



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

Eduardo Antonio Ferreira

**Avaliação do potencial antioxidante e
hipotrigliceridêmico de análogos sintéticos da
acetofenona**

**Florianópolis
2005**

Eduardo Antonio Ferreira

**Avaliação do potencial antioxidante e
hipotrigliceridêmico de análogos sintéticos da
acetofenona**

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: Profa. Dra. Rozangela Curi Pedrosa

**Florianópolis
2005**

“Sei que para tudo há uma razão. Talvez na hora não tenhamos o discernimento nem a percepção para compreendê-la, porém, com tempo e paciência, ela acaba por revelar”. – BRIAN WEISS.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir meus sonhos se transformarem realidade, por me transformar numa pessoa feliz e realizada.

À Profa. Dra. Rozangela Curi Pedrosa, pela oportunidade oferecida, pela orientação, preocupação, seriedade, competência, paciência e pelos ensinamentos que me possibilitaram realizar este trabalho.

Aos componentes da banca examinadora Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes, por suas considerações e sugestões sobre a relação estrutura-atividade dos compostos testados; Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho por sua disponibilidade na correção deste trabalho; e a Dra. Maria Helena Rossi pela disponibilidade na avaliação deste trabalho.

Aos amigos de laboratório e colegas de mestrado, pelo companheirismo e pelos momentos de descontração que tornaram os momentos de trabalho bem mais prazerosos.

Aos meus pais e meu irmão por respeitarem as minhas escolhas e sempre me apoiarem e incentivarem na realização de meus objetivos.

Especialmente a Eliana, minha adorável e eterna companheira, obrigado pelo amor, paciência e dedicação demonstrados nestes anos.

À todas as pessoas que contribuíram no desenvolvimento desse trabalho, os quais, direta ou indiretamente, participaram da minha formação como profissional e ser humano, e aos que acreditaram na minha capacidade, que torceram pela minha vitória e que ajudaram de alguma forma na conquista de mais um sonho. A todos vocês fica a minha mais profunda admiração e eterna gratidão.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\Delta_g$	Oxigênio singlete	ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
4-AA	4-Aminoacetofenona	EROs	Espécies reativas de oxigênio
ALT	Alanina aminotransferase	FOX	Oxidação do ferro pelo xilenol laranja
AST	Aspartato aminotransferase	Gala	Galacetofenona (2,3,4-trihidroxiacetofenona)
ATP	Adenosina trifosfato	GPx	Glutaciona peroxidase
BHT	Hidroxitolueno butilado	GR	Glutaciona redutase
CAT	Catalase	GSH	Glutaciona reduzida
CCl ₄	Tetracloroeto de carbono	GSSG	Glutaciona oxidada
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno	GST	Glutaciona S-transferase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais	2- HA	2- Hidroxiacetofenona
3,4-DCA	3,4-Dicloroacetofenona	HDL	Lipoproteína de alta densidade
2,6-DHA	2,6-Dihidroxiacetofenona	H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
DMSO	Dimetilsulfóxido	HO ₂ •	Radical hidroperoxil
DNA	Ácido desoxirribonucléico	HOBr	Ácido hipobromoso
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina	HOCl	Ácido hipocloroso
DPPH	1,1-difenil-2-picril hidrazina	ICAD	Inibidor da DNase ativada por caspase
DTNB	5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico	L•	Radical livre de ácido graxo centrado no carbono
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético	LDL	Lipoproteína de baixa densidade

LH	Ácido graxo	O ₂	Oxigênio molecular
LO [•]	Radical alcóxil	O ₂ ^{•-}	Radical ânion superóxido
LO ₂ [•]	Radical peróxil	O ₃	Ozônio
LOOH	Hidroperóxido de ácido graxo	[•] OH	Radical hidroxil
LOONO	Alquil peroxinitrito	ONOO ⁻	Peroxinitrito
LPO	Lipoperoxidação	ox-LDL	LDL oxidada
LMPA	Agarose de baixo ponto de fusão	PBS	Salina tamponada com fosfato
LPS	Lipopolissacarídeo	QM	Quilomícra
4-MA	4-Metoxiacetofenona	RL	Radical livre
MDA	Malondialdeído	RNA	Ácido ribonucléico
3-NA	3-Nitroacetofenona	SOD	Superóxido dismutase
4-NA	4-Nitroacetofenona	TBA	Ácido tiobarbitúrico
NADH	Nicotinamina adenina dinucleotídeo, forma reduzida	TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
NADPH	Nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida	t-BuOOH	tert-butilhidroperóxido
NBT	Nitrilo blue tetrazolium	TCA	Ácido tricloroacético
NMPA	Agarose de ponto de fusão normal	THA	Floroacetofenona (2,4,6-trihidroxiacetofenona)
NTA	Ácido nitrilo acético	TNF- α	Fator de necrose tumoral
NO [•]	Óxido nítrico	VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
NO ₂ [•]	Dióxido de nitrogênio	XO	Xantina oxidase

RESUMO

Ferreira, E. A. **Avaliação do potencial antioxidante e hipotrigliceridêmico de análogos sintéticos da acetofenona.** 2005. 120 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

A oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) através de agentes oxidantes, na forma de radicais livres, está correlacionada ao grau de evolução da aterosclerose. Neste sentido, o presente trabalho se propôs avaliar o potencial antioxidante e hipotrigliceridêmico de oito (8) análogos sintéticos da acetofenona, utilizando modelos *in vivo* e *in vitro*. A avaliação *in vitro* do potencial antioxidante foi investigada pelos métodos de captação do radical DPPH, O_2^{\bullet} e $\bullet OH$, além da lipoperoxidação. A avaliação *in vivo* do estresse oxidativo (fragmentação do DNA, lipoperoxidação de membranas e carbonilação de proteínas) e as defesas antioxidantes (concentração de GSH, atividades da CAT e GST) foi realizada em camundongos pré-tratados com os análogos THA e Gala e, posteriormente, expostos a CCl_4 . Com o intuito de avaliar o potencial hipotrigliceridêmico, foram utilizados modelos de hiperlipidemia induzida pela dieta hipercalórica de 30 dias em ratos e ensaios de inibição da absorção intestinal de triglicerídeos e da atividade da lipase intestinal em camundongos. Os análogos sintéticos da acetofenona apresentaram significativa atividade antioxidante *in vitro*, destacando-se a THA e Gala, pois apresentaram atividade "scavenger" de radicais DPPH, O_2^{\bullet} e $\bullet OH$ em concentrações muitas vezes menor ou similar à rutina, reconhecido agente antioxidante. O CCl_4 causou estresse oxidativo e dano celular no fígado dos camundongos, onde a rutina, THA e Gala, apresentaram importante atividade antioxidante na proteção tecidual através de diminuições de TBARS, FOX, dano ao DNA, oxidação protéica, além de diminuição da GSH e elevação da AST, CAT, GST e ALT (exceto THA). O efeito hipotrigliceridêmico foi verificado para THA, fazendo com que as concentrações séricas de triglicerídeos, fossem menores que no grupo controle, causando uma forte redução na absorção de triglicerídeos e uma forte inibição da atividade da lipase intestinal, após administração do azeite de oliva. Estes resultados demonstram que a THA e Gala apresentaram uma importante atividade antioxidante tanto *in vitro* como em *in vivo* e também manifestando um o efeito hipotrigliceridêmico da THA. Os dados obtidos nos permite concluir que a Gala e, particularmente, a THA, poderiam constituir moléculas protótipos para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças vasculares obstrutivas.

Palavras chaves: Antioxidantes, hipotrigliceridemia, acetofenonas, análogos sintéticos.

ABSTRACT

Ferreira, E. A. **Evaluation of the antioxidant and hypotriglyceridemic potential of synthetic analogues of acetophenone.** 2005. 120 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

The oxidation of low density lipoprotein (LDL) through oxidant agents in the form of free radicals is correlated with the degree of evolution of atherosclerosis disease. In this regard, the present work evaluated the antioxidant and hypotriglyceridemic potential of synthetic analogues of acetophenone using *in vitro* and *in vivo* models. The *in vitro* evaluation of the antioxidant potential was investigated through the scavenging of DPPH, $O_2^{\bullet-}$ and $\bullet OH$ radical, besides lipoperoxidation protection. The *in vivo* evaluation of oxidative stress (DNA fragmentation, membrane lipoperoxidation and carbonyl protein formation) and the antioxidants defenses (concentration of GSH dual activities of CAT and GST) was measured in pre-treated mice with THA and Gala and later exposed to CCl_4 . The hypotriglyceridemic potential was evaluate and in the gut through the model of induced hyperlipidemic with hypercaloric diet for 30 days, inhibition of triglycerid absorption e and lipase activity. The synthetic analogues of acetophenone significant *in vitro* antioxidant activity, mainly THA and Gala, able to "scavenge" DPPH, $O_2^{\bullet-}$ and $\bullet OH$ in concentrations, compared to rutin which is a well-known antioxidant agent. After oxidative stress and cellular damage induced by CCl_4 in mice liver, rutin, THA and Gala, promoted tecidual protection by decreasing levels of TBARS, FOX, DNA damage, protein oxidation and GSH and increasing of AST, CAT, GST and ALT activities (except THA). The hypotriglyceridemic potential was examined for THA, and serum triglyceride levels, were smaller than these of the control group which were associated with a strong decrease of triglyceride absorption and an important inhibition of intestinal lipase activity after the administration of olive oil. These results suggest that THA and Gala presented an important *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity and also presenting a hypotriglyceridemic effect for THA. The results showed that Gala, and especially THA, could be used as a prototype molecules in studies of new alternative therapeutic for vascular obstructive diseases.

Keys words: Antioxidant, hypotriglyceridemic, acetophenone, synthetic analogues.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio nas formas radicalares e não radicalares	2
Tabela 2. Pontuação e exemplos de classes de cometa visualizadas	28
Tabela 3. Composição e cronograma da dieta hipercalórica	33
Tabela 4. Avaliação da atividade antioxidante dos análogos sintéticos da acetofenona e rutina através da medida da capacidade “scavenger” do radical DPPH.	36
Tabela 5. Efeito dos análogos sintéticos da acetofenona e rutina sobre a atividade da xantina oxidase (XO).	37
Tabela 6. Avaliação da atividade antioxidante dos análogos sintéticos da acetofenona e rutina através da medida da capacidade “scavenger” do $O_2^{\bullet-}$	38
Tabela 7. Avaliação da atividade antioxidante dos análogos sintéticos da acetofenona e rutina através da medida da capacidade “scavenger” do $^{\bullet}OH$	39
Tabela 8. Avaliação da atividade antioxidante dos análogos sintéticos da acetofenona e rutina através da medida da proteção a lipoperoxidação em homogenato de fígado de rato avaliada em termos de TBARS.	40
Tabela 9. Porcentagem de distribuição dos cometas em diferentes classes analisados em sangue total de camundongos não tratados (controle negativo, CN), em tratados com CCl_4 (controle positivo, CP), pré-tratados com THA, pré-tratados com rutina, pré-tratados com Gala, e posteriormente, com CCl_4	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formação de EROs durante a redução do oxigênio até água.....	2
Figura 2. Reações de formação do $\cdot\text{OH}$	3
Figura 3. Vias de geração de EROs e mecanismo de defesa enzimática.	4
Figura 4. Representação esquemática das reações de iniciação e propagação da LPO.	9
Figura 5. Representação esquemática das reações de formação da floroacetofenona via síntese.....	15
Figura 6. Estrutura química da rutina.	17
Figura 7. Índice de peroxidação lipídica (TBARS; nmol/g) em fígados de camundongos não tratados (controle negativo, CN), tratados com CCl_4 (controle positivo, CP), pré-tratados com a THA, pré-tratados com rutina, pré-tratados com Gala, e posteriormente, tratados com CCl_4	42
Figura 8. Índice de hidroperóxido lipídico (FOX; CHPE/g) em fígados de camundongos não tratados (controle negativo, CN), tratados com CCl_4 (controle positivo, CP), pré-tratados com a THA, pré-tratados com rutina, pré-tratados com Gala, e posteriormente, tratados com CCl_4	43
Figura 9. Dano ao DNA em sangue total de camundongos não tratados (controle negativo, CN), tratados com CCl_4 (controle positivo, CP), pré-tratados com a THA, pré-tratados com rutina, pré-tratados com Gala, e posteriormente, tratados com CCl_4	45
Figura 10. Índice de carbonilação de proteínas (nmol/g) em fígados de camundongos não tratados (controle negativo, CN), tratados com CCl_4 (controle positivo, CP), pré-tratados com a THA, pré-tratados com rutina, pré-tratados com Gala, e posteriormente, tratados com CCl_4	46
Figura 11. Concentração de GSH hepática (mM) em fígados de camundongos não tratados (controle negativo, CN), tratados com CCl_4 (controle positivo, CP), pré-tratados com a THA, pré-tratados com rutina, pré-tratados com Gala, e posteriormente, tratados com CCl_4	47
Figura 12. Atividade da CAT ($\text{mmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) em fígados de camundongos não tratados (controle negativo, CN), tratados com CCl_4 (controle positivo, CP), pré-tratados com a THA, pré-tratados com rutina, pré-tratados com Gala, e posteriormente, tratados com CCl_4	48
Figura 13. Atividade da GST ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) em fígados de camundongos não tratados (controle negativo, CN), tratados com CCl_4 (controle positivo, CP), pré-tratados com a THA, pré-tratados com rutina, pré-tratados com Gala, e posteriormente, tratados com CCl_4	49

Figura 14. Atividade da AST (UI) em fígados de camundongos não tratados (controle negativo, CN), tratados com CCl ₄ (controle positivo, CP), pré-tratados com a THA, pré-tratados com rutina, pré-tratados com Gala, e posteriormente, tratados com CCl ₄	50
Figura 15. Atividade da ALT (UI) em fígados de camundongos não tratados (controle negativo, CN), tratados com CCl ₄ (controle positivo, CP), pré-tratados com a THA, pré-tratados com rutina, pré-tratados com Gala, e posteriormente, tratados com CCl ₄	51
Figura 16. Concentrações séricas de triglicérides (mg/dL) em ratos após 15 e 30 dias de tratamento com uma dieta hipercalórica (grupo1), dieta hipercalorica e a THA (grupo 2), dieta normal (grupo 3), dieta normal e THA (grupo 4).	52
Figura 17. Concentrações séricas de triglicérides (mg/dL) em camundongos tratados com azeite de oliva (PAO), sem tratamento com azeite de oliva (SAO), pré-tratados com a THA (TAO), pré-tratados com Xenical [®] (XAO); pré-tratados com Gala (GAO) e tratado com azeite de oliva após 30 min.	53
Figura 18. Atividade da lipase intestinal (UI) em camundongos tratados com azeite de oliva (PAO), sem tratamento com azeite de oliva (SAO), pré-tratados com a THA (TAO), pré-tratados com Xenical [®] (XAO), pré-tratados com Gala (GAO) e tratado com azeite de oliva após 30 min.	54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Radicais Livres	1
1.2 Defesas Antioxidantes	5
1.3 Estresse Oxidativo	7
1.4 Aterosclerose e Hiperlipidemia	9
1.5 Compostos Fenólicos	14
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3 METODOLOGIA	20
3.1 Materiais e reagentes	20
3.2 Animais	20
3.3 Ensaio Biológicos	21
3.3.1 Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	21
3.3.1.1 Determinação da atividade “scavenger” do radical DPPH	21
3.3.1.2 Formação e monitoramento da atividade “scavenger” do $O_2^{\bullet-}$	22
3.3.1.3 Formação e monitoramento da atividade “scavenger” do $\bullet OH$	23
3.3.1.4 Proteção à peroxidação lipídica	24
3.3.2 Atividade Antioxidante <i>in vivo</i> e indicadores de estresse oxidativo	25
3.3.2.1 Protocolo experimental	25
3.3.2.2 Avaliação do dano à membrana celular	25
3.3.2.2.1 Medida da lipoperoxidação pelo TBARS	25
3.3.2.2.2 Medida da lipoperoxidação pelo FOX (oxidação do ferro pelo xilenol laranja)	26
3.3.2.3 Avaliação do dano ao DNA	27
3.3.2.4 Avaliação do dano oxidativo a proteínas	29
3.3.2.5 Conteúdo de Glutathione reduzida	30
3.3.2.6 Atividade da enzima catalase	30
3.3.2.7 Atividade da enzima glutathione S-transferase	31
3.3.3 Marcadores de função hepática	31
3.3.3.1 Determinação da atividade da enzima AST	31

3.3.3.2	Determinação da atividade da enzima ALT	32
3.3.4	Atividade Hipotrigliceridêmica	32
3.3.4.1	Modelo da hiperlipidemia induzida pela dieta hipercalórica	32
3.3.4.1.1	Protocolo experimental	32
3.3.4.1.2	Determinação da concentração de triglicerídeos	34
3.3.4.2	Inibição da absorção de lipídeos	34
3.3.4.2.1	Protocolo experimental	34
3.3.4.2.2	Determinação da concentração de triglicérides	35
3.3.4.2.3	Determinação da atividade da lipase	35
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
4	RESULTADOS	36
4.1	Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	36
4.1.1	Determinação da atividade “scavenger” do radical DPPH	36
4.1.2	Formação e monitoramento da atividade “scavenger” do O ₂ ^{•-}	37
4.1.2.1	Avaliação da atividade da Xantina Oxidase	37
4.1.2.2	Avaliação da capacidade “scavenger” do O ₂ ^{•-}	38
4.1.3	Formação e monitoramento da atividade “scavenger” •OH	39
4.1.4	Proteção à peroxidação lipídica	40
4.2	Avaliação dos indicadores de estresse oxidativo e atividade antioxidante <i>in vivo</i>	41
4.2.1	Avaliação do dano à membrana celular	41
4.2.1.1	Medida da lipoperoxidação pelo TBARS	41
4.2.1.2	Medida da lipoperoxidação pelo FOX (oxidação do ferro pelo xilenol laranja)	43
4.2.2	Avaliação do dano ao DNA	44
4.2.3	Avaliação do dano oxidativo a proteínas	46
4.2.4	Avaliação da concentração de glutathiona reduzida	47
4.2.5	Atividade da enzima catalase	48
4.2.6	Atividade da enzima glutathiona S-transferase	49
4.3	Marcadores de função hepática	50
4.3.1	Determinação da atividade da enzima AST	50
4.3.2	Determinação da atividade da enzima ALT	51
4.4	Atividade Hipotrigliceridêmica	52
4.4.1	Hiperlipidemia induzida pela dieta hipercalórica	52

4.4.1.1 Avaliação da concentração de triglicerídeos	52
4.4.2 Inibição da absorção de lipídeos	53
4.4.2.1 Determinação da concentração de triglicérides	53
4.4.2.2 Avaliação da atividade da lipase intestinal	54
5 DISCUSSÃO	55
5.1 Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	55
5.2 Atividade antioxidantes <i>in vivo</i>	59
5.3 Atividade hipotrigliceridêmica	64
6 CONCLUSÕES	70
7 PERSPECTIVAS	72
8 BIBLIOGRAFIA	73

1 INTRODUÇÃO

Os efeitos dos radicais livres (RLs) sobre os sistemas biológicos têm estado em evidência nos últimos anos, especialmente nas doenças relacionadas com o aumento destas espécies reativas nos organismos aeróbios e com o envelhecimento precoce. Várias pesquisas têm demonstrado a participação dos RLs na etiologia de algumas patologias de elevada incidência na população ocidental. Assim, qualquer substância que demonstre ter a capacidade de neutralização destes radicais, torna-se um alvo farmacológico importante, já que poderá prevenir ou amenizar os problemas causados pelo excesso de espécies reativas no organismo, o chamado estresse oxidativo.

1.1 Radicais Livres

Nos átomos, os elétrons ocupam uma região no espaço conhecida como orbitais e cada orbital pode ter, no máximo, dois elétrons com *spins* em direções opostas. Para que uma molécula ou átomo permaneça estável, é necessária a presença de elétrons pareados na sua órbita externa. Entretanto, esta falta de paridade forma uma espécie química altamente instável, geralmente de vida média muito curta, o radical livre (RL). Os RLs são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons não pareados na sua órbita externa, geralmente formados pela perda ou ganho de elétrons (oxirredução) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Em meio biológico, a maioria das moléculas não se encontram na forma de radicais, permanecendo com elétrons pareados. Entretanto em determinadas situações, os RLs melhor denominados em termos biológicos de espécies reativas, são formados e podem causar efeito fisiológico e patológico (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Espécies reativas é um termo coletivo que inclui as espécies reativas de oxigênio (EROs), bem como as espécies reativas de nitrogênio (ERNs), como pode

ser observado na Tabela 1. “Reativo” não é sempre um termo apropriado, uma vez que H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$ e óxido nítrico (NO^{\bullet}) reagem diretamente com poucas moléculas no corpo humano, enquanto $\bullet OH$ pode reagir com qualquer molécula (HALLIWELL, 2001).

Tabela 1. Principais espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio nas formas radicalares e não radicalares. Adaptada de HALLIWELL (2001).

Espécies reativas de oxigênio (EROs)	
Radicais	Não radicalais
Ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)
Hidroxil ($\bullet OH$)	Ácido hipocloroso ($HOCl$)
Peroxil (RO_2^{\bullet})	Ácido hipobromoso ($HOBr$)
Alcoxil (RO^{\bullet})	Ozônio (O_3)
Hidroperoxil (HO_2^{\bullet})	Oxigênio singleto ($^1\Delta_g$)
Espécies reativas de nitrogênio (ERNs)	
Radicais	Não radicalais
Óxido nítrico (NO^{\bullet})	Peroxinitrito ($ONOO^-$)
Dióxido de nitrogênio (NO_2^{\bullet})	Alquil peroxinitrito ($ROONO$)

O oxigênio é essencial à vida dos organismos aeróbios, porém, sua presença é paradoxal. Sua função predominante nos eucariontes é servir como último aceptor de elétrons na respiração mitocondrial, quando será finalmente reduzido à água durante o complexo processo de fosforilação oxidativa. O oxigênio também é responsável pela degradação química de inúmeras macromoléculas no sistema biológico (DAVIES, 1994). A redução completa do oxigênio até água requer 4 elétrons, e essa redução produz seqüencialmente, do começo ao fim do processo, 3 produtos de redução (DI GIULIO et al., 1995).

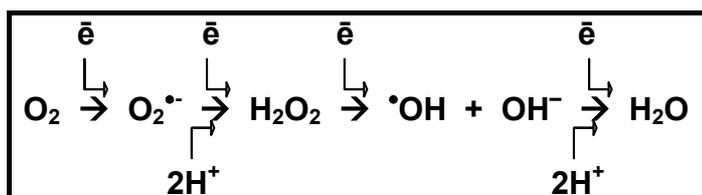


Figura 1. Formação de EROs durante a redução do oxigênio até água. Adaptada de NORDBERG e ARNER (2001).

As espécies reativas de oxigênio (EROs), são formadas através da redução parcial do oxigênio até água através de sucessivas reações (Figura 1). A transferência de um elétron para o O_2 produz o primeiro intermediário reativo, o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o qual sofre dismutação espontânea a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que não é um RL. O H_2O_2 sofre uma reação de quebra das ligações entre os átomos de O_2 formando o radical hidroxil ($\bullet OH$), que pode ser catalisada por metais de transição (reação de Fenton), ou pela combinação do $O_2^{\bullet-}$ com o H_2O_2 (reação de Haber-Weiss) (Figura 2) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

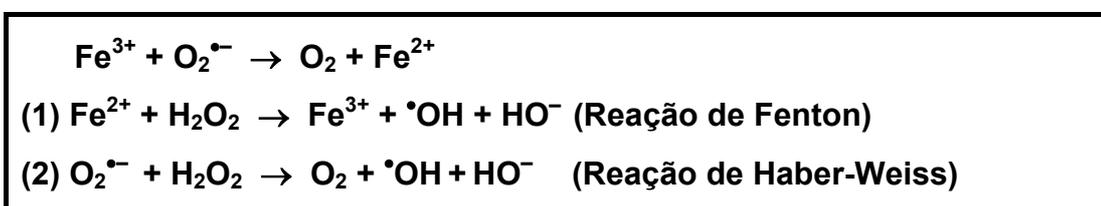


Figura 2. Reações de formação do $\bullet OH$. Adaptada de HALLIWELL e GUTTERIDGE (1999).

A formação do $O_2^{\bullet-}$ originado pela adição de um elétron ao oxigênio molecular (O_2), é mediada enzimaticamente como as NAD(P)H oxidases e xantina oxidase (XO) e não enzimaticamente por compostos redox-reativos tais como as semi-ubiquinonas da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons. A enzima superóxido dismutase (SOD) converte o $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 . Nos tecidos, o $O_2^{\bullet-}$ também pode ser convertido não enzimaticamente em H_2O_2 e $^1\Delta_g$, (DROGE, 2002). Na presença de metais de transição livres (particularmente ferro ou cobre), $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 podem gerar o $\bullet OH$ (reações de Fenton e Haber-Weiss), que é extremamente reativo (Figura 2). Alternativamente, o H_2O_2 pode ser convertido em H_2O pelas enzimas catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx). Na reação da GPx, a glutathiona (GSH) é oxidada até glutathiona dissulfídio (GSSG), que pode ser novamente convertida a GSH pela glutathiona redutase (GR), em um processo que consome NADPH (Figura 3) (DROGE, 2002; HADDAD, 2002).

