por estimulação dos mecanismos de defesa endógenos, que pode diminuir a LDL circulante e a oxidação de lipídeos de membrana e suas conseqüências deletérias nas células endoteliais, certos polifenóis com estruturas específicas podem melhorar a função endotelial (pelo aumento do NO, EDHF e prostaciclina e pela diminuição da formação de endotelina-1) e inibir a angiogênese, migração

e proliferação das células vasculares (Stoclet et al., 2004). Benito e colaboradores (2002) verificaram que a ingestão de uma dieta rica em flavonóides (quercetina e catequina) melhorou o relaxamento dependente do endotélio vascular em aorta isolada de rato, pelo aumento na produção de NO nos vasos dos animais tratados.

Vários estudos utilizando flavonóides de diferentes fontes tem demonstrado sua atividade vasodilatadora dependente do endotélio, que está geralmente associada ao aumento na formação de GMPc e é bloqueada por inibidores da NOS, indicando que é mediado pela via NO/GMPc (Herrera et al., 1996; Andriambelason et al., 1997; Huang et al., 2004).

Além de interferir na via do NO/GMPc flavonóides podem tem um efeito vasodilatador através de outros mediadores, como o EDHF (Tirapelli et al., 2004; Schuldt et al., 2005) e a prostaciclina (Ajay et al., 2003).

Com base em dados da literatura, que demonstram as propriedades terapêuticas de flavonóides e plantas ricas neste grupo de compostos, o presente trabalho propõe o estudo de *Cyathea phalerata*, através da avaliação do seu potencial antioxidante e vasodilatador, utilizando ensaios bioquímicos e farmacológicos, respectivamente.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante do extrato bruto e de frações obtidas do caule de *Cyathea phalerata*, utilizando modelos *in vitro*, e a atividade antioxidante da fração acetato de etila (FAE), utilizando modelos *in vivo*. Além disso, procurou-se investigar a atividade farmacológica da FAE sobre a reatividade vascular, utilizando o modelo de aorta torácica isolada de rato.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* do extrato bruto (EB), fração precipitado (PPT), fração aquosa (FAQ), fração n-butanol (FBU) e fração acetato de etila (FAE) de *Cyathea phalerata*, utilizando os ensaios de capacidade seqüestradora dos radicais DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazina), $O_2^{\bullet-}$ e $\bullet OH$, e de peroxidação lipídica;
- Avaliar o estresse oxidativo (fragmentação do DNA, peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas) e as defesas antioxidantes (concentração de GSH, atividade de CAT e GST), em camundongos pré-tratados com a FAE de *Cyathea phalerata* e expostos ao tetracloreto de carbono (CCl_4);
- Investigar a atividade farmacológica do EB e da FAE de *Cyathea phalerata* com relação à sua capacidade vasorrelaxante, em preparações isoladas de

anéis de aorta torácica isoladas de ratos, bem como envolvimento da via NO/GMPc e da prostaciclina nas ações da FAE;

- Analisar a influência da incubação prévia da FAE na contração induzida pela fenilefrina e no relaxamento induzido pelo doador de NO, nitroprussiato de sódio;
- Relacionar a atividade antioxidante (*in vitro* e *in vivo*) com os resultados obtidos nos experimentos farmacológicos em anéis de aorta torácica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Animais

Para os ensaios de atividade antioxidante *in vivo* foram utilizados camundongos Swiss machos, pesando entre 30 e 40 gramas (6 - 8 semanas). Já para os ensaios de peroxidação lipídica *in vitro* e reatividade vascular foram utilizados ratos Wistar machos (10 - 12 semanas), pesando entre 200 e 250 gramas. Todos os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, CCB – UFSC, em temperatura controlada de 22 ± 2 °C (ratos) e 21 ± 2 °C (camundongos), em ciclo claro/escuro de 12 horas, com livre acesso à água e ração. Os animais permaneceram no laboratório durante um período de pelo menos 24 horas antes da realização dos ensaios.

Os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina e estão cadastrados sob os números 330/CEUA e 002728/2005-41/UFSC, e PP00052 e 23080.015491/2006-40/UFSC.

3.1.2. Fármacos e Reagentes

Foram utilizadas as seguintes fármacos e reagentes: acetilcolina, ácido nitrilotriacético (NTA), ácido sulfossalicílico, ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido tricloroacético (TCA), ácido tungstosalicílico, albumina bovina, agarose de baixo ponto de fusão (LMPA), cloridrato de fenilefrina, desoxirribose, 1,1-difenil-2-picril hidrazina (DPPH), 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH), dimetil sulfóxido (DMSO), DTNB, formaldeído, glicerol, hidroperóxido de cumeno, indometacina, L-arginina, laurilsarcosinato de sódio, L^w-nitro-L-arginina (L-NOARG), nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), metassulfato de fenazina, nitro blue tetrazolium (NBT), 1H-[1,2,4]oxidiazolol[4,3- α]quinoxalin-1-ona (ODQ), peróxido de terc-butila, rutina, sulfato ferroso, sulfato de atropina, tetracloreto de carbono, Triton X-100 e xilenol laranja adquiridos junto à Sigma Chemical Company (St. Louis, EUA). Ácido clorídrico, bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, cloreto de cálcio, cloreto de potássio, cloreto de sódio, etanol, hidróxido de sódio, manitol, nitrato de prata, nitroprussiato de sódio, sulfato de cobre, sulfato de zinco e tartarato de sódio e potássio adquiridos junto à Nuclear (Diadema - SP, Brasil). Cloreto de magnésio, glicose anidra, glutationa reduzida (GSH) e reativo de Folin adquiridos da Merck S.A. (Rio de Janeiro - RJ, Brasil). Ácido acético, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, cloreto férrico, EDTA, fosfato de potássio monobásico, fosfato de potássio dibásico, nitrato de amônio e peróxido de hidrogênio adquiridos da Reagen (Rio de Janeiro - RJ, Brasil). Agarose de ponto de fusão médio (NMPA) e Tris adquiridos da Gibco (New York, EUA), superóxido dismutase adquirida da Roche (São Paulo - SP, Brasil).

3.1.3. Material Botânico

O caule de *Cyathea phalerata* Mart. foi coletado no Alto do Aririú, no município de Palhoça - SC e identificado no Herbário da Universidade Federal do Rio de Janeiro pela Professora Dra. Lana Silvestre, cuja catalogação está sob o número RBR 4287. O extrato bruto e as frações de *Cyathea phalerata* Mart. foram preparados e caracterizados pelo Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.2. Métodos

3.2.1. Preparo do extrato bruto e das frações *Cyathea phalerata*

O caule fresco (9,18 kg) foi picado em pequenos pedaços de até 3 cm e macerado em etanol 92,5% durante 15 dias por duas vezes consecutivas. O extrato bruto (EB) resultante foi então concentrado em rotaevaporador a temperatura controlada de até a 55°C, até iniciar a formação de precipitado. O extrato bruto concentrado foi deixado em repouso por 24 h sob refrigeração (5 °C) e o precipitado formado foi filtrado em papel filtro para obter um sólido de coloração marrom escuro (PPT) (48 g). O filtrado aquoso (EAQ) resultante deste procedimento (141 g) foi submetido a um particionamento líquido-líquido seqüencial com acetato de etila e n-butanol. Este procedimento resultou na obtenção das frações acetato de etila (FAE) (2,94g), n-butanol (FBU) (18 g) e aquosa (FAQ) (116 g) (Figura 6).

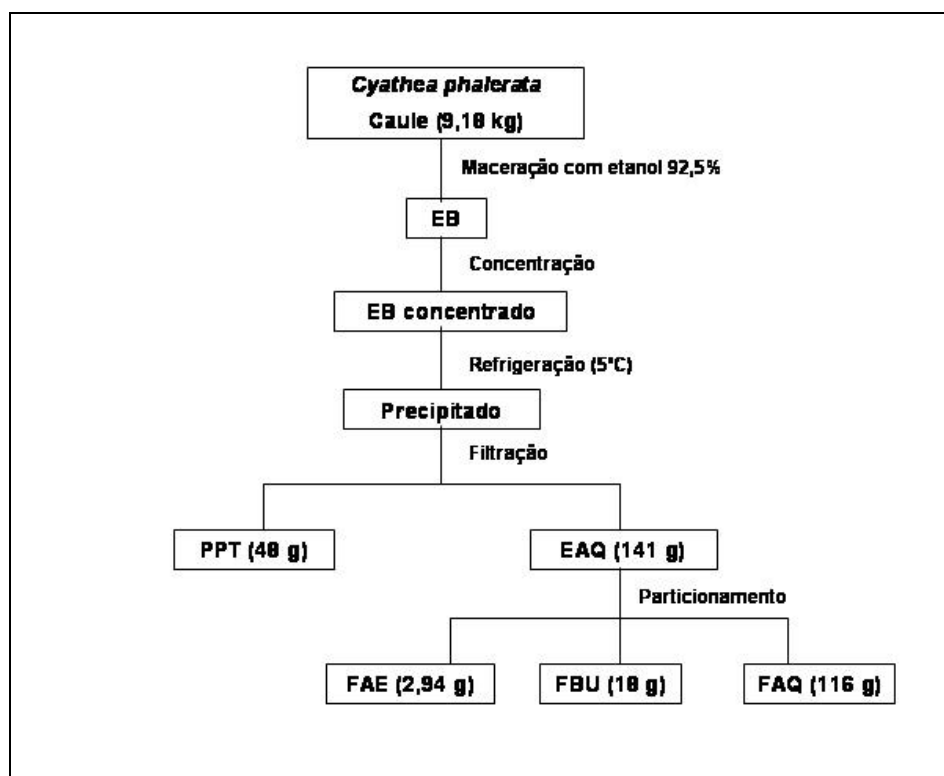


Figura 6: Fluxograma de preparo do extrato bruto e das frações de *Cyathea phalerata*.

3.2.2. Caracterização química de *Cyathea phalerata*

O extrato bruto, preparado a partir do caule fresco, foi separado em quatro frações conforme descrito no item anterior: precipitado (PPT), fração solúvel em acetato de etila (FAE), fração solúvel em n-butanol (FBU) e fração aquosa (FAQ). Estas frações foram individualmente submetidas a sucessivos fracionamentos por cromatografia em coluna de sílica gel (70 - 230 e 230 - 400 mesh), utilizando como eluente misturas de hexano, acetato de etila, etanol e metanol com gradiente de polaridade crescente. Após a reunião das frações por similaridade em cromatografia de camada fina, seguido de purificação (para alguns compostos) por recristalização em acetona, metanol e metanol-água obteve-se 8 compostos. Seis compostos glicosídeos contendo o kanferol, ácido caféico, ácido cumárico, sitosterol e ácido 3,4-dihifroxibenzóico como

agliconas: kanferol 3-O- α -L-rhamnopiranosil (1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosídeo, ácido 4-O- β -D-glicopiranosilcafeico, ácido 4-O- β -D-glicopiranosil-p-cumárico, sitosterol- β -D-glucoside, composto 3,4-dihidroxibenzoato de 1'-glicosila; e os demais β -sitosterol, kanferol, etilgalactoside.

A caracterização foi realizada com base nos dados espectroscópicos de IV (infravermelho), MASSAS, RMN de ^1H , ^{13}C , APT e HETCOR, HMQC e HMBC e confirmado com dados da literatura.

Na FAE foi encontrado o composto 3-O- α -L-rhamnopiranosil (1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosídeo, isolado pela primeira vez na família Cyatheaceae, representando 51,26% desta fração (composto majoritário). Além deste, foram encontrados nessa fração os compostos ácido 4-O- β -D-glicopiranosilcafeico, etilgalactoside, β -sitosterol e kanferol, em menores quantidades (Figura 7). Na FBU também foram identificados os compostos 3-O- α -L-rhamnopiranosil (1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosídeo (rendimento de 16,47 %) e 4-O- β -D-glicopiranosilcafeico, em quantidades inferiores.

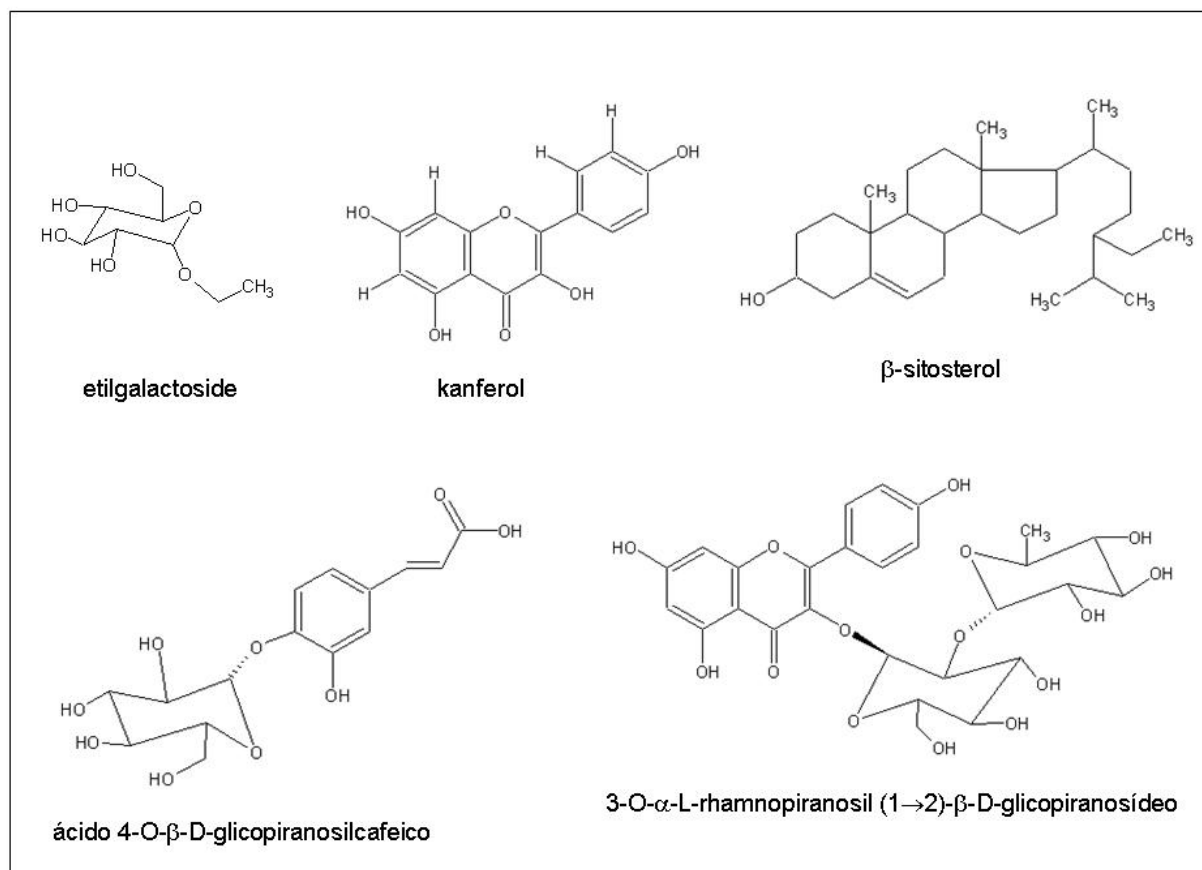


Figura 7: Estruturas químicas dos compostos presentes na FAE de *Cyathea phalerata*.

3.2.3. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de *Cyathea phalerata*

3.2.3.1. Determinação da atividade seqüestradora do EB e das frações de *Cyathea phalerata* sobre o radical DPPH

A atividade seqüestradora do radical 1,1-difenil-2-picril hidrazina (DPPH) foi avaliada pela medida da extinção de sua absorção máxima em 517 nm (Mensor et al., 2001). O procedimento constituiu-se em incubação de uma solução etanólica de DPPH (3 mM), durante 30 minutos à temperatura ambiente, com concentrações crescentes (1; 3; 10; 30 e 100 µg/mL) de EB, PPT, FAQ, FBU e FAE de *Cyathea phalerata* ou de rutina (controle positivo, 50

$\mu\text{g/mL}$). Após esse período foi feita a leitura espectrofotométrica em 517 nm contra um branco contendo apenas etanol. O controle negativo foi obtido pela adição do DDPH na ausência do EB e das frações. Os ensaios foram realizados em triplicata e o percentual seqüestrador do radical DPPH foi calculado em termos de porcentagem de atividade antioxidante (AA%), conforme fórmula abaixo:

$$\text{AA\%} = 100 - \{[(\text{Abs. amostra} - \text{Abs. branco}) \times 100] / \text{Abs. controle}\}$$

Os resultados foram expressos como médias percentuais da atividade antioxidante \pm Erro Padrão da Média (EPM).

3.2.3.2. Determinação da capacidade seqüestradora do EB e das frações de *Cyathea phalerata* sobre o radical Ânion Superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$)

Para avaliar a capacidade seqüestradora do radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ foi utilizado o sistema fenazina-metasulfato-NADH para geração deste radical, segundo Robak e Gryglewski (1988). O meio de reação consistiu de metasulfato de fenazina, nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) e nitro blue tetrazolium (NBT) em tampão fosfato. Em tubos de “Eppendorf”, foram adicionados 50 μL de solução de NBT (600 μM), 50 μL de solução de NADH (100 μM), 50 μL de H_2O (controle) ou SOD (controle positivo, 100 U/mL) ou 50 μL de concentrações crescentes de EB, PPT, FAQ, FBU e FAE (10; 30; 100; 300 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, concentração final) e 240 μL de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,8), antes da adição de 10 μL de metassulfato de fenazina (10 μM). Após 2 min à temperatura ambiente, a reação foi interrompida pela adição de 100 μL de solução de HCl (0,01 N). A absorbância do tubo controle foi medida a 560

nm contra o branco da reação, o qual não continha a solução de metassulfato de fenazina e a absorbância dos tubos com o EB e as frações foi medida contra um branco específico, contendo a mesma concentração destes, porém sem o metassulfato de fenazina. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média \pm EPM das porcentagens de redução do NBT, sendo considerado 100 % de redução a reação controle na ausência do EB e das frações. As porcentagens foram calculadas de acordo com a fórmula:

$$\text{Redução do NBT (\%)} = [(\text{Abs. amostra} - \text{Abs. branco}) \times 100] / \text{Abs. controle}$$

3.2.3.3. Inibição dos danos oxidativos à desoxirribose induzidos pelo radical $\cdot\text{OH}$, pelo EB e frações de *Cyathea phalerata*

O sistema gerador do radical $\cdot\text{OH}$ utilizado para a detecção de danos oxidativos à desoxirribose foi realizado de acordo com o método descrito por Nishida e colaboradores (1991). A detecção dos produtos de oxidação da desoxirribose foi realizada conforme a descrição de Halliwell e Gutteridge (1981). Neste ensaio, o radical $\cdot\text{OH}$, gerado através da reação do Fe^{2+} com o ácido nitrilotriacético (NTA) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Reação de Fenton), é capaz de oxidar a desoxirribose. O produto dessa oxidação (malondialdeído, MDA) reage prontamente com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando um produto corado que é medido espectrofotometricamente (Halliwell e Gutteridge, 1981).

Os ensaios foram realizados em triplicata, num volume final de 1,2 mL, em tubos de 10 mL. Inicialmente, para a formação do quelato, foram

adicionados 25 μL de solução de FeCl_3 (25 μM) e 100 μL da solução estoque de NTA (100 μM), permanecendo por 10 min à temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado 605 μL de água destilada, 150 μL de tampão fosfato (0,01 M, pH 7,4), 100 μL de solução de desoxirribose (2,8 mM), 120 μL de H_2O (controle) ou manitol (controle positivo, 1 mM) ou 120 μL de concentrações crescentes de EB, PPT, FAQ, FBU ou FAE (0,1; 1; 10; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, concentração final) e por último 100 μL de H_2O_2 (1,4 mM). Os tubos foram mantidos por 20 min em banho-maria a 37 °C. A reação para quantificação dos produtos de oxidação foi realizada pela adição de 1 mL de TBA (1 %) e 1 mL de ácido tricloroacético (TCA, 2,8 %). Os tubos foram mantidos por mais 15 min à temperatura de 100°C para a formação do produto corado e ao final do tempo, resfriados em banho de gelo. Os ensaios foram realizados em triplicata e a absorbância do tubo controle foi medida a 532 nm contra um branco contendo todos os reagentes, com exceção da desoxirribose. A absorbância de cada tubo teste foi medida contra um branco específico, contendo a mesma concentração do EB e das frações. Os resultados foram expressos como média \pm EPM das porcentagens da degradação da desoxirribose, considerando-se os valores médios da absorbância do controle, sem a presença do EB e frações, como 100 % da degradação. As porcentagens foram calculadas de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Degradação da Desoxirribose (\%)} = [(\text{Abs. amostra} - \text{Abs. branco}) \times 100] / \text{Abs. controle}$$

3.2.3.4. Avaliação da inibição da peroxidação lipídica pelo EB e frações de *Cyathea phalerata*

A inibição da peroxidação lipídica foi testada usando-se homogenato de fígado de ratos, segundo o método de Chen e Tappel (1996) com modificações. Ratos Wistar machos foram sacrificados por deslocamento cervical, a cavidade abdominal foi aberta e o fígado foi retirado após ser perfundido com solução salina (NaCl 0,9 %). Aproximadamente 3,0 g de fígado foram homogeneizadas em 9 mL de tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0 em KCl 140 mM. O homogenato obtido foi centrifugado durante 15 min a 3.500 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi congelado a -20°C e utilizado posteriormente para os ensaios de peroxidação lipídica.

