



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

LUIZ PAULO DE LEMOS WIESE

AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE E ANTIINFLAMATÓRIA
DE EXTRATO E FRAÇÕES DE
Alternanthera tenella Colla

Florianópolis
2008

Luiz Paulo de Lemos Wiese

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE E ANTIINFLAMATÓRIA
DE EXTRATO E FRAÇÕES DE
Alternanthera tenella Colla**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Rozangela Curi Pedrosa

**Florianópolis
2008**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar a oportunidade de conhecer pessoas extraordinárias nesta vida.

Em especial, Januária e Helena, minha família, razão de todo esforço e dedicação. É de coração aberto que dedico não só este trabalho, mas toda uma vida de amor, conquistas e felicidade;

Aos meus pais, por todo o apoio, incentivo e carinho. Exemplos de caráter, dedicação e amor;

Aos meus amigos, mesmo que distantes, sempre guardados com um carinho enorme no coração;

À minha orientadora, pela paciência, dedicação e amizade;

Aos professores envolvidos durante o processo, que dividiram comigo, conhecimento, tempo e amizade;

Ao PPGFar - pela oportunidade e apoio durante todo o processo;

A CAPES pelo suporte financeiro para o desenvolvimento deste projeto;

A todos que de alguma forma participaram do processo, com trabalho, apoio, idéias, suporte e amizade, tornando este trabalho possível,

Muito Obrigado!

“Faça do desconhecido um impulso, não um obstáculo.”

Amyr Klink

“Quando todo o impossível for descartado, o que resta, por mais absurdo que possa parecer, é a verdade.”

Sir Arthur Conan Doyle – Sherlock Holmes

RESUMO

Alternanthera tenella Colla, conhecida como apaga-fogo e *joyweed*, é uma planta daninha, encontrada em terrenos baldios e lavouras, sendo muito utilizada popularmente para alívio de processos inflamatórios. Tendo em vista que os radicais livres têm importante papel no processo inflamatório, o presente trabalho objetivou avaliar a atividade antioxidante desta planta, bem como correlacionar os dados obtidos com a sua atividade antiinflamatória. Para tal foram preparados o extrato bruto etanólico (EEtOH), fração metanólica (FMeOH), fração acetato de etila (FAcoEt) e fração clorofórmica (FCHCl₃) das partes aéreas de *A. tenella* para avaliação do potencial antioxidante utilizando modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*. Os padrões utilizados para os ensaios *in vitro* foram a quercetina (QUE) e a rutina (RUT). Para avaliação preliminar da atividade antiinflamatória foi utilizado modelo *in vivo* do edema de pata induzido pela carragenina. As metodologias utilizadas *in vitro* foram determinações da captação dos radicais livres DPPH, HO[•], O₂^{•-}, [•]NO e proteção contra a lipoperoxidação, além do conteúdo de polifenóis totais. O modelo estabelecido para geração de estresse oxidativo *in vivo* foi o do CCl₄, onde foi determinado o índice de dano ao DNA, o conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) e proteína carbonilada (PC), além do potencial antioxidante total do plasma (FRAP) e a atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). Os ensaios realizados destacaram FMeOH e EEtOH, que obtiveram os melhores resultados, expressos em CE₅₀, em praticamente todas as análises, mostrando-se eficazes no seqüestro de radicais como o DPPH (FMeOH = 77,12 ± 0,66 µg/mL, EEtOH = 78,14 ± 1,80 µg/mL e QUE = 2,48 ± 0,80 µg/mL), espécies reativas de oxigênio como o HO[•] (FMeOH = 11,28 ± 1,66 µg/mL, EEtOH = 24,96 ± 3,40 µg/mL e QUE = 22,54 ± 2,06 µg/mL) e O₂^{•-} (FMeOH = 109,49 ± 3,48 µg/mL, EEtOH = 139,19 ± 4,03 µg/mL e RUT = 358,64 ± 0,83 µg/mL) e de espécies reativas de nitrogênio, como o [•]NO (FMeOH = 1.000 µg/mL e EEtOH = 62,50 µg/mL) e na proteção contra a lipoperoxidação *in vitro* (FMeOH = 28,82 ± 5,69 µg/mL, EEtOH = 46,90 ± 8,47 µg/mL e RUT = 203,83 ± 1,44 µg/mL). Os resultados dos ensaios *in vivo* como a proteção contra a lipoperoxidação *in vivo* (FMeOH = 87,18 ± 15,97 µg/mL, EEtOH = 76,82 ± 3,6 µg/mL, RUT = 79,01 ± 10,0 µg/mL e CP = 185,12 ± 10,01 µg/mL), a prevenção contra a carbonilação protéica (FMeOH = 62,21 ± 8,27 nmol.mg⁻¹, EEtOH = 62,48 ± 2,92 nmol.mg⁻¹, RUT = 52,69 ± 10,02 nmol.mg⁻¹ e CP = 371,66 ± 20,5 nmol.mg⁻¹), os níveis de GSH (FMeOH = 0,1228 ± 0,01 mmol.g⁻¹, EEtOH = 0,1240 ± 0,01 mmol.g⁻¹, RUT = 0,4000 ± 0,10 e CP = 0,1467 ± 0,01 mmol.g⁻¹), a prevenção de danos causados ao DNA (Índice de Dano ao DNA – IDD) (FMeOH = 121, EEtOH = 113, RUT = 82 e CP = 211), a atividade enzimática da CAT (FMeOH = 39,38 ± 2,12 mmol.min⁻¹.g⁻¹, EEtOH = 33,88 ± 2,99 mmol.min⁻¹.g⁻¹, RUT = 20,00 ± 5,00 mmol.min⁻¹.g⁻¹ e CP = 48,01 ± 10,01 mmol.min⁻¹.g⁻¹) e da SOD (FMeOH = 262,06 ± 41,18 U SOD.g⁻¹, EEtOH = 243,99 ± 56,68 U SOD.g⁻¹, RUT = 275,00 ± 25,01 U SOD.g⁻¹ e CP = 385,56 ± 20,27 U SOD.g⁻¹) também demonstraram um perfil antioxidante. O ensaio de verificação da redução do edema de pata induzido pela carragenina demonstrou uma atividade antiedematogênica discreta (EEtOH, ΔGC= 0,016 ± 0,003 e ΔGT= 0,025 ± 0,003). Os resultados também evidenciam uma correlação entre atividade antioxidante e antiinflamatória e o conteúdo de polifenóis totais (FMeOH = 85,15 ± 2,94 GAE mg/L e EEtOH = 83,15 ± 3,66 GAE mg/L) e potencial antioxidante total (FMeOH = 2.045,04 ± 205,76 mmol/L, EEtOH = 1.924,10 ± 137,17 mmol/L, RUT = 2.131,23 ± 214,12 mmol/L) das frações analisadas. Em conclusão, a fração metanólica (FMeOH) e o extrato etanólico (EEtOH) mostraram-se promissores para futuras análises para elucidar mecanismos de ação dos processos avaliados neste trabalho, sendo necessárias maiores análises para a demonstração de real potencial antiinflamatório e hepatoprotetor desta planta.

Palavras-Chave: Antioxidante, Antiinflamatório, *Alternanthera tenella*.

ABSTRACT

Alternanthera tenella Colla is a minor weed founded mostly in crops used on folk medicine to reduce inflammatory processes and is known as apaga-fogo and joyweed. Free radicals have an important role on inflammatory process, therefore this work aimed to evaluate the antioxidant activity of this plant and to correlate with its anti-inflammatory activity. The samples used were the Ethanolic Crude Extract (EEtOH), Methanolic Fraction (FMeOH), Chloroformic Fraction (FCHCl₃) and Etil Acetate Fraction (FAcoEt) from the aerial parts of *A. tenella* to evaluate the antioxidant potential on *in vitro* and *in vivo* experimental models. For a preliminary evaluation of anti-inflammatory activity, the *in vivo* carrageenin-induced paw edema was used. The *in vitro* methodologies were determination of scavenger capacity for DPPH, HO[•], O₂^{•-}, •NO, protection against lipoperoxidation and total polyphenols content. For *in vivo* evaluation of oxidative stress generation, the CCl₄ model was performed, measuring the DNA damage, GSH content, protein carbonilation (PC), total antioxidant power (FRAP) and the enzymes activities from catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD). The performed assays showed that FMeOH and EEtOH fractions showed the best results on most assays, being effective to scavenge free radicals, like DPPH (FMeOH = 77.12 ± 0.66 µg/mL, EEtOH = 78.14 ± 1.80 µg/mL and QUE = 2.48 ± 0.80 µg/mL), HO[•] (FMeOH = 11.28 ± 1.66 µg/mL, EEtOH = 24.96 ± 3.40 µg/mL and QUE = 22.54 ± 2.06 µg/mL) and O₂^{•-} (FMeOH = 109.49 ± 3.48 µg/mL, EEtOH = 139.19 ± 4.03 µg/mL and RUT = 358.64 ± 0.83 µg/mL) and also to scavenge reactive nitrogen species, such as •NO (FMeOH = 1,000.00 µg/mL and EEtOH = 62.50 µg/mL). The effective action of *in vitro* and *in vivo* protection against lipoperoxidation (FMeOH = 28.82 ± 5.69 µg/mL, EEtOH = 46.90 ± 8.47 µg/mL and RUT = 203.83 ± 1.44 µg/mL and FMeOH = 87.18 ± 15.97, EEtOH = 76.82 ± 3.6, RUT = 79.01 ± 10.0 and CP = 185.12 ± 10.01, respectively), prevention against protein carbonilation (FMeOH = 62.21 ± 8.27 nmol.mg⁻¹, EEtOH = 62.48 ± 2.92 nmol.mg⁻¹, RUT = 52.69 ± 10.02 nmol.mg⁻¹ and CP = 371.66 ± 20.5 nmol.mg⁻¹), GSH levels (FMeOH = 0.1228 ± 0.01 mmol.g⁻¹, EEtOH = 0.1240 ± 0.01 mmol.g⁻¹, RUT = 0.4000 ± 0.10 mmol.g⁻¹ and CP = 0.1467 ± 0,01 mmol.g⁻¹), and prevention of DNA damage (DNA Damage Class; FMeOH = 121, EEtOH = 113, RUT = 82 and CP = 211), protection of CAT activity (FMeOH = 39.38 ± 2.12 mmol.min⁻¹.g⁻¹, EEtOH = 33.88 ± 2.99 mmol.min⁻¹.g⁻¹, RUT = 20.00 ± 5.00 mmol.min⁻¹.g⁻¹ e CP = 48.01 ± 10.01 mmol.min⁻¹.g⁻¹) and SOD (FMeOH = 262.06 ± 41.18 U SOD.g⁻¹, EEtOH = 243.99 ± 56.68 U SOD.g⁻¹, RUT = 275.00 ± 25.01 U SOD.g⁻¹ e CP = 385.56 ± 20.27 U SOD.g⁻¹) and the reduction of carrageenin-induced pedal edema were also demonstrated (EEtOH, ΔGC= 0,016 ± 0,003 e ΔGT= 0,025 ± 0,003). The results show correlation between antioxidant and anti-inflammatory activity and the total polyphenol content (FMeOH = 85.15 ± 2.94 GAE mg/L and EEtOH = 83.15 ± 3.66 GAE mg/L) and the total antioxidant power (FMeOH = 2,045.04 ± 205.76 mmol/L, EEtOH = 1,924.10 ± 137.17 mmol/L and RUT = 2,131.23 ± 214.12 mmol/L) of the analyzed fractions. In conclusion, the FMeOH and EEtOH fractions showed to be promising on futures incursions on complementary analysis to elucidate the mechanism of action.

Keywords: Antioxidant, anti-inflammatory, *Althernanthera tenella* Colla

LISTA DE ABREVIATURAS

•OH	Radical Hidroxila
•NO	Óxido Nítrico
AA%	Atividade Antioxidante
BHT	Hidroxitolueno Butilado
CAT	Catalase
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
FCHCl ₃	Fração Clorofórmica
CI ₅₀	Concentração Inibitória 50%
ClO ⁻	Radical Ânion Hipoclorito
CN	Controle Negativo
COX	Cicloxigenase
CP	Controle Positivo
DMSO	Dimetilssulfóxido
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DP	Desvio Padrão
DPPH	1,1-difenil-2-picril hidrazila
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico
EPM	Erro Padrão da Média
ERN	Espécie Reativa de Nitrogênio
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
ER	Espécies Reativas de Nitrogênio e Oxigênio
FAcoEt	Fração Acetato de Etila
EEtOH	Extrato Bruto Etanólico
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Redutase
GSH	Glutathione Reduzida
GST	Glutathione-S-Transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HNO ₂	Ácido Nitroso
IND	Indometacina
MDA	Malondialdeído

FMeOH	Fração Metanólica
MPO	Mieloperoxidase
N ₂ O ₃	Óxido Nitroso
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida
NaNPS	Nitroprusseto de Sódio
NBT	Azul de p-Nitro Tetrazólio
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
NTA	Ácido Nitrilo Acético
O ₂	Oxigênio
O ₂ ^{•-}	Radical Ânion Superóxido
ONOO ⁻	Radical Peroxinitrito
PC	Proteína Carbonilada
QUE	Quercetina
RO [•]	Radical Alcoxila
ROO [•]	Radical Peroxila
RUT	Rutina
SOD	Superóxido Dismutase
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	Tiobarbituric Acid Reactives Substances
TCA	ácido Tricloroacético
TPTZ	2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura geral dos flavonóides.....	17
Figura 2 – Estrutura da quercetina	18
Figura 3 – Esquema de estresse oxidativo e implicações fisiológicas.....	22
Figura 4 – Esquema de formação de espécies reativas.....	25
Figura 5 – Esquema de formação de $O_2^{\bullet-}$ e atividade da SOD.....	30
Figura 6 – Fundamento químico para dosagem de GSH.....	35
Figura 7 – Concentração de GSH ($mmol \cdot g^{-1}$) em fígado de camundongo Balb-c expostos ao CCl_4 e tratados com as frações obtidas de <i>A. tenella</i> : EEtOH, FMeOH, FAcoEt e FCHCl3. Grupos controles, positivo somente com administração de CCl_4 e negativo com administração de PBS.	45
Figura 8 – Índice de peroxidação lipídica – TBARS ($nmol \cdot g^{-1}$) em fígado de camundongo Balb-c expostos ao CCl_4 e tratados com as frações obtidas de <i>A. tenella</i> : EEtOH, FMeOH, FAcoEt e FCHCl3. Grupos controles, positivo somente com administração de CCl_4 (CP) e negativo com administração de PBS (CN).....	46
Figura 9 – Carbonilação protéica – PC ($nmol \cdot mg^{-1}$) em fígado de camundongo Balb-c expostos ao CCl_4 e tratados com as frações obtidas de <i>A. tenella</i> : EEtOH, FMeOH, FAcoEt e FCHCl3. Grupos controles, positivo somente com administração de CCl_4 (CP) e negativo com administração de PBS (CN).....	46
Figura 10 - Atividade enzimática da CAT ($mmol$ de H_2O_2 consumido $min^{-1}g^{-1}$) em fígado de camundongo Balb-c expostos ao CCl_4 e tratados com as frações obtidas de <i>A. tenella</i> : EEtOH, FMeOH, FAcoEt e FCHCl3. Grupos controles, positivo somente com administração de CCl_4 (CP) e negativo com administração de PBS (CN).....	47
Figura 11. Atividade da SOD ($U\ SOD \cdot g^{-1}$) em fígado de camundongo Balb-c expostos ao CCl_4 e tratados com as frações obtidas de <i>A. tenella</i> : EEtOH, FMeOH, FAcoEt e FCHCl3. Grupos controles, positivo somente com administração de CCl_4 (CP) e negativo com administração de PBS (CN).	48
Figura 12. Frequência das diferentes classes de dano de cometas observados em células sanguíneas de camundongos Balb-c expostos ao CCl_4 e tratados com as frações obtidas de <i>A. tenella</i> : EEtOH e FMeOH. Grupos controle positivo somente com administração de CCl_4 (CP) e negativo com PBS (CN).	49
Figura 13 – Avaliação do “potencial antioxidante total do plasma” (FRAP) no plasma de camundongo Balb-c expostos ao CCl_4 e tratados com as frações obtidas de <i>A. tenella</i> : EEtOH, FMeOH, FAcoEt e FCHCl3. Grupos controles, positivo somente com administração de CCl_4 (CP) e negativo com administração de PBS (CN).....	50
Figura 14 – Grupo de animais (n=6), tratados via oral com solução PBS ou fração EEtOH, 1 hora antes da administração via intraplantar de PBS nos controles negativos (CN) e do agente flogístico carragenina nos controles positivos (CP), no intervalo de tempo de 30 a 240 min.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pontuação e exemplos de cada classe de cometa visualizada.....	38
Tabela 2: Avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto etanólico e frações de <i>Alternanthera tenella</i> Colla, rutina e quercetina, através da medida da capacidade “scavenger” do radical DPPH, testados em concentrações crescentes e expressos em CE ₅₀ após análise de regressão linear. Todos os dados foram expressos em termos de média ± DP. nda: não demonstrou atividade na concentração utilizada..	41
Tabela 3: Avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto etanólico e frações de <i>Alternanthera tenella</i> Colla, rutina e quercetina, através da medida da capacidade “scavenger” do radical hidroxila, testadas em concentrações crescentes e expresso em CE ₅₀ após análise de regressão linear. Todos os dados foram expressos em termos de média ± DP. nda: não demonstrou atividade na concentração utilizada.	42
Tabela 4: Avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto etanólico e frações de <i>Alternanthera tenella</i> Colla e rutina, através da medida da capacidade “scavenger” do ânion superóxido, testadas em concentrações crescentes e expressas em CE ₅₀ após análise de regressão linear. Todos os dados foram expressos em termos de média ± DP. nda: não demonstrou atividade na concentração utilizada.	42
Tabela 5. Avaliação da atividade antioxidante do EEtOH e FMeOH de <i>Alternanthera tenella</i> Colla, através da medida da capacidade “scavenger” do radical óxido nítrico, testadas em concentrações crescentes e expresso em CE ₅₀ após análise de regressão linear. nda: não demonstrou atividade na concentração utilizada	43
Tabela 6. Curva padrão para dosagem de NO ₂ /NO ₃ , realizada em concentrações crescentes de NO ₂ e NO ₃ (0, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100 e 150 µg/mL) e expresso em absorbância obtida a 543 nm.	43
Tabela 7: Avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto etanólico e frações de <i>Alternanthera tenella</i> Colla e rutina, através da medida da capacidade protetora contra a lipoperoxidação de membrana, testadas em concentrações crescentes e expressas em CE ₅₀ após análise de regressão linear. nda: não demonstrou atividade na concentração utilizada.....	44
Tabela 8. Determinação de teor de fenóis totais das amostras, expressos em equivalentes de ácido gálico (GAE mg/L).	44
Tabela 9. Porcentagem de distribuição dos cometas em diferentes classes analisados em sangue total de camundongos não tratados (controle negativo, CN), tratados com 0,5 mL / 100 g (30% v/v) de CCl ₄ (controle positivo, CP), pré-tratados com EEtOH e FMeOH,(150,0 mg/kg) e rutina (6,0 mg/kg).....	48

Sumário

1	Introdução.....	12
2.	Revisão Bibliográfica.....	14
2.1.	<i>Alternanthera tenella</i> Colla.....	14
2.2.	Espécies Reativas, Estresse oxidativo e Antioxidantes.....	17
2.3.	Inflamação e Espécies Reativas.....	22
3.	Objetivos.....	25
3.1.	Objetivo Geral.....	25
3.2.	Objetivos Específicos.....	25
4.	Metodologia, Materiais e Reagentes.....	26
4.1.	Descrição.....	26
4.2.	Coleta e Registro de Exsicata.....	26
4.3.	Preparação e Fracionamento do Extrato.....	26
4.4.	Materiais e Reagentes.....	27
4.5.	Atividade Antioxidante <i>in vitro</i>	27
4.5.1.	“Scavenger” do Radical DPPH.....	27
4.5.2.	“Scavenger” do Radical Hidroxila.....	28
4.5.3.	“Scavenger” do Radical Ânion Superóxido.....	29
4.5.4.	“Scavenger” do Óxido Nítrico.....	30
4.5.5.	Peroxidação Lipídica <i>in vitro</i>	31
4.5.6.	Teor de Fenóis Totais.....	32
4.6.	Ensaio Antioxidantes <i>in vivo</i> :.....	32
4.6.1.	Protocolo experimental.....	32
4.6.2.	Proteção à Lipoperoxidação de Membrana.....	33
4.6.3.	Glutationa Reduzida – GSH.....	34
4.6.4.	Atividade da Catalase – CAT.....	35
4.6.5.	Atividade da Superóxido Dismutase - SOD.....	35
4.6.6.	Determinação de Carbonilação Protéica.....	36
4.6.7.	Avaliação do Dano ao DNA (fragmentação do DNA).....	37
4.6.8.	Potencial Antioxidante Total do Plasma.....	38
4.7.	Atividade Antiedematogênica.....	39
4.7.1.	Edema de Pata Induzido por Carragenina.....	39
4.8.	Análise Estatística.....	39
5.	Resultados.....	40
5.1.	Atividade Antioxidante <i>in vitro</i>	40
5.1.1.	“Scavenger” do Radical DPPH.....	40
5.1.2.	“Scavenger” do Radical Hidroxila.....	41

5.1.3.	“Scavenger” do Radical Ânion Superóxido.....	41
5.1.4	“Scavenger” do Óxido Nítrico.....	42
5.1.4.	Peroxidação Lipídica <i>in vitro</i>	43
5.1.5.	Teor de Fenóis Totais	44
5.2.	Atividade Antioxidante <i>in vivo</i>	44
5.2.1.	Glutathiona Reduzida – GSH	44
5.2.2.	Proteção à Lipoperoxidação de Membrana	45
5.3.	Determinação de Carbonilação Protéica.....	46
5.4.	Enzima Catalase	46
5.5.	Enzima Superóxido Dismutase.....	47
5.6.	Avaliação do dano ao DNA – Teste Cometa.....	48
5.7.	Potencial Antioxidante Total do Plasma.....	49
6.	Atividade Antiedematogênica	49
6.1.	Indução de Edema de Pata por Carragenina	49
7.	Discussão.....	50
7.1.	Ensaio Antioxidantes <i>in vitro</i>	50
7.2.	Ensaio Antioxidantes <i>in vivo</i>	53
7.3.	Ensaio Antiinflamatórios	57
8.	Conclusões.....	60
9.	Perspectivas	61
10.	Referências Bibliográficas.....	63

1. Introdução

A busca por substâncias capazes de prevenir, amenizar e curar vêm desde os primórdios da existência humana. O homem sempre buscou na natureza aquilo que lhe faltava, quer fosse saúde, alimento, proteção ou riquezas. Com a evolução da espécie, a seleção natural por tentativa e erro daquilo que era útil e o que era “proibido” por fazer mal, foi-se acumulando conhecimentos, passados através de gerações, pelos sábios detentores do conhecimento, ou seja, aqueles que “pesquisavam a cerca das propriedades biológicas de plantas e ervas”. Essa descrição se enquadra no papel de um pajé para uma tribo, de um curandeiro para uma comunidade, de um enviado dos deuses para uma civilização, de um herege para uma doutrina, de um visionário para o comércio e, por que não, de um pesquisador científico para as reais confirmações. Ao longo dos séculos, toda comunidade tinha seu grau de ligação com plantas medicinais, algumas com raízes mais profundas, como as culturas orientais (chinesa, hindu, babilônica) e ocidentais (astecas, maias) e outras mais superficiais. Antes de existirem registros escritos, esses conhecimentos eram passados verbalmente através de descendentes e discípulos, e muita informação era perdida ou esquecida quando não utilizada. Sem dúvida, com o advento da escrita, os registros sobre plantas, ervas e suas propriedades curativas foram sendo repassados de maneira sistemática através das gerações.

