

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

KARINA AZAMBUJA CARBONARI

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE (*IN VITRO* E *IN VIVO*)
E ANTIINFLAMATÓRIO DE *OURATEA PARVIFLORA*,
POLYMNIA SONCHIFOLIA E *MARLIEREA OBSCURA*.**

Florianópolis – S.C.

2005

KARINA AZAMBUJA CARBONARI

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE (*IN VITRO* E *IN VIVO*)
E ANTIINFLAMATÓRIO DE *OURATEA PARVIFLORA*,
POLYMNIA SONCHIFOLIA E *MARLIEREA OBSCURA*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Saúde.

Orientadora: Dr^a Rozangela Curi Pedrosa

Florianópolis –S.C.

2005

*“A sabedoria é filha da experiência.
Todo o nosso saber começa nos
sentimentos”.*
Leonardo da Vinci

*“Melhor que a criatura, fez o
criador a criação.
A criatura é limitada.
O tempo, o espaço, normas e
costumes, erros e acertos.
A criação é ilimitada.
Excede o tempo e o meio.
Projeta-se”.*

Cora Coralina

*“Todas as coisas possíveis de cair sob o conhecimento dos homens
nenhuma é tão afastada que não se possa atingir
nem tão oculta que não se possa descobrir”.*
René Descartes.

Aos meus pais, Luiz Carlos e Ana Maria, pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter concedido a mim, as possibilidades para a realização desta conquista, frente às adversidades.

À Universidade Federal de Santa Catarina por ser pública, gratuita e de qualidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, por disponibilizar recursos humanos e infra-estruturais de qualidade, imprescindíveis à realização do presente trabalho.

À minha orientadora, Dr^a. Rozangela Curi Pedrosa, não apenas por ter concedido, a mim, a oportunidade de desenvolver este trabalho em seu laboratório, mas principalmente, pela atenção criteriosa, convivência produtiva, confiança, pelos conselhos valorosos, ensinamentos que certamente procurarei transmitir e, enfim, pela “mãe-profissional” que és. A ti, meu profundo respeito, admiração e amizade.

Aos docentes do mestrado, especialmente ao Dr. Carlos Pinto, à Dr^a. Ana Maria Viana e Dr^a. Margarida Mendonça, além do coordenador deste programa de pós-graduação Dr. Mario Steindel por serem pessoas especiais e atenciosas.

Às amigas Joice e Lígia, pela dedicação, respeito, atenção e carinho.

Aos colegas das disciplinas do mestrado, pelo aprendizado mútuo e pela convivência, especialmente à Jussara, Carla, Gladis, Paulo, Alexandre, Ana Kelly, Karin e Valdelucia.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Bioquímica Experimental : Mari, Jean, Valdelucia, Maicon, Reginaldo, Tatiane e, especialmente Duda, Jussara, Karina e Reginaldo por toda a ajuda e dedicação, pela troca de experiências, pela convivência prazerosa, conselhos e amizade ímpar. A vocês, que fazem parte dessa conquista, o meu carinho!

Ao Dr. Danilo Wilhelm Filho e à Dr^a. Maria Helena Rossi, que integraram a banca examinadora desta dissertação de mestrado, pela correção minuciosa e sugestões oportunas.

Às professoras Regina Vasconcellos Antonio, Fátima Mena Barreto, Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau, bem como, aos professores Rozendo Augusto Yunes, Valfredo Favere e Mauro Laranjeira e seus respectivos orientandos.

Aos amigos doutorandos Amauri e Salete pelo bom-humor e amizade.

Ao funcionário Américo, pelo auxílio com os equipamentos da sala de uso comum do CCB.

Aos amigos de Santo Ângelo : Margarete e Janir, Antônio e Marisa, Valéria, Carmem, Denise, Nádia, Maurício e família, Rômulo, Adair, Marisa, Josi, Terezinha e a todos que torceram por mim.

Aos amigos de Pelotas, especialmente à Dr^a. Maria da Graça Martino Roth por fazeres parte de mais uma das minhas conquistas.

Aos meus pais, Luiz Carlos e Ana Maria, por acreditarem e incentivarem a realização deste sonho. Vocês são a razão de tudo!

Ao irmão Cristiano e familiares, pelos finais de ano memoráveis, carinho e fé.

Ao tio César “lindinho” e à incomparável amiga Lígia, e ao amigo Dr. Hermênio, pela ajuda, carinho, atenção e confiança. A vocês, que são pessoas iluminadas, minha gratidão e carinho!

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, auxiliaram para que este trabalho fosse realizado, os meus profundos sentimentos de gratidão e respeito.

RESUMO

A medicina popular tem-se utilizado de plantas para o tratamento das mais diversas patologias, entretanto faz-se necessário estudos embasados cientificamente que corroborem com os relatos etnobotânicos e etnofarmacológicos. A fim de resgatar a cultura popular, bem como, valorizar a biodiversidade do bioma Mata Atlântica, especialmente a Reserva da Juréia/SP, objetivou-se neste trabalho submeter o extrato bruto e frações de *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifolia* e *Marlierea obscura* (popularmente utilizadas como antiinflamatórias), a ensaios *in vitro* e *in vivo* para avaliação do potencial antioxidante e antiinflamatório. A avaliação *in vitro* do potencial antioxidante fez-se 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, atividade da CAT, GST) foi realizada em camundongos pré-tratados com OP_{EB} , OP_4 e posteriormente expostos ao CCl_4 . Para a avaliação da atividade antiinflamatória selecionou-se os extratos e frações que apresentaram melhor atividade antioxidante, sendo estes OP_{EB} , OP_4 , PS_{EB} e MO_3 . Para tanto, aplicou-se o ensaio do edema de pata induzido pela carragenina em camundongos. Os extratos e frações das referidas plantas apresentaram significativa atividade antioxidante *in vitro*, destacando-se a *Ouratea parviflora* (OP_{EB} , OP_4), pois foram capazes de causar o “scavenger” de radicais DPPH, $O_2^{\bullet-}$ e $\bullet OH$ em concentrações por vezes menores ou similares à rutina, reconhecido agente antioxidante. O CCl_4 causou estresse oxidativo e dano celular ao fígado dos camundongos, onde a rutina, OP_{EB} e OP_4 apresentaram importante atividade na proteção tecidual comprovada pelos ensaios FOX, dano ao DNA, oxidação proteica, redução da GSH e elevação da AST (exceto OP_{EB}), elevação da CAT, GST e ALT. Embora nos tempos 60 e 120 minutos, tenha ocorrido uma tendência de inibição do edema pelo tratamento prévio com as plantas medicinais (300 mg/Kg) via oral, a análise estatística não revelou diferenças significativas entre os diferentes tratamentos. Apesar disso, o aparente efeito antiedematogênico exibido por OP_4 e MO_3 vem de encontro aos resultados obtidos nos ensaios referentes à atividade antioxidante, especialmente o $\bullet OH$, radical envolvido no processo inflamatório. Os dados obtidos permitem concluir que os produtos de *Ouratea parviflora*, particularmente OP_{EB} e OP_4 , poderiam se constituir em protótipos para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento patologias associadas a geração de EROs, uma vez que demonstraram importante potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo*. A atividade antiinflamatória de *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifolia* e *Marlierea obscura* não pode ser confirmada através do modelo experimental do edema de pata induzido pela carragenina.

Palavras chave: atividade antioxidante, atividade antiinflamatória, *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifolia*, *Marlierea obscura*.

ABSTRACT

The popular medicine have used plants to treat many pathologies. But, there are still many folk using reports which need to be confirmed by scientific studies. To rescue the popular culture and to give importance to the biodiversity of the bioma Mata Atlântica (specially Jureia's Reserve/SP), this work aimed to submit the *Ouratea parviflora* (OP_{EC}), *Polymnia sonchifolia* (PS_{CE}) and *Marlierea obscura* (MO_{CE}) crude extracts and fractions to "in vitro" and "in vivo" assays. All to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory potentials. The "in vitro" evaluations for the antioxidant potentials were done through scavenging of DPPH radical, superoxide anion, hydroxyl radicals and lipoperoxidation levels. The oxidative stress was "in vitro" evaluated by : DNA fragmentation, membrane lipoperoxidation and protein carbonilation. Male mice were pre treated with OP_{CE}, OP₄ and CCl₄ was administrated to them in the sequence to evaluate the antioxidant defenses GSH, CAT activity and GST. The assay of oedema paw induced by carrageenan type IV (Sigma) in mice was used to determine the anti-inflammatory activity of OP_{CE}, OP₄, PS_{CE} and MO₃. Results : the extracts showed significant antioxidant activity "in vitro". Mainly OP_{CE} and OP₄ because they were able to scavenge DPPH radicals, O₂^{•-} and [•]OH in smaller or at least similar concentrations when compared to the standard rutin. CCl₄ caused oxidative stress and cell damage in mice livers. Assays FOX, DNA damage, proteic oxidation, GSH reducing, AST elevation (except OP_{EB}), CAT elevation, GST and ALT showed rutin, OP_{CE} and OP₄ revealed important activity of tissue protection. Statistics analysis showed that although it has occurred an inhibition oedema tendency through the previous treatment with medicinal plants (300 mg/Kg gavage) it was not observed any significant difference among the several treatments. The antiedematogenic effect of OP₄ and MO₃ agrees with the obtained results for the antioxidant activity, specially [•]OH inflammatory process involved. Obtained datas allow to conclude that OP extract and fractions, particularly OP_{CE} and OP₄, could be prototypes to the development of a new therapeutical choice to the EROS raising pathologies, once they showed important antioxidant potential "in vitro" and "in vivo". The anti-inflammatory activity of the plants could not be confirmed through this experimental model research.

Key words: antioxidant activity, anti-inflammatory activity, *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifolia*, *Marlierea obscura*.

LISTA DE ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete	GPx	Glutaciona peroxidase
ALT	Alanina aminotransferase	GR	Glutaciona redutase
AST	Aspartato aminotransferase	GSH	Glutaciona reduzida
ATP	Adenosina trifosfato	GSSG	Glutaciona oxidada
BHT	Hidroxitolueno butilado	GST	Glutaciona S-transferase
CAT	Catalase	H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
CCl_4	Tetracloroeto de carbono	HO_2^\bullet	Hidroperoxil
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno	HOBr	Ácido hipobromoso
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais	HOCl	Ácido hipocloroso
DMSO	Dimetilsulfóxido	L^\bullet	Radical livre de ácido graxo centrado no carbono
DNA	Ácido desoxirribonucléico	LH	Ácido graxo
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina	LO^\bullet	Radical alcóxil
DPPH	1,1-difenil-2-picril hidrazina	LO_2^\bullet	Radical peróxil
DTNB	5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico	LPO	Lipoperoxidação
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético	LMPA	Agarose de baixo ponto de fusão
EPM	Erro padrão da média	LOOH	Hidroperóxido de ácido graxo
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio	LOONO	Alquil peroxinitrito
EROs	Espécies reativas de oxigênio	LPS	Lipopolissacarídeo
FOX	Oxidação do ferro pelo xilenol laranja	MDA	Malondialdeído

MO	Fração hexânica de <i>Marlierea obscura</i>	O ₂	Oxigênio molecular
MO ₁	Fração clorofórmica de <i>Marlierea obscura</i>	O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
MO ₂	Fração acetato de etila de <i>Marlierea obscura</i>	O ₃	Ozônio
MO ₃	Fração metanólica de <i>Marlierea obscura</i>	•OH	Radical hidroxil
NADH	Nicotinamina adenina dinucleotídeo, forma reduzida	ONOO ⁻	Peroxinitrito
NADPH	Nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida	PBS	Salina tamponada com fosfato
NBT	Nitrilo blue tetrazolium	PS _{EB}	Extrato bruto de <i>Polymnia sonchifolia</i>
NMPA	Agarose de ponto de fusão normal	PS ₂	Fração hexano acetato 3:7 de <i>Polymnia sonchifolia</i>
NTA	Ácido nitrilo acético	PS ₃	Fração hexano acetato 2:8 de <i>Polymnia sonchifolia</i>
NO [•]	Óxido nítrico	PS ₄	Fração acetato metanólica 1:1 de <i>Polymnia sonchifolia</i>
NO ₂ [•]	Dióxido de nitrogênio	PS ₅	Fração metanólica de <i>Polymnia sonchifolia</i>
•OH	Radical hidroxil	PS ₆	Fração clorofórmica de <i>Polymnia sonchifolia</i>
ONOO ⁻	Peroxinitrito	PS ₇	Fração hexânica de <i>Polymnia sonchifolia</i>
OP _{EB}	Extrato bruto de <i>Ouratea parviflora</i>	RL	Radical livre
OP ₁	Fração hexânica de <i>Ouratea parviflora</i>	SOD	Superóxido dismutase
OP ₂	Fração clorofórmica de <i>Ouratea parviflora</i>	TBA	Ácido tiobarbitúrico
OP ₃	Fração acetato de etila de <i>Ouratea parviflora</i>	TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
OP ₄	Fração hidroalcoólica de <i>Ouratea parviflora</i>	t-BuOOH	tert-butilhidroperóxido
OP ₅	Fração metanólica de <i>Ouratea parviflora</i>	TCA	Ácido tricloroacético
ox-LDL	LDL oxidada	TNF- α	Fator de necrose tumoral