Neste ensaio, o agente oxidante é o *tert*-butilhidroperóxido que abstrai o átomo de hidrogênio dos ácidos graxos mono e poliinsaturados dando início ao processo de peroxidação lipídica. Os ensaios foram realizados em triplicata, num volume final de 1,0 mL. Em tubos de ensaio, foram adicionados seqüencialmente 125 µL de tampão fosfato (80 mM, pH 7,4), 150 µL de homogenato de fígado de ratos, 100 µL de H₂O (controle) ou BHT (controle positivo, 1 mM) ou 100 µL de concentrações crescentes de EB, PPT, FAQ, FBU e FAE (1; 3; 10; 30; 100 µg/mL, concentração final), 100 µL de *tert*-butilhidroperóxido (0,1 mM) e água deionizada (volume necessário para completar 1,0 mL). Os tubos foram mantidos sob agitação por 2 horas a 37°C. A reação de quantificação dos produtos de peroxidação lipídica foi realizada pela adição de 1 mL de TBA (1 %) e 1 mL de ácido tricloroacético (TCA, 2,8 %). Os tubos foram mantidos por 15 min à temperatura de 100°C para a formação do cromóforo e ao final do tempo, resfriados imediatamente em

banho de gelo e centrifugados por 5 min a 3.500 rpm. A absorbância do tubo controle foi medida em 532 nm contra o branco contendo todos os reagentes, com exceção do homogenato de fígado de ratos. A absorbância dos tubos teste foi medida contra um branco específico, contendo a mesma concentração do EB e das frações. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos como média \pm EPM das porcentagens de peroxidação lipídica, considerando-se os valores médios da absorbância do controle sem a presença do EB e frações como 100 % peroxidação lipídica. As porcentagens foram calculadas de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Peroxidação lipídica (\%)} = \frac{[(\text{Abs. amostra} - \text{Abs. branco}) \times 100]}{\text{Abs. controle}}$$

3.2.4. Atividade antioxidante de *Cyathea phalerata in vivo* e indicadores de estresse oxidativo

Os camundongos foram divididos em 6 grupos (6 - 8 animais por grupo) e tratados por via oral durante 10 dias, uma vez ao dia, com a FAE, rutina ou o veículo, conforme descrito abaixo:

1. CN (controle normal): tratados com veículo (água destilada);
2. CT (controle tetracloreto): tratados com veículo (água destilada);
3. FAE 10: tratados com FAE 10 mg/kg de peso;
4. FAE 30: tratados com FAE 30 mg/kg de peso;
5. FAE 100: tratados com FAE 100 mg/kg de peso;
6. RUT (controle positivo): tratados com rutina 6 mg/kg de peso.

Após 10 dias de tratamento os animais dos grupos CT, FAE 10, FAE 30, FAE 100 e RUT receberam, por via intraperitoneal, tetracloreto de carbono (CCl_4) 0,5 mL/100 g de peso (30% v/v) em solução de óleo de milho e o grupo CN recebeu 0,5 mL/100 g de peso de óleo de milho (veículo). Vinte quatro horas após a administração, os animais foram anestesiados com éter etílico e o sangue coletado por punção ocular para análise do dano oxidativo ao DNA. Imediatamente após a coleta do sangue os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os fígados retirados para as dosagens dos indicadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes.

3.2.4.1. Avaliação do dano à membrana celular

3.2.4.1.1. Medida da peroxidação lipídica pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A avaliação da peroxidação lipídica endógena foi realizada pela detecção dos seus derivados lipoperóxidos, através de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), destacando-se o malondialdeído, produzindo uma base de Schiff de coloração rosa (Bird e Draper, 1984).

Pequenas porções de fígado (0,1 g) foram separadas e pesadas para a preparação dos homogenatos, obtidos com ácido fosfórico 1,1%. Após a homogeneização, 400 μL do homogenato foram misturados a 400 μL da solução TBA 1%/ NaOH 50 mM/ BHT 0,1mM e 0,2 mL de ácido fosfórico 7%. Posteriormente a amostra foi incubada a 100°C por 15 minutos e em seguida foi adicionado 1,5 mL de butanol. Finalmente, os tubos foram agitados

vigorosamente e centrifugados a 3.000 rpm por 5 minutos. A fase orgânica foi removida e medida espectrofotometricamente em 532 e 600 nm, contra um branco que não continha as amostras de homogenato (Hermes-Lima et al., 1995).

Os ensaios foram realizados em triplicata e a concentração de TBARS (nmol/g) foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 156 mM conforme a fórmula:

$$[\text{TBARS}] = [\text{Amostra}(\text{Abs}_{532} - \text{Abs}_{600}) - \text{Branco}(\text{Abs}_{532} - \text{Abs}_{600})] \times 100 \times \text{diluições} / 156$$

3.2.4.1.2. Medida da concentração de hidroperóxidos lipídicos pelo método do FOX (oxidação do ferro pelo xilenol laranja)

Os ensaios para avaliar a concentração de hidroperóxido lipídico foram realizados conforme descrito por Hermes-Lima e colaboradores (1995). As amostras de fígado (0,2 g) foram pesadas e homogeneizadas em 1,0 mL de metanol gelado (4 °C) grau HPLC (1:5 g/v). Os homogenatos foram centrifugados a 3.000 rpm por 10 minutos e os sobrenadantes removidos para o ensaio. A seguir, foram misturados os reagentes: 250 µL de FeSO₄ 1 mM, 100 µL de H₂SO₄ 0,25 M, 100 µL de xilenol laranja 1 mM, 60 µL do homogenato e 490 µL de água destilada. O branco foi preparado substituindo o volume de homogenato por água destilada. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 24 horas até que se completasse a reação. A absorbância foi medida em 580 nm. Após esta leitura foram adicionados 5 µL de hidroperóxido de cumeno 1 mM, e depois de 60 minutos a absorbância foi novamente medida em 580 nm. As análises foram realizadas em triplicata e a

concentração dos hidroperóxidos lipídicos (substâncias reativas ao FOX) foi expressa em termos de equivalentes de cumeno hidroperóxido por grama de tecido (CHPE/g), calculados através da fórmula:

$$\text{CHPE/g} = (\text{Abs.}_{\text{amostra}}/\text{Abs.}_{5 \text{ nmol CHP}}) \times 5 \text{ nmol CHP} \times 1000/\text{V} \times 6$$

V = volume de amostra utilizado

6 = fator de diluição 1:5 (g/v)

3.2.4.2. Determinação do dano ao DNA através do teste do COMETA

Com o intuito de avaliar se a FAE poderia reduzir possíveis danos ao DNA promovidos pelas EROs utilizou-se o teste do COMETA, um ensaio de genotoxicidade, o qual une técnicas citogenéticas e bioquímicas para detecção de danos ao DNA, inclusive danos oxidativos (Hartmann e Speit, 1997; Nadin et al., 2001).

No teste do COMETA (Singh et al., 1988), avalia-se a fragmentação do DNA através de eletroforese horizontal e microscopia. Este teste fundamenta-se na eletroforese de células lisadas sob condições alcalinas embebidas em gel de agarose de baixo ponto de fusão, sobre lâminas de microscopia (Anderson et al., 1994; Klaude et al., 1996).

Para este teste 10 μL de sangue, coletados com heparina, foram adicionados a 90 μL de agarose de baixo ponto de fusão (LMPA 0,75%) a 37°C. Este sistema foi transferido para uma lâmina de microscopia contendo uma camada prévia de agarose de ponto de fusão normal (NMPA 1,5%) obtida previamente por esfregaço. Em seguida, o sistema foi coberto com uma lamínula de vidro. As lâminas foram então acondicionadas a 5 °C por 10

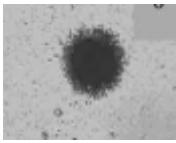
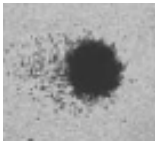
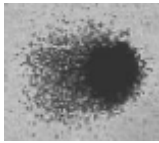
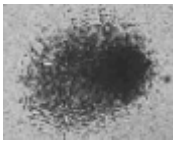
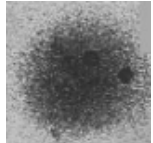
minutos. A seguir, as lamínulas foram retiradas e as lâminas transferidas para cubas apropriadas, envoltas com papel alumínio, contendo solução de lise a 4°C (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10mM, 1% de Lauril Sarcosinato de Sódio, DMSO 10% e Triton X-100 1%), onde permaneceram por no mínimo 1 hora.

A seguir as lâminas foram retiradas da lise e acomodadas na cuba de eletroforese, mantida a baixa temperatura com gelo e cobertas pela solução tampão (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, pH 13,0), permanecendo aí por 20 minutos. Posteriormente, as lâminas foram submetidas à uma eletroforese horizontal sob voltagem de 25 V e corrente elétrica de 300 mA por 20 minutos. Ao final da eletroforese as lâminas foram lavadas três vezes em intervalos de 5 minutos com solução neutralizadora (Tris 0,4 M) e uma vez com água destilada, e secadas a temperatura ambiente.

A coloração das lâminas foi feita com nitrato de prata (Nadin et al., 2001). Primeiramente as lâminas foram colocadas em uma cubeta contendo solução fixadora (ácido tricloroacético 15%, sulfato de zinco 5% e glicerol 5%). Após a fixação as lâminas foram lavadas 3 vezes com água destilada e secadas em estufa a 37°C por 1 hora e 30 minutos. Antes de serem coradas, o gel foi reidratado por 5 minutos com água destilada. A solução corante foi preparada na seguinte seqüência: 34 mL da solução B (nitrato de amônio 0,2%, nitrato de prata 0,2%, ácido tugstosalicílico 0,5%, formaldeído 0,15% e carbonato de sódio 5%) e 66 mL de solução A (carbonato de sódio 5%). As lâminas ficaram imersas na solução corante por 15 minutos a 37°C. A seguir foram mergulhadas numa solução de parada (ácido acético 1%), lavadas com água destilada e secadas à temperatura ambiente, para posterior leitura.

Para cada animal foram analisadas, aleatoriamente, imagens de 100 células (50 células de cada lâmina, duplicata), e o tamanho dos cometas (região nuclear + cauda) foi classificado visualmente por microscopia óptica. Os cometas de cada animal foram divididos em classes, de acordo com o tamanho da cauda, variando de cometas sem cauda (indicativos de ausência de dano ao DNA e denominados cometas de classe 1) até cometas que apresentam cauda longa (indicativos de dano máximo ao DNA e denominados cometas de classe 5). Para expressar o dano visualizado nas lâminas em valores numéricos, cada classe recebeu uma pontuação, conforme a Tabela 2.

Tabela 2: Pontuação e exemplos de cada classe de cometa visualizada.

	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	Classe 5
Pontuação	0	1	2	3	4
Imagem do cometa					

Para cada animal foi atribuída uma pontuação utilizando-se o índice de unidades arbitrárias, obtido de acordo com o número de cometas visualizados em cada classe, segundo a equação abaixo:

$$\text{Índice de dano ao DNA} = (\text{n}^\circ \text{ de cometas classe 1} \times 0) + (\text{n}^\circ \text{ de cometas classe 2} \times 1) + (\text{n}^\circ \text{ de cometas classe 3} \times 2) + (\text{n}^\circ \text{ de cometas classe 4} \times 3) + (\text{n}^\circ \text{ de cometas classe 5} \times 4).$$

Conseqüentemente, obteve-se uma única pontuação para cada grupo. Assim, o índice de dano de cada grupo variou de 0 (ausência de dano) a 400 (dano máximo). Para todas as amostras, os resultados foram expressos como

média \pm EPM das unidades arbitrárias de cada grupo experimental e da quantidade de células por classe de dano.

3.2.4.3. Avaliação do dano oxidativo a proteínas

O dano oxidativo às proteínas por carbonilação foi determinado de acordo com o método proposto por Reznick e Packer (1994). Os fígados foram homogeneizados (na diluição de 1:20) em 5% de ácido sulfossalicílico gelado. Foram adicionados 800 μ L de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH 10 mM em HCl 2,5 M) à 200 μ L de homogenato. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 1 hora, sendo vigorosamente agitadas a cada 15 min. A seguir foram adicionados 800 μ L de TCA 20% e os tubos agitados e centrifugados por 5 minutos a 5.000 rpm. Os sobrenadantes foram descartados e adicionou-se 800 μ L de TCA 10%, os tubos foram agitados e novamente centrifugados a 5.000 rpm por 5 minutos. Os sobrenadantes foram novamente descartados e o excesso de DNPH removido lavando-se os precipitados por 3 vezes com uma mistura de etanol e acetato de etila (1:1), e em seguida agitou-se os tubos e centrifugou-se por 5 minutos a 14.000 rpm. Os precipitados resultantes foram dissolvidos em 400 μ L de cloreto de guanidina 6 M, submetidos à agitação e incubados por 10 min a 37°C, para dissolução. As absorbâncias foram determinadas a 360 nm, contra um tubo branco contendo apenas cloreto de guanidina.

A concentração total de proteína das amostras foi determinada através do método de Lowry (1951). Para isto, durante o preparo do pellet foi adicionado HCl 2,5 M no lugar do DNPH. O precipitado obtido após a adição do

TBA 10% foi dissolvido em água destilada e 20 μL foram utilizados para a determinação da concentração protéica total. Às amostras foram adicionados 780 μL de água destilada, 2 mL do Reativo (50 mL de NaHCO_3 2% em NaOH 0,1 N + 0,5 mL de $\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% + Tartarato de sódio e potássio 2%) e 200 μL do Reativo de Folin. Após 30 minutos a temperatura ambiente, as absorbâncias foram lidas a 625 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata e as concentrações de proteína foram calculadas utilizando-se uma curva padrão de albumina bovina (fator de correção).

Os valores finais das proteínas carboniladas foram determinados utilizando-se a seguinte fórmula:

$$C \text{ (nmol/g)} = (\text{Abs} \times 45,45 \text{ nmol/mg}) / [\text{Proteína}]$$

Onde:

Abs = absorbância das amostras a 360 nm.

[Proteína] = concentração total de proteína das amostras

3.2.4.4. Avaliação da concentração de glutathiona reduzida (GSH)

Amostras de fígado foram precipitadas com TCA 12% nas diluições 1:10 (p/v) e homogeneizadas, seguido de centrifugação a 5.000 rpm durante 5 minutos. A concentração de pequenos tióis foi avaliada imediatamente após a obtenção dos extratos ácidos hepáticos (Beutler et al., 1963). A adição de 0,2 mL de DTNB (2,5 mM) nas cubetas contendo 1,9 mL de tampão fosfato de potássio 80 mM pH 8,0 e 0,1 mL do extrato ácido permitiu, após cerca de 2 min, a obtenção máxima de formação do ânion tiolato (TNB) de cor amarela,

mensurável em 412 nm. As análises foram realizadas em triplicata e os valores expressos em mM.

3.2.4.5. Atividade da enzima catalase (CAT)

Para análise da atividade desta enzima, foi quantificada a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em 240 nm, pela enzima presente na amostra (Aebi, 1984). Os fígados foram homogeneizados (na proporção 1:20) em tampão Tris 20 mM, pH 7,4, Triton 0,1% e NaCl 150 mM. Para esse ensaio, foi utilizada a solução de H_2O_2 10 mM em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0 preparada e titulada no dia da análise. Em uma cubeta de quartzo, foram colocados 2 mL da solução de H_2O_2 e 20 μ L de amostra (homogenato). Após homogeneização a velocidade de decomposição do H_2O_2 foi medida durante 20 segundos. As amostras foram analisadas em triplicata, sendo os valores expressos em $mmol$ de H_2O_2 consumido. $min^{-1} \cdot g^{-1}$.

3.2.4.6. Atividade da enzima glutathione S-transferase (GST)

As GSTs são um grupo de enzimas que catalisam a formação de tioéteres pela adição de GSH a um grande número de compostos que contém um carbono eletrofílico. A atividade da GST foi medida espectrofotometricamente em 340 nm durante 60 segundos (Habig et al., 1974). Os fígados foram homogeneizados (na proporção 1:20) em tampão Tris 20 mM, pH 7,4, Triton X-100 0,1% e NaCl 150 mM. A amostra de homogenato (10 μ L) foi adicionada em um meio contendo 10 μ L de CDNB 0,1 M, 10 μ L de

GSH 0,1 M e 970 μ L de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, sendo que na cubeta de referência o volume de amostra foi substituído por tampão. As análises foram feitas em triplicata e os valores de atividade enzimática foram expressos em mmol de CDNB conjugado $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$.

3.2.5. Avaliação do efeito de *Cyathia phalerata* na reatividade vascular em anéis de aorta isolada de ratos

3.2.5.1. Montagem das preparações isoladas de anel de aorta torácica de rato

Os animais foram sacrificados por aprofundamento da anestesia com quetamina e cloridrato de xilazina, seguido de exsanguinação feita pela secção da artéria carótida. Após a abertura da cavidade torácica, a aorta foi delicadamente removida e transferida para uma placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit, com a seguinte composição (mM): NaCl 118; KCl 4,7; CaCl_2 2,5; MgSO_4 1,2; KH_2PO_4 0,9; NaHCO_3 25; glicose 11, e retirou-se os tecidos adiposos e conectivos adjacentes (Andriambeloson et al., 1997).

O vaso foi seccionado na forma de anéis de 3 a 4 mm de comprimento, os quais foram transferidos para cubas de vidro com volume total de 5 mL contendo solução de Krebs-Henseleit, mantida à 37°C, pH 7,4 e aerada com uma mistura de 95% de O_2 e 5% de CO_2 . Duas hastas metálicas foram inseridas na luz dos mesmos, sendo uma delas adaptada a um transdutor de tensão isométrica acoplado a um sistema de aquisição de dados SOFT & SOLUTIONS (KitCad 8). A tensão de repouso das preparações correspondeu a 1,0 g e a solução nutriente foi substituída a cada 15 minutos.

Após o período de equilíbrio (60 minutos) as preparações foram contraídas com fenilefrina (1 μM) e a presença do endotélio funcional foi avaliada pela capacidade da acetilcolina (ACh, 1 μM) induzir ao relaxamento das preparações. Somente as preparações que apresentaram relaxamento igual ou superior a 75% foram consideradas com endotélio íntegro.

Nos experimentos onde pretendeu-se investigar a relevância do endotélio vascular na capacidade vasorrelaxante da FAE, foi realizada a remoção da camada de células endoteliais (Corrêa et al., 1991). Para este procedimento, uma das hastes utilizadas na montagem dos vasos no sistema, foi levemente friccionada contra a superfície interna das preparações. A lesão do endotélio vascular foi considerada após a verificação da ausência total de relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh, 1 μM), em vasos contraídos previamente com fenilefrina (1 μM). Após a realização do teste da integridade do endotélio, as preparações foram lavadas com solução fisiológica e mantidas em repouso por 30 minutos.

3.2.5.2. Caracterização do efeito vasorrelaxante do EB e da FAE de *Cyathea phalerata*

Após os 30 minutos de repouso, foram realizadas Curvas Concentração Resposta (CCR) cumulativas (0,1 - 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ao EB e à FAE, na presença do endotélio, em anéis previamente contraídos com fenilefrina (1 μM). Para a FAE foram realizadas CCR cumulativas também na ausência de endotélio funcional.

3.2.5.3. Verificação da influência da FAE de *Cyathea phalerata* na via NO/GMPc

Para avaliar a participação da via do NO no efeito vasorrelaxante da FAE foram realizadas CCR cumulativas, em preparações com endotélio íntegro e na presença de L^w-nitro-L-arginina (L-NOARG, 10 μ M), inibidor da enzima NO-sintase (NOS), adicionado 20 minutos antes da realização da CCR cumulativa à FAE.

Também foi avaliado o efeito relaxante da FAE na presença de um excesso de L-arginina (1 mM), substrato endógeno da NOS, incubada 10 minutos antes da adição de L-NOARG (10 μ M) ao banho.

Com o intuito de investigar a influência da FAE na formação do monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), foram realizadas incubações com 1H-[1,2,4]oxidiazolol[4,3- α]quinoxalin-1-ona, ODQ (1 μ M), composto inibidor da enzima guanilato ciclase. O ODQ foi adicionado 20 minutos antes da realização da CCR à FAE.

3.2.5.4. Verificação da participação de prostaciclina no efeito vasodilatador da FAE de *Cyathea phalerata*

Para avaliar a participação dos metabólitos da enzima ciclooxigenase (COX) no relaxamento induzido pela FAE, foram realizadas CCR cumulativas na presença de indometacina (1 μM), inibidor da COX. A indometacina foi adicionada 20 minutos antes da realização da CCR cumulativa à FAE.

3.2.5.5. Verificação da influência da FAE de *Cyathea phalerata* na contração induzida pela fenilefrina

O efeito da FAE também foi avaliado em relação à resposta contrátil induzida pela fenilefrina. Foram realizadas CCR cumulativas à fenilefrina (1 nM – 30 μM), na ausência e na presença de incubações isoladas (30 e 100 $\mu\text{g/mL}$) da FAE, adicionadas às cubas 20 minutos antes da realização das CCR cumulativas ao agonista α_1 -adrenérgico.

3.2.5.6. Influência da FAE de *Cyathea phalerata* no vasorrelaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio (SNP)

A possível capacidade seqüestradora da FAE sobre as espécies reativas de oxigênio (EROs), foi avaliada pela realização de CCR cumulativas ao SNP (0,01 nM – 300 nM), na ausência de endotélio vascular. As preparações foram submetidas a incubações isoladas (30 e 100 $\mu\text{g/mL}$) da FAE, 20 minutos antes da realização das CCR ao doador de NO. Como

controle positivo, foi utilizada a SOD (100 U/mL), adicionada imediatamente antes da realização das CCR cumulativas ao SNP.

3.3. Apresentação dos resultados e análise estatística

Os resultados dos ensaios de atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* foram calculados conforme descrito anteriormente para cada análise e os resultados expressos como média \pm EPM.

Os relaxamentos induzidos pelo EB, FAE e SNP foram apresentados como porcentagem de relaxamento em relação à contração máxima induzida pela fenilefrina. As contrações induzidas pela fenilefrina foram apresentadas em valores de tensão (gramas). Os valores de relaxamento e contrações foram apresentados como média \pm EPM.