O primeiro manuscrito conhecido sobre essa prática é o Papiro de Ebers, datado de 1500 a.C., que descreve centenas de plantas medicinais, além dos métodos de ação no combate às enfermidades (EBBELL,1937). Alguns dos vegetais ali mencionados são de uso comum até hoje, como a papoula. No século V a.C. o grego Hipócrates, considerado o "Pai da Medicina", deixou uma obra notável – o *Corpus Hippocraticum* (BOURGEY, 1975). Mas muito desse conhecimento perdeu-se com as invasões, guerras e expansões de impérios, que destruíram povos e civilizações sem a preocupação em manter a base de conhecimento gerada. Algumas conquistas eram mais “civilizadas” e absorviam algumas características culturais dos povos “conquistados”. Temos exemplos próximos, não tão antigos, como a cruel colonização europeia dos povos Maias, Incas e Astecas e a colonização portuguesa dos povos indígenas brasileiros.

Essa cultura assimilada foi de fundamental importância para o que hoje está sendo o primórdio de toda pesquisa voltada à descoberta de novos compostos bioativos, a etnofarmacologia. A pesquisa científica com base no conhecimento popular mostrou-se muito mais promissora do que a prospecção ao acaso. A etnofarmacologia é uma divisão da

etnobiologia, uma disciplina devotada ao estudo do complexo conjunto de relações de plantas e animais com sociedades humanas, presentes ou passadas (BERLIN, 1992).

Define-se etnofarmacologia como “a exploração científica interdisciplinar dos agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados pelo homem” (BRUHN e HOLMSTEDT, 1982). A experiência de nossos antepassados ajuda-nos hoje a termos um ponto de partida para prospecção de atividades biológicas provenientes de plantas. Os “chás” e “garrafadas” tinham um fundamento experimental, aquele mesmo de tentativa e erro que se desenvolveu ao longo da evolução humana. A etnofarmacologia nos traz o conhecimento popular a respeito do uso e indicações de determinadas espécies vegetais, para que com o conhecimento teórico e tecnologia disponível ao nosso alcance, possamos validar, ou não, este uso, além de determinar outras características como toxicidade e composição química, por exemplo.

Das 250.000 espécies de plantas no mundo, menos de 10 % foram exaustivamente investigadas com vistas ao descobrimento de propriedades terapêuticas. A biodiversidade brasileira é uma das mais ricas do mundo, possuindo cerca de 100 mil espécies vegetais, das quais menos de 1% foi estudada sob o ponto de vista medicinal. Só no Amazonas, existem 25 mil espécies diferentes de plantas, das quais muito pouco se conhece e muitas delas inéditas para a comunidade científica (CITES, 2006).

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonóides, alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, ligninas, etc..., tem sido objeto de incessantes estudos, onde já foram comprovadas as ações farmacológicas através de testes pré-clínicos com animais. Muitas destas substâncias têm grandes possibilidades de futuramente virem a ser aproveitadas como agentes medicinais (CECHINEL-FILHO e YUNES, 1998).

O caso mais notório é do ácido acetilsalicílico, a aspirina[®], descoberto em pesquisas com o salgueiro branco (*Salix alba*). Bem longe dos herméticos laboratórios, os índios norte-americanos já o usavam para aliviar a dor e a febre (VIEGAS et al., 2006).

Iniciar o processo de desenvolvimento de um novo fármaco a partir de moléculas criadas sinteticamente, além de consumir recursos e tempo, tornou-se um processo desgastante. Segundo Ferreira (1998), as empresas internacionais não inventam novas moléculas e nem esperam “descobrir” novos compostos de uso terapêutico a partir de plantas medicinais, ainda que isso tenha uma pequena chance de ocorrer. Elas procuram na verdade, um modelo na natureza, os chamados “*templates*”, que lhes permitam usar como ponto de partida para uma

reação de síntese ou síntese de um análogo. Trata-se, portanto, de uma combinação de técnicas novas com o “*screening*”, e não a sua substituição (FERREIRA, 1998).

Dentro deste contexto, considerando os registros encontrados sobre atividade biológica da família Amaranthaceae, alguns sobre o gênero *Alternanthera*, e uma pequena quantidade sobre a espécie *Alternanthera tenella*, especialmente no que diz respeito ao seu uso como antiinflamatório, deu-se início ao desenvolvimento do presente estudo de avaliação de atividade antioxidante e antiinflamatória desta espécie.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. *Alternanthera tenella* Colla

A família Amaranthaceae compreende 65 gêneros e aproximadamente 1.000 espécies descritas, originárias de zonas tropicais, sub-tropicais e temperadas da África, América de Sul e Sudeste Asiático. Os espécimes são de ocorrência anual e perenial, seu porte varia entre herbáceo, arbustos e algumas árvores e tem como membro de maior destaque o ginseng (*Pfaffia paniculata*) (SIQUEIRA, 1987). O gênero *Alternanthera* Forsk., 1775, situado dentro da tribo *Gomphrineae*, é composto por 80 espécies, sendo que 30 delas podem ser encontradas em território brasileiro.

Alternanthera tenella Colla 1829, é conhecida como sempre-viva, apaga-fogo, carrapichinho ou periquito e caracteriza-se por ser de porte herbáceo (5 a 45 cm de altura), de folhas pequenas, oval-lanceoladas, de coloração avermelhada ou verde-clara, de acordo com a variedade. É encontrada em terrenos baldios e lavouras agrícolas de todo o Brasil, em regiões de cerrado, caatinga e de mata ciliar, incluindo vegetações de margem, sendo considerada uma erva daninha (TOWNSEND, 1988).

A sabedoria popular descreve o uso de plantas da família Amaranthaceae com finalidade curadora para estados febris e processos inflamatórios (SALVADOR et al., 2004; CAI, SUN e CORKE, 2005; SALVADOR et al., 2002; GORINSTEIN et al., 1991; SIQUEIRA, 1987). Para o gênero o uso popular envolve tratamento de processos infecciosos, atividade antiviral (LAGROTA et al., 1994), hepatoprotetora (LIN et al., 1994), antibacteriana, antifúngica, inibidor da ativação linfocitária (MORAES et al., 1994), antinociceptiva, analgésica (MACEDO et al., 1999) e diurética, além de efetiva contra *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi* (SALVADOR et al., 2004; SALVADOR e DIAS, 2004; BROCHADO et al., 2003; SALVADOR et al., 2002; ZHOU et al., 1988). O chá das folhas de *Alternanthera*

tenella Colla é popularmente utilizado em casos de infecções, febres, machucados, coceiras e também como diurético e antiinflamatório (SALVADOR et al., 2004; MORAES et al., 1994; SIQUEIRA e GUIMARÃES, 1984; REGO, 1995). Seu uso tópico é descrito para picadas de insetos e inchaço (SOUZA et al., 1998).

Alguns estudos com extrato aquoso desta planta, comprovam sua atividade imunomodulatória e atividade antitumoral em ratos usando como modelo o tumor de Ehrlich (GUERRA et al., 2003; MORAES et al., 1994), assim como sua atividade antibiótica *in vitro* sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (GALLEGOS et al., 2000; SILVEIRA, 2000).

Estudos de composição química de plantas da família Amaranthaceae indicam a presença de antraquinonas, auronas, betacianinas, betalainas, betaxantinas, cromoalcalóides, exdiesteróides, flavonóides, protoalcalóides, saponinas, esteróides e triterpenos (FERREIRA et al., 2004, SALVADOR e DIAS, 2004, BROCHADO et al., 2003). As betalainas e betaxantinas são utilizadas na indústria como corantes e conservantes antioxidantes (CAI, SUN e CORKE, 2005). Somente 16 espécies deste gênero possuem registros de estudos fitoquímicos, onde são descritos flavonóides (aglicona, C- e O- glicosídeos) (RICHARDSON, 1978; RUIZ, 1991; SAHU e GRAY, 1993), antraquinonas (RUIZ, 1996), cromoalcalóides (SAENZ, 1970; SASCENA, 1975), betaínas (BLUNDEN et al., 1999), betacianinas (PIATTELLI e MINALE, 1964), saponinas triterpênicas (DOGRA e OJBRA, 1978; PENDERS et al., 1992; SANOKO, 1999; SALVADOR, 2002), esteróides (PATTERSON et al., 1991) e triterpenos (MACEDO et al., 1999). A espécie *A. tenella* Colla possui alguns estudos fitoquímicos onde foram identificados compostos como acetina 8-C-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosídeo], 2''-O- α -L-ramnopiranosil-vitexina, 2''-O- β -D-ramnopiranosil-vitexina, vitexina, quercetina e canferol (SALVADOR, 2006; SHARAF, 1997; HARBORNE e MABRY, 1982; MARKHAM e GEIGER, 1994; AGRAWAL, 1989; MATSUBARA et al., 1984).

Os flavonóides foram identificados pela primeira vez em 1930 por Szent-György e podem ser definidos como uma classe de metabólitos secundários de plantas, derivados da condensação de uma molécula de ácido cinâmico e três moléculas de malonil-CoA. Sua estrutura comum é composta de dois anéis benzênicos ligados por um anel de três carbonos (figura 01) e as múltiplas combinações de grupamentos hidroxila, açúcares, oxigênios e metilas ligados a esta estrutura comum resulta nas diversas classes de flavonóides (flavonas; flavanóis; flavononas, flavonóis, isoflavonas e antocianidinas) (MILLER, 1996).

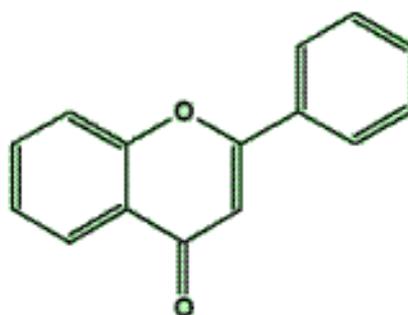


Figura 01 – Estrutura geral dos Flavonóides

Este grupo de compostos são pigmentos naturais presentes na maioria dos vegetais e plantas, onde desempenham um importante papel na proteção contra agentes oxidantes (luz ultravioleta, poluição) e ataques externos como insetos, fungos e bactérias (RICE-EVANS et al., 1996).

Algumas atividades biológicas são atribuídas aos flavonóides, como a antioxidante (KEMERTELIDZE et al., 2000), antimicrobiana (HIROYUKI et al., 1998), antitumoral (COWARD et al., 1993), antiinflamatória (ABAD et al., 1993), citotóxica (YA-QIN et al., 2001) antiprotozoária (LUNARDI et al., 2003), antidiabética (SHIN et al., 1999), antialérgica e antiviral (FORMICA e REGELSON, 1995; FOTSIS et al., 1997).

A partir da estrutura geral de flavonóides (Figura 01), a incorporação de elementos adicionais é responsável pela capacidade de neutralização de radicais livres exercida por esta classe de compostos, dentre elas, a presença do grupo orto-diidroxí ou grupo catecol no anel B (que confere uma maior estabilidade à forma radicalar), a existência de uma dupla ligação conjugada com a função 4-oxo (aumenta a estabilização eletrônica a partir do anel B) e a presença de grupos hidroxila na posição 3 e 5 com função oxo (promove o deslocamento dos elétrons do grupo 4-oxo) (MARTINÉS-FLORES et al., 2002; SILVA, 2002). A capacidade quelante de metais é também uma característica complementar aos compostos com atividade antioxidante. Sua capacidade de retirar metais livres interrompe a formação de espécies reativas através das reações de Fenton e Haber Weiss (MOREL et al., 1993).

Em termos gerais, o que determina o caráter antioxidante de um flavonóide é o estado redox do radical formado a partir do flavonóide original (HEIM et al., 2002). Dentre as estruturas que se enquadram nesta descrição está a quercetina (Fig. 02), um flavonóide bastante conhecido, encontrado em frutas, vegetais e ervas (cebola, maçã, *Gingko biloba*, vinho tinto) (KEREM et al., 2004; WATSON e OLIVEIRA, 1999; HERTOOG et al., 1992). A quercetina tem sido investigada pelas suas atividades farmacológicas, que incluem: antitumoral (KANADASWAMI et al., 2005), antiinflamatória (COMALADA et al., 2005), antioxidante (INAL e KAHRAMAN, 2000), e hepatoprotetora (LEE et al., 2003).

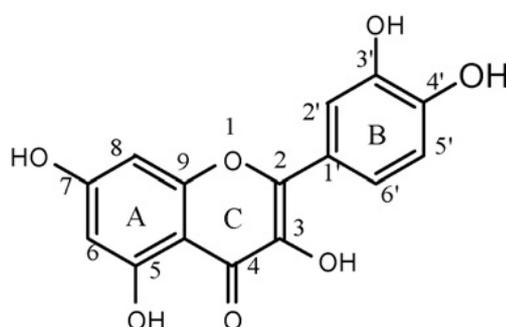


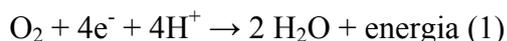
Figura 02 – Estrutura da Quercetina

2.2. Espécies Reativas, Estresse oxidativo e Antioxidantes.

Teoricamente, todo componente celular está sujeito a sofrer danos oxidativos. Lipídios, proteínas e ácidos nucleicos são exemplos clássicos de moléculas que sofrem alterações funcionais quando oxidadas. Alguns dos principais causadores destes danos oxidativos são os radicais livres. Por definição, o termo radical livre refere-se a átomos ou moléculas altamente reativos, que contêm número ímpar de elétrons na última camada eletrônica e este não emparelhamento de elétrons da última camada é que lhes confere esta alta reatividade, tornando-os ávidos por retornar ao estado de equilíbrio eletrônico (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989). Quando esta molécula é derivada do metabolismo do oxigênio, denomina-se Espécie Reativa de Oxigênio (ERO), quando deriva do metabolismo do nitrogênio, denomina-se Espécie Reativa de Nitrogênio (ERN). Justamente por esta falta de elétrons pareados na sua órbita externa, estas espécies reativas (ER) reagem com qualquer molécula próxima capaz de doar elétrons, justificando seu tempo de meia-vida extremamente

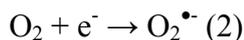
curto. O radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) e o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), possuem tempo de vida média respectivamente de 1×10^{-9} e 1×10^{-6} segundos, enquanto que o do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é superior a 10^{-2} segundos. O tempo de meia vida está relacionado também com a capacidade de difusão, sendo que quanto maior o tempo de meia-vida das ERO e ERN, maior sua capacidade de difusão intra e extra celular (PRYOR, 1986).

As principais ERO distribuem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila ($\bullet\text{OH}$), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila (ROO^{\bullet}) e alcoxila (RO^{\bullet}); e os não-radicalares: oxigênio (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânion hipoclorito (ClO^-). Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-) (CHATGILIALOGLU e O'NEILL, 2001; HALLIWELL e GUTTERRIDGE, 1999; WISEMAN et al., 1995 e CADET et al., 1999). O oxigênio (O_2) que respiramos é metabolizado em nosso organismo, onde aproximadamente 85 a 90% são utilizados pela mitocôndria, através da cadeia de transporte de elétrons e os 10 a 15% restantes são utilizados por diversas enzimas oxidases e oxigenases e também por reações químicas de oxidação diretas. Na parte terminal da cadeia de transporte de elétrons, a enzima citocromo oxidase remove um elétron de cada uma das quatro moléculas reduzidas de citocromo c, oxidando-as, e adiciona os quatro elétrons ao O_2 para formar água (em torno de 95 a 98% dos 85 a 90% citados acima), conforme reação descrita abaixo (equação 1). Os 2 a 5% restantes são reduzidos univalentemente em intermediários reativos (HALLIWELL, 1990).



Equação 1 - Redução tetravalente do oxigênio

A adição de um elétron a uma molécula de oxigênio no estado fundamental gera a formação do ânion superóxido.



Equação 2 - Redução tetravalente do oxigênio – Etapa 1

O superóxido ao receber mais um elétron e dois íons hidrogênio forma peróxido de hidrogênio (H_2O_2), através do processo chamado dismutação (PAL YU, ano). Essa reação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) que é encontrada em quantidades

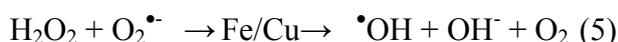
elevadas nas células de mamífero e que acelera a reação a 10^4 vezes a frequência para dismutação espontânea num pH fisiológico.



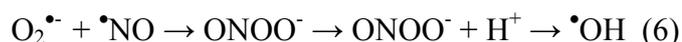
Quando o H_2O_2 recebe mais um elétron e um íon hidrogênio, é formado o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), que é o mais reativo dos intermediários, pois pode reagir e alterar qualquer estrutura celular que esteja próxima e assim danificar enzimas, membranas ou ácidos nucleicos (JENKINS, 1988). O radical hidroxila pode ser formado quando o H_2O_2 reage com íons ferro ou cobre (Reação de Fenton).



Os íons de metais de transição podem também catalisar a reação entre H_2O_2 e superóxido, conduzindo à produção de radical hidroxila (Reação de Haber-Weiss).



Além disso, o radical superóxido pode reagir diretamente com o óxido nítrico (NO), gerando peroxinitrito (ONOO^-). Este pode levar à formação de um oxidante com características do radical hidroxila.



As ERO produzidas, principalmente o $\text{O}_2^{\bullet-}$, quando ativadas por microrganismos patogênicos, atuam como bactericidas, sendo, portanto, um importante meio de proteção orgânica contra o desenvolvimento de infecções oportunistas. O ânion superóxido ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo organismo ou absorvidos da dieta. De acordo com Halliwell (2000), antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo. Os antioxidantes produzidos pelo organismo agem em duas linhas. Uma delas atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão. Esta linha é constituída por glutatona reduzida (GSH), as

enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa-peroxidase (GPx). A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pela vitamina C, vitamina E, pela glutationa-redutase (GR) e pela glutationa-S-transferase (GST), entre outros. Com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana, os demais agentes antioxidantes estão no meio intracelular (ROSS, 1991; HEBBEL, 1986).

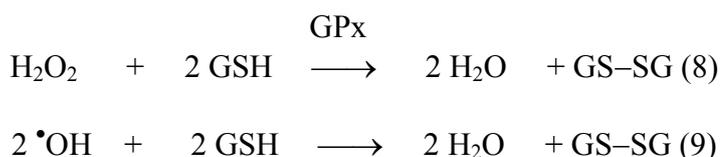
A enzima SOD catalisa a reação de dois ânions superóxidos com a formação de peróxido, que é menos reativo e pode ser degradado por outra enzima (equação 3). Há algumas variações de SOD encontradas em células humanas: a citoplasmática e a extracelular que contém cobre e zinco em seu sítio de ativação e a mitocondrial que contém manganês. Existe ainda a forma SOD contendo ferro em seu sítio de ativação presente em algumas bactérias, entre elas *E. coli* (PESKIN e WINTERBOURN, 2000)

A CAT é uma heme proteína (possui o grupo heme) e é altamente específica, transformando o peróxido de hidrogênio em água.



Está presente principalmente em tecidos que possuem no interior de suas células os peroxisomos (vesículas intracelulares). Coração, pulmões e cérebro estão mais expostos aos danos provocados pelos radicais livres, pois não possuem peroxisomos. Nestes órgãos o H_2O_2 se difunde para o sangue, onde reage com a CAT eritrocitária e assim é inativado (GOODSELL, 2004).

A GPx é uma enzima dependente de selênio, que também transforma os peróxidos em H_2O , tem uma ação mais geral, catalisando a redução de muitos peróxidos (como o lipídico, por exemplo) utilizando a GSH como cofator. A GSH é um tripeptídeo com grupo sulfidríla que pode ser reciclada pela interação da forma oxidada com NADPH na presença de GR (esta reciclagem torna a GSH muito efetiva contra os radicais livres). A enzima GPx está presente no citoplasma e na mitocôndria das células.



A manutenção das defesas antioxidantes químicas e enzimáticas em equilíbrio dinâmico com a formação de ERO no organismo é fundamental para a sua sobrevivência. O sistema de

defesa antioxidante inclui ainda algumas moléculas endógenas como a albumina, transferrina, ferritina, ácido úrico, bilirrubina e antioxidantes exógenos obtidos da dieta como os flavonóides e vitaminas E e C.

Estresse oxidativo é uma situação gerada por um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, em favor dos oxidantes (AGARWAL, GUPTA e SHARMA, 2005). Em determinadas situações fisiológicas, ambientais, psicológicas ou sociais, nosso organismo entra em um estado de alerta, onde o consumo de oxigênio e a atividade enzimática de algumas oxigenases e oxidases estão elevados. Essa maior atividade e maior consumo levam a uma maior geração de radicais livres.

Quando ocorre um desequilíbrio na relação ERO e defesas antioxidantes, duas situações são esperadas. A primeira ocorre quando as defesas antioxidantes naturais e as moléculas antioxidantes ingeridas pela dieta encontram-se em maior número do que as espécies reativas produzidas pelo organismo. Nesse caso acontece uma redução nos níveis normais de ER, resultando em uma incapacidade de sinalização celular, culminando em perda da capacidade proliferativa da célula. Na segunda probabilidade, as defesas e moléculas antioxidantes são insuficientes para neutralizar o excesso de espécies reativas formadas, ocasionando lesões em organelas, membranas, tecidos, enzimas, culminando em perda de função celular e/ou tecidual, gerando uma patologia específica.