XO Xantina oxidase

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Principais espécies reativas de O_2 e N_2 nas formas de radicais e não radicais **08**
- Tabela 2:** Avaliação do potencial antioxidante do extrato bruto e frações de *Ouratea parviflora* (1000 $\mu\text{g/mL}$) além de rutina através da medida da capacidade “scavenger” do radical livre DPPH, testada em concentrações crescentes (5, 10, 25, 50, 125, 250 $\mu\text{g/mL}$) **36**
- Tabela 3:** Avaliação do potencial antioxidante do extrato bruto e frações de *Polymnia sonchifolia* (1000 $\mu\text{g/mL}$) além de rutina através da medida da capacidade “scavenger” do radical livre DPPH, testada em concentrações crescentes (5, 10, 25, 50, 125, 250 $\mu\text{g/mL}$) **38**
- Tabela 4:** Avaliação do potencial antioxidante do extrato bruto e frações de *Marlierea obscura* (1000 $\mu\text{g/mL}$) além de rutina através da medida da capacidade “scavenger” do radical livre DPPH, testada em concentrações crescentes (5, 10, 25, 50, 125, 250 $\mu\text{g/mL}$) **40**
- Tabela 5:** Efeito do extrato bruto e frações de *Ouratea parviflora* e rutina sobre a atividade da xantina oxidase (XO) testadas em concentrações crescentes (5, 10, 25, 50, 75, 125 $\mu\text{g/mL}$) **42**
- Tabela 6:** Efeito do extrato bruto e frações de *Polymnia sonchifolia* e rutina sobre a atividade da xantina oxidase (XO) testadas em concentrações crescentes (5, 10, 25, 50, 75, 125 $\mu\text{g/mL}$) **44**
- Tabela 7:** Efeito do extrato bruto e frações de *Marlierea obscura* e rutina sobre a atividade da xantina oxidase (XO) testadas em concentrações crescentes (5, 10, 25, 50, 75, 125 $\mu\text{g/mL}$) **45**
- Tabela 8:** Avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto e frações de *Ouratea parviflora* e rutina através da medida da capacidade “scavenger” do $O_2^{\bullet-}$ testadas em concentrações crescentes (50, 75, 125, 250, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$) **47**
- Tabela 9:** Avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto e frações de *Polymnia sonchifolia* e rutina através da medida da capacidade “scavenger” do $O_2^{\bullet-}$ testadas em concentrações crescentes (50, 75, 125, 250, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$) **49**
- Tabela 10:** Avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto e frações de *Marlierea obscura* e rutina através da medida da capacidade “scavenger” do $O_2^{\bullet-}$ testadas em concentrações crescentes (50, 75, 125, 250, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$) **51**
- Tabela 11:** Avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto e frações de *Ouratea parviflora* e rutina através da medida da capacidade “scavenger” do $\bullet\text{OH}$ testadas em concentrações crescentes (10, 100, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$) **53**

Tabela 12: Avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto e frações de <i>Polymnia sonchifolia</i> e rutina através da medida da capacidade “scavenger” do $\cdot\text{OH}$ testadas em concentrações crescentes (10, 100, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$)	55
Tabela 13: Avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto e frações de <i>Marliera obscura</i> e rutina através da medida da capacidade “scavenger” do $\cdot\text{OH}$ testadas em concentrações crescentes (10, 100, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$).....	57
Tabela 14: Avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto e frações de <i>Ouratea parviflora</i> e rutina através da medida da proteção à lipoperoxidação em homogenato de fígado de ratos, avaliada em termos de TBARS, testadas em concentrações crescentes (32,25; 62,5; 125; 250; 500 $\mu\text{g/mL}$).....	59
Tabela 15: Avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto e frações de <i>Polymnia sonchifolia</i> e rutina através da medida da proteção à lipoperoxidação em homogenato de fígado de ratos, avaliada em termos de TBARS, testadas em concentrações crescentes (32,25; 62,5; 125; 250; 500 $\mu\text{g/mL}$).....	61
Tabela 16: Avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto e frações de <i>Marlierea obscura</i> e rutina através da medida da proteção à lipoperoxidação em homogenato de fígado de ratos, avaliada em termos de TBARS, testadas em concentrações crescentes (32,25; 62,5; 125; 250; 500 $\mu\text{g/mL}$).....	63
Tabela 17: Percentagem de cometas em cada classe para cada grupo	69
Tabela 18: Avaliação da atividade antiinflamatória induzida em camundongos por OP_{EB} , OP_4 , PS_{EB} , MO_3 (300 mg/Kg) via oral	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formação de espécies reativas de oxigênio durante a redução do oxigênio à água	09
Figura 2: Reações de formação do radical hidroxil (*OH).....	09
Figura 3: Vias de geração de EROs e mecanismo de defesa enzimática.....	10
Figura 4: Representação esquemática das reações de iniciação e propagação da LPO.....	14
Figura 5: Avaliação do dano as membranas celulares e nucleares pela medida da proteção à lipoperoxidação pelo TBARS	65
Figura 6: Avaliação do dano as membranas celulares e nucleares pela medida da proteção à lipoperoxidação pelo FOX (oxidação do ferro pelo xilenol laranja).....	67
Figura 7: Índice de dano ao DNA	70
Figura 8: Avaliação do dano oxidativo a macromoléculas proteicas	72
Figura 9: Avaliação da concentração de glutathiona reduzida - GSH	73
Figura 10: Avaliação da atividade da enzima catalase - CAT	74
Figura 11: Avaliação da atividade da enzima glutathiona-S-transferase - GST	76
Figura 12: Avaliação da atividade da enzima aspartato amino transferase - AST ...	77
Figura 13: Avaliação da atividade da enzima alanina amino transferase - ALT	78
Figura 14: Variação do edema de pata induzido pela carragenina nos animais controles nos diferentes tempos do ensaio	79
Figura 15: Variação do edema de pata induzido pela carragenina nos animais controles nos diferentes tempos do ensaio	81

SUMÁRIO

1. Introdução	01
1.1 <i>Ouratea parviflora</i>	05
1.2 <i>Polymnia sonchifolia</i>	06
1.3 <i>Marlierea obscura</i>	06
1.4 Estresse oxidativo e defesas antioxidantes.....	17
1.4.1 Radicais livres.....	07
1.4.2 Defesas antioxidantes.....	11
1.4.3 Estresse oxidativo.....	13
1.5 Inflamação e estresse oxidativo.....	15
1.5.1 O processo inflamatório.....	16
1.5.2 Correlação entre ação antiinflamatória e estresse oxidativo.....	18
1.5.3 Plantas medicinais e fitoterápicos como antiinflamatórios.....	18
2. Objetivos	20
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3. Metodologia	21
3.1 Extratos brutos e frações das plantas medicinais.....	21
3.1.2 Preparo do extrato bruto e frações de <i>Ouratea parviflora</i>	21
3.1.3 Preparo do extrato bruto e frações de <i>Polymnia sonchifolia</i>	22
3.1.4 Preparo do extrato bruto e frações de <i>Marlierea obscura</i>	22
3.2 Reagentes.....	23
3.3 Animais.....	23
3.4. Ensaio biológico.....	24
3.4.1 Atividade antiinflamatória <i>in vivo</i>	24
3.4.1.1 Modelo do edema de pata em camundongos induzido pela carragenina.....	24
3.4.2 Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	24
3.4.2.1 Determinação da atividade “scavenger” do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazina.....	24
3.4.2.2 formação e monitoramento da atividade “scavenger” do radical ânion superóxido.....	25

3.4.2.3 Formação e monitoramento da atividade “scavenger” do radical hidroxil.....	26
3.4.2.4 Proteção à peroxidação lipídica.....	27
3.4.3 Potencial antioxidante <i>in vivo</i> e indicadores de estresse oxidativo.....	28
3.4.3.1 Protocolo experimental.....	28
3.4.3.2 Avaliação de dano às membranas celulares.....	28
3.4.3.2.1 Medida da lipoperoxidação pelo TBARS.....	28
3.4.3.2.2 Medida da lipoperoxidação pelo FOX.....	29
3.4.3.3 Avaliação do dano ao DNA.....	30
3.4.3.3.1 Ensaio cometa.....	30
3.4.3.4 Avaliação do dano oxidativo às proteínas.....	32
3.4.3.5 Glutathiona reduzida.....	32
3.4.3.6 Atividade da enzima catalase.....	33
3.4.3.7 Atividade da enzima glutathiona-S-transferase.....	33
3.4.4 Marcadores da função hepática.....	33
3.4.4.1 Determinação da atividade da enzima aspartato aminotransferase.....	33
3.4.4.2 Determinação da atividade da enzima alanina aminotransferase.....	34
4. Análise estatística.....	34
5. Resultados.....	35
5.1 Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	35
5.1.1 Determinação da atividade “scavenger” do radical 1,1-difenil-2-picril hidrazina.....	35
5.1.1.1 Determinação da atividade “scavenger” do radical 1,1-difenil-2-picril hidrazina pela <i>Ouratea parviflora</i>	35
5.1.1.2 Determinação da atividade “scavenger” do radical 1,1-difenil-2-picril hidrazina pela <i>Polymnia sonchifolia</i>	37
5.1.1.3 Determinação da atividade “scavenger” do radical 1,1-difenil-2-picril hidrazina pela <i>Marlierea obscura</i>	39
5.1.2 Formação e monitoramento da atividade “scavenger” do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$).....	41
5.1.2.1 Avaliação da atividade da xantina oxidase (XO).....	41

5.1.2.1.1 Avaliação da atividade da xantina oxidase (XO) sobre a <i>Ouratea parviflora</i>	41
5.1.2.1.2 Avaliação da atividade da xantina oxidase (XO) sobre a <i>Polymnia sonchifolia</i>	43
5.1.2.1.3 Avaliação da atividade da xantina oxidase (XO) sobre a <i>Marlierea obscura</i>	45
5.1.2.2 Avaliação da atividade “scavenger” do $O_2^{\bullet-}$ pela inibição do “nitro blue tetrazolium” (NBT).....	46
5.1.2.2.1 Avaliação da atividade “scavenger” do $O_2^{\bullet-}$ pela inibição do NBT pela <i>Ouratea parviflora</i>	46
5.1.2.2.2 Avaliação da atividade “scavenger” do $O_2^{\bullet-}$ pela inibição do NBT pela <i>Polymnia sonchifolia</i>	48
5.1.2.2.3 Avaliação da atividade “scavenger” do $O_2^{\bullet-}$ pela inibição do NBT pela <i>Marlierea obscura</i>	50
5.1.3 Formação e monitoramento da atividade “scavenger” do radical hidroxil ($\bullet OH$).....	52
5.1.3.1 Formação e monitoramento da atividade “scavenger” do radical hidroxil ($\bullet OH$) pela <i>Ouratea parviflora</i>	52
5.1.3.2 Formação e monitoramento da atividade “scavenger” do radical hidroxil ($\bullet OH$) pela <i>Polymnia sonchifolia</i>	54
5.1.3.3 Formação e monitoramento da atividade “scavenger” do radical hidroxil ($\bullet OH$) pela <i>Marlierea obscura</i>	56
5.1.4 Proteção a peroxidação lipídica.....	58
5.1.4.1 Proteção à peroxidação lipídica pela <i>Ouratea parviflora</i>	58
5.1.4.2 Proteção à peroxidação lipídica pela <i>Polymnia sonchifolia</i>	60
5.1.4.1 Proteção à peroxidação lipídica pela <i>Marlierea obscura</i>	62
5.2 Avaliação dos indicadores de estresse oxidativo e atividade antioxidante <i>in vivo</i>	64
5.2.1 Avaliação do dano às membranas celulares e nucleares pela medida da proteção à lipoperoxidação pelo TBARS.....	64
5.2.2 Avaliação do dano às membranas celulares e nucleares pela medida da proteção à lipoperoxidação pelo FOX	66

5.2.3 Avaliação do dano ao DNA	68
5.2.4 Avaliação do dano oxidativo a macromoléculas proteicas.....	71
5.2.5 Avaliação da concentração de glutathiona reduzida – GSH.....	73
5.2.6 Avaliação da atividade da enzima catalase – CAT.....	74
5.2.7 Avaliação da concentração de glutathiona-S-transferase – GST.....	75
5.3 Marcadores da função hepática.....	77
5.3.1 Avaliação da atividade da enzima aspartato amino transferase (AST)....	77
5.3.2 Avaliação da atividade da enzima alanina amino transferase (ALT).....	78
5.4 Avaliação da atividade antiinflamatória	79
5.4.1 Ensaio do edema de pata induzido pela carragenina.....	79
6. Discussão.....	82
6.1 Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	82
6.2 Atividade antioxidante <i>in vivo</i>	87
6.3 Atividade inflamatória	92
7. Conclusão.....	95
8. Perspectivas.....	97
9. Bibliografia.....	98

1. INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da humanidade os vegetais constituem parte da vida do homem como fonte de alimentos, de materiais para o vestuário e habitação, de utilidades domésticas, defesa e ataque, na produção de meios de transporte, como utensílios para manifestações artísticas, culturais e religiosas, e como meio restaurador da saúde. Até o século XIX, os recursos terapêuticos constituíam-se, predominantemente, por plantas e extratos vegetais, o que pode ser ilustrado pelas farmacopéias da época. Assim, na *Pharmacopeia Geral para o Reino e Domínios de Portugal* (1794), entre os produtos chamados *simplices* constam 30 produtos de origem mineral, 11 produtos de origem animal e cerca de 400 espécies vegetais. Outrossim, as plantas medicinais e seus extrativos constituíam a maioria dos medicamentos, que naquela época, pouco se diferenciavam dos remédios utilizados na medicina popular. Já no início do século passado, tais recursos começaram a ser estudados com os instrumentos científicos da época e, estabeleceu-se paulatinamente a tendência de utilização de substâncias ativas isoladas, os chamados “princípios ativos”, resquício da linguagem alquimista da época (SIMÕES et al., 1999).