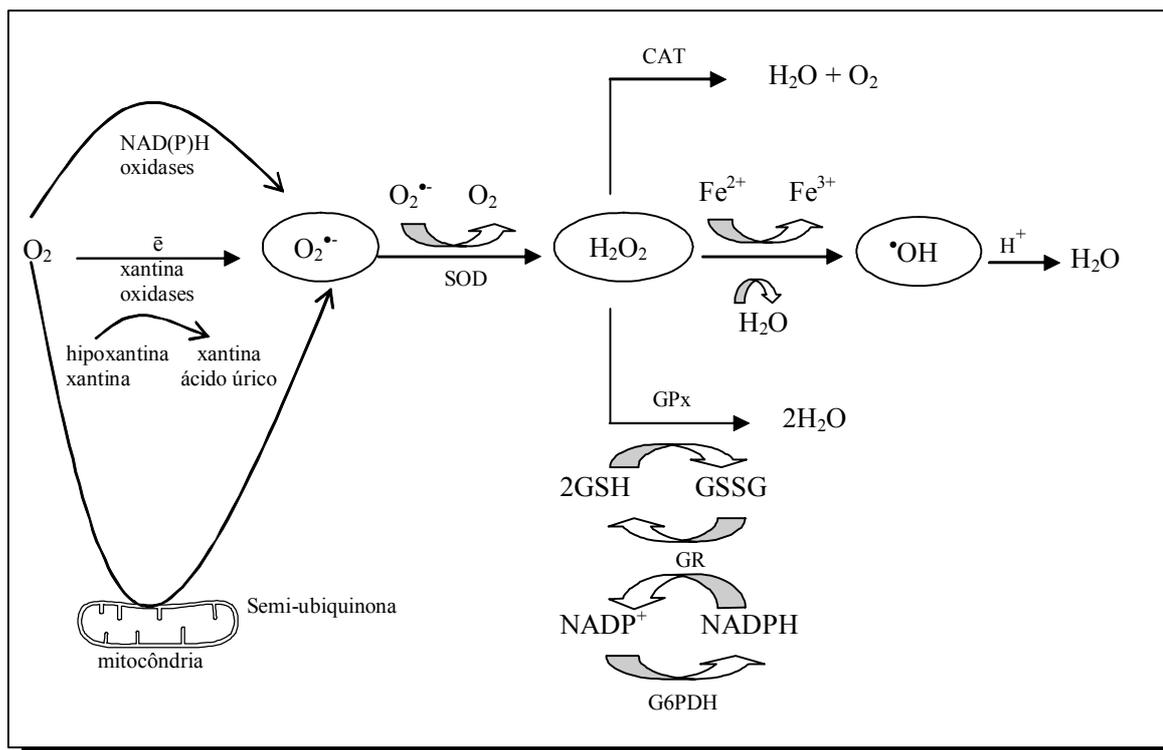


Figura 3. Vias de geração de EROs e mecanismo de defesa enzimática. Adaptada de DROGE (2002); HADDAD (2002) e BECKER (2004).

O mecanismo de geração das EROs em sistemas biológicos pode ocorrer por inúmeras reações bioquímicas, sendo que quatro deles têm recebido maior atenção: o sistema de β -oxidação peroxissomal, as reações do citocromo P450, a geração de NO^\bullet e HOCl no processo fagocítico, e a cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, onde se acredita ocorrer o mecanismo responsável pela produção da maior parte das EROs (BECKMAN e AMES, 1998; PRESTON et al., 2001).

Para minimizar os efeitos deletérios associados à constante formação das EROs, os organismos aeróbicos foram dotados ao longo do tempo evolutivo de distintas defesas antioxidantes. Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, podendo estes ser enzimáticos como SOD, CAT e GPx, ou não enzimáticos, tais como α -tocoferol (principal componente da vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C) e GSH (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

O desequilíbrio entre a produção de EROs e/ou ERNs e o sistema de defesa antioxidante endógeno é o fator predominante que pode causar uma série de

mudanças fisiológicas, chamadas de estresse oxidativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

1.2 Defesas Antioxidantes

O principal sistema de defesa antioxidante enzimático celular é composto pela SOD, CAT e GPx (Figura 3), que constitui a primeira defesa endógena de neutralização das EROs. Secundariamente, a glutatona redutase (GR) e a glutatona S-transferase (GST) auxiliam na regeneração da GSH e na conjugação de metabólitos reativos. Através delas, as células tentam manter baixas as quantidades do $O_2^{\bullet-}$ e de H_2O_2 , evitando assim, a formação do $\bullet OH$, que, embora de vida curta, na fração de milionésimos de segundos e, mesmo em concentrações bastante reduzidas ($\sim 10^{-18}$ M), é extremamente reativo e danoso às células (BOVERIS e CADENAS, 1997).

A SOD, uma metaloenzima, é considerada uma das mais importantes defesas antioxidantes na neutralização das Eros e está presente praticamente em todos os organismos eucarióticos, sendo responsável pela conversão do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e O_2 (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). As células humanas apresentam duas isoformas da SOD, uma mitocondrial, que contém manganês no seu sítio ativo (MnSOD), e outra citosólica, com cobre e zinco no seu sítio ativo (CuZnSOD) (HALLIWELL, 2001; STEHBENS, 2003).

O H_2O_2 da célula pode ser convertido a H_2O e O_2 por dois tipos de enzimas: CAT e GPx. A CAT que atua especificamente sobre o H_2O_2 , está presente na maioria das células aeróbicas, especialmente concentradas nos hepatócitos e eritrócitos, estando localizada principalmente em organelas subcelulares chamadas peroxissomos. Esta enzima é composta de quatro subunidades proteicas, cada uma contendo um grupo heme (FeIII-protoporfirina) ligado ao sítio ativo. Já a GPx, uma das poucas classes de enzimas humanas que requer selênio para sua ação, remove

H₂O₂ e outros hidroperóxidos, oxidando a GSH a GSSG (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

A GR auxilia na manutenção do poder redutor intracelular, pois catalisa a redução da GSSG, através da oxidação de NADPH, permitindo a contínua regeneração da GSH produzida pela ação da GPx e pelas EROs (HALLIWELL, 2001).

As GSTs, também desempenham um papel fisiológico importante, iniciando a detoxificação de agentes alquilantes potenciais, incluindo compostos farmacologicamente ativos, entretanto, não atuam prioritariamente contra as EROs. Estas enzimas catalisam a conjugação de metabólitos reativos com os grupamentos SH da GSH, neutralizando os sítios eletrofílicos destes compostos e rendendo produtos mais solúveis em água (HABIG et al., 1974).

As células também exibem antioxidantes não-enzimáticos que incluem compostos endógenos como, principalmente, a GSH, ácido úrico, ubiquinol 10 e alguns hormônios, outros exógenos como a vitamina E, C e A (além de outros carotenóides como o licopeno e o β-caroteno), flavonóides e outras pequenas moléculas derivadas de fonte vegetais (SCANDALIOS, 1997).

Já os antioxidantes não enzimáticos podem ser definidos como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas com o substrato oxidável, são capazes de retardar ou inibir a oxidação deste substrato (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

A GSH, um tripeptídeo composto de glutamato, cisteína e glicina, é o principal tiol celular não protéico, mais abundante em células eucariotas e desempenha um importante papel em muitos tipos de reações de biorredução e conjugação, como a integridade do citoesqueleto, síntese de proteína e de DNA, transporte de aminoácidos, “scavenger” de EROs, transdução de sinais, cofator de enzimas essenciais e defesa contra moléculas oxidantes e xenobióticos potencialmente tóxicos (PEÑA et al., 2000; STEHBENS, 2003). Este tripeptídeo pode prover proteção contra todas as formas de estresse oxidativo através de pelo menos dois mecanismos: i) nos primeiros momentos do dano oxidativo, a GSH pode

agir diretamente sobre as EROs; ii) pode também ajudar a ativar muitos genes que têm função de extinguir o dano oxidativo (NEBERT,2000; STEHBENS, 2003).

Alem dos antioxidantes clássicos presentes em concentrações consideradas relativamente baixas, existem compostos que possuem pequena atividade antioxidante, mas quando presentes em altas concentrações, podem contribuir para capacidade antioxidante total, dentre eles podemos citar a bilirrubina e os compostos fenólicos (DROGE, 2002).

1.3 Estresse Oxidativo

Em organismos aeróbios saudáveis, a relação entre a produção de EROs e ERNs com os sistemas de defesas antioxidantes, estão aproximadamente em equilíbrio. Entretanto, esse equilíbrio nem sempre é perfeito. O estresse oxidativo ocorre como um desequilíbrio entre o balanço pró-oxidante / antioxidante, em favor da situação pró-oxidante, promovendo um dano potencial (SIES, 1993; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

O efeito do estresse oxidativo pode resultar em três diferentes processos: i) adaptação por regulação do sistema de defesa antioxidante; ii) injúria tecidual, podendo causar dano a qualquer molécula alvo (DNA, proteínas e lipídios); iii) morte celular por necrose ou apoptose (HALLIWELL, 2001). Entretanto, é importante salientar que, mesmo em equilíbrio redox, o dano associado à geração de EROs é contínuo e cumulativo, ocorrendo corriqueiramente em organismos jovens e sadios.

As EROs podem reagir com biomoléculas tais como proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; MEAGHER e FITZGERALD, 2000). Nas proteínas, as EROs podem reagir diretamente com as mesmas, ou podem reagir com moléculas como lipídios e carboidratos, gerando produtos que, por sua vez, podem reagir com as proteínas. Tanto a ligação peptídica quanto as cadeias laterais podem ser o alvo do ataque de EROs (LEVINE, 2002).

Com respeito ao DNA, estudos associam a fragmentação deste causada pelo estresse oxidativo sob condições de depleção de GSH (HIGUCHI, 2003), alteração dos níveis de outros antioxidantes ou EROs (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999) com apoptose ou necrose. A modificação oxidativa das bases do DNA pode resultar em mutação, ao passo que a oxidação das unidades de desoxirribose pode induzir a liberação de bases ou quebra nas fitas de DNA (ZWART et al., 1999). Considera-se que a fragmentação do DNA sob condições de depleção de GSH ocorre por dois mecanismos: i) RLs lipídicos produzidos a partir dos ácidos graxos poliinsaturados (tanto na membrana plasmática quanto nuclear) podem diretamente atacar o DNA presente na cromatina do núcleo; ii) a lipoperoxidação (LPO) em uma célula causa a perda da integridade da membrana celular, podendo tornar o ambiente favorável ao ataque ao DNA da cromatina por outros tipos de radicais de oxigênio. O radical $\cdot\text{OH}$ pode inicialmente causar quebra da fita simples do DNA, e posteriormente levar à quebra da fita dupla do DNA (HIGUCHI, 2003).

A LPO, utilizada como um sinal do estresse oxidativo celular e auxiliar no reconhecimento de danos oxidativos em organismos com algumas patologias (SEVANI e URSINI, 2000), ocorre em uma seqüência de reações já conhecida. No passo inicial, um átomo de hidrogênio é seqüestrado do ácido graxo contendo ao menos duas duplas ligações separadas por metilenos intercalados (LH), originando um RL centrado no carbono (radical lipídico, $\text{L}\cdot$) com um rearranjo das duplas ligações (conjugação de dienos), seguido pela interação do $\text{L}\cdot$ com o oxigênio molecular (O_2), para formar um radical peroxil ($\text{LOO}\cdot$). Este último pode então, retirar um átomo de hidrogênio, tanto do LH adjacente (induzindo uma reação de propagação), como de outro doador de hidrogênio, como, por exemplo, um antioxidante (Figura 4). Em ambas as circunstâncias um hidroperóxido de ácido graxo (LOOH) é formado (ERNSTER e HOCHSTEIN, 1994; HERMES-LIMA et al., 1995; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

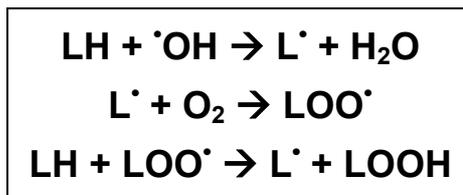


Figura 4. Representação esquemática das reações de iniciação e propagação da LPO. Adaptada de HERMES-LIMA et al. (1995).

As conseqüências mais comuns da LPO correspondem à perturbação das funções essenciais das membranas celulares e organelas, incluindo o processo de transporte, a transdução de sinais mediada por receptores e a preservação do gradiente de íons e metabólitos. Como já mencionado anteriormente, a LPO pode secundariamente causar dano ao DNA e às proteínas (ERNSTER e HOCHSTEIN, 1994).

Os níveis elevados de EROs no organismo parecem ser um dos maiores contribuintes para o envelhecimento (HERMAN, 1992), e para muitos processos degenerativos como o câncer, aterosclerose, doenças neurodegenerativas, cataratas, entre outros (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). O desenvolvimento da aterosclerose, tem como conseqüência o surgimento de doença coronariana, onde a LPO aparece como uma importante contribuição (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Segundo alguns autores, o nível de oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) em ox-LDL no tecido subendotelial, o qual ocorre através da ação de agentes oxidantes na forma de RL (GIROUX et al., 1993), está proporcionalmente correlacionado com o grau de evolução de doença aterosclerótica (HOLVOET e COLLEN, 1998).

1.4 Aterosclerose e Hiperlipidemia

Aterosclerose é um termo utilizado para retratar um processo evolutivo, dinâmico, que ocorre a partir de um dano endotelial originado multifatorialmente, com propriedades de reparação tecidual, ocorrendo espessamento e endurecimento

das lesões arteriais musculares de médio (membros inferiores) e grande calibre (carótidas) e artérias elásticas (aorta). A utilização da terminologia de arteriosclerose, um termo similar que retrata o espessamento e endurecimento de todos os tipos de vasos sanguíneos, é consequência do processo aterosclerótico (ROSS, 1999; LUZ, 2001).

A hipótese de que a peroxidação lipídica desempenha importante papel na patogênese da aterosclerose desperta crescente entusiasmo sobre o uso de antioxidantes como agentes antiaterogênicos. As lesões ateroscleróticas formam-se sobre os danos endoteliais dos vasos sanguíneos. O início ou aumento destas lesões pode ocorrer na presença de substâncias irritantes, resultantes do metabolismo da peroxidação lipídica (NAPOLI, 1997; OPLETALOVA et al., 2003).

Concentrações elevadas de LDL plasmática podem aumentar a velocidade de sua adesão na parede arterial, na qual ocorrem os processos de oxidação por agentes, tais como ânion superóxido, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio, modificando-se em ox-LDL (BATLOUNI, 1997; KÁDÁR, 2001). A deposição das ox-LDLs na camada íntima arterial pode provocar citotoxicidade no endotélio vascular, assim como inibição da saída de LDL, o que leva ao seu acúmulo na parede do vaso. Em seqüência, as ox-LDLs são consumidas por macrófagos, tornando-se “células espumosas”, armazenando-se na camada íntima, liberando agentes quimiotáticos capazes de aumentar o recrutamento das LDLs plasmáticas e fatores de crescimento, causando a migração e proliferação das células musculares lisas, produzindo grande quantidade de colágeno, elastina e proteoglicanos. Como resultado, ocorre a formação de uma placa ateromatosa, composta de uma cobertura fibrosa com células musculares lisas, macrófagos, células espumosas, linfócitos, colágeno, elastina, proteoglicanos; e de um centro necrótico composto de restos celulares, cristais de colesterol, células espumosas e cálcio (STANLEY e ROBBINS, 1991; STARY et al., 1994; BATLOUNI, 1997; FRANÇOSO e COATES, 2002).

Os danos desenvolvidos pelas artérias podem sofrer complicações, de modo que calcificações e ulcerações da superfície do endotélio em contato com o sangue, podem levar à ruptura da superfície da placa. Como consequência teremos o descarregamento de resíduos desta ruptura na corrente sanguínea, ocorrendo,

nesse caso, o desenvolvimento de hemorragia ou hematoma, terminando por causar microembolias e trombose que podem fechar a artéria e, em casos severos, a aterosclerose enfraquece de tal maneira as paredes dos vasos, que provoca dilatação arterial ou aneurisma (FRANÇOSO e COATES, 2002).

Dentre os principais fatores de risco da aterosclerose encontra-se a hipercolesterolemia e a hipertrigliceridemia. O nível de colesterol alto está associado basicamente a uma elevação das concentrações das LDLs, partículas densas e pequenas, potencialmente aterogênicas, ao passo que a elevação de triglicérides está associada com o aumento das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDLs), e remanescentes de seu catabolismo, as lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) (MEYER, et al., 2000). Por outro lado, tem-se demonstrado que as concentrações das lipoproteínas de alta densidade (HDL) estão inversamente associadas ao desenvolvimento de aterosclerose (REAL, et al., 2001).

As hiperdislipidemias ou dislipidemias são alterações metabólicas lipídicas resultantes de distúrbios em qualquer fase do metabolismo lipídico, ocasionando alterações nas concentrações séricas das lipoproteínas (GOTTO, 1993). Os resultados laboratoriais das dislipidemias aparecem em situações distintas: hipercolesterolemia isolada; hipertrigliceridemia isolada; hiperlipidemia mista; diminuição isolada do HDL-colesterol, ou em associação com aumento do LDL-colesterol e/ou dos triglicérides. As dislipidemias podem ser desencadeadas por causas genéticas (dislipidemias primárias), algumas só se manifestando quando há influência ambiental, ou podem ser causadas por outras doenças ou uso de medicamentos (dislipidemias secundárias) (SINGH e MEHTA, 2002; CHAPMAN, 2003).

Geralmente a concentração normal de colesterol total obtido no plasma em pessoas em jejum, apresenta-se entre 120 a 220 mg/dL, e em adultos jovens e saudáveis, 175 mg/dL é o valor médio (GHANNEM et al., 2001). Pesquisas epidemiológicas mostram que pessoas com concentrações plasmáticas de colesterol total acima de 200 mg/dL, e aquelas que possuem uma forma relativamente branda, com concentrações plasmáticas de colesterol total entre 240 a 280 mg/dL, apresentam uma propensão maior em desenvolver aterosclerose, recomendando-se

alimentação com restrição dietética e/ou com baixo teor de colesterol, para a redução das concentrações sanguíneas deste esterol (GHANNEM et al., 2001).

Recentemente, pesquisas demonstraram que as concentrações elevadas de triglicerídeos aparentam ser um forte e independente fator de risco futuro de infarto do miocárdio, juntamente com concentrações de colesterol total elevadas (TALMUD et al., 2002). Diversos estudos prospectivos e do tipo caso-controle vêm demonstrando uma relação significativa entre as concentrações plasmáticas de triglicérides e risco de cardiopatia isquêmica. Uma meta-análise realizada por Aviram (2000), demonstrou que, para cada 1 mmol de aumento nos níveis plasmáticos de triglicérides, o risco de doença coronariana aumenta em 32% para os homens e 78% para as mulheres. Entretanto, ainda não há consenso sobre a importância da hipertrigliceridemia como fator de risco isolado (AVIRAM, 2000). Raramente encontra-se hipertrigliceridemia isolada, sendo freqüentemente acompanhada por aumento no colesterol total, no LDL-colesterol e diminuição no HDL-colesterol (SCHIAVO et al., 2003).

Assim sendo, existem evidências suficientes que demonstram que o excesso de triglicérides amplifica o risco de cardiopatia isquêmica, quando associado com outros fatores de risco, como hipercolesterolemia ou aumento de LDL (SLATER et al., 2002; FRUCHART e DURIEZ, 2002). Conforme a American Association of Clinical Endocrinologist, (2000), através de estudo prospectivo (Prospective Cardiovascular Munster – PROCAM), evidenciou-se que as concentrações de triglicérides maiores que 200 mg/dL, em conjugação com concentrações de LDL maiores que 160 mg/dL, aumentam substancialmente os riscos de doenças cardiovasculares. Outro estudo mostrou que os pacientes com média de 229 mg/dL de trigliceridemia e com a relação colesterol total/HDL também com média de 5,7, tinham 3 vezes mais risco de doença coronariana, quando comparados a indivíduos com trigliceridemia menor ou com relação colesterol total/HDL mais baixa (WIERZBICKI e MIKHAILIDIS, 2002).

Alguns estudos relatam o efeito antiaterogênico das lipases plasmáticas, em que a sua ação catalítica resulta na redução das concentrações de triglicerídeos plasmáticos e aumento das concentrações de HDL, onde os mecanismos

envolvendo este segundo componente ainda não são bem descritos (JIN et al., 2002; STEIN e STEIN, 2003).

A lipase lipoprotéica é uma enzima chave na digestão da gordura dos alimentos, catalisando a hidrólise dos componentes triacilglicerol existentes nos quilomícrons (QM) e nas VLDL produzindo ácidos graxos e monoacilglicerol (MEAD et al., 1999). Por causa da sua ação lipolítica sobre os triglicerídeos, formam-se produtos que podem ser armazenados nos adipócitos ou usados como fonte de energia pelos miócitos esqueléticos e cardíacos, tendo estas um papel importante na homeostase energética (JIN et al., 2002).

Dentre as várias condutas terapêuticas indicadas para o tratamento da hiperlipidemia encontra-se a restrição dietética. Contudo, se a limitação dietética não gerar uma diminuição adequada da concentração de colesterol e/ou triglicerídeos, a administração de fármacos com atividade hipolipemiante, faz-se necessária, associada ao regime de restrição dietética, uma vez que a terapêutica hipolipemiante reduz o ritmo de progressão da doença aterosclerótica e, em alguns casos, induz a regressão das lesões já existentes (SCHIEFFER e DREXLER, 2003; UESHIMA et al., 2004).

Embora exista um grande número de pessoas com doenças cardiovasculares associadas às elevadas concentrações plasmáticas de lipídeos, ainda são poucas as alternativas terapêuticas disponíveis para a prevenção ou tratamento destas enfermidades. Dentre as opções, pode-se destacar: as estatinas ou inibidores competitivos da HMG-CoA redutase, os ácidos fíbricos, as resinas sequestradoras de ácidos biliares e as fibras dietéticas (BROWN et al., 1998; HOPKINS et al., 2000; SPIEKER, 2000; ELLEGARD, 2000; CHAPMAN, 2003).

Por outro lado, o uso de antioxidantes tem se mostrado benéfico nos casos em que a doença está associada com o aumento da peroxidação lipídica, como no caso da aterosclerose, o que despertou crescente entusiasmo com agentes antiaterogênicos. Particularmente, quando a atividade oxidativa é um fator central na patofisiologia da doença; quando há deficiência na atividade antioxidante; quando o agente antioxidante tem capacidade de alcançar o sítio de dano oxidativo e causar

impacto no processo oxidativo; e ainda quando possa ser administrado em doses toleráveis e seguras (MAXWELL, 1995; BATLOUNI, 1997).

Dentre estes agentes podemos citar os compostos fenólicos, derivados do metabolismo secundário vegetal, e apresentam uma larga e complexa distribuição fitoquímica, exibindo ação antioxidante e, conseqüentemente, um efeito fisiológico benéfico (BRAVO, 1998; MARTINEZ-VALVERDE, PERIAGO e ROS, 2000). Estes antioxidantes retardam a oxidação dos lipídios nos vegetais e nas membranas biológicas dos animais (FAROMBI, BRITTON e EMEROLE, 2000).

1.5 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos apresentam como estrutura fundamental um anel aromático com um grupamento hidroxila substituindo ao menos um átomo de hidrogênio. Este grupo de compostos está largamente distribuído nos vegetais e microorganismos, sob a forma livre ou ligada a açúcares (glicosídeos) e proteínas (CARVALHO, GOSMANN e SCHENKEL, 2003).

A grande variedade de compostos fenólicos existe devido à sua dupla origem biossintética: pela via do acetato-polimalato, iniciando com acetil-coenzima A e malonilo-coenzima A, obtendo compostos com grupos hidroxilas na posição *orto* (HONDA e VILEGAS, 1998), ou através do ácido chiquímico a partir de carboidratos, origina compostos dispostos em *meta*. Ambos podem produzir compostos de origem mista, gerando moléculas simples como as dos ácidos fenólicos ou compostos altamente polimerizados como os taninos (CARVALHO, GOSMANN e SCHENKEL, 2003).