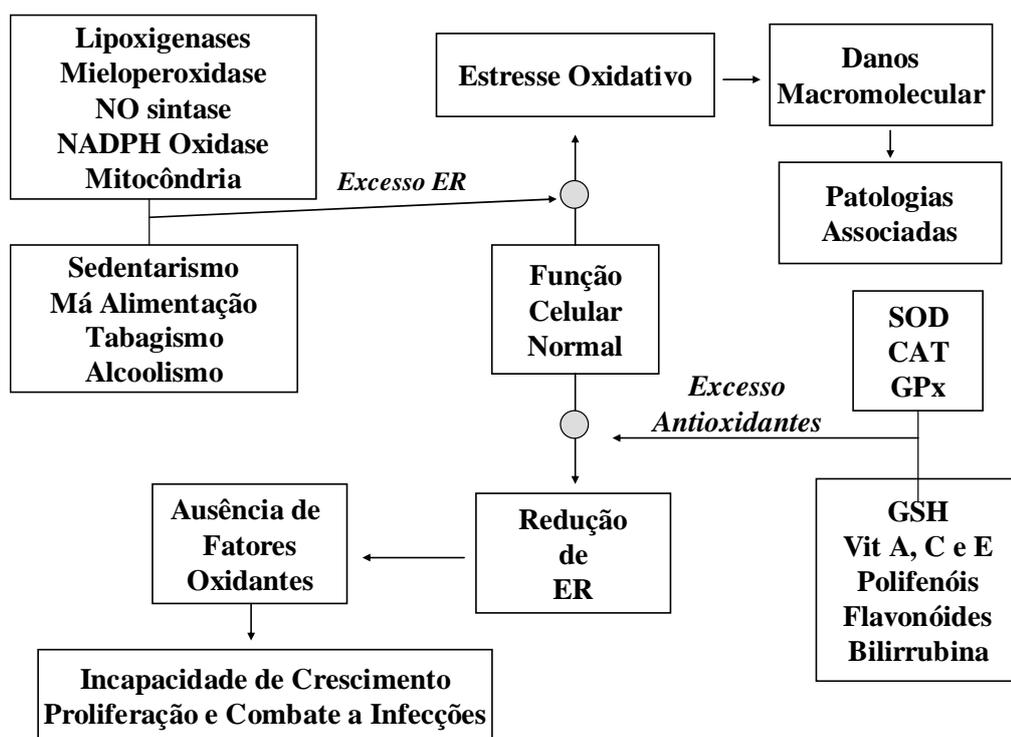


Figura 03 – Estresse oxidativo e implicações fisiológicas (Adaptado de SEIFRIED, 2006).

Desta forma, o estresse oxidativo está envolvido na patogênese de várias doenças, entre elas, os distúrbios neurodegenerativos (GILGUN-SHERKI et al., 2001), cardiovasculares (BLACK e GARBUTT, 2002) e câncer (SENTHIL et al., 2004).

2.3. Inflamação e Espécies Reativas

A inflamação é uma das patologias associadas aos danos causados pelos ERO, que são produzidos pelos neutrófilos quando existem os seguintes estímulos: exposição a agentes quimiotáticos, imunocomplexos e ação de macrófagos. Pequenas alterações nos níveis de radicais livres aumentam a expressão de quimiocinas, de citocinas e de moléculas de adesão. Por outro lado, altos níveis provocam dano epitelial, ativação de proteases e lesão de outros tipos celulares causando lesão tissular. Um dos principais radicais livres envolvidos no processo inflamatório é o $\bullet\text{NO}$. Trata-se de um gás solúvel produzido por células endoteliais, macrófagos e neurônios específicos. Ele tem ação parácrina, ou seja, age em células próximas ao local de sua produção. Além disso, o $\bullet\text{NO}$ possui meia vida curta e é gerado pela enzima NO-sintase, que está presente em células endoteliais e em macrófagos. Um estímulo inflamatório induz produção e liberação da enzima pela célula. A consequência disso é a liberação de mais $\bullet\text{NO}$. Suas ações principais referem-se ao relaxamento do endotélio (vasodilatação) e destruição de microorganismos. Mas ele também possui ações deletérias quando reage com o $\text{O}_2^{\bullet-}$, levando à produção de peroxinitrito (ONOO^\bullet) e posterior conversão a $\bullet\text{OH}$ (DUSSE, VIEIRA e CARVALHO, 2003).

Quando o neutrófilo da corrente sanguínea recebe a informação de uma reação inflamatória em curso, ocorre uma profunda alteração no seu metabolismo intermediário e, então, a célula é “ativada”. Isso significa que o neutrófilo passará a expressar as suas moléculas de adesão e passará, também, a consumir ativamente oxigênio em suas mitocôndrias. Esse processo é chamado de explosão oxidativa (ou explosão respiratória, por ocorrer na cadeia respiratória mitocondrial) e esse consumo não é direcionado para o metabolismo da célula e, sim, para a produção de espécies reativas de oxigênio (SGARBI et al., 2006). Uma vez nos tecidos, os neutrófilos sofrem um processo de desgranulação com a liberação para o citoplasma da enzima mieloperoxidase (MPO), armazenada nos grânulos azurófilos. A MPO é uma heme proteína que compõe o sistema H_2O_2 -MPO-Hialida, um eficiente e importante sistema com ação antimicrobiana presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos (WINTERBOURN et al., 1992; SEPE e CLARK, 1985; STOESSEL et al., 1974). O mecanismo de ação deste sistema baseia-se na síntese de H_2O_2 pelos neutrófilos por ação da

SOD, a partir de 2 moléculas de $O_2^{\bullet-}$ (BOGDAN, 2001; NATHAN e SHILOH, 2000). A MPO converte o H_2O_2 em presença de cloreto em ânion hipoclorito (OCl^-) (AKAIKE, 2001), uma potente citotoxina com importante papel na defesa do organismo contra invasores (bactérias, vírus) e células tumorais, mas também pode causar dano aos tecidos normais (KLEBANOFF e CLARK, 1978; KLEBANOFF, 1980; BABIOR, 1999). A enzima MPO gera ainda outros oxidantes, incluindo o $\bullet OH$ (RAMOS et al., 1992) e 1O_2 (STEINBECK et al., 1992).

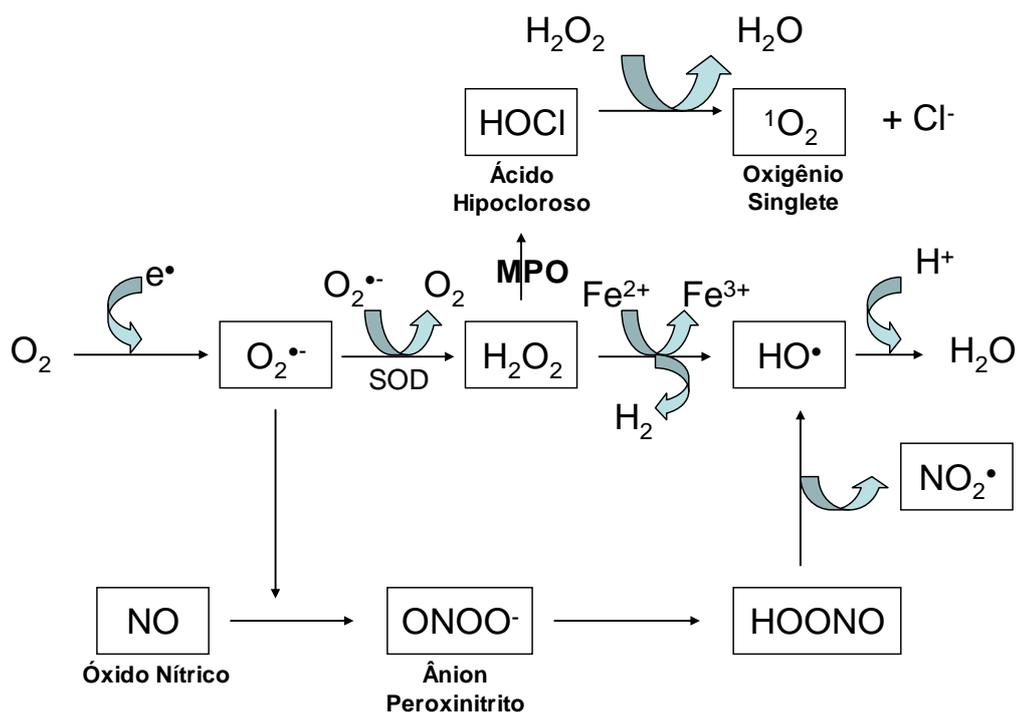


Figura 04 – Esquema de Formação de Espécies Reativas

Outro sistema citotóxico de defesa enzimático, NADPH-oxidase, consiste em vários componentes, uma vez presentes na membrana plasmática em resposta a um estímulo, também dispara a explosão respiratória (LUNARDI et al., 2006). A nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) oxidase é uma enzima que catalisa a produção de ânions superóxido a partir de O_2 e NADPH de acordo com a reação abaixo:



Esta produção de ânion superóxido é realizada nos fagócitos (neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos) em alguns estágios de seus desenvolvimentos (BATOT et al., 1995), onde o radical livre atua como agente tóxico para organismos que entram em contato com estes fagócitos.

Os agentes oxidantes produzidos pela NADPH oxidase incluem H_2O_2 , pela dismutação de $O_2^{\bullet-}$, HOCl, gerada pela oxidação de Cl^- mediada por H_2O_2 , catalisada pela MPO, 1O_2 , derivado da reação de HOCl e H_2O_2 e $\bullet OH$, via reação de Fenton ou da reação entre ozônio e H_2O_2 (BABIOR, 2004, WINK et al., 1994, HAUSLADEN e FRIDOVICH, 1994, GARDNER e FRIDOVICH, 1991a, GARDNER e FRIDOVICH, 1991b, FRIDOVICH, 1975).

A cicloxigenase (COX) é a enzima responsável pela formação de importantes mediadores biológicos, os prostanóides (prostaglandinas, prostaciclina, tromboxano). Sua ação consiste na conversão do ácido araquidônico em prostaglandina H_2 , o precursor dos prostanóides. Existem atualmente três isoformas de COX, sendo elas a COX-1, COX-2 e COX-3. A COX-1 é considerada como constituinte e é encontrada na maioria das células dos mamíferos, enquanto que a COX-2 é quase inexpressiva na maioria dos tecidos e é considerada uma isoforma induzida, tornando-se abundante em macrófagos e células em locais de inflamação (CHANDRASEKHARAN, et al., 2002). A isoforma COX-3 foi recentemente identificada (SIMMONS et al., 2002) e sugere-se que esteja mais envolvida no processo de dor e febre e que seja esta a enzima de sítio de ação do paracetamol (CHANDRASEKHARAN, et al., 2002).

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante e antiinflamatória do extrato e das frações obtidas de *Alternanthera tenella* Colla, utilizando modelos *in vivo* e *in vitro*.

3.2. Objetivos Específicos

1. Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* do extrato bruto e das frações de *A. tenella* através da medida da captação dos radicais DPPH, hidroxila, anion superóxido, óxido nítrico além da medida de proteção à lipoperoxidação;
2. Avaliar o teor de polifenóis totais do extrato bruto e das frações de *A. tenella*;
3. Avaliar a capacidade antioxidante *in vivo* do extrato bruto e das frações de *A. tenella* utilizando o modelo de indução do estresse oxidativo no fígado pelo CCl₄;
4. Avaliar a atividade antiinflamatória *in vivo* do extrato bruto e das frações de *A. tenella* de melhor desempenho nos ensaios antioxidantes.

4. Metodologia, Materiais e Reagentes

4.1. Descrição

Este projeto teve como base a utilização das instalações, materiais e reagentes do Laboratório de Bioquímica Experimental da Universidade Federal de Santa Catarina e seus laboratórios associados. Contou também com o apoio financeiro na forma de bolsa de estudos, fornecido pela CAPES.

4.2. Coleta e Registro de Exsicata

Alternanthera tenella foi coletada no município de São Paulo e sua exsicata depositada no Herbário Municipal “Viveiro Manequinho Lopes” situado no Parque do Ibirapuera, na cidade de São Paulo - SP, com a designação: M.H. Rossi s.n. (PMSP 9688).

4.3. Preparação e Fracionamento do Extrato

As partes aéreas (1.268 g) da espécie *Alternanthera tenella* foram secas em estufa a 40° C, moídas e submetidas à maceração com etanol P.A. por 3 dias, 3 vezes consecutivas. O solvente foi filtrado e evaporado sob pressão reduzida, obtendo-se 87,30 g de extrato bruto etanólico (EEtOH). O EEtOH (22,81 g) foi aplicado em uma coluna de sílica gel 60 e feita uma partição em coluna sob vácuo, utilizando-se os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol (polaridade crescente). As frações correspondentes foram coletadas e os solventes evaporados sob pressão reduzida, obtendo-se um total de 4,70g de fração clorofórmica (FCHCl3), 1,99 g de fração de acetato de etila (FAcoEt) e 14,33g de fração metanólica (FMeOH). A fração hexânica não foi utilizada por apresentar um rendimento muito baixo (0,010g). Todos os procedimentos de coleta, preparação e fracionamento do extrato e frações de *Alernanthera tenella* Colla, foram realizados sob supervisão da Prof^a Dr^a Maria Helena Rossi, do Instituto Biológico de São Paulo.

4.4. Materiais e Reagentes

Para a realização dos ensaios, os reagentes DPPH (1,1-difenil-2-picril hidrazila), ácido sulfossalicílico, ácido nitriloacético (NTA), ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido tricloroacético (TCA), 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB), hidroxitolueno butilado (BHT), azul de p-nitro tetrazólio (NBT), peróxido de t-butila, tartarato de sódio e potássio, sulfato de cobre, guanidina, albumina, reagente de Folin-Ciocalteu, ácido gálico, rutina, carragenina, desoxirribose, xantina e xantina oxidase foram adquiridos junto à Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Os solventes utilizados para o preparo dos extratos foram todos de nível P.A..

4.5. Atividade Antioxidante *in vitro*

O termo “scavenger” será utilizado em inglês com o intuito de descrever uma capacidade não somente seqüestradora (tradução literal ao português), mas também estabilizadora e quelante, própria de uma agente antioxidante.

4.5.1. “Scavenger” do Radical DPPH

O radical DPPH (1,1-difenil-2-picril hidrazila) é considerado um radical estável e tem sua absorção máxima em 517 nm. Quando este composto recebe um elétron ou um radical hidrogênio de um agente antioxidante ou de um radical livre, para se tornar um composto mais estável, resulta em perda de absorbância, passando de violeta (forma livre) para amarelo (forma conjugada). Para a determinação do “scavenger” de radicais DPPH conforme método proposto por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), cada amostra foi diluída a partir de uma solução estoque (1 mg/mL), com concentrações finais de 500, 250, 125, 50, 25, 10 e 5 µg/mL em etanol P.A., com um volume final de 2,5 mL. Foi preparado um branco contendo amostra diluída em etanol P.A. nas mesmas concentrações, mas em volume final de 3,5 mL. Os flavonóides quercetina e rutina foram utilizados como controle positivo do experimento. Adicionou-se 1 mL do reagente DPPH 0,3 mM somente às amostras. Para controle preparou-se uma solução contendo etanol (2,5 mL) e DPPH 3 mM (1 mL) e como branco controle somente 3,5 mL de etanol. Passados 30 minutos, as absorbâncias foram lidas em 517 nm e calculadas em percentual de atividade antioxidante usando a equação:

$$AA \% = 100 -$$

$$\frac{[(Abs AMOSTRA - Abs BRANCO) \times 100]}{(Abs CONTROLE - Abs BRANCO)}$$

O ensaio foi realizado em triplicata e a concentração capaz de inibir 50% da atividade do radical DPPH (CI₅₀) foi calculada por regressão linear e expressa em média ± desvio padrão (DP), onde o eixo X representa a concentração ([] µg/mL) e o eixo Y representa a percentagem de atividade antioxidante (AA%). As análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prisma.

4.5.2. “Scavenger” do Radical Hidroxila

A formação e monitoramento dos radicais hidroxilas foram determinados pelo método da desoxirribose. Este método baseia-se na oxidação da desoxirribose provocada por radicais hidroxilas, produzidos pela reação de peróxido de hidrogênio com o ferro, levando a formação de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA), monitoradas espectrofotometricamente a 532 nm (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1981). Neste método, as amostras a serem testadas foram previamente diluídas nas seguintes concentrações: EEtOH (250, 125, 100, 50, 25, 10, 5, 1 e 0,5 µg/mL), frações FMeOH, FAcoEt e FCHCl₃ (500, 250, 125, 100, 50, 25, 10, 5 e 1 µg/mL). Os flavonóides quercetina e rutina foram utilizados como controle positivo do experimento. Inicialmente incubou-se por 10 minutos a temperatura ambiente, 25 µL de FeCl₃ 1,2 mM e 100 µL de ácido nitrilotriacético (NTA) 1,2 mM para formação de quelato. Em seguida foram adicionados 150 µL de tampão fosfato de potássio 80 mM, pH 7,4; 60 µL da amostra a ser analisada; 100 µL de desoxirribose 33,6 mM; água destilada e 100 µL de H₂O₂ 16,8 mM (30%) e realizada nova incubação por 20 minutos a 37 °C. Após este período a reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 2,8% seguida de 1,0 mL de TBA 1% diluído em NaOH 0,05 N. Posteriormente, incubou-se por 15 minutos a 100 °C e interrompeu-se a reação com banho de gelo por 5 minutos. A absorbância das soluções foi medida em 532 nm, sempre comparado a um branco contendo as mesmas substâncias nas mesmas concentrações com exceção da desoxirribose. O cálculo do percentual de oxidação da desoxirribose é realizado considerando a absorbância do controle como 100 % de oxidação e o potencial “scavenger” do •OH foi

calculado em termos de porcentagem de atividade antioxidante (AA%) conforme a formula abaixo:

$$AA \% = 100 - \frac{[(Abs AMOSTRA - Abs BRANCO) \times 100]}{(Abs CONTROLE - Abs BRANCO CONTROLE)}$$

Os resultados foram apresentados em termos de CI_{50} que representa a concentração suficiente da amostra que é necessária para inibir 50% do dano causado pelos radicais $\cdot OH$, e foram calculadas por análise de regressão exponencial, expressos como média \pm DP.

4.5.3. “Scavenger” do Radical Ânion Superóxido

O ânion superóxido é gerado pelo sistema xantina oxidase – xantina e é detectado pela formação de um cromóforo com NBT. Quando a enzima SOD está presente, a concentração do radical ânion superóxido é reduzida, decrescendo assim a formação do cromóforo, conforme esquema abaixo (ROBAK e GRYGLEWSKI, 1988).

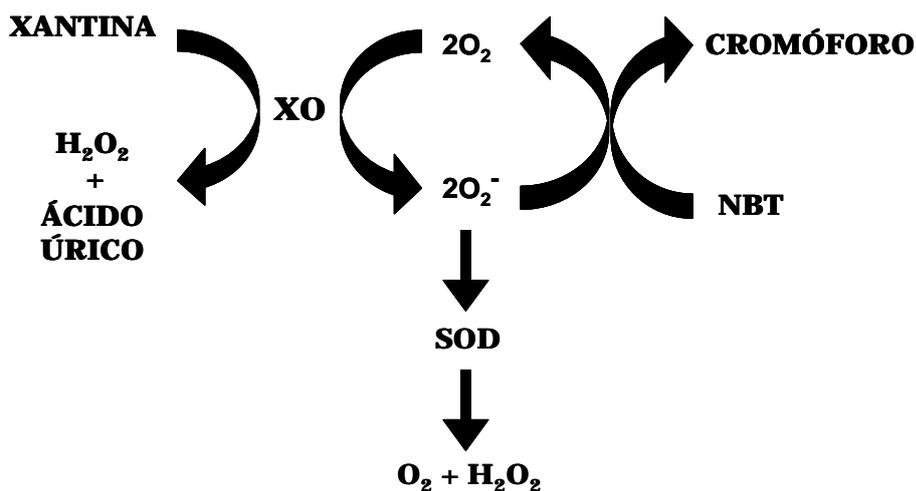


Figura 05 – Esquema de formação de $O_2^{\cdot -}$ e atividade da SOD.

Cada extrato ou fração foi diluído a partir de uma solução estoque (1 mg/mL), com concentrações finais de 500, 250, 125, 50, 25, 10 e 5 $\mu g/mL$ em etanol. A rutina foi utilizada como controle positivo do experimento. O sistema de incubação foi constituído por: tampão

fosfato 0,1 M (pH 7,8); amostra a ser analisada; xantina 100 µM; NBT 6 mM e XO 0,04 U/mL. O sistema foi incubado por 10 minutos à temperatura ambiente e a reação foi interrompida pela adição de HCl 0,1 N, sendo que a redução da absorvância do NBT foi medida em 560 nm e calculadas em percentual de atividade antioxidante usando a seguinte equação:

$$AA \% = 100 - \frac{[(Abs AMOSTRA - Abs BRANCO) \times 100]}{(Abs CONTROLE - Abs BRANCO CONTROLE)}$$

Os resultados obtidos foram expressos em termos de concentração inibitória (CI₅₀), que representa a concentração da amostra que é necessária para inibir em 50% a atividade do O₂^{•-} e foram calculadas por análise de regressão exponencial, expressos como média ± DP.

4.5.4. “Scavenger” do Óxido Nítrico

O ensaio para a dosagem de nitrato foi realizado segundo metodologia descrita por Bartholomew (1984), baseia-se na incubação dos compostos em estudo com um doador de [•]NO, monitorando a produção de nitrito obtido com a sua reação com o oxigênio, com o reagente de Griess (sulfanilamida 1% em H₃PO₄ 5% e 2-α-naftil-etilenodiamina 0,1% em H₂O 1:1). Com *E. coli*, cultivada em meio de cultura modificado para expressão de nitrato redutase, responsável pela conversão, foi lavada, aliquoteada e armazenada em freezer -70 °C. Foi realizada a dosagem de nitrato/nitrito em uma placa de 96 cavidades, onde foram plaqueadas as curvas padrões de nitrato e nitrito, nas concentrações de 0, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100 e 150 µM de NO₂ e NO₃, respectivamente, diluídos em água Milli-Q. Desta forma, 40 mM de nitroprusseto de sódio (NaNPS) (doador de [•]NO) foi incubado na ausência e na presença de crescentes concentrações das frações de *A. tenella* (31,25, 62,5, 125, 250, 500, 1.000 µg/mL), em um meio contendo 20 mM de NaH₂PO₄, pH 7,2, por 30 minutos a 37 °C. Posteriormente, a quantidade de nitrito formado, proporcional à quantidade de [•]NO livre que reagiu com o oxigênio, foi determinada espectrofotometricamente a 543 nm após 10 minutos da adição do reagente de Griess (GREEN et al., 1982). A quantidade de NO₂ formada foi calculada utilizando-se uma curva padrão de nitrito obtida com a mesma metodologia.