Os chineses, por volta do ano 3000 a.C., sintetizaram vermífugos, diuréticos, cosméticos e muitos líquidos perfumados e anti-sépticos, onde também diversas matérias vegetais eram empregadas no embalsamento de múmias. Nos primórdios da era cristã, Dioscórides enumerou em seu “Tratado de Matéria Médica” mais de 500 extratos de origem vegetal, descrevendo o uso terapêutico das mesmas. A utilização de plantas na prevenção e cura de moléstias condicionadas a um processo empírico que vem se desenvolvendo desde os tempos mais remotos, constitui a base da medicina popular (ALZUGARAY, 1983). Há um crescente interesse no uso de produtos naturais e o consumidor está cada vez mais consciente de seus possíveis efeitos benéficos à saúde (TANG et al., 2004).

Apesar dos grandes avanços da medicina moderna nos últimos cem anos, as plantas medicinais continuam tendo sua contribuição, deveras importante, para o arsenal terapêutico atual. Na última década, o interesse por plantas medicinais tem crescido consideravelmente, estimando-se em 25% o número de fármacos originalmente derivados, direta ou indiretamente de plantas superiores. Em alguns grupos farmacológicos de interesse, cerca de 60% dos medicamentos disponíveis,

tanto no mercado quanto na fase clínica de desenvolvimento, têm sua origem em produtos naturais, principalmente de plantas superiores, como ocorre com os antitumorais e antimicrobianos (CALIXTO, 2000).

A medicina popular tem utilizado vários extratos de plantas para o tratamento das mais diversas patologias, entretanto ainda são poucos os ensaios biológicos que confirmam este efeito (PHILLIPSON, 2000). Para tanto, estudos científicos devem ser conduzidos no sentido de corroborar e confirmar a ação de fármacos e produtos naturais que produzam melhores e duradouros resultados (YUNES, 2001).

As plantas medicinais utilizadas apresentam geralmente similaridades em sua composição química, contendo uma variedade de compostos ativos como fitosteróis, fitoestrogênios, triterpenos (livres ou estereificados a ácidos graxos), lecitinas, lignanas e flavonóides. Estas substâncias possuem atividade anti-androgênica, antiinflamatória, inibem a proliferação celular, sendo que o efeito destes extratos possivelmente não esteja relacionado a um único componente ativo e sim ao efeito sinérgico de seus componentes (BACH et al., 1996; CRISTONI et al., 2000).

As plantas medicinais foram incorporadas pela medicina moderna através da sua utilização direta, ou de seus compostos ativos, como agentes terapêuticos. Servem de matéria-prima para elaboração de compostos semi-sintéticos e seus compostos isolados podem ser utilizados como protótipos para a modelagem de novos produtos sintéticos ou como marcadores taxonômicos (YUNES et al., 2001).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou em um bilhão o número de pessoas vivendo em pobreza absoluta e que cerca de 85% da população mundial depende essencialmente da medicina tradicional para o atendimento de suas necessidades básicas de saúde. A maior parte das práticas terapêuticas tradicionais envolve o uso de extratos de plantas ou seus compostos ativos. Por volta de 1970, a OMS reconheceu o valor das plantas medicinais, considerando os promissores e consagrados resultados da medicina tradicional chinesa. Como conseqüência do retorno aos produtos naturais como fonte de medicamentos, muitos fármacos importantes foram desenvolvidos a partir de 1980 (YUNES e CALIXTO, 2001).

Segundo a OMS, as práticas da medicina tradicional expandiram-se globalmente na última década e ganharam popularidade, incentivada não somente pelos profissionais que atuam na rede básica de saúde dos países em desenvolvimento, mas também naqueles onde a medicina convencional é predominante no sistema de saúde local. Em tal sentido, a OMS tem elaborado uma

série de resoluções com o intuito de considerar o valor potencial da medicina tradicional em seu conjunto para a expansão dos serviços de saúde regionais (OMS, 2000).

No Brasil, país cuja biodiversidade é expressiva possuindo a maior reserva de plantas do mundo, 84% dos fármacos são importados e 60% dos que são produzidos no país são consumidos por, apenas, 23% da população, o que faz com que os remédios caseiros à base de plantas medicinais, sejam a principal fonte de medicamentos para a maioria o povo brasileiro (ELISABETSKY, 1991).

Apesar de várias substâncias naturais com importância terapêutica terem sido isoladas de plantas da flora brasileira, as investigações científicas relacionadas aos estudos químicos, bioquímicos e farmacológicos de substâncias provenientes de plantas medicinais estão aquém do potencial de nossa flora. É importante ressaltar que no Brasil, dos quase seis mil produtos farmacêuticos disponíveis entre fármacos e fitofármacos, poucos foram desenvolvidos por indústrias nacionais. No entanto, investe-se bilhões de dólares na importação da matéria-prima utilizada na produção de fármacos (BLOCK et al., 1998).

O potencial de recursos inaproveitados do bioma Mata Atlântica e ecossistemas associados, pode ser revelado através de estudos detalhados. Entretanto, embora haja inúmeros estudos enfocando o entendimento das florestas tropicais, em especial a Mata Atlântica, ainda persiste a falta de conhecimento sobre a composição florística e estrutura fitossociológica destas florestas. Estes estudos podem ocorrer em diferentes níveis e, dependendo da atividade envolvida, proporcionar diretrizes para uma política de conservação realista, bem como oferecer uma gama de informações aplicáveis em diferentes áreas do conhecimento (AGUIAR, 2003).

O panorama da fitoquímica será mais importante e decisivo para o Brasil num futuro próximo, ao considerarmos sua grande riqueza vegetal ainda sem estudo, e as possibilidades que observamos para o desenvolvimento de novos medicamentos. Analisando todas as fases do desenvolvimento da fitoquímica de plantas medicinais, podemos evidenciar sua importância, não só como embasamento científico de uma medicina alternativa, mas como fonte de novos e potentes fármacos (YUNES e CALIXTO, 2001).

Embora já existam estudos químicos e farmacológicos a respeito de muitas plantas, a maioria delas carece de estudos científicos detalhados que suportem suas

aplicações terapêuticas. Tendo-se em vista a valorosa biodiversidade brasileira, poucas são as plantas nativas que têm sua ação farmacológica comprovada cientificamente (CECHINEL FILHO, 1998). Portanto, pesquisas nesse sentido são indispensáveis para validar o uso de fitoterápicos (YUNES et al., 2001). Dentre os efeitos relacionados a algumas plantas tradicionalmente utilizadas e com ação já confirmada por pesquisas científicas, pode-se citar : redução do colesterol plasmático, efeito anti-inflamatório, efeito citotóxico direto, atividade antiprostaglandina, atividade anti-androgênica e/ou anti-estrogênica (SILVERIO et al., 1998)

Baseando-se nos argumentos supracitados, o presente estudo objetivou pesquisar três plantas medicinais, visando validar, através de ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*, algumas propriedades terapêuticas preconizadas popularmente através de relatos etnobotânicos e etnofarmacológicos. Tais estudos representam os primeiros passos, os quais serão a base para estudos futuros mais detalhados, visando o desenvolvimento de produtos fitoterápicos ou substâncias isoladas a partir de plantas medicinais.

Selecionou-se, para este estudo, plantas utilizadas na medicina popular, as quais são conhecidas por conterem compostos fenólicos em sua composição. No entanto, suas propriedades biológicas não são, até o momento, completamente elucidadas. Os compostos fenólicos contidos nestes extratos são conhecidos em ter alguns efeitos biológicos (TROUILLAS et al., 2003), e são componentes majoritários de algumas plantas medicinais tradicionais. Vários estudos epidemiológicos e experimentais atuais sugerem que tais componentes apresentam importante papel na prevenção de várias doenças (VISIOLI & GALI, 1995) e certos tumores (VISIOLI, BELLOMO & GALLI, 1998), bem como doenças para as quais a produção descontrolada de radicais livres tem sido postulada (DUTHIE, WAHLE & JAMES, 1989). É sabidamente relatado que extratos contendo polifenólicos atuam como “scavengers” de radicais livres, bem como antilipoperoxidantes além de auxiliar na proteção do colágeno da degradação causada pelo radical ânion superóxido (CHEN & HO,). Ademais, componentes fenólicos possuem uma variedade de inibidores da lipoxigenase, potencialmente benéficos, além de propriedades antioxidantes. Em virtude de tais achados, eles têm sido usados para o tratamento de doenças antiinflamatórias (TROUILLAS et al., 2003).

Sistemas integrando bioensaios *in vitro* e *in vivo* têm sido extensivamente usados para monitorar potenciais atividades de extratos de plantas medicinais usados na medicina tradicional. Neste estudo, pretende-se validar ou confirmar, através de ensaios *in vitro* e *in vivo*, a eficácia do uso popular destas plantas, bem como demonstrar a correlação entre a eficiência da atividade antioxidante e antiinflamatória de extratos e frações de três plantas, sendo duas (*Ouratea parviflora* e *Marlierea obscura*) oriundas de uma Área de Preservação Ambiental Permanente, a Reserva da Juréia, no estado de São Paulo, porção integrante da Mata Atlântica brasileira. A terceira planta, *Polymnia sonchifolia*, coletada em Capão Bonito, estado de São Paulo, onde é cultivada.

Como resultado danoso da ação antrópica, atualmente restam, apenas, 5% da Mata Atlântica Brasileira. Ressalta-se que neste trabalho pretende-se também, valorizar a biodiversidade que ainda resta deste ecossistema, através do resgate da cultura popular pelo uso medicinal das plantas, disponibilizar dados etnofarmacológicos a partir de relatos etnobotânicos, além de validar cientificamente as propriedades medicinais atribuídas às plantas aqui estudadas e que serão apresentadas a seguir.

1.1 *Ouratea parviflora* Ball

O gênero *Ouratea* compreende 300 espécies as quais ocorrem principalmente na América do Sul (HEYWOOD, 1978 in MBING et al., 2003).

Ouratea parviflora Ball (Ochnaceae), é nativa da América do Sul, sendo popularmente denominada “coração-de-bugre”. É uma planta medicinal tradicionalmente utilizada no Brasil para o tratamento de úlceras, doenças reumáticas, inflamatórias, isquemia, câncer e achaques gástricos (FELICIO et al., 2004), ou seja, doenças geralmente recorrentes e já claramente associadas à geração de EROs.

Vários biflavonóides foram isolados de *Ouratea spectabilis* (FELICIO et al., 1995), *Ouratea hexasperma* (MOREIRA et al., 1994, 1999), e *Ouratea semiserrata* (VELANDIA et al., 1998). Análises fitoquímicas prévias de suas folhas revelaram a presença do flavonóide rutina em *Ouratea multiflora* (FELICIO et al., 2001), bem como, em *Ouratea flava*, dois novos biflavonóides : flavanonas A e B (MBING et al.,

2003), e em *Ouratea parviflora*, o biflavonóide amentoflavona e alguns diterpenóides (FELICIO et al., 2004).

1.2 *Polymnia sonchifolia* Poepp.Endl.

Asteraceae é uma das maiores famílias de plantas superiores e tem sido descrita como uma fonte rica de componentes bioativos.

Polymnia sonchifolia Poepp.Endl. (Asteraceae) é originária dos Andes, e suas raízes são cultivadas na América do Sul, desde a Venezuela até o noroeste da Argentina, sendo assim, típica de clima tropical e subtropical. É uma planta perene, cultivada para degustação de suas raízes, cujo sabor é doce e de paladar agradável. Há, nas raízes, a ocorrência de açúcares frutanos, não assimiláveis pelo trato digestivo. Devido aos relatos de uso medicinal, indicada contra diabetes, colesterol, inflamação e reconstrutora da flora intestinal, esta planta tem sido plenamente aceita no mercado norte-americano e na Nova Zelândia. É popularmente denominada, no Brasil, por Yacon. Sua raiz tuberosa é usada como alimento no Japão e suas folhas são fortemente resistentes a pragas, provavelmente devido à presença de diterpenos extraídos dos tricomas glandulares das folhas (TAKASUGI e MASUDA, 1996). Evidências arqueológicas confirmam sua presença nas tumbas pré-incas, demonstrando que sua dispersão iniciou-se em tempos remotos. O extrato etanólico de suas folhas inibe a produção de aflatoxina B1 por *Aspergillus flavus*, e é utilizada na medicina popular como antiinflamatória, antimicrobiana, anti-helmíntica, fungistática (presença de fitoalexina-acetofenona e sesquiterpenóides) e antiviral (KAKUTA et al., 1992; ZARDINI et al., 1991; TAKASUGI & MASUDA, 1996). A infusão de suas folhas reduziu os níveis de glicose no sangue de ratos, de 348 para 214 mg/dL, em dez dias.