As CI50 (concentrações inibitórias que promovem 50% dos efeitos máximos obtidos) e as CE50 (concentrações efetivas que promovem 50% dos efeitos máximos obtidos) foram apresentadas como médias geométricas, acompanhadas de seus respectivos limites de confiança para 95% (Fleming et al., 1972).

A análise estatística dos resultados foi realizada através de análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey ou Dunnet. As diferenças ponto a ponto entre os valores experimentais obtidos com diferentes grupos, que apresentaram níveis de probabilidade iguais ou menores do que 5% ($p < 0,05\%$) foram considerados estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de *Cyathea phalerata*

4.1.1. Determinação da atividade seqüestradora do EB e das frações de *Cyathea phalerata* sobre o radical DPPH

Na Figura 8 estão representados os resultados da atividade antioxidante do EB e das frações de *Cyathea phalerata*, utilizando o radical livre DPPH. Observa-se que a atividade antioxidante aumentou de maneira dependente da concentração para o EB, FAQ, FBU e FAE, enquanto que o PPT apresentou uma atividade significativa somente na última concentração testada. A FBU e a FAE apresentaram um efeito máximo de aproximadamente 86 e 88%, respectivamente. Entretanto, a FAE apresentou a menor CE50 (Tabela 3) e conseqüentemente um potencial antioxidante mais expressivo frente ao radical DPPH.

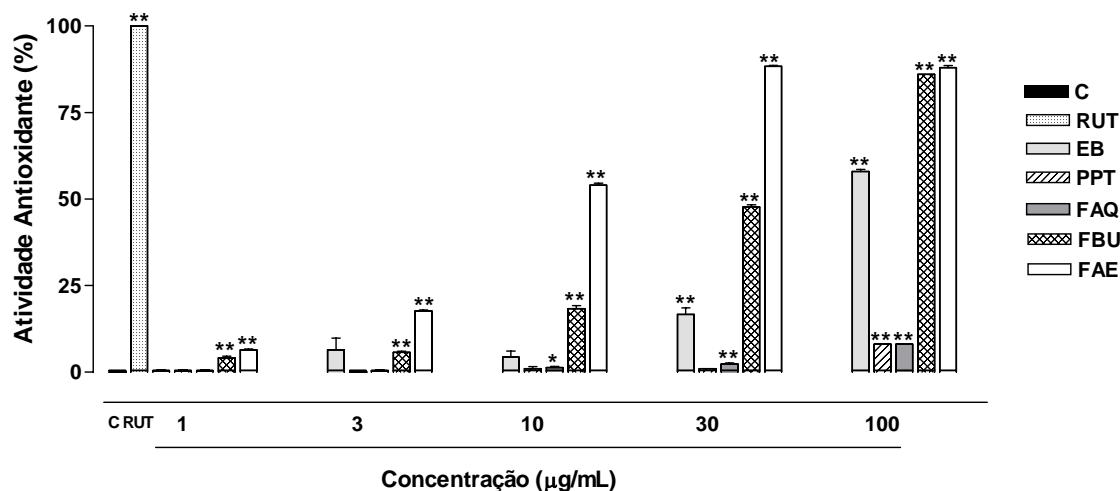


Figura 8: Atividade seqüestradora do radical DPPH de EB, PPT, FAQ, FBU e FAE de *Cyathea phalerata*. Cada barra representa média percentual \pm EPM da atividade antioxidante frente ao radical DPPH de 3 experimentos realizados em triplicata, em concentrações que variam de 1 a 100 $\mu\text{g/mL}$. A primeira coluna (C) representa o controle da reação na ausência do EB e das frações, considerado como ausência de atividade antioxidante. A rutina (RUT, 50 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizada como controle positivo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ representa a diferença significativa em relação ao grupo C (controle) (ANOVA/Dunnet).

Tabela 3: Valores de CE50 e seus respectivos intervalos de confiança no ensaio da capacidade seqüestradora do radical DPPH do EB, PPT, FAQ, FBU e FAE de *Cyathea phalerata*.

	CE50 (IC 95%) $\mu\text{g/mL}$
EB	43,29 (35,99 – 52,06)
PPT	n.d. ¹
FAQ	n.d. ¹
FBU	25,66 (23,69 – 27,61)
FAE	7,19 (6,08 – 8,50)

¹ não determinado.

4.1.2. Determinação da capacidade seqüestradora do EB e das frações de *Cyathea phalerata* sobre o radical ânion Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

A capacidade seqüestradora do EB e das frações de *Cyathea phalerata* sobre o radical $O_2^{\bullet-}$ está representada na Figura 9 e expressa como porcentagem de redução do NBT. A FAE foi capaz de inibir a redução do NBT de maneira significativa nas concentrações de 300 e 1000 $\mu\text{g/mL}$. O EB e as demais frações testadas apresentaram inibição significativa apenas na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Não foi possível calcular os valores de CI_{50} , e seus respectivos intervalos de confiança, para este ensaio devido à baixa atividade do EB e das frações testadas.

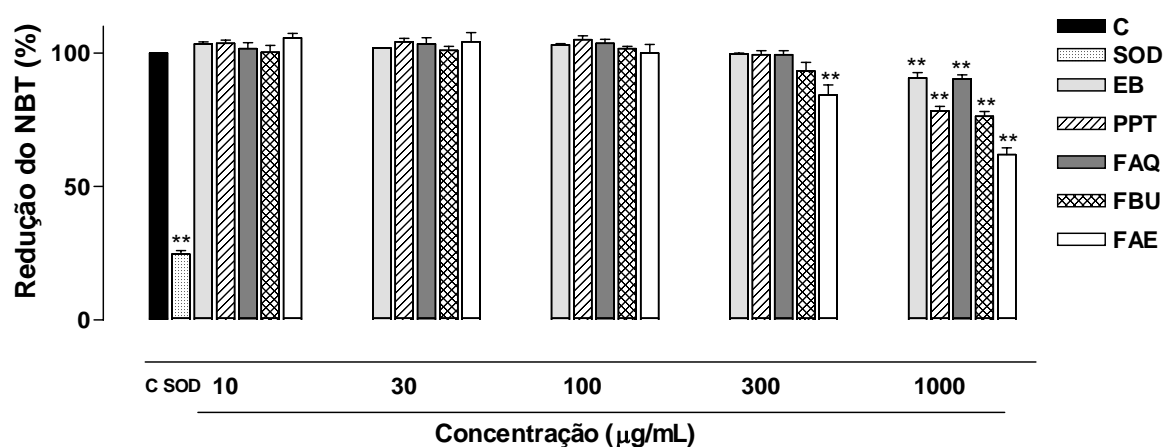


Figura 9: Efeito do EB, PPT, FAQ, FBU e FAE de *Cyathea phalerata* na redução do NBT. Cada barra representa a média percentual \pm EPM de redução do NBT de 3 determinações realizadas em triplicata, em concentrações que variam de 10 a 1000 $\mu\text{g/mL}$. A primeira coluna (C) representa o controle da reação na ausência do EB e das frações, considerado como 100 % da redução do NBT. A SOD (100 U/mL) foi utilizada como controle positivo. ** $p < 0,01$ representa a diferença significativa em relação ao grupo controle (C) (ANOVA/Dunnet).

4.1.3. Inibição dos danos oxidativos à desoxirribose induzidos pelo radical $\cdot\text{OH}$, pelo EB e frações de *Cyathea phalerata*

Na Figura 10 estão representados os resultados da atividade do EB e das frações de *Cyathea phalerata* sobre a degradação da desoxirribose, induzida pelo radical $\cdot\text{OH}$. É possível observar que a inibição da degradação da desoxirribose é dependente da concentração de todas as frações e do EB. A FAE apresentou um efeito acentuado já na concentração mais baixa (0,1 $\mu\text{g/mL}$), reduzindo a degradação da desoxirribose em cerca de 54%. A FBU apresentou o maior efeito máximo ($\cong 92\%$), mas como pode ser observado na Tabela 4, a CI50 foi maior do que a apresentada pela FAE.

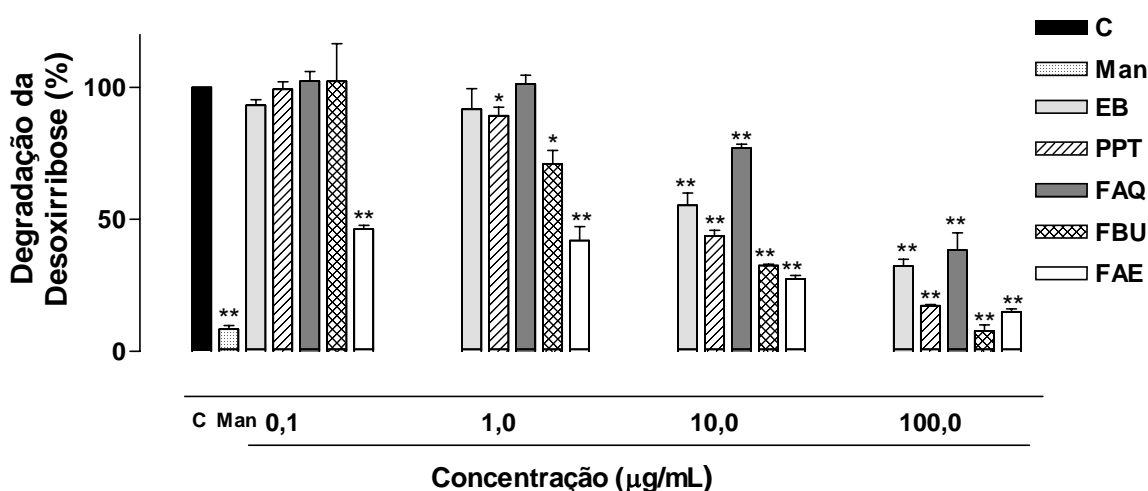


Figura 10: Efeito do EB, PPT, FAQ, FBU e FAE de *Cyathea phalerata* na degradação da desoxirribose induzida pelo radical OH^\cdot . Cada barra representa a média percentual \pm EPM de 3 determinações realizadas em triplicata, em concentrações que variam de 0,1 a 100 $\mu\text{g/mL}$. A primeira coluna (C) representa o controle da reação na ausência do EB e das frações, considerado como 100 % de degradação da desoxirribose. O manitol (Man, 1 mM) foi utilizado como controle positivo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ representa a diferença significativa em relação ao grupo controle (C) (ANOVA/Dunnet)

Tabela 4: Valores de CI50 e seus respectivos intervalos de confiança no ensaio da inibição da degradação da desoxirribose do EB, PPT, FAQ, FBU e FAE de *Cyathea phalerata*.

	CI 50 (IC 95%) µg/mL
EB	4,91 (0,91 - 26,38)
PPT	4,25 (1,17 – 15,48)
FAQ	15,27 (7,31 – 31,92)
FBU	2,73 (1,01 – 7,52)
FAE	< 0,1

4.1.4. Avaliação da inibição da peroxidação lipídica pelo EB e frações de *Cyathea phalerata*

A Figura 11 representa o efeito do EB e das frações de *Cyathea phalerata* sobre a peroxidação lipídica induzida pelo *tert*-butilhidroperóxido, em homogenato de fígados de ratos. A FAE foi capaz de inibir a peroxidação lipídica de maneira significativa a partir da concentração de 10 µg/mL, apresentando um efeito máximo de aproximadamente 75% na maior concentração testada. O valor médio calculado para CI50 obtida para a FAE juntamente com seu respectivo intervalo de confiança foram de 16,75 (5,47 – 51,23) µg/mL. O EB, PPT, FAQ e FBU reduziram significativamente a peroxidação lipídica somente na maior concentração testada (100 µg/mL). Os valores de CI50 e seus respectivos intervalos de confiança para o EB, PPT, FAQ e FBU não foram calculados, pois o efeito inibitório destas sobre a peroxidação lipídica foi menor do que 50%.

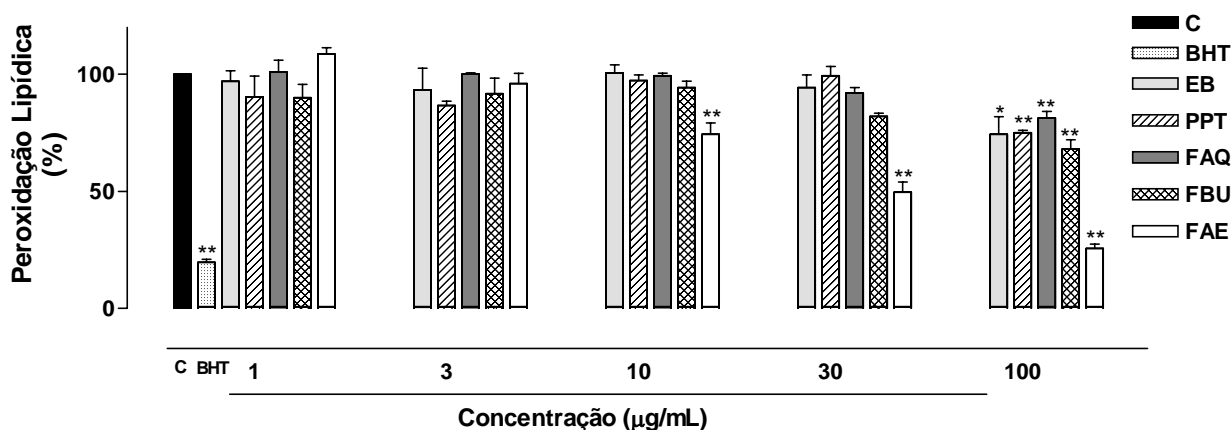


Figura 11: Efeito do EB, PPT, FAQ, FBU e FAE de *Cyathea phalerata* sobre a peroxidação lipídica. Cada barra representa a média percentual \pm EPM da peroxidação lipídica de 3 determinações realizadas em triplicata, em concentrações que variam de 1 a 100 $\mu\text{g/mL}$. A primeira coluna (C) representa o controle da reação na ausência do EB e das frações, considerado como 100% de peroxidação lipídica. O BHT (1 mM) foi utilizado como controle positivo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ representa a diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA/Dunnet).

4.2. Atividade antioxidante de *Cyathea phalerata* *in vivo* e indicadores de estresse oxidativo

Avaliando-se os resultados obtidos nos ensaios de atividade antioxidante *in vitro*, foi possível observar um potencial antioxidante bastante significativo da FAE em relação ao EB e as outras frações testadas. Assim, selecionou-se esta fração de *Cyathea phalerata* para ser avaliada em modelos de estresse oxidativo *in vivo*, a fim de confirmar sua atividade antioxidante.

4.2.1. Avaliação do dano à membrana celular

4.2.1.1. Medida da peroxidação lipídica pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica endógena foi avaliada pela detecção de seus derivados lipoperóxidos em homogenato de fígado de camundongos, através da medida das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). Neste ensaio, a FAE foi capaz de reduzir significativamente os níveis de TBARS nas doses administradas, apresentando uma maior proteção nas doses de 30 e 100 mg/kg, 44,19 e 42,02% respectivamente, em relação ao grupo CT. Assim, o pré-tratamento com esta fração foi capaz de proteger a peroxidação lipídica causada pelo agente estressor CCl₄ em fígado de camundongos. Pode-se observar ainda que houve diferença significativa entre o controle normal e os grupos tratados com a FAE. A rutina, um flavonóide com conhecida atividade antioxidante, foi capaz de reduzir os níveis de TBARS em 63,7% em relação ao grupo CT (Figura 12).

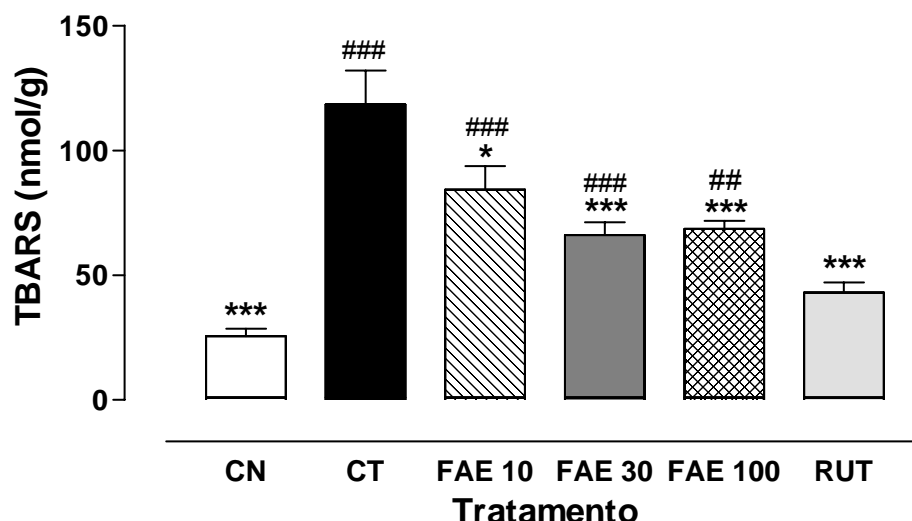


Figura 12: Índice de peroxidação lipídica (TBARS, nmol/g) em fígados de camundongos não tratados (controle normal, CN), tratados com CCl_4 (controle tetracloreto, CT), pré-tratados com FAE (10, 30 ou 100 mg/kg) ou rutina (controle positivo, 6 mg/kg) durante 10 dias e posteriormente tratados com CCl_4 . Cada barra representa média \pm EPM da concentração de TBARS (nmol/g) das determinações de 6 a 8 animais por grupo. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ representa a diferença significativa em relação ao CT; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ representa diferença em relação ao CN (ANOVA/Tukey).

4.2.1.2. Medida da concentração de hidroperóxidos lipídicos pelo método de FOX (oxidação do ferro pelo xilenol laranja)

Na Figura 13 estão representados os resultados da medida de lipoperoxidação determinados pelo método de FOX. Este ensaio foi utilizado para realizar a medida da concentração de hidroperóxido lipídico gerado pela indução de estresse oxidativo com CCl_4 . Ao contrário dos dados obtidos com a medida da concentração total de lipoperoxídicos (TBARS), a FAE não foi capaz de diminuir a formação de hidroperóxidos. A rutina, entretanto, foi capaz de diminuir os níveis de hidroperóxidos em 56,2%, com relação ao grupo CT.

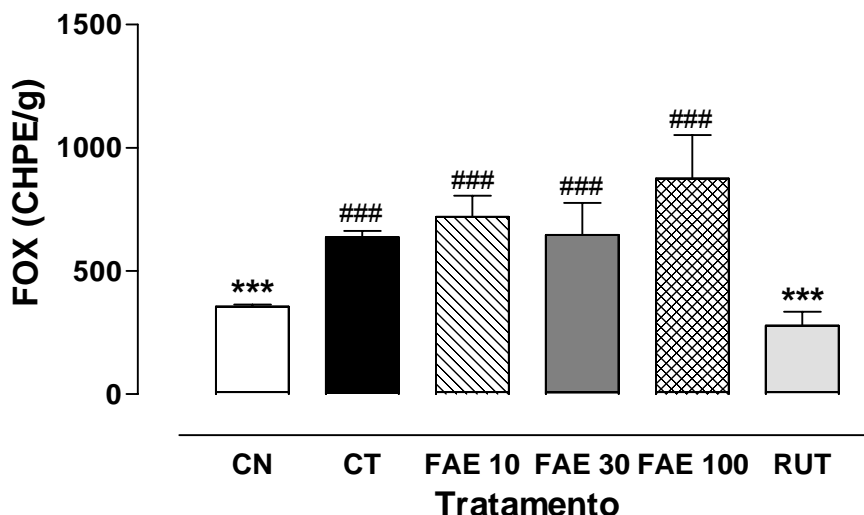


Figura 13: Índice de hidropéroxido lipídico (FOX, CHPE/g) em fígados de camundongos não tratados (controle normal, CN), tratados com CCl_4 (controle tetracloreto, CT), pré-tratados com FAE (10, 30 ou 100 mg/kg) ou rutina (controle positivo, 6 mg/kg) durante 10 dias e posteriormente tratados com CCl_4 . Cada barra representa a média \pm EPM da concentração de hidropéroxidos (CHPE/g) das determinações de 6 a 8 animais por grupo. *** $p < 0,001$ representa a diferença significativa em relação ao grupo CT; ### $p < 0,001$ representa diferença em relação ao grupo CN (ANOVA/Tukey).

4.2.2. Determinação do dano ao DNA através do teste do COMETA

A Tabela 5 apresenta a porcentagem de cometas de cada classe (1 a 5) para cada grupo analisado. O grupo CN apresentou menor porcentagem de dano ao DNA, com cometas principalmente de classes 1 (57,3 %) e 2 (35,8 %). O CCl_4 (CT) foi capaz de induzir dano ao DNA, predominando os cometas de classe 2 (46,9%), 3 (22,0 %) e 4 (10,7 %). É possível observar que o pré-tratamento com a FAE, nas 3 doses utilizadas, foi capaz de diminuir o dano ao DNA, apresentando predominantemente cometas de classes 1 e 2. Este resultado é semelhante ao encontrado no grupo CN, indicando uma proteção frente à indução de dano ao DNA gerada pelo CCl_4 .

Tabela 5: Porcentagem de distribuição dos cometas em diferentes classes analisados no sangue total de camundongos não tratados (controle normal, CN), tratados com CCl₄ (controle tetracloreto, CT), pré-tratados com FAE (10, 30 e 100 mg/kg) ou com rotina (controle positivo, 6mg/kg) e posteriormente tratados com CCl₄

	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	Classe 5
CN	57,3 %	35,8 %	5,3 %	1,7 %	0,0 %
CT	15,6 %	46,9 %	22,0 %	10,7 %	4,8 %
FAE 10	47,0 %	40,9 %	10,4 %	1,7 %	0,0 %
FAE 30	37,2 %	45,2 %	14,6 %	3,0 %	0,0 %
FAE 100	51,5 %	39,5 %	8,7 %	0,3 %	0,0 %
RUT	36,2 %	56,3 %	7,5 %	0,0 %	0,0 %

A quantificação do dano ao DNA foi feita através do índice de dano ao DNA, que está representado na Figura 14. O agente estressor (CCl₄) aumentou significativamente o dano ao DNA em comparação ao controle normal. O pré-tratamento com a FAE foi capaz de reduzir o dano oxidativo ao DNA nas 3 doses administradas, de forma semelhante à rotina. Não ocorreu diferença significativa em relação ao CN, demonstrando uma importante atividade protetora da FAE.