4.5.5. Peroxidação Lipídica *in vitro*

Este método baseia-se na prévia geração de radicais hidroxila pelo peróxido de t-butila, e estes radicais reagem com os ácidos graxos presentes na membrana lipídica, gerando o MDA que reage com 2 moléculas de TBA com a eliminação de 2 moléculas de água, formando um complexo rosa com absorção máxima a 532 nm.

A proteção à peroxidação lipídica foi avaliada de acordo com Chen e Tappel (1996), usando homogenato de fígado de ratos. As amostras testadas foram previamente diluídas nas seguintes concentrações: 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 µg/mL. A rotina foi utilizada como controle positivo do experimento. Os animais foram sacrificados e o fígado retirado cirurgicamente, lavado com solução NaCl 0,9%, pesado uma alíquota de 100 g e homogeneizado em 1,9 mL de tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0 e KCl 140 mM. Posteriormente, foi feita a incubação de 150 µL de homogenato, 525 µL de H₂O destilada, 125 µL de tampão fosfato de potássio 80 mM (pH 7,4), 100 µL de peróxido t-butila 1 mM e 100 µL de amostra. Como branco das amostras foram preparadas soluções idênticas, substituindo somente o homogenato de fígado por 150 µL de água destilada. Como controle positivo da reação preparou-se uma solução contendo as mesmas quantidades e concentrações de água destilada, fosfato de potássio 80 mM e pH 7,4, peróxido t-butila 1 mM, homogenato de fígado. Como controle negativo preparou-se uma solução idêntica ao controle positivo, porém adicionando 100 µL de BHT 10 mM. Os controles foram zerados com uma solução branco contendo 775 µL de água destilada e fosfato de potássio 80 mM (pH 7,4) e peróxido t-butila 1 mM nas mesmas quantidades e concentrações anteriormente descritas. As misturas foram incubadas a 37 °C, por 2 horas. Após a incubação, foi adicionado 1,0 mL de TCA 2,8%, seguido de 1,0 mL de TBA 1% diluído em NaOH 0,05 N. O sistema de incubação foi aquecido a 100 °C por 15 min e posteriormente, colocado em banho de gelo por 5 min. A absorvância das soluções foi medida em 532 nm após centrifugação por 3 minutos a 3.000 g a 5 °C.

O potencial de proteção à lipoperoxidação foi calculado em termos de atividade antioxidante, conforme a fórmula abaixo:

$$A A \% = 100 - \frac{[(Abs AMOSTRA - Abs BRANCO) \times 100]}{(Abs CONTROLE - Abs BRANCO CONTROLE)}$$

Os valores de CI_{50} representam as concentrações das amostras que são necessárias para prevenir em 50% a peroxidação lipídica, calculadas por análise de regressão linear e expressos como média \pm DP.

4.5.6. Teor de Fenóis Totais

A quantidade de fenóis totais no extrato bruto e frações de *A. tenella* foi determinada através da reação com o reagente de Folin-Ciocalteu. Esta reação baseia-se no princípio que em meio alcalino os compostos fenólicos presentes na amostra, reduzem a mistura dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico, do reagente de Folin, em óxidos de tungstênio e molibdênio de cor azul, tornando possível realizar leituras de absorvância na faixa visível do espectro em 765 nm (SINGLETON et al., 1999, SLINKARD e SINGLETON, 1977). Com uma alíquota (100 μ L) de cada fração, adicionou-se água destilada (7,9 mL) e reagente de Folin (500 μ L), com posterior homogenização. Passados 3 minutos, adicionou-se 1,5 mL de carbonato de sódio (20% m/v), homogenizando a mistura e deixando repousar ao abrigo da luz em temperatura ambiente por 2 horas, para então realizar a leitura espectrofotométrica em 765 nm. Foi utilizado como branco a mesma composição, substituindo a amostra por adicionais 100 μ L de água destilada. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (GAE mg/L), através de curva padrão obtida pela mesma metodologia utilizando como amostra concentrações conhecidas de ácido gálico (2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 12,5 μ g/mL).

4.6. Ensaio Antioxidantes *in vivo*:

4.6.1. Protocolo experimental

Foram utilizados camundongos isogênicos (provenientes de uma mesma linhagem com um percentual mínimo de diferenciação gênica), machos, da linhagem Balb-c, com peso aproximado de 20 ± 2 g, que foram mantidos em biotério próprio em condições ideais de temperatura e umidade (22 ± 2 °C, 60% respectivamente), com um ciclo claro-escuro programado de 12 horas. Foram alimentados com ração própria para roedores oriunda do Biotério Central e água filtrada *ad libitum*. Toda manutenção dos animais, assim como os procedimentos experimentais seguiram as recomendações do “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals - Portuguese Edition” de 1996 publicado pelo “Institute for Laboratory Animal Research” e o projeto obteve aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC cadastrado sob o número PP00140/CEUA. O flavonóide rutina foi

utilizado como controle, uma vez que a quercetina tornou-se inviável para administração *in vivo* pela sua característica de solubilidade.

Os camundongos foram divididos em 7 grupos (n = 6), onde: grupo 1 (controle negativo) foi tratado com veículo (solução hidroalcoólica 10%); grupos 2, 3, 4 e 5 foram pré-tratados via oral durante 7 dias com solução de EEtOH, FMeOH, FAcOEt e FCHCl₃, respectivamente; grupo 6 recebeu o tratamento com rutina (6,0 mg/kg) e grupo 7 (controle positivo) tratado com CCl₄ via intraperitoneal (ip), (agente estressor) 0,5 mL / 100 g (30% v/v) em solução com óleo de milho. No sétimo dia, os grupos 2, 3, 4, 5 e 6, foram tratados com CCl₄ (0,5 mL / 100 g, 30% v/v, em solução com óleo de milho, intraperitoneal). Após 24 horas da administração do CCl₄, os animais foram anestesiados com éter etílico e o sangue foi coletado por punção ocular da veia supraorbital para ensaios de dano oxidativo ao DNA e potencial antioxidante total. Imediatamente após a coleta sangüínea, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os fígados retirados cirurgicamente para as dosagens dos indicadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes.

4.6.2. Proteção à Lipoperoxidação de Membrana

A avaliação da peroxidação lipídica foi realizada a partir da reação de substância reativas com o ácido tiobarbitúrico gerando bases de Schiff (OHKAWA, 1979; BIRD e DRAPER, 1984, modificado por HERMES-LIMA et al., 1995). Os ácidos graxos presentes na membrana lipídica, após sofrerem dano oxidativo, geram o MDA que reage com 2 moléculas de TBA com a eliminação de 2 moléculas de água, formando um complexo rosa com absorção máxima a 532 nm. Para a detecção do dano causado pela lipoperoxidação, 400 µL do homogenato foram misturados a 400 µL da solução (1% TBA / 50 mM NaOH / 0,1 mM BHT) e 200 µL de ácido fosfórico 7%. Posteriormente, a amostra foi incubada a 100 °C por 15 min e após a descanso de 5 min em banho de gelo para estabelecer o término da reação, foram adicionados 1,5 mL de butanol. Finalmente, os tubos foram agitados vigorosamente e centrifugados a 3.000 g por 10 min. A fase orgânica foi removida e medida espectrofotometricamente em 532 e 600 nm em cubetas de quartzo para volume igual a 1 mL. Para o branco foi substituída a solução de TBA por HCl 3,0 mM. A concentração de TBARS (nmol/g) foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 156 mM conforme a fórmula:

$$\text{TBARS (nmol.g}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Absorbância da amostra (A}_{532} - \text{A}_{600}) \times 10^3 \times 340}{156}$$

Onde:

156 nM = TBARS é quantificado pelo coeficiente de extinção molar

340 mg/mL = Diluição (Homogenato 20 x cubeta 17)

4.6.3. Glutationa Reduzida – GSH

O fundamento do método para detecção de GSH (figura 06) consiste na reação do grupamento sulfidríla da GSH com o reagente de Ellman (DTNB ou ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico), formando um tiolato (TNB ou ácido 5-tio-2-nitrobenzóico) de coloração amarela, mensurável espectrofotometricamente a 412 nm. A formação de TNB é diretamente proporcional à concentração de GSH na amostra (BEUTLER, DURON e KELLY, 1963).

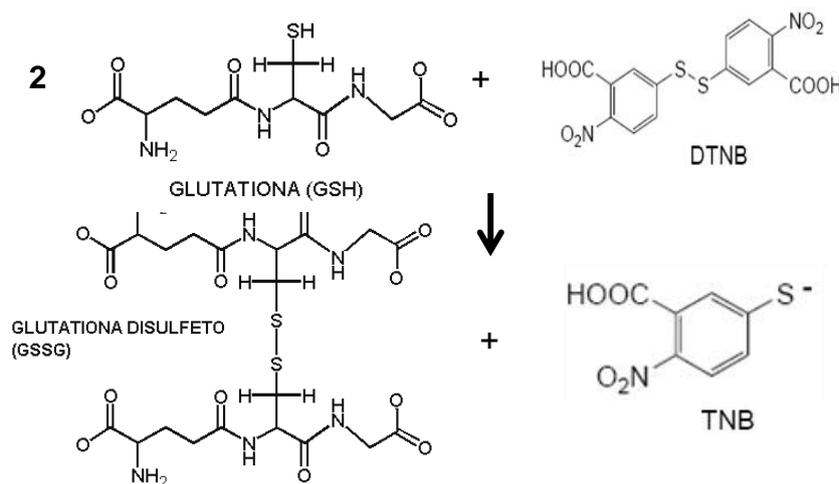


Figura 06. Fundamento químico para dosagem de GSH

Para a realização do ensaio, 100 mg de amostras de fígado foram precipitadas com TCA 12% na proporção 1:10 (m/v), homogeneizadas com execução de 20 impactos em homogeneizador mecânico, seguidos de centrifugação a 5.000 g durante 5 min. A concentração de tióis foi avaliada imediatamente após a obtenção dos extratos ácidos hepáticos (BEUTLER, DURON e KELLY, 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 homogenato permitiu, após cerca de 2 min em agitação constante, o monitoramento dos ânions tiolato (TNB), de coloração amarela mensurável em 412 nm. As análises foram feitas

em triplicata e os valores expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$, utilizando a fórmula descrita abaixo, onde: 14,1 é o coeficiente de extinção molar do ânion tiolato

$$[\text{GSH}] \mu\text{mol.g}^{-1} = A_{412} \times \text{diluições}/14,1$$

4.6.4. Atividade da Catalase – CAT

O princípio deste método baseia-se no decaimento da absorbância ocasionado pela redução de H_2O_2 a água, pela CAT presente na amostra, medido espectrofotometricamente a 240 nm, durante tempo predeterminado (AEBI, 1984). Para esse ensaio, utilizou-se a solução de peróxido de hidrogênio (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 μL de amostra. 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 por minuto e por grama.

$$\text{CAT} = \Delta \text{ abs} \times \text{diluição}^* \times 1,5 \text{ (mmol.min}^{-1}.\text{g}^{-1})$$

* diluição (homogenato 20 x cubeta 100) = 2000

4.6.5. Atividade da Superóxido Dismutase - SOD

A atividade da SOD foi medida espectrofotometricamente em 480 nm (MISRA e FRIDOVICH, 1972) mediante a oxidação da epinefrina (mudança de pH 2,0 para pH 10,0) que gera o ânion superóxido e um cromóforo róseo, o adrenocromo, cuja formação é retardada pela enzima presente na amostra. Em uma cubeta contendo 1,95 mL de glicina 50 mM, pH 10,0 foram adicionados 50 μL de epinefrina 60 mM (mantida em gelo, frasco âmbar e pH em torno de 2,0 para evitar a oxidação). A velocidade de formação do adrenocromo foi acompanhada durante cerca de 90 segundos antes do início da reação, para então adicionar a alíquota da amostra (em torno de 20 a 70 μL , dependendo da concentração e atividade da enzima presente na amostra). O tempo total de monitoramento da reação foi de 3 minutos. Curvas de 4 a 7 pontos permitiram avaliar indiretamente a atividade enzimática da SOD nestas condições. Os valores da SOD foram expressos em U SOD g^{-1} , ou seja, em termos de atividade da enzima, onde uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para diminuir à metade a velocidade espontânea de formação do adrenocromo.

4.6.6. Determinação de Carbonilação Protéica

A reação dos grupos de proteínas com reagentes específicos para grupos carbonila fornece um método de detecção e quantificação de oxidação catalisada por metais. No presente método foi usado a 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH), um reagente clássico, que reage com as carbonilas de proteínas oxidadas conforme reações abaixo (REZNICK e PACKER, 1994):



O dano oxidativo às proteínas por carbonilação foi determinado de acordo com o método proposto por Levine et al. (1990). Os fígados foram homogeneizados (na diluição de 1:10) em 5% de ácido sulfossalicílico gelado. Uma alíquota de 200 μL de homogenato foi adicionada a 800 μL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 1 hora, ao abrigo da luz, sendo vigorosamente agitadas a cada 15 min. Então, foram adicionados 800 μL de TCA 20% e os tubos foram agitados e centrifugados por 5 min a 5000 g. Os sobrenadantes foram descartados e o excesso de DNPH foi removido lavando-se os precipitados inicialmente com 800 μL de TCA 10%, agitados e centrifugados por 5 min a 5000 g e depois, lavados por três vezes, com 800 μL de uma solução de etanol: acetato de etila (1:1), sempre seguidos de agitação e centrifugação por 5 min a 14.000 g. Após secagem das paredes dos tubos com o auxílio de um bastonete de algodão, os precipitados foram dissolvidos em 600 μL de guanidina 6 M, submetidos à agitação e incubados por 10 min a 37 °C, para dissolução. Os brancos foram preparados substituindo-se DNPH por HCl 2 M. As absorvâncias máximas em 360 nm foram determinadas e os valores finais das proteínas carboniladas foram calculados utilizando o coeficiente de extinção molar, a concentração de proteínas totais previamente determinada e o conteúdo de proteína carbonilada foi calculado conforme equação abaixo.

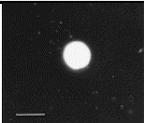
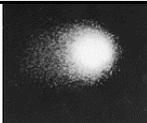
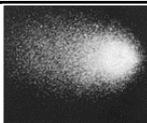
$$\text{Proteína Carbonilada (nmol/mg)} = (\text{Abs}_{360} \times 45,45) / [\text{Proteínas Totais}]$$

4.6.7. Avaliação do Dano ao DNA (fragmentação do DNA)

A fragmentação do DNA foi avaliada através de eletroforese horizontal e microscopia de fluorescência utilizando o teste COMETA (SINGH et al., 1988). Para o teste, utilizou-se 10 µL de sangue diluído em 1 mL de PBS. As células isoladas (10 µL) foram embebidas em 75 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMPA; 0,75 %) a 37 °C. Esta mistura (células / LPMA) foi adicionada a uma lâmina de microscópio pré-coberta com uma camada de agarose de ponto de fusão normal (NMPA, 1 %). As lâminas foram mergulhadas em solução de lise gelada que continha 2,5 mM NaCl, 100 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 10 % DMSO e 10 mM Tris pH 10, por no mínimo 2 horas. Após este período, as lâminas foram incubadas por 25 minutos em tampão alcalino gelado (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH 13) e o DNA liberado foi submetido a uma eletroforese horizontal sobre voltagem de 25 V e uma corrente elétrica de 280 mA por 30 minutos. Posteriormente, as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris 0,4 M (pH 7,5) e coradas com brometo de etídeo (2 µg/mL). A visualização foi feita em um microscópio de fluorescência (400x) com filtro de excitação de 515 e filtro de extinção de 560 nm.

Como controle interno da técnica foi usado controle positivo a cada eletroforese realizada. Esses controles foram realizados usando 100 µL de H₂O₂ (100 µM) misturados às amostras de sangue dos animais do grupo controle e incubados durante 15 minutos a 25 °C. Para cada animal foram analisadas aleatoriamente imagens de 100 núcleos (50 núcleos por lâmina, em duplicata) e o tamanho dos cometas (região nuclear + cauda) foi classificado visualmente dentro de 5 classes de dano, variando de 0 (cometas sem dano) a 4 (cometas com dano máximo) de acordo com metodologia proposta por Collins et al., (1995). A fim de expressar o dano visualizado nas lâminas em valores numéricos, cada classe recebeu uma pontuação de acordo com as características próprias de cada classe de dano, conforme demonstrado na tabela 3.

Tabela 1. Pontuação e exemplos de cada classe de cometa visualizada.

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

Para cada animal foi calculada uma pontuação de acordo com o número de cometas visualizados em cada classe, segundo a equação abaixo:

Índice de dano ao DNA = [(Nº de cometas classe 0 x 0) + (Nº de cometas classe 1 x 1) + (Nº de cometas classe 2 x 2) + (Nº de cometas classe 3 x 3) + (Nº de cometas classe 4 x 4)].

Conseqüentemente, obteve-se uma única pontuação para cada grupo estudado. Então, o índice de dano de cada grupo podia variar de 0 (ausência de dano) a 400 (presença de dano máximo).

4.6.8. Potencial Antioxidante Total do Plasma

Este ensaio, descrito na literatura internacional como FRAP (ferric reducing antioxidant power), é um ensaio para medida direta do potencial antioxidante total do plasma. A reação baseia-se na formação do complexo de Fe³⁺ com o 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) e sua posterior redução em meio ácido à sua forma ferrosa, mediante presença de compostos antioxidantes (equação 12). Essa redução leva a uma alteração colorimétrica da solução, monitorado espectrofotometricamente a 593 nm (BENZIE e STRAINS, 1996; BENZIE e STRAINS, 1999).

Para a realização do ensaio, utilizou-se uma solução de trabalho composta por tampão acetato 300 mM (pH 3,6), TPTZ e FeCl₃.6H₂O na proporção 10:1:1, respectivamente. A amostra (100 µL) foi acrescentada a 3 mL da solução de trabalho e imediatamente após homogeneização, realizou-se uma leitura. A solução foi submetida a uma temperatura de 37 °C em banho-maria por 4 minutos e então realizada nova leitura. O mesmo procedimento foi feito com uma solução padrão de ácido ascórbico 250 µM. Um branco contendo somente o reagente de trabalho foi utilizado e o poder antioxidante total das amostras foi calculado conforme equação abaixo:

$$\text{FRAP} = \frac{0 - 4 \text{ min. } \Delta A_{593 \text{ nm amostra teste}}}{0 - 4 \text{ min. } \Delta A_{593 \text{ nm padrão (ácido ascórbico)}}} \times [\text{FRAP}]_{\text{padrão}} \times 30$$

Onde 30 refere-se à diluição na cubeta de análise e [FRAP] padrão, para uma concentração de ácido ascórbico de 250 µM, o valor é igual a 500.

4.7. Atividade Antiedematogênica

4.7.1. Edema de Pata Induzido por Carragenina

Para a determinação de atividade antiinflamatória foi escolhido o modelo da carragenina segundo Sughisita e colaboradores (1981), onde foram utilizados camundongos isogênicos machos da linhagem Balb/C (n=10, 20±2 g), divididos em 2 grupos (1-EEtOH e 2-CN), pré-tratados (1 hora antes) oralmente com EEtOH (150 mg/kg) e veículo de diluição (PBS, pH 7,4), respectivamente. Para a indução do edema, utilizou-se carragenina (6 µg/µL, 500 µL/pata) que foi injetada na superfície plantar da pata traseira direita, enquanto que a pata contra lateral recebeu injeção de PBS (pH 7,4, 50µL), uma vez que os extratos estavam diluídos em PBS (pH 7,4). O desenvolvimento do edema foi medido pletismograficamente em tempos de 0, 30, 60, 120 e 240 min após a implantação do edema. Os resultados foram expressos como diferença de volume de edema entra a pata com carragenina e a pata com PBS, segunda a fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = \Delta\text{cpv} - \Delta\text{tpv} / \Delta\text{cpv}$$

Onde Δcpv = aumento de volume do grupo controle e Δtpv = aumento de volume do grupo tratado.

4.8. Análise Estatística

As análises estatísticas dos dados obtidos foram realizadas através de análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de Tukey-Kramer. Para tal utilizou-se o software INSTAT (GrahPad, San Diego, CA, USA) admitindo níveis de significância mínimos de $P < 0,05$, $P < 0,01$ e $P < 0,001$.

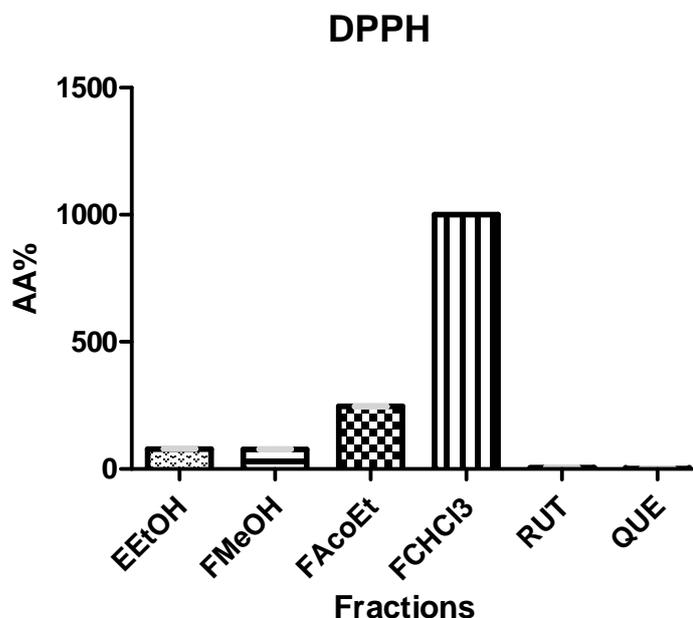
5. Resultados

5.1. Atividade Antioxidante *in vitro*

5.1.1. “Scavenger” do Radical DPPH

A capacidade “scavenger” do extrato bruto e frações de *A. tenella*, testada para o radical DPPH, demonstrou que o extrato bruto e as frações, com exceção da FCHCl₃, apresentaram atividade antioxidante significativa (Tabela 2), destacando-se o extrato bruto etanólico (EEtOH) e a fração metanólica (FMeOH), que obtiveram os melhores resultados, expressos em concentração eficaz 50% (CE₅₀), não apresentando diferença estatisticamente significativa entre si. Nenhuma das amostras demonstrou ser mais efetiva do que os padrões utilizados como controle, rutina (RUT) e quercetina (QUE), flavonóides com marcante atividade antioxidante.