Estes compostos podem atuar nas plantas como antioxidantes, antimicrobianos, fotoreceptores, atraentes visuais e repelentes de predadores. Contudo, há um grande interesse sobre sua atividade antioxidante, devido à sua habilidade de seqüestrar e de reduzir a formação EROs e outros eletrófilos; de quelar metais e de inibir o processo de nitrosação; potencial de auto-oxidação,

produzindo peróxido de hidrogênio na presença de certos metais como ferro e cobre; e sua capacidade de modular a atividade de enzimas como a proteína quinase C e a lipooxigenase (MIDDLETON, KANDASWAMI e THEOHARIDES, 2000; PIETTA, 2000; CARVALHO, GOSMANN e SCHENKEL, 2003).

Os compostos fenólicos podem inibir os processos da oxidação em certos sistemas, mas isso não significa que eles possam proteger as células e os tecidos de todos os tipos de danos oxidativos. Esses compostos também podem apresentar atividade pró-oxidante em determinadas condições (DECKER, 1997).

Dentre os compostos fenólicos, encontram-se as acetofenonas que apresentam várias atividades biológicas. As acetofenonas podem ocorrer em plantas naturalmente (FAVIER et al., 1998), ou podem ser produzidas por via sintética (figura 5). Esses compostos apresentam interesse por apresentarem importantes atividades biológicas, como: antiinflamatória (FAVIER et al., 1998), antiespasmódica (CECHINEL Filho et al., 1995), antibacteriana (NIERO et al., 1996) e antifúngica (CECHINEL Filho et al., 1996).

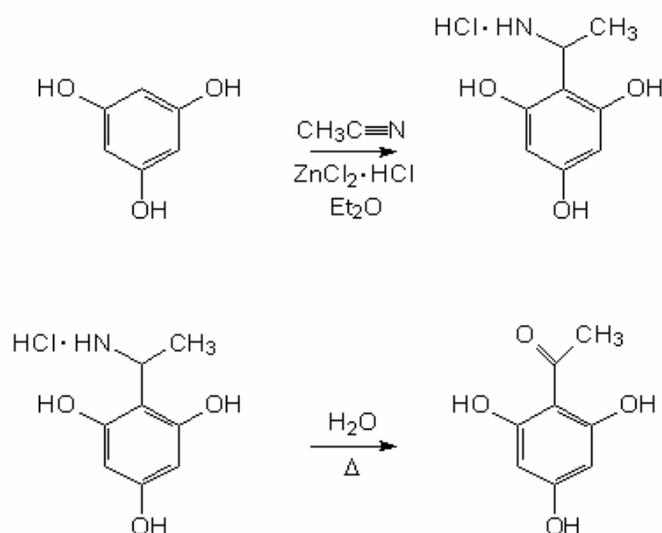
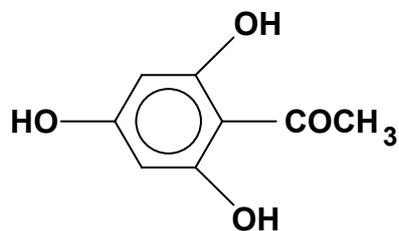


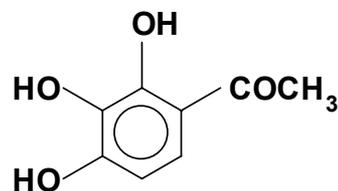
Figura 5. Representação esquemática das reações de formação da floroacetofenona via síntese. Adaptada de Organic Syntheses (1942).

Esta classe de compostos já vem sendo testada no laboratório de Bioquímica Experimental (LABIOEX), tendo sido tema de dissertação de mestrado Luis Flávio de Souza Oliveira, onde foi observado um efeito hipocolesterolêmico da acetofenona em ratos submetidos a uma dieta hipercalórica (OLIVEIRA, 2001).

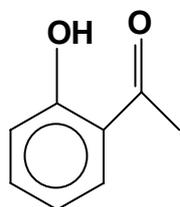
A seguir são apresentadas as estruturas químicas dos compostos a serem estudados:



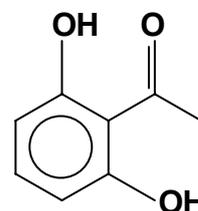
2,4,6 – trihidroxiacetofenona (THA)
(Floroacetofenona)



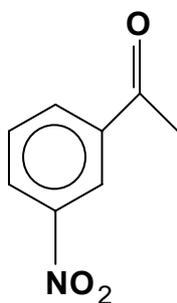
2,3,4 – trihidroxiacetofenona (Gala)
(Galacetofenona)



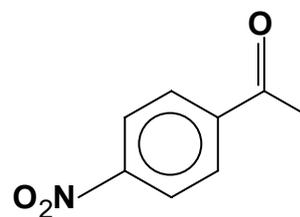
2' – hidroxiacetofenona



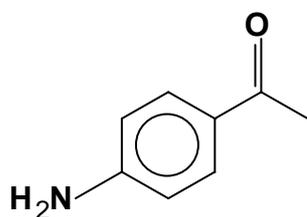
2',6' - dihidroxiacetofenona



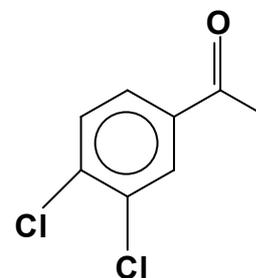
3' - nitroacetofenona



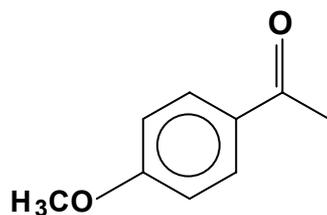
4' – nitroacetofenona



4' - aminoacetofenona



3',4' – dicloroacetofenona



4' – metoxiacetofenona

A rutina (Figura 6), um flavonóide presente em várias plantas, já foi estudada extensivamente e são conhecidas suas múltiplas atividades farmacológicas, incluindo ação antibacteriana, antiviral, antiprotozoária, antitumoral, antialérgica, antiinflamatória, antidiarréica, antiulcerosa, antiespasmódica, antimutagênica, protetora do miocárdio, vasodilatadora e imunomoduladora (La CASA et al., 2000; JANBAZ et al., 2002). É também considerado um importante agente antioxidante, por inibir a lipoperoxidação e capturar os radicais $\cdot\text{OH}$ e o $\text{O}_2\cdot^-$ (NEGRÉ-SALVAYRE et al., 1991; BOMBARDELLI e MORAZZONI, 1993; METODIEWA et al., 1997). Razão pela qual foi utilizada como controle do presente trabalho.

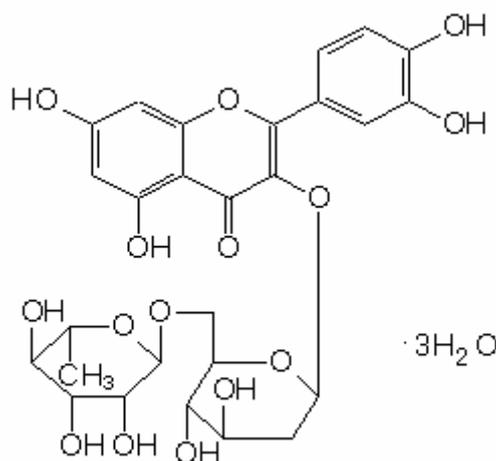


Figura 6. Estrutura química da rutina.

Historicamente, os produtos naturais sempre desempenharam um papel muito importante no processo de desenvolvimento de novos fármacos, já que a maioria dos fármacos comercializados é de origem natural ou de produtos sintéticos baseados em produtos naturais. Os métodos clássicos de isolamento de substâncias ativas provenientes de produtos naturais e a utilização de processos de síntese química na avaliação destas substâncias são fontes para o desenvolvimento de novos compostos protótipos (STROBEL, 2002; MACIAS et al., 2003; de las HERAS et al., 2003). Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo realizar uma avaliação do potencial hipolipemiante e antioxidante de alguns análogos sintéticos da acetofenona com vista à proposição futura de uma molécula protótipo que possa ser utilizada na pesquisa de novos fármacos com atividade hipolipemiante associada a antioxidante.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante e hipotrigliceridêmico de alguns análogos sintéticos da acetofenona, utilizando modelos *in vivo* e *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* de alguns análogos sintéticos da acetofenona, utilizando o ensaio de captação do radical DPPH, $O_2^{\bullet-}$ e $\bullet OH$ além da peroxidação lipídica;
2. Avaliar o estresse oxidativo (fragmentação do DNA, lipoperoxidação de membranas e carbonilação de proteínas) e as defesas antioxidantes (concentração de GSH, atividade da CAT e GST), em camundongos pré-tratados com análogos sintéticos da acetofenona e expostos a tetracloreto de carbono;
3. Avaliar o possível efeito hipotrigliceridêmico dos análogos sintéticos da acetofenona através do modelo de hiperlipidemia induzida pela dieta hipercalórica;
4. Avaliar o possível efeito hipotrigliceridêmico dos análogos sintéticos da acetofenona através de ensaios de inibição da absorção intestinal de triglicerídeos;

5. Avaliar o possível efeito hipotriglicéidêmico dos análogos sintéticos da acetofenona através de ensaios de inibição da atividade da lipase intestinal;
6. Tentar correlacionar os dados obtidos com respeito à atividade antioxidante e hipotriglicéidêmica e as estruturas químicas dos compostos testados.

3 METODOLOGIA

3.1 Materiais e reagentes

As substâncias utilizadas para a avaliação da atividade antioxidante e hipotrigliceridêmica, foram sintetizadas pelo Laboratório de Síntese Estrutura e Atividade, LABSEAT, do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, coordenado pelo Professor Dr. Rosendo Augusto Yunes.

Ácido nitrilo acético (NTA), ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido tricloroacético (TCA), 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), fenazina-metasulfato, hidroperóxido de cumeno, o 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico (DTNB), hidroxitolueno butilado (BHT), nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), nitrilo blue tetrazolium (NBT), peróxido tert-butila, rutina, xantina, xantina oxidase, foram adquiridos junto à Sigma-Aldrich (St Louis, USA).

O kit para determinação da lipase foi obtido junto à *In Vitro* Diagnóstica Ltda (MG, Brasil). Os kits para a dosagem das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e triglicerídeos, foram adquiridos junto à Labtest Diagnóstica S.A. (MG, Brasil).

3.2 Animais

Para realização dos experimentos foram utilizados camundongos SWISS (*Mus musculus*), machos (25 – 40 g de peso) e ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos (200 ± 50 g de peso), com aproximadamente 70 dias, provenientes do

Biotério Central da UFSC, através do Departamento de Bioquímica (BQA), Centro de Ciências Biológicas (CCB).

Os animais foram pesados e divididos em grupos de seis (6) animais e mantidos em gaiolas plásticas sob condições controladas (ciclo claro-escuro de 12 h, temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ~ 60% umidade do ar), recebendo ração comercial e água *ad libitum* para adaptação.

Este projeto faz parte de um projeto maior aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) da UFSC, aprovado sob o número de protocolo de Pesquisa/Ensino 149/CEUA - 23080.009607/2002-88.

3.3 Ensaios Biológicos

3.3.1 Atividade antioxidante *in vitro*

3.3.1.1 Determinação da atividade “scavenger” do radical DPPH

A atividade “scavenger” do radical 1,1-difenil-2-picril hidrazina (DPPH) foi avaliado pela medida da extinção de sua absorção máxima em 517 nm (MENSOR et al., 2001). O procedimento constitui-se em incubação durante 30 minutos à temperatura ambiente de uma solução etanólica de DPPH 3,0 mM com concentrações crescentes (5, 10, 25, 50, 125 e 250 $\mu\text{g/mL}$) de análogos sintéticos das acetofenonas. Após esse período foi feita a leitura espectrofotométrica em 517 nm e o percentual “scavenger” do radical DPPH foi calculado em termos de porcentagem de atividade antioxidante (AA%), conforme fórmula abaixo:

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

A concentração da amostra que necessária para captar 50% dos radicais livres DPPH (CE₅₀) foi calculada por análise de regressão exponencial e expressa como média ± E.P.M.

3.3.1.2 Formação e monitoramento da atividade “scavenger” do O₂^{•-}

O O₂^{•-} pode ser gerado por distintos sistemas enzimáticos, entre eles a reação catalisada pela enzima xantina oxidase (XO) que utiliza a xantina como substrato, levando à formação de O₂^{•-} e ácido úrico, ou pelo sistema não enzimático através da reação de metassulfato de fenazina com NADH (ROBAK e GRYGLEWSKI, 1988).

Inicialmente, foi avaliado o efeito das substâncias sobre a atividade da enzima XO. O sistema de incubação foi constituído por: tampão fosfato 0,1 M, pH 7,8; análogos sintéticos da acetofenonas com concentração crescente (50,125, 250, 500 e 1000 µg/mL); xantina 100 µM e XO 0,04 U/mL. Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, a reação foi interrompida, adicionando-se aos tubos-testes HCl 0,1 N. A formação de ácido úrico a partir da xantina, foi medida espectrofotometricamente a 295 nm.

Posteriormente, foi avaliada a capacidade antioxidante dos análogos sintéticos da acetofenonas de inibir a redução o “nitro blue tetrazolium” (NBT) pelo O₂^{•-}, gerado pela reação catalisada pela XO. O sistema de incubação foi constituído por: tampão fosfato 0,1 M, pH 7,8; análogos sintéticos da acetofenonas com concentração crescente (50,125, 250, 500 e 1000 µg/mL); xantina 100 µM; NBT 6 mM e XO 0,04 U/mL. Foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e a reação foi interrompida pela adição de HCl 0,1 N, sendo a redução da absorbância do NBT foi medida em 560 nm (ROBAK e GRYGLEWSKI, 1988).

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

Os valores de concentração eficaz (CE_{50}) representam a concentração suficiente da amostra que é necessária para captar 50% dos $O_2^{\bullet-}$ e foram calculadas por análise de regressão exponencial, expressos como média \pm E.P.M.

3.3.1.3 Formação e monitoramento da atividade “scavenger” do $\bullet OH$

A formação e monitoramento do radical hidroxil foram determinados pelo método da desoxirribose, de acordo com HALLIWELL e GUTTERIDGE (1981). Este método baseia-se na oxidação da desoxirribose provocada por $\bullet OH$, produzido pela reação de H_2O_2 com o ferro, levando à formação de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA), monitoradas espectrofotometricamente a 532 nm.

Inicialmente incubou-se por 10 minutos à temperatura ambiente, 25 μL de $FeCl_3$ 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 dos análogos sintéticos de acetofenonas com concentração crescente (10, 100, 500 e 1000 $\mu g/mL$); 100 μL de desoxirribose 33,6 mM; água deionizada ou destilada e 100 μL de H_2O_2 16,8 mM, sendo realizada nova incubação por 20 minutos à 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% em NaOH 0,05 N. Posteriormente, incubou-se o meio de reação por 15 minutos a 100 °C e finalizou-se com banho de gelo por 5 minutos. A absorbância das soluções foi medida em 532 nm, contra um branco contendo todos os reagentes, menos desoxirribose. O potencial “scavenger” do $\bullet OH$ foi calculado em termos de porcentagem de atividade antioxidante (AA%), conforme à fórmula abaixo:

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

Os resultados foram apresentados em termos de CE_{50} que representa a concentração suficiente da amostra que é necessária para captar 50% dos $\bullet OH$, e foram calculadas por análise de regressão exponencial, expressos como média \pm E.P.M.

3.3.1.4 Proteção à peroxidação lipídica

A proteção à peroxidação lipídica foi avaliada de acordo com Chen e Tappel (1996), usando homogenato de fígado de ratos. Os animais foram sacrificados e o fígado retirado, lavado com salina 0,9%, pesado e homogeneizado em tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0 em KCl 140 mM. O homogenato foi centrifugado a 2000 g e o sobrenadante diluído (1:3) em tampão fosfato de potássio 80 mM, pH 7,4.

Posteriormente, foi feita a incubação de 100 µL H₂O destilada, 125 µL de tampão fosfato de potássio 80 mM e pH 7,4, 100 µL de peróxido tert-butila, 100 µL de diferentes concentrações dos análogos sintéticos de acetofenonas (31,25; 62,5; 125; 250 e 500 µg/mL), e 150 µL do homogenato diluído. Ao controle foi adicionado 100 µL de BHT. A mistura foi incubada a 37 °C, sob condições aeróbicas, com agitação constante de 180 ciclo/min, por 2 horas. Após a incubação, foi adicionado 1,0 mL de TCA 2,8%, seguido de 1,0 mL de TBA 1% 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 absorbância das soluções foi medida em 532 nm.

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

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

Os valores de CE₅₀ representam as concentrações das amostras que são necessárias para prevenir em 50% a peroxidação lipídica, calculadas por análise de regressão exponencial e expressos como média ± E.P.M..

3.3.2 Atividade Antioxidante *in vivo* e indicadores de estresse oxidativo

3.3.2.1 Protocolo experimental

Os camundongos foram divididos em grupos (n = 6), onde: grupo 1 foi tratado via intraperitoneal (ip) com CCl₄ (agente estressor) 0,5 mL / 100 g (30% v/v) em solução com óleo de milho; grupo 2 foi pré-tratado via oral durante 7 dias com os análogos sintéticos de acetofenonas e rutina (6,0 mg/kg), no sétimo dia, tratado com CCl₄.

Após 24 horas da administração do CCl₄, os animais foram anestesiados com éter etílico e o sangue foi coletado por punção ocular para a avaliação enzimática da função hepática. Imediatamente após a coleta sangüínea, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os fígados retirados para as dosagens dos indicadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes.

3.3.2.2 Avaliação do dano à membrana celular

3.3.2.2.1 Medida da lipoperoxidação pelo TBARS

A avaliação da peroxidação lipídica endógena foi realizada em triplicata, pela detecção dos seus derivados lipoperóxidos, através de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), destacando-se o malondialdeído, produzindo uma base de Schiff de coloração rosa (OHKAWA, 1979; BIRD e DRAPER, 1984).

Após o sacrifício dos camundongos, os fígados dos animais foram retirados e colocados imediatamente no gelo. Uma pequena porção foi separada e pesada para a preparação do homogenato, obtido em ácido fosfórico 1,1% (1:20 p/v). A

homogeneização foi realizada a 4 °C, com cerca de 20 impactos em homogenizador Potter-Elvehjem.

Após a homogeneização, 400 µL do homogenato foi misturado a 400 µL da solução (1% TBA / 50 mM NaOH / 0,1 mM BHT) e 0,2 mL de ácido fosfórico 7%. Posteriormente, a amostra foi incubada a 100 °C por 15 min e após a incubação, foi adicionado 1,5 mL de butanol. Finalmente, os tubos foram agitados vigorosamente e centrifugados a 2000 g por 5 min. A fase orgânica foi removida e medida espectrofotometricamente em 532 e 600 nm. Para o branco foi substituído a solução de TBA por HCl 3,0 mM (HERMES-LIMA e STOREY, 1995).

A concentração de TBARS (nmol/g) foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 156 mM conforme a fórmula:

$$[\text{TBARS}] = [\text{Amostra } (A_{532} - A_{600}) - \text{Branco } (A_{532} - A_{600})] \times 1000 \times \text{diluições} / 156.$$

3.3.2.2 Medida da lipoperoxidação pelo FOX (oxidação do ferro pelo xilenol laranja)

Os ensaios para avaliar a concentração de hidropéroxido lipídico foram realizados conforme descrito por Hermes-Lima et al. (1995). As amostras de fígado (200 mg) foram pesadas e homogeneizadas em 1,0 mL de metanol gelado (4 °C) grau HPLC (1:5 g/v). Os homogenatos foram centrifugados a 1000 g por 10 min e os sobrenadantes foram removidos para o ensaio. Então, foram misturados os seguintes reagentes: 250 µL de FeSO₄ 1 mM, 100 µL de H₂SO₄ 0,25 M, 100 µL de xilenol laranja 1 mM, 450 µL de água e adicionado 60 µL do homogenato, ajustando o volume final para 1 mL com água destilada. O branco foi preparado substituindo o volume de homogenato por água destilada. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 24 horas até que a reação estivesse completa. A absorbância foi medida em 580 nm. Após esta leitura foram adicionados 5 µL de cumeno hidropéroxido 1 mM, aguardou-se por 60 min e a absorbância foi novamente medida em 580 nm.

A concentração dos hidroperóxidos lipídicos (substâncias reativas do FOX) foram expressos em termos de equivalentes de cumeno hidroperóxido por grama de tecido (CHPE/g) através da fórmula:

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

V = volume do extrato de amostra usado
6 = fator de diluição 1:5 g/v.

3.3.2.3 Avaliação do dano ao DNA

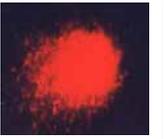
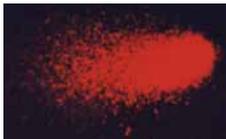
No intuito de avaliar as substâncias aqui pesquisadas poderiam reduzir possíveis danos ao DNA promovidos pelas EROs utilizou-se o teste do cometa, um ensaio de genotoxicidade, o qual une técnicas citogenéticas e bioquímicas para detecção de danos ao DNA, inclusive danos oxidativos (HARTMANN e SPEIT 1995; TUO, 1996.).

O teste COMETA (SINGH et al., 1988), avalia-se a fragmentação do DNA através de eletroforese horizontal e de microscopia de imunofluorescência. Este teste fundamenta-se na eletroforese de células lisadas sob condições alcalinas e embebidas em gel de agarose de baixo ponto de fusão, sobre lâminas de microscopia (ANDERSON, et al., 1994; KLAUDE et al., 1996). Diluiu-se 20 µL do sangue periférico dos camundongos em 100 µL de PBS (1:10). A partir desta diluição, coletou-se 10 µL e então homogeneizou-se em 70 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMPA 0,75%) a 37°C. Transferiu-se este sistema (células/LPMA) para uma lâmina de microscopia, a qual continha uma pré-camada de agarose de ponto de fusão normal (NMPA 1%) obtida previamente por esfregaço. Em seguida, cobriu-se o referido sistema, com uma lamínula de vidro. As lâminas foram então acondicionadas a 5°C durante 5 min. A seguir, efetuou-se a retirada das lamínulas e transferiu-se as lâminas para cubas apropriadas e envoltas em papel alumínio para o abrigo da luz, contendo solução de lise a 4°C (2,5 mM NaCl, 100 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10% DMSO e 10 mM Tris pH 10). Mergulharam-se, então, as lâminas na referida solução por, no mínimo, 24 h. Após o período de lise das membranas

celulares e nucleares, as lâminas foram mantidas durante 30 min em tampão alcalino a 4°C (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH 13) e o DNA liberado foi então, submetido a uma eletroforese horizontal sob voltagem de 25V e corrente elétrica de 280 mA por 20 min. A seguir, as lâminas foram lavadas três vezes em intervalos de 15 min, com solução neutralizadora que consiste em tampão Tris 0,4 M, pH 7,5. Finalmente, cada lâmina foi corada com brometo de etídeo (2 µg/mL) e então, fixada com etanol a 4°C. Efetuou-se a leitura das lâminas em microscopia de imunofluorescência (400x) com filtro de excitação de 515 nm e filtro de extinção de 560 nm (SINGH et al., 1988).

Para o controle negativo das amostras utilizou-se uma alíquota de sangue periférico de um camundongo controle, sem tratamento. Para o controle positivo, utilizou-se 10 µL de sangue periférico de camundongo controle adicionando-se 100 µL de H₂O₂ 1000 µM e incubou-se por 10 min em temperatura ambiente. Para cada animal analisou-se, aleatoriamente, imagens de 100 células (50 células de cada lâmina, em duplicata), e o tamanho dos cometas (região nuclear + cauda) foi classificado visualmente por microscopia. Os cometas de cada animal foram divididos em classes, de acordo com o tamanho da cauda, variando de cometas sem cauda (indicativos de ausência de dano ao DNA e denominados cometas de classe 1) até cometas que apresentaram cauda longa (indicativos de dano máximo ao DNA e denominados cometas de classe 5). Com o intuito de expressar-se o dano visualizado nas lâminas em valores numéricos, cada classe recebeu uma pontuação, segundo demonstrado na Tabela 2.

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

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

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

Índice de dano ao DNA = (Nº de cometas classe 1 x 0) + (Nº de cometas classe 2 x 1) + (Nº de cometas classe 3 x 2) + (Nº de cometas classe 4 x 3) + (Nº de cometas classe 5 x 4).

Conseqüentemente, obteve-se uma única pontuação para cada grupo estudado. Então, o índice de dano de cada grupo variou de 0 (ausência de dano) a 400 (presença de dano máximo). Para todas as amostras, os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. das unidades arbitrárias de cada grupo experimental e da quantidade de células por classe de dano.