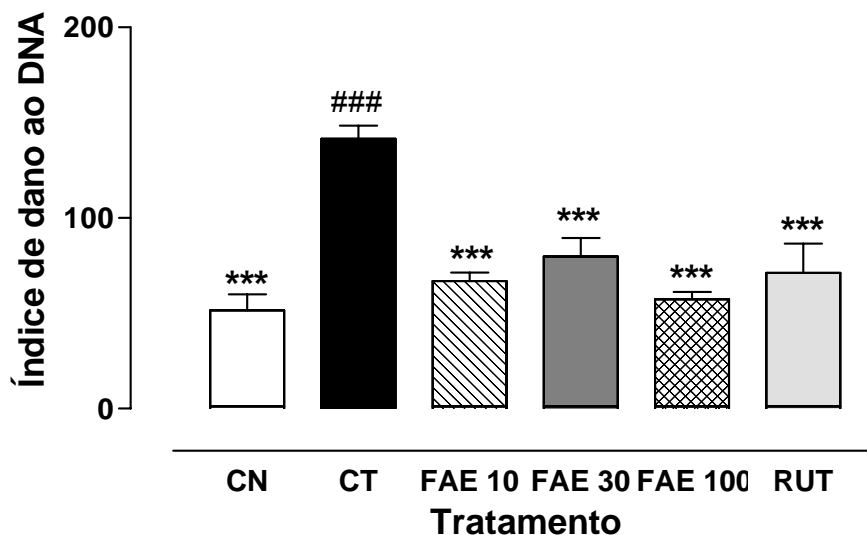


Figura 14: Dano ao DNA em sangue total de camundongos não tratados (controle normal, CN), tratados com CCl₄ (controle tetracloreto, CT), pré-tratados com FAE (10, 30 ou 100 mg/kg) ou rutina (6 mg/kg) durante 10 dias e posteriormente tratados com CCl₄ avaliado no teste do COMETA. Cada barra representa a média ± EPM das determinações de 6 a 8 animais por grupo. *** p<0,001 representa a diferença significativa em relação ao grupo CT; ### p< 0,001 representa diferença em relação ao grupo CN (ANOVA/Tukey).

4.2.3. Avaliação do dano oxidativo a proteínas

O tratamento dos animais com CCl₄ causou uma elevação na carbonilação de proteínas (53,2 %). O pré-tratamento com a FAE, principalmente das doses de 10 e 100 µg/mL (maior significância, p<0,01), diminuiu a carbonilação de proteínas, como pode ser observado na Figura 15.

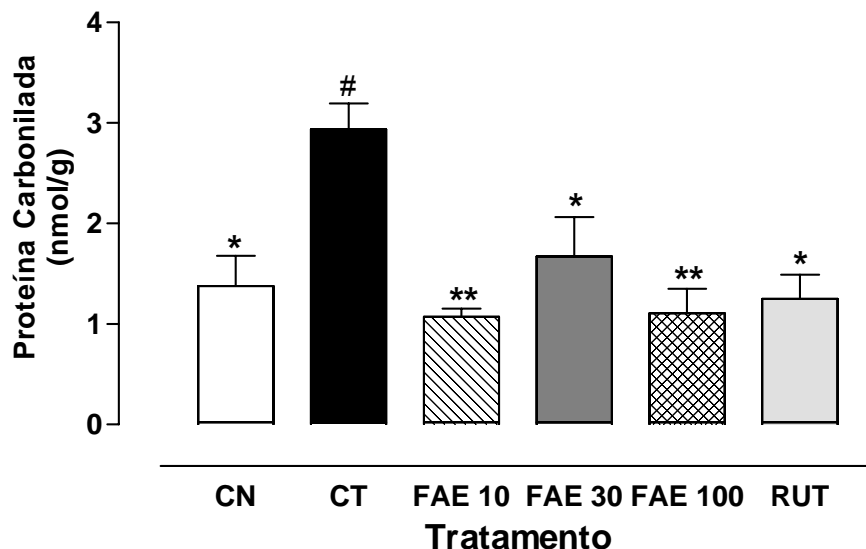


Figura 15: Concentração de proteínas carboniladas (nmol/g) em fígados de camundongos não tratados (controle normal, CN), tratados com CCl_4 (controle tetracloreto, CT), pré-tratados com FAE (10, 30 ou 100 mg/kg) ou rutina (controle positivo, 6 mg/kg) durante 10 dias e posteriormente tratados com CCl_4 . Cada barra representa a média \pm EPM da concentração de proteína carbonilada (nmol/g) das determinações de 6 a 8 animais por grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ representa a diferença significativa em relação ao grupo CT; # $p < 0,05$ representa diferença em relação ao grupo CN (ANOVA/Tukey).

4.2.4. Avaliação da concentração de glutathiona reduzida (GSH)

A Figura 16 apresenta as concentrações de GSH nos fígados dos camundongos tratados ou não com a FAE ou rutina durante 10 dias. O agente estressor CCl_4 reduziu os níveis hepáticos de GSH em 54,1 %. O pré-tratamento com FAE e rutina não foi capaz de diminuir a depleção de GSH causada pelo CCl_4 , apresentando concentrações semelhantes ao grupo CT.

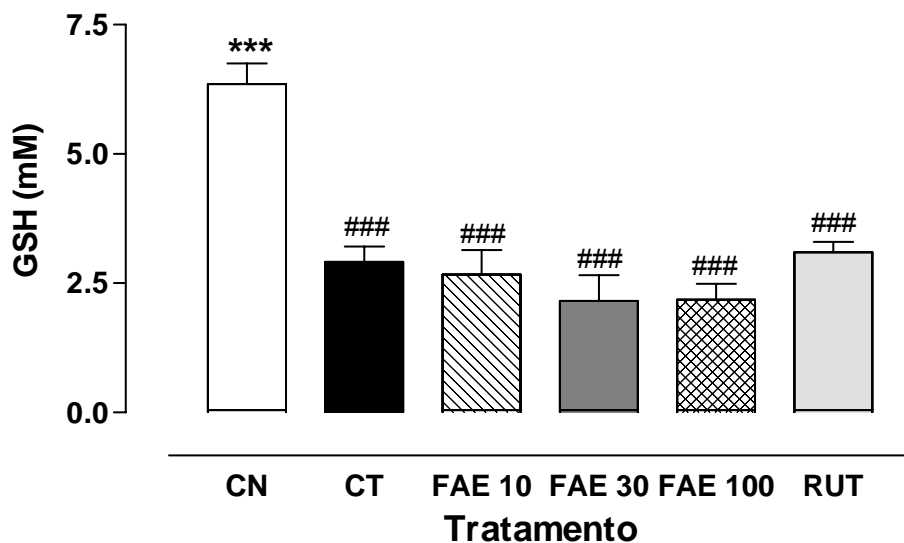


Figura 16: Concentração de GSH (mM) em fígados de camundongos não tratados (controle normal, CN), tratados com CCl_4 (controle tetracloreto, CT), pré-tratados com FAE (10, 30 ou 100 mg/kg) ou rutina (controle positivo, 6 mg/kg) durante 10 dias e posteriormente tratados com CCl_4 . Cada barra representa a média \pm EPM da concentração de GSH (mM) das determinações de 6 a 8 animais por grupo. *** $p < 0,001$ representa a diferença significativa em relação ao grupo CT; ### $p < 0,001$ representa diferença em relação ao grupo CN (ANOVA/Tukey).

4.2.5. Atividade da enzima catalase (CAT)

Na Figura 17 é possível observar que o tratamento com CCl_4 foi capaz de reduzir significativamente a atividade da enzima CAT (em aproximadamente 31%), a qual foi prevenida pela administração da FAE nas doses de 10 ($p < 0,01$) e 100 mg/kg ($p < 0,05$). A rutina, entretanto, não alterou a atividade enzimática.

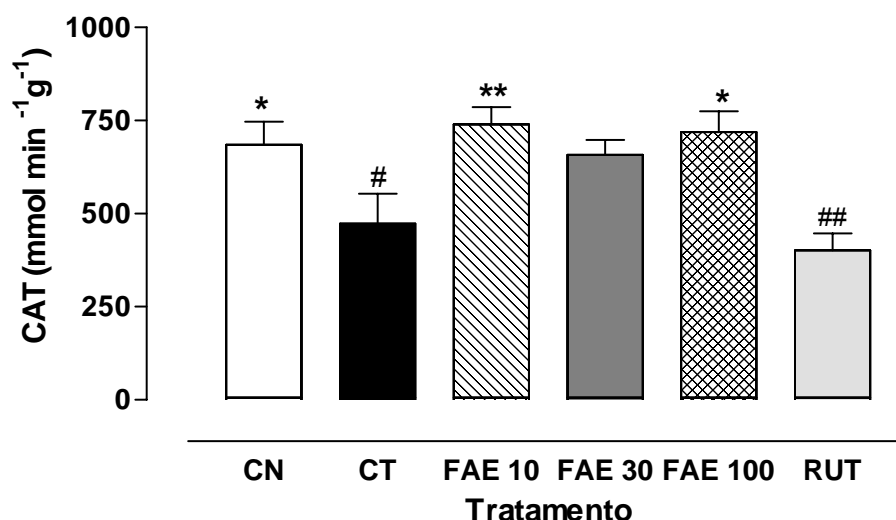


Figura 17: Atividade de CAT ($\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) em fígado de camungondos não tratados (controle normal, CN), tratados com CCl_4 (controle tetracloreto, CT), pré-tratados com FAE (10, 30 ou 100 mg/kg) ou rutina (6 mg/kg) durante 10 dias e posteriormente tratados com CCl_4 . Cada barra representa a média \pm EPM da atividade de CAT ($\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) das determinações de 6 a 8 animais por grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ representa a diferença significativa em relação ao grupo CT; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ representa diferença significativa em relação ao grupo CN (ANOVA/Tukey).

4.2.6. Atividade da enzima glutathiona S-transferase (GST)

Os resultados da determinação da atividade da enzima GST estão apresentados na Figura 18. O agente estressor diminuiu significativamente a atividade enzimática (82,77 %) em relação ao CN. É possível observar uma menor redução da atividade enzimática nos animais que foram pré-tratados com FAE, nas doses de 30 (58,4 %) e 100 mg/kg (52,56 %). O mesmo ocorreu com os animais tratados com rutina, que também foi capaz de diminuir a redução da atividade de GST causada pelo CCl_4 (54,9 %).

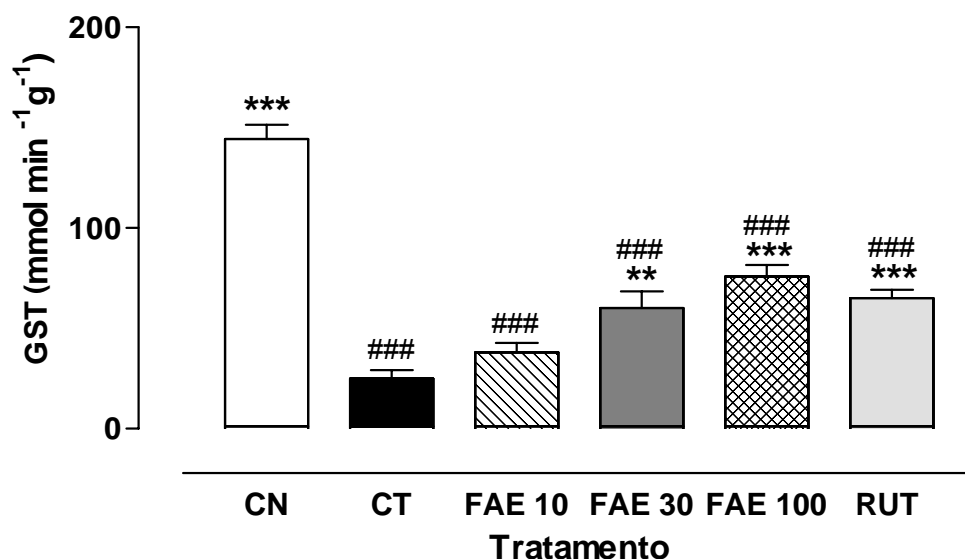


Figura 18: Atividade de GST ($\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) em fígados de camungondos não tratados (controle normal, CN), tratados com CCl_4 (controle tetracloreto, CT), pré-tratados com FAE (10, 30 ou 100 mg/kg) ou rutina (controle positivo, 6 mg/kg) durante 10 dias e posteriormente tratados com CCl_4 . Cada barra representa a média \pm EPM da atividade de GST ($\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) das determinações de 6 a 8 animais por grupo. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ representa a diferença significativa em relação ao grupo CT; ### $p < 0,001$ representa diferença em relação ao grupo CN (ANOVA/Tukey).

4.3. Avaliação do efeito de *Cyathea phalerata* na reatividade vascular em anéis de aorta isolada de ratos

4.3.1. Caracterização do efeito vasorelaxante do EB e da FAE de *Cyathea phalerata*

Para avaliar o efeito do EB e da FAE na reatividade vascular em anéis de aorta torácica isolada de ratos, foram realizadas CCR cumulativas na presença de endotélio funcional (Figura 19). As CCR cumulativas demonstraram um efeito vasodilatador mais pronunciado da FAE em comparação ao EB, apresentado relaxamento máximo de $59,56 \pm 2,66\%$ e $31,71 \pm 2,97\%$, respectivamente (Tabela 6).

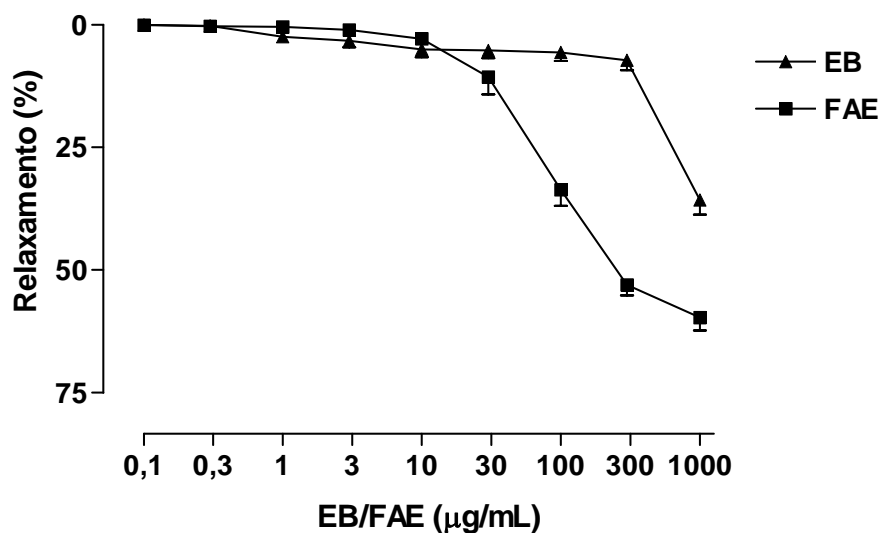


Figura 19: Curvas concentração resposta cumulativas ao EB e à FAE de *Cyathea phalerata* (0,1 – 1000 µg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de rato, contraídos previamente com fenilefrina (1 µM). Cada ponto representa média ± EPM de 7 – 8 experimentos.

Para avaliar a participação do endotélio vascular no relaxamento induzido pela FAE, foram realizadas CCR cumulativas após a remoção dessa camada celular. É possível observar na Figura 20 que o relaxamento induzido pela FAE é reduzido significativamente na ausência de endotélio, diminuindo o relaxamento máximo para $7,71 \pm 2,00$ % (Tabela 6).

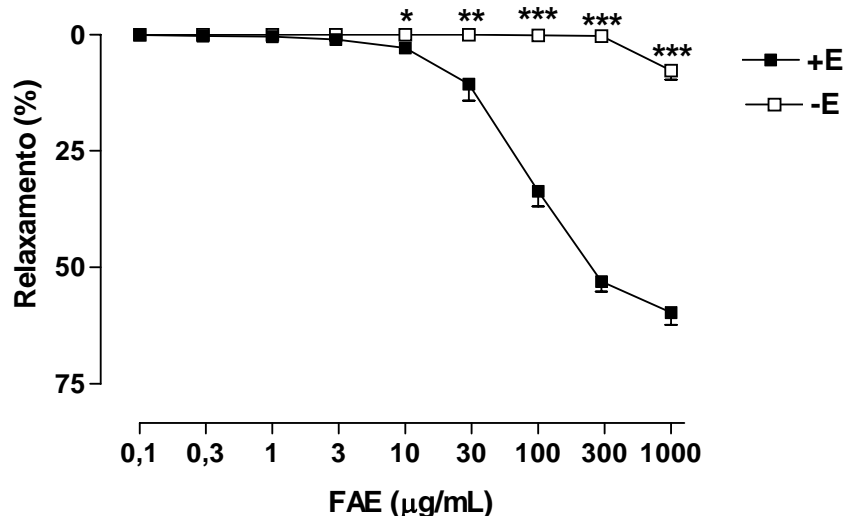


Figura 20: Curvas concentração resposta cumulativas à FAE de *Cyathea phalerata* (0,1 – 1000 µg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de rato, contraídos previamente com fenilefrina (1 µM), na presença (+E) e ausência de endotélio funcional (-E). Cada ponto representa média ± EPM de 7 – 9 experimentos. * p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 representa a diferença significativa em relação ao grupo +E (ANOVA/Tukey).

Tabela 6: Valores de CI50 e de Relaxamento Máximo induzido pelo EB e pela FAE de *Cyathea phalerata*, na presença (+E) ou na ausência (-E) de endotélio, em preparações isoladas de aorta torácica de rato.

	CI50 (IC 95%) µg/mL	Relaxamento Máximo (%)
EB	n.d. ¹	31,71 ± 2,97
FAE (+E)	74,78 (28,01 – 199,62)	59,67 ± 2,66
FAE (-E)	n.d. ¹	7,71 ± 2,00

¹ não determinado

4.3.2. Verificação da influência da FAE de *Cyathea phalerata* na via do NO/GMPc

De acordo com os resultados anteriores, a FAE de *Cyathea phalerata* possui um efeito vasodilatador dependente da camada endotelial. Assim, para avaliar o envolvimento da via NO/GMPc nesse efeito, foram realizadas CCR cumulativas à FAE na presença de diferentes drogas que atuam nessa via.

Na Figura 21 é possível observar que na presença de L-NOARG (inibidor da enzima NO sintase) ocorreu um deslocamento da CCR cumulativa à FAE para a direita e uma redução do relaxamento máximo (Tabela 7).

Para investigar a reversão do efeito promovido pela L-NOARG, foram realizadas CCR cumulativas à FAE, na presença de um excesso de L-arginina, substrato endógeno da enzima NO sintase. Pode ser observado na Figura 21, que a adição de L-arginina reverteu o efeito inibitório da L-NOARG sobre a resposta vasodilatadora induzida pela fração. Os valores de relaxamento máximo e de CI50, com seu respectivo intervalo de confiança 95%, se aproximaram dos valores do grupo controle (FAE) (Tabela 7).

Na Figura 21 pode ser observado também o efeito do ODQ (inibidor da enzima guanilato ciclase) no efeito vasorrelaxante da FAE em anéis de aorta torácica de ratos. De maneira semelhante à L-NOARG, a pré-incubação com ODQ também foi capaz de deslocar a CCR para a direita e reduzir o relaxamento máximo, como pode ser observado na Tabela 7.

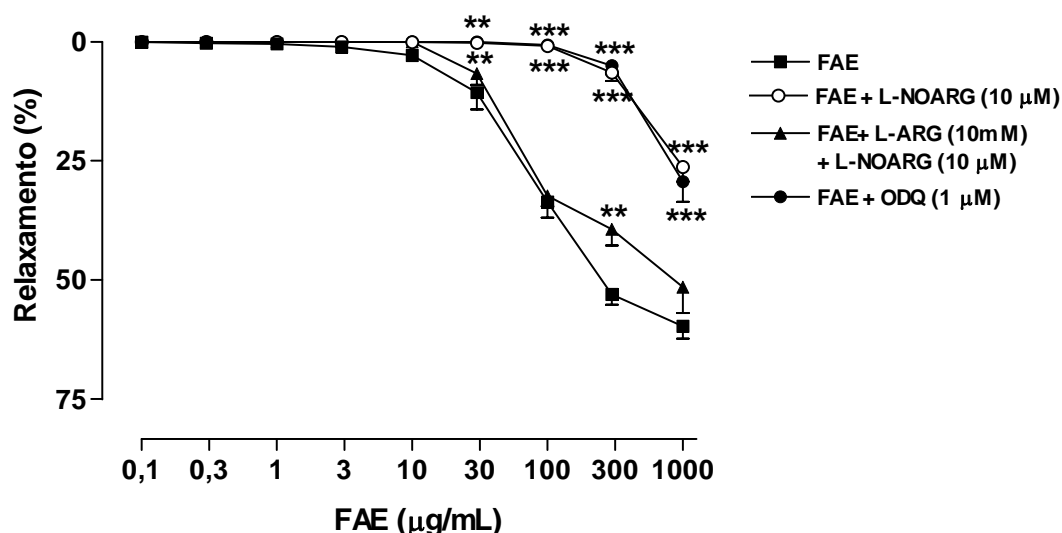


Figura 21: Curvas concentração resposta cumulativas à FAE de *Cyathea phalerata* (0,1 – 1000 µg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de rato, contraídos previamente com fenilefrina (1 µM), na ausência e na presença de L-NOARG (10 µM), L-arginina (10 mM) + L-NOARG (10 µM) e ODQ (1 µM). Cada ponto representa a média ± EPM de 7 – 9 experimentos. **p<0,01; ***p<0,001 representa a diferença significativa em relação ao grupo controle (FAE) (ANOVA/Tukey).