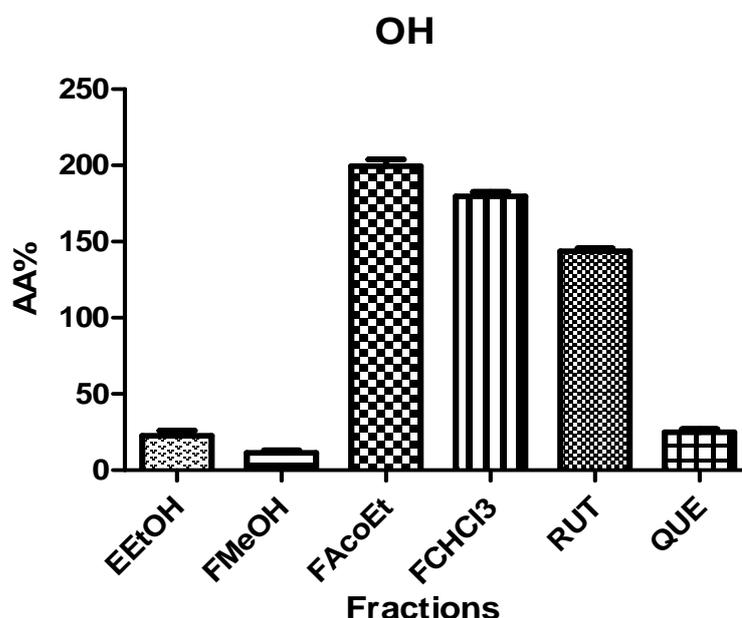
Tabela 2. Avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto etanólico e frações de *Alternanthera tenella* Colla, rutina e quercetina, através da medida da capacidade “scavenger” do radical DPPH, testados em concentrações crescentes e expressos em CE₅₀ após análise de regressão linear. Todos os dados foram expressos em termos de média ± DP. **nda**: não demonstrou atividade na concentração utilizada.



5.1.2. “Scavenger” do Radical Hidroxila

A atividade antioxidante contra radicais livres comprovou a melhor eficácia em seqüestrar radicais hidroxila das frações FMeOH e EEtOH. Em ensaio realizado segundo Halliwell e Gutteridge (1991), essas frações demonstraram ser tão eficientes no “scavenger” do radical hidroxila quanto o flavonóide QUE, utilizado como um dos padrões para o ensaio (Tabela 3). Estes resultados confirmam a tendência de uma atividade antioxidante proporcional à concentração das frações utilizadas.

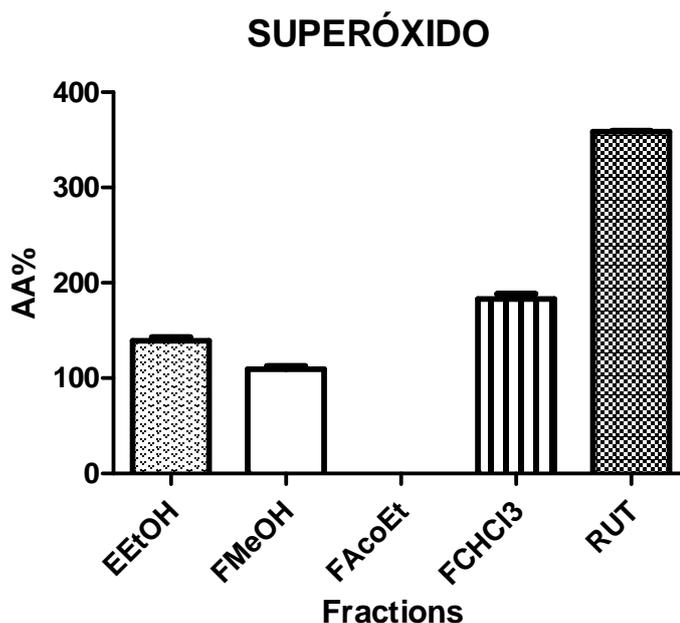
Tabela 3. Avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto etanólico e frações de *Alternanthera tenella* Colla, rutina e quercetina, através da medida da capacidade “scavenger” do radical hidroxila, testadas em concentrações crescentes e expressas em CE₅₀ após análise de regressão linear. Todos os dados foram expressos em termos de média ± DP.



5.1.3. “Scavenger” do Radical Ânion Superóxido

Os melhores resultados de capacidade “scavenger” para o ânion superóxido, gerado pelo sistema xantina-xantina oxidase, foram novamente EEtOH e MEEtOH.

Tabela 4. Avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto etanólico e frações de *Alternanthera tenella* Colla e rutina, através da medida da capacidade “scavenger” do ânion superóxido, testadas em concentrações crescentes e expressas em CE₅₀ após análise de regressão linear. Todos os dados foram expressos em termos de média ± DP. **nda:** não demonstrou atividade na concentração utilizada.



5.1.4 “Scavenger” do Óxido Nítrico

A capacidade de inibição da conversão de óxido nítrico em nitratos pela enzima NO redutase, expressa, quando em condições favoráveis, pela bactéria *E. coli*, resultou em uma maior atividade do EEtOH, com atividade moderada da fração FMeOH e não demonstrando atividade para as demais frações.

As absorvâncias obtidas no ensaio foram comparadas às obtidas na curva padrão de NO₂/NO₃, onde o a quantidade utilizada para os ensaios corresponde a 100(µg/mL), tendo uma absorvância média de 0,537 nm, significando 100 % de formação de NO₂/NO₃, obtendo assim um valor comparativo na conversão com consumo de •NO, onde 74,32 ± 4,41 µg/mL de EEtOH inibiu 50 % da formação de NO₂/NO₃ e nas concentrações utilizadas, nenhuma outra fração obteve tal resultado. A fração FMeOH apresentou uma discreta capacidade “scavenger”, reduzindo em 50% a formação de NO₂/NO₃ quando em concentração de 721,00 ± 10,21 µg/mL.

Tabela 5. Curva padrão para dosagem de NO₂/NO₃, realizada em concentrações crescentes de NO₂ e NO₃ (0, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100 e 150 µg/mL), expressa em absorvância a 543 nm.

Concentração (µg/mL)	Abs 543 nm	
	NO ₂	NO ₃
0	0,103	0,101
2,5	0,134	0,149
5	0,126	0,140
10	0,156	0,161

25	0,237	0,247
50	0,374	0,370
100	0,536	0,539
150	0,640	0,627

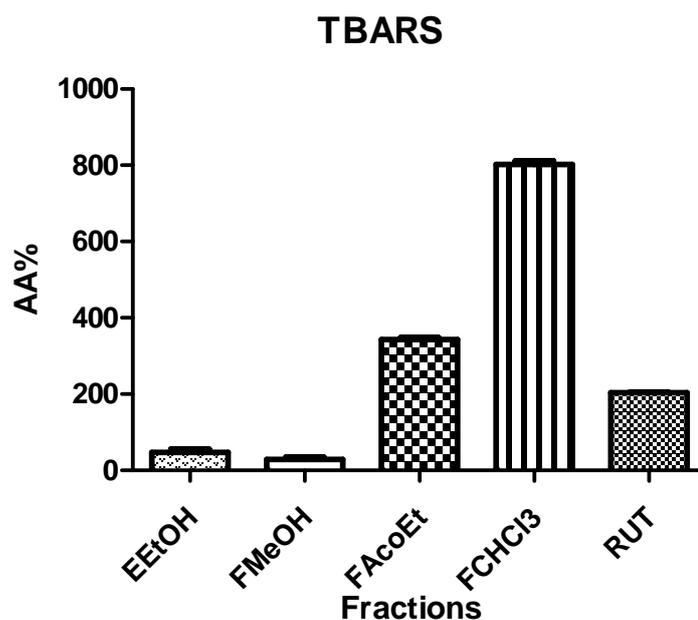
Tabela 6. Avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto etanólico e frações de *Alternanthera tenella* Colla, através da medida da capacidade “scavenger” do radical óxido nítrico, testadas em concentrações crescentes e expressas em absorbância obtida a 543 nm. **nda:** não demonstrou atividade na concentração utilizada.

Conc. µg/mL	EEtOH	FMeOH
31,25	0,479	-
62,5	0,231	0,498
125	0,103	0,486
250	0,080	0,378
500	0,069	0,306
1000	-	0,259

5.1.4. Peroxidação Lipídica *in vitro*

A capacidade de proteção contra a lipoperoxidação de membrana através da medida da redução de malonaldeído formado, demonstrou que os melhores resultados foram novamente da FMeOH e EEtOH.

Tabela 7. Avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto etanólico e frações de *Alternanthera tenella* Colla e rutina, através da medida da capacidade protetora contra a lipoperoxidação de membrana, testadas em concentrações crescentes e expressas em CE₅₀ após análise de regressão linear. **nda:** não demonstrou atividade na concentração utilizada.



5.1.5. Teor de Fenóis Totais

A concentração de fenóis totais presentes em cada fração demonstra uma relação entre teor de fenóis e atividade antioxidante. Os melhores resultados dos ensaios *in vitro* foram justamente às frações que apresentaram maior teor de fenóis.

Tabela 8. Determinação de teor de fenóis totais das amostras, expressos em equivalentes de ácido gálico (GAE mg/L).

Fração	Teor de fenóis GAE mg/L
EEtOH	83,15 ± 3,66
FMeOH	85,15 ± 2,94
FAcoEt	77,10 ± 4,77
FCHCl3	78,50 ± 3,40

5.2. Atividade Antioxidante *in vivo*

5.2.1. Glutationa Reduzida – GSH

O conteúdo de glutathiona reduzida é um dos principais componentes não enzimáticos de defesa antioxidante do nosso organismo e seu consumo é indicativo de estresse oxidativo. Não houve diferença significativa entre as frações analisadas e o controle positivo (CCl₄)

(Figura 7). O extrato bruto e as frações não foram capazes de reverter o grande consumo de GSH para neutralização dos radicais livres gerados pelo tratamento com CCl₄.

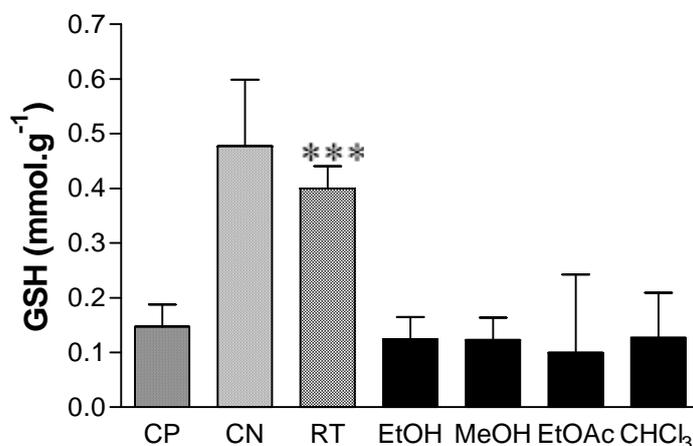


Figura 7 – Concentração de GSH (mmol . g⁻¹) em fígados de camundongos Balb-c expostos ao CCl₄ e tratados com extrato e frações obtidas de *A. tenella*: EEtOH, FMeOH, FAcOEt e FCHCl₃. Grupo controle positivo (CP) tratado somente com CCl₄ (0,5 mL\100g) e grupo controle negativo (CN) tratado com PBS. Todos os valores foram expressos como média ± Erro Padrão Médio (EPM), n = 6. (***) representa diferença estatística $P < 0,001$ em relação a CP.

5.2.2. Proteção à Lipoperoxidação de Membrana

A capacidade de proteção contra a lipoperoxidação de membrana, medida segundo Ohkawa (1979), demonstrou que EEtOH e FMeOH obtiveram os melhores resultados com relação ao controle positivo ($P < 0,001$), apresentando proteção semelhante aquela obtida com o pré-tratamento com rutina (Figura 8). As demais frações não obtiveram resposta satisfatória na prevenção contra danos causados aos lipídios de membrana.

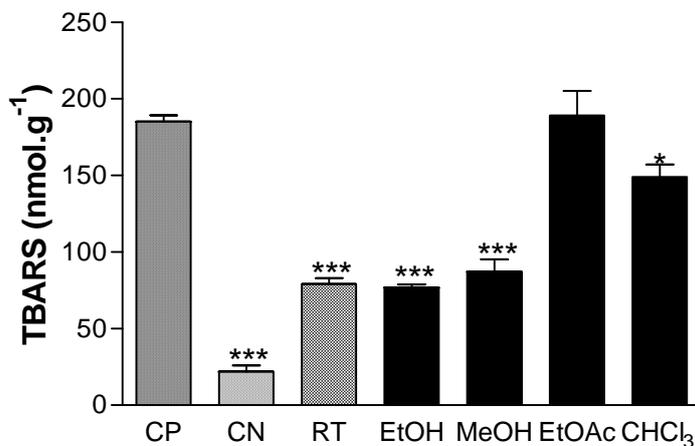


Figura 8 - Índice de peroxidação lipídica (TBARS; nmol . g⁻¹) em fígados de camundongos Balb-c expostos ao CCl₄ e tratados com extrato e frações obtidas de *A. tenella*: EEtOH, FMeOH, FAcOEt e FCHCl₃. Grupo controle positivo (CP) tratado somente com CCl₄ (0,5 mL\100 g) e grupo controle negativo (CN) tratado somente com

PBS. Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, n = 6. (***) e (*) representam diferença estatística $P < 0,001$ e $P < 0,05$ em relação a CP.

5.3. Determinação de Carbonilação Protéica

Os resultados obtidos demonstraram que no pré-tratamento dos camundongos, todos os extratos e frações da *A. tenella* tiveram ação protetora contra ação oxidativa das ER sobre as proteínas causadas pelo tratamento com o CCl_4 (Figura 9). É importante notar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os pré-tratamentos com os extratos da planta em relação aos animais pré-tratados com a rutina.

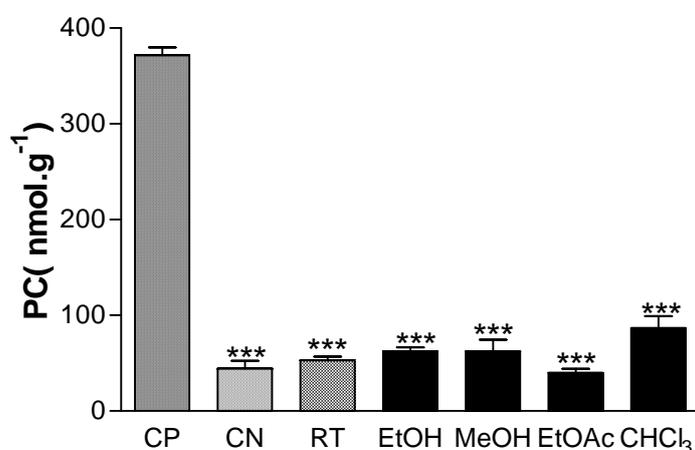


Figura 9 - Carbonilação protéica (PC; nmol . mg⁻¹) em fígados de camundongos Balb-c expostos ao CCl_4 e tratados com extrato e frações obtidas de *A. tenella*: EEtOH, FMeOH, FAcOEt e FCHCl₃. Grupo controle positivo (CP) tratado somente com CCl_4 (0,5 mL\100 g) e grupo controle negativo (CN) tratado com PBS. Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, n = 6. (***) representa diferença estatística $P < 0,001$ em relação a CP.

5.4. Enzima Catalase

A determinação da velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima CAT presente na amostra curiosamente demonstrou que somente o pré-tratamento dos animais com a FAcOEt e a rutina apresentaram redução significativa na atividade da CAT ($P < 0,001$)(Figura 10). Somente estes dois tratamentos mostraram-se capazes de retornar os valores normais para CAT após exposição ao agente estressor, não ocorrendo diferença estatística na atividade enzimática do grupo controle negativo e o pré-tratado com FAcOEt ou rutina.

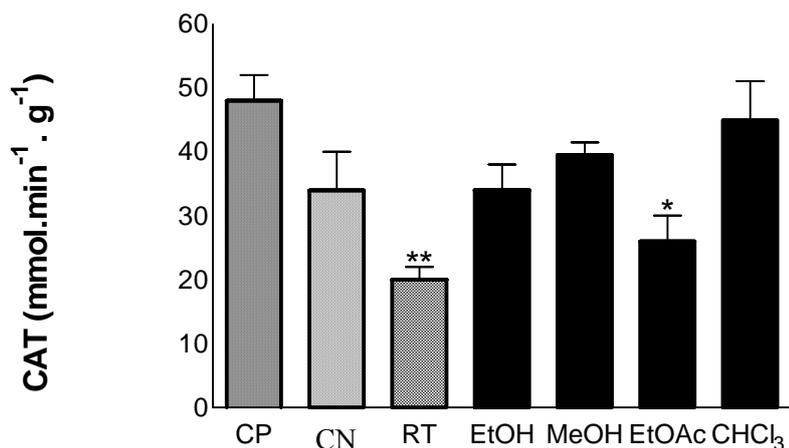


Figura 10 - Atividade enzimática da CAT (mmol de H₂O₂ consumido min⁻¹.g⁻¹) em fígados de camundongos Balb-c expostos ao CCl₄ e tratados com extrato e frações obtidas de *A. tenella*: EEtOH, FMeOH, FAcEt e FCHCl₃. Grupo controle positivo (CP) tratado somente com CCl₄ (0,5 mL\100g) e grupo controle negativo (CN) tratado com PBS. Todos os valores foram expressos como média ± EPM, n = 6. (**) e (*) representam diferença estatística $P < 0,01$ e $P < 0,05$ em relação a CP.

5.5. Enzima Superóxido Dismutase

A atividade da SOD foi avaliada segundo a capacidade de catalisação da reação entre o ânion superóxido e prótons resultando em peróxido de hidrogênio. Os pré-tratamentos com FMeOH e EEtOH causaram significativa redução ($P < 0,01$ e $P < 0,05$) na atividade desta enzima (Figura 11). Não houve diferença estatística entre os animais pré-tratados com rutina e aqueles pré-tratados com FMeOH e EEtOH.

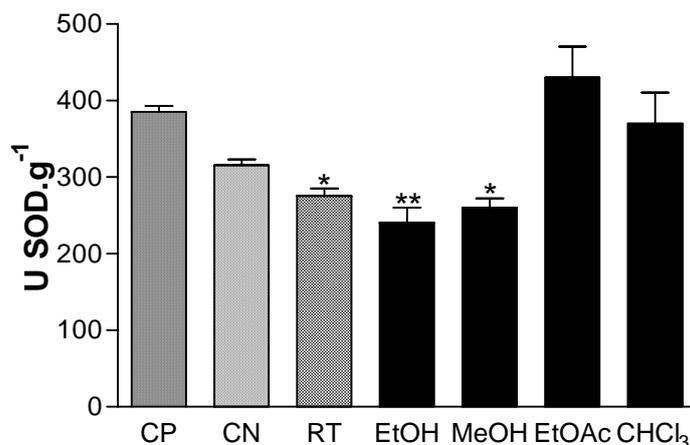


Figura 11 - Atividade da SOD (U SOD.g⁻¹) em fígados de camundongos Balb-c expostos ao CCl₄ e tratados com extrato e frações obtidas de *A. tenella*: EEtOH, FMeOH, FAcEt e FCHCl₃. Grupo controle positivo (CP) tratado somente com CCl₄ (0,5 mL\100 g) e grupo controle negativo tratado com PBS. Todos os valores foram expressos como média ± EPM, n = 6. (**) e (*) representam diferença estatística $P < 0,01$ e $P < 0,05$ em relação a CP.

5.6. Avaliação do dano ao DNA – Teste Cometa

Na avaliação dos danos causados ao DNA pelo Teste Cometa, as células afetadas pela presença excessiva de ER foram quantificadas e classificadas segundo as classes de danos previamente descritas. A resposta das frações analisadas foi semelhante, havendo um predomínio de células classificadas como Classe 1 em todas as frações analisadas, inclusive no padrão utilizado no ensaio (rutina) (Tabela 9). Uma maior quantidade de células classificadas nas Classes 2 e 3 foram observadas, tanto no tratamento com EEtOH quanto com a FMeOH, em comparação com o padrão rotina, onde se observaram raros casos de células com dano Classe 2 e a não existência de células classificadas como Classe 3.

Tabela 9. Porcentagem de distribuição dos cometas em diferentes classes analisados em sangue total de camundongos não tratados (controle negativo, CN), tratados com 0,5 mL / 100 g de CCl₄ (controle positivo, CP), pré-tratados com EEtOH e FMeOH, (150,0 mg/kg) e rotina (6,0 mg/kg).

	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
CN	75 %	25 %	0 %	0 %	0 %
CP	7 %	76 %	17 %	0 %	0 %
EEtOH	31 %	38 %	20 %	9 %	2 %
FMeOH	29 %	35 %	25 %	8 %	3 %
Rutina	36 %	56 %	8 %	0 %	0 %

Por outro lado, como pode ser observado na figura 12, somente o pré-tratamento dos camundongos com a rotina foi capaz de proteger efetivamente o DNA do ataque oxidativo dos radicais livres.

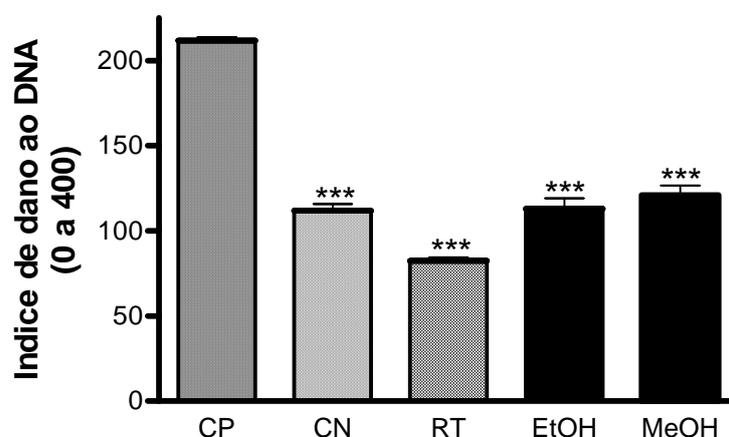


Figura 12. Frequência das diferentes classes de dano de cometas observados em células sanguíneas de camundongos Balb-c expostos ao CCl₄ e tratados com extrato e frações obtidas de *A. tenella*: EEtOH e FMeOH. Grupo controle positivo (CP) tratado somente com CCl₄ (0,5 mL/100 g) e controle negativo (CN) tratado com PBS. Todos os valores foram expressos como média ± EPM, n = 6. (***) representa diferença estatística $P < 0,001$ em relação ao CP.