3.3.2.4 Avaliação do dano oxidativo a proteínas

O dano oxidativo às proteínas por carbonilação foi determinado de acordo com o método proposto por Levine e Stadtman (1990). Os fígados foram homogeneizados (na diluição de 1:10) em 5% de ácido sulfossalicílico gelado e então centrifugados a 15000 g por 5 min. Removeu-se os sobrenadantes e foi adicionado aos precipitados 0,5 mL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH, 10 mM em 2 M de HCl). As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 1 hora, sendo vigorosamente agitadas a cada 15 min. Então, foram adicionados 500 μ L de TCA 20% e os tubos foram agitados e centrifugados por 6 min a 15000 g. Os sobrenadantes foram descartados e o excesso de DNPH foi removido lavando-se os precipitados por três vezes com uma solução de etanol: acetato de etila (1:1), e em seguida agitando-se os tubos e centrifugando por 3 min a 15000 g. Os precipitados resultantes foram dissolvidos em 1,0 mL de cloreto de guanidina 6 M, submetidos à agitação e incubados por 15 min a 37 °C, para dissolução. As absorvâncias máximas no intervalo de 360 – 370 nm foram determinadas e os valores finais das proteínas carboniladas foram determinados utilizando o coeficiente de extinção molar de 22 mM. Os brancos foram preparados substituindo-se a DNPH por HCl 2 M.

3.3.2.5 Conteúdo de Glutathiona reduzida

Amostras de fígado foram precipitadas com TCA 12% nas diluições 1:10 (p/v) homogeneizadas com cerca de 20 impactos em homogeneizador Potter-Elvehjem, seguidos de centrifugação a 5000 *g* durante 5 min. A concentração de pequenos tióis foi avaliada imediatamente após a obtenção dos extratos ácidos hepáticos (BEUTLER et al., 1963). A adição de 0,2 mL de DTNB (2,5 mM) nas cubetas contendo 1,9 mL de tampão fosfato de potássio 80 mM pH 8,0 e 0,1 mL do extrato ácido permitiu, após cerca de 2 min, a obtenção máxima de formação do ânion tiolato (TNB) de cor amarela, mensurável em 412 nm. As análises foram feitas em duplicata e os valores expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$.

3.3.2.6 Atividade da enzima catalase

Para análise da atividade desta enzima, quantificou-se a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em 240 nm, pela enzima presente na amostra (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 duplicata, sendo os valores expressos em $\text{mmol de H}_2\text{O}_2 \text{ consumido min}^{-1} \text{ g}^{-1}$.

3.3.2.7 Atividade da enzima glutationa S-transferase

As GSTs são um grupo de enzimas que catalisam a formação de tioéteres pela adição de GSH a um grande número de compostos que contém um carbono eletrofílico. A atividade da GST foi medida espectrofotometricamente em 340 nm (HABIG et al., 1974). A amostra foi adicionada em um meio contendo 10 μL de CDNB 0,1 M, 10 μL de GSH 0,1 M e 970 μL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, sendo que na cubeta de referência o volume de amostra foi substituído por tampão. As análises foram feitas em duplicatas e os valores da atividade da enzima expressos em μmol de CDNB conjugado $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$.

3.3.3 Marcadores de função hepática

3.3.3.1 Determinação da atividade da enzima AST

Para determinação da atividade desta enzima foi utilizado o método cinético de tempo fixo e medição de tempo final através de um kit comercial para diagnóstico clínico (Labtest Diagnóstica S.A.). Pré-incubaram-se 0,25 mL de tampão 67 mmol/L pH 7,4 contendo ácido α -cetoglutárico 2 mmol/L, ácido L-aspártico 99 mmol/L e azida sódica 15,4 mmol/l em banho a 37 °C durante 2 min. Após este período, foram adicionados 0,05 mL de soro e a mistura foi incubada novamente a 37 °C durante exatamente 60 min. Posteriormente, adicionou-se 0,25 mL do reagente de cor (2,4 dinitrofenilhidrazina 1 mmol/L e ácido clorídrico 1 mol/L), incubou-se a temperatura ambiente durante 20 min e adicionou-se 0,25 mL de NaOH. As absorvâncias foram determinadas em 505 nm e os valores foram expressos em UI.

3.3.3.2 Determinação da atividade da enzima ALT

Para determinação desta enzima foi utilizado o método cinético de tempo fixo e medição de ponto final através de um kit comercial para diagnóstico clínico (Labtest Diagnóstica S.A.). Pré-incubaram-se 0,25 mL de tampão 67 mmol/L pH 7,4 contendo ácido α -cetoglutárico 2 mmol/L, ácido L-alanina 100 mmol/L e azida sódica 15,4 mmol/l em banho a 37 °C durante 2 min. Após este período, foram adicionados 0,05 mL de soro e a mistura foi incubada novamente a 37 °C durante exatamente 60 min. Posteriormente, adicionou-se 0,25 mL do reagente de cor (2,4 dinitrofenilhidrazina 1 mmol/L e ácido clorídrico 1 mol/L), incubou-se à temperatura ambiente durante 20 min e adicionou-se 0,25 mL de NaOH. As absorvâncias foram determinadas em 505 nm e os valores foram expressos em UI.

3.3.4 Atividade Hipotrigliceridêmica

3.3.4.1 Modelo da hiperlipidemia induzida pela dieta hipercalórica

3.3.4.1.1 Protocolo experimental

Após o período de adaptação, os ratos foram divididos em quatro grupos de 6 animais com uma distribuição uniforme de peso. Nos animais do grupo 1, foi induzida a hiperlipidemia de forma crônica, através da administração de dieta hipercalórica durante um período de 30 dias, conforme proposto por ROTHWELL et. al. (1982) (Tabela 3), enquanto que aos animais do grupo 2 foram administrados 6,0 mg/kg de floroacetofenona (V.O.), paralelamente a dieta hipercalórica. Ao grupo 3 foi administrado uma dieta normal durante 30 dias e ao grupo 4 foi administrado simultaneamente floroacetofenona (6,0 mg/kg).

Após 15 e 30 dias de tratamento, foi coletado sangue dos animais pela cavidade ocular. O soro foi separado por centrifugação e alíquotado para determinação das concentrações de triglicerídeos.

Tabela 3. Composição e cronograma da dieta hipercalórica, proposta por ROTHWELL, SVILLE e STOCK (1982).

ORDEM	COMPONENTES DA DIETA	PESOS (g)	DIAS
1	Biscoito de chocolate Suspiros Cheetos	5 g de cada componente a cada dia *	1 ^o dia 2 ^o dia 3 ^o dia
2	Pé-de-moleque Chocolate Biscoito de chocolate	5 g de cada componente a cada dia *	4 ^o dia 5 ^o dia 6 ^o dia
3	Amendoim Baconzitos Suspiros	5 g de cada componente a cada dia *	7 ^o dia 8 ^o dia 9 ^o dia
4	Cheetos Rosquita de leite Amendoim	5 g de cada componente a cada dia *	10 ^o dia 11 ^o dia 12 ^o dia
5	Amendoim Biscoito de chocolate Baconzitos	5 g de cada componente a cada dia *	13 ^o dia 14 ^o dia 15 ^o dia
6	Rosquita de leite Baconzitos Amendoim	5 g de cada componente a cada dia *	16 ^o dia 17 ^o dia 18 ^o dia
7	Bolacha sortida Batata frita Amendoim	5 g de cada componente a cada dia *	19 ^o dia 20 ^o dia 21 ^o dia
8	Chocolate Queijo Pé-de-moleque	5g de cada componente a cada dia *	22 ^o dia 23 ^o dia 24 ^o dia
9	Bolacha sortida Pé-de-moleque Queijo	5 g de cada componente a cada dia *	25 ^o dia 26 ^o dia 27 ^o dia
10	Queijo Rosquita de leite Bolacha sortida	5 g de cada componente a cada dia *	28 ^o dia 29 ^o dia 30 ^o dia

* Foi acrescido mais 15g de ração comercial padronizada para complementação da dieta, equivalente ao período de um dia.

Em 15 e 30 dias, foi coletado sangue dos animais para dosagens bioquímicas.

3.3.4.1.2 Determinação da concentração de triglicerídeos

Os níveis sanguíneos de triglicérides foram determinados pelo método enzimático da lipase lipoprotéica (BUCOLO & DAVID, 1973), em triplicata, utilizando o kit de reagentes para triglicérides (Kit Labtest Diagnóstica S.A.). O método fundamenta-se nas reações do glicerol, que é liberado a partir dos triglicérides, pela ação da lipase e então convertido em glicerol 3-fosfato pela ação da glicerolquinase. O glicerol 3-fosfato é oxidado à dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio, na presença da glicerol fosfato oxidase. Ocorre uma reação de acoplamento entre o peróxido de hidrogênio e a 4-aminoantipirina pela peroxidase, produzindo quinoneimina, a qual foi medida na absorvância de 540 nm.

3.3.4.2 Inibição da absorção de lipídeos

3.3.4.2.1 Protocolo experimental

A inibição da absorção intestinal de triglicerídeo foi avaliada conforme protocolo experimental proposto por Shimoda (2003).

Os camundongos foram divididos em grupos de 6 animais da seguinte forma: grupo controle negativo sem tratamento algum; grupo controle tratado com 0,5 mL de azeite de oliva por via oral; grupo pré-tratado com THA ou Gala (6,0 mg/kg), 30 minutos antes da administração do azeite de oliva; grupo controle positivo pré-tratado com Xenical® (Orlistat) 250 mg/kg, 30 minutos antes da administração do azeite de oliva.

Após este período, foi coletado sangue dos animais em 2, 4 e 6 horas após a administração do óleo de oliva. Imediatamente após a coleta sanguínea, os animais foram mortos por deslocamento cervical e os intestinos foram retirados para

as dosagens da atividade da lipase. O soro foi separado por centrifugação e alíquotado para a realização das análises bioquímicas (triglicerídeos e atividade da lipase).

3.3.4.2.2 Determinação da concentração de triglicérides

Os níveis sanguíneos de triglicérides foram determinados conforme método apresentado no item 3.3.4.1.2.

3.3.4.2.3 Determinação da atividade da lipase

A atividade da lipase foi determinada em triplicata pelo método enzimático, utilizando o kit de reagentes para lipase (Kit *In Vitro* Diagnóstica Ltda.). A lipase hidrolisa especificamente um tioéster, liberando o tioálcool correspondente e ácido 5,5-ditio-bis-2-nitobenzóico em meio tamponado, formando um ânion de coloração amarela, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da enzima, e apresenta a absorção máxima em 412 nm.

3.4 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 de $p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$.

4 RESULTADOS

4.1 Atividade antioxidante *in vitro*

4.1.1 Determinação da atividade “scavenger” do radical DPPH

Na Tabela 4 estão representados os resultados da atividade antioxidante dos análogos sintéticos da acetofenona e rutina, utilizando o radical livre DPPH. Observa-se que a atividade antioxidante dos compostos testados aumenta com a elevação da concentração dos compostos. Porém, quando calculada a concentração eficaz, apenas 3 análogos sintéticos da acetofenona (THA, Gala e 2,6-DHA), além da rutina, apresentaram atividade antioxidante importante (CE_{50} inferior a 1000 $\mu\text{g/mL}$). Entretanto, é importante notar que nenhum dos compostos avaliados apresentaram potencial antioxidante frente ao radical DPPH superior ao da rutina, um flavonóide de reconhecida atividade antioxidante, utilizado como controle positivo do ensaio.

Tabela 4. Avaliação da atividade antioxidante dos análogos sintéticos da acetofenona e rutina através da medida da capacidade “scavenger” do radical DPPH, testadas em concentrações crescentes dos compostos (5, 10, 25, 50, 125, 250 $\mu\text{g/mL}$).

Compostos	AA%						CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ¹
	5	10	25	50	125	250	
THA	7,6 ± 0,8	16,1 ± 1,2	28,1 ± 1,2	40,2 ± 1,0	60,2 ± 1,0	70,6 ± 0,9	76,35 ± 0,73
Gala	sa	27,1 ± 0,3	63,8 ± 0,9	80,7 ± 0,8	85,4 ± 0,9	86,2 ± 0,9	17,74 ± 0,35
2,6-DHA	9,9 ± 0,7	17,8 ± 0,8	28,1 ± 0,8	34,4 ± 0,4	43,3 ± 0,8	52,4 ± 0,8	276,59 ± 0,45
2- HA	0,1 ± 0,1	0,9 ± 0,2	1,3 ± 0,1	2,4 ± 0,1	3,4 ± 0,3	6,5 ± 0,8	> 1000
4-MA	sa	sa	sa	sa	sa	sa	sa
3,4-DCA	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	2,7 ± 1,0	5,7 ± 0,1	7,7 ± 0,3	> 1000
4-AA	sa	0,6 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,6 ± 0,3	3,4 ± 0,6	5,5 ± 0,7	> 1000
3-NA	sa	0,1 ± 0,0	2,3 ± 0,2	2,8 ± 0,1	3,2 ± 0,1	3,7 ± 0,4	> 1000
4-NA	sa	sa	sa	sa	sa	sa	sa
Rutina	32,2 ± 0,8	65,3 ± 2,4	89,2 ± 0,7	100	100	100	7,00 ± 0,61

Todos os valores foram expressos como média ± EPM e os ensaios foram realizados em triplicata.

¹ Os valores da concentração eficaz (CE_{50}) foram determinados por regressão exponencial.

sa - sem atividade antioxidante nas concentrações testadas.

THA = fluoroacetofenona; Gala = Galacetofenona; 2,6-DHA = 2,6-Dihidroxiacetofenona; 2- HA = 2-Hidroxiacetofenona; 4-MA = 4-Metoxiacetofenona; 3,4-DCA = 3,4-Dicloroacetofenona; 4-AA = 4-Aminoacetofenona; 3-NA = 3-Nitroacetofenona; 4-NA = 4-Nitroacetofenona.

4.1.2 Formação e monitoramento da atividade “scavenger” do O₂^{•-}

4.1.2.1 Avaliação da atividade da Xantina Oxidase

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados dos efeitos dos análogos sintéticos da acetofenona e rutina sobre a atividade enzimática da XO. Podemos observar que o THA apresentou um potente efeito inibidor da XO (CE₅₀ inferior a 50 µg/mL) quando comparado à rutina, enquanto que a Gala e 4-MA mostraram moderado efeito inibidor (CE₅₀ inferior a 500 µg/mL), e a 3-NA apresentou efeito semelhante a este flavonóide (CE₅₀ inferior a 1000 µg/mL). A avaliação da atividade da XO frente à exposição a um determinado composto é uma medida indireta do potencial antioxidante deste, uma vez que esta enzima é uma importante fonte geradora de ânions superóxido nos organismos.

Tabela 5. Efeito dos análogos sintéticos da acetofenona e rutina sobre a atividade da xantina oxidase (XO), testadas em concentrações crescentes dos compostos (50, 125, 250, 500 e 1000 µg/mL).

Compostos	% Inibição ¹					CE ₅₀ (µg/mL) ²
	50	125	250	500	1000	
THA	52,0 ± 0,7	59,1 ± 1,6	73,6 ± 1,4	97,0 ± 0,9	99,6 ± 1,0	47,00 ± 0,92
Gala	15,1 ± 1,9	35,4 ± 1,4	39,9 ± 1,7	50,0 ± 0,6	56,2 ± 2,5	488,52 ± 1,48
2,6-DHA	31,0 ± 2,1	22,5 ± 4,6	15,3 ± 3,4	11,7 ± 4,7	8,4 ± 5,3	> 1000
2- HA	21,6 ± 0,4	25,5 ± 1,6	30,5 ± 1,7	32,7 ± 0,5	34,5 ± 0,8	> 1000
4-MA	29,2 ± 0,9	33,0 ± 1,1	38,9 ± 0,8	57,3 ± 0,7	68,2 ± 0,9	397,67 ± 0,84
3,4-DCA	12,8 ± 1,3	19,7 ± 0,7	20,8 ± 0,6	26,5 ± 0,5	27,9 ± 0,8	> 1000
4-AA	31,9 ± 0,8	21,2 ± 1,0	16,9 ± 1,7	12,4 ± 0,8	3,4 ± 2,1	> 1000
3-NA	15,2 ± 1,1	24,6 ± 1,4	26,9 ± 0,7	34,1 ± 0,8	43,9 ± 1,2	918,06 ± 0,67
4-NA	61,3 ± 1,2	60,1 ± 0,5	57,5 ± 2,0	53,7 ± 1,3	53,4 ± 0,9	> 1000
Rutina	16,9 ± 0,5	24,4 ± 0,9	30,6 ± 0,8	37,5 ± 0,4	64,6 ± 1,0	939,88 ± 0,43

Todos os valores foram expressos como média ± EPM e os ensaios foram realizados em triplicata.

¹Capacidade de inibir a XO.

²Os valores da concentração inibitória (CE₅₀) foram determinados por regressão exponencial.

THA = floroacetofenona; Gala = Galacetofenona; 2,6-DHA = 2,6-Dihidroxiacetofenona; 2- HA = 2-Hidroxiacetofenona; 4-MA = 4-Metoxiacetofenona; 3,4-DCA = 3,4-Dicloroacetofenona; 4-AA = 4-Aminoacetofenona; 3-NA = 3-Nitroacetofenona; 4-NA = 4-Nitroacetofenona.

4.1.2.2 Avaliação da capacidade “scavenger” do O₂^{•-}

Na Tabela 6 estão representados os resultados da avaliação da atividade antioxidante dos análogos sintéticos da acetofenona e rutina sobre a medida de “scavenger” do O₂^{•-}, avaliada pela inibição da redução o “nitro blue tetrazolium” (NBT). Os dados obtidos demonstraram que a THA foi mais eficiente (CE₅₀ inferior a 100 µg/mL) no “scavenger” do O₂^{•-} que a própria rutina (CE₅₀ inferior a 500 µg/mL), enquanto a Gala, 2-HA, 4-MA e 3,4-DCA, tiveram fraca atividade antioxidante (CE₅₀ maior que 1000 µg/mL), em comparação ao flavonóide utilizado como padrão antioxidante.

Tabela 6. Avaliação da atividade antioxidante dos análogos sintéticos da acetofenona e rutina através da medida da capacidade “scavenger” O₂^{•-}, testadas em concentrações crescentes dos compostos (50, 125, 250, 500 e 1000 µg/mL).

Compostos	AA% ¹					CE ₅₀ (µg/mL) ²
	50	125	250	500	1000	
THA	66,2 ± 2,3	70,8 ± 0,5	78,0 ± 3,0	92,5 ± 1,5	97,6 ± 2,0	66,49 ± 2,08
Gala	11,6 ± 0,5	15,6 ± 1,5	18,4 ± 0,2	19,0 ± 0,5	47,0 ± 2,2	> 1000
2,6-DHA	sa	sa	sa	sa	sa	sa
2- HA	17,7 ± 1,4	20,0 ± 0,6	27,6 ± 1,3	29,5 ± 1,4	32,3 ± 2,4	> 1000
4-MA	12,0 ± 1,8	14,4 ± 1,3	15,6 ± 1,9	17,2 ± 1,0	18,4 ± 2,7	> 1000
3,4-DCA	0,00	1,5 ± 1,3	2,2 ± 1,6	5,8 ± 1,7	9,5 ± 2,0	> 1000
4-AA	sa	sa	sa	sa	sa	sa
3-NA	sa	sa	sa	sa	sa	sa
4-NA	sa	sa	sa	sa	sa	sa
Rutina	16,9 ± 0,5	24,4 ± 0,8	30,6 ± 0,8	37,5 ± 0,4	64,6 ± 1,0	358,64 ± 0,83

Todos os valores foram expressos como média ± EPM e os ensaios foram realizados em triplicata.

¹Redução do NBT pelo O₂^{•-}.

²Os valores da concentração eficaz (CE₅₀) foram determinados por regressão exponencial.

sa - sem atividade antioxidante nas concentrações testadas.

THA = floroacetofenona; Gala = Galacetofenona; 2,6-DHA = 2,6-Dihidroxiacetofenona; 2- HA = 2-Hidroxiacetofenona; 4-MA = 4-Metoxiacetofenona; 3,4-DCA = 3,4-Dicloroacetofenona; 4-AA = 4-Aminoacetofenona; 3-NA = 3-Nitroacetofenona; 4-NA = 4-Nitroacetofenona.

4.1.3 Formação e monitoramento da atividade “scavenger” do $\cdot\text{OH}$

A habilidade de scavenger do $\cdot\text{OH}$ ou quelação do ferro pelos análogos sintéticos da acetofenona e rutina, foi avaliada usando o ensaio de degradação da desoxirribose. A Tabela 7 exhibe a atividade antioxidante dos análogos sintéticos da acetofenona e rutina onde pode observar-se que a THA apresentou forte potencial antioxidante equivalente ao da rutina (CE_{50} inferiores a 200 $\mu\text{g/mL}$), enquanto 2,6-DHA, 2-HA e 3-NA tiveram fraca atividade antioxidante (CE_{50} inferior a 1000 $\mu\text{g/mL}$), e Gala, 4-AA, 4-MA, 3,4-DCA e 4-NA, apresentaram muito fraca atividade (CE_{50} superior a 1000 $\mu\text{g/mL}$) quando comparados ao flavonóide padrão.

Tabela 7. Avaliação da atividade antioxidante dos análogos sintéticos da acetofenona e rutina através da medida da capacidade “scavenger” do $\cdot\text{OH}$, testadas em concentrações crescentes dos compostos (10, 100, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$).

Compostos	AA%				CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ¹
	10	100	500	1000	
THA	22,85 ± 1,61	47,74 ± 0,95	67,69 ± 1,98	74,53 ± 1,28	113,92 ± 1,26
Gala	4,38 ± 1,18	13,18 ± 1,90	30,63 ± 3,37	49,21 ± 1,41	> 1000
2,6-DHA	15,63 ± 1,51	27,43 ± 2,64	43,14 ± 1,26	51,58 ± 2,13	886,60 ± 1,64
2- HA	28,35 ± 1,38	29,09 ± 2,23	36,57 ± 0,74	51,84 ± 1,72	964,58 ± 0,52
4-MA	10,88 ± 1,53	18,81 ± 2,04	37,38 ± 1,95	40,32 ± 2,15	> 1000
3,4-DCA	9,26 ± 1,76	19,56 ± 1,27	36,67 ± 2,01	41,78 ± 1,99	> 1000
4-AA	10,96 ± 1,46	11,13 ± 0,92	36,42 ± 0,88	35,01 ± 2,78	> 1000
3-NA	8,60 ± 1,35	15,24 ± 2,08	37,15 ± 1,78	51,95 ± 2,34	940 ± 1,58
4-NA	1,16 ± 1,53	9,18 ± 2,48	38,37 ± 2,00	47,76 ± 2,27	> 1000
Rutina	27,96 ± 0,90	46,00 ± 2,22	73,82 ± 2,32	85,05 ± 3,19	143,57 ± 1,86

Todos os valores foram expressos como média ± EPM e os ensaios foram realizados em triplicata.

¹Os valores da concentração eficaz (CE_{50}) foram determinados por regressão exponencial.

THA = floroacetofenona; Gala = Galacetofenona; 2,6-DHA = 2,6-Dihidroxiacetofenona; 2- HA = 2-Hidroxiacetofenona; 4-MA = 4-Metoxiacetofenona; 3,4-DCA = 3,4-Dicloroacetofenona; 4-AA = 4-Aminoacetofenona; 3-NA = 3-Nitroacetofenona; 4-NA = 4-Nitroacetofenona.

4.1.4 Proteção à peroxidação lipídica

A proteção contra a peroxidação lipídica induzida por peróxido tert-butílica foi avaliada em homogenato de fígado de ratos. A Tabela 8 mostra o efeito protetor dos análogos sintéticos da acetofenona e rutina onde pode observar-se que a THA apresentou um forte efeito protetor da lipoperoxidação ($CE_{50} = 151,73 \pm 0,71$), maior que a rutina ($CE_{50} = 203,83 \pm 1,44$), enquanto a Gala, 2,6-DHA, 2-HA, 3-NA e 4-NA tiveram uma fraca atividade antioxidante (CE_{50} superior a 500 $\mu\text{g/mL}$), quando comparado ao flavonóide padrão.

Tabela 8. Avaliação da atividade antioxidante dos análogos sintéticos da acetofenona e rutina através da medida da proteção à lipoperoxidação em homogenato de fígado de rato avaliada em termos de TBARS, testadas em concentrações crescentes dos compostos (31,25; 62,5; 125; 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$).

Compostos	AA%					CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ¹
	31,25	62,5	125	250	500	
THA	29,7 \pm 1,8	36,9 \pm 1,2	47,6 \pm 0,3	54,3 \pm 0,9	55,7 \pm 1,4	151,73 \pm 0,71
Gala	sa	8,8 \pm 1,8	21,7 \pm 4,5	32,9 \pm 1,7	37,8 \pm 2,4	> 500
2,6-DHA	18,2 \pm 2,7	25,5 \pm 1,2	30,9 \pm 1,2	35,45 \pm 1,8	43,7 \pm 3,8	> 500
2- HA	17,7 \pm 1,4	20,1 \pm 0,6	27,6 \pm 1,3	29,5 \pm 1,4	32,3 \pm 2,4	> 500
4-MA	sa	sa	sa	sa	sa	sa
3,4-DCA	sa	sa	sa	sa	sa	sa
4-AA	sa	sa	sa	sa	sa	sa
3-NA	sa	sa	sa	7,6 \pm 1,7	13,5 \pm 2,3	> 500
4-NA	sa	sa	8,2 \pm 0,9	13,3 \pm 1,8	25,5 \pm 2,1	> 500
Rutina	25,1 \pm 2,4	35,8 \pm 3,1	45,5 \pm 1,0	47,0 \pm 1,7	54,0 \pm 1,1	203,83 \pm 1,44

Todos os valores foram expressos como média \pm EPM e os ensaios foram realizados em triplicata.