Tabela 7: Efeito de diferentes drogas que atuam na via NO/GMPc sobre a CI50 e Relaxamento Máximo, na concentração de 1000 µg/mL, induzido pela FAE de *Cyathea phalerata* em aorta torácica isolada de rato.

Droga	CI50 (IC 95%) µg/mL	Relaxamento (%) (1000 µg/mL)
Controle (FAE)	74,78 (28,01 – 199,62)	59,67 ± 2,66
L-NOARG	n.d. ¹	26,25 ± 3,06
L-ARG + L-NOARG	74,35 (45,57 – 121,33)	51,50 ± 5,43
ODQ	n.d. ¹	29,33 ± 4,26

¹ não determinado.

4.3.3. Verificação da participação da prostaciclina no efeito vasodilatador da FAE de *Cyathea phalerata*

Com o objetivo de avaliar a participação de prostaciclina na resposta vasodilatadora induzida pela FAE foram realizados experimentos na presença de indometacina, um inibidor não seletivo da enzima ciclooxigenase. É possível observar na Figura 22 que a presença de indometacina deslocou a CCR cumulativa à FAE para a direita, aumentando o valor da CI50, mas não reduziu o relaxamento máximo (Tabela 8).

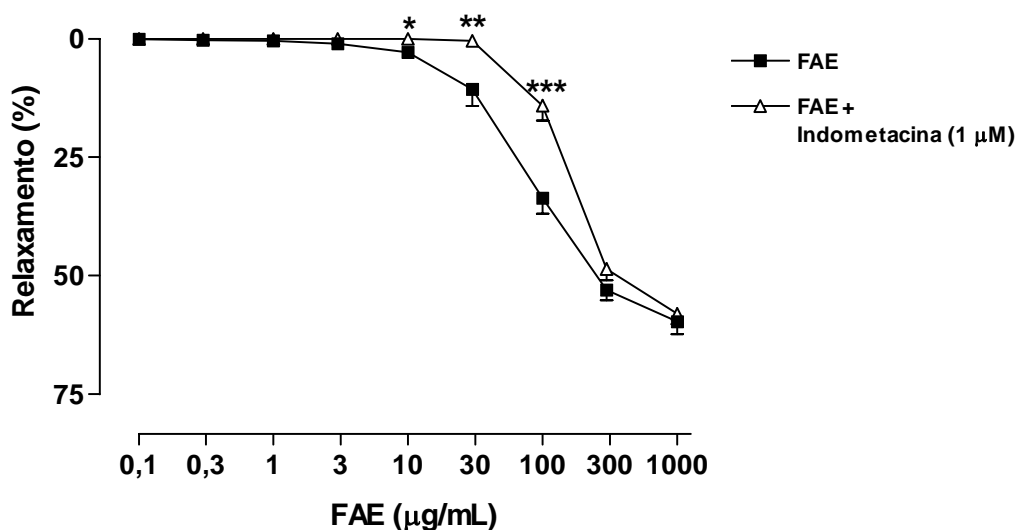


Figura 22: Curvas concentração resposta cumulativas à FAE de *Cyathea phalerata* (0,1 – 1000 µg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de rato, contraídos previamente com fenilefrina (1 µM), na ausência e na presença de indometacina (1 µM). Cada ponto representa a média ± EPM de 7 – 9 experimentos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ representa a diferença significativa em relação ao grupo controle (FAE) (ANOVA/Tukey).

Tabela 8: Efeito da indometacina sobre a CI50 e o Relaxamento Máximo induzido pela FAE de *Cyathea phalerata* em aorta torácica isolada de rato.

Droga	CI50 (IC 95%) µg/mL	Relaxamento Máximo (%)
Controle (FAE)	74,78 (28,01 – 199,62)	59,67 ± 2,66
Indometacina	104,39 (97,96 – 111,25)	58,00 ± 2,22

4.3.4. Verificação da influência da FAE de *Cyathea phalerata* na contração induzida pela fenilefrina

O efeito de incubações com diferentes concentrações da FAE sobre a contração induzida pela fenilefrina foi verificado. As concentrações de 30 e 100 µg/mL foram escolhidas partindo-se dos valores de CI50 obtidos nas CCR cumulativas ao efeito vasodilatador da FAE. É possível verificar na Figura 23, que a presença da FAE não foi capaz de alterar a contração induzida pela fenilefrina. Na Tabela 9, estão apresentados os valores de efeito máximo e de CE50, com os seus respectivos intervalos de confiança 95%, das CCR à fenilefrina na presença e na ausência de FAE.

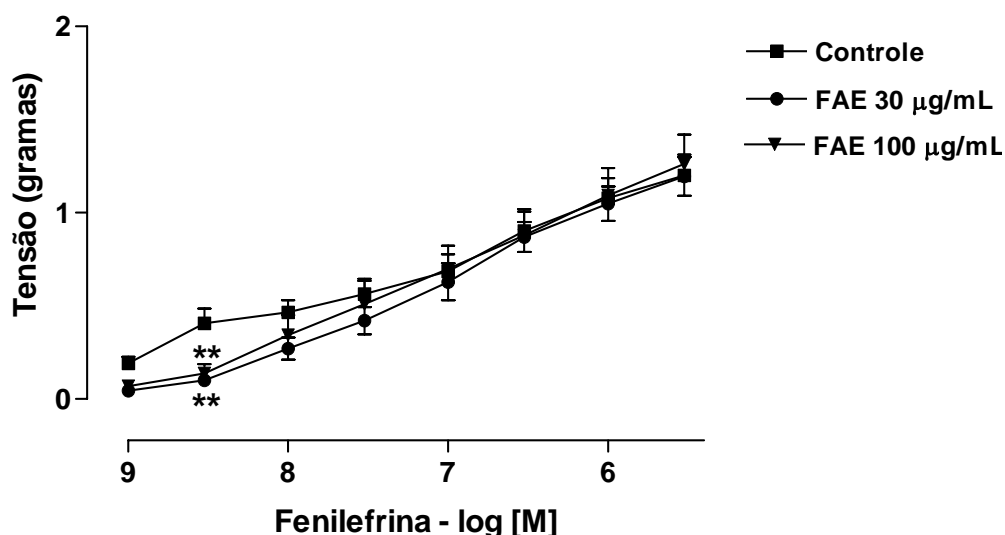


Figura 23: Curvas concentração resposta cumulativas à fenilefrina (1 nM – 3 µM) em anéis de aorta torácica isolada de rato na ausência e na presença de incubações isoladas da FAE de *Cyathea phalerata* (30 e 100 µg/mL). Cada ponto representa a média ± EPM de 6 – 12 experimentos. ** $p < 0,01$; representa a diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA/Tukey).

Tabela 9: Efeito de incubações isoladas de FAE de *Cyathea phalerata* sobre a CE50 e o efeito máximo induzido pela fenilefrina em preparações isoladas de aorta torácica de rato.

	CE50 (IC 95%) nM	Efeito máximo (g)
Controle	41,61 (4,10 – 422,31)	1,20 ± 0,11
30 µg/mL	71,02 (7,62 – 661,76)	1,26 ± 0,16
100 µg/mL	58,15 (4,22 – 800,98)	1,19 ± 0,10

4.3.5. Influência da FAE de *Cyathea phalerata* no vasorrelaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio (SNP)

O efeito de diferentes incubações da FAE de *Cyathea phalerata* sobre o relaxamento induzido pelo SNP (doador de NO em solução aquosa) foi avaliado em anéis de aorta desprovidos de endotélio.

A Figura 24 apresenta as CCR cumulativas ao SNP na presença ou ausência de FAE. O pré-tratamento com a FAE não alterou a CCR cumulativa ao SNP nas concentrações utilizadas. Na Tabela 10 estão apresentados os valores de CI50, e seus respectivos intervalos de confiança 95%, e o relaxamento máximo das CCR ao SNP na presença e ausência de FAE.

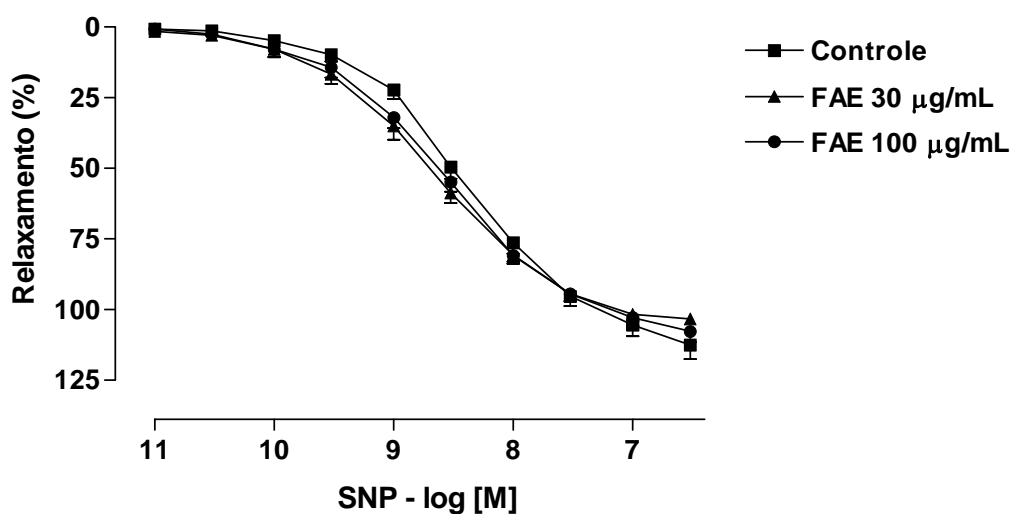


Figura 24: Curvas concentração resposta cumulativas ao SNP (0,01 nM – 300 nM) em anéis de aorta torácica isolada de rato, previamente contraídos com fenilefrina, na ausência e na presença de incubações isoladas da FAE de *Cyathea phalerata* (30 e 100 µg/mL). Cada ponto representa a média ± EPM de 7 – 8 experimentos.

As CCR cumulativas ao SNP, na ausência e na presença de SOD (100 U/mL), estão representadas na Figura 25. Ocorreu um deslocamento significativo das CCR ao SNP para a esquerda (Tabela 10) na presença de SOD, confirmando a capacidade seqüestradora de radicais $O_2^{\bullet-}$ desta enzima.

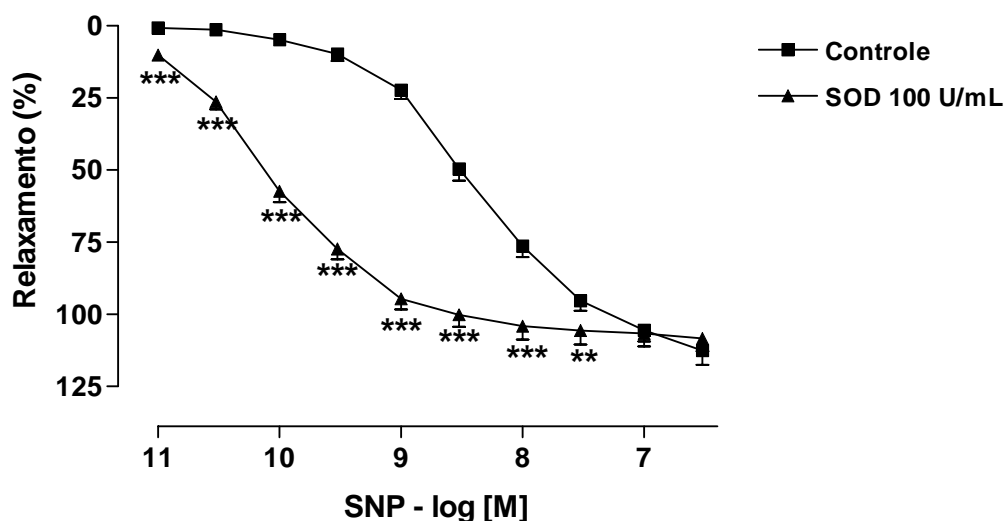


Figura 25: Curvas concentração resposta cumulativas ao SNP (0,01 nM – 300 nM) em anéis de aorta torácica isolada de rato, previamente contraídos com fenilefrina (1 μ M), na ausência e na presença de superóxido dismutase (SOD, 100 U/mL). Cada ponto representa a média \pm EPM de 4 – 8 experimentos. **p<0,01; ***p<0,001 representa a diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA/Tukey).

Tabela 10: Efeito de incubações isoladas de FAE de *Cyathea phalerata* ou de SOD sobre a CI50 e o Relaxamento Máximo induzido pelo SNP em preparações isoladas de aorta torácica de rato.

Incubações	CI50 (IC 95%) nM	Relaxamento máximo (%)
Controle	4,05 (1,40 – 11,69)	112,62 \pm 5,00
30 μ g/mL	2,21 (0,70 – 6,99)	103,43 \pm 1,23
100 μ g/mL	2,69 (9,76 – 0,74)	107,82 \pm 3,82
SOD 100 U/mL	0,09 (0,05 – 0,16)	108,50 \pm 4,42

5. DISCUSSÃO

Segundo a medicina popular, a *Cyathea phalerata*, conhecida popularmente como xaxim, é utilizada no combate a varizes, tratamento de afecções renais, amarelão, reumatismo e o chá das folhas é usado para tosse e gripes (Verdi, 2005). Entretanto, pouco é descrito na literatura científica sobre suas atividades biológicas e sua caracterização química.

A partir do caule fresco de *Cyathea phalerata*, foi obtido o extrato bruto (EB), que por sua vez foi separado em quatro frações: precipitado (PPT), fração solúvel em acetato de etila (FAE), fração solúvel em n-butanol (FBU) e fração aquosa (FAQ). Na FAE foi encontrado o composto kanferol 3-O- α -L-rhamnopiranosil (1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosídeo, isolado pela primeira vez na família Cyatheaceae e com alto rendimento (51,25 %), além de outros compostos minoritários como ácido 4-O- β -D-glicopiranosilcafeico, ácido 4-O- β -D-glicopiranosil-p-cumárico, sitosterol- β -D-glicoside, 3,4-dihidroxibenzoato de 1'-glicosila, β -sitosterol, kanferol e etilgalactoside.

Tem sido descrito na literatura que compostos como o kanferol, ácido caféico, ácido cumárico e β -sitosterol apresentam uma pronunciada atividade antioxidante (Kikuzaki et al., 2002; Russo et al., 2002; Butkovic et al., 2004, Park et al., 2006), além de vasodilatadora (Pérez-Vizcaíno et al., 2002; Ajay et al., 2003; Chen et al., 2004), antiinflamatória (Goel et al., 1988), anti-ulcerogênica (Goel et al., 1988), antiviral (Jiang et al., 2005) e antitumoral (Liao et al., 2003; Ovesná et al., 2004), entre outras.

Flavonóides glicosilados derivados de espécies vegetais, semelhantes aos encontrados na *Cyathea phalerata* também apresentam importantes

atividades biológicas, tais como antioxidante (Braca et al., 2003, De Souza et al., 2004; Yao et al., 2006), hipoglicemiante (De Souza et al., 2004; Kim et al., 2004), anti-hemolítica (Daí et al., 2006), anti-apoptótica (Ruiz et al., 2006) e vasodilatadora (Ho et al., 2002; Gao et al., 2004).

O estudo do potencial antioxidante de *Cyathea phalerata* foi baseado em sua composição química, juntamente com dados da literatura sobre as atividades biológicas de compostos semelhantes aos encontrados nesta planta.

O interesse no uso de antioxidantes para o tratamento e prevenção de doenças tem crescido nas duas últimas décadas (Halliwell, 2000; Halliwell et al., 2005). Muitos estudos têm sugerido que os flavonóides exibem atividades biológicas, incluindo antialérgica, antiviral, antiinflamatória e vasodilatadora. Entretanto, o maior interesse tem sido atribuído à sua atividade antioxidante, a qual se deve à sua capacidade de transferir elétrons de radicais livres, quelar metais e ativar enzimas antioxidantes (Pietta, 2000; Butkovic et al., 2004).

Dados da literatura evidenciam que os radicais livres e outras espécies reativas estão envolvidos nas mais diferentes patologias humanas. O estresse oxidativo associado às doenças pode ser resultado de uma diminuição das defesas antioxidantes ou uma produção acentuada de EROs e ERNs. A depleção dos antioxidantes da dieta e outros constituintes também podem levar ao estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 1999). Devido à eficiência incompleta de nossos sistemas de defesa endógenos e a existência de algumas situações fisiopatológicas e ambientais (fumo, poluentes do ar, radiação ultravioleta, dieta rica em ácidos graxos poliinsaturados, inflamação, isquemia/reperfusão, etc.) em que radicais livres de oxigênio são produzidos em excesso e em tempo e local errado, antioxidantes da dieta são necessários

para diminuir os efeitos cumulativos do dano oxidativo ao longo da vida (Pietta, 2000).

Os métodos utilizados para determinar a atividade de antioxidantes biológicos têm envolvido desde ensaios químicos com substratos lipídicos a ensaios mais complexos para a medida da capacidade antioxidante total em fluidos e amostras biológicas. Os ensaios antioxidantes podem ser divididos em dois grupos: ensaios utilizados para avaliar a peroxidação lipídica, no qual o substrato lipídico ou lipoprotéico é utilizado sob condições padronizadas e o grau de inibição da oxidação é medido; e os ensaios utilizados para medir a capacidade seqüestradora de radicais livres (Sánchez-Moreno, 2002).

O ensaio de capacidade seqüestradora do radical DPPH (1,1-difenil-2-picril hidrazina) é considerado um ensaio fácil e apurado para avaliar a atividade antioxidante de sucos de frutas e vegetais ou extratos. Uma das vantagens é que o radical DPPH é estável e não é gerado como em outros ensaios de atividade antioxidante (Sánchez-Moreno, 2002; Huang et al., 2005). Várias pesquisas têm demonstrado a capacidade de extratos e frações obtidas a partir de diferentes plantas com capacidade de seqüestrar o radical estável DPPH (Cho et al., 2003; Erdemoglu et al., 2006; Lee e Yen, 2006). Além disso, flavonóides isolados como kanferol, quercetina, luteolina, catequina e rutina também apresentaram uma importante atividade neste ensaio (Butkovic et al., 2004; Yu et al., 2005; Kim et al., 2006). De acordo com os resultados apresentados a FAE de *Cyathea phalerata* apresentou uma maior capacidade de captação do radical DPPH (CE50 = 7,19 µg/mL) em relação ao EB e as outras frações avaliadas. A FBU e o EB também foram efetivos neste ensaio, embora com resultados menos expressivos.

A atividade antioxidante apresentada pela *Cyathea phalerata* neste ensaio, pode ser devido à sua capacidade de transferir um átomo de hidrogênio para o radical. Dados da literatura indicam que compostos fenólicos possuem essa capacidade, transferindo um átomo de hidrogênio para o radical DPPH (Goupy et al., 2003).

Após a verificação da atividade seqüestradora deste radical, passou-se a estudar o EB e as frações de *Cyathea phalerata* em relação à espécies reativas biológicas, visto que o DPPH é um radical sintético e não está presente em organismos vivos.

Um importante ensaio para determinação da atividade antioxidante de uma dada substância é o da medida da capacidade seqüestradora do radical $O_2^{\bullet-}$. Neste modelo, a capacidade seqüestradora do EB e das frações foi avaliada através da geração de radicais $O_2^{\bullet-}$ sem interferência enzimática. Assim, foi possível verificar uma discreta atividade antioxidante do EB e das frações, sendo que apenas a FAE inibiu significativamente a redução do NBT já na concentração de 300 $\mu\text{g/mL}$. Dados da literatura indicam que compostos fenólicos são capazes de seqüestrar radicais $O_2^{\bullet-}$ (Tsujimoto et al., 1993). Hanasaki e colaboradores (1994) verificaram que flavonóides como a epicatequina, miricetina, rutina, catequina, epigallocatequina, quercetina, galangina e morina apresentam uma importante capacidade seqüestradora de deste radical.

O principal interesse em descobrir substâncias capazes de inativar o $O_2^{\bullet-}$ é que este radical gera outras espécies reativas com elevada citotoxicidade. A dismutação do $O_2^{\bullet-}$ gera H_2O_2 , pouco reativo em níveis fisiológicos, mas que pode atravessar a membrana celular e isso é um fato

importante, pois o ambiente extracelular possui poucos mecanismos de defesa antioxidante (Southorn, 1988). Uma das mais reativas e citotóxicas espécies formada é o peroxinitrito, produzido pela rápida reação do $O_2^{\bullet-}$ com NO, que em condições fisiológicas se decompõe a dióxido de nitrogênio (NO_2^{\bullet}), e o radical $^{\bullet}OH$. O radical $^{\bullet}OH$ também pode ser formado pela reação do $O_2^{\bullet-}$ com o H_2O_2 (Halliwell e Gutteridge, 1999). O radical $^{\bullet}OH$ é uma das espécies mais reativas encontrada em meios biológicos, reagindo no próprio sítio ativo onde foi gerado, sendo responsável por grande parte dos danos celulares, causando danos ao DNA, proteínas e lipídeos (Halliwell e Gutteridge, 1999).

A capacidade seqüestradora de radicais $^{\bullet}OH$ de *Cyathea phalerata* foi avaliada através do ensaio de degradação da desoxirribose, onde o radical é produzido pela reação de H_2O_2 com o ferro e oxida a desoxirribose. Biologicamente, o radical $^{\bullet}OH$ é amplamente gerado quando o H_2O_2 reage com Ferro (II) (Reação de Fenton). Como nos experimentos anteriores, a FAE apresentou novamente uma atividade pronunciada, sendo capaz de inibir a degradação da desoxirribose. O EB e o restante das frações estudadas também apresentaram uma importante atividade neste ensaio.