1.3 *Marlierea obscura*

Marlierea obscura (Myrtaceae) (LANDRUM e KAWASAKI, 1997 in AMARAL, 2001) é uma planta de clima tropical e que ocorre na Mata Atlântica. É popularmente denominada “goiabinha do campo” ou “goiabinha do mato”. Trata-se de uma planta arbórea, com folhas inteiras e sobre a qual não há registro de informações químicas e farmacológicas. Espécies da família Myrtaceae são utilizadas na medicina popular

como antidiabéticas, antidiarréicas, antireumáticas, adstringentes, antiinflamatórias e no tratamento de úlceras crônicas. Estudos fitoquímicos prévios demonstraram que esta família é rica em componentes flavonóides quercitina e quercitrina (JALVEZ et al., 1993) myricetina (ZHONG et al., 1997) e componentes fenólicos do ácido elágico e metilelágico (PAKULSKI e BUDZIANOWSKI, 1996 in AMARAL et al., 2001) os quais possuem conhecida atividade antioxidante. A infusão de folhas da família Myrtaceae é amplamente indicada, na medicina popular, como antiinflamatória. Há poucos estudos fitoquímicos sobre o gênero *Marlierea*. A literatura relata um único trabalho que descreve o isolamento de flavonóides das folhas de *Marlierea schotii* e *Marlierea grandifolia* (AMARAL et al., 2001).

1.4 Estresse Oxidativo e Defesas Antioxidantes

Os efeitos dos radicais livres sobre os sistemas biológicos têm estado em evidência nos últimos anos, especialmente nas doenças relacionadas com o aumento destas espécies reativas no organismo e ao envelhecimento precoce. Varias pesquisas têm demonstrado a participação dos radicais livres 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 importante, já que pode prevenir ou amenizar os problemas causados pelo excesso de espécies reativas no organismo.

1.4.1 Radicais Livres

Nos átomos, os elétrons ocupam uma região no espaço conhecida como orbital. Cada orbital pode ter, no máximo, dois elétrons com *spins* em direções opostas. Para que uma molécula permaneça estável, é necessária a presença de elétrons pareados em sua órbita externa. Entretanto, essa falta de paridade forma uma molécula altamente instável, geralmente de vida média muito curta, o radical livre. Os radicais livres (RL) 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

RL são formados e podem causar efeitos fisiológicos e patológicos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Espécie reativa 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 o $^{\bullet}OH$ pode reagir com qualquer molécula (HALLIWELL, 2001).

Tabela 1. Principais espécies reativas de O_2 e N_2 nas formas de radicais e não radicais. Adaptada de HALLIWELL, 2001.

Espécies reativas de oxigênio (EROs)	
Radicais	Não radicais
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 (1O_2)
Espécies reativas de nitrogênio (ERNs)	
Radicais	Não radicais
Óxido nítrico (NO^{\bullet})	Peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$)
Dióxido de nitrogênio (NO_2^{\bullet})	Alquil peroxinitrito ($ROONO$)

O oxigênio é essencial à vida dos organismos aeróbios, porém sua presença é paradoxal. Predominantemente nos eucariontes, sua função é servir como último aceptor de elétrons na respiração mitocondrial, quando finalmente é 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 à água requer 4 elétrons, e essa redução produz, seqüencialmente, do início ao fim, 3 produtos de redução (DI GIULIO et al., 1995).

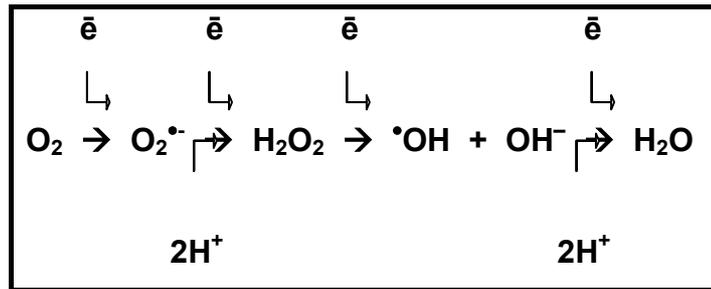


Figura 1. Formação de espécies reativas de oxigênio durante a redução do oxigênio à água. Adaptada de NORDBERG e ARNÈR, 2001.

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 ($\bullet OH$), 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).

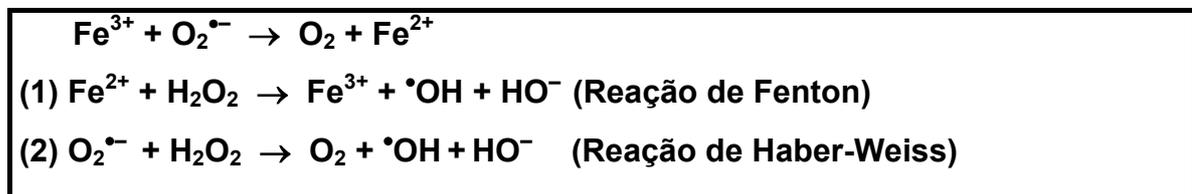


Figura 2. Reações de formação do radical hidroxil ($\bullet OH$). Adaptada de HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999.

A formação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) originado pela adição de um elétron ao oxigênio molecular (O_2), pode ser mediado por enzimas como as NAD(P)H oxidase 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 enzimaticamente 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 1O_2 , (DROGE, 2002). Na presença de metais de transição livres (particularmente ferro ou cobre), $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 podem gerar o radical $\bullet OH$, que é extremamente reativo via reações de Fenton e Haber-Weiss (Figura 2).

Alternativamente, o H_2O_2 pode ser convertido em H_2O , pelas enzimas catalase (CAT) ou glutaciona peroxidase (GPx). Na reação da GPx, a glutaciona (GSH) é oxidada a glutaciona dissulfídio (GSSG), que pode ser novamente convertida a GSH pela glutaciona redutase (GR) em um processo que consome NADPH (Figura 3), (DROGE, 2002; HADDAD, 2002).

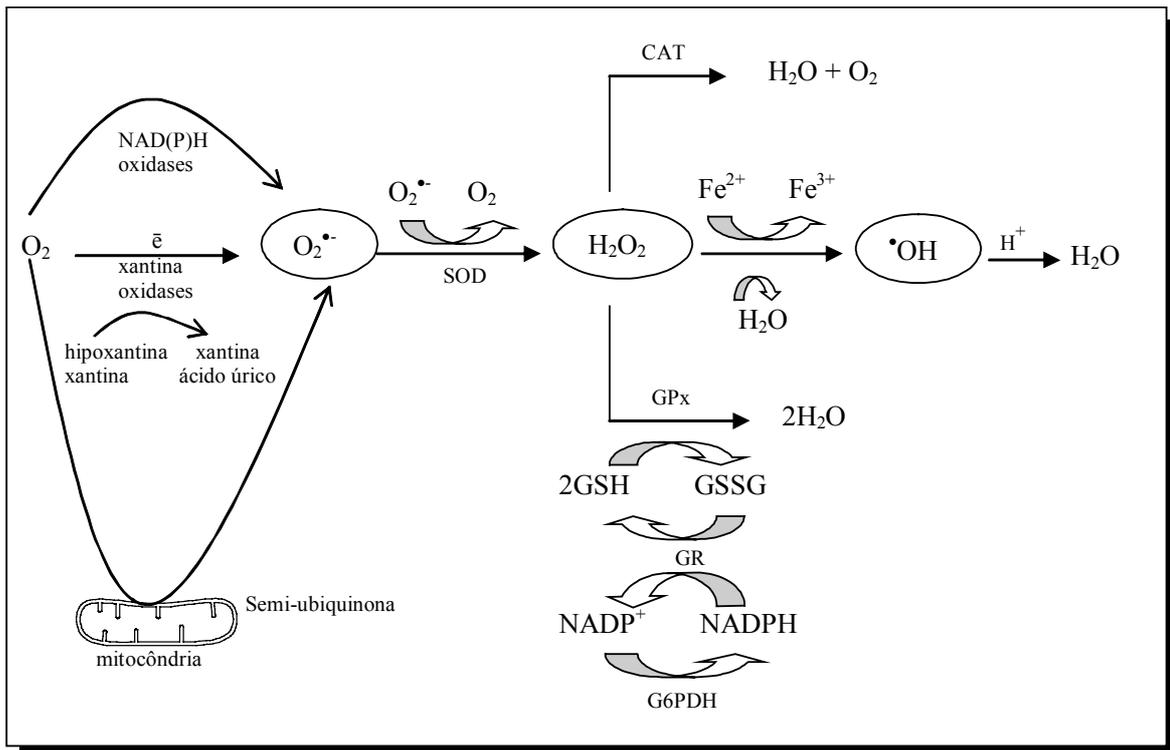


Figura 3. Vias de geração de EROs e mecanismo de defesa enzimática. Adaptada de DROGE, 2002; HADDAD, 2002 e BECKER, 2004.

O mecanismo de geração das EROs em sistemas biológicos pode ocorrer por inúmeras reações bioquímicas, sendo que quatro destes 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 acredita-se ocorrer o mecanismo responsável pela produção da maior parte dos RL no organismo (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 notadamente a SOD, CAT e GPx, ou não enzimáticos, tais como α -tocoferol (principal componente da vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C), flavonóides e GSH (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

1.4.2 Defesas Antioxidantes

Os principais sistemas de defesas antioxidantes enzimáticas celulares são compostos pela SOD, CAT e GPx (figura 3), que constituem a primeira defesa endógena de neutralização dos radicais livres. Secundariamente, a glutathione redutase (GR) e a glutathione S-transferase (GST) auxiliam na regeneração da GSH e na conjugação de metabólitos reativos. Através delas, as células tentam manter baixas as quantidades do $O_2^{\cdot-}$ e de H_2O_2 , evitando assim, a formação do $\cdot OH$, que embora de vida curta, na fração de segundos, e em reduzida concentração, 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 $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e O_2 (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). As células humanas apresentam, pelo menos, 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 está presente na maioria das células aeróbicas, especialmente concentradas nos hepatócitos e eritrócitos, localizando-se principalmente em organelas sub-celulares denominadas 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 H_2O_2 oxidando a GSH à 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 (HALLIWELL, 2001).

As GSTs, também desempenham um papel fisiológico importante, iniciando a detoxificação de agentes alquilantes potenciais, incluindo compostos

farmacologicamente ativos, entretanto não atuam diretamente contra as EROs. Estas enzimas catalisam a conjugação de metabólitos reativos com os grupamentos SH da GSH, neutralizando os sítios eletrofílicos destes compostos e gerando produtos mais solúveis em água (HABIG et al., 1974).

As células também exibem antioxidantes não-enzimáticos que incluem compostos endógenos como a GSH, e 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 mesmo 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 bio-redução e conjugação, tais como : integridade do citoesqueleto, síntese de proteínas (transcrição) e de DNA (replicação), transporte de aminoácidos, “scavenger” de radicais livres, 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 conferir 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 bloqueando o potencial tóxico das EROs; ii) pode também ajudar a ativar muitos genes que têm a função de extinguir o dano oxidativo (NEBERT, 2000; STEHBENS, 2003).

Além dos antioxidantes clássicos presentes em concentrações 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).

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, denominadas de estresse oxidativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

1.4.3 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 apoptose (HALLIWELL, 2001).

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

Com relação ao DNA, estudos associam a fragmentação deste causada pelo estresse oxidativo sob condições de depleção de GSH com apoptose ou necrose (HIGUCHI, 2003). 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.

Considera-se que a fragmentação do DNA sob condições de depleção de GSH ocorre por dois mecanismos: **i)** radicais livres lipídicos produzidos a partir dos ácidos graxos poliinsaturados (tanto na membrana plasmática quanto nuclear) poderiam diretamente atacar o DNA presente na cromatina do núcleo. **ii)** a lipoperoxidação (LPO) em uma célula causa a perda da integridade da membrana celular e pode 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, ocorre

em uma seqüência de reações já conhecida. Inicialmente, um átomo de hidrogênio é seqüestrado do ácido graxo contendo, ao menos, duas duplas ligações separadas por metilenos intercalados (LH), originando um radical livre centrado no carbono (radical lipídico) (L^\bullet) com um rearranjo das duplas ligações (conjugação de dienos), seguido pela interação do L^\bullet com o oxigênio molecular (O_2), para formar um radical peroxil (LOO^\bullet), que 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).

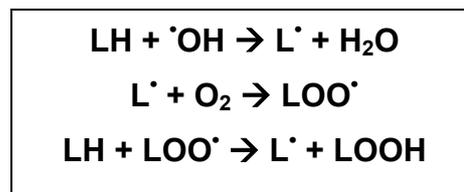


Figura 4. Representação esquemática das reações de iniciação e propagação da LPO. Adaptada de HERMES-LIMA et al., 1995.

As conseqüências mais comuns da LPO correspondem à perturbação das funções essenciais das membranas celulares e organelas, incluindo o processo de transporte transmembrana, 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 a proteínas (ERNSTER e HOCHSTEIN, 1994).

Os níveis elevados de EROs no organismo parecem ser um dos maiores contribuintes para o envelhecimento (HARMAN, 1992), e para muitos processos degenerativos como o câncer, aterosclerose, doenças neurodegenerativas, cataratas dentre outros (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Numerosos eventos patológicos, como o processo inflamatório e de envelhecimento, estão associados à geração de EROs e indução da peroxidação lipídica. A ação antioxidante dos constituintes de plantas tem sido associada aos componentes polifenólicos, lactonas sesquiterpênicas e flavonóides presentes nestas, os quais exibem atividade antiinflamatória.