¹Os valores da concentração eficaz (CE_{50}) foram determinados por regressão exponencial.

sa - sem atividade antioxidante nas concentrações testadas.

THA = floacetofenona; Gala = Galacetofenona; 2,6-DHA = 2,6-Dihidroxiacetofenona; 2- HA = 2-Hidroxiacetofenona; 4-MA = 4-Metoxiacetofenona; 3,4-DCA = 3,4-Dicloroacetofenona; 4-AA = 4-Aminoacetofenona; 3-NA = 3-Nitroacetofenona; 4-NA = 4-Nitroacetofenona.

4.2 Avaliação dos indicadores de estresse oxidativo e atividade antioxidante *in vivo*

A partir dos dados obtidos com os ensaios de atividade antioxidante *in vitro*, foram selecionados os compostos THA e Gala para realização dos ensaios *in vivo* e os resultados obtidos são apresentados a seguir.

4.2.1 Avaliação do dano à membrana celular

4.2.1.1 Medida da lipoperoxidação pelo TBARS

A peroxidação lipídica endógena foi avaliada pela detecção dos seus derivados lipoperóxidos, através de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). Confirmando os resultados obtidos com respeito à atividade antioxidante *in vitro*, a THA causou uma maior proteção contra a lipoperoxidação em fígado de camundongos expostos ao agente estressor CCl₄, levando a uma redução de 82,7% enquanto a rutina reduziu em 53,6%. Curiosamente, a Gala que demonstrou *in vitro* uma fraca proteção à lipoperoxidação, *in vivo* apresentou uma proteção semelhante à THA. Também é importante ressaltar que não houve diferença estatística entre o grupo controle negativo e o grupo pré-tratado com THA (Figura 7), sugerindo um possível efeito protetor desta acetofenona contra o estresse oxidativo induzido pelo CCl₄.

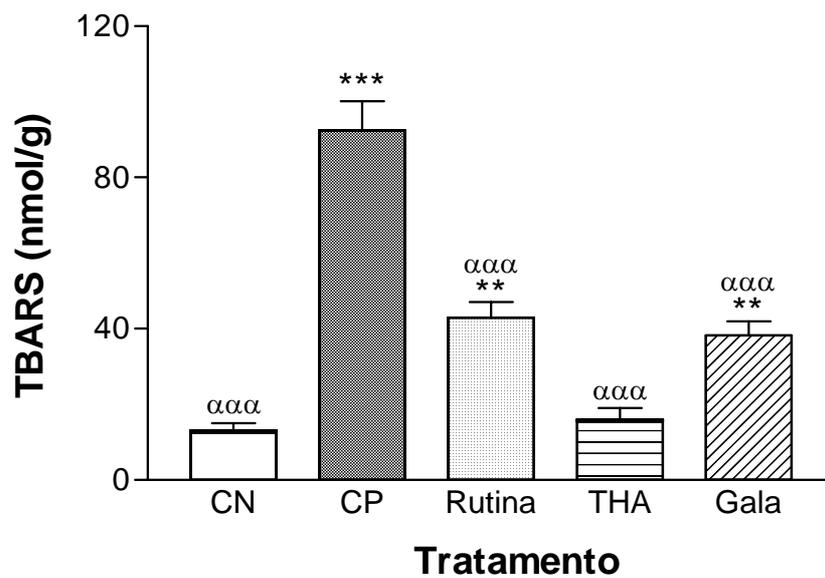


Figura 7. Índice de peroxidação lipídica (TBARS; nmol/g) em fígados de camundongos não tratados (controle negativo, CN), tratados com 0,5 mL / 100 g (30% v/v) de CCl_4 (controle positivo, CP), pré-tratados com a THA (6,0 mg/kg), pré-tratados com rutina (6,0 mg/kg), pré-tratados com Gala (6,0 mg/kg) e posteriormente tratados com CCl_4 . Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 6$. (***) e (**) representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$) e ($p < 0,01$) respectivamente, em relação ao CN. (ααα) representa diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$) em relação ao CP.

4.2.1.2 Medida da lipoperoxidação pelo FOX (oxidação do ferro pelo xilenol laranja)

Este ensaio foi utilizado para avaliar especificamente a concentração de hidroperóxido lipídico gerado em situação de estresse oxidativo. Diferentemente dos dados obtidos quando da avaliação da concentração total de lipoperóxidos (ensaio do TBARS), houve uma diminuição média de ~20% na produção de hidroperóxido nos animais pré-tratados com rutina, THA e Gala, quando comparados ao grupo controle negativo, entretanto não houve diferença estatística entre os grupos pré-tratados (Figura 8). Estes dados sugerem que a capacidade de proteção ao dano de membrana celular causado pelo CCl_4 em termos de hidroperoxidação ocorreu semelhantemente para os três compostos avaliados. Também não foi observado diferença estatística significativa entre os três pré-tratamentos e o grupo controle negativo, sugerindo mais uma vez uma proteção ao estresse oxidativo induzido pelo agente estressor.

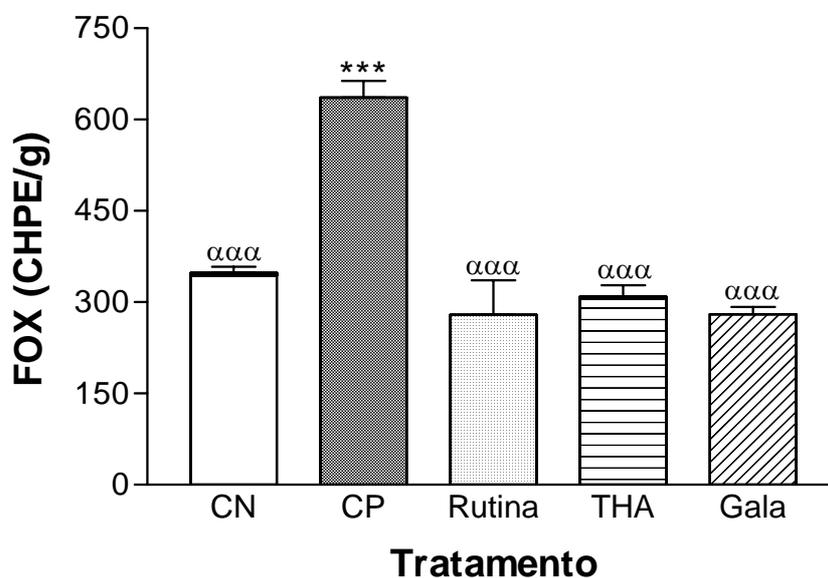


Figura 8. Índice de hidroperóxido lipídico (FOX; CHPE/g) em fígados de camundongos não tratados (controle negativo, CN), tratados com 0,5 mL / 100 g (30% v/v) de CCl_4 (controle positivo, CP), pré-tratados com a THA (6,0 mg/kg), pré-tratados com rutina (6,0 mg/kg), pré-tratados com Gala (6,0 mg/kg) e posteriormente tratados com CCl_4 . Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, n = 6. (***) representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$), em relação ao CN. (ααα) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$) em relação ao CP.

4.2.2 Avaliação do dano ao DNA

Os cometas de cada grupo foram classificados em classes, de acordo com o tamanho da cauda, variando de cometas sem cauda (com ausência de dano, classe1) até cometas que apresentaram cauda longa (dano máximo, classe 5). A Tabela 6 apresenta a porcentagem de cometas em cada classe para cada grupo analisado. O CN demonstrou uma baixa porcentagem de dano ao DNA, com cometas principalmente nas classes 1 (75,0%) e 2 (25,0%). Em contraste, o controle de peróxido de hidrogênio (CH_2O_2) apresentou a maioria dos cometas nas classes 2 (24,3%), 3 (43,6%) e 4 (15,4%), justificando a escolha do mesmo como um controle da presença de dano ao DNA. O CCl_4 mostrou-se um causador de dano ao DNA, já que os cometas deste grupo classificaram-se principalmente nas classes 2 (75,8%) e 3 (17,2%). Contudo, quando foi feito um pré-tratamento com rutina, THA e Gala os cometas concentraram-se principalmente nas classes 1 (36,2; 50,0 e 39,8%, respectivamente) e 2 (56,3; 50,0 e 50,0%, respectivamente). Este resultado assemelha-se muito às porcentagens encontradas no CN, indicando a proteção da rutina, THA e Gala frente à indução de dano ao DNA causada pelo CCl_4 .

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 a THA (6,0 mg/kg), pré-tratados com rutina (6,0 mg/kg), pré-tratados com Gala (6,0 mg/kg) e posteriormente tratados com CCl_4 .

	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	Classe 5
CN	75,0 %	25,0 %	0 %	0 %	0 %
CP	7,0 %	75,8 %	17,2 %	0 %	0 %
Rutina	36,2 %	56,3 %	7,5 %	0 %	0 %
THA	50,0 %	50,0 %	0 %	0 %	0 %
Gala	39,8 %	50,0 %	6,5 %	2,5 %	1,2 %

A quantificação do dano ao DNA após 24 horas de tratamento com CCl_4 foi feita através do índice de dano ao DNA, onde, após a classificação dos cometas, cada grupo recebeu uma pontuação (Figura 9). O CCl_4 elevou significativamente o dano ao DNA (120,4%) quando comparado ao CN ($p < 0,001$). Por outro lado, o pré-

tratamento, tanto com a rutina quanto com a THA, diminuiu o dano oxidativo ao DNA causado pelo CCl_4 , não havendo diferença estatística significativa entre estes pré-tratamentos e o grupo controle normal. Curiosamente, o pré-tratamento com a Gala não foi capaz de proteger o DNA, tendo sido observado uma elevação estatisticamente significativa na fragmentação deste ácido nucleico ($p < 0,01$), quando comparado ao grupo controle normal. Portanto, o pré-tratamento com a THA, diferentemente da Gala, apresentou um resultado surpreendente, já que se mostraram pontuações iguais ao do CN, sugerindo que o pré-tratamento com a THA protegeu o DNA de um possível ataque oxidativo ao DNA (Figura 9).

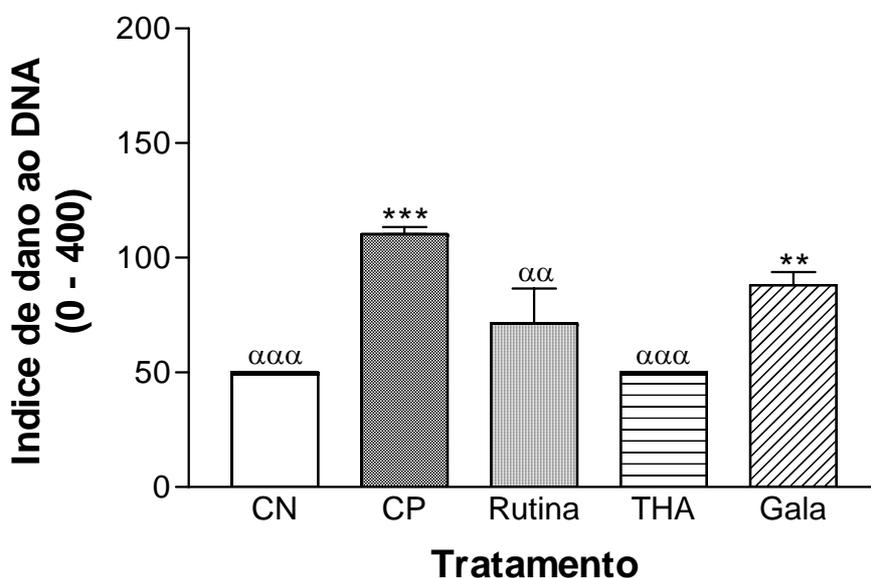


Figura 9. Dano ao DNA em sangue total de camundongos não tratados (controle negativo, CN), tratados com 0,5 mL / 100 g (30% v/v) de CCl_4 (controle positivo, CP), pré-tratados com a THA (6,0 mg/kg), pré-tratados com rutina (6,0 mg/kg), pré-tratados com Gala (6,0 mg/kg) e posteriormente tratados com CCl_4 . Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 6$. (***) e (**) representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$) e ($p < 0,01$) respectivamente, em relação ao CN. (ααα) e (αα) representam diferenças estatísticas significativa ($p < 0,001$) e ($p < 0,01$) respectivamente, em relação ao CP.

4.2.3 Avaliação do dano oxidativo a proteínas

Os dados obtidos, conforme pode ser observado na Figura 10, demonstraram que o tratamento dos animais com CCl_4 causou uma elevação de 40,5% na carbonilação de proteínas, mas que o pré-tratamento com a THA, Gala ou rutina foi capaz de bloquear este ataque oxidativo. Confirmando os dados obtidos com o TBARS e FOX, não houve diferença estatística significativa entre os três pré-tratamentos sugerindo mais uma vez, um potencial protetor contra o estresse oxidativo equivalente para THA, Gala e rutina.

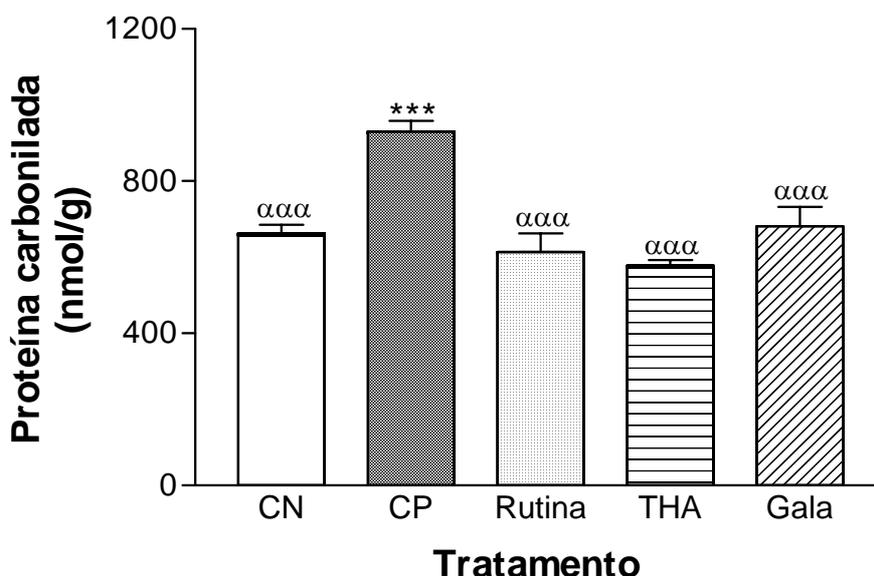


Figura 10. Índice de carbonilação de proteínas (nmol/g) em fígados de camundongos não tratados (controle negativo, CN), tratados com 0,5 mL / 100 g (30% v/v) de CCl_4 (controle positivo, CP), pré-tratados com a THA (6,0 mg/kg), pré-tratados com rutina (6,0 mg/kg), pré-tratados com Gala (6,0 mg/kg) e posteriormente tratados com CCl_4 . Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 6$. (***) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$), em relação ao CN. (ααα) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$) em relação ao CP.

4.2.4 Avaliação da concentração de glutathiona reduzida

Os resultados apresentados na Figura 11 demonstram que o CCL₄ causou uma forte depleção da GSH 65,3% e que esta diminuição não foi compensada pelo pré-tratamento com a THA, Gala ou rutina. Os dados obtidos demonstram também que ocorreu uma maior depleção ($p < 0,01$ e $p < 0,05$) nos grupos pré-tratados com os compostos em estudo, quando comparados a grupo controle positivo tratado somente com CCL₄, sugerindo um possível efeito aditivo.

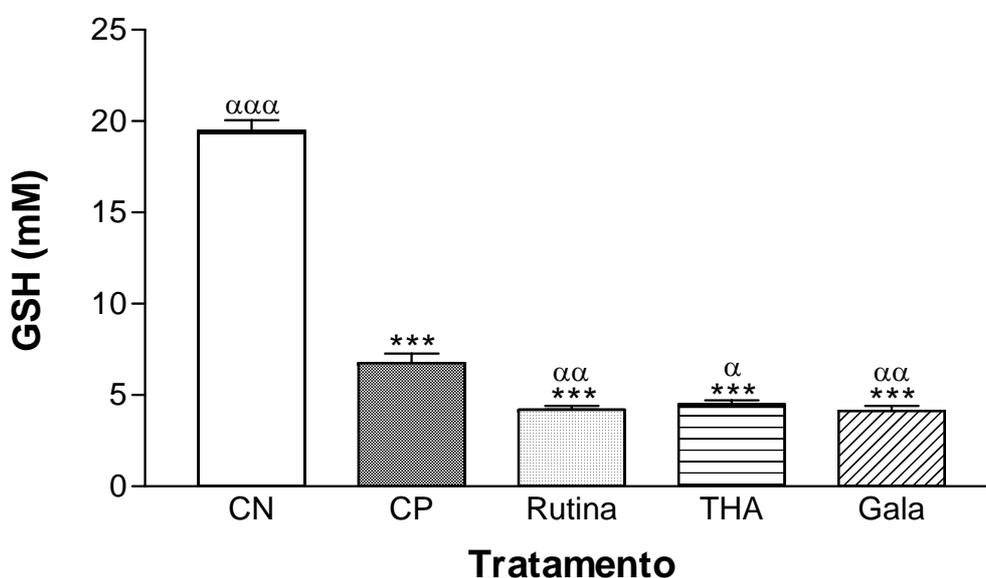


Figura 11. Concentração de GSH hepática (mM) em fígados de camundongos não tratados (controle negativo, CN), tratados com 0,5 mL / 100 g (30% v/v) de CCl₄ (controle positivo, CP), pré-tratados com a THA (6,0 mg/kg), pré-tratados com rutina (6,0 mg/kg), pré-tratados com Gala (6,0 mg/kg) e posteriormente tratados com CCl₄. Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 6$. (***) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$) em relação ao CN. (ααα), (αα) e (α) representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$), ($p < 0,01$) e ($p < 0,05$) respectivamente, em relação ao CP.

4.2.3 Atividade da enzima catalase

Os resultados apresentados na Figura 12 demonstram que o CCl_4 causou uma pequena elevação na atividade da CAT, a qual aparentemente, foi revertida pelo pré-tratamento com a THA, porém não estatisticamente significativa. Curiosamente, tanto o pré-tratamento com rutina quanto Gala, elevaram sensivelmente a atividade da CAT quando comparada ao grupo controle negativo ($p < 0,001$) e ao grupo controle positivo ($p < 0,001$).

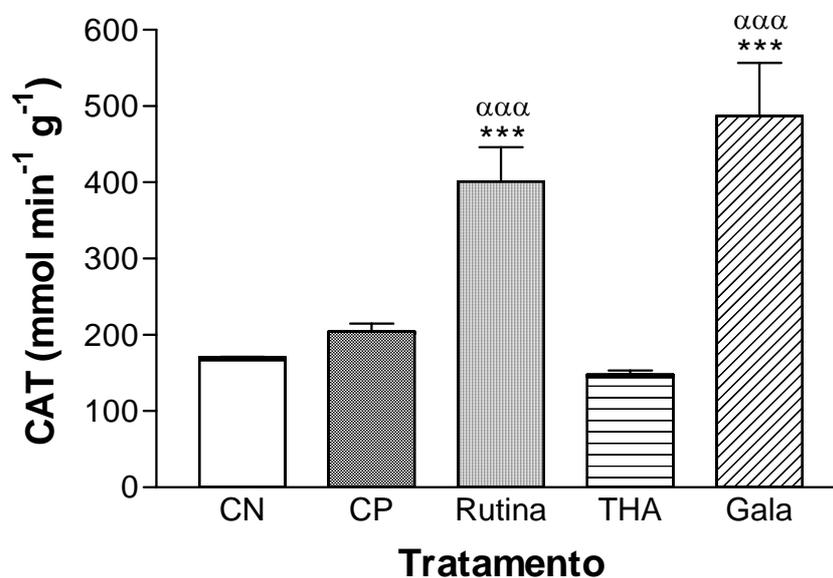


Figura 12. Atividade da CAT ($\text{mmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) em fígados de camundongos não tratados (controle negativo, CN), tratados com 0,5 mL / 100 g (30% v/v) de CCl_4 (controle positivo, CP), pré-tratados com a THA (6,0 mg/kg), pré-tratados com rutina (6,0 mg/kg), pré-tratados com Gala (6,0 mg/kg) e posteriormente tratados com CCl_4 . Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 6$. (*) representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao CN. ($\alpha\alpha\alpha$) e (α) representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$) e ($p < 0,05$) respectivamente, em relação ao CP.

4.2.4 Atividade da enzima glutationa S-transferase

Os resultados obtidos a respeito da atividade da GST são apresentados na Figura 13. Como se pode observar, diferentemente da CAT, esta enzima não teve sua atividade alterada pelo tratamento com o CCl_4 , nem mesmo com o pré-tratamento com a THA. Por outro lado, tanto o pré-tratamento com rutina quanto com Gala, de forma semelhante à CAT, causaram uma sensível elevação da atividade enzimática, quando comparadas ao grupo controle normal ($p < 0,001$), ou quando comparadas ao grupo controle positivo ($p < 0,001$).

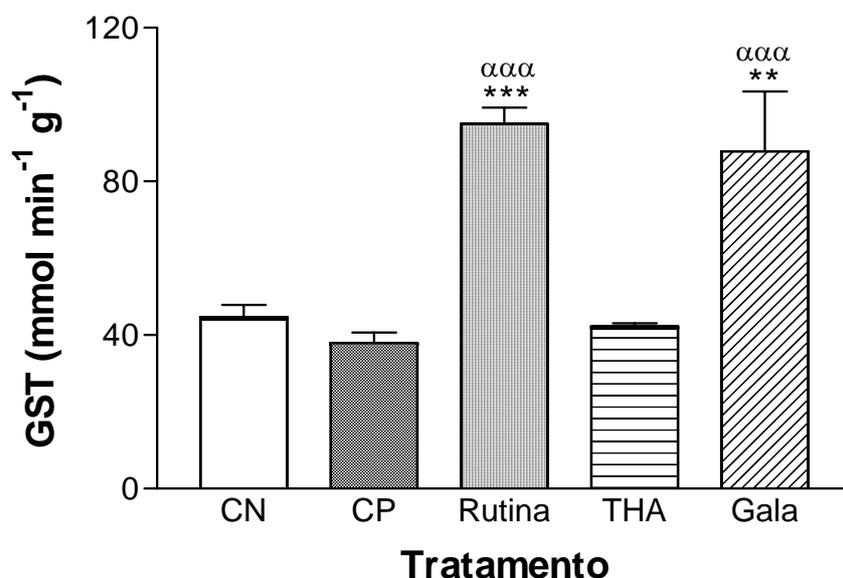


Figura 13. Atividade da GST ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) em fígados de camundongos não tratados (controle negativo, CN), tratados com 0,5 mL / 100 g (30% v/v) de CCl_4 (controle positivo, CP), pré-tratados com a THA (6,0 mg/kg), pré-tratados com rutina (6,0 mg/kg), pré-tratados com Gala (6,0 mg/kg) e posteriormente tratados com CCl_4 . Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 6$.

4.3 Marcadores de função hepática

4.3.1 Determinação da atividade da enzima AST

Na Figura 14 são apresentados os resultados obtidos com respeito à atividade enzimática da AST, onde pode-se observar que o tratamento com CCl_4 causou uma elevação de 265,6% na atividade deste marcador hepático, quando comparado com o CN, não sendo revertida pelo tratamento com a THA. Já nos animais pré-tratados com a rutina e Gala, a elevação na atividade da AST foi significativamente menor ($p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente), que aquela observada nos animais que sofreram exclusivamente o tratamento com CCl_4 .