5.7. Potencial Antioxidante Total do Plasma

Os resultados obtidos neste ensaio abrangem um “poder antioxidante total do plasma” das frações, englobando vários parâmetros enzimáticos e não enzimáticos de defesa antioxidante presentes no plasma. Seguindo a mesma tendência, o FRAP demonstrou que o pré-tratamento com FMeOH, apresentou um maior poder antioxidante, seguida de EEtOH, sem diferença significativa entre elas. Também é importante observar que houve diferença estatística entre estas frações e o pré-tratamento com a rutina.

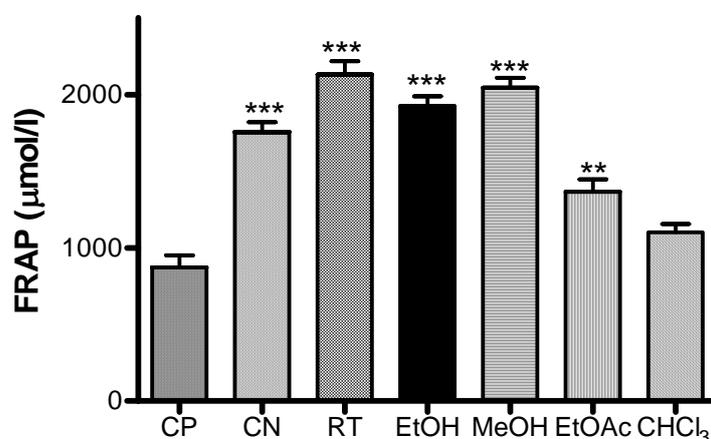


Figura 13 - Avaliação do “poder antioxidante total do plasma” (FRAP) no plasma de camundongos Balb-c expostos ao CCl₄ e tratados com extrato e frações obtidas de *A. tenella*: EEtOH, FMeOH, FAcOEt e FCHCl₃. Grupo controle positivo (CP) tratado somente com CCl₄ (0,5 mL/100 g) e grupo controle negativo tratado com PBS. Todos os valores foram expressos como média ± EPM, n = 6. (***) e (**) representam diferença estatística $P < 0,001$ e $P < 0,01$ em relação ao CP.

6. Atividade Antiedematogênica

6.1. Indução de Edema de Pata por Carragenina

O ensaio para avaliação de formação de edema de pata induzido por carragenina, proposta por Sughisita (1981), foi realizado com a fração de melhor atividade antioxidante nos ensaios previamente realizados. A fração EEtOH demonstrou também uma capacidade antiinflamatória discreta, mas significativa, frente aos controles e padrões estabelecidos, sendo capaz de inibir o processo inflamatório gerado pela carragenina, principalmente durante o período de 2 horas, quando comparada ao grupo controle, equivalendo-se ao mesmo após o período de 4 horas ($\Delta GC = 0,016 \pm 0,003$ e $\Delta GT = 0,025 \pm 0,003$), conforme gráfico abaixo.

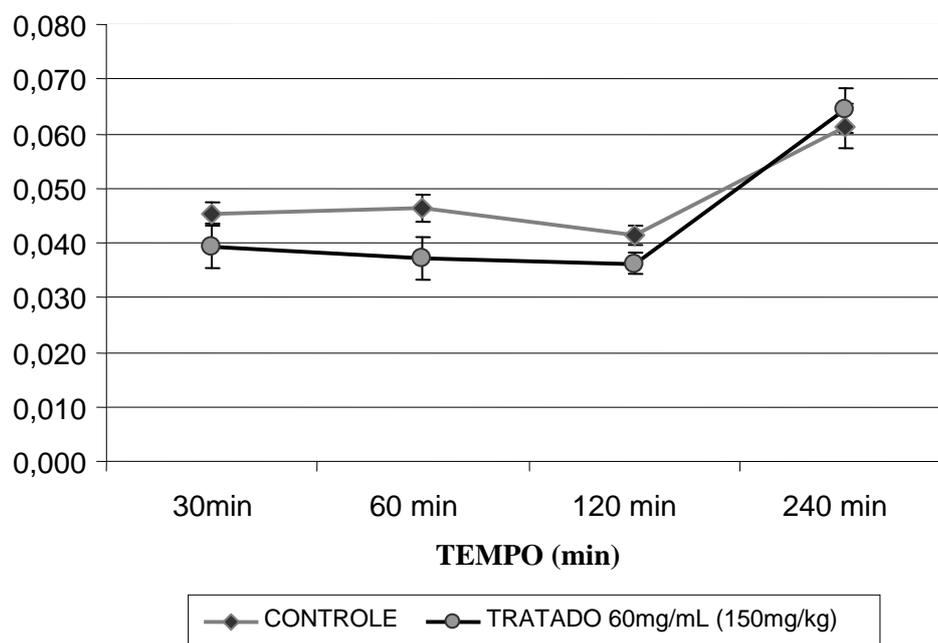


Figura 14 - Grupo de animais (n=6), tratados via oral com solução PBS ou EEtOH, 1 hora antes da administração via intraplantar de PBS nos controles negativos (CN) e do agente flogístico carragenina nos controles positivos (CP), no intervalo de tempo de 30 a 240 min. Todos os valores foram expressos como média \pm EPM referentes à variação do edema.

7. Discussão

7.1. Ensaio Antioxidantes *in vitro*

O ensaio envolvendo a captação do radical DPPH tem sido uma ferramenta muito utilizada para triagem de substâncias com potencial antioxidante. A capacidade “scavenger” para radicais DPPH, exercida por compostos fenólicos já está bem descrita na literatura (HEIM et al., 2002; ACKER et al., 1996). O trabalho publicado por Tang et al. (2004), pesquisou extratos de 33 plantas medicinais chinesas, contendo compostos fenólicos, e todos apresentaram efeito “scavenger” para o radical DPPH. Trabalho semelhante foi realizado por Leung e Shui (2002) em Singapura, onde foi analisada a atividade antioxidante de 27 espécies vegetais encontradas nos mercados públicos da cidade, também tendo sido caracterizada a atividade antioxidante de extratos ricos em flavonóides pelo método do DPPH. Inicialmente, no presente estudo, os extratos e frações da *A. tenella* foram avaliados com respeito à atividade antioxidante pela mesma metodologia. Corroborando os dados já relatados na literatura, onde EEtOH e FMeOH são relatados como as mais ricas em compostos fenólicos,

apresentaram a maior capacidade de captação do radical livre DPPH (Tabela 2), entretanto apresentaram CE₅₀ superior aos obtidos com a rutina e quercetina.

O radical hidroxila é considerado a ERO mais reativa em sistemas biológicos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989). A combinação extremamente rápida do $\cdot\text{OH}$ com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirma sua alta reatividade. Assim, dependendo do sítio de geração deste radical, sua ação oxidante pode levar à inativação ou mutação do DNA; inativação de várias proteínas (enzimas e membrana celular), ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (-SS) e iniciação da oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares (lipoperoxidação). A formação e monitoramento dos radicais hidroxilas proposto por Halliwell and Gutteridge (1986) é uma das metodologias mais citadas na literatura para a avaliação deste radical livre em produtos naturais. Este método baseia-se na oxidação da desoxirribose provocada por radicais hidroxilas, produzidos pela reação de peróxido de hidrogênio com o ferro (Reação de Fenton e Haber-Weiss). O ensaio da capacidade “scavenger” para $\text{HO}\cdot$ complementa o ensaio anterior por ser este uma molécula mais ligada aos processos fisiopatológicos, mimetizando uma situação real no organismo.

Tabata e colaboradores (2008), utilizando o método de oxidação da desoxirribose demonstraram atividade antioxidante de folhas de *Mallotus japonicus* pelo “scavenger” de $\cdot\text{OH}$, tendo obtidos resultados similares aos aqui descritos, onde as frações avaliadas superaram a capacidade antioxidante de compostos isolados como a rutina e quercetina (Tabela 3). Em outro estudo, Tanaka e colaboradores (2003), demonstraram que a atividade “scavenger” para $\text{O}_2\cdot^-$ cresce proporcionalmente ao número de hidroxilas fenólicas na molécula. Outros autores observaram também que suas amostras inibiram a redução do NBT pelo $\text{O}_2\cdot^-$, sugerindo que diversos flavonóides e compostos fenólicos são considerados antioxidantes, não somente pela capacidade de capturar ERO, mas também por inibir a enzima xantina oxidase (COS et al., 2000). Seguindo na mesma direção dos resultados obtidos por Schuldt et al. (2004), avaliando o potencial antioxidante de compostos fenólicos extraídos de *Cuphea carthagenensis* sobre a enzima xantina oxidase, o presente estudo demonstrou uma maior capacidade “scavenger” para $\text{O}_2\cdot^-$ de EEtOH e FMeOH, sendo que esta última foi significativamente mais efetiva que a rutina e o extrato bruto etanólico (Tabela 4). Dados semelhantes também foram obtidos por Souza et al. (2007) com frações extraídas de *Alternanthera maritima* em que os extratos superaram o flavonóide padrão, rutina, na sua capacidade “scavenger” do anion superóxido.

A peroxidação de ácidos graxos insaturados nas membranas lipídicas é um processo conhecido como peroxidação lipídica. Este processo promove grave alteração da membrana celular, causando perda da fluidez, alteração da função secretora e dos gradientes iônicos transmembrana. Além disso, tem sido observada perda da seletividade na troca iônica, com liberação do conteúdo de organelas, levando à formação de produtos citotóxicos e até a morte celular. Muitas evidências vêm comprovando a proteção conferida por substâncias antioxidantes contra o ataque aos ácidos graxo poli-insaturados presentes nas membranas plasmáticas, pelas espécies reativas do oxigênio, indicando ser esse um dos possíveis mecanismos responsáveis pelas lesões teciduais (MEAGHER e FITZGERALD, 2000).

Um dos principais ensaios que avalia o dano causado pela peroxidação lipídica é o TBARS, onde o malondialdeído (MDA), que é um produto de lipoperoxidação *in vivo*, reage com o ácido tiobarbitúrico e forma um derivado que pode ser estimado espectrofotometricamente.

Compostos fenólicos, dentre eles os flavonóides, estão diretamente relacionados com a eficácia na proteção contra a lipoperoxidação de membrana, e, conseqüentemente, na sua atividade antioxidante (BARREIRA et al., 2008). Confirmando esta observação e também os dados obtidos com os ensaios de “scavenger” dos radicais hidroxila, DPPH e ânion superóxido, FMeOH e EEtOH de *A. tenella* (Tabela 7) conferiram maior proteção contra a lipoperoxidação. Mais uma vez, é importante notar que estas amostras foram aquelas que apresentaram maior concentração de compostos fenólicos (Tabela 8).

A quantificação do teor de fenóis totais presentes em cada amostra sugere a relação entre os resultados obtidos nos ensaios antioxidantes realizados e a presença de compostos polifenólicos. As amostras com maior quantidade de fenóis são EEtOH e FMeOH, justamente as que apresentaram melhor desempenho geral na bateria de ensaios antioxidantes realizados *in vitro*. Rice-Evans et al. (1996), Aquino et al. (2001) e Cao, Sofic e Pryor (1997) demonstraram a existência dessa relação entre compostos polifenólicos e atividade antioxidante em frações extraídas de plantas, frutas e sementes.

De maneira geral a atividade antioxidante de extratos de plantas medicinais está relacionada com a presença de compostos fenólicos. A presença de substituintes nos anéis diferencia as respostas de grupos de compostos e determinam a capacidade doadora de elétrons (antioxidante). Compostos fenólicos, como os flavonóides, podem prevenir danos causados pelas ER por diversos mecanismos (CAO, SOFIC e PRYOR, 1997), um destes é a ação “scavenger” direta sobre as ER (HANASAKI et al., 1994). Os flavonóides são oxidados pelos radicais livres, resultando em um radical mais estável e menos reativo (ESPOSITO et

al., 2002). O potencial scavenger para radicais livres dos flavonóides é devido à sua estrutura molecular, especificamente às hidroxilas presentes nos três anéis (A, B e C) que compõe a estrutura dos mesmos (Figura 1) (BORS et al., 1990; RICE-EVANS et al., 1996). Além disso, a atividade seqüestradora de elétrons também depende da natureza do radical e seu mecanismo de ação específico (EDENHARDER e GRÜNHAGE, 2003).

Entretanto, segundo outros autores, apesar do número de hidroxilas ligadas ao anel aromático e suas posições serem, provavelmente, os fatores mais importante com respeito à atividade antioxidante, não seria o único fator responsável por esta atividade, tendo ainda fatores como a capacidade quelante de metais dependente de sua estrutura tridimensional e ainda a estabilização eletrônica oriunda dos anéis benzênicos (SROKA e CISOWSKI, 2003).

Czinner e colaboradores (2000), verificaram que compostos fenólicos de extratos de *Helichrysum arenarium*, ricos em quercetina e derivados, entre eles a rutina, glicosídeo da quercetina, possuem a capacidade de capturar o radical $\bullet\text{OH}$. Robak e Gryglewski (1988) também verificaram que os flavonóides preenchem todos os requisitos estruturais de um antioxidante. Sua eficácia na proteção à citotoxicidade gerada por H_2O_2 também foi demonstrada por Gao et al. (2001). A utilização de rutina e quercetina como padrões para os ensaios, decorrem de sua atividade antioxidante bem estabelecida na literatura, e por fazerem parte da composição fitoquímica da *A. tenella* (SALVADOR et al., 2006). Dall'Acqua e Innocenti (2004) também utilizaram estas substâncias como padrão para avaliar a atividade antioxidante de extratos de *Chaerophyllum hirsutum*.

Devido a sua baixa solubilidade em meio aquoso, a quercetina foi utilizada como padrão somente nos ensaios *in vitro* que utilizam etanol como diluente (AZUMA et al., 2002). Os ensaios *in vivo* com a quercetina diluída em meio hidroalcoólico 10% não apresentaram atividade significativa justamente por sua baixa solubilidade no meio utilizado. Para se obter uma solubilidade adequada, seria necessária uma solução 50% etanol:água, tornado-se inviável, por sua toxicidade, uma avaliação de atividade biológica *in vivo*, nos modelos utilizados neste trabalho (AZUMA et al., 2002).

7.2. Ensaios Antioxidantes *in vivo*

As células possuem diversos mecanismos de defesa contra os ataques de ER, dentre eles as enzimas endógenas e moléculas antioxidantes da dieta. A alteração nas defesas antioxidantes representa um mecanismo de defesa celular para combater a toxicidade das

ERO e que tem sido muito usado em vários estudos para determinar a capacidade protetora antioxidante de compostos diversos (WILHELM FILHO, 1996).

Em condições fisiológicas, ER são geradas constantemente pelas células por várias enzimas oxidases e pelo processo de respiração mitocondrial. O peróxido de hidrogênio facilmente se difunde pelos meios intra e extracelular, sendo capaz de modular múltiplos processos celulares (proliferação, transdução de sinais, expressão gênica, dano ao DNA, apoptose e necrose) (STONE e YANG, 2006; AGARWAL, GUPTA e SHARMA, 2005). O estresse oxidativo é gerado por um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, em favor dos oxidantes, podendo causar dano tecidual. Esse estresse, associado com condições de inflamação crônica, pode ter efeitos deletérios mediados pela habilidade das ER em induzir morte celular em diferentes tipos celulares (AGARWAL, GUPTA e SHARMA, 2005; IBORRA et al., 2005).

O modelo de indução de estresse oxidativo por CCl₄ e seus efeitos hepatotóxicos já foram extensivamente documentados na literatura (OHTA et al., 2000) e é utilizado para caracterizar a peroxidação de lipídios e a oxidação de proteínas, geralmente responsáveis pela hepatotoxicidade deste composto (OZTURK et al., 2003). Alguns autores relatam um efeito nefrotóxico do CCl₄ também associado à geração de ER (OZTURK et al., 2003; SHEWEITA, et al., 2001). O mecanismo pelo qual o CCl₄ induz a hepatotoxicidade é resultante da ativação de CCl₄ através do sistema microsomal do citocromo P₄₅₀ no retículo endoplasmático dos hepatócitos, em que os radicais triclorometila ($\cdot\text{CCl}_3$) e o peroxi-triclorometila ($\cdot\text{O}_2\text{CCl}_3$) são as formas iniciadoras da peroxidação lipídica por CCl₄ (RECKNAGEL et al., 1989). Entretanto, alguns autores também atribuem a hepatotoxicidade à formação aumentada de $\cdot\text{OH}$ na ausência e/ou inibição da enzima CAT (WANG, S. et al., 1998). Segundo Ahamed e colaboradores (2000), o CCl₄ pode induzir hipertrofia hepática, necrose dos hepatócitos e acúmulo de triacilglicerol, diminuindo o conteúdo de GSH, aumentando a lipoperoxidação, danificando a membrana, deprimindo a síntese de proteínas e a atividade de várias enzimas.

O fígado é o principal órgão de biotransformação, o que leva a uma maior geração de ER, tendo como consequência a elevação das defesas antioxidantes, tornando-se mais atuantes no fígado do que em outros órgãos (AHMAD et al., 1992). Os ensaios realizados com o extrato e frações da *A. tenella* utilizando o modelo do CCl₄ demonstrou evidente capacidade de proteção a lipoperoxidação contra esses danos, das amostras EEtOH e FMeOH (Figura 8), evitando a propagação dos danos causados à membrana pela ação das ER, semelhantes aos obtidos pela rotina. Wang, D. et al. (2008) e Céspedes et al. (2008) obtiveram resultados

semelhantes com avaliação antioxidante em camundongos com extrato fenólico de *Aristotelia chilensis*.

Geralmente o aumento da atividade da CAT sugere ação oxidativa excessiva não contida pela atividade antioxidante não enzimática que tenha favorecido a formação de peróxido de hidrogênio, potencializando a produção do radical hidroxila via reação de Haber-Weiss. Também esta elevada atividade da CAT poderá ser um indicativo de uma forte geração de $O_2^{\bullet-}$ que foi dismutado pela SOD, uma vez que esse radical livre de oxigênio pode ser facilmente convertido em peróxido de hidrogênio na presença de metais de transição como o ferro e cobre. A redução da atividade da SOD observada no presente trabalho (Figura 11) sugere que os animais pré-tratados com EEtOH e FMeOH neutralizaram uma situação de estresse oxidativo provavelmente com uma redução na geração de $O_2^{\bullet-}$, já que a dismutação desse ânion foi inibida pela diminuição da atividade da enzima. Seria importante notar que comportamento semelhante foi obtido com a rotina. Por outro lado, a atividade da CAT induzida pelo tratamento com CCl_4 (Figura 10) não foi significativamente alterada pelo pré-tratamento com extrato e frações da *A. tenella*, não ocorrendo também uma redução na atividade da SOD sugerindo, portanto, a existência de outros mecanismos de geração de ânions superóxido, estando em desacordo com os resultados obtidos no estudo de Ozturk et al. (2002), onde o CCl_4 induziu dano renal e provocou um aumento significativo da atividade da SOD e CAT. Portanto, os dados obtidos sugerem a presença de outros mecanismos de neutralização dos radicais livres além daqueles enzimáticos, como por exemplo, a neutralização direta destes radicais pela glutatona reduzida.

A GSH é um tripeptídeo (L-glutamil-L-cisteinil-glicina) de baixo peso molecular contendo um grupo tiol (-SH) livre em sua molécula, sendo o tiol mais abundante no meio intracelular. A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro, oxigênio hiperbárico, radiação e luz ultravioleta. Ela atua também na transdução de sinais, expressão gênica, apoptose, interage com óxido nítrico e, principalmente, como substrato para enzimas envolvidas na detoxificação de moléculas deletérias, como os xenobióticos, através da Glutaciona Transferase (GT) e na reação catalisada pela Glutaciona Peroxidase (GPx) convertendo peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos em água e seu respectivo álcool. Durante esse processo, a GSH sofre oxidação, tornando-se Glutaciona Oxidada (GSSG). Esta GSSG é então reciclada em GSH pela enzima Glutaciona Redutase (GR) com participação de uma molécula de α -Nicotinamida

Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH) (GALLAGHER e DI GIULIO, 1992). Os resultados no presente estudo (Figura 7) não demonstraram nenhuma diferença estatística entre as frações analisadas em comparação com o grupo positivo (100% de oxidação). Estes resultados podem ser associados ao elevado consumo da GSH quando do processo de neutralização do metabólito reativo gerado pela biotransformação do CCL₄ via GT e GPx. Como não foi possível sustentar os processos oxidativos somente com a ação enzimática, se fez necessário o consumo excessivo das reservas de GSH. Outra explicação pode ser dada através de uma possível inativação enzimática para CAT por parte das amostras utilizadas. Como a avaliação das enzimas envolvidas diretamente com o consumo de GSH (GT e GPx), não fazia parte deste trabalho, uma avaliação quanto às causas deste consumo expressivo de GSH por metodologias envolvendo tais enzimas poderia elucidar melhor esse processo.