1.5 Inflamação e Estresse Oxidativo

A partir da década de 80, cresceu o interesse sobre as EROs e ERNs através de estudos que revelaram que tais radicais livres estavam relacionados a doenças inflamatórias como a artrite reumatóide, enfisema pulmonar, aterosclerose e doenças neurodegenerativas (WINYARD et al., 1997; MERRY et al., 1989 in SIES 1997). Até então, esses radicais vêm sendo estudados a cerca de seus efeitos destrutivos em meios biológicos. Tal relato é verdadeiro, ao passo que altas concentrações destes radicais (EROs e ERNs) têm uma relação particular com dano a biomoléculas como o DNA (WILLIAMS, 1985; WISEMAN e HALLIWELL, 1996; in SIES, 1997). Todavia, evidências recentes têm demonstrado que estes radicais têm papel fisiológico importante como mensageiros celulares a baixas concentrações (SARAN e BORS, 1989; SNYDER, 1995 in SIES, 1997).

Várias são as fontes de EROs na inflamação. Os maiores produtores de EROs no tecido inflamatório são os leucócitos sanguíneos, os quais tornam-se ativados e aderem-se à superfície das células endoteliais. A NADPH oxidase de leucócitos polimorfonucleares, contém citocromo B₂₄₅ e cataliza a redução monovalente do O₂ para formar O₂^{•-} (FORMAN e THOMAS, 1986; SEGAL, 1991 in SIES, 1997), outras células inflamatórias como linfócitos e macrófagos possuem uma NADPH oxidase na membrana (HANCOCK et al., 1989 in SIES, 1997). A cascata do AA que gera prostaglandinas e leucotrienos gera EROs no processo do metabolismo de seus produtos (CADENAS, 1989). Durante o exercício nas articulações inflamadas, a pressão intra-articular é transmitida diretamente para a vasculatura da membrana sinovial, produzindo oclusão dos capilares sinoviais superficiais e conseqüente isquemia. A reperusão da membrana sinovial ocorre quando o exercício cessa e, conseqüentemente, leva à geração de EROs através do sistema xantina oxidase (MERRY et al., 1989).

O íon ferroso (Fe²⁺) geralmente não está presente em condições fisiológicas (*in vivo*) e não se acreditava que esse íon pudesse ser gerado em concentrações suficientes para catalizar a formação de O₂^{•-} em condições inflamatórias. No entanto, com medidas químicas sensíveis, foi relatado que a concentração de ferro livre no líquido sinovial de joelhos inflamados, pode catalizar a Reação de Fenton e gerar grandes quantidades de EROs (CUZZOCREA et al., 1998, 1999, 2001).

IL-1 e TNF- α , dois mediadores importantes no processo inflamatório, são capazes de induzir a produção de EROs, perpetuando assim sua formação e ação (ADAMSON e BILLINGS, 1992; GOUCHEROT-POCIDALO e REVILLARD, 1993; LO et al., 1998).

A ativação de células endoteliais também gera EROs e contribui significativamente para a manutenção de um ambiente oxidante no sítio inflamatório. O tratamento de células endoteliais da veia umbilical humana com IL-1, IFN- γ , resulta em um aumento dependente da dose e do tempo da produção de O₂^{•-} (MATSUBARA & ZIFF, 1986).

Vários são os efeitos das EROs no processo inflamatório. Uma característica chave das doenças inflamatórias, como a artrite reumatóide, é o aumento da expressão de certos genes que codificam proteínas (como as citocinas) e proteinases envolvidas na destruição celular. Uma importante característica da expressão gênica é o controle da transcrição por proteínas específicas, os fatores de transcrição (McKAY, 1994). Dois dos fatores de transcrição, AP-1 e NF- κ B, são influenciados pelo estado redox (VLAKE, 1994). Vários autores têm postulado que a ativação do NF- κ B por EROs seja um dos eventos iniciais na indução de reações inflamatórias (KALTSCHMIDT et al., 1994). Tem sido demonstrado que EROs podem induzir a atividade do NF- κ B em células T humanas (SCHRECK et al., 1991).

1.5.1. O Processo inflamatório

O significado da inflamação pode ser definido como uma reação microvascular induzida por um agente agressor aos tecidos e, conseqüentemente, movimentação de elementos intravasculares, como fluidos, células e moléculas para o espaço extravascular (SIQUEIRA, 2000; CRANSHAW e GRIFFITHS, 2003). Todo elemento que possa estimular o organismo pode ser considerado como eventual agente etiológico da inflamação, dentre eles destacam-se os agentes químicos (cáusticos, metais pesados, ácidos, álcalis fortes, micotoxinas, venenos vegetais e animais); agentes físicos (calor e frio, eletricidade, radiações, sons e ultra-sons, traumas mecânicos e atritos); biológicos (vírus, exo e endotoxinas bacterianas, fungos, protozoários, helmintos, artrópodes, entre outros). As degenerações ou necroses tissulares e os derivados de alterações na resposta imunológica (por

imunocomplexo ou autoimunidade), são outros agentes que podem ser mencionados (VASCONELOS, 2000).

O processo inflamatório tem como finalidade dominar, minimizar, enclausurar, neutralizar, destruir, eliminar o agente agressor, assim como induzir a reparação de células do epitélio (reepitelização), do parênquima (regeneração), do estroma (cicatrização) e de tecidos mortos (HERSH; WEISS; ZYCHLINSKI, 1998; CONE 2001). Sem este sistema de reparo, as infecções prosseguiriam desimpedidas, as feridas jamais cicatrizariam, não haveria cura e reparo das lesões, e os órgãos danificados poderiam tornar-se lesões ulceradas permanentes. Contudo, a resposta inflamatória pode também ser potencialmente lesiva como a que ocorre na asma, na doença obstrutiva crônica, entre outras (MADDOX e SCHWARTZ, 2002).

Didaticamente, a resposta inflamatória pode ser classificada em reação aguda e crônica (CORRÊA, 2004). A resposta inflamatória aguda é caracterizada em fases distintas, cada uma delas sendo aparentemente mediada por mecanismos diferentes (GEREMIAS, 2004). Na fase aguda, de duração variável, predominam fenômenos vasculares-exudativos : vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar (CIRINO; FIORUCCI; SESSA, 2003). A vasodilatação, o engurgitamento de capilares e arteríolas, bem como a participação adicional de outros vasos que normalmente estariam hipofuncionantes, promove um aumento do fluxo sanguíneo na área lesada e, este efeito, é responsável pelo eritema ou rubor na área comprometida. Ademais, pode ocorrer elevação da temperatura local (LATEY, 2001).

O aumento da permeabilidade vascular consiste na saída de um fluido rico em proteínas (exsudato) para o meio extravascular resultando em acúmulo deste, no local da lesão (edema) (PATTERSON e LUM, 2001; LEY, 2002). O edema tecidual comprime as terminações nervosas causando dor e conseqüente formação do edema e dor, os tecidos afetados perdem suas funções normais (DAVIES e HAGEN, 1997; CORRÊA, 2000). Em decorrência do aumento da permeabilidade vascular, a velocidade da circulação diminui (estase sanguínea) contribuindo para a marginação dos leucócitos (SIEGELMAN; STANESCU; ESTESS, 2000). A seguir, ocorre uma fase subaguda, caracterizada por infiltração de leucócitos e de células fagocíticas para o sítio da lesão. Este evento celular é dito quimiotaxia (ALI et al., 1997; FRANGOIANNIS; SMITH; ENTMAN, 2002). No local da lesão os neutrófilos e

macrófagos reconhecem o agente agressor, englobam e o destroem (fagocitose) (RODRIGUES et al., 2002).

1.5.2 Correlação entre ação antiinflamatória e estresse oxidativo

As EROs participam tanto do metabolismo normal da célula quanto em diversas patologias. Em várias condições patológicas, como as doenças inflamatórias, a homeostase entre a produção de antioxidantes e pró-oxidantes pode ser afetada, acarretando um aumento na produção de EROs, que por sua vez, destroem o antígeno responsável pelo processo inflamatório. Contudo, tal produção excessiva leva à injúria tecidual pelo dano causado às macromoléculas e lipoperoxidação de membranas. Ademais, as EROs podem atuar como mensageiras secundárias ativando a produção de outros mediadores envolvidos no processo inflamatório (MAXWELL, 1995; MIESEL et al., 1995; POLLA et al., 1995; HAANEN e VERMES, 1995; WHISLER et al., 1995).

1.5.3. Plantas medicinais e fitoterápicos como antiinflamatórios

Vários fármacos antiinflamatórios têm mostrado, recentemente, um mecanismo antioxidante como parte de sua atividade. Entre tais fármacos pode-se citar o nimesulide (FACINO et al., 1993), aminosalicilatos (MILES e GRISHAM, 1994), salicilato de sódio e ácido acetil salicílico (KOPP e GOSH, 1994 in SIES, 1997), componentes tiolatos como a aurotioglucose (YANG et al., 1995 in SIES, 1997), glicocorticóides (AUPHAN et al., 1995; SHEINMAN et al., 1995 in SIES, 1997) e poliaminas (LOVAAS e CARLIN, 1991; FERRANTE et al., 1986 in SIES, 1997), dentre outros fármacos.

Contudo, é interessante estudar produtos de origem natural, tais como extratos de plantas usadas na medicina tradicional, as quais não se pode afirmar de antemão, que também possuam um mecanismo antioxidante.

PÉREZ-GARCIA e MARIN, 1996 relataram, através de ensaios *in vivo* e *in vitro*, a diminuição do estresse oxidativo causado pelo extrato aquoso de *Pucea sagittalis* (planta medicinal popularmente utilizada na América do Sul), que ocasionou o controle da inflamação pela inibição da atividade de EROs.

ISMAILI et al., 2004 relataram atividade antiinflamatória pelo uso tópico, através de ensaios *in vivo* e atividade antioxidante *in vitro* dos extratos das folhas de *Thymus satureoides* Boiss, *Thymus willdenowii* Boiss, *Thymus brissonettii* Boiss (Labiatae), plantas aromáticas tradicionalmente utilizadas como medicinais pela população do Norte da África, cujo nome popular é “azukni”.

TROUILLAS et al., 2003 relataram a correlação entre atividade antiinflamatória e antioxidante em algumas plantas medicinais amplamente utilizadas na medicina popular francesa, tais como *Filipendula ulmaria*, *Alchemilla vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*, *Urtica dioica*, *Equisetum arvense*, *Betula pendula*, *Ilieracium pilosella*, *Achiellea millefolium*, *Lithospermum officinal*, *Cynara scolymus*, *Lamium album*, *Vaccinium myrtillus*, *Chamomilla recutia*, *Humulus lupulus*, *Melilotus officinalis* e *Lotus corniculatus*.

Flavonóides de origem vegetal, como a quercitina, inibe a produção de $O_2^{\bullet-}$ por neutrófilos humanos, sua degranulação e geração de OH^{\bullet} , a flavona-3-hidroxifarrerol inibe o *burst* respiratório em neutrófilos humanos ativados. Muitos destes compostos têm mostrado atividade “scavenger” de EROs e também inibidoras da lipoperoxidação no processo inflamatório (PIETTA, 2000).

Seguindo a indicação popular de uso das espécies *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifolia* e *Marlierea obscura*, como antiinflamatórias, optou-se em analisar, neste trabalho, através de ensaios biológicos, bioquímicos e de mutagenicidade, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, a possível correlação entre atividade antioxidante e antiinflamatória dos extratos e frações obtidos das referidas plantas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho objetivou avaliar o potencial antioxidante e antiinflamatório dos extratos brutos e frações de *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifolia* e *Marlierea obscura*, utilizando-se modelos biológicos e bioquímicos *in vitro* e *in vivo*.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar *in vitro* o potencial antioxidante de todos os extratos brutos e frações de *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifolia* e *Marlierea obscura*, utilizando o ensaio de captação do radical DPPH, $O_2^{\bullet-}$ e $\bullet OH$, além da lipoperoxidação;
2. Avaliar *in vivo* 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 o extrato bruto e fração hidroalcoólica de *Ouratea parviflora* (os quais revelaram os melhores resultados nos ensaios *in vitro*), e posteriormente, tratados com um agente indutor de estresse (tetracloreto de carbono : CCl_4);
3. Avaliar *in vivo* o potencial antiinflamatório dos extratos brutos e frações de *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifolia* e *Marlierea obscura*, que revelaram os melhores resultados nos ensaios referentes aos itens 1 e 2 supracitados, através do modelo da indução do edema de pata em camundongos pela carragenina.

3. METODOLOGIA

3.1 Extratos brutos e frações das plantas medicinais

As folhas de *Ouratea parviflora* e *Marlierea obscura* foram coletadas em 2001, na Reserva da Juréia, área de preservação ambiental, porção integrante da Mata Atlântica, estado de São Paulo, Brasil. As espécies foram identificadas e as exsiccatas encontram-se depositadas no Herbário do Estado de São Paulo Eneida P. K. Fidalgo, do Instituto de Botânica. As folhas de *Polymnia sonchifolia* foram coletadas em Capão Bonito, estado de São Paulo, onde é cultivada.

Os extratos e frações das plantas, utilizados neste estudo para a avaliação do potencial antioxidante e antiinflamatório, foram produzidos e gentilmente cedidos pela Dra. Maria Helena Rossi do Laboratório de Química e Farmacologia de Produtos Naturais, do Centro de Sanidade Animal, do Instituto Biológico de São Paulo.