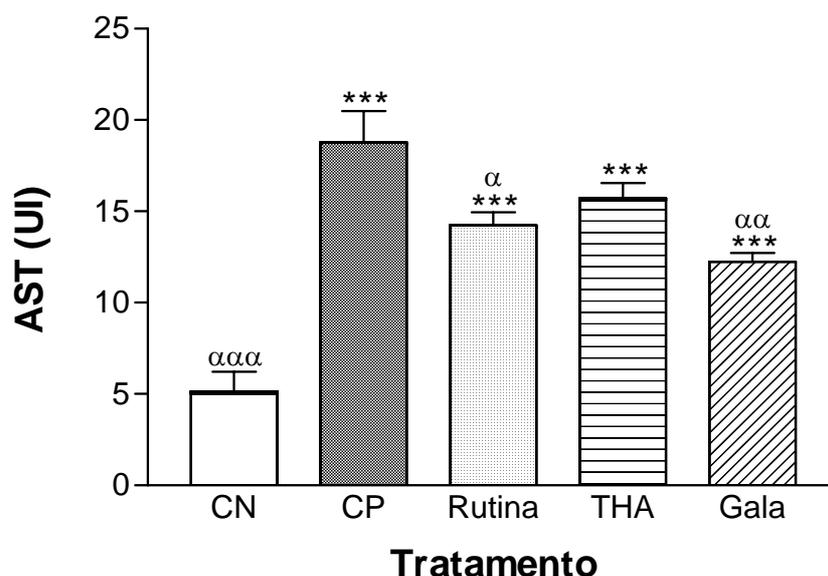


Figura 14. Atividade da AST (UI) em fígados de camundongos não tratados (controle negativo, CN), tratados com 0,5 mL / 100 g (30% v/v) de CCl_4 (controle positivo, CP), pré-tratados com a THA (6,0 mg/kg), pré-tratados com rutina (6,0 mg/kg), pré-tratados com Gala (6,0 mg/kg) e posteriormente tratados com CCl_4 . Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 6$. (***) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$) em relação ao CN. (ααα), (αα) e (α) representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$), ($p < 0,01$) e ($p < 0,05$) respectivamente, em relação ao CP.

4.3.2 Determinação da atividade da enzima ALT

A Figura 15 mostra que, diferentemente da atividade da AST, a atividade da ALT apresentou elevações estatisticamente significativas de 246,0% e 227,0% para o CP e a THA, respectivamente ($p < 0,001$), quando comparada ao CN. Curiosamente, quando comparadas ao CP, a rutina e Gala apresentaram uma diminuição significativa na atividade desta enzima, sugerindo um certo efeito hepatoprotetor para estes compostos.

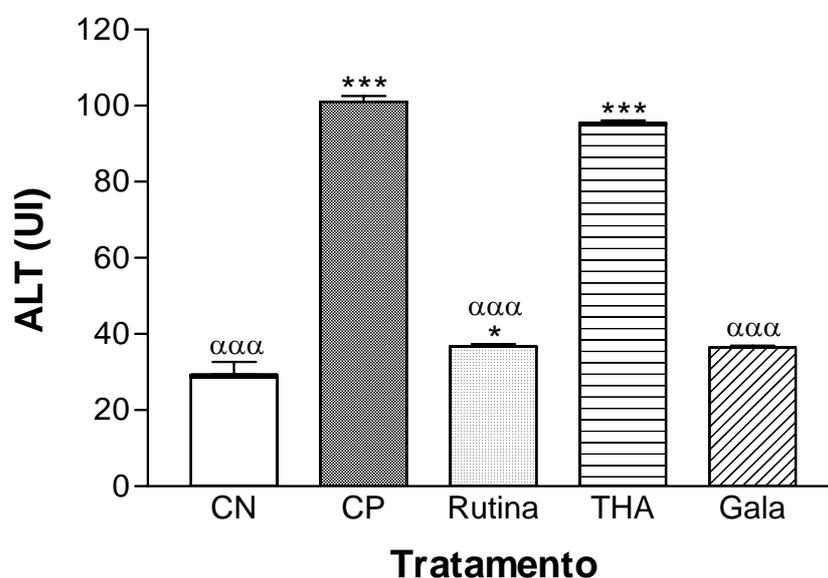


Figura 15. Atividade da ALT (UI) em fígados de camundongos não tratados (controle negativo, CN), tratados com 0,5 mL / 100 g (30% v/v) de CCl_4 (controle positivo, CP), pré-tratados com a THA (6,0 mg/kg), pré-tratados com rutina (6,0 mg/kg), pré-tratados com Gala (6,0 mg/kg) e posteriormente tratados com CCl_4 . Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 6$. (***) e (*) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$) e ($p < 0,05$) respectivamente, em relação ao CN. (ααα) representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$) em relação ao CP.

4.4 Atividade Hipotrigliceridêmica

4.4.1 Hiperlipidemia induzida pela dieta hipercalórica

4.4.1.1 Avaliação da concentração de triglicerídeos

Como pode-se observar na Figura 16, as concentrações séricas de triglicerídeos, encontraram-se significativamente menores, quando tratados com THA e uma dieta hipercalórica, tanto após 15 dias 88,9% quanto em 30 dias 85,2% quando comparadas ao grupo controle. Da mesma forma, os animais tratados com THA e uma dieta padrão, também apresentaram uma redução significativa ($p < 0,001$) nos níveis sanguíneos de triglicérides, tanto em 15 dias 58,7% quanto 30 dias 61,4% de tratamento, quando comparados com seus respectivos controles.

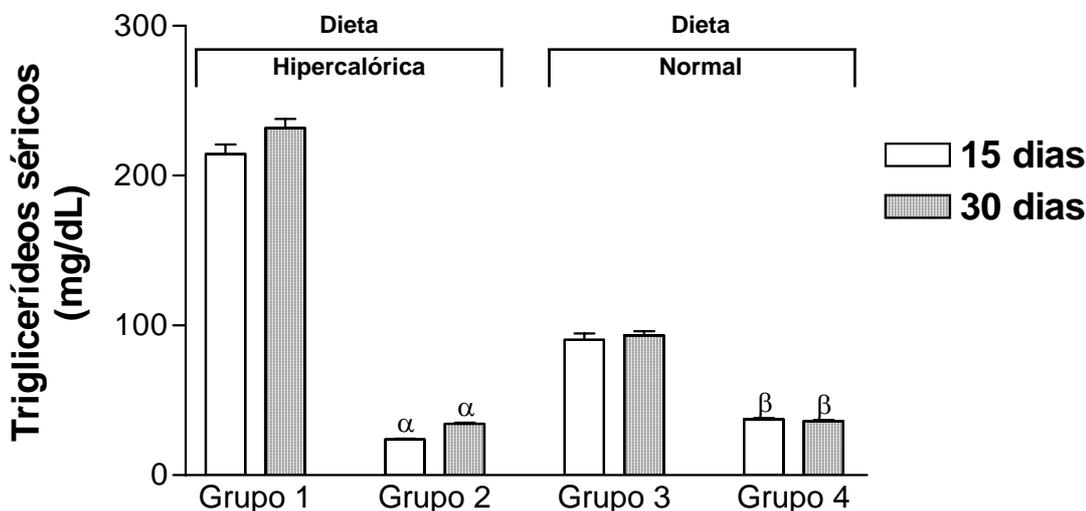


Figura 16. Concentrações séricas de triglicérides (mg/dL) em ratos após 15 e 30 dias de tratamento com uma dieta hipercalórica (grupo1), dieta hipercalórica e a THA (6,0 mg/kg, v.o)(grupo 2), dieta normal (grupo 3), dieta normal e THA (6,0 mg/kg, v.o)(grupo 4). Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 6$. (α) diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 1 ($p < 0,001$). (β) representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$) em relação ao grupo 3.

4.4.2 Inibição da absorção de lipídeos

4.4.2.1 Determinação da concentração de triglicérides

Na Figura 17 são apresentados os resultados obtidos com os animais pré-tratados com azeite de oliva, e posteriormente tratados com os diferentes compostos. Como pode ser observado, a azeite de oliva causou forte elevação 120,0% na concentração sanguínea de triglicérides após duas horas de sua administração, e que esta elevação pode ser fortemente prevenida pela administração de THA 141,7% e parcialmente prevenida pelo Xenical® e Gala. Curiosamente, em 4 e 6 horas, os níveis de triglicérides nos animais tratados com a THA mantiveram-se baixos, mas estáveis, já a Gala e o Xenical® diminuíram os níveis deste lipídeo.

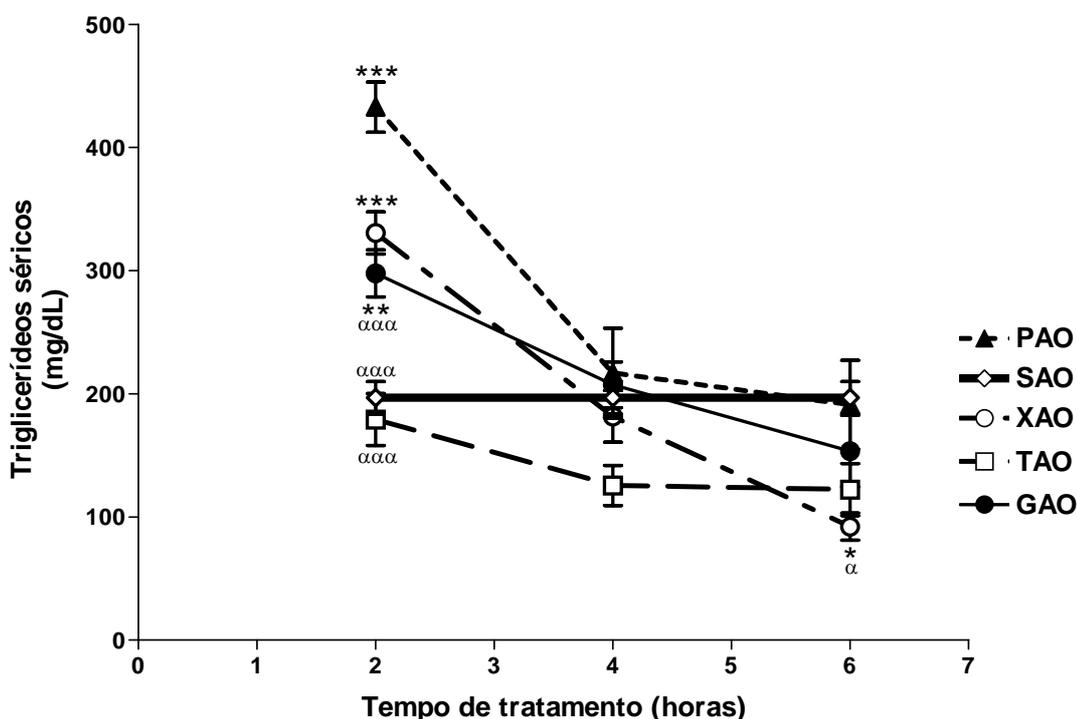


Figura 17. Concentrações séricas de triglicérides (mg/dL) em camundongos tratados com azeite de oliva (PAO), sem tratamento com azeite de oliva (SAO), pré-tratados com a THA (6,0 mg/kg, v.o.) (TAO), pré-tratados com Xenical® (250 mg/kg, v.o.) (XAO); pré-tratados com Gala (6,0 mg/kg, v.o.) (GAO) e tratado com azeite de oliva após 30 min; determinadas em 2, 4 e 6 horas após tratamento. Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, n = 6. (***) (***) e (*) diferença estatisticamente significativa em relação aos camundongos SAO ($p < 0,001$), ($p < 0,01$) e ($p < 0,05$) respectivamente. ($\alpha\alpha\alpha$) e (α) representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$) e ($p < 0,05$) respectivamente, em relação ao PAO.

4.4.2.2 Avaliação da atividade da lipase intestinal

O dados apresentados na Figura 18 demonstram que a Gala não apresentou efeito inibidor sobre a atividade da lipase intestinal nos diferentes tempos avaliados. A THA ao contrário, apresentou um efeito inibitório sobre a atividade da lipase intestinal após 4 e 6 horas de tratamento, sendo que este efeito foi mais acentuado em 6 horas. É importante notar que o Xenical® apresentou um perfil de inibição enzimático diferente da THA, uma vez ocorreu uma forte inibição já após 2 horas, o qual se manteve estável até 6 horas de tratamento. Também é importante ressaltar que a THA foi mais efetiva em reduzir a atividade da lipase intestinal após 6 horas de tratamento, tempo este em ocorreu a maior ativação da lipase intestinal nos animais tratados somente com o óleo de oliva.

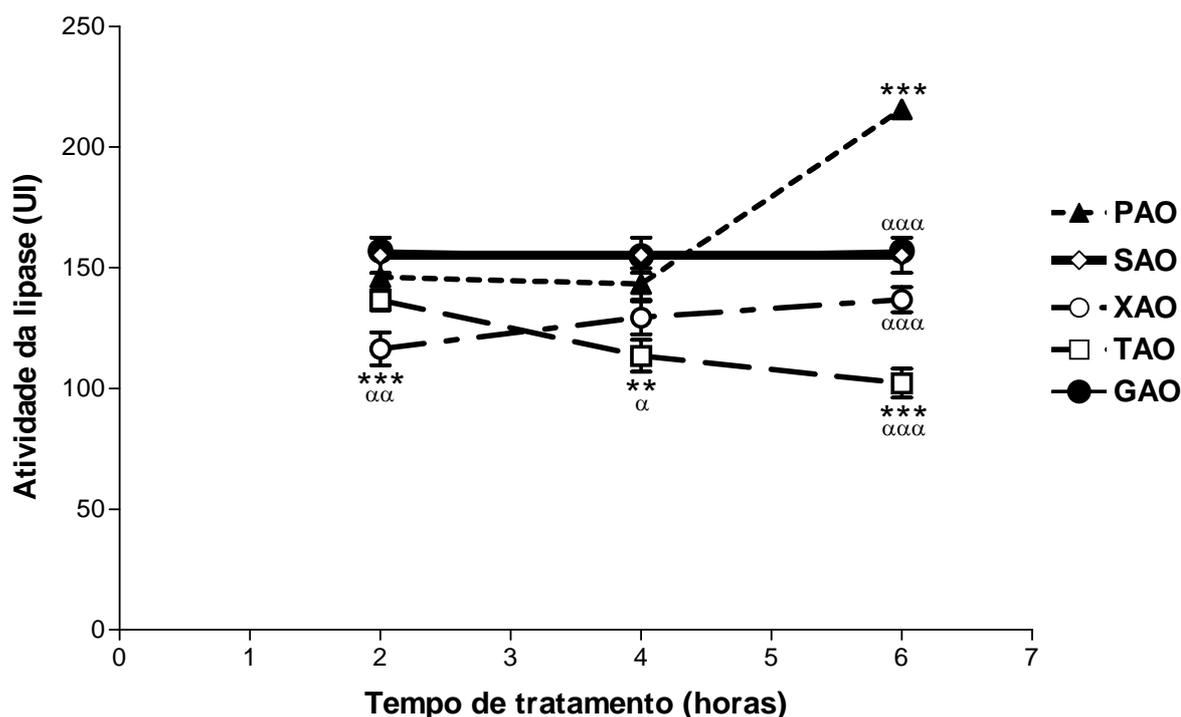


Figura 18. Atividade da lipase intestinal (UI) em camundongos tratados com azeite de oliva (PAO), sem tratamento com azeite de oliva (SAO), pré-tratados com a THA (6,0 mg/kg, v.o.) (TAO), pré-tratados com Xenical® (250 mg/kg, v.o.) (XAO), pré-tratados com Gala (6,0 mg/kg, v.o.) (GAO) e tratado com azeite de oliva após 30 min; determinadas em 2, 4 e 6 horas após tratamento. Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, n = 6. (***) e (**) diferença estatisticamente significativa em relação aos camundongos SAO ($p < 0,001$) e ($p < 0,01$) respectivamente. (ααα) (αα) e (α) representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$), ($p < 0,01$) e ($p < 0,05$) respectivamente, em relação ao PAO.

5 DISCUSSÃO

5.1 Atividade antioxidante *in vitro*

Para o ensaio com o radical livre DPPH, apenas 3 análogos sintéticos da acetofenona (THA, Gala e 2,6-DHA), além da rutina, apresentaram atividade antioxidante importante (CE_{50} inferior a 1000 $\mu\text{g/mL}$). A Gala apresentou o melhor resultado entre os análogos sintéticos da acetofenona testados, com um CE_{50} de $17,74 \pm 0,35 \mu\text{g/mL}$, talvez pela posição das hidroxilas, uma vez que possui o mesmo número de hidroxilas na estrutura que a THA, esta última apresentando um CE_{50} de $76,35 \pm 0,73 \mu\text{g/mL}$. Já a 2,6-DHA, com CE_{50} de $276,59 \pm 0,45 \mu\text{g/mL}$, que possui duas hidroxilas em sua estrutura, confirma desta forma, que a capacidade de captação de RLs dos compostos fenólicos está diretamente correlacionada à capacidade de formação de radicais mais estáveis, particularmente compostos aromáticos contendo hidroxilas (FAUCONNEU et al., 1997). Já os outros compostos apresentaram uma baixa atividade sobre o radical DPPH, provavelmente devido ao pequeno número ou ausência de hidroxilas, ou diferentes ligantes acoplado a estrutura básica.

O presente trabalho demonstrou que a capacidade de captar o radical livre DPPH pela rutina foi maior que a dos análogos da acetofenona testados (Tabela 3). Dall'Acqua e Innocenti (2004) também utilizaram esta substância como padrão para avaliar a atividade antioxidante de extratos da *Chaerophyllum hirsutum*, obtendo uma CE_{50} de 7,8 mM, semelhante ao obtido neste trabalho. Apesar de apresentarem atividade antioxidante menor à da rutina, tanto a Gala quanto a THA apresentaram importante capacidade de captação do radical DPPH, indicando serem estas acetofenonas promissoras candidatas ao aprofundamento dos estudos de atividade antioxidante. A capacidade de captura do DPPH pela THA também foi avaliada por Mathiesen, Malterud e Sund (1997), que verificaram que esta substância, em concentrações de 118 μM e 470 μM , foi capaz de capturar o radical DPPH, após 1

min de incubação (aproximadamente 8 e 13% respectivamente). Quando o tempo de incubação foi maior (15 min), esta percentagem aumentou para aproximadamente 27 e 40%, respectivamente, indicando que a capacidade de captura do DPPH pela THA é dependente do tempo de incubação e da concentração.

A relação entre a estrutura química e a atividade dos compostos fenólicos está diretamente correlacionada à capacidade de formação de radicais mais estáveis, e sugerindo que compostos aromáticos contendo hidroxilas, especialmente aqueles na posição *orto*-hidróxil no anel, comportam-se como excelentes captadores de radicais (FAUCONNEU *et al.*, 1997; GALATO *et al.*, 2001), como já foi observado com a THA (MATHIESEN, MALTERUD e SUND, 1997). Segundo alguns autores, a capacidade de captação de radicais livres está relacionada ao número de hidroxilas livres no anel aromático dos compostos fenólicos, sendo que a forte atividade antioxidante dos mesmos está relacionada ao sistema de substituição das hidroxilas nas posições *orto* e *para*, enquanto que as hidroxilas em posição *meta* possuem uma fraca atividade (GALATO *et al.*, 2001; SROKA e CISOWSKI, 2003).

A capacidade antioxidante dos compostos análogos sintéticos da acetofenona e da rutina em seqüestrar o $O_2^{\bullet-}$ gerado pelo sistema enzimático xantina/xantina oxidase foram avaliadas neste trabalho. Inicialmente foi avaliada a atividade dos compostos sobre a inibição da enzima que catalisa a formação de $O_2^{\bullet-}$ e ácido úrico. A THA causou a maior inibição enzimática entre os compostos testados, sugerindo desta forma que, pelo menos de forma indireta, este composto tem importante atividade antioxidante, já que a xantina oxidase *in vivo* é um dos importantes sistemas geradores de ânions superóxido no fígado. A Gala e 4-MA apresentaram um efeito inibidor moderado, já a 3-NA apresentou efeito semelhante à rutina, utilizada como padrão.

Dados semelhantes aos nossos foram obtidos por Schuldt *et al.* (2004), que avaliaram o potencial antioxidante dos compostos fenólicos constituintes de extrato e frações das folhas da *Cuphea carthagenensis* sobre a enzima xantina oxidase, onde todas as amostras avaliadas inibiram a atividade da enzima. Os autores observaram também que suas amostras inibiram a redução do NBT pelo $O_2^{\bullet-}$, sugerindo que

diversos flavonóides e compostos fenólicos são considerados antioxidantes, não somente pela capacidade de capturar RLs, mas também por inibir a enzima xantina oxidase (COS et al., 1998).

Posteriormente, foi avaliada a capacidade antioxidante dos análogos sintéticos da acetofenona e rutina de bloquear a redução do NBT pelo $O_2^{\bullet-}$, gerado na reação catalisada pela XO. A THA também aqui, apresentou a melhor atividade antioxidante entre os compostos testados, enquanto a Gala apresentou moderado potencial antioxidante, 2-HA, 4-MA e 3,4-DCA tiveram fraca atividade antioxidante em comparação à rutina. Segundo Tanaka, Nishikawa e Ishimaru (2003), a atividade “scavenger” do $O_2^{\bullet-}$ para os compostos fenólicos cresce de acordo com o número de hidroxilas fenólicas na molécula. Assim, nossos resultados confirmam dados existentes na literatura que sugerem que a forte atividade antioxidante dos compostos fenólicos está relacionada ao sistema de substituição das hidroxilas nas posições *orto* e *para*, enquanto que as hidroxilas em posição *meta* possuem uma fraca atividade, caso da Gala e rutina (SROKA e CISOWSKI, 2003). Entretanto, segundo outros autores, apesar do número de hidroxilas ligadas ao anel aromático e suas posições ser provavelmente, o fator mais importante com respeito à atividade antioxidante, não seria o único fator responsável por esta atividade (SROKA e CISOWSKI, 2003).

O radical hidroxil ($\bullet OH$) é a espécie mais reativa encontrada em meios biológicos, reagindo no próprio sitio onde foi gerado, sendo responsáveis por grande parte dos danos celulares provenientes das EROs, causando quebras nas fitas do DNA, lipoperoxidação e também oxidação protéica (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Para determinar se os compostos análogos sintéticos da acetofenona e a rutina poderiam de alguma forma afetar a formação ou efeito deste radical, utilizou-se um método de geração de $\bullet OH$ que se baseia na oxidação da desoxirribose provocada por $\bullet OH$, produzido pela reação de H_2O_2 com o ferro. Todos os compostos testados apresentam importante atividade antioxidante neste sistema, pois foram capazes de inibir a degradação da desoxirribose de maneira dependente da concentração. A THA apresentou forte potencial antioxidante, equivalente ao da rutina, enquanto 2,6-DHA, 2-HA e 3-NA tiveram fraca atividade antioxidante, e Gala,

4-AA, 4-MA, 3,4-DCA e 4-NA apresentaram muito fraca atividade quando comparados ao flavonóide padrão. Estes resultados estão de acordo com Czinner et al. (2000), pois verificaram que compostos fenólicos provenientes de extratos da *Helichrysum arenarium*, ricos em quercetina e derivados, entre eles a rutina, possuem a capacidade de capturar o radical $\cdot\text{OH}$. Robak e Gryglewski (1988) também verificaram que alguns flavonóides, entre eles quercetina, mirecetina e rutina, são bastante eficazes em seqüestrar o $\cdot\text{OH}$.

A proteção à peroxidação lipídica foi testada usando homogenato de fígado de ratos como substrato-alvo (CHEN e TEPPEAL, 1996), onde a peroxidação foi induzida por peróxido t-butila. A THA apresentou um forte efeito protetor da lipoperoxidação ($\text{CE}_{50} = 151,73 \pm 0,71 \mu\text{g/mL}$), maior que a rutina ($\text{CE}_{50} = 203,83 \pm 1,44 \mu\text{g/mL}$). Nas mesmas condições experimentais a Gala, 2,6-DHA, 2-HA, 3-NA e 4-NA tiveram uma fraca atividade protetora da peroxidação (CE_{50} superior a 500 $\mu\text{g/mL}$), quando comparadas ao flavonóide padrão. Nossos resultados vão ao encontro de relatos na literatura, onde se observou efeito protetor de compostos fenólicos, como flavonóides, por serem doadores de hidrogênio, correspondendo ao principal mecanismo de ação dos antioxidantes (SESTILI et al., 2002; NARDI et al., 2003; SHULDIT et al., 2004). Aherne e O'Brien (2000) verificaram a capacidade da rutina em proteger a quebra da simples fita do DNA induzida por peróxido de tert-butila.

Em resumo, a análise da atividade antioxidante *in vitro* dos análogos sintéticos da acetofenona, com exceção do ensaio com o DPPH, revelou que a atividade antioxidante da THA foi sempre melhor que a da rutina (considerada como referência) e dos outros compostos testados. A THA mostrou efeito "scavenger", tanto para $\text{O}_2^{\cdot-}$ quanto $\cdot\text{OH}$, o que poderia explicar sua elevada proteção contra lipoperoxidação. E esta atividade possivelmente estaria relacionada à presença de hidroxilas fenólicas na posição *orto* e *para*.

5.2 Atividade antioxidante *in vivo*

O tetracloreto do carbono é um hidrocarboneto halogenado, muito utilizado em processos de síntese orgânica de compostos clorados, particularmente compostos aromáticos halogenados e também na indústria de lavagem a seco, sendo um agente químico altamente tóxico (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999), causando principalmente danos hepáticos e renais. A exposição a CCl_4 pode resultar no desenvolvimento de tumor e cirrose hepáticos, além de necrose tubular aguda no rim (JUNNILA, 2000; OZTURK et al., 2003).