O potencial seqüestrador de radicais $^{\bullet}OH$ apresentado pela FAE pode ser de grande importância devido à alta reatividade e toxicidade deste radical. Estes resultados alinham-se a dados da literatura que indicam que diversos flavonóides apresentam atividade seqüestradora deste radical (Hu e Kitts, 2003; Zou et al., 2004; Joubert et al., 2005; Varga et al., 2006). Substâncias capazes de seqüestrar radicais $^{\bullet}OH$ podem ser importantes na prevenção dos danos oxidativos gerados por este radical, em diversas doenças que envolvem

o estresse oxidativo, como aterosclerose, diabetes, doenças neurodegenerativas, entre outras.

A proteção à peroxidação lipídica foi testada usando homogenato de fígado de ratos como substrato-alvo. A FAE de *Cyathea phalerata* apresentou um forte efeito protetor da peroxidação lipídica (CI50 = 16,75 µg/mL), quando comparada ao EB e às outras frações avaliadas. A capacidade seqüestradora dos radicais $O_2^{\bullet-}$ e principalmente do $\bullet OH$ pode ser responsável pelos efeitos de diminuição dos danos aos lipídeos de membrana. Os resultados obtidos vão ao encontro de dados da literatura, onde se observou o efeito protetor de compostos fenólicos, especialmente flavonóides, sobre a peroxidação lipídica (Ng et al., 2000; Nardi, et al., 2003).

Ácidos graxos poliinsaturados isolados e incorporados à lipídeos são facilmente atacados por radicais livres, sendo oxidados a peróxidos lipídicos. Estes peróxidos lipídicos são tóxicos e capazes de danificar muitas células (Halliwell e Chirico, 1993). A peroxidação lipídica pode contribuir para perda das funções celulares alterando a fluidez lipídica, a permeabilidade da membrana, inativando enzimas associadas à membrana, alterando o transporte de íons, liberando o conteúdo intracelular e gerando metabólitos citotóxicos de hidroperóxidos lipídicos (Rice Evans, 1995; Stark, 2005).

A peroxidação lipídica desempenha um importante papel na patogênese da aterosclerose. A oxidação da LDL envolve a peroxidação de ácidos graxos e modificação covalente da apolipoproteína B-100 por produtos da peroxidação lipídica (Steinberg, 1997). Substâncias capazes de impedir a peroxidação lipídica podem apresentar um importante papel na prevenção desta doença.

A análise do potencial antioxidante *in vitro* revelou uma atividade maior da FAE em relação ao EB e as outras frações avaliadas. A maior atividade desta fração pode ser justificada pela elevada concentração de compostos fenólicos, principalmente flavonóides, conhecidos por sua eficiente atividade antioxidante. O composto 3-O- α -L-rhamnopiranosil (1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosídeo, majoritário nesta fração, pode ser um dos principais responsáveis por esta atividade. A FBU apresentou uma atividade também importante nestes modelos, embora menor que a FAE, que também pode ser atribuída ao composto kanferol 3-O- α -L-rhamnopiranosil (1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosídeo, pois o mesmo está presente em menor quantidade nesta fração.

Flavonóides glicosilados obtidos a partir de diferentes espécies vegetais (*Aconitum sp.*, *Polygonum sp.*, *Viscum coloratum*; *Brassica juncea*, *Gentiana arinanensis*) também possuem atividade em ensaios de atividade antioxidante *in vitro* (Ko et al., 1998; Calis et al., 1999; Choi et al., 2002; Yao et al., 2006). Braca e colaboradores (2003), por exemplo, demonstraram a atividade antioxidante de 13 flavonol glicosídeos, isolados de espécies de *Aconitum sp.*

A partir desses resultados *in vitro*, foi escolhida a FAE para dar continuidade ao estudo em modelos de estresse oxidativo *in vivo*, no qual foi utilizado o tetracloreto de carbono (CCl₄) como agente estressor. O CCl₄ é um solvente orgânico, altamente tóxico, e tem sido empregado como uma importante ferramenta para o estudo do estresse oxidativo experimental devido à sua rápida metabolização no fígado ao radical triclorometil (CCl₃[•]) e subsequente iniciação da peroxidação lipídica (Kadiiska et al., 2005). Ao reagir

com O_2 , o CCl_3^\bullet , forma o radical $CCl_3O_2^\bullet$, que pode ser também iniciador da peroxidação lipídica, abstraindo átomos de hidrogênio dos lipídeos. O estresse oxidativo induzido pelo CCl_4 no fígado pode levar à uma elevação nos níveis de Ca^{+2} intracelular, depleção de GSH e liberação de ferro (Halliwell e Gutteridge, 1999). Além da sua atividade hepatotóxica, causa geração de radicais livres em outros tecidos tais como rins, coração, pulmões, testículos, cérebro, e no sangue (Galelli et al., 1997; Tirkey et al., 2005).

Vinte e quatro horas após a administração intraperitoneal de CCl_4 em camundongos, foi possível observar uma indução da peroxidação lipídica, avaliada pela detecção de derivados lipoperóxidos, através de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). A FAE de *Cyathea phalerata* nas doses de 30 e 100 mg/kg foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica, concordando com os dados para a avaliação da peroxidação lipídica *in vitro*, onde a FAE também apresentou um efeito inibitório sobre a peroxidação lipídica. A rutina, um flavonóide com conhecida atividade antioxidante também apresentou atividade protetora neste ensaio, confirmando dados existentes na literatura (Ng et al., 2000).

Ng e colaboradores (2000) demonstraram que os flavonóides rutina, baicalina e luteolina tiveram efeito inibitório sobre a peroxidação lipídica utilizando homogenatos de cérebro e rins, através da medida de TBARS. O flavonóide glicosilado, hisperidina, abundantemente encontrado na laranja e no limão, é capaz de diminuir os níveis de peroxidação lipídica no fígado e rins de ratos expostos ao CCl_4 (Tirkey et al, 2005).

Os radicais livres atacam a membrana e convertem ácidos graxos poliinsaturados em hidroperóxidos lipídicos. A medida de hidroperóxidos

orgânicos em organismos vivos submetidos a estresse oxidativo têm sido amplamente empregada como indicação de um dano antecipado causado por radicais livres e outras EROs (Gay e Gebicki, 2003).

No ensaio com xilenol laranja, é feita uma medida direta de hidroperóxidos (LOOH), ao contrário do TBARS que mede os produtos de decomposição do LOOH (Hermes-Lima et al., 1995). Curiosamente, a FAE não foi capaz de proteger contra a formação de hidroperóxidos, enquanto que a rutina apresentou atividade protetora neste ensaio. A neutralização do LOO^\bullet pela FAE pode ter ocorrido após a formação dos hidroperóxidos, em uma etapa posterior do processo de peroxidação lipídica.

O ensaio do cometa foi utilizado para avaliar a presença de dano ao DNA. Este ensaio tem se mostrado útil e rápido para a avaliação deste tipo de dano e pode ser utilizado para examinar efeitos de antioxidantes e outros agentes (Anderson et al., 1994). $\text{O}_2^{\bullet-}$, NO ou H_2O_2 , em níveis fisiológicos, não parecem reagir com nenhuma base de DNA ou RNA ou os açúcares ribose ou desoxirribose em taxas significativas. Em contraste, como pode ser esperado pela alta reatividade do radical $^\bullet\text{OH}$, a exposição do DNA ao $^\bullet\text{OH}$ gera muitos produtos, pois este ataca açúcares, purinas e pirimidinas. O O_2 singlete é mais seletivo, mas também gera dano ao DNA. Radicais livres de nitrogênio também podem produzir nitração, nitrosação e desaminação das bases de DNA (Halliwell e Gutteridge, 1999; Evans et al., 2004).

Danos contínuos ao DNA, se não forem eficientemente reparados, podem estar envolvidos no desenvolvimento de câncer (Pool-Zobel, et al., 1997; Valko et al., 2004), assim a ingestão de compostos com atividade antioxidante na dieta pode prevenir tal patologia (Halliwell, 1996).

De acordo com os resultados, foi possível observar que a administração de CCl_4 foi capaz de induzir um dano considerável ao DNA. Dados da literatura demonstram que o CCl_4 induz uma fragmentação após 24 horas de sua administração (Nath et al., 1990). As 3 doses de FAE administradas foram capazes de diminuir o ataque oxidativo dos radicais livres ao DNA, reduzindo o índice de dano com predomínio dos cometas de classe 1 e 2, de forma semelhante à rotina. A proteção ao DNA gerada pela FAE de *Cyathea phalerata* pode ter sido decorrente da capacidade de seqüestrar radicais $\cdot\text{OH}$, diminuindo conseqüentemente seu ataque às moléculas de DNA, e à proteção da membrana lipídica, reforçando os dados apresentados anteriormente.

Anderson e colaboradores (1994) demonstraram que os antioxidantes vitamina C, vitamina E e silimarina reduziram o dano ao DNA em linfócitos humanos, avaliado pelo ensaio do cometa. De maneira semelhante aos resultados obtidos com *Cyathea phalerata*, o extrato de *Trianthema portulacastrum* L., uma erva indiana, foi capaz de proteger a quebra de cadeia de DNA em fígado de camundongos pré-tratados com CCl_4 (Sarkar et al., 1999).

A geração de grupos carbonila nas proteínas causa perda da função catalítica e estrutural, causando efeitos deletérios nas células e função dos órgãos (Levine, 2002). O conteúdo de proteína carbonilada é atualmente um indicador comumente utilizado como um marcador de oxidação protéica, e o acúmulo destas têm sido observado em várias doenças incluindo doença de Alzheimer, diabetes e artrite. O método espectrofotométrico do DNPH é muito utilizado para quantificar o conteúdo carbonílico em misturas de proteínas, tais

como plasma, homogenatos de tecidos, extratos celulares ou isolados de proteínas (Dalle-Donne et al., 2003b; Stadtman e Levine, 2003).

Os radicais CCl_3^\bullet e $\text{CCl}_3\text{O}_2^\bullet$, produzidos pela biotransformação do CCl_4 , em um meio rico em proteínas, podem abstrair um átomo de hidrogênio, gerando radicais livres em proteínas. A adição de oxigênio à estes radicais pode promover a oxidação protéica de maneira similar à agentes como metais e radiação (Galelli et al., 1997). De acordo com os resultados, o CCl_4 foi capaz de aumentar a carbonilação às proteínas em cerca de 113,7 % no fígado de camundongos. A FAE promoveu uma proteção ao dano oxidativo gerado, principalmente das doses 10 e 100 mg/kg. Estes resultados demonstram um efeito protetor contra o ataque oxidativo, gerado pelo CCl_4 a proteínas, evitando a carbonilação e também reforçando os dados anteriores em relação à peroxidação lipídica e dano ao DNA.

Em relação às defesas antioxidantes, o CCl_4 depletou os níveis de GSH total hepática em 54,1% nos animais expostos. O tratamento com a FAE ou rutina não foi capaz de reduzir essa depleção, apresentado níveis de GSH semelhantes aos do controle tetracloreto. A GSH é utilizada como substrato da GPx, mas pode atuar na neutralização direta de EROs, transferindo um átomo de hidrogênio do seu grupo SH para o radical livre (Chaudière e Ferrari-Iliou, 1999). A GSH pode reagir diretamente com O_2^\bullet , H_2O_2 , radicais peroxil e ONOO^- (Halliwell, 1996).

Talvez a FAE poderia estar atuando de forma semelhante à GSH na neutralização direta de EROs doando um átomo de hidrogênio para o radical livre, pois conseguiu reverter os danos oxidativos às macromoléculas (lipídeos, DNA e proteínas), mesmo em concentrações baixas de GSH.

No caso das enzimas de defesa, é possível observar uma redução significativa das atividades de GST e CAT após a exposição dos animais ao CCl₄. O aumento na concentração de radicais livres resultante de condições de estresse oxidativo causa perda da atividade enzimática (Escobar et al., 1996). Szymonik-Lesiuk e colaboradores (2003) encontraram uma redução da atividade da CAT em rim de ratos 24 horas após a exposição destes ao CCl₄. Experimentos demonstraram que a expressão gênica da enzima CAT, em fígados de ratos, foi diminuída 24 horas após a administração de CCl₄ (Fountoulakis et al., 2002).

De maneira interessante, a FAE preservou a atividade de CAT de maneira mais significativa na dose de 10 mg/kg, não alterando a atividade na dose de 30 mg/kg e de maneira menos significativa na dose de 100 mg/kg. A rotina usada como controle nesse experimento não foi capaz de aumentar a atividade desta enzima. Ha e Lee (2003) demonstraram que o antioxidante sulfato de condroitina também foi capaz de aumentar a atividade da enzima CAT no fígado de ratos que receberam CCl₄.

A GST e a GSH apresentam um importante papel na detoxificação de muitos xenobióticos, pois a GST é a enzima responsável por catalisar a reação da GSH com o metabólito reativo (Sheweita et al., 2001). A atividade de GST foi diminuída nos animais que receberam o CCl₄ e o pré-tratamento com a FAE nas doses de 30 e 100 mg/kg foi capaz de aumentar essa atividade, de forma semelhante à rotina.

Uma fração biflavonóide de um extrato de sementes de *Garcinia kola* foi capaz de aumentar a atividade de GST em fígado de ratos expostos ao CCl₄ (Farombi et al., 2000), de maneira semelhante aos resultados encontrados para

a FAE de *Cyathea phalerata*. Uma erva medicinal, *Crassocephalum crepidioides*, das ilhas Okinawa, que contém na sua composição química o kanferol-3-galactoside e outros flavonóides, também é capaz de aumentar a atividade de GST no fígado de ratos expostos ao CCl₄ (Aniya et al., 2005).

De acordo com os resultados de atividade antioxidante *in vitro* foi possível verificar que a FAE de *Cyathea phalerata* foi capaz de seqüestrar radicais [•]OH. Além disso, foi demonstrado que esta fração também é capaz de reduzir o dano oxidativo à proteínas hepáticas. Sendo assim, a capacidade de preservar a atividade enzimática de CAT e GST desta fração poderia estar relacionada a essa atividade seqüestradora, reduzindo desta maneira o dano oxidativo causado por este radical às enzimas, levando à preservação de sua atividade. Escobar e colaboradores (1996) demonstraram que a perda da atividade enzimática em uma situação de estresse oxidativo está relacionada ao aumento das interações entre as proteínas e os radicais reativos.

De maneira geral, a FAE de *Cyathea phalerata* apresentou uma importante atividade de proteção tecidual contra o ataque oxidativo gerado pelo CCl₄, comprovado pelos ensaios de peroxidação lipídica, dano ao DNA, oxidação protéica e elevação das atividades enzimáticas de CAT e GST, porém o efeito observado não foi dependente da dose utilizada.

No sistema cardiovascular, os radicais livres de oxigênio, em níveis fisiológicos, apresentam um papel essencial na manutenção da integridade vascular e cardíaca, já em concentrações elevadas possuem um papel patofisiológico na disfunção cardiovascular associada à condições tais como hipertensão, diabetes, aterosclerose, injúria por isquemia/reperfusão e insuficiência cardíaca congestiva (Touyz e Schiffrin, 2004). A relação entre o

aumento do estresse oxidativo na vasculatura e o prejuízo da função vasodilatadora é clara e muitos pesquisadores consideram a possibilidade de que o aumento das defesas antioxidantes podem ter um efeito benéfico, principalmente na aterosclerose (Tomasian et al., 2000).

Estudos epidemiológicos sugerem a existência de uma correlação negativa entre o consumo de alimentos ou bebidas ricos em polifenóis e a incidência de doenças cardiovasculares e infarto (Stoclet et al., 2004). Este fato pode estar relacionado à atividade antioxidante destes compostos, visto que o tratamento utilizando estas substâncias melhora a função e estrutura vascular, prevenindo o dano ao órgão-alvo, e reduzindo a pressão arterial (Moline et al., 2000; Touyz e Schiffrin, 2004).

Visto que a FAE apresentou uma atividade antioxidante importante nos modelos utilizados (*in vitro* e *in vivo*) e que o estresse oxidativo está envolvido em diferentes patologias, dentre elas doenças cardiovasculares, continuou-se o estudo desta fração em um modelo de reatividade vascular. Além disso, dados da literatura demonstram que flavonóides possuem uma importante atividade vasodilatadora e antihipertensiva (Herrera et al., 1996; Ajay et al., 2003; Woodman e Chan, 2004), sendo por isso importantes para a prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares.

Pesquisas com plantas medicinais, especialmente as ricas em flavonóides e outros compostos fenólicos, têm demonstrado um importante efeito vasodilatador normalmente por mecanismos dependentes do endotélio vascular (Fitzpatrick et al., 1995; Wazlawik et al., 1997; Schuldt et al., 2000; Jiang et al., 2005; Schuldt et al., 2005).

O estudo de *Cyathea phalerata* revelou um efeito vasodilatador do EB e de modo ainda mais expressivo da FAE, que foi reduzido de forma significativa após a remoção da camada de células endoteliais. Apenas em concentrações muito elevadas (1000 µg/mL) a FAE foi capaz de promover efeito nas preparações desprovidas de endotélio. Andriambeloson e colaboradores (1997) verificaram que uma determinada mistura de polifenóis existentes no vinho, promovia relaxamento dependente do endotélio e que nas preparações sem endotélio, eram necessárias concentrações muito maiores para desencadear o efeito.

As células endoteliais secretam mediadores vasoativos em resposta a substâncias liberadas de nervos autonômicos e sensoriais, hormônios circulantes, derivados da coagulação e produtos plaquetários, ou produtos autacóides produzidos pelas células endoteliais e pelo músculo liso vascular. Os principais vasodilatadores derivados do endotélio são: óxido nítrico (NO), prostaciclina e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Mombouli e Vanhoute, 1999).

Para investigar o possível envolvimento do NO no relaxamento induzido pela FAE, foram realizados experimentos utilizando um inibidor da óxido nítrico sintase (NOS), L-NOARG, e seu substrato o aminoácido L-arginina. Nos experimentos utilizando L-NOARG o relaxamento induzido pela FAE foi significativamente reduzido. Os inibidores da NOS bloqueiam a atividade enzimática por serem análogos do substrato L-arginina, competindo com esse aminoácido pelo seu sítio ativo (Aoki, 1995; Moncada e Higgs, 2006). A L-arginina foi capaz de reverter o efeito inibitório promovido pelo L-NOARG, alcançando valores muito próximos aos da curva controle.

O efeito da FAE também foi reduzido a valores semelhantes aos obtidos com L-NOARG quando o ODQ (inibidor da enzima guanilato ciclase) foi adicionado à preparação. De acordo com estes resultados podemos verificar uma relação com a diminuição da formação de GMPc e conseqüentemente uma redução da vasodilatação induzida pela FAE.

O NO produzido nas células endoteliais produz vasodilatação por ativar a guanilato ciclase no músculo liso vascular, aumentando a concentração intracelular de GMPc. O GMPc, por sua vez, atua como segundo mensageiro, ativando uma proteína quinase, diminuindo a concentração citosólica de Ca^{2+} levando à inibição da contração das células lisas musculares (Mombouli e Vanhoutte, 1999; Tomasian et al., 2000).

O efeito da FAE pode ser atribuído aos flavonóides encontrados em grande quantidade nessa fração, visto que estes compostos são conhecidos por apresentarem uma importante atividade vasodilatadora (Herrera et al., 1996; Ajay et al., 2003; Woodman e Chan, 2004). Os resultados obtidos vão ao encontro de diversos estudos realizados em anéis de aorta torácica de rato utilizando flavonóides obtidos de diferentes fontes tais como vinhos, cacau, chás, mel e outros (Fitzpatrick et al., 1995; Chen e Asciak, 1996; Andriambelason, et al., 1997; Wazlawik et al., 1997; Flesch et al., 1998; Kim et al., 2000; Schuldt et al., 2000; Ajay et al., 2003; Ghayur et al., 2005; Jiang et al., 2005).

O mecanismo de ativação da NOS em resposta a diferentes estímulos, envolve o Ca^{+2} intracelular, com exceção do “estresse de cisalhamento”, onde ocorre estimulação da eNOS independente da concentração intracelular de Ca^{+2} . Estudos tem sido realizados a fim de avaliar a implicação destes dois

mecanismos na ativação da NOS pelos polifenóis (Stoclet et al., 2004). A incubação de células endoteliais com vinho tinto aumentou a expressão protéica da eNOS e a sua atividade enzimática (Wallerath et al., 2002). Além disso, os flavonóides são capazes de aumentar a liberação ou atividade de NO, com conseqüente aumento nos níveis de GMPc. O aumento nos níveis de GMPc pode ser devido a uma inibição da enzima fosfodiesterase, responsável pela degradação do AMPc e GMPc promovida pelos flavonóides (Beretz et al., 1986).

A prostaciclina é um vasodilatador produzido pelas células endoteliais a partir do ácido araquidônico pela enzima ciclooxigenase (COX). A ligação da prostaciclina aos seus receptores na membrana da célula muscular lisa vascular ativa a adenilato ciclase e eleva os níveis de AMPc, que por sua vez estimula canais de K^+ causando hiperpolarização da membrana celular e inibindo a contração (Mombouli e Vanhoute, 1999; Parkington et al., 2004). A ação das prostaciclina no músculo liso vascular pode ser potencializada pelo NO. Além disso, o aumento de GMPc na célula alvo inibi a fosfodiesterase que quebra AMPc. Assim, o NO indiretamente prolonga o tempo de meia vida do segundo mensageiro da prostaciclina (Delpy et al., 1996). Além disso, o NO formado nas células endoteliais pode ativar a COX, aumentando a produção de prostaciclina (Salvemini et al., 1997).

A prostaciclina derivada das células endoteliais também pode participar do efeito vasorrelaxante dos flavonóides (Ajay et al., 2003). A incubação de indometacina, inibidor da COX, foi capaz de aumentar os valores de CI50 do relaxamento induzido pela FAE, indicando uma participação deste mediador no seu efeito. Aldini e colaboradores (2003) demonstraram que proantocianidinas

extraídos de sementes de uvas, são capazes de estimular a atividade da COX e a produção de PGI₂, através de um mecanismo dependente de NO/GMPc, possuindo um papel importante na recuperação do coração infartado, pois previne o aparecimento de arritmias e a agregação plaquetária.