3.1.1 Preparo do extrato bruto e frações das plantas

3.1.2 Preparo do extrato bruto e frações de *Ouratea parviflora*

O material vegetal (1,7 Kg de galhos e folhas), após a secagem, foi moído e extraído com etanol (durante três dias, por três vezes consecutivas), do qual obteve-se, após a evaporação do solvente, o extrato bruto etanólico.

O extrato etanólico (78,25 g) foi solubilizado em etanol:água 75% e submetido a partições com hexano, clorofórmio e acetato de etila, obtendo-se as frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e hidroalcoólica. As frações foram purificadas por cromatografia em coluna de sílica e Diaion HP-20 e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A fração hexânica foi particionada em hexano: metanol, obtendo-se as frações hexânica e metanólica, isolando-se da fração metanólica, a apigenina e amentoflavona. Da fração clorofórmica foi isolado um biflavonoide, a agastiflavona. Da fração acetato de etila foram isolados apigenina, um glicopiranosídeo, e um norisoprenóide da família dos mastigmanos. Da fração hidroalcoólica, além de mistura de açúcares, foi isolado o flavonóide rutina.

Os componentes obtidos foram identificados com base em ressonância magnética nuclear de Hidrogênio (RMNH¹) e Carbono (RMNC¹³), além de espectrometria de massas (SM).

3.1.3 Preparo do extrato bruto e frações de *Polymnia sonchifolia*

As folhas secas foram moídas e submetidas à maceração com etanol a frio por 3 a 4 dias, repetindo-se o processo por 3 vezes consecutivas. Após, efetuou-se a evaporação do solvente sob pressão reduzida, o resíduo chamado de extrato etanólico (B) foi submetido a uma cromatografia rápida sob vácuo em coluna de sílica 60, utilizando-se os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. Desta forma, foram obtidas as frações: hexânica, clorofórmica (B6), acetato de etila (B1) e metanólica (B5). A fração acetato de etila (B1) foi cromatografada em coluna de silicagel 60H sob pressão e o material foi eluído sucessivamente com as misturas: hexano/ acetato 3:7, hexano/ acetato 2:8 e acetato/metanol 1:1, obtendo-se respectivamente as frações: B2, B3 e B4.

Da fração B2 foram isoladas as lactonas sesquiterpênicas enidrina e uvedalina . Da fração B3 foram isoladas além da enidrina e uvedalina, os flavonóides 3,7-di-O-metil quercetina e 7-O-metil hesperetina. Da fração B4 foram isolados os dois flavonóides mencionados. A fração B5 constitui-se numa mistura de açúcares.

3.1.4 Preparo do extrato bruto e frações de *Marlierea obscura*

A planta foi coletada Na Reserva da Juréia (estado de São Paulo) e identificada por Inês Cordeiro do Instituto de Botânica. As folhas secas foram moídas e submetidas à maceração com etanol a frio por 3 a 4 dias, repetindo-se o processo por 3 vezes consecutivas. Após a evaporação do solvente sob pressão reduzida, o resíduo chamado de extrato etanólico (B) foi submetido a uma cromatografia rápida sob vácuo em coluna de sílica 60 utilizando-se os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. Desta forma foram obtidas as frações: hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanólica .

3.2. Reagentes

O ácido nitrilo acético (NTA), ácido tiobarbitúrico (TBA), fenazina-metasulfato, hidroperóxido de cumeno, 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico (DTNB), hidroxitolueno butilado (BHT), nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), “nitrilo blue tetrazolium” (NBT), fenazina-metassulfato, lauril sarcosinato de sódio, dimetil-sulfoxido (DMSO), tetracloreto de carbono (CCl₄), brometo de etídio, peróxido t-butila, triton X-100, rutina, xantina, xantina oxidase, e carragenina foram adquiridos junto a Sigma-Aldrich (St Louis, USA). Cloreto férrico (FeCl₂), éter, EDTA e tampão fosfato de potássio adquiriu-se através da Reagen, Brasil.

Agarose NMA – “normal melting agarose”, agarose LMA – “low melting agarose”, PBS livre de Ca²⁺ e Mg²⁺, solução de Hanks e TRIS foram adquiridos junto à Gibco BRL, Escócia.

Os kits para a dosagem da AST, ALT foram adquiridos junto à Labtest Diagnóstica S.A. (MG, Brasil).

3.3 Animais

Para a realização dos experimentos utilizou-se camundongos SWIS (*Mus musculus*), machos, 25 – 40g de peso, com aproximadamente 70 dias, provenientes do Biotério Central da UFSC, através do Departamento de Bioquímica (BQA), Centro de Ciências Biológicas (CCB), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Os animais foram aclimatados no biotério do Laboratório de Bioquímica Experimental durante um período de 5 dias. Pesou-se e dividiu-se os animais em grupos de seis, os quais foram mantidos em gaiolas plásticas sob condições ambientais controladas (ciclo claro-escuro de 12 h, temperatura 25 ± 2°C e 60% de umidade relativa do ar), recebendo ração comercial e água *ad libitum*.

Este estudo integra um projeto maior aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), aprovado sob o número de protocolo de pesquisa/ensino 149/CEUA - 23080.009607/2002-88.

3.4 Ensaios Biológicos

3.4.1 Atividade antiinflamatória *in vivo*

3.4.1.1 Modelo do edema de pata em camundongos induzido pela carragenina

Após o período de adaptação, os camundongos foram divididos em grupos de seis animais cada, com distribuição relativamente aproximada de peso. Cada grupo de animais foi pré-tratado, via oral, com 300 mg/kg de peso diluída em solução salina com 5% de etanol, com as seguintes amostras : extrato bruto e fração hidroalcoólica de *Ouratea parviflora*, extrato bruto de *Polymnia sonchifolia*, e fração metanólica de *Marlierea obscura*. O grupo controle negativo recebeu somente a solução veículo PBS. Após 30 min foi feita a aplicação via intraplantar da carragenina. A seguir, o volume da pata foi determinado através do aumento do peso promovido pela imersão da pata até a articulação tíbio-társica em um Becker contendo uma solução 2,5% de lauril sulfato de sódio, colocado sobre uma balança analítica eletrônica. As variações de volume das patas foram registradas numericamente pela balança nos tempos zero (antes da injeção do agente flogístico carragenina) e após 30, 60, 120 e 240 minutos. Os resultados foram expressos como médias \pm E.P.M. referentes à diferença de volume entre a pata posterior direita injetada com carragenina, e a pata posterior esquerda injetada com veículo PBS (salina tamponada com fosfato, composição em mmol/L : NaCl 137, KCl 2,7 e tampão fosfato 10).

Calculou-se as percentagens de inibição para cada grupo tratado em relação ao controle através da área sobre a curva dos animais controle, considerados como 100% de edema, e animais tratados (TORRES, 2000).

3.4.2 Atividade antioxidante *in vitro*

3.4.2.1 Determinação da atividade “scavenger” do radical 1,1-difenil-2-picril hidrazina

O “scavenger” do radical 1,1-difenil-2-picril hidrazina (DPPH) foi avaliado pela medida da extinção de sua absorção máxima em 517 nm (MENSOR, 2001). O procedimento constituiu-se na incubação, durante 30 min à temperatura ambiente, de uma solução etanólica de DPPH 3,0 mM com concentrações crescentes (5, 10, 25, 50, 125 e 250 µg/mL) dos extratos e frações de *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifolia* e *Marlierea obscura*. Após o referido período, mensurou-se espectrofotometricamente em 517 nm, e o percentual “scavenger” do radical DPPH foi calculado em termos da porcentagem de atividade antioxidante (AA%), conforme a seguinte fórmula:

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

A concentração das amostras necessárias para captar 50% do radical livre DPPH (CE₅₀) foi calculada por análise de regressão exponencial e linear, e foram expressas em média ± E.P.M.

3.4.2.2 Formação e monitoramento da atividade “scavenger” do radical ânion superóxido (O₂^{•-})

Para avaliar-se a capacidade “scavenger” do O₂^{•-} utilizou-se os sistemas geradores do referido radical, os quais podem ser gerados tanto pelo sistema enzimático, através da reação catalisada pela enzima xantina oxidase (XO), que utiliza a xantina como substrato levando à formação de O₂^{•-} e ácido úrico, quanto pelo sistema não enzimático, através da reação do metassulfato de fenazina com NADH (ROBAK e GRYGLEWSKI, 1988).

Inicialmente, avaliou-se o efeito dos extratos e frações de *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifolia* e *Marlierea obscura* sobre a atividade da enzima XO. O sistema de incubação constituiu-se de : tampão fosfato 0,1 M, pH 7,8; extratos e frações de *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifolia* e *Marlierea obscura* com concentrações crescentes (50, 75, 125, 250, 500 e 1000 µg/mL); xantina 100 µM e XO 0,04 U/mL. Após 10 min de incubação a 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 mensurada espectrofotometricamente a 295 nm.

Posteriormente, avaliou-se o potencial antioxidante dos extratos e frações de *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifolia* e *Marlierea obscura* na redução do “nitro

blue tetrazolium” (NBT) pelo $O_2^{\bullet-}$, gerado pela reação catalisada pela XO. O sistema de incubação constituiu-se de : tampão fosfato 0,1 M, pH 7,8; extratos e frações de *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifolia* e *Marlierea obscura* com concentrações crescentes (50, 75, 125, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$); xantina 100 μM ; NBT 6 mM e XO 0,04 U/mL. Incubou-se por 10 min a temperatura ambiente. Após, interrompeu-se a reação com a adição de HCl 0,1 N. A redução da absorbância do NBT foi avaliada espectrofotometricamente em 560 nm (ROBAK & GRYGLEWSKI, 1988) de acordo com a seguinte fórmula:

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

Os valores da concentração efetiva (CE_{50}) representaram a concentração suficiente da amostra necessária para captar 50% dos radicais $O_2^{\bullet-}$, os quais foram calculados por análise de regressão exponencial, expressos em média \pm E.P.M. Considerou-se os valores da absorbância dos controles como 100% da redução do NBT sem a presença dos extratos e frações das plantas testadas.

3.4.2.3 Formação e monitoramento da atividade “scavenger” do radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$)

A formação e monitoramento do radical hidroxil foram determinados pelo método da desoxirribose segundo HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1981 e NISHIDA et al., 1991. Tal método baseia-se na oxidação da desoxirribose provocada por $\cdot\text{OH}$ 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. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

Inicialmente incubou-se por 10 min a 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 adicionou-se 150 μL de tampão fosfato de potássio 80 mM com pH 7,4; 60 μL dos extratos e frações de *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifolia* e *Marlierea obscura* com concentrações crescentes (10, 100, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$); 100 μL de desoxirribose 33,6 mM; água destilada e 100 μL de H_2O_2 16,8 mM. A seguir, realizou-se nova incubação por 20 min a 37 °C em banho-maria. 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 por 15

min a 100 °C em banho-maria e finalizou-se a reação com banho de gelo por 5 min. A absorbância das soluções foi mensurada espectrofotometricamente em 532 nm, contra um tubo, denominado branco, contendo todos os reagentes e com a mesma concentração das amostras utilizadas no ensaio, excetuando-se a desoxirribose. Calculou-se o potencial “scavenger” do $\cdot\text{OH}$ em termos de porcentagem de atividade antioxidante (AA%) conforme a fórmula a seguir :

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

Os resultados foram expressos em termos de CE_{50} que representa a concentração suficiente da amostra necessária para captar 50% dos $\cdot\text{OH}$, os quais foram calculados por análise de regressão exponencial e expressos como média \pm E.P.M. Considerou-se, para os controles, 100% de oxidação para os valores das absorbâncias obtidas.

3.4.2.4 Proteção contra a peroxidação lipídica

Avaliou-se a proteção contra peroxidação lipídica de acordo com CHEN e TAPPEL, (1996), utilizando-se homogenato de fígado de ratos como substrato alvo. Os animais foram anestesiados com éter etílico e sacrificados por deslocamento cervical. Retirou-se o fígado e lavou-se com solução salina 0,9%, pesou-se e homogeneizou-se (Ultraturax – Bosh) em tampão fosfato de potássio 10 mM e pH 7,0 em KCl 140 mM. Centrifugou-se o homogenato a 2000 g por 5 minutos a 4°C e, o sobrenadante diluiu-se (3:9) em tampão fosfato de potássio 80 mM e pH 7,4.

Posteriormente, fez-se a incubação de : 100 μL H_2O destilada, 125 μL de tampão fosfato de potássio 80 mM e pH 7,4, 100 μL de peróxido t-butila, 100 μL de diferentes concentrações dos extratos e frações de *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifolia* e *Marlierea obscura* (31,25; 62,5; 125; 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$), e 150 μL do homogenato diluído. Ao tubo controle adicionou-se 100 μL de BHT. Tal mistura foi incubada a 37 °C, sob agitação e condições aeróbicas por 2 horas. Após incubação, adicionou-se 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 em banho-maria e, a seguir, transferiu-se as amostras para o banho de gelo, por 5 min. A absorbância das soluções foi monitorada espectrofotometricamente em 532 nm.