Os efeitos tóxicos de CCl_4 no fígado já foram extensivamente documentados na literatura (OHTA et al., 2000). Sua ativação metabólica pelo citocromo P450 geram RLs, isso é, o triclorometano e os radicais peroxil do triclorometano, é utilizada para caracterizar a peroxidação de lipídios e a oxidação de proteínas, o que geralmente são responsáveis pela hepatotoxicidade deste composto (OZTURK et al., 2003). Algumas investigações sugerem que os efeitos nefrotóxicos do CCl_4 também estão associados à produção de RLs (SHEWEITA, ABD EL-GABAR e BASTAWY, 2001; OZTURK et al., 2003).

O mecanismo pelo qual o CCl_4 induz a hepatotoxicidade é considerado geralmente resultante da ativação de CCl_4 através do sistema microsomal do citocromo P450 no retículo endoplasmático dos hepatócitos, em que o radical triclorometil ($\cdot\text{CCl}_3$) e o radical altamente reativo do peroxi-triclorometil ($\cdot\text{O}_2\text{CCl}_3$) são as formas iniciadoras da peroxidação lipídica do retículo endoplasmático no estágio avançado de toxicidade do CCl_4 (RECKNAGEL et al., 1989). Entretanto, alguns autores também atribuem a hepatotoxicidade à formação aumentada de $\cdot\text{OH}$ na ausência da CAT (WANG et al., 1998).

No presente trabalho, o CCl_4 foi utilizado para induzir a peroxidação lipídica endógena inicialmente avaliada em termos de detecção dos derivados lipoperóxidos, através de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). Como demonstrado claramente na Figura 7, CCl_4 induz a lipoperoxidação, uma vez que

houve um aumento significativo da concentração de TBARS (606,0%) neste grupo. Observou-se que a rutina, THA e Gala foram capazes de reverter este índice de lipoperoxidação hepática causada pelo CCl₄, sugerindo que estes compostos possivelmente conferiram uma proteção à membrana celular contra o ataque oxidativo das EROs, considerando os presentes resultados obtidos experimentalmente *in vitro* e também por relatos existentes na literatura estes compostos teriam atividade antioxidantes. Com respeito à rutina, Gao et al. (2003) utilizando ensaios semelhantes observaram que, em homogenato de fígado, este flavonóide inibiu significativamente a lipoperoxidação induzida por radical alquil. No presente trabalho, a THA apresentou uma proteção contra a lipoperoxidação total melhor que a própria rutina, e também confirmou os dados obtidos com o estudo *in vitro*, demonstrando um efeito protetor sobre a peroxidação lipídica *in vivo*, ainda não relatado na literatura. Já a Gala apresentou uma proteção semelhante à da rutina. Curiosamente, a Gala não havia apresentado importante proteção ao TBARS *in vitro* conforme já citado anteriormente. Poder-se-ia especular que talvez tenha havido um problema de solubilidade deste composto quando da incubação com os sistemas geradores de RLs, pois no ensaio com o DPPH este composto apresentou o melhor potencial “scavenger”. É importante ressaltar que no ensaio com o DPPH todos os compostos foram diretamente solubilizados em etanol, ao passo que nos outros ensaios a Gala foi solubilizada em uma solução etanol e água destilada (1:1).

Além da avaliação da lipoperoxidação pelo TBARS, que quantifica a lipoperoxidação de forma geral, também procurou-se medir a concentração de hidroperóxido lipídico pelo ensaio com xilenol laranja (FOX reativo com hidroperóxido lipídico), conforme descrito por Hermes-Lima et al. (1995). Nesta avaliação, a rutina apresentou a melhor proteção contra a hidroperoxidação (Figura 8), e curiosamente, THA e Gala apresentaram capacidades de proteção à hidroperoxidação semelhantes, ao contrário do que vinha sendo observado nos outros ensaios com TBARS *in vitro* e *in vivo*. RLs atacam a membrana e convertem ácidos graxos poliinsaturados em hidroperóxidos lipídicos e estes, por sua vez, tendem a migrar para fora do meio hidrofóbico da membrana, causando o rompimento desta. A geração de hidroperóxido em membrana biológicas aumenta a passagem de íons para o meio extracelular além de causar danos às proteínas trans-membranas, tais como receptores e enzimas (WARD e PETERS, 1995).

Para confirmar a hipótese de que o CCl_4 , além de causar importante dano por peroxidação lipídica, também seria capaz de induzir um dano oxidativo significativo ao DNA, foi utilizado o ensaio Cometa. Este método é sensível e rápido para a detecção de quebras de fitas simples e duplas de DNA em células eucarióticas individuais e possivelmente, pode ser usado para detectar dano ao DNA em qualquer célula eucariótica (TICE, 1995; ROJAS, LOPEZ e VALVERDE, 1999). Os resultados obtidos comprovaram esta hipótese, demonstrando a capacidade do CCl_4 de induzir um dano oxidativo considerável (120,4%) ao DNA (Figura 9). Dados já existentes na literatura demonstram que o CCl_4 induz uma fragmentação importante 24 horas após sua administração (NATH, LI e RANDERATH, 1990).

A rutina utilizada como composto referência capaz de proteger o DNA do ataque oxidativo dos RLs do CCl_4 causou uma diminuição do dano a este ácido nucléico de 35,3% (Figura 9). Em trabalho semelhante utilizando peróxido tert-butílica como agente estressor, Aherne e O'Brien (2000) observaram que a rutina também foi capaz de proteger a quebra da fita simples do DNA. Calabrò et al. (2005) também observaram uma diminuição significativa do dano ao DNA com a utilização da rutina como antioxidante, porém uma complexação desta com ciclodextrina aumentou seu efeito citoprotetor. Segundo Yamaguchi et al. (2005), os flavonóides possuem importante atividade como agentes antioxidantes por mecanismos de "scavenger" de RLs com formação de pequenos radicais fenoxil reativos dos flavonóides. Os mesmos autores relataram que, em termos de potencial citoprotetor, a quercetina teria maior atividade de proteção a dano ao DNA, seguido da rutina que também apresentou elevada eficiência.

Já a THA também foi capaz de reduzir significativamente (54,6%) o dano ao DNA causado pelo CCl_4 , não havendo diferença estatística significativa entre estes pré-tratamentos e o grupo controle normal, mostrando um efeito protetor sobre o DNA de hepatócitos ainda não relatado na literatura. Por outro lado, a Gala não foi capaz de proteger o DNA, tendo sido observada uma elevação estatisticamente significativa em 76,0% na fragmentação deste ácido nucleico ($p < 0,01$) quando comparada ao grupo controle normal. Estes resultados sugerem que a proteção ao DNA gerada pela THA poderia ser devida à proteção da membrana lipídica,

reforçando os dados anteriormente apresentados a respeito da proteção contra a peroxidação lipídica e hidroperoxidação, e conseqüentemente, protegendo o DNA.

A oxidação catalisada por metais tem sido identificada como uma modificação covalente a proteínas que pode ser importante em muitos processos fisiológicos e patológicos. A introdução de grupos carbonil em resíduos de aminoácidos destas proteínas é um marcador desta modificação oxidativa (LEVINE, 1990; LEVINE, 2002). Dados existentes na literatura sugerem que o CCl₄ induz a carbonilação às proteínas dos hepatócitos dos camundongos (SHEWEITA, ABD EL-GABAR e BASTAWY, 2001). Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que o CCl₄ causou uma elevação de 40,5% na carbonilação de proteínas, e, tanto a rutina quanto a THA e Gala, causaram uma proteção semelhante sobre o dano oxidativo à proteína (Figura 10). Estes resultados são extremamente importantes, pois demonstram que estes compostos têm um importante efeito citoprotetor contra o ataque oxidativo do CCl₄ a proteínas, evitando a carbonilação destas, e também reforçando os dados anteriormente apresentados a respeito da proteção contra a peroxidação lipídica (LPO e HPO) e ao dano ao DNA.

Segundo Ahamed et al. (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.

Com relação às defesas antioxidantes, o CCl₄ demonstrou causar uma forte depleção de GSH total hepática de 65,3% nos animais expostos (Figura 11), o que provavelmente, provocou dano à proteína e lipoperoxidação no grupo controle positivo. Nota-se que a concentração da GSH dos grupos tratados com rutina, THA e Gala, também apresentaram uma depleção, talvez pela toxicidade inerente ao CCl₄, porém os 3 compostos possivelmente estariam atuando de forma semelhante a GSH, que é usada tanto como substrato da GPx, para a conversão do H₂O₂ em H₂O, quanto na neutralização direta de EROs, pois conseguiram reverter os danos oxidativos (TBARS, fragmentação do DNA, carbonilação de proteínas), mesmo com concentrações baixas deste tiol.

No estudo de Ozturk et al. (2002), o CCl_4 induziu dano renal e provocou um aumento significativo da atividade da SOD e CAT. Confirmando estes dados, os resultados obtidos no presente trabalho (Figura 12) demonstraram que o CCl_4 causou uma pequena elevação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na atividade da CAT. Curiosamente, o pré-tratamento com rutina elevou sensivelmente a atividade da CAT quando comparada ao grupo controle positivo ($p < 0,001$) diferentemente dos dados obtidos por Gao et al. (2003), onde foi relatado que a atividade da CAT em fígado de ratos tratados pela rutina sofreu um decréscimo significativo. Já a elevação da atividade enzimática que o CCl_4 provocou, aparentemente foi revertida pelo pré-tratamento com a THA, porém não estatisticamente significativa. Curiosamente, o pré-tratamento com a Gala elevou sensivelmente a atividade da CAT (138,3%) quando comparada ao grupo controle negativo e ao grupo controle positivo.

A GST e a GSH desempenham importante papel na destoxificação de muitos xenobióticos (Sheweita, El-Gabar e Bastawy, 2001), pois a GST é a enzima responsável por catalisar a reação da GSH com o metabólito reativo. Segundo Sheweita, El-Gabar e Bastawy (2001), o CCl_4 induziu o dano ao fígado, inibindo a atividade da GST em aproximadamente 30,0%, quando comparado com o controle. Entretanto Sotelo-Félix et al. (2002) relataram que o CCl_4 não modificou a atividade da GST em camundongos expostos ao agente. Portanto, semelhantemente ao presente trabalho (Figura 13), a enzima não teve sua atividade alterada pelo tratamento com o CCl_4 . Por outro lado, o pré-tratamento com rutina, de forma semelhante ao ocorrido com CAT, causou uma sensível elevação (112,6%) da atividade da GST. Hirose et al. (1999) também relataram que a rutina aumentou a atividade da GST, entretanto de forma menos intensa, de 29,0% na atividade da enzima. Já o pré-tratamento com THA não alterou a atividade da GST, ao contrário da Gala, que causou uma sensível elevação da GST (96,6%), como ocorreu na CAT.

Como o CCl_4 é um agente hepatotóxico, Nishida et al. (1998) e Gyamgi et al. (1999) analisaram a atividade das transaminases 12 e 24 horas após a sua administração, e observaram aumentos da atividade AST e ALT séricas associadas ao dano hepatocelular. Confirmando estas observações, no presente trabalho o

tratamento com CCl₄ causou uma elevação de 365,6% na atividade da AST, o qual não foi revertido pelo tratamento com a THA. No entanto, a rutina e a Gala causaram uma elevação significativamente menor da atividade desta enzima, sugerindo um efeito hepatoprotetor. Da mesma forma, a atividade enzimática da ALT apresentou elevações estatisticamente significativas (346,0% e 327,0%) nos animais tratados com CCl₄ e também nos pré-tratados com THA e posteriormente CCl₄. Curiosamente, quando comparados ao grupo tratado exclusivamente com CCl₄, a rutina e Gala apresentaram uma diminuição significativa na atividade desta enzima, sugerindo novamente um certo efeito hepatoprotetor para estes compostos. Janbaz et al. (2002) demonstraram que a rutina exerce proteção contra danos hepáticos causados por CCl₄, onde os animais pré-tratados com a rutina preveniram a elevação dos níveis sanguíneos das transaminases induzidas por CCl₄.

Em resumo, quanto à atividade antioxidante *in vivo*, a rutina, THA e Gala, apresentaram importante atividade de proteção tecidual contra o ataque oxidativo do CCl₄, comprovado pelos ensaios de TBARS, FOX, dano ao DNA, oxidação protéica, depleção da GSH e elevação das atividades da CAT, GST, AST e ALT (exceto para o tratamento com THA).

5.3 Atividade hipotrigliceridêmica

Conforme discutido anteriormente, os análogos sintéticos da acetofenona, particularmente a THA e Gala, apresentaram importante potencial antioxidante, tanto *in vitro* quanto *in vivo* e, portanto, pareceu pertinente investigar um possível potencial hipolipemiante destes compostos. Em estudo anterior realizado em nosso laboratório (OLIVEIRA, 2001), foi observado que a THA apresentou efeito hipocolesterolêmico em ratos com dieta hipercalórica, entretanto, o efeito hipotrigliceridêmico não fora explorado. No modelo da indução de hiperlipemia através da dieta hipercalórica, promoveu-se um aumento da oferta de substratos e hormônios, como a insulina, que induzem a ativação das vias biossintéticas, processo que a longo prazo gera um

modelo crônico de hiperlipemia. O aumento dos níveis de insulina causa a inibição da mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo, aumentando a lipogênese e a síntese de acil-glicerol, através da inibição de hormônios ativadores da atividade da lipase e, desta forma, elevam fortemente os níveis de triglicérides circulantes e teciduais (MURRAY, GRANNES e MAYS, 2000).

As elevadas concentrações de triglicérides circulantes podem, além de inibir a lipólise tecidual, contribuir para a formação de partículas densas e pequenas de lipoproteínas LDL, devido ao aumento da transferência de colesterol esterificado da VLDL para esta lipoproteína, o que a torna mais susceptível aos processos oxidativos que antecipam a doença aterosclerótica, já que dificulta o processo de reconhecimento celular. Do mesmo modo, o aumento da transferência de colesterol esterificado para as lipoproteínas HDL pode contribuir para a redução das concentrações séricas de colesterol da HDL, freqüentemente associada à hipertrigliceridemia (DURRINGTON, 1998).

A respeito da inibição da hipertrigliceridemia induzida pela dieta hipercalórica, as concentrações séricas de triglicérides foram significativamente menores nos animais tratados com THA, tanto após 15 dias quanto em 30 dias de tratamento, quando comparados ao grupo controle (Figura 16). Da mesma forma os animais tratados com THA e uma dieta padrão também apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,001$) nos níveis sanguíneos de triglicérides tanto em 15 dias quanto em 30 dias de tratamento.

Piyachaturawat et al. (2000), em uma prévia investigação da atividade hipocolesterolemica do composto THA e análogos hidroxilados, mostrou que a THA apresentou um efetivo aumento da secreção do ácido biliar e diminuição do colesterol. De acordo com estes investigadores, a THA em doses biologicamente ativas, possui baixa toxicidade, sendo um efetivo agente hipocolesterolêmico em hamsters com dieta indutora de hipercolesterolemia. Nesse mesmo estudo verificou-se que a THA, na dose de 400 $\mu\text{mol/kg}$ administrada duas vezes ao dia por 7 dias, diminuiu os níveis de colesterol e triglicérido plasmático em 52,0% e 25,0%, respectivamente, sendo a resposta dependente da dose, bem como do tempo de

administração da substância. No presente estudo, como pode ser observado na, as concentrações séricas de triglicerídeos diminuíram significativamente com a administração de THA (Figura 16) - após 15 dias (88,9%) e 30 dias (85,2%), verificando-se que o decréscimo dos níveis de triglicerídeos foi dependente da dose de THA administrada como também do tempo de tratamento, confirmando os resultados obtidos por Piyachaturawat et al. (2002).

Alguns estudos têm demonstrado que níveis elevados de lipoproteínas ricas em triglicérides são fortes preditores independentes de progressão de aterosclerose e da ocorrência de eventos isquêmicos. Tomados em conjunto, esses estudos mostram que as lipoproteínas ricas em triglicérides, particularmente as partículas pequenas de VLDL e IDL, estão mais intimamente relacionadas à progressão de doenças cardiovasculares do que a LDL, tradicionalmente considerada a lipoproteína mais aterogênica (FRUCHART e DURIEZ, 2002). Portanto, o potencial redutor sobre as concentrações séricas de triglicérides apresentado pelas THA desperta especial interesse, uma vez que as partículas de lipoproteínas ricas em triglicérides, em especial a VLDL, não somente atravessam a parede íntima das artérias, como também podem ser retidas na parede arterial por um longo período, causando efeitos similares à LDL oxidada (DURRINGTON, 1998).

Um aumento na síntese de ácidos graxos e, conseqüentemente, de triacilglicerol, proporciona uma elevação da secreção da lipoproteína VLDL, sendo que os ácidos graxos utilizados na síntese dos triacilgliceróis podem ser derivados de dois processos, através do aumento da disponibilização de acetil-CoA, ou de grandes concentrações de ácidos graxos livres na circulação. No entanto, a primeira situação é predominante quando temos um maior estímulo da síntese de ácidos graxos e pequenos níveis circulantes, processo este que ocorre na dieta hipercalórica, provocado pelo aumento dos níveis hormonais de insulina que estimulam a síntese e esterificação dos ácidos graxos, inibindo a sua oxidação e a atividade de enzimas lipolíticas (DURRINGTON, 1998). Além deste fato, altas concentrações de triglicérides nas VLDLs contribuem, como já foi mencionado, na formação de lipoproteínas LDL, e uma similar diminuição das concentrações de colesterol na lipoproteína HDL, ambos relacionados com o aumento da transferência

de colesterol esterificado para estas lipoproteínas (SLATER, PARAFIORITI e TORTORA et al., 2002).

Dentre as varias condutas terapêuticas indicadas para o tratamento da hiperlipidemia, encontra-se a restrição dietética. Contudo, se a limitação dietética não gerar uma diminuição adequada da concentração de colesterol e/ou triglicerídeos, a administração de fármacos com atividade hipolipemiante faz-se necessária, associada ao regime de restrição dietética, uma vez que a terapêutica hipolipemiante reduz o ritmo de progressão da doença aterosclerótica e, em alguns casos, induz a regressão das lesões já existentes (SCHIEFFER e DREXLER, 2003; UESHIMA et al., 2004). Como elevados níveis de triglicerídeos estão associados a condições patogênicas que aceleram a aterosclerose, além de existirem evidências de que a hipertrigliceridemia é um fator de risco, independente para doenças coronarianas devido a efeito aterogênico direto das lipoproteínas ricas em triglicerídeos (SCHIAVO et al., 2003), os inibidores de absorção de triglicerídeos podem ser uma estratégia bastante promissora na prevenção da aterosclerose (UESHIMA et al., 2004).

É importante ressaltar que os dados obtidos no presente estudo demonstraram que a THA causou uma forte redução na absorção de triglicerídeos (Figura 17) já nas 2 horas após o tratamento com azeite de oliva, sendo parcialmente prevenida pelo Orlistat e Gala, sugerindo, desta forma, que a THA tem um efeito direto e imediato na absorção de lipídeos. É importante observar que os dados obtidos neste trabalho sugerem que a THA teria, pelo menos inicialmente, um melhor efeito inibidor da absorção intestinal de lipídeos que o próprio Orlistat utilizado como controle positivo do experimento.

O Orlistat comercialmente conhecido como Xenical[®] é um inibidor das lipases lipoprotéica, hepática e pancreática, entretanto, quando administrado por via oral, os efeitos deste são restringidos ao intervalo gastrointestinal (McNEELY e BENFIELD, 1998). Devido ao fato deste fármaco causar a inibição de lipase gastrointestinal, o que conduz a uma redução da absorção da gordura, o Orlistat está sendo utilizado no tratamento da obesidade (BALLINGER e PEIKIN, 2002). Em pacientes com

hiperlipidemia, o Orlistat demonstrou reduzir a concentração de triglicerídeos no plasma (REITSMA et al., 1994). Conseqüentemente, o Orlistat pode reduzir a progressão de lesão aterosclerótica, em conseqüência da diminuição de triglicerídeo, através da inibição da absorção de gordura (UESHIMA et al., 2004). Portanto, este fármaco poderia ser um agente efetivo na moderação da obesidade relativamente mórbida, especialmente quando utilizado em conjunto com dietas apropriadas, modificação de hábitos alimentares e exercícios físicos (HSIEH et al., 2004).

A lipase é uma enzima que, em mamíferos superiores, degrada os triacilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol, e apresenta grande relevância clínica, principalmente em relação à arteriosclerose e à hiperlipidemia, uma vez que alguns produtos de sua atuação – ácidos graxos livres e diacilgliceróis – têm papel crucial na regulação e no metabolismo celular (KOBBLITZ et al., 2004). Alguns compostos flavonóides têm sido investigados a respeito da propriedade de diminuição da concentração sangüínea de lipídeos (LIMA et al., 1999).

É importante notar que a THA, apesar de reduzir fortemente os níveis sangüíneos de triglicerídeos, aparentemente não teve efeito sobre a lipase 2 horas após administração do azeite de oliva, ao contrário do Orlistat, o que sugere que a THA possa ter outro efeito sobre a absorção intestinal, que não relacionado à lipase. Entretanto, após 6 horas da administração do azeite de oliva, a THA teve forte efeito inibidor sobre esta enzima, atividade maior inclusive que o Orlistat. Curiosamente, em nosso modelo experimental foi exatamente no tempo de 6 horas que a lipase foi mais ativa no grupo controle tratado somente com o azeite, sugerindo que a THA possa ser um potente inibidor tardio de lipase. Portanto, a THA possivelmente apresenta pelo menos dois mecanismos de ação sobre absorção de lipídeo, um inespecífico (às 2 horas) e outro sobre a atividade da lipase (às 6 horas), temporariamente distintos.

Em resumo, conforme discutido anteriormente, podemos afirmar que os análogos sintéticos da acetofenona testados, particularmente a THA e Gala, possuem importante atividade antioxidante, tanto *in vitro*, uma vez que apresentou capacidade de seqüestrar RLs (DPPH, $O_2^{\bullet-}$ e $\bullet OH$), quanto *in vivo* pois foram

capazes de reverter os danos oxidativo induzido pelo CCl₄. Adicionalmente, a THA apresentou importante atividade hipotrigliceridêmica, cujo mecanismo de ação possivelmente esteja associado à inibição de lipídeos devido à inibição da atividade da lipase intestinal, além de um efeito anti-absortivo inespecífico. Finalmente, pelas características anteriormente citadas, podemos dizer que a THA poderia constituir-se em molécula protótipo para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças vasculares obstrutivas, uma vez que mostrou importante potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo*, além de ação hipotrigliceridêmica.

6 CONCLUSÕES

Os dados obtidos com o presente trabalho permite concluir que:

1. Os análogos sintéticos da acetofenona, particularmente a THA e Gala, apresentaram importante atividade antioxidante *in vitro*, pois foram capazes de causar o “scavenger” de radicais DPPH, hidroxil e ânion superóxido, bem como proteção contra a lipoperoxidação, em concentrações muitas vezes menor ou similar à rutina, um reconhecido agente antioxidante;
2. A THA e Gala apresentaram importante atividade antioxidante *in vivo*, uma vez que foram capazes de bloquear o estresse oxidativo induzido pelo CCl₄, comprovados pelos ensaios de TBARS, FOX, dano ao DNA, oxidação protéica, diminuição da GSH e elevação da CAT, GST, AST e ALT (exceto para o tratamento com THA);
3. Aparentemente, a atividade antioxidante tanto *in vitro* quanto *in vivo* está associada ao número de hidroxilas fenólicas e disposição em posição *orto*;
4. A THA apresentou importante atividade na inibição à hipertrigliceridemia induzida pela dieta, uma vez que as concentrações séricas de triglicerídeos, foram significativamente menores nos animais tratados com THA, tanto em animais com uma dieta hipercalórica, quanto em dieta normal;
5. A THA mostrou-se um potente agente inibidor da absorção de triglicerídeos, em animais tratados com azeite de oliva;
6. A THA aparentemente não teve efeito inibidor da atividade intestinal da lipase, sendo, porém, mais efetiva quando comparado ao Orlistat, um inibidor específico desta esterase;

7. Finalmente, pelas características antioxidante e hipotriglicéridêmica da THA constatada no presente trabalho e por dados existentes na literatura, que conferem atividade hipocolesterolêmica à THA, indicam que este análogo da acetofenona poderia constituir-se numa molécula protótipo para pesquisa de desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas no tratamento da aterosclerose e outras doenças vasculares.

7 PERSPECTIVAS

Após a realização deste trabalho, ficam algumas propostas a serem eventualmente desenvolvidas posteriormente:

- Complementar a avaliação do efeito antioxidante da THA em modelos de estresse oxidativo, através da determinação das enzimas antioxidantes SOD, GPx, GR, G6PDH e dos Tióis (GT e GSSG);
- Avaliar o potencial da THA em coelhos aterogênicos, com o objetivo de confirmar o efeito protetor deste composto, tanto no ponto de vista do estresse oxidativo quanto da atividade hipolipemiante;
- Avaliar o possível efeito antiobesidade da THA (ganho de peso, níveis de triglicérides circulantes, concentração da leptina, etc.) em animais, uma vez que esta acetofenona apresentou uma forte atividade hipotrigliceridêmica;
- Avaliar modificações estruturais nas acetofenonas que possam favorecer uma melhoria no efeito hipolipemiante, particularmente aqueles associados à elevação dos níveis de HDL concomitantemente com a redução da VLDL.