O efeito da FAE sobre a contração induzida pela fenilefrina foi avaliado em anéis de aorta torácica. Não ocorreu alteração nesta contração, ao contrário de dados encontrados na literatura que demonstram que vários extratos e frações ricas em flavonóides são capazes de reduzir a contração induzida por fenilefrina ou noradrenalina (Testai et al., 2005).

Como foi apresentado anteriormente, a FAE apresentou uma importante atividade seqüestradora de radicais livres, através de experimentos *in vitro* e *in vivo*. O aumento da atividade do NO, poderia estar relacionado a um aumento na sua geração ou a uma diminuição de sua inativação por espécies reativas (Fitzpatrick, 1993). O O₂^{•-} reage com NO formando peroxinitrito e este é muito menos efetivo como ativador da guanilato ciclase, resultando na redução na biodisponibilidade do NO (Tomasian et al., 2000). Antioxidantes capazes de seqüestrar radicais livres como o O₂^{•-} aumentam a biodisponibilidade do NO e conseqüentemente seu efeito vasodilatador.

Com o objetivo de investigar se o efeito vasodilatador produzido pela FAE seria desencadeado por sua atividade antioxidante, foram realizados experimentos utilizando um doador de NO, o nitroprussiato de sódio (SNP). O SNP na presença de um agente redutor ou a redução de um elétron libera o NO que exerce efeito vasodilatador (Feelisch, 1998; Yamamoto e Bing, 2000). Na presença da FAE a curva ao SNP, na ausência de endotélio vascular não apresentou alteração. A FAE não foi capaz de seqüestrar os radicais O₂^{•-}, nas

concentrações utilizadas, não potencializando assim o efeito do SNP. A SOD, enzima que converte o $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 (Halliwell e Gutteridge, 1999), deslocou significativamente a curva ao SNP para a esquerda, devido ao aumento da disponibilidade do NO. Estes resultados concordam com o que foi observado no ensaio de redução do NBT, onde a FAE apresentou uma baixa atividade seqüestradora de radicais $O_2^{\bullet-}$.

Desta forma, a atividade vasodilatadora não estaria diretamente relacionada com a atividade antioxidante da FAE, e deve ser devido principalmente à uma ativação da via NO/GMPc e com participação das prostaciclina. Estes dados concordam com os estudos de Andriambelison e colaboradores (1997,1998), que sugeriram que a atividade vasodilatadora endotélio-dependente de polifenóis do vinho não é devida à sua capacidade seqüestradora de radicais $O_2^{\bullet-}$, mas ao aumento na formação de NO resultante da interação com alvos localizados nas células endoteliais.

No presente trabalho observou-se a atividade antioxidante de *Cyathea phalerata in vitro*, principalmente seqüestrando radicais altamente reativos como $\bullet OH$, diminuição do dano à macromoléculas e aumento das defesas antioxidantes *in vivo*, e potencial vasodilatador *in vitro*. Sendo assim, destaca-se o relevante potencial terapêutico de *Cyathea phalerata*, especialmente a FAE, na prevenção e tratamento de diversas patologias que envolvem produção acentuada de radicais livres, dentre elas as doenças cardiovasculares.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que:

- A FAE de *Cyathea phalerata* apresentou uma importante atividade antioxidante *in vitro*, sendo capaz de seqüestrar os radicais DPPH, $\cdot\text{OH}$ e $\text{O}_2^{\cdot-}$, além de proteger contra peroxidação lipídica. Esta fração apresentou resultados mais pronunciados em relação ao EB e as outras frações estudadas;
- No modelo de estresse oxidativo *in vivo*, a FAE foi capaz de diminuir os danos causados pelo agente estressor (CCl_4) às macromoléculas, lipídeos, proteínas e DNA, além de elevar a atividade das enzimas antioxidantes (CAT e GST). Este efeito não foi dependente da dose administrada;
- A FAE apresentou um efeito vasodilatador, em anéis de aorta torácica, de maneira dependente da concentração;
- A atividade vasodilatadora da FAE parece ser dependente do endotélio, ao menos nas menores concentrações, e envolver a participação da via NO/GMPc e de prostaciclina;
- O efeito vasodilatador da FAE parece não ser devido à capacidade seqüestradora de radicais livres, e sim à ativação de mecanismos vasodilatadores dependentes do endotélio;
- As atividades biológicas da FAE de *Cyathea phalerata* podem ser atribuídas ao elevado teor de flavonóides encontrado nesta fração;
- O relevante potencial antioxidante de *Cyathea phalerata*, associado à sua atividade vasodilatadora, pode ser importante para o tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, especialmente doenças cardiovasculares.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, 105: 121-126, 1984.

AJAY, M.; GILANI, A. U.; MUSTAFA, M. R. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. **Life Sciences**, 74 (5): 603-612, 2003.

ALDINI, A. G.; CARINIA, M.; PICCOLIA, A.; ROSSONIB, G.; FACINO, R. M. Procyanidins from grape seeds protect endothelial cells from peroxynitrite damage and enhance endothelium-dependent relaxation in human artery: new evidences for cardio-protection. **Life Sciences**, 73: 2883–2898, 2003.

ANDERSON, D.; YU, T. W.; PHILLIPS, B. J. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the comer assay. **Mutation Research**, 307: 261-271, 1994.

ANDRIAMBELOSON, E.; KLESCHYOV, A. L.; MULLER, B.; BERETZ, A.; STOCLET, J.C.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. **British Journal of Pharmacology**, 120: 1053-1058, 1997.

ANDRIAMBELOSON, E.; MAGNIER, C.; HAAN-ARCHIPOFF, G.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R.; BERETZ, A.; STOCLET, J.C.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Natural Dietary Polyphenolic Compounds Cause Endothelium-Dependent Vasorelaxation in Rat Thoracic Aorta. **The Journal of Nutrition**, 128: 2324-2333, 1998.

ANIYA, Y.; KOYAMA, T.; MIYAGI, C.; MIYAHIRA, M.; INOMATA, C.; KINOSHITA, S.; ICHIBA, T. Free Radical Scavenging and Hepatoprotective actions of the medicinal Herb, *Crassocephalum crepidioides* from the Okinawa Islands. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 28 (1): 19-23, 2005.

AOKI, E.; TAKEUCHI, I. K.; SHOJI, R. Nitric oxide: an attractive signaling molecule. **Acta Histochemica et Cytochemica**, 28 (2): 97-106, 1995.

ARAI, Y.; HATTORI, T.; HAMAGUCHI, N.; MASUDA, K.; TAKANO, A.; SHIOJIMA, K. Fern constituents: dryocrassy formate, sitostanyl formate and 12 α -hydroxyfern-9(11)-ene from *Cyathea podophylla*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, 51 (11): 1311-13130, 2003.

ARAI, Y.; KOIDE, N.; OHKI, F.; AGETA, H.; YANG, L.L.; YEN, K.Y. Fern constituents: Triterpenoids isolated from leaflets of *Cyathea spinulosa*. **Chemical & Pharmacheutical Bulletin**, 42 (2): 228-232, 1994.

BAST, A.; HAENEN, G. R.; DOELMAN, C. J. Oxidants and antioxidants: state of the art. **The American Journal of Medicine**, 91(3C): 2S-13S, 1991.

BEECHER, G. R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. **The Journal of Nutrition**, 133 (10): 3248S-3254S, 2003.

BENITO, S.; LOPEZ, D.; SÁIZ, M. P.; BUXADERAS, J.; SÁNCHEZ, P. PUIG-PARELLADA, P.; MITJAVILA, M. T. A flavonoid-rich diet increases nitric oxide production in rat aorta. **British Journal of Pharmacology**, 135: 910-916, 2002.

BERETZ, A.; BRIANCON-SCHIED, F.; STIERLE, A.; CORRE, G.; ANTON, R.; CAZENAVE, J. P. Inhibition of human platelet cyclic AMP phosphodiesterase and of platelet aggregation by a hemisynthetic flavonoid, amentoflavone hexaacetate. **Biochemical Pharmacology**, 35 (2): 257-262, 1986.

BEUTLER, E.; DURAN, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, 61: 882-890, 1963.

BIRD, R. P.; DRAPER, A. H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods in Enzymology**, 90: 105-110, 1984.

BOYLE, S. P.; DOBSON, V. L.; DUTHIE, S. J.; KYLE, J. A.; COLLINS, A. R. Absorption and DNA protective effects of flavonoid glycosides from an onion meal. **European Journal of Nutrition**, 39 (5): 213-223, 2000.

BRACA, A.; FICO, G.; MORELLI, I.; DE SIMONE, F.; TOMÈ, F.; DE TOMMASI, N. Antioxidant and free radical scavenging of flavonol glycosides from different *Aconitum* species. **Journal of Ethnopharmacology**, 86: 63-67, 2003.

BRYAN, R. M.; YOU, R.; GOLDING, E. M.; MARRELLI, S. P. Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor. **Anesthesiology**, 102: 1261-1277, 2005.

BUSSE, R.; EDWARDS, G.; FÉLÉTOU, M.; FLEMING, P. M.; VANHOUTTE, P. M.; WESTON, A. H. EDHF: bringing the concepts together. **Trends in Pharmacological Sciences**, 23 (8): 374-380, 2002.

BUTKOVIC, V.; KLASINC, L.; BORS, W. Kinetic study of flavonoid reactions with stable radicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52 (10): 2816-2820, 2004.

CALIS, I.; KURUUZUM, A.; DEMIREZER, L. O.; STICHER, O.; GANCI, W.; RUEDI, P. Phenylvaleric Acid and Flavonoid Glycosides from *Polygonum salicifolium*. **Journal of Natural Products**, 62: 1101-1105, 1999.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, 100: 131-134, 2005.

CARR, A.; FREI, B. The role of natural antioxidants in preserving the biological activity of endothelium-derived nitric oxide. **Free Radical Biology & Medicine**, 28 (12): 1806-1814, 2000.

CAZAROLLI, L. H. **Estudo da atividade de flavonóides e de complexos de vanádio na glicemia de ratos diabéticos induzidos com aloxana.** Dissertação de Mestrado em Farmácia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

CECONI, C.; BORASO, A.; CARGNONI A.; FERRARI, R. Oxidative Stress in cardiovascular disease: myth or fact? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 420: 217-221, 2003.

CHEN, H.; TAPPEL, A. L. Protection of multiple antioxidants against heme protein oxidation and lipid peroxidation induced by CBrCl₃ in liver, lung, heart, and spleen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44: 854-858, 1996.

CHEN, L.; BOWEN, P. E.; BERZY, D.; ARYEE, F.; STACEWICZ-SAPUNTZAKIS, M.; RILEY, R. E. Diet modifications affects DNA oxidative damage in healthy humans. **Free Radical Biology & Medicine**, 26 (5/6): 695-703, 1999.

CHEN, Z.; HU, Y.; WU, H.; JIANG, H. Synthesis and biological evaluation of flavonoids as vasorelaxant agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 14(15): 3949-3952, 2004.

CHO, E. J.; YOKOZAWA, T.; RHYU, D. Y.; KIM, S. C.; SHIBAHARA, N.; PARK, J. C. Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. **Phytomedicine**, 10: 544-551, 2003.

CHOI, E.J.; LEE, B. H.; LEE, K.; CHEE, K.M. Long-term combined administration of quercetin and daidzein inhibits quercetin-induced suppression of glutathione antioxidant defenses. **Food and Chemical Toxicology**, 43 (5): 793-798, 2005.

CHOI, J. S.; JUNG, M. J.; PARK, H. J.; CHUNG, H. Y.; KANG, S. S. Further isolation of peroxyxynitrite and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging isorhamnetin 7-O-glucoside from the leaves of *Brassica juncea* L. **Archives of Pharmaceutical Research**, 25 (5): 625-627, 2002.

CLAUDIÉRE, J.; FERRARI-ILIOU, R. Intracellular Antioxidants: from Chemical to Biochemical Mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, 37: 949-962, 1999.

CORRÊA, D. S.; RABETTI, A. C.; RAE, G. A. ATP-sensitive potassium channels do not mediate vasorelaxation by acetylcholine or iloprost. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 24: 729-734, 1991.

COTELLE, N. Role of Flavonoids in Oxidative Stress. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 1: 569-590, 2001.

DAI, F.; MIAO, Q.; ZHOU, B.; YANG, L.; LIU, Z. L. Protective effects of flavonols and their glycosides against free radical-induced oxidative hemolysis of red blood cells. **Life Sciences**, 78 (21): 2488-2493, 2006.

DALLE-DONNE, I.; GIUSTARINI, D.; COLOMBO, R.; ROSSI, R.; MILZANI, A. Protein carbonylation in human diseases. **Trends in Molecular Medicine**, 9 (4): 169-176, 2003a.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; COLOMBO, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, 329: 23-38, 2003b.

DELPY, E.; COSTE, H.; GOUVILLE, A.C. Effects of cyclic GMP elevation on isoprenaline-induced increase in cyclic AMP and relaxation in rat aortic smooth muscle: role of phosphodiesterase 3. **British Journal of Pharmacology**, 119 (3): 471-478, 1996.

DE SOUZA, E.; ZANATTA, L.; SEIFRIZ, I.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. PIZZOLATTI, M. G.; SZPOGANICZ, B. SILVA, F. R. M. B. Hypoglycemic Effect and Antioxidant Potential of Kaempferol-3,7-O-(r)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* Leaves. **Journal of Natural Products**, 67: 829-832, 2004.

DING, H.; TRIGGLE, C. R. Novel endothelium-derived relaxing factors Identification of factors and cellular targets. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, 44: 441-452, 2000.

DIZDAROGLU, M.; JARUGA, P.; BIRINCI OGLU, M.; RODRIGUEZ, H. Free Radical-Induced Damage to DNA: Mechanisms and Measurement. **Free Radical Biology & Medicine**, 32 (11): 1102–1115, 2002.

DRÖGE, W. Free Radicals in the Physiology Control of Cell Function. **Physiological Reviews**, 82: 47-95, 2002.

ERDEMOGLU, N.; TURAN, N. N.; CAKICI, I.; SENER, B.; AYDIN, A. Antioxidant activities of some Lamiaceae plant extracts. **Phytotherapy Research**, 20 (1): 9-13, 2006.

ERNST, E. The efficacy of herbal medicine – an overview. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, 19: 405-409, 2005

ESCOBAR, J. A.; RUBIO, M. A.; LISSI, E. A. SOD and catalase inactivation by singlet oxygen and peroxy radicals. **Free Radical Biology & Medicine**, 20 (3): 285-290, 1996.

ESTRUCH, R. Wine and cardiovascular disease. **Food Research International**, 33: 219-226, 2000.

EVANS, M. D.; DIZDAROGLU, M.; COOKE, M. S. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. **Mutation Research**, 567: 1–61, 2004.

FAROMBI, E. O. Mechanisms for the hepatoprotective action of kolaviron: studies on hepatic enzymes, microsomal lipids and lipid peroxidation in carbontetrachloride-treated rats. **Pharmacological Research**, 42 (1): 75-80, 2000.

FAROMBI, E.O.;HANSEN, M.; RAVN-HAREN, G.; MOLLER, P.; DRAGSTED, L. O. Commonly consumed and naturally occurring dietary substances affect biomarkers of oxidative stress and DNA damage in healthy rats. **Food and Chemical Toxicology**, 42 (8): 1315-1322, 2004.

FATTMAN, C.L. SCHAEFER, L. M.; OURY, T. D. Extracellular Superoxide Dismutase in Biology and Medicine. **Free Radical Biology & Medicine**, 35 (3): 135-156, 2003.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, M. EDHF: new therapeutic targets? **Pharmacological Research**, 49: 565-580, 2004.

FEELISCH, M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 358: 113-122, 1998.

FERREIRA, S. H. (Organizador). **Medicamentos a partir de Plantas Medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998.

FITZPATRICK, D. F.; HIRSCHFIELD, S. L.; RICCI, T.; JANTZEN, P.; COFFEY, R. G. Endothelium-dependent Vasorelaxation Caused by Various Plant Extracts. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, 26: 90-95, 1995.

FITZPATRICK, D.F.; STEVEN, L.; HIRSCHFIELD, S. L.; COFFEY, R. G. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. **American Journal of Physiology**, 265: 774-778, 1993.

FLEMING, I.; BUSSE, R. NO: the Primary EDRF. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, 31: 5-14, 1999.

FLEMING, W. W.; WESTPHALL, D. P; DE LA LANDRE, D. P.; JELLET, L. B. Log-normal distribution of equieffective doses of norepinephrine and acetylcholine in several tissues. **Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics**, 181: 339-345, 1972.

FLESCH, M.; SCHWARZ, A.; BÖHM Effects of red and white wine on endothelium-dependent vasorelaxation of rat aorta and human coronary arteries. **American Journal of Physiology**, 275: 1186-1190, 1998.

FOUNTOULAKIS, M.; DE VERA, M. C.; CRAMERI, F.; BOESS, F. GASSER, R.; ALBERTINI, S.; SUTER, L. Modulation of gene and protein expression by carbon tetrachloride in the rat liver. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 183 (1): 71-80, 2002.

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, 288: 373-376, 1980.

FURCHGOTT, R.F.; CHERRY, P.D.; ZAWADZKI, J. V.; JOTHIANANDAN, D. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, 6: 336-343, 1984.

FREI, B.; HIGDON, J. V. Antioxidant Activity of Tea Polyphenols in Vivo: evidence from Animal Studies. **The Journal of Nutrition**, 133 (10): 3275-3284, 2003.

GALELLI, M. E.; DÍAZ GÓMEZ, M. I.; CASTRO, G. D.; CASTRO, J. A. Carbon tetrachloride-induced free radical mediated protein oxidation in vitro and in vivo. **Redox Report**, 3 (1): 23-29, 1997.

GAO, S.; FENG, N.; YU, S.; YU, D.; WANG, X. Vasodilator constituents from the roots of *Lysidice rhodostega*. **Planta Medica**, 70 (12): 1128-1134, 2004.

GAY, C. A.; GEBICKI, J. M. Measurement of protein and lipid hydroperoxides in biological systems by the ferric–xylenol orange method. **Analytical Biochemistry**, 315: 29–35, 2003.

GEWALTIG, M. T.; KOJDA, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. **Cardiovascular Research**, 55: 250–260, 2002.

GHAYUR, M. N.; GILANI, A. H.; AFRIDI, M. B.; HOUGHTON, P. J. Cardiovascular effects of ginger aqueous extract and its phenolic constituents are mediated through multiple pathways. **Vascular Pharmacology**, 43 (4): 234-241, 2005.

GLASS, C. K.; WITZTUM, J. L. Atherosclerosis: the road ahead. **Cell**, 16: 104-503, 2001.

GOEL, R. K.; PANDEY, V. B.; DWIVEDI, S. P.; RAO, Y. V. Antiinflammatory and antiulcer effects of kaempferol, a flavone, isolated from *Rhamnus procumbens*. **Indian Journal of Experimental Biology**, 26 (2): 121-124, 1988.

GOLA, G.; NEGRI, G.; CAPPELLETTI, C. **Tratado de Botânica**. 2 ed. Barcelona, Rio de Janeiro: Editora Labor, 1965.

GOUPY, P.; DUFOUR, C.; LOONIS, M.; DANGLES, O. Quantitative Kinetic Analysis of Hydrogen Transfer Reactions from Dietary Polyphenols to the DPPH Radical. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51: 615-622, 2003.

GRAHAM, J. G.; QUINN, M. L.; FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. Plants used against cancer – an extension of the work of Jonathan Hartwell. **Journal of Ethnopharmacology**, 73: 347–377, 2000.

GRIENDLING, K. K.; FITZGERALD, G. A. Oxidative Stress and Cardiovascular Injury: Part I: Basic Mechanisms and In Vivo Monitoring of ROS. **Circulation**, 108: 1912-1916, 2003.

HA, B. J.; LEE, J. Y. The Effect of Chondroitin Sulfate against CCl₄ –Induced Hepatotoxicity. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 26 (5): 622-626, 2003.

HA, K. T.; YOON, S. J.; CHOI, D. Y.; KIM, D. W.; KIM, J. K.; KIM, C. H. Protective effect of Lycium chinense fruit on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. **Journal of Ethnopharmacology**, 96 (3): 529-535, 2005.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, 249 (22): 7130-7139, 1974.

HALLIWELL, B. Antioxidants in Human Health and Disease. **Annual Reviews of Nutrition**, 16: 33-50, 1996.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **Lancet**, 355 (9210): 1179-1180, 2000.

HALLIWELL, B. Effect of Diet on Cancer Development: Is Oxidative DNA Damage a Biomarker? **Free Radical Biology & Medicine**, 32: 10, 968–974, 2002.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid Peroxidation: its mechanism, measurement and significance. **American Journal of Clinical Nutrition**, 57: 715-25, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Formation of a thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose assay in the presence of iron salts – the role of superoxide and hydroxyl radicals. **FEBS Letters**, 128 (2): 347-352, 1981.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 3 ed. London: Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL, B.; RAFTER, J.; JENNER, A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? **American Journal of Clinical Nutrition**, 81: 268-276, 2005.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, 142: 231-255, 2004.

HANASAKI, Y.; OGAWA, S. FUKUI, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radical Biology & Medicine**, 16 (6): 845-850, 1994.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). **Toxicology Letters**, 90: 183-188, 1997.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, 96: 67-202, 2002.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione Transferases. **Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology**, 45: 51–88, 2005.

HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W. G.; STOREY, K. B. Quantification of Lipid Peroxidation in Tissue Extracts based on Fe(III)Xylenol Orange Complex Formation. **Free Radical Biology & Medicine**, 19 (3): 271-280, 1995.

HERRERA, M. D.; ZARZUELO, A.; JIMÉNEZ, J.; MARHUENDA, E.; DUARTE, J. Effects of Flavonoids on Rat Aortic Smooth Muscle Contractility: Structure-Activity Relationships. **General Pharmacology**, 27 (2): 273-277, 1996.