Calculou-se o potencial de proteção contra a lipoperoxidação em termos de atividade antioxidante de acordo com a seguinte fórmula:

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

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

3.4.3 Potencial antioxidante *in vivo* e indicadores de estresse oxidativo

3.4.3.1 Protocolo experimental

Os camundongos foram divididos em grupos (n = 6), onde o grupo 1 foi tratado via intraperitoneal com CCl₄ (agente indutor de estresse) 0,5 mL / 100 g (30% v/v) em solução salina; os grupos 2 e 3 foram pré-tratados por via oral durante 7 dias com o extrato bruto e fração hidroalcoólica de *Ouratea parviflora* (300mg/Kg), o grupo 4 foi tratado com rutina (6,0 mg/kg). No sétimo dia tratou-se todos os camundongos com CCl₄. Após as 24 horas da administração do CCl₄, anestesiou-se os animais com éter etílico e coletou-se o sangue periférico por punção ocular para a avaliação enzimática da função hepática e fragmentação do DNA. Imediatamente após a coleta sangüínea, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os fígados retirados e lavados com solução salina 0,9% para as dosagens dos indicadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes.

3.4.3.2 Avaliação de dano às membranas celulares

3.4.3.2.1 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 rosácea (OHKAWA, 1979; BIRD e DRAPER, 1984).

Após a morte dos camundongos, os fígados foram retirados e colocados imediatamente em caixas térmicas contendo gelo e ao abrigo da luz. Separou-se uma pequena porção e pesou-se para a preparação do homogenato, obtido em

ácido fosfórico 1,1% (1:20 p/v). A homogeneização foi realizada em banho de gelo, com cerca de 20 impactos em homogenizador Potter-Elvehjem.

Após a referida homogeneização, transferiu-se 400 μ L do homogenato para 400 μ L da solução (1% TBA / 50 mM NaOH / 0,1 mM BHT) e 0,2 mL de ácido fosfórico 7%. Posteriormente, incubou-se a amostra a 100 °C por 15 min em banho-maria, e então, adicionou-se 1,5 mL de butanol. Finalmente, os tubos foram agitados vigorosamente em vórtex e centrifugados a 2000 g por 5 min. A fase orgânica (sobrenadante) foi removida e mensurada espectrofotometricamente, em 532 e 600 nm. Para o branco substituiu-se a solução de TBA por HCl 3,0 mM (HERMES-LIMA e STOREY, 1995).

Calculou-se a concentração de TBARS (nmol/g) utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 156 mM segundo a fórmula a seguir:

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

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

Os ensaios para avaliar a concentração dos hidroperóxidos lipídicos foram realizados segundo HERMES-LIMA et al., 1995. As amostras de fígado (200 mg) foram pesadas e homogeneizadas em 1,0 mL de metanol a 4 °C, grau HPLC (1:5 g/v). Os homogenatos foram centrifugados a 1000 g, a 4 °C, e os sobrenadantes obtidos foram removidos. Então foram incubados os seguintes reagentes : 250 μ L de FeSO₄ 1 mM, 100 μ L de H₂SO₄ 0,25 M, 100 μ L de xilenol laranja 1 mM e 450 mL da água destilada. Então adicionou-se 60 μ L do homogenato e ajustou-se o volume final para 1 mL usando-se água destilada. O branco foi preparado substituindo-se o extrato do tecido por água destilada. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 24 horas até que a reação estivesse completa. A absorbância foi mensurada em 580 nm. Em seguida, adicionou-se às amostras do tecido, 5 μ L de cumeno hidroperóxido 1 mM e então, aguardou-se por 60 min e a absorbância foi mensurada novamente, em 580 nm.

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

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

V = volume do extrato da amostra utilizada; 6 = fator de diluição 1:5 g/v

3.4.3.3 Avaliação do dano ao DNA

3.4.3.3.1 Ensaio Cometa

EROs podem causar alterações estruturais no material genético, tais como deleções, rearranjos e inserções. Além da produção mitocondrial, EROs são geradas em quadros patológicos (CUZZOCREA et al., 2000). No intuito de avaliar se os extratos e frações das plantas aqui pesquisadas poderiam reduzir possíveis danos ao DNA promovidos pelas EROs, utilizou-se o teste do cometa, um ensaio de genotoxicidade relativamente recente o qual une técnicas citogenéticas e bioquímicas para detecção de danos ao DNA, inclusive danos oxidativos avaliando-se a fragmentação do DNA através de eletroforese horizontal e de microscopia de imunofluorescência (SINGH et al., 1988). 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. 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 consistia de tampão Tris 0,4 M, pH 7,5. Finalmente, cada lâmina foi corada com brometo de etídeo (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 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 e filtro de extinção de 560 nm (SINGH et al., 1988).

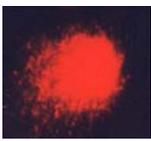
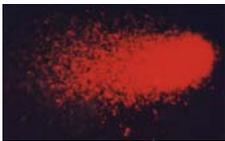
Para o controle negativo das amostras utilizou-se uma alíquota de sangue periférico de um camundongo controle, sem tratamento. Para o controle positivo, utilizou-se 10 μL de sangue periférico de camundongo controle adicionando-se 100 μL de H_2O_2 1000 μM , e incubou-se por 10 min em temperatura ambiente.

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.

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 a seguir :

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.

3.4.3.4 Avaliação do dano oxidativo às 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 1:20) em 5% de ácido sulfossalicílico gelado e então centrifugados a 15000 *g* por 5 min. Desprezou-se os sobrenadantes e adicionou-se aos precipitados 0,5 mL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH, 10 mM em 2 M de HCl). Mantiveram-se as amostras a temperatura ambiente por 1 hora, sendo vigorosamente agitadas em vórtex a cada 15 min. Então, adicionou-se 500 μ L de TCA 20%, agitou-se os tubos e centrifugou-se por 6 min a 15000 *g*. Os sobrenadantes foram desprezados e o removeu-se o excesso de DNPH 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-os por 3 min a 15000 *g*. Os precipitados resultantes foram dissolvido em 1,0 mL de cloreto de guanidina 6 M e submeteu-se à agitação e incubou-se por 15 min a 37°C, para dissolução. As absorbâncias máximas, no intervalo de 360 a 370 nm, foram determinadas e os valores finais das proteínas carboniladas foram determinados utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 22 mM. Os brancos foram preparados substituindo-se a DNPH por HCl 2 M.

3.4.3.5 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 espectrofotometricamente em 412 nm. As análises foram feitas em duplicatas e os valores expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$.

3.4.3.6 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 a homogeneização do conteúdo a velocidade de decomposição do H_2O_2 foi mensurada durante 20 segundos. As amostras foram analisadas em duplicatas, sendo os valores expressos em mmol de H_2O_2 consumido $\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$.

3.4.3.7 Atividade da enzima glutationa S-transferase

A atividade da GST foi mensurada 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 nmol de CDNB conjugado $\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$.

3.4.4 Marcadores de função hepática

3.4.4.1 Determinação da atividade da enzima aspartato aminotransferase (AST)

Para determinação da atividade desta enzima foram utilizados 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 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.

3.4.4.2 Determinação da atividade da enzima alanina aminotransferase (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 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.

3.5 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 $p < 0,001$.

5. RESULTADOS

5.1 Atividade antioxidante in vitro

5.1.1 Determinação da atividade “scavenger” do radical 1,1-difenil-2-picril hidrazina

5.1.1.1 Determinação da atividade “scavenger” do radical 1,1-difenil-2-picril hidrazina pela *Ouratea parviflora*

Na tabela 2 estão representados os resultados da atividade antioxidante do extrato bruto e frações de *Ouratea parviflora* pesquisadas, além de rutina, relacionados ao ensaio da captação do radical livre DPPH.

Observa-se que a atividade antioxidante, do extrato bruto e frações analisadas, aumentou de acordo com a elevação da concentração das referidas amostras. Ao calcular-se a concentração eficaz, verificou-se que das cinco frações testadas, quatro frações : hexânica (OP₁), acetato de etila (OP₃), hidroalcoólica (OP₄) e metanólica (OP₅) e a rutina, apresentaram atividade antioxidante importante (CE₅₀ inferior a 1000 µg/mL), excetuando-se a fração clorofórmica (OP₂), que não exibiu atividade “scavenger”, ou seja, aceptora e neutralizadora do radical livre DPPH.

Entretanto, é importante ressaltar que a fração hidroalcoólica (OP₄) apresentou potencial antioxidante frente ao radical DPPH mais expressivo, cujo valor da concentração eficaz, mais se aproximou do valor da rutina, um flavonóide de reconhecida atividade antioxidante, utilizado como controle positivo do ensaio.

Tabela 2. Avaliação do potencial antioxidante do extrato bruto e frações de *Ouratea parviflora* (1000 µg/mL) além de rutina, através da medida da capacidade “scavenger” do radical livre DPPH, testada em concentrações crescentes (5, 10, 25, 50, 125, 250 µg/mL).

<i>Ouratea parviflora</i>	AA%						CE ₅₀ (µg/mL) ¹
	5	10	25	50	125	250	
OP_{EB}	sa	sa	sa	sa	sa	sa	sa
OP₁	0,09 ±	0,28 ±	0,55 ±	0,30 ±	5,47 ±	8,25 ±	396,97 ±
	0,003	0,011	0,004	0,004	0,003	0,006	0,46
OP₂	sa	sa	sa	sa	sa	sa	sa
OP₃	sa	sa	2,69 ±	2,31 ±	5,60 ±	7,87 ±	989,63 ±
			0,016	0,022	0,002	0,003	2,34
OP₄	1,90 ±	6,53 ±	17,98 ±	35,83 ±	77,93 ±	86,78 ±	78,10 ±
	0,003	0,002	0,002	0,004	0,004	0,003	1,40
OP₅	1,37 ±	2,44 ±	5,76 ±	7,13 ±	18,11 ±	32,92 ±	382,57 ±
	0,003	0,004	0,001	0,003	0,002	0,001	0,43
rutina	32,21 ±	65,3 ±	89,19 ±				
	0,75	2,36	0,71	100	100	100	8,20 ± 1,10

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

¹ Os valores da concentração eficaz (CE₅₀) foram determinados por regressão linear.

sa - sem atividade antioxidante em todas as concentrações testadas

OP_{EB} = extrato bruto; OP₁ = fração hexânica; OP₂ = fração clorofórmica; OP₃ = fração acetato de etila; OP₄ = fração hidroalcoólica; OP₅ = fração metanólica.

5.1.1.2 Determinação da atividade “scavenger” do radical 1,1-difenil-2-picril hidrazina pela *Polymnia sonchifolia*.

Na tabela 3 estão representados os resultados da atividade antioxidante do extrato bruto e frações de *Polymnia sonchifolia* estudadas além de rutina, relacionados ao ensaio do radical livre DPPH.

Observou-se que a atividade antioxidante do extrato bruto e da maioria das frações analisadas neste experimento, aumentou de acordo com a elevação da concentração das referidas amostras, excetuando-se com relação à fração hexano acetato 2:8 (PS₃), que apresentou atividade antioxidante limiar referente à concentração de 125 µg/mL, visto que, na concentração de 250 µg/mL a fração PS₃, passou a comportar-se com atividade pró-oxidante.

Ao calcular-se a concentração eficaz, verificou-se que o extrato bruto (PS_{EB}), as frações : hexano acetato 3:7 (PS₂), hexano acetato 2:8 (PS₃), metanólica (PS₅) e rutina, apresentaram atividade antioxidante importante (CE₅₀ inferior a 1000 µg/mL).

Entretanto, cabe ressaltar que o extrato bruto etanólico apresentou melhor resultado, com potencial antioxidante frente ao radical DPPH mais expressivo quando comparado com os demais valores obtidos. Tal valor da concentração eficaz aproximou-se mais do valor da rutina, um flavonóide de reconhecida atividade antioxidante, utilizado como controle positivo do ensaio.

Tabela 3. Avaliação do potencial antioxidante do extrato bruto e frações de *Polymnia sonchifolia* (1000 µg/m), além de rutina, através da medida da capacidade “scavenger” do radical livre DPPH, testada em concentrações crescentes (5, 10, 25, 50, 125, 250 µg/mL).

<i>Polymnia sonchifolia</i>	AA%						CE ₅₀ (µg/mL) ¹
	5	10	25	50	125	250	
PS_{EB}	sa	3,09 ±	6,5 ±	13,4 ±	32,05 ±	63,53 ±	195,77 ±
		0,01	0,007	0,01	0,006	0,011	0,66
PS₂	sa	sa	sa	4,3 ±	12,55 ±	15,64 ±	470,93 ±
				0,002	0,003	0,004	3,02
PS₃	sa	sa	2,52 ±	2,67 ±	4,27 ±	- 18,66 ±	517,69 ±
			0,007	0,005	0,004	0,041	8,59
PS₄	sa	sa	sa	sa	sa	sa	sa
PS₅	sa	sa	sa	0,41 ±	0,70 ±	23,53 ±	423,87 ±
				0,013	0,012	0,001	5,72
PS₆	sa	sa	sa	sa	sa	sa	sa
PS₇	sa	sa	sa	sa	sa	sa	sa
rutina	32,21 ±	65,3 ±	89,19 ±	100	100	100	8,20 ±
	0,75	2,36	0,71				1,10

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

¹ Os valores da concentração eficaz (CE₅₀) foram determinados por regressão linear.

sa - sem atividade antioxidante em todas as concentrações testadas.

PS_{EB} = extrato bruto; **PS₂** = fração hexano acetato 3:7; **PS₃** = fração hexano acetato 2:8; **PS₄** = fração acetato metanólica 1:1; **PS₅** = fração metanólica; **PS₆** = fração clorofórmica; **PS₇** = fração hexânica.