8 BIBLIOGRAFIA

ABRAHAM, P.; WILFRED, G.; CATHRINE, S. P. Oxidative damage to the lipids and proteins of the lungs, testis and kidney of rats during carbon tetrachloride intoxication. **Clin. Chim. Acta.**, v. 289, p. 177–179, 1999.

ACKER, S. A. B. E. et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonóides. **Free Radic. Biol. Med.**, v.20, n.3, p.331-342, 1996.

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Meth. Enzymol.**, v. 105, p. 121-126, 1984.

AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Mechanism of protection by flavonoids, quercetin and rutin, against tert-butylhydroperoxide- and menadione- induced DNA single strand breaks in Caco-2 cells. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 29, p. 507–514, 2000.

AMERICAN ASSOCIATION OF CLINICAL ENDOCRINOLOGIST. Ninth annual meeting and clinical congress 2002. <http://www.linex.com.br>, acessado em 17/06/2003.

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

AVIRAM, M. Review of human studies on oxidative damage and antioxidant protection related to cardiovascular diseases. **Free Radic. Res.**, v. 33, p. S85-S97, 2000.

BALLINGER, A.; PEIKIN, S. R. Orlistat: its current status as an antiobesity drug. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 440, p. 109-117, 2002.

BATLOUNI, M. Hipótese oxidativa da aterosclerose e emprego dos antioxidantes na doença arterial coronária. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 68, n. 1, p. 55-63, 1997.

BECKER, L. B. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. **Cardiovas. Res.**, v. 61, p. 461-470, 2004.

BECKMAN, K. B.; AMES, B. N. The free radical theory of aging matures. **Physiol. Rev.**, v. 78, n. 2, p. 547-581, 1998.

BEUTLER, E.; DURAN, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J. Lab. Clin. Med.**, 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.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutr. Rev.**, v. 56, p. 17-33, 1998.

BROWN, B. G. et al. Use of niacin, statins, and resins in patients with combined hyperlipidemia. **Am. J. Cardiol.**, v. 81, n. 4A, p. 52-59, 1998.

CALABRÒ, M. L. et al. The rutin/-cyclodextrin interactions in fully aqueous solution: spectroscopic studies and biological assays. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 36, p. 1019-1027, 2005.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.). **Farmacognosia - da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2003. 1102p., p. 519-536.

CASSCELLS, W.; NAGHAVI, M.; WILLERSON, J. T. Vulnerable atherosclerosis plaque: multifocal disease. **Circulation.**, v. 107, n. 16, p. 2072-2075, 2003.

CECHINEL FILHO, V. et al. Fungicide and fungistatic effects of xanthoxyline. **J. Ethnopharmacol.**, v. 53, p. 171-173, 1996.

CECHINEL FILHO, V.; MIGUEL, O. G.; CALIXTO, J. B. Antispasmodic activity of Xanthoxyline derivatives structure activity relationships. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 84, p. 473-475, 1995.

CHAPMAN, M. J. Fibrates in 2003: therapeutic action in atherogenic dyslipidaemia and future perspectives. **Atherosclerosis**, v. 30, p. 1-13, 2003.

CHEN, H.; TAPPEL, A. L. Protection of multiple antioxidants against heme protein oxidation and lipid peroxidations induced by CBrCl₃ in liver, lung, heart, and spleen. **J. Agric. Chem.**, v. 44, p. 854-858, 1996.

HSIEH, C.-J. et al. Orlistat for obesity: benefits beyond weight loss. **Diabetes Res. Clin. Practice.**, In press, 2004.

COS, P. et al. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as antioxidant and pro-oxidant compounds. In: RAHMAN. **Studies Nat. Prod. Chem.**, p. 307-341, 2000.

COS, P. et al. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xantine oxidase and superoxide scavengers. **J. Nat. Prod.**, v. 61, p. 71-76, 1998.

CZINNER, E. et al. *In vitro* antioxidant properties of *Helichrysem arenarium* (L.) Moench. **J. Ethnopharmacol.**, v. 73, p. 437-443, 2000.

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

DAVIES, K. J. A. Oxidative stress: The paradox of aerobic life. **Biochem. Soc. Sympo.**, v. 61. p. 1-31, 1994.

de las HERAS, B. et al. Terpenoids: sources, structure elucidation and therapeutic potencial in inflammation. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 3, n. 2, p. 171-185, 2003.

DECKER, E. A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Rev.**, v.55, n.11, p.396-407, 1997.

DI GIULIO, R. T.; BENSON, W. H.; SANDERS, B. M.; VAN VELD, P. A. Biochemical Mechanisms: Metabolism, Adaptation, and Toxicity. **Fundamentals of Aquatic Toxicology Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**. RAND, G. M. (ed.) 2ed. Taylor & Francis. 1995. p. 523-560.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Phys. Rev.**, v. 82, p. 47-95, 2002.

ELLEGARD, L.; BOSAEUS, I.; ANDERSSON, H. W. Recommended changes in fat and fibre intake affects cholesterol absorption and sterol excretion? An ileostomy study. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 54, n. 1, p. 306-313, 2000.

ERNSTER, L.; HOCHSTEIN, P. Membrane lipid peroxidation: cellular mechanisms and toxicological implications. In: C. A. Tyson e J. M. Frazier. **Meth. Toxic.**, p. 33-45, 1994.

FAROMBI, E. O.; BRITTON, G.; EMEROLE, G. O. Evaluation of antioxidant activity and partial characterization of extracts from browned yam flour diet. **Food Res. Int.**, v. 33, p. 493-499, 2000.

FAUCONNEAU, B. et al. Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using *in vitro* tests. **Life Sci.**, v.61, n.21, p.2103-2110, 1997.

FAVIER, L. et al. Anti-inflammatory activity of acetophenones from *Ophryosporus axilliflorus*. **Planta Med.**, v. 64, p. 657-659, 1998.

FOTI, M. C.; DAQUINO, C.; GERACI C. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH[•] radical in alcoholic solutions. **J. Org. Chem.**, v. 69, p. 2309-2314, 2004.

FRANÇOSO, L. A.; COATES, V. Evidências anatomopatológicas do início da aterosclerose na infância e adolescência. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 78, n. 1, p. 131-136, 2002.

FREITAS, E. V. Triglicerídeos e Doença Arterial Coronariana, **Rev. SOCERJ**, v. 17, n. 1, p. 45-49, 2004.

FRUCHART, J. C.; DURIEZ, P. HDL and triglyceride as therapeutic targets. **Curr. Opin. Lipidol**, v. 13, n. 6, p. 605-616, 2002.

GALATO, D.; CKLESS, K.; SUSIN, M. F.; GIACOMELLI, C.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; SPINELLI, A. Antioxidant capacity of phenolic and related compounds: correlation among electrochemical, visible spectroscopy methods and structure–antioxidant activity. **Redox Report**, v. 6, n. 4, p. 243–250, 2001.

GAO, Z.; XU, H.; CHEN, X.; CHEN, H. Antioxidant status and mineral contents in tissues of rutin and baicalin fed rats. **Life Sci.**, v. 73, p. 1599-1607, 2003.

GHANNEM, H. et al. Epidemiology of cardiovascular risk factors among schoolchildren in Sousse, Tunisia. **J. of Cardiovasc. Risk**, v. 8, n. 2, p. 87-91, 2001.

GIROUX, M.; DAVIGNON, J.; NARUSZEWICZ, M. Simvastatin inhibits the oxidation of low-density lipoproteins by activated human monocyte-derived macrophages. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1165, Issue 3, p. 335-338. 1993.

GOTTO, A. M. Overview of a current issues in manegement of dyslipidemia. **Am. J. Cardiol.**, v. 71, p. 3B-8B, 1993.

GRUNDY, S.M. Hypertriglyceridemia, atherogenic dyslipidemia, and the metabolic syndrome. **Am. J. Cardiol.**, v. 81, n. 4A, p. 18B-25B, 1998.

GUIMARÃES, A. C. Prevenção das doenças cardiovasculares no século 21. **Hipertensão**, v. 5, n. 3, p. 103-106. 2002.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J. Biol. Chem.**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.

HADDAD, J. J. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. **Cell. Signall.**, v. 14, p. 879-897, 2002.

HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. **Life Sci.**, p. 1-7, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Formation of a thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron slts – 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.

HARMAN, D. Free radical theory of aging. **Mutat Res.**, v. 275, p. 257-266, 1992.

HEEREN, J. et al. Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to human postprandial chylomicrons and mediates their hepatic clearance in vivo. **Atheroscl. Supplem.**, v. 3, n. 2, p. 122, 2002.

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

HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W. G. and STOREY K. B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts, based on FE(III)Xylenol orange complex formation, **Free Rad. Biol. Med.**, v. 19, n. 3, p. 271-280, 1995.

HIGUCHI, Y. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. **Biochem. Pharmacol.**, v. 66, p. 1527-1535, 2003.

HOGAN, S. et al. Studies on the antiobesity activity of tetrahydrolipstatin, a potent and selective inhibitor of pancreatic lipase. **Int. J. Obes.**, v. 11 (Suppl. 3), p. 35-42, 1987.

HOLVOET, P.; COLLEN, D. Oxidation of low density lipoprotein in the pathogenesis of atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 137, p. S33-S38, 1998.

HOPKINS, J. C. Statins: Effective antiatherosclerotic therapy. **Am. Heart J.**, v. 139, p. 577-583, 2000.

JANBAZ, K. H.; SAEED, S. A.; GILANI, A. H. Protective effect of rutin on paracetamol- and CCl₄-induced hepatotoxicity in rodents. **Fitoterapia**, v. 73, p. 557–563, 2002.

JIN, W.; MARCHADIER, D.; RADER, D. J. Lipases and HDL metabolism. **Trend in Endocrinol. Metabol.**, v. 13, Issue 4, p. 174-178, 2002.

JUNNILA, M. et al. Reduction of carbon tetrachloride-induced hepatotoxic effect by oral administration of betaine in male Han-Wistar rats: a morphometric histological study. **Vet Pathol.**, v. 37, p. 231–238, 2000.

KÁDÁR, A.; GLASZ, T. Development of atherosclerosis and plaque. **Cardiov. Surgery**, v. 9, n. 2, p. 109-121, 2001.

KLAUDE M., ERIKSON S., NYGREN J., AHNSTRÖN G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutat. Res.**, v. 363, p. 89-96, 1996.

KOBLITZ, M. G. B.; PASTORE, G. M. Purificação parcial, por dois diferentes métodos cromatográficos, da lipase produzida por *Rhizopus* sp. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 24, n. 2, p. 287-292, 2004.

KULISIC, T.; RADONIC, A.; KATALINIC, V.; MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chem.**, v. 85, p. 633-640, 2004.

LEESON, C. P. M. et al. Cholesterol and arterial distensibility in the first decade of life: a population-based study. **Circ.**, v. 101, n. 1, p. 1533-1538, 2000.

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. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Meth. Enzymol.**, v. 186, p. 464-478, 1990.

LIMA, L. R. P. et al. Determinação da atividade de lipase na presença de morina, naringenina, naringina e rutina. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v.23, n.3, p.626-631, jul./set., 1999.

LUZ, P. L. Atherogênese. Arquivos Brasileiros de Cardiologia: **III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias**, v. 77, p. 10-11, 2001.

MACIAS, F. A. et al. Allelopathy as a new strategy for sustainable ecosystems development. **Biol. Sci. Space**, v. 17, n. 1, p. 18-23, 2003.

MARTINEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M. J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. **Arch. Lat. Nut.**, v. 50, p. 5-18, 2000.

MATHIESEN, L.; MALTERUD, K. E.; SUND, R. B. Hydrogen bond formation as basis for radical scavenging activity: a structure-activity study of c-methylated dihydrochalcones from *Myrica gale* and structurally related acetophenones. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 22, p. 307-311, 1997.

MAXWELL S.R. Prospects for the use of antioxidant therapies. **Drugs**, v. 49, n. 3, p. 345-361, 1995.

MCNEELY, W.; BENFIELD, P. Orlistat. **Drugs**, v. 56, p. 241–249, 1998.

MEAD, J. R.; CRYER, A.; RAMJI, D. P. Lipoprotein Lipase, a key role in atherosclerosis? **FEBS Letters**, v. 462, Issue 1-2, p. 1-6, 1999.

MENSOR L. L. et al. Screenig of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytoth. Res.**, v. 15, 127-130, 2001.

MEYER, B. J. et al. Two subpopulations of intermediate density lipoprotein and their relationship to plasma triglyceride and cholesterol levels. **Atherosclerosis**, v. 153, n. 2, p. 355-362, 2000.

MIDDLETON, E; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacol. Rev.**, v. 52, p. 673-751, 2000.

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.

MUNOZ, D.; AUDICANA, M.; GASTAMINZA, G.; FERNÁNDEZ E. Dermatitis de contacto por galatos. **Alergol. Inmunol. Clin.**, v. 17, p. 173-177, 2002.

NAPOLI, C. Low density lipoprotein oxidation and atherogenesis: from experimental models to clinical studies. **Gazz. Ital. Cardiol.**, v. 27, n. 12, p. 1302-1314, 1997.

NARDI, G. M. et al. Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Cróton celtidifolius* bark. **Phytomedicine**, v. 10, p. 176-184, 2003.

NATH, R. G.; LI, D.; RANDEPATH, K. Acute and long-term effects of carbon tetrachloride on DNA modifications {I-compounds) in male mouse liver. **Chem. Biol. Interactions**, v. 76, p. 343-357, 1990.

NEBERT, D. W. et al. Role of the Aromatic Hydrocarbon Receptor and [Ah] Gene Battery in the Oxidative Stress Response, Cell Cycle Control, and Apoptosis. **Biochem. Pharmacol.**, v. 59, p. 65-85, 2000.

NIERO, R. et al. Isolation of triterpenes and a n acetophenone derivative with antispasmodic activity from *Euphorbia milli* Desmoul. Ex Boiss (Euphorbiaceae). **Acta Farmac. Boanaerense**, v. 15, p. 239-242. 1996.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian Thioredoxin system. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

NOROOZI, M., ANGERSON, W.J., LEAN, M.E. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage in human lymphocytes. **Am. J. Clin. Nut.**, v. 67, n. 6, p. 1210-1218, 1998.

OGATA, M.; HOSHI, M.; SHIMOTOHNO.; URANO, S.; ENDO, T. Antioxidant activity of magnolol, honokiol, and related phenolic compounds. **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, v. 74, p. 557-562, 1997.

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

OHTA, Y. et al. Therapeutic effect of melatonin on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. **J. Pineal Res.**, v. 28, p. 119-126, 2000.

OLIVEIRA, L. F. S. **Avaliação *in vivo* do efeito hipocolesterolêmico do extrato metanólico de *Aleurides moluccana*, xantoxilina e seus derivados**, 2001, 115p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Bioquímica, UFSC, 2001.

OPLETALOVÁ, V. et al. Chalcones (1,3-diarylpropen-1-ones) and their analogs as potential therapeutic agents in cardiovascular system diseases. **Ceska Slov. Farm.**, v. 52, n. 1, p. 12-19, 2003.

OW Y.Y.; STUPANS I. Gallic acid and gallic acid derivatives: effects on drug metabolizing enzymes. **Cur. Drug Metab.**, v. 4, n. 3, p. 241-248, 2003.

OZTURK, F. et al. Carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity and protective effect of betaine in sprague-dawley rats. **Urology**, v. 62, n. 2, p. 353-356, 2003.

PEÑA S. *et al.* Role of glutathione in thiobencarb resistance in the European eel *Anguilla anguilla*. **Ecot. Environmental Saf.**, v. 46, p. 51-56, 2000.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PIYACHATURAWAT, P. et al. Effect of phloracetophenone on bile flow and biliary lipids in rats. **Hepatol. Res.**, v. 12, p. 198-206, 1998.

PIYACHATURAWAT, P.; CHAROENPIBOONSIN, J.; TOSKULKAO, C.; SUKSAMRARN, A. Reduction of plasma cholesterol by *Curcuma comosa* extract in hypercholesterolaemic hamsters. **J. Ethnopharmacol.**, v. 66, p. 199-204, 1999.

PIYACHATURAWAT, P. et al. Choleric activity of phloracetophenone in rats: structure-function studies using acetophenone analogues. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 37, p. 221-227, 2000.

PIYACHATURAWAT, P. et al. Cholesterol lowering effects of a choleric phloracetophenone in hypercholesterolemic hamsters. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 439, p. 141-147, 2002.

PIYACHATURAWAT, P. et al. Evaluation of the acute and subacute toxicity of a choleric phloracetophenone in experimental animals. **Toxic. Letters**, v. 129, p. 123-132, 2002.

PRESTON, T. J. et al. Mitochondrial contributions to cancer cell physiology: potential for drug development. **Adv. Drug Delivery Rev.**, v. 49, p. 45-61. 2001.

QUYYUMI, A. A. Prognostic value of endothelial function. **Am. J. Cardiol.**, v.12, p. 19-24, 2003.

REAL, J. T. et al. Importance of HDL-cholesterol levels and the total/HDL-cholesterol ratio as a risk factor for coronary heart disease in molecularly defective heterozygous familial hypercholesterolaemia. **Eur. Heart J.**, v. 22, n. 6, p. 465-471, 2001.

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.

REITSMA, J.B., CABEZAS, M.C., DE BRUIN, T.W., ERKELENS, D.W. Relationship between improved postprandial lipemia and low-density lipoprotein metabolism during treatment with tetrahydrolipstatin, a pancreatic lipase inhibitor. **Metabolism.**, v. 43, p. 293-298, 1994.

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.

ROSS, R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 340, p. 115, 1999.

ROTHWELL, N. J.; SVILLE, M. E.; STOCK, M. J. Effects of feeding a "cafeteria" diet on energy balance and diet induced thermogenesis in four strains rats. **J. Nutr.**, v. 112, p. 1515-1524, 1982.

SANG, S. et al. Chemical studies on antioxidant mechanism of tea catechins: analysis of radical reaction products of catechin and epicatechin with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. **Bio. Med. Chem.**, v.10, n.7, p.2233-2237, 2002.

SANTOS, L. **Avaliação do potencial hipolipemiante de algumas chalconas sintéticas utilizando diferentes modelos experimentais**, 2003, 145 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Bioquímica, UFSC, 2003.

SAVI, L. A. **Avaliação da genotoxicidade e das atividades anti-herpética e antioxidante de compostos fenólicos**, 2004, 140 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFSC, 2004.

SCANDALIOS, J. G. Introduction. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 23, p. 471- 472, 1997.

SCHIAVO, M.; LUNARDELLI, A.; OLIVEIRA, J. R. Influência da dieta na concentração sérica de triglicerídeos. **J. Br. Patol. Med. Lab.**, v. 39, n. 4, p. 283-288, 2003.

SCHIEFFER, B.; DREXLER, H. Role of 3-hidroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, angiotensin-converting enzyme inhibitors, cyclooxygenase-2 inhibitors, and aspirin in anti-inflammatory and immunomodulatory treatment of cardiovascular diseases. **Am. J. Cardiol.**, v. 91, p.12-18, 2003.

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.

SESTILI, P. et al. Plant-derived phenolic compounds prevent the DNA single-strand breakage and cytotoxicity induced by tert-butylhydroperoxide via an iron-chelating mechanism. **J. Biochem.**, v. 364, p. 121-128, 2002.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P. Phenolic antioxidants. **Critic. Rev. Food Sci. Nut.**, v. 32, p. 67-103, 1992.

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.

SILVA, F.A.M. et al. Phenolic acids and derivatives: studies on the relationship among structure, radical scavenging activity, and physiochemical parameters. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, p.2122-2126, 2000.

SINGH, B. K.; MEHTA, J. L. Management of dyslipidemia in the primary prevention of coronary heart disease. **Curr. Opin. Cardiol.**, v. 17, n. 5, p. 503-511, 2002.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Exper. Cell Res.**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SLATER, H. et al. Hypertriglyceridemia: a secondary target for primary prevention (ATP III). **Atheroscl. Supple.**, v. 3, n. 2, p. 208, 2002.

SOTELO-FÉLIX, J. I. et al. Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. **J. Ethnopharmacol.**, v. 81, p. 145-154, 2002.

SPIEKER, L. E. et al. Efficacy and tolerability of fluvastatin and bezafibrate in patients with hyperlipidemia and persistently high triglyceride levels. **J. Cardio. Pharmacol.**, v. 35, p. 361-365, 2000.

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.

STANLEY, L.; ROBBINS, M. D. **Patologia estrutural e funcional**, 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1230, 1991.

STARY, H. C. et al. A definition of initial, fatty streak and intermediate lesions of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Atherosclerosis. **Circulation.**, v. 89, p. 2462-2478, 1994.

STEBBENS, W. E. Oxidative stress, toxic hepatitis, and antioxidants with particular emphasis on zinc. **Exp. Molec. Pathology.**, v. 75, p. 265-276, 2003.

STEIN, Y.; STEIN, O. Lipoprotein lipase and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, 2003.

STROBEL, G. A. Rainforest endophytes and bioactives products. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 22, n. 4, p. 315-333, 2002.

SUKSAMRARN, A.; EIAMONG, S.; PIYACHATURAWAT, P.; BYRNE, L. T. A phloracetophenone glucoside with choleric activity from *Curcuma comosa*. **Phytochemistry.**, v. 45: p. 103-105, 1997.

TALMUD, P. J. et al. Nonfasting apolipoprotein B and triglyceride levels as a useful predictor of coronary heart disease risk in middle-aged UK men. **Atheroscl. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 22, p. 1918, 2002.

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

TERAO, J.; PISKULA, M. K. Flavonoids and membrane lipid peroxidation inhibition. **Nutrition**, v. 15, p. 790, 1997.

TICE, R. R. **The single cell gel/comet assay: a microgel eletroforetic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells.** In: D H Phillips and S Venitt. Environmental Mutagenesis. Oxford: Bios Scientific Publishers, 1995. p. 315-339.

TSENG, T.-H.; TSHENG, Y.-M.; LEE, Y.-J. Cytotoxicity effects of di- and tri-hydroxybenzaldehydes as a chemopreventive potential agent on tumor cells. **Toxicology**, v. 161, p. 179-187, 2001.

UESHIMA, K. et al. A gastrointestinal lipase inhibitor reduces progression of atherosclerosis in mice fed a western-type diet. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 501, p. 137-142, 2004.

VAN DER HEIJDEN C.A.; JANSSEN P.J.; STRIK J.J. Toxicology of gallates: a review and evaluation. **Food Chem. Toxic.**, v.24, n.10-11, p.1067-1070, 1986.

VERRI, J.; FUSTER, V. Mecanismos das síndromes isquêmicas agudas e da progressão da aterosclerose coronária. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 68, n. 6, 1997.

VIVOT, E. et al. Inhibitory activity of xanthine-oxidase and superoxide scavenger properties of *Inga verna* subsp. *affinis*. Its morphological and micrographic characteristics. **J. Ethnopharmacol.**, v. 76, p.65-71, 2001.

WANG, D.-H.; ISHII, K.; TAKETA, K. Inhibition of carbon tetrachloride-induced liver injury in acatalasemic mice by hepatic iron deprivation. **Hepatol. Res.**, v. 10, p. 237-247, 1998.

WANG, L.-F.; ZHANG, H.-Y. A Theoretical Investigation on DPPH radical-scavenging Mechanism of Edaravone. **Bio. Med. Chem. Letters**, v. 13, p. 3789-3792, 2003.

WARD, R. F. and PETERS, T. F. Free radicals. In: MARSHALL, W. J. and BANGERT, S. K. **Clin. Biochemistry** – Metabolic and Clinical Aspects. New York. Ed. Churchill Livingstone, 1995. 854p., p. 765-777.

WIERZBICKI, A. S.; MIKHAILIDIS, D. P. Beyond LDL-C - the importance of raising HDL-C. **Curr. Med. Res. Opin.**, v. 18, n. 1, p. 36-44, 2002.

WIERZBICKI, A. S.; REYNOLDS, T. M.; CROOK, M. A. Usefulness of Orlistat in the treatment of severe hypertriglyceridemia. **Am. J. Cardiol.**, v. 89, n. 2, p. 229-231, 2002.

YOSHINO, M. et al. Prooxidant action of gallic acid compounds: copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. **Toxicology in vitro**, v.16 p.705-709, 2002.

YU, Y. M. et al. Antioxidative and Hypolipidemic Effects of Barley Leaf Essence in a Rabbit Model of Atherosclerosis. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 89, p. 142-148, 2002.