HIGUCHI, Y. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. **Biochemical Pharmacology**, 66: 1527–1535, 2003.

HIRAOKA, A.; HASEGAWA, M. Flavonoid glycosides from five *Cyathea* species. **Bot. Mag. Tokio**, 88: 127-130, 1975.

HIRAOKA, A.; MAEDA, M.; A new acylated flavonol glycoside from *Cyathea contaminans* Copel. and its distribution in the Pterophyta. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, 27 (12): 3130-3136, 1979.

HO, H. M.; CHEN, R.; HUANG, Y.; CHEN, Z. Y. Vascular effects of a soy leaves (*Glycine max*) extract and kaempferol glycosides in isolated rat carotid arteries. **Planta Medica**, 68 (6): 487-491, 2002.

HU, C.; KITTS, D. D. Antioxidant, Prooxidant, and Cytotoxic Activities of Solvent-Fractionated Dandelion (*Taraxacum officinale*) Flower Extracts in Vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51: 301-310, 2003.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53: 1841-1856, 2005.

HUANG, Y. WONG, C. M.; LAU, C.; YAO, X.; TSANG, S. Y.; SU, Y. L.; CHEN, Z. Y. Inhibition of nitric oxide/cyclic GMP-mediated relaxation by purified flavonoids, baicalin and baicalein, in rat aortic rings. **Biochemical Pharmacology**, 67: 787-795, 2004.

IJIMA, K.; YOSHIZUMI, M.; OUCHI, Y. Effect of red wine polyphenols on vascular smooth muscle cell function – molecular mechanism of the “French paradox”. **Mechanisms of Ageing and Development**, 123: 1033-1039, 2002.

ILAVARASAN, R.; VASUDEVAN, M.; ANBAZHAGAN, S.; VENKATARAMAN, S. Antioxidant activity of *Thespesia populnea* bark extracts against carbon

tetrachloride-induced liver injury in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 87(2-3): 227-230, 2003.

JIANG, R.; LAU, K.; HON, P.; MAK, T. C. W.; WOO, K.; FUNG, K. Chemistry and Biological Activities of Caffeic Acid Derivatives from *Salvia miltiorrhiza*. **Current Medicinal Chemistry**, 12 (2): 237-246, 2005.

JOHNSON, F.; GIULIVI, G. Superoxide dismutases and their impact upon human health. **Molecular Aspects of Medicine**, 26: 340–352, 2005.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 7 ed, São Paulo: Cia Editora Nacional, 1967.

JOSEPHY, P. D. **Molecular Toxicology**. New York: Oxford University Press, 1997.

JOUBERT, E.; WINTERTON, P.; BRITZ, T. J.; GELDERBLOM, W. C. A. Antioxidant and Pro-oxidant Activities of Aqueous Extracts and Crude Polyphenolic Fractions of Rooibos (*Aspalathus linearis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53: 10260-10267, 2005.

KADIISKA, M.B.; GLADEN, B. C.; BAIRD, D.D.; GERMOLEC, D.; GRAHAM, L. B.; PARKER, C. E.; NYSKA, A.; WASCHSMAN, J. T.; AMES, B. N.; BASU, S.; BROTH, N.; FITZGERALD, G. A.; FLOYD, R. A.; GEORGE, M.; HEINECKE, J. W.; HATCH, G. E.; HENSLEY, K.; LAWSON, J. A.; MARNETT, L. J.; MORROW, J. D. MURRAY, D. M.; PLASTARAS, J.; ROBERTS, L. J.; ROKACH, J.; SHINENAGA, M. K.; SOHAL, R. S.; SUN, J.; TICE, R. R.; VAN THIEL, D. H.; WELLNER, D.; WALTER, P. B.; TOMER, K. B.; MASON, R. P.; BARRET, J.C. Biomarkers of Oxidative Stress Study II. Are oxidation products of lipids, proteins and DNA markers of CCl₄ poisoning? **Free Radical Biology & Medicine**, 38: 698-710, 2005.

KIKUZAKI, H.; HISAMOTO, M. HIROSE, K.; AKIYAMA, K.; TANIGUCHI, H. Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Related Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50: 2161-2168, 2002.

KIM, H. J.; CHEN, F.; WANG, X.; RAJAPAKSE, N. C. Effect of methyl jasmonate on secondary metabolites of sweet basil (*Ocimum Basilicum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54 (6): 2327-2332, 2006.

KIM, H. Y.; MOON, B. H.; LEE, H. J.; CHOI, D. H. Flavonol glycosides from the leaves of *Eucommia ulmoides* O. with glycation inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, 93: 227–230, 2004.

KIM, S. H.; KANG, K. W.; KIM, K. W.; KIM, N. D. Procyanidins in crataegus extract evoke endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta. **Life Sciences**, 67: 121-131, 2000.

KLAUDE, M.; ERIKSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTRÖN, G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutation Research**, 363: 89-96, 1996.

KO, F. N. CHU, C. C.; LIN, C. N.; CHANG, C. C.; TENG, C. M. Isoorientin-6"-O-glucoside, a water-soluble antioxidant isolated from *Gentiana arisanensis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1389 (2): 81-90, 1998.

LANDMESSER, U.; HORNIG, B.; DREXLER, H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? **Circulation**, 109 (21): 27-33, 2004.

LEE, C. P.; YEN, G. C. Antioxidant activity and bioactive compounds of tea seed (*Camellia oleifera* Abel.) oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54 (3): 779-784, 2006.

LEVINE, R. L. Carbonyl Modified Proteins in Cellular Regulation, Aging and Disease. **Free Radical Biology & Medicine**, 32 (9): 790-796, 2002.

LIAO, H. F.; CHEN, Y. Y.; LIU, J. J.; HSU, M. L.; SHIEH, H. J.; LIAO, H. J.; SHIEH, C. J.; SHIAO, M. S.; CHEN, Y. J. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on angiogenesis, tumor invasion, and metastasis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51(27): 7907-7912, 2003.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, 193 (1): 265-275, 1951.

MADAMANCHI, N. R.; VENDROV, A. RUNGE, M. S. Oxidative stress and vascular disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 25 (1): 29-38, 2005.

MATÉS, J.M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; DE CASTRO, I. N. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. **Clinical Biochemistry**, 32: 595-603, 1999.

McCORD, J. M. The evolution of Free Radical Stress and Oxidative Stress. **The American Journal of Medicine**, 108: 652-659, 2000.

MENSOR, L. L.; MENEZES F. S.; LEITAO, G. G.; REIS, A.S.; DOS SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITAO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, 15: 127-130, 2001.

MICHIELS, C. Endothelial Cell Functions. **Journal of Cellular Physiology**, 196: 430-443, 2003.

MILLER, A. Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. **Current Opinion in Chemical Biology**, 8:162-168, 2004.

MOLINE, J.; BUKHAROVICH, I. F.; WOLFF, M. S.; PHILLIPS, R. Dietary flavonoids and hypertension is there a link? **Medical Hypotheses**, 55 (4): 306-309, 2000.

MOMBOULI J.; VANHOUTTE, P. M. Endothelial Dysfunction: From Physiology to Therapy. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, 31: 61-74, 1999.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its roles in vascular biology. **British Journal of Pharmacology**, 147: 193-201, 2006.

MORTON, L.W.; CACCETTA, R. A.; PUDDEY, I. B.; CROFT, K. D. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 27: 152-159, 2000.

NADERALI, E.; WILLIAMS, G. Prolonged endothelial-dependent and independent arterial dysfunction induced in the rat by short-term feeding with a high-fat, high sucrose diet. **Atherosclerosis**, 166: 253-259, 2003.

NADIN, S. B.; VARGAS-ROIG, L. M.; CIOCCA, D. R. A Silver Staining Method for Single-cell Gel Assay. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, 49 (9): 1193-1186, 2001.

NARDI, G.M.; FELIPPI, R.; DALBÓ, S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. M.; ARRUDA, D. C.; DELLE MONACHE, F.; TIMBOLA, A. K.; PIZZOLATTI, M. G.; CKLESS, K.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Croton ceutidifolius* bark. **Phytomedicine**, 10: 176-184, 2003.

NATH, R. G.; LI, D. H.; RANDERATH, K. Acute and long-term effects of carbon tetrachloride on DNA modifications (I-compounds) in male mouse liver. **Chemico-Biological Interactions**, 76 (3): 343-357, 1990.

NG, T. B.; LIU, F.; WANG, Z. T. Antioxidative activity of natural products from plants. **Life Sciences**, 66 (8): 709-723, 2000.

NIJVELDT, R. J.; VAN NOOD, E.; VAN HOORN, D. E.; BOELEN, P. G.; VAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P. A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 74 (4): 418-425, 2001.

NIKI, E.; YOSHIDA, Y.; SAITO, Y.; NOGUCHI, N. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 338: 668-676, 2005.

NISHIDA, Y.; YOSHIZAWA, K.; AKAMATSU, T. Preparation of iron (III) complex with nitrilotricacetic acid and origin of its unique reactivity. **Chemistry Letters**, 1521- 1524, 1991.

OGITA, H.; LIAO, J. K. Endothelial Function and Oxidative Stress. **Endothelium**, 11: 123-132, 2004.

OVESNÁ, Z.; VACHALCOVÁ, A.; HORVÁTHOVÁ, K. Taraxasterol and beta-sitosterol: new naturally compounds with chemoprotective/chemopreventive effects. **Neoplasma**, 51 (6): 407-414, 2004.

PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric Oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, 327: 524-526, 1987.

PARK J. S, RHO, H. S.; KIM, D. H.; CHANG, I. S. Enzymatic preparation of kaempferol from green tea seed and its antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54 (8): 2951-2956, 2006.

PARKINGTON, H. C.; COLEMAN, H. A.; TARE, M. Prostacyclin and endothelium-dependent hyperpolarization. **Pharmacological Research**, 49 (6): 509-514, 2004.

PEREZ-VIZCAINO, F.; IBARRA, M.; COGOLLUDO, A. L.; DUARTE, J.; ZARAGOZA-ARNAEZ, F.; MORENO, L.; LOPEZ-LOPEZ, G.; TAMARGO, J. Endothelium-independent vasodilator effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolites in rat conductance and resistance arteries. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 302 (1): 66-72, 2002.

PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, 63: 1035-1042, 2000.

POOL-ZOBEL, B. L.; BUB, A.; RECHKEMMER, G. Application of the Comet Assay so Study Oxidative DNA Damage in Human Cells. In: ARUOMA, O. I.; CUPPETT, S. L. (Ed) **Antioxidant Methodology In vivo and in vitro Concepts**, Champaign: AOCS Press, 1997.

REQUENA, J. R.; LEVINE, R. L.; STADTMAN, E. R. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. **Amino Acids**, 25 (3-4): 221-226, 2003.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Carbonyl Assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, 233: 357-363, 1994.

RICE-EVANS, C. Free Radicals and antioxidants in normal and pathological processes. In: RICE-EVANS, C.; BRUCKDORFER, K. R. (Ed) **Oxidative Stress, Lipoproteins and Cardiovascular Dysfunction**, London: Portland Press Ltd., 1995.

ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R. J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. **Biochemical Pharmacology**, 37 (5): 837-841, 1988.

ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. **Nature**, 362: 801-809, 1993.

RUBIO, A. R.; MORALES-SEGURA, M. A. Nitric Oxide, an Iceberg in Cardiovascular Physiology: Far Beyond Vessel Tone Control. **Archives of Medical Research**, 35: 1-11, 2004.

RUIZ, E.; PADILLA, E.; REDONDO, S.; GORDILLO-MOSCOSO, A.; TEJERINA T. Kaempferol inhibits apoptosis in vascular smooth muscle induced by a component of oxidized LDL. **European Journal of Pharmacology**, 529: 79–83, 2006.

RUSSO, A. LONGO, R.; VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. **Fitoterapia**, 73 (1): 21-29, 2002.

SALAH, N.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G.; TIJBURG, L.; BOLWELL, G. P.; RICE-EVANS, C. Polyphenolic Flavanols as Scavengers of Aqueous Phase Radicals and as Chain-Breaking Antioxidants. **Arquives of Biochemistry and Biophysics**, 322 (1): 339-346, 1995.

SALVEMINI, D. Regulation of cyclooxygenase enzymes by nitric oxide. **Cellular and Molecular Life Science**, 53: 576–582, 1997.

SANCHÉZ-MORENO, C. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. **Food Science and Technology International**, 8 (3): 121-137, 2002.

SARKAR, A.; PRADHAN, S.; MUKHOPADHYAY, I.; BOSE, S. K.; ROY, S.; CHATTERJEE, M. Inhibition of early DNA-damage and chromosomal aberrations by *Trianthema portulacastrum* L.. in carbon tetrachloride-induced mouse liver damage. **Cell Biology International**, 23 (10): 703-708, 1999.

SATO, J. O'BRIEN, T.; KATUSIC, Z. S.; FU, A.; NYGREN, J.; SINGH, R.; NAIR, S. Dietary antioxidants preserve endothelium dependent vasorelaxation in overfed rats. **Atherosclerosis**, 161: 327-333, 2002.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress and defense mechanisms in plants: introduction. **Free Radical Biology & Medicine**, 23 (3): 471-472, 1997.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 3 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editoras da UFRGS e UFSC, 2001.

SCHULDT, E.Z. **Estudo de uma Fração Rica em Compostos Fenólicos Provenientes de Uvas da Variedade Bordô (*Vitis labrusca* L.), sobre o Sistema Cardiovascular: Enfoque na Aterosclerose Experimental**. Tese de doutorado em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

SCHULDT, E. Z.; BET, A. C.; HORT, M. A.; IANSSEN, C. MARASCHIN, M. CKLESS, K. RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. An ethyl acetate fraction obtained from a Southern Brazilian red wine relaxes rat mesenteric arterial bed through

hyperpolarization and NO-cGMP pathway. **Vascular Pharmacology**, 43(1):62-8, 2005.

SCHULDT, E. Z.; CKLESS, K.; SIMAS, M. E.; FARIAS, M. R.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. Butanolic fraction from *Cuphea carthagenensis* Jacq McBride relaxes rat thoracic aorta through endothelium-dependent and endothelium-independent mechanisms. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, 35 (2): 234-239, 2000.

SCHULZ, R.; TRIGGLE, C. R. Role of NO in vascular smooth muscle and cardiac muscle function. **Trends in Pharmacological Sciences**, 15 (7): 255-259, 1994.

SEHNEN, A. **Flora Ilustrada Catarinense. Ciathéáceas**. I parte, Itajaí: IOESCSA, 1978.

SHEEHAN, D.; MEADE, G.; FOLEY, V. M.; DOWD, C. A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochemical Journal**, 360: 1-16, 2001.

SHEWEITA, S. A.; ABD EL-GABAR. M.; BASTAWY, M. Carbon tetrachloride-induced changes in the activity of phase II drug-metabolizing enzyme in the liver of male rats: role of antioxidants. **Toxicology**, 165 (2-3): 217-224, 2001.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, 175 (1):184-191, 1988.

SOBRATTEE, M.A.; NEERGHEEN, V. S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA O. I.; BAHORUN, T. Phenolic as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutation Research**, 579 (1-2): 200-213, 2005.

SORG, O. Oxidative Stress: a theoretical model or a biological reality? **Comptes Rendus Biologie**, 327: 649-662, 2004.

SOUTHORN, P. A. Free Radicals in Medicine. I. Chemical Nature and Biologic Reactions. **Mayo Clinic Proceedings**, 63: 381-389, 1988.

STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Free radical-mediated oxidations of free amino acids and amino acids residues in proteins. **Amino Acids**, 25: 207-218, 2003.

STARK, G. Functional Consequences of Oxidative Membrane Damage. **The Journal of Membrane Biology**, 205: 1-16, 2005.

STOCKER, R.; O'HALLORAN, R. A. Dealcoholized red wine decreases atherosclerosis in apolipoprotein E gene-deficient mice independently of inhibition of lipid peroxidation in the artery wall. **American Journal of Clinical Nutrition**, 79: 123-130, 2004.

STEINBERG, D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. **Journal of Biological Chemistry**, 272: 20963-20966, 1997.

STOCKER, R.; KEANEY Jr, J. F. New insights on oxidative stress in the artery wall. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 3 (8): 1825-1834, 2005.

STOCLET, J.; CHATAIGNEAU, T.; NDIAYE, M.; OAK, M.; BEDOUI, J. E.; CHATAIGNEAU, M.; SCHINI-KERTH, V. B. Vascular protection by dietary polyphenols. **European Journal of Pharmacology**, 500: 299-313, 2004.

SZYMONIK-LESIUK, S.; CZECHOWSKA, G.; STRYJECKA-ZIMMER, M.; SLOMKA, M.; MADRO, A.; CELINSKI, K.; WIELOSZ, M. Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. **Journal of Hepato-Biliary-Pancreat Surgery**, 10 (4): 309-315, 2003.

TANIYAMA, Y.; GRIENGLING, K. K. Reactive Oxygen Species in the Vasculature Molecular and Cellular Mechanisms. **Hypertension**, 42: 1075-1081, 2003.

TAPIERO, H.; TEW, K. D.; NGUYEM BA, G.; MATHÉ, G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 56: 200-207, 2005.

TESTAI, L.; SILVIO, C.; AMMAR, B.; LUISA, P.; VINCENZO, C.; MARTINOTTI, E. Vasorelaxant effects of the chloroformic crude extract of *Bupleurum fruticosum* L. (Ubelliferae) roots on rat thoracic aorta. **Journal of Ethnopharmacology**, 96: 93-97, 2005.

TIRAPELLI, C. R.; AMBROSIO, S. R.; DE COSTA, F. B.; COUTINHO, S. P.; DE OLIVEIRA, D. C. R.; DE OLIVEIRA, A. M. Analysis of the mechanism underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acids in the isolated rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, 492: 233-241, 2004.

TIRKEY, N.; PILKHWAL, S.; KUHAD, A.; CHOPRA, K. Hesperidin, a citrus biflavonoid, decreases the oxidative stress produced by carbon tetrachloride in rat liver and kidney. **BMC Pharmacology**, 5 (1): 1-8, 2005.

TOMASIAN, D.; KEANEY, J. F.; VITA, J. A. Antioxidants and the bioactivity of endothelium-derived nitric oxide. **Cardiovascular Research**, 47 (3): 426-435, 2000.

TOUYZ, R. M. Reactive Oxygen Species, Vascular Oxidative Stress and Redox Signaling in Hypertension. What is the Clinical Significance? **Hypertension**, 44: 248-252, 2004.

TOUYZ, R.M.; SCHIFFRIN, E. L. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. **Histochemistry and Cell Biology**, 122: 339-352, 2004.

TRYON, R.M.; TRYON, A. **Ferns and allied plants with special reference to tropical America**. New York: Springer-Verlang, 1982.

TSUJIMOTO, Y.; HASHIZUME, H.; YAMAZAKI, M. Superoxide radical scavenging activity of phenolic compounds. **The International Journal of Biochemistry**, 25 (4): 491-494, 1993.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C. J.; TELSER, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 266: 37-56, 2004.

VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarizations: the history. **Pharmacological Research**, 49 (6): 503-508, 2004.

VARGA, Z.; SERES, I.; NAGY, E.; UJHELYI, L.; BALLA, G.; BALLA, J.; ANTUS, S. Structure prerequisite for antioxidant activity of silybin in different biochemical systems in vitro. **Phytomedicine**, 13 (1-2): 85-93, 2006.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, 28 (3): 519-528, 2005.

VERDI, L. G. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades biológicas de espécies medicinais da Mata Atlântica**. Tese de doutorado em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

WALLACE, J. W. Chemosystematic implications of flavonoids and C-Glycosylxanthenes in "ferns". **Biochemical Systematics and Ecology**, 17: 145-153, 1989.

WALLERATH, T.; LI, H.; GÖDTEL-AMBRUST, U.; SCHWARZ, P. M.; FÖRSTERMANN, U. A blend of polyphenolic compounds explains the stimulatory effect of red wine on human endothelial NO synthase. **Nitric Oxide**, 12: 97-104, 2005.

WAZLAWIK, E.; DA SILVA, M. A.; PETERS, R. R.; CORREIA, J. F.; FARIAS, M. R.; CALIXTO, J. B.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. Analysis of the role of nitric oxide in the relaxant effect of the crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* in the rat thoracic aorta. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 49 (4): 433-437, 1997.

WILHEM FILHO, D.; DA SILVA, E. L.; BOVERIS, A. Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Ed.) **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**, Chapecó: Argos, 2001.

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P. E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: Antioxidants or Signalling Molecules? **Free Radical Biology & Medicine**, 36 (7): 838 - 849, 2004.

WOODMAN, O. L.; CHAN, E. C. Vascular and anti-oxidant actions of flavonols and flavones. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, 31 (11): 786-790, 2004.

YAMAMOTO, T.; BING, R. J.; Nitric Oxide Donors. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 225: 200-206, 2000.

YAO, H.; LIAO, Z. X. WU, Q.; LEI, G. Q.; LIU, Z. J.; CHEN, D. F.; CHEN, J. K.; ZHOU, T. S. Antioxidative flavanone glycosides from the branches and leaves of *Viscum coloratum*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, 54 (1): 133-135, 2006.

YU, J.; WANG, I.; WALZEM, R. L.; MILLER, E. G.; PIKE, L. M.; PATIL, B. S. Antioxidant Activity of Citrus Limonoids, Flavonoids, and Coumarins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53: 2009-2014, 2005.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Breve Análise Histórica da Química de Plantas Medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Ed.) **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**, Chapecó: Argos, 2001.

ZOU, Y.; LU, Y.; WEI, D. Antioxidant Activity of a Flavonoid-Rich Extract of *Hypericum perforatum* L. *in vitro*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52: 5032-5039, 2004.

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonóides. In: SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 3 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editoras da UFRGS e UFSC, 2001.