A utilização de grupos carbonila inseridos em seqüências protéicas é um confiável marcador de danos oxidativos (LEVINE et al., 1990; LEVINE, 2002). Dados existentes na literatura sugerem que o CCL₄ induz carbonilação às proteínas de hepatócitos de camundongos (SHEWEITA, ABD EL-GABAR e BASTAWY, 2001). Por outro lado, diversos processos patológicos e fisiológicos (doenças pulmonares, artrites, processos de envelhecimento), apresentam oxidações catalisadas por metais que têm sido identificadas como uma modificação covalente de proteínas. Uma das principais alterações estruturais causadas pelo estresse oxidativo é a carbonilação protéica (DANDONA et al., 2001). Durante o processo oxidativo, alguns grupos carbonila são introduzidos em proteínas e esta modificação pode ser avaliada por métodos específicos (FAGAN et al., 1999; NYSTRÖM, 2005). Não somente as ER, mas também a lipoperoxidação, redução de açúcares e a exposição ao ácido hipocloroso podem causar dano oxidativo às proteínas. Os principais pontos de ataque dos grupos carbonila às moléculas protéicas são os aminoácidos lisina, prolina ou treonina. Muitos estudos vêm fortalecendo evidências de que a determinação de proteínas carboniladas possa ser um útil marcador biológico para estresse oxidativo (BANAN et al., 1996; PANTKE et al., 1999 e LIM et al., 2002). Os resultados obtidos com o pré-tratamento dos animais com os extratos da *A. tenella* indicaram uma importante capacidade protetora contra a carbonilação protéica de todas as frações avaliadas, que não diferiram significativamente do pré-tratamento com a rutina (Figura 9). Desta vez, a fração FAcoEt demonstrou atividade melhor do que FMeOH e EEtOH, indicando, talvez, uma extração específica de compostos correlacionados com atividade pontual na prevenção da carbonilação protéica, por mecanismos outros que não somente o seqüestro de radicais livres.

Com o avanço nas técnicas de detecção de danos causados ao DNA, com o trabalho de Rydberg e Johanson (1978), foi desenvolvido um sistema utilizando agarose em meio alcalino, que posteriormente seria melhorado com um aumento de sensibilidade de detecção com técnicas eletroforéticas em microgel (Ostling e Johanson, 1984) onde foram então detectadas quebras de dupla fita e fita simples em meio neutro e alcalino, respectivamente (ROJAS et al., 1999; ZWART et al., 1999). Esta metodologia, comumente conhecida como teste cometa, foi utilizada no presente trabalho para caracterização de um possível efeito protetor dos extratos e frações da *A. tenella* contra os danos oxidativos ao DNA induzidos pelo CCl₄. Os resultados obtidos demonstraram claramente que o pré-tratamento com o extrato e frações desta planta que possuem maior conteúdo de compostos fenólicos (EEtOH e FMeOH) causaram uma redução (47 e 49%) de danos oxidativos ao DNA (Figura 12). Entretanto, seria importante notar que a proteção obtida com a rutina foi significativamente maior que aquelas obtidas com as frações da *A. tenella*. Uma co-relação entre dano causado ao DNA e desenvolvimento de patologias como distúrbios cardiovasculares, câncer, processos inflamatórios e doenças neuro-degenerativas, tendo como intermediário comum na maioria dos processos, as ER, estão bem estabelecidas na literatura (SAIKO et al., 2008; WANG, 2008; CHUMARK et al., 2007).

Englobando todo o processo de avaliação de atividade antioxidante *in vivo*, o ensaio de FRAP vem demonstrar o maior potencial antioxidante total de FMeOH e EEtOH frente às demais frações, e correlaciona a capacidade de proteção à lipoperoxidação de membrana, aos danos ao DNA, à carbonilação protéica, a atividade das enzimas CAT e SOD apesar da depleção das reservas de GSH observada.

7.3. Ensaio Antiinflamatórios

Uma avaliação conjunta da atividade antiinflamatória determinada pelos ensaios de edema de pata e capacidade “scavenger” para •NO se faz necessária para uma melhor interpretação e discussão dos resultados obtidos, justificando-se o fato de ambos os parâmetros estarem intimamente ligados quando da ocorrência do processo *in situ*.

O processo inflamatório caracteriza-se pela sua complexidade e dinamismo, é mediado por multifatores e tem a participação de eventos celulares e humorais interdependentes, podendo manifestar-se tanto na duração quanto na intensidade da resposta inflamatória, conforme o tipo de dano ou estímulo nocivo. Basicamente, a reação inflamatória aguda caracteriza-se por dilatação arterial, aumento de permeabilidade vascular, acúmulo de

leucócitos e dor. A inflamação pode ser desencadeada por agentes físicos, químicos ou biológicos, que provocam distúrbios na membrana celular ocasionando a ativação da fosfolipase A2 e liberação de ácido araquidônico e seus metabólitos (KUMMER e COELHO, 2002). Essas enzimas têm potente atividade citotóxica e destroem células vizinhas, liberando assim novas enzimas. Dentre os diversos modelos para avaliação de atividade antiinflamatória *in vivo* existentes (pleurisia, indução de edema de pata, bolsa de ar no dorso, artrite e implantes de esponjas embebidas com agentes irritantes) o escolhido para esse trabalho foi o modelo de edema de pata induzido por carragenina (SEDGWICK e WILLOUGHBY, 1989). Este ensaio é um modelo clássico de formação de edema e hiperalgesia frequentemente utilizado no desenvolvimento de novos fármacos antiinflamatórios (GUAY et al., 2004). O método foi descrito pela primeira vez em ratos por Winter et al. (1962), apresentando um perfil semelhante de atividade em camundongos (SUGHISHITA et al., 1981). Durante a primeira hora, o edema gerado é mediado por histamina e serotonina e, após este período, o aumento da permeabilidade vascular é mantida por cininas como a bradicinina. Em torno de duas horas os processos edematogênicos são mediados pelas prostaglandinas, associados à migração de leucócitos à região inflamada (DI ROSA e WILLOUGHBY, 1971). Em condições fisiológicas, o relaxamento vascular ocorre quando receptores da membrana das células endoteliais são ativados por estímulos solúveis (incluindo-se acetilcolina, bradicinina, adenosina difosfato, substância P, serotonina e outros) ou quando há um aumento do atrito exercido pelas células circulantes sobre a camada endotelial (shear-stress), levando à ativação da c-NOS presente nestas células e à consequente produção de $\bullet\text{NO}$ (DUSSE, VIEIRA e CARVALHO, 2003; BUSCONI e MICHEL, 1993).

No presente trabalho foi utilizado o modelo de edema de pata e somente a amostra de *A. tenella* que apresentou melhor atividade antioxidante foi escolhida para a execução deste ensaio, a saber, EEtOH. Os resultados obtidos demonstraram atividade antiinflamatória estatisticamente significativa nas primeiras duas horas de observação, havendo uma redução no volume de edema e consequentemente, do processo inflamatório (Figura 14). Nas horas consecutivas, o processo inflamatório da pata tratada igualou-se ao da pata controle, não havendo diferença estatística significativa entre elas. Essa resposta em tempo curto poderia ser parcialmente atribuída à capacidade “scavenger” do radical $\bullet\text{NO}$, onde ficou demonstrada uma evidente atividade do EEtOH em evitar a formação de NO_3/NO_2 a partir do substrato por ação da enzima bacteriana nitrato redutase (NR), e uma ação discreta por parte de FMeOH, invertendo o quadro estabelecido pelos ensaios antioxidantes, onde a fração FMeOH, demonstrou ser mais efetiva (Tabela 5). Para uma confirmação mais precisa da existência de

atividade antiinflamatória relativa ao extrato e frações de *A. tenella*, são necessárias maiores análises em diferentes modelos, como os citados anteriormente, uma vez que são cumulativos os relatos de uso popular desta espécie com finalidade antiinflamatória e os ensaios de edema de pata induzido pela carragenina e da capacidade “scavenger” para \bullet NO obtiveram resultados promissores, ainda que discretos (SALVADOR, 2004; CAI, SUN e CORKE, 2005; SALVADOR, 2002; GORINSTEIN et al., 1991; SIQUEIRA, 1987).

Podemos afirmar então, que a fração FMeOH e o extrato EEtOH são capazes de oferecer uma proteção efetiva contra um estresse oxidativo gerado artificialmente através de CCl_4 , atuando no seqüestro de ERO e ERN, assim como na redução dos danos causados aos lipídios de membrana e ao DNA, auxiliando na normalização das defesas constituintes como as enzimas SOD e a CAT e os níveis de GSH. A atividade antiinflamatória foi observada no EEtOH e, mais discretamente na FMeOH, sendo necessários melhores estudos para confirmar se a planta apresenta potencial terapêutico para o tratamento da inflamação.

8. Conclusões

A partir dos resultados obtidos com o presente trabalho foi possível concluir que:

1. O extrato bruto etanólico e frações de *Alternanthera tenella* Colla avaliados apresentaram conteúdo de compostos fenólicos, particularmente o extrato bruto etanólico e a fração metanólica;
2. O potencial antioxidante *in vitro* do extrato bruto etanólico e da fração metanólica da *Alternanthera tenella* Colla pode ser relacionado com a presença de compostos fenólicos, em especial os flavonóides glicosilados, como a rutina, extraídos pelos solventes etanol e metanol nas respectivas amostras EEtOH e FMeOH;
3. O extrato bruto etanólico e a fração metanólica da *Alternanthera tenella* Colla foram capazes de reduzir de forma estatisticamente significativa a lipoperoxidação de membranas, a carbonilação de proteínas, o dano oxidativo ao DNA e elevação do potencial redutor do plasma em animais expostos ao agente estressor tetracloreto de carbono;
4. O ensaio do edema de pata induzido pela carragenina mostrou que o extrato bruto etanólico de *Alternanthera tenella* Colla, causou redução do edema da pata;
5. Os compostos fenólicos com atividade antioxidante (como flavonóides p.ex.) presentes nos extratos avaliados da *Alternanthera tenella* Colla contribuem para a atividade antiinflamatória da planta;

9. Perspectivas

Os ensaios *in vitro* com o extrato EEtOH e frações FMeOH, FAcoEt e FCHCl₃, forneceram informações suficientes para uma triagem prévia de frações com atividade biológica e para a utilização racional de animais para estudos *in vivo*, como previsto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais. Com base nos resultados obtidos através das técnicas experimentais para avaliação de atividades biológicas, podemos afirmar a existência de atividade antioxidante e antiinflamatória, nos modelos experimentais *in vivo* utilizados, sendo ainda necessários maiores esforços em modelos diversos para a concreta comprovação de atividade antiinflamatória da planta *Alternanthera tenella* Colla. Sem dúvida as amostras a serem mais bem avaliadas são FMeOH e EEtOH, que demonstraram uma atividade consistente ao longo de todo o trabalho. Considerando a atividade antioxidante no fígado e sangue confirmada neste trabalho e o envolvimento das ERO na fisiopatologia da fibrose e cirrose, uma investigação da possível atividade hepatoprotetora seria um próximo passo promissor a ser avaliado, bem como seu mecanismo de ação. Os resultados são promissores e abrem a linha de pesquisa voltada aos parâmetros inflamatórios e oxidativos em modelos mais específicos como a cultura de células humanas, com a intenção de validar os dados obtidos em modelo animal, também neste modelo.

10. Referências Bibliográficas

ABAD, M.J.; BERMEJO, P.; VILLAR, A.; VALVERDE, S. Antiinflammatory activity of two flavonoids from *Tanace microphyllum*. **J. Nat. Prod.** v. 56, p. 1164, 1993.

ACKER, S. A. B. E.; BERG, D. J. V. D.; TROMP, M. N. J. L.; GRIFFIOEN, D. H.; BENNEKOM, W. P. V.; VIJGH, W. J. F. V. D.; BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonóides. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 3, p. 331-342, 1996.

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

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol.* v. 3, p. 28, 2005.

AGRAWAL, P. K. Carbon-13 NMR of Flavonoids. *Elsevier Science*, New York. 1989.

AHAMED, A.; TSURUMI, S.; OZAKI, M.; AMAKAWA, T. Chromosaponin I stimulates the sugar taste receptor cells of the blowfly, *Phormia regina* Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: *Molecular & Integrative Physiology*, v. 125, n. 3, p. 343-349, 2000.

AHMAD, M. S.; FAZAL, F.; RAHMAN, A.; HADI, S. M.; PARISH, J. H. Activities of flavonoids for the cleavage of DNA in the presence of Cu (II): Correlation with generation of active oxygen species. *Carcinogenesis.* v. 13, p. 605-608, 1992.

AKAIKE, T. Role of free radicals in viral pathogenesis and mutation. *Reviews in Medical Virology.* v.11, n.2, 87-101, 2001.

AQUINO, R.; MORELLI, S.; LAURO, M. R.; ABDO, S.; SAIJA, A.; TOMAINO, A. Phenolic constituents and antioxidant activity of an extract of *Anthurium versicolor* leaves. *J. Nat. Prod.* v. 64, p. 1019-1023, 2001.

AZUMA, K.; IPPOUSHI, K.; ITO, H.; HIGASHIO, H.; TERAU, J. Combination of Lipids and Emulsifiers Enhances the Absorption of Orally Administered Quercetin in Rats. *J. Agric. Food Chem.* v. 50, p. 1706-1712, 2002.

BABIOR, B. M. NADPH oxidase. v. 16, n.1, p. 42-47, 2004.

BABIOR, B. M. NADPH oxidase: an update. *Blood*, v. 93, p. 1464-1476, 1999.

BANAN, A.; WANG, J. Y.; MCCORMACK, S. A.,.; JOHNSON, L. R. Relationship between polyamines actin distribution and gastric mucosal ulcer healing in rats. *Am J Physiol.*v. 271, p. G893-G903, 1996.

BARREIRA, J. C. M.; FERREIRA, I. C. F. R.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; PEREIRA, J. A. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food Chemistry*, v. 107, n. 3, p. 1106-1113, 2008.

BARTHOLOMEW, B. A rapid method for the assay of nitrate in urine using the nitrate reductase enzyme of *Escherichia coli*. *Fd Chem. Toxic.* v. 22, n. 7, p. 541-543, 1984.

BATOT, G.; MARTEL, C.; CAPDEVILLE, N.; WIENTJES, F.; MOREL, F. Characterization of neutrophil NADPH oxidase activity reconstituted in a cell-free assay using specific monoclonal antibodies raised against cytochrome b558. *Eur J Biochem*, v. 234, p. 208-215, 1995.

BENZIE, I. F. F.; STRAINS, J. J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymol*, v. 299, p. 15-27, 1999.

BENZIE, I. F. F.; STRAINS, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, v. 239, p. 70-76, 1996.

BERLIN, B. On the making of a comparative ethnobiology. In: *Ethnobiological Classification: principles of categorization of plants and animals in traditional societies*, Princeton, Princeton University, 1992.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. *The journal of Laboratory and Clinical Medicine*. v. 61, p. 882-890, 1963.

BIRD, R. P.; DRAPER, A. H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. *Meth. Enzymol.*, v. 90, p. 105-110, 1984.

BLACK, P. H.; GARBUTT, L. D. Stress, inflammation and cardiovascular disease. *J Psychosom Res.* v. 52, n.1, p.1-23, 2002.

BLUNDEN, G.; YANG, M.; JANICSÁK, G.; MÁTHÉ, I. CARABOT-CUERVO, A. *Biochem. Syst. Ecol.* v. 27, p. 87, 1999.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunol.* v. 2, p. 907-916, 2001.

BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* p.186343-186355, 1990.

BOURGEY, L. 'La relation du médecin au malade dans les écrits de l'école de Cos'. In: La Collection hippocratique et son rôle dans la médecine: Colloque Hippocratique de Strarsbourg. Lieden. *E. J. Brill*, p. 209-27, 1975.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie.* v. 28, p. 25-30, 1995.

BROCHADO, C. O.; ALMEIDA, A. P.; BARRETO, B. P.; COSTA, L. P.; RIBEIRO, L. S.; PEREIRA, R. L. C.; KOATZ, V. L. G.; COSTA, S. S. Flavonol Robinobiosides and Rutinosides from *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) and their Effects on Lymphocyte Proliferation *in vitro*. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 14, n. 3, p. 449-451, 2003.

BRUHN, J. G.; HOLMSTEDT, B. "Ethnopharmacology, objectives, principles and perspectives". In: Natural products as medicinal agents. Stuttgart: Hippokrates, 1982.

BURY, N.; GROSELL, M. Iron acquisition by teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology.* v. 135, n. 2, p. 97-105, 2003.

BUSCONI, L.; MICHEL, T. Endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, v. 268, n. 12, p. 8410-8413, 1993.

CADET, J. ; DELATOUR, T. ; DOUKI, T. ; GASPARUTTO, D. ; POUGET, J. P.; RAVANAT, J. L. ; SAUVAIGO, S. : Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res.* v. 424, p. 9-21, 1999.

CAI, Y.; SUN, M.; CORKE, H. HPLC haracterization of betalains from plants in the Amaranthaceae. *J Chromatogr Sci.* v. 43 p. 454-60, 2005.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRYOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 22, n. 5, p. 749-760, 1997.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais, conceitos sobre modificação para otimização da atividade. *Quím Nova.* v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CÉSPEDES, C. L.; EL-HAFIDI, M.; PAVON, N.; ALARCON, J. Antioxidant and cardioprotective activities of phenolic extracts from fruits of Chilean blackberry *Aristotelia chilensis* (Elaeocarpaceae), Maqui. *Food Chemistry*, v. 107, n. 2, p. 820-829, 2008.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L. T.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, D. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. v. 99, n. 21, p. 13926-13931, 2002.

CHATGILIALOGLU, C.; O'NEILL, P. Free radicals associated with DNA damage. *Experimental Gerontology*. v. 36, n. 9, p.1459-1471, 2001.

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

CHUMARK, P.; KHUNAWAT, P.; SANVARINDA, Y.; PHORNCHIRASILP, S.; MORALES, N. P.; PHIVTHONG-NGAM, L.; RATANACHAMNONG, P.; SRISAWAT, S.; PONGRAPEEPORN, K. S.;. The *in vitro* and *ex vivo* antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. *J Ethnopharmacol*. 2007.

CITES World - Official Newsletter of the Parties. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. n. 17, 2006.

COMALADA, M., CAMUESCO, D., SIERRA, S., BALLESTER, I., XAUS, J., GALVEZ, J., ZARZUELO, A. *In vivo* quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-kappaB pathway. *Eur. J. Immunol*. v. 35, p. 584-592, 2005.

COS, P.; YING, L.; CALOMME, M.; HU, J. P.; CIMANGA, K.; VAN POEL, B.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D. V. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as antioxidant and pro-oxidant compounds. In: RAHMAN. *Studies Nat. Prod. Chem.*, p. 307-341, 2000.

COWARD, L., BARNES, N., SETCHELL, K., BARNES, S. Genistein, Daidzein, and their b-glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *J. Agric. Food Chem*. v. 41, p. 1961-1967, 1993.

CZINNER, E.; HAGYMÁSI, K.; BLÁZOVICS, A.; KÉRY, Á.; SZÖKE, É.; LEMBERKOVICS, É. *In vitro* antioxidant properties of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 73, n. 3, p. 437-443, 2000.

DALL'ACQUA, S.; INNOCENTI, G. Antioxidant compounds from *Chaerophyllum hirsutum* extracts. *Fitoterapia*. v. 75, n. 6, p. 592-595, 2004.

DANDONA, P.; MOHANTY, P.; GHANIM, H.; ALJADA, A.; BROWNE, R.; HAMOUDA, W.; PRABHALA, A.; AFZAL, A.; GARG, R. The Suppressive Effect of Dietary Restriction and Weight Loss in the Obese on the Generation of Reactive Oxygen Species by Leukocytes, Lipid Peroxidation, and Protein Carbonylation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. v. 86, n. 1, p. 355-362, 2001.

DI ROSA, M.; WILLOUGHBY, D. A. Screens for anti-inflammatory drugs. *J Pharm Pharmacol*. v. 23, n. 4, p. 297-298, 1971.

DOGRA, J. V. V.; OJBRA, O. P. *Comp. Physiol. Ecol*. v. 3, p. 5, 1978.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

EBBELL, B., The Papyrus Ebers. The Greatest Egyptian Medical Document. Oxford University Press, London, 1937.

EDENHARDER, R.; GRÜNHAGE, D. Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by *tert*-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. v. 540, n. 1, p. 1-18, 2003.

ESPOSITO, E.; ROTILIO, D.; DI MATTEO, V.; DI GIULIO, C.; CACCHIO, M.; ALGERI, S. A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiol Aging*. v. 23, n. 5, p. 719-735, 2002.

FAGAN, J. M.; SLECZKA, B. G.; SOHAR, I. Quantitation of oxidative damage to tissue proteins. *Int J Biochem Cell Biol*.v. 31, p. 751-757, 1999.

FERREIRA, E. O.; SALVADOR, M. J.; PRAL, E. M. F.; ALFIERI, S. C.; ITO, I. Y.; DIAS, D. A: A New Heptasubstituted (*E*)-Aurone Glucoside and Other Aromatic Compounds of *Gomphrena agrestis* with Biological Activity. *Z. Naturforsch*. v. 59, p. 499-505, 2004.

FERREIRA, S. H. (Organizador); Medicamentos a Partir de Plantas Mediciniais no Brasil. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 1998.

FORMICA J.V.; W. REGELSON, Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids, *Food Chem Toxicol* . p. 1061–1080, 1995.

FOTSIS T., M.S. PEPPER, E. AKATAS, S. BREIT, S. RASKU; H. ADLERCREUTZ, Flavonoids, dietary derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis, *Cancer Res*. p. 2916–2921, 1997.

- FRIDOVICH I: Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* v. 44, p. 147-159, 1975.
- FUKUMOTO, L. R.; MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds, *J. Agric. Food Chem.* v. 48, p. 3597–3604, 2000.
- GALLAGHER, E. P.; DI GIULIO, R. T. A comparison of glutathione-dependent enzymes in liver, gills and posterior kidney of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Comp. biochem physiol. C, Comp. pharmacol. toxicol.* v. 102, n. 3, p. 543-547, 1992.
- GALLEGOS OLEA R. S.; SILVEIRA, L. M. S.; OLIVEIRA, A. V.; MENDES, A. M. C.; CARVALHO, L. C. F. Atividade antibacteriana de frações polares de partes aéreas de *Alternanthera tenella Colla* (Amaranthaceae). XVI Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Recife, PE, Brasil, Abstract 124, 2000.
- GARDNER, P. R.; FRIDOVICH, I. Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* 6-phosphogluconate dehydratase. *J Biol Chem.* v. 266, p.1478-1483, 1991 (a).
- GARDNER, P. R.; FRIDOVICH, I. Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* aconitase. *J. Biol Chem.* v. 266, p.19328-19333, 1991 (b).
- GILGUN-SHERKI, Y.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the bloodbrain barrier. *Neuropharmacol.* v. 40, p. 959-975, 2001.
- GOODSELL, D. S. Rcsb Protein Data Bank, 2004.
- GORINSTEIN, S.; NUE, I. A.; ARRUDA, P. Alcohol-Soluble and Total Proteins from Amaranth Seeds and Their Comparison with Other Cereals. *J. Agric. Food Chem.* v. 39, p. 848-850, 1991.
- GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.
- GRIFFITH, O. W. Biological and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Rad. Biol. Med.* v. 27, p. 922-935, 1999.
- GUAY, J.; BATEMAN, K.; GORDON, R.; MANCINI, J.; RIENDEAU, D. Carrageenan-induced Paw Edema in Rat Elicits a Predominant Prostaglandin E2 (PGE2) Response in the Central Nervous System Associated with the Induction of Microsomal PGE2 Synthase-1. *J. Biol.Chem.* v. 279, p. 24866–24872, 2004.

GUERRA, R. N. M.; PEREIRA, H. A. W.; SILVEIRA, L. M. S.; OLEA, R. S. G. Immunomodulatory properties of *Alternanthera tenella* Colla aqueous extracts in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 36, p. 1215-1219, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free radicals in biology and medicine*. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press; 1989.

HALLIWELL, B. How to characterise a biological antioxidant. *Free Radic. Res. Commun.* v. 9, p.1-32,1990.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. *The Lancet*, v. 355, n. 9210, p.1179-1180, 2000.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Rad. Biol. Med.*, 3a ed. New York: Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys*; v. 246, p. 501-14, 1986.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The desoxyribose assay: both for free hydroxyl radical and for. *Chemistry Letters*, 1521-124, 1991.

HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med.* v.16, n. 6, p. 845-50, 1994.

HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J. Flavone and flavonol glycosides. In: HARBORNE, J.B., MABRY, H. (Eds.), *The Flavonoids: Advances in Research*. Chapman and Hall, London, p. 261–309, 1982.

HAUSLADEN, A.; FRIDOVICH, I. Superoxide and peroxy-nitrite inactivate aconitases, but nitric oxide does not. *J Biol Chem* v. 269, p. 29405-29408, 1994.

HEBBEL, R. P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. *J Lab Clin Med*, v. 107, p. 401-405, 1986.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.13, p.572-584, 2002.

HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W. G.; STOREY, K. B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylene orange complex formation, *Free Radical Biology & Medicine*, v. 19, n. 3, p. 271-280, 1995.

HERTOG, M. G. L.; HOLLMAN, P. C. H.; VENEMA, D. P. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *J. Agric. Food Chem.* v. 40, p. 1591–1598, 1992.

HIROYUKI, H.; KATSUHIKO, T.; YUKIYOSHI, T.; KENJI, M.; TAKESHI, K. Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry* . v. 48, p. 125–129, 1998.

IBORRA, A.; PALACIO, J. R.; MARTINEZ, P. Oxidative stress and autoimmune response in the infertile woman. *Chem Immunol Allergy*. v. 88, p. 150-162, 2005.

INAL, M. E.; KAHRAMAN, A. The protective effect of flavonol quercetina against ultraviolet A induced oxidative stress in rats. *Toxicology* v. 154, p. 21–29, 2000.

JENKINS, R. R. Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Med.* v. 5, n. 3, p. 156-70, 1988.

KANADASWAMI, C., LEE, L.T., LEE, P.P., HWANG, J.J., KE, F.C., HUANG, Y.T., LEE, M.T. The antitumor activities of flavonoids. *In Vivo* v. 19, p. 895–909, 2005.

KEMERTELIDZE, E.P., TSITSISHVILI, V.G., ALANIYA, M.D., SAGAREISHVILI, T.G. Structure–function analysis of the radioprotective and antioxidant activity of flavonoids. *Chem. Nat. Comp.* v. 36, p. 54–59, 2000.

KEREM, Z., BRAVDO, B.A., SHOSEYOV, O., TUGENDHAFT, Y. Rapid liquid chromatography–ultraviolet determination of organic acids and phenolic compounds in red wine and must. *J. Chromatogr.* v. 1052, p. 211–215, 2004.

KLEBANOFF, S. J. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann Intern Med.* v. 93, p. 480, 1980.

KLEBANOFF, S. J.; CLARK, R. A. *The Neutrophil: Function and Clinical Disorders*, ed. North-Holland, New York, 1978.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Cyclooxygenase-2 inhibitors nonsteroid anti-inflammatory drugs. *Rev. Bras. Anesthesiol.* v. 52, n. 4, p. 498-512, 2002.

LAGROTA, M. H. C.; WIGGS, M. D.; MIRANDA, M. M. F. S.; CAMARA, F. P.; COUCEIRO, J. N. S. S.; COSTA, S. S. Inhibitory activity of extracts of *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) against *Herpes simplex* virus. *Phytotherapy Research*, v. 8, p. 358-361, 1994.

LEE, E.S.; LEE, H.E.; SHIN, J.Y.; YOON, S.; MOON, J.O. The flavonoid quercetin inhibits dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* v. 55, p. 1169–1174, 2003.

LEUNG, L. P.; SHUI, G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chemistry*. v.76, n.1, p.69-75, 2002.

LEVINE, R. L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Rad. Biol. Med.*, v. 32, n. 9, p. 790-796, 2002.

LEVINE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C.N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A. G.; AHN, B.W.; SHALTIEL. S.; STADTMAN, E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* v. 186, p. 464-478, 1990.

LIM, P. S.; CHENG, Y. M.; WEI, Y. H. Increase in oxidative damage to lipids and proteins in skeletal muscle of uremic patients. *Free Radic Res.*v. 36, p. 295-301, 2002.

LIN, S. C.; LIN, Y. H.; SHYUU, S. J.; LIN, C. C. Hepatoprotective effects of Taiwan folk medicine - *Alternanthera sessilis* on liver damage induced by various hepatotoxins. *Phytotherapy Research*, v. 8, p. 391-398, 1994.

LUNARDI, F.; GUZELA, M.; RODRIGUES, A.; CORREA, R.; EGER-MANGRICH, I.; STEINDEL, M.; GRISARD, E.; ASSREUY, J.; CALIXTO, J.; SANTOS, A.R. Trypanocidal and leishmanicidal properties of substitution-containing chalcones. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 47, n. 4, p. 1449–1451, 2003.

LUNARDI, F.; LIMA, J. H. C.; ASSREUY, J. Comparative study of respiratory burst induced by phorbol ester and zymosan in human granulocytes. *Clinical Biochemistry*. v. 39, n. 1, p. 78-85, 2006.

MACEDO, A. F.; BARBOSA, N. C.; ESQUIBEL, M. A.; SOUZA, M. N.; CECHINEL-FILHO, V. Pharmacological and phytochemical studies of callus culture extracts from *Alternanthera brasiliana*. *Pharmazie*, v. 54, p. 776-777, 1999.

MARKAM, K. R.; GEIGER, H. ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuterodimethylsulfoxide. In: *The Flavonoids* (HARBONE, J. B., ed.). CHAPMAN e HALL, London, p. 450-453, 1994.

MARTINÉZ FLORES, S.; GALLEGO, J. G.; CULEBRAS, J. M.; TUÑÓN, M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes, *Nutr. Hosp.* v. XVII, n. 6, p. 271-278, 2002.

MATSUBARA, Y.; KUMAMOTO, H.; YONEMOTO, H.; IIZUKA, Y.; MURAKAMI, T.; OKAMOTO, K.; MIYATE, H.; YOKOI, K. Structure and hypotensive effect of flavonoid glycosides in citrus fruits peels. *Kinki Daigaku Igaku Zasshi.* v. 9, p. 61-71, 1984.

MAYES, P.A. Biologic oxidation. In MURRAY, R.K., GRANNER, D.K., MAYES, P.A., RODWELL, V.W. (eds): Harper's biochemistry. San Mateo, Appleton & Lange; 105-111, 1990.

MEAGHER, E. A.; FITZGERALD, G. A. Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. *Free Rad Biol Med.*v. 28, p. 1745-1750, 2000.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. *Annu Rev Biochem*; v. 52, p. 711-60. 1983.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screenig of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.

MILLER, A. L. Antioxidant Flavonoids: Structure, Function and Clinical Usage. **Alternative Medicine Review**. v. 1, n. 2, p. 103-111, 1996.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J. Biol. Chem.**, v. 247, p. 3170-3175, 1972.

MORAES, V.L.G.; SANTOS, L. F. M.; CASTRO, S. B.; LOUREIRO, L. H.; LIMA, A. O.; SOUZA, M. L. M.; YIEN, L. M. K.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S. S. Inhibition of lymphocyte activation by extracts and fractions of *Kalanchoe*, *Alternanthera*, *Paullinia* and *Mikania* species. **Phytomedicine**, v. 1, p. 199-204, 1994.

MOREL, I.; LESCOAT, G.; COGREL, P.; SERGENT, O.; PASDELOUP, N.; BRISSOT, P.; CILLARD, P.; CILLARD, J. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetina and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. **Biochem Pharmacol.** v. 7, n. 45(1), p. 13-19, 1993.

MsCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. Na enzyme function for erythrocuprein (hemocuprein). **J. Biol. Chem.**v. 244, p. 6049-6055, 1969.

NATHAN, C.; SHILOH, M. U. Reactive Oxygen and Nitrogen Intermediates in the Relationship between Mammalian Hosts and Microbial Pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 16, p. 8841-8848, 2000.

NYSTRÖM, T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *The EMBO Journal*. v. 24, p. 1311–1317, 2005.

OHKAWA, H. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, v. 95, p. 351-358, 1979.

OHTA, Y.; KONGO, M.; SASAKI, E.; NISHIDA, K.; ISHIGURO, I. Therapeutic effect of melatonin on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *J. Pineal Res.*, v. 28, p. 119-126, 2000.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. v. 30, n. 123, p. 291-298, 1984.

OZTURK, B.; APAYDIN, S.; GOLDELIB, E.; INCEB, I.; ZEYBEKA, U. *Hypericum triquetrifolium Turra.* extract exhibits antiinflammatory activity in the rat. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 80, n. 1, p. 207-209, 2002.

OZTURK, F.; UCAR, M.; OZTURK, I. C.; VARDI, N.; BATCIOGLU, K. Carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity and protective effect of betaine in sprague-dawley rats. *Urology*, v. 62, n. 2, p. 353-356, 2003.

PANTKE, U.; VOLK, T.; SCHMUTZLER, M.; KOX, W. J.; SITTE, N.; GRUNE, T. Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery. *Free Radic Biol Med*. v. 27, p.1080-1086, 1999.

PATTERSON, G. W.; XU, S.; SALT, T. A. *Phytochemistry*. v. 30, p. 523, 1991.

PENDERS, A.; KAPUNDU, M.; DELAUDE, C.; *Bull. Soc. Chem. Belg.* v. 101, p. 227, 1992.

PESKIN, A. V.; WINTERBOURN, C. C. "A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1)". *Clinica Chimica Acta*. v. 293, p. 157-166, 2000.

PIATTELLI, M.; MINALE, L. *Phytochemistry* v. 3, p. 547, 1964.

PRYOR, W.A. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. *Annu. Rev. Physiol.* v. 48, p. 657-667, 1986.

RECKNAGEL, R. O.; GLENDE, E. A.; DOLAK, J. A.; WALLER, R. E. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol. Ther.*, v. 43, p. 139–154. 1989.

REGO, T. J. A. Fitogeografia das Plantas Medicinais no Maranhão. 2nd ed. EDUFMA, São Luís, MA, Brasil, p. 108-109, 1995.

RESNICK, A. Z.; PACKER, K. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* v. 233, p. 357-363, 1994.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.* v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RICHARDSON, M. *Biochem. Syst. Ecol.* v. 6, p. 283, 1978.

ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R. J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.*, v. 37, n. 5, p. 837-841, 1988.

ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J. Chromat. B.* v. 722, p. 225-254, 1999.

RUIZ, R. E. L.; FUSCO, M. R.; RAPISARDA, M.; SOSA, A.; RUIZ, S. O. *Acta Farm. Bonaerense.* v. 10, n. 25, 1991.

RYDBERG, B.; JOHANSON, K. J. In: DNA Repair Mechanisms, HANAWALT, P. C.; FRIEDBERG, E.C.; FOX, C.F. eds., *Academic Press*, New York, p. 465, 1978.

SAENZ, R.; JOSE, A.; NASSAR, C.; MARYSSI, A. *Rev. Biol. Trop.* v. 18, p. 129, 1970.

SAHU, S. C.; GRAY, G. C. Interactions of flavonoids, trace metals, and oxygen: nuclear DNA damage and lipid peroxidation induced by myricetin. *Cancer Lett.* v. 15, n. 70, p.73-79, 1993.

SAIKO, P.; SZAKMARY, A.; JAEGER, W.; SZEKERES, T..Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, v. 658, n. 1, p. 68-94, 2008.

SALVADOR, M. J.; DIAS, D. A. Flavone C-glycosides from *Alternanthera maritima* (Mart.) St. Hil. (Amaranthaceae). *Biochemical Systematics and Ecology.* v. 32, p. 107-110, 2004.

SALVADOR, M. J.; FERREIRA, E. O.; PRAL, E. M. F.; ALFIERI, S. C.; ALBUQUERQUE, S.; ITO, I. Y.;DIAS, D. A. Bioactivity of crude extracts and some constituents of *Blutaparon portulacoides* (Amaranthaceae). *Phytomedicine.* v. 9, p. 566-571, 2002.

SALVADOR, M.J.; ZUCCHI, O.L.A.D.; CANDIDO, R.C.; ITO, I.Y.; DIAS, D.A. In vitro Antimicrobial Activity of Crude Extracts and Isolated Constituents of *Alternanthera marítima*. *Internacional Journal of Pharmacognosy*. v. 42, n. 2, p. 138-148, 2004.

SANOKO R.; SPERANZA G.; PIZZA C.; DE TOMMASI N..Triterpene saponins from *Alternanthera repens*. *Phytochemistry*. v. 51, n. 8, p. 1043-1047, 1999.

SASCENA, H. O. *Loydia*. v. 38, p. 346, 1975.

SCHULDT, E. Z.; FARIAS, M. R.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; CKLESS, K. Comparative study of radical scavenger activities of crude extract and fractions from *Cuphea carthagenensis* leaves. *Phytomedicine*, v. 11, p. 523-529, 2004.

SCOTT, M.D., LUBIN, B.H., ZUO, L., KUYPERS, F.A. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. *J Lab Clin Med*. v. 118, p. 7-16. 1991.

SEDGWICK, A.D.; WILLOUGHBY, D. A. Animal models for testing drugs on inflammatory and hypersensitivity reactions. *In Textbook of Immunopharmacology*. M.M. DALE AND J.C. FOREMAN, editors. *Blackwell Scientific Publications Ltd.*, London. p. 253-261, 1989.

SEIFRIED, H. Oxidative stress and antioxidants: a link to disease and prevention?. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 18, n. 3, p. 168-171, 2007.

SENTHIL, K.; ARANGANATHAN, S.; NALINI, N. *Clinica Chimica Acta*. v. 339, n. 1, p. 27-32, 2004.

SEPE, S. M.; CLARK, R. A.Oxidant membrane injury by the neutrophil myeloperoxidase system. II. Injury by stimulated neutrophils and protection by lipid-soluble antioxidants. *The Journal of Immunology*, v. 134, n. 3, p. 1896-1901, 1985.

SGARBI, M. W. M.; SILVA JUNIOR, B. A.; HUNGRIA NETO, J. S. Importância da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) no prognóstico dos pacientes politraumatizados. *Rev Bras Ortop*. v. 41, n. 1-2, p.1-6, 2006.

SHARAF, M.; EL-ANSARI, M. A.; SALEH, N. A. M. Flavonoids of four *Cleome* and three *Capparis* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 25, n. 2, p. 161-166, 1997.

SHEWEITA, S.A.; ABD EL-GABAR, M.; BASTAWY, M. Carbon tetrachloride changes the activity of cytochrome P450 system in the liver of male rats: role of antioxidants. *Toxicology*, v. 169, p. 83-92, 2001.

SHIN, J.S., KIM, K.S., KIM, M.B., JEONG, J.H., KIM, B.K., 1999. Synthesis and hypoglycemic effect of chrysin derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9, 869–874.

SIES H., “Glutathione and its role in cellular function”, *Free Rad. Biol. Med.* v. 27, p. 916-921, 1999.

SILVA, M.M. et al.; *Free Radical Research*; 2002; 36(11); 1219-1227.

SILVEIRA, L. M. S. Caracterização fitoquímica, biológica e mineral de partes aéreas de *Alternanthera tenella Colla* (Amaranthaceae). Master's thesis, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brazil, 2000.

SIQUEIRA, J. C : Importância alimentícia e medicinal das Amaranthaceae do Brasil. *Acta Biologica Leopoldensia.* v. 9, p.5-22, 1987.

SIQUEIRA, J. C.; GUIMARÃES, E. F. *Rodriguésia.* v. 36, p. 21, 1984.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods enzymol.* v. 299, p. 152-178, 1999.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V. L. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *Am. J. Enol. Vitic.* v. 28, n. 1, p. 49-55, 1977.

SOUZA, J.G.; TOMEI, R.R.; KANASHIRO, A.; KABEYA, L.M.; AZZOLINI, A.E.; DIAS, D.A.; SALVADOR, M.J.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Ethanolic crude extract and flavonoids isolated from *Alternanthera maritima*: neutrophil chemiluminescence inhibition and free radical scavenging activity. *Z Naturforsch.*; v. 62, p. 339-47, 2007.

SOUZA, M.M.; KERN, P.; FLORIANI, A.E.O.; CECHINEL-FILHO, V. Analgesic properties of a hydroalcoholic extract obtained from *Alternanthera brasiliana*. *Phytotherapy Research.* 12, n.4, p 279-281, 1998.

SROKA, Z.; CISOWSKI, W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem. Toxicol.*, v. 41. p. 753-758, 2003.

STEINBECK, M. J.; KHAN, A. U.; KARNOVSKY, M. J. Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap *J. Biol. Chem.*, v. 267, n. 19, p. 13425-13433, 1992.

STOESSEL J, KALFF G. Proceedings: Advantages and contraindications of controlled hypotension in orthopedic operations. *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* v. 112, n. 4, p. 951-954, 1974.

STONE, J. R.; YANG, S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal.* v. 8, p. 243-270, 2006.

SUGHISITA, E.; AMAGAYA, S.; OGIHARA, Y. Anti-inflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. *J Pharmaco-Biodyn.* v. 4, p. 565-75, 1981.

TABATA, H.; KATSUBE, T.; TSUMA, T.; OHTA, Y.; IMAWAKA, N.; UTSUMI, T. Isolation and evaluation of the radical-scavenging activity of the antioxidants in the leaves of an edible plant, *Mallotus japonicus*. *Food Chemistry*, v. 109, n. 1, p. 64-71, 2008.

TANAKA, N.; NISHIKAWA, K.; ISHIMARU, K. Antioxidant capacity of extracts and constituents in *Cornus capitata* adventitious roots. *J. Agric. Food Chem.*, v. 51, p. 5906-5910, 2003.

TANG, S.Y.; WHITEMAN, M.; PENG, Z.F.; JENNER, A.; YONG, E.L.; HALLIWELL, B. Characterization of antioxidant and antiglycation properties and isolation of active ingredients from traditional Chinese medicines. *Free Radical Biology & Medicine. Free Radic Biol Med.* v. 15, n. 36(12), p.1575-87, 2004.

TIETZE, F. "Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues", *Anal. Biochem.* v. 27, p. 502-522, 1969.

TOWNSEND, C. C. Entry for *Alternanthera tenella* Colla [family AMARANTHACEAE] FZ, v. 9 n. 1, p. 28, 1988.

VIEGAS, C. J. R.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Quím. Nova.* v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WANG, D.; WANG, L.; ZHU, F.; ZHU, J.; CHEN, X. D.; ZOU, L.; SAITO, M.; LI, L. In vitro and in vivo studies on the antioxidant activities of the aqueous extracts of Douchi (a traditional Chinese salt-fermented soybean food). *Food Chemistry*, v. 107, n. 4, p. 1421-1428, 2008.

WANG, S. Y.; BOWMAN, L.; DING, M. Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (*Rubus* sp.) and promotes antiproliferation of human cancer cells. *Food Chemistry.* v. 107, n.3, p. 1261-1269, 2008.

WATSON, D. G.; OLIVEIRA, E. J. Solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry determination of kaempferol and quercetin in human urine after consumption of Ginkgo biloba tablets. *J. Chromatogr.* v. 723, p. 203–210, 1999.

WILHELM-FILHO, D. Fish antioxidant defenses--a comparative approach. *Braz J Med Biol Res.* v. 29, n. 12, p. 1735-1742, 1996.

WINK, D. A.; NIMS, R. W.; SAAVEDRA, J. E.; UTERMAHLEN, W. E. JR.; FORD, P. C. The Fenton oxidation mechanism: reactivities of biologically relevant substrates with two oxidizing intermediates differ from those predicted for the hydroxyl radical. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 91, p. 6604-6608, 1994.

WINTER, C.A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med.* v. 111, p. 544-547, 1962.

WINTERBOURN, C. C.; VAN DEN BERG, J. J. M.; ROITMAN, E.; KUYPERS, F. A. Chlorohydrin formation from unsaturated fatty acids reacted with hypochlorous acid. *Arch. biochem. biophys.* v. 296, n. 2, p. 547-555, 1992.

WISEMAN, S. A.; VAN DEN BOOMB, M. A. P.; FOUWA, N. J.; WASSINKB, M. G.; KAMPB, J. A. F. D.; TIJBURGA, L. B. M. Comparison of the effects of dietary vitamin E on in vivo and in vitro parameters of lipid peroxidation in the rabbit. *Free Radical Biology and Medicine.* v.19, n. 5, p. 617-626, 1995.

YA-QIN, S., TOSHIO, F., HIROSHI, S., WEN-JIN, C., PEI-QUAN, Y., FENG-PENG, W., TARO, N. Cytotoxic flavonoids with isoprenoids groups from *Morus mongolica*. *J. Nat. Prod.* v. 64, p. 181–188, 2001.

YU, B. P. Modulation of aging processes by dietary restriction. Boca Raton, Fla, CRC Press, 1994.

ZHOU, B.; BLASKÒ, G.; CORDELL, G.A. Alternanthin, A C-glycosylated flavonoid from *Alternanthera philoxeroides*. *Phytochemistry.* v. 27, n. 11, p. 3633-3636, 1988.

ZWART, L. L.; MEERMANA, J. H. N.; COMMANDEURA, J. N. M.; VERMEULENA, N. P. E. : Biomarkers of free radical damage Applications in experimental animals and in humans. **Free Radical Biology and Medicine.** v. 26, n. 1, p. 202-226, 1999.