5.1.1.3 Determinação da atividade “scavenger” do radical 1,1-difenil-2-picril hidrazina pela *Marlierea obscura*.

Na tabela 4 estão representados os resultados da atividade antioxidante das frações de *Marlierea obscura* pesquisadas além de rutina, relacionados ao ensaio do radical livre DPPH.

Observou-se que a atividade antioxidante das frações hexânica (MO) e metanólica (MO₃) aumentou de acordo com a elevação da concentração das referidas amostras, excetuando-se com relação à fração clorofórmica (MO₁), que apresentou atividade antioxidante variável frente às concentrações, exibindo atividade “scavenger”, porém a concentração eficaz revelou ser muito alta (CE₅₀ superior a 1000 µg/mL).

Ao calcular-se a concentração eficaz, verificou-se que as frações hexânica (MO) e metanólica (MO₃) apresentaram atividade antioxidante importante (CE₅₀ inferior a 1000 µg/mL), tal como a rutina, o controle positivo da ação antioxidante.

Entretanto, é importante ressaltar que frações hexânica (MO) e metanólica (MO₃) apresentaram potencial antioxidante expressivo frente ao radical DPPH, embora o melhor resultado tenha sido exibido pela fração metanólica (MO₃).

Contudo, todos os resultados das amostras distanciaram-se do valor exibido pela rutina.

Tabela 4 Avaliação do potencial antioxidante do extrato bruto e frações de *Marlierea obscura* (1000 µg/m), além de rutina, através da medida da capacidade “scavenger” do radical livre DPPH, testada em concentrações crescentes (5, 10, 25, 50, 125, 250 µg/mL).

<i>Marlierea obscura</i>	AA%						CE ₅₀ (µg/mL) ¹
	5	10	25	50	125	250	
MO	4,0 ± 0,003	3,33 ± 0,001	5,61 ± 0,01	11,35 ± 0,0004	28,32 ± 0,014	48,72 ± 0,003	251,19 ± 1,09
MO₁	0,13 ± 0,001	0,45 ± 0,003	12,51 ± 0,044	0,78 ± 0,001	2,32 ± 0,001	2,18 ± 0,003	6215,1 ± 0,11
MO₂	sa	sa	sa	sa	sa	sa	sa
MO₃	- 4,08 ± 0,048	1,25 ± 0,001	5,12 ± 0,005	10,20 ± 0,004	24,48 ± 0,004	53,55 ± 0,004	236,60 ± 0,67
rutina	32,21 ± 0,75	65,3 ± 2,36	89,19 ± 0,71	100	100	100	8,20 ± 1,10

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

¹ Os valores da concentração eficaz (CE₅₀) foram determinados por regressão linear.

sa - sem atividade antioxidante em todas as concentrações testadas

MO = fração hexânica; **MO₁** = fração clorofórmica; **MO₂** = fração acetato de etila; **MO₃** = fração metanólica.

5.1.2 Formação e monitoramento da atividade “scavenger” do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

5.1.2.1 Avaliação da atividade da Xantina Oxidase (XO)

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 ânion superóxido nos organismos.

5.1.2.1.1 Avaliação da atividade da Xantina Oxidase (XO) sobre a *Ouratea parviflora*

Na tabela 5 estão representados os resultados do efeito do extrato bruto e frações de *Ouratea parviflora* além de rutina, sobre a atividade enzimática da XO.

Observou-se que a fração acetato de etila (OP_3) apresentou um potente efeito inibidor da XO (CI_{50} inferior a 100 $\mu\text{g/mL}$) quando comparado à rutina, enquanto o extrato bruto (OP_{EB}), fração hexânica (OP_1) e fração hidroalcoólica (OP_4), apresentaram moderado efeito inibidor da enzima (CI_{50} inferior a 500 $\mu\text{g/mL}$). Já a fração metanólica (OP_5) apresentou efeito relativamente semelhante ao flavonóide padrão rutina (CI_{50} inferior a 1000 $\mu\text{g/mL}$).

Neste ensaio, todas as amostras de *Ouratea parviflora* mostraram-se efetivas em inibir a enzima XO, geradora de radicais livres, exibindo assim, importante atividade antioxidante, impedindo a formação do ânion superóxido.

Tabela 5 Efeito do extrato bruto e frações de *Ouratea parviflora* e rutina sobre a atividade da xantina oxidase (XO) testadas em concentrações crescentes (5, 10, 25, 50, 75, 125 µg/mL).

Amostra	% Inibição ¹						CI ₅₀ (µg/mL) ²
	5	10	25	50	75	125	
OP _{EB}	25,00 ±	44,08 ±	17,00 ±	45,36 ±	68,40 ±	100 ±	41,19 ±
	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	6,36
OP ₁	15,12 ±	35,43 ±	39,88 ±	50,00 ±	56,19 ±	56,19 ±	97,71 ±
	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	2,39
OP ₂	sa	sa	37,18 ±	44,17 ±	49,40 ±	52,91 ±	95,53 ±
			0,01	0,06	0,00	0,01	2,77
OP ₃	45,50 ±	44,29 ±	48,62 ±	43,03 ±	49,55 ±	48,86 ±	134,00 ±
	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	1,12
OP ₄	31,14 ±	41,55 ±	41,27 ±	42,44 ±	41,56 ±	46,50 ±	134,40 ±
	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01
OP ₅	sa	sa	sa	16,07 ±	18,75 ±	22,85 ±	477,62 ±
				0,03	0,027	0,01	0,54
rutina	16,93 ±	24,35 ±	30,58 ±	37,53 ±	64,55 ±	64,55 ±	939,88 ±
	0,48	0,85	0,77	0,35	0,99	0,99	0,43

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

¹Capacidade de inibir a xantina oxidase.

²Os valores da concentração inibitória (CI₅₀) foram determinados por regressão linear.

sa - sem atividade antioxidante em todas as concentrações testadas.

OP_{EB} = extrato bruto; OP₁ = fração hexânica; OP₂ = fração clorofórmica; OP₃ = fração acetato de etila;

OP₄ = fração hidroalcoólica; OP₅ = fração metanólica.

5.1.2.1.2 Avaliação da atividade da Xantina Oxidase (XO) sobre a *Polymnia sonchifolia*

Na tabela 6 estão representados os resultados do efeito do extrato bruto e frações de *Polymnia sonchifolia* além de rutina, sobre a atividade enzimática da XO.

Observou-se que a fração acetato metanólica 1:1 (PS₄) apresentou um moderado efeito inibidor (CI₅₀ inferior a 500 µg/mL), enquanto que as demais amostras pesquisadas não se mostraram efetivas em inibir a atividade da enzima XO.

Tabela 6 Efeito do extrato bruto e frações de *Polymnia sonchifolia* e rutina sobre a atividade da xantina oxidase (XO) testadas em concentrações crescentes (5, 10, 25, 50, 75, 125 µg/mL).

Amostra	% Inibição ¹						CE ₅₀ (µg/mL)
	5	10	25	50	75	125	
PS_{EB}	sa	sa	sa	sa	sa	sa	sa
PS₂	sa	sa	sa	sa	sa	sa	sa
PS₃	sa	sa	sa	sa	sa	sa	sa
PS₄	sa	1,40 ± 0,01	2,46 ± 0,00	33,49 ± 0,01	39,87 ± 0,01	58,14 ± 0,01	101,25 ± 6,15
PS₅	sa	sa	sa	sa	sa	sa	sa
PS₆	sa	sa	sa	sa	sa	sa	sa
PS₇	sa	sa	sa	sa	sa	sa	sa
rutina	16,93 ± 0,48	24,35 ± 0,85	30,58 ± 0,77	37,53 ± 0,35	64,55 ± 0,99	64,55 ± 0,99	939,88 ± 0,43

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

¹Capacidade de inibir a xantina oxidase.

²Os valores da concentração inibitória (CI₅₀) foram determinados por regressão linear.

sa - sem atividade antioxidante em todas as concentrações testadas.

PS_{EB} = extrato bruto; **PS₂** = fração hexano acetato 3:7; **PS₃** = fração hexano acetato 2:8; **PS₄** = fração acetato metanólica 1:1; **PS₅** = fração metanólica; **PS₆** = fração clorofórmica; **PS₇** = fração hexânica.

5.1.2.1.3 Avaliação da atividade da Xantina Oxidase (XO) sobre a *Marlierea obscura*

Na tabela 7 estão representados os resultados do efeito do extrato bruto e frações de *Marlierea obscura* além de rutina, sobre a atividade enzimática da XO.

Observou-se que nenhuma das frações de *Marlierea obscura* pesquisadas neste ensaio mostrou-se efetiva em inibir a atividade da enzima XO e, conseqüentemente, impedir a formação do ânion superóxido.

Outros ensaios, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, foram realizados a fim de avaliar o potencial antioxidante desta planta, os quais serão apresentados ao longo desta dissertação.

Tabela 7 Efeito das frações *Marlierea obscura* e rutina sobre a atividade da xantina oxidase (XO), testadas em concentrações crescentes (5, 10, 25, 50, 75, 125 µg/mL).

Amostra	% Inibição ¹						CI ₅₀ (µg/mL) ²
	5	10	25	50	75	125	
MO	sa	sa	sa	sa	sa	sa	sa
MO₁	sa	sa	sa	sa	sa	sa	sa
MO₂	sa	sa	sa	sa	sa	sa	sa
MO₃	sa	sa	sa	sa	sa	sa	sa
rutina	16,93 ±	24,35 ±	30,58 ±	37,53 ±	64,55 ±	64,55 ±	939,88 ±
	0,48	0,85	0,77	0,35	0,99	0,99	0,43

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

¹Capacidade de inibir a xantina oxidase.

²Os valores da concentração inibitória (CI₅₀) foram determinados por regressão exponencial ou linear.

sa - sem atividade antioxidante nas concentrações testadas.

MO = fração hexânica; **MO₁** = fração clorofórmica; **MO₂** = fração acetato de etila; **MO₃** = fração metanólica.

5.1.2.2 Avaliação da capacidade “scavenger” do $O_2^{\bullet-}$ pela inibição do “nitro blue tetrazolium” (NBT)

5.1.2.2.1 Avaliação da capacidade “scavenger” do $O_2^{\bullet-}$ pela inibição do (NBT) pela *Ouratea parviflora*

Na tabela 8 estão representados os resultados referentes à avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto e frações de *Ouratea parviflora* além de rutina, sobre a capacidade “scavenger” do $O_2^{\bullet-}$ determinada através da inibição da redução do “nitro blue tetrazolium” (NBT).

Os dados obtidos demonstraram que o extrato bruto etanólico (OP_{EB}) apresentou moderado potencial antioxidante (CE₅₀ inferior a 1000 µg/ml).

As demais amostras, as frações OP₁, OP₂, OP₃, OP₄ e OP₅, revelaram fraca atividade antioxidante (CE₅₀ maior que 1000 µg/mL) em comparação ao flavonóide rutina, utilizado como padrão antioxidante no ensaio. Os referidos resultados sugerem que, apesar das amostras exibirem atividade antioxidante, a concentração efetiva das frações possivelmente esteja muito próxima da concentração tóxica.

Tabela 8 Avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto e frações de *Ouratea parviflora* e rutina através da medida da capacidade “scavenger” $O_2^{\bullet-}$ testadas em concentrações crescentes (50, 75, 125, 250, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$).

Amostra	A.A. % ¹						CI ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) ²
	50	75	125	250	500	1000	
OP_{EB}	21,00 ±	25,29 ±	28,14 ±	30,50 ±	37,66 ±	29,90 ±	873,22 ±
	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	1,42
OP₁	20,88 ±	22,28 ±	27,75 ±	30,25 ±	32,16 ±	36,15 ±	>1000
	0,01	0,02	0,00	0,01	0,01	0,01	
OP₂	5,13 ±	9,18 ±	9,70 ±	10,40 ±	17,26 ±	46,60 ±	>1000
	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
OP₃	30,36 ±	31,61 ±	33,09 ±	35,23 ±	36,70 ±	40,90 ±	>1000
	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	
OP₄	<i>sa</i>	<i>sa</i>	10,62 ±	10,77 ±	13,87 ±	15,05 ±	>1000
			0,01	0,01	0,01	0,01	
OP₅	13,65 ±	15,53 ±	26,04 ±	31,65 ±	33,38 ±	44,78 ±	>1000
	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	
rutina	16,93 ±	24,35 ±	30,58 ±	37,53 ±	64,55 ±	100,00	358,64 ±
	0,48	0,85	0,77	0,35	0,99		0,83

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

¹Redução do NBT pelo $O_2^{\bullet-}$.

²Os valores da concentração inibitória (CI₅₀) foram determinados por regressão linear.

sa - sem atividade antioxidante nas concentrações testadas.

OP_{EB} = extrato bruto; **OP₁** = fração hexânica; **OP₂** = fração clorofórmica; **OP₃** = fração acetato de etila; **OP₄** = fração hidroalcoólica; **OP₅** = fração metanólica.

5.1.2.2.2 Avaliação da capacidade “scavenger” do $O_2^{\bullet-}$ pela inibição do (NBT) pela *Polymnia sonchifolia*

Na tabela 9 estão representados os resultados referentes à avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto e frações de *Polymnia sonchifolia* além de rutina, sobre a capacidade “scavenger” do $O_2^{\bullet-}$ determinada através da inibição da redução do “nitro blue tetrazolium” (NBT).

Os dados obtidos demonstram que a fração hexano acetato 3:7, a qual contém flavonóides, (PS₂), exibiu moderado potencial antioxidante (CE₅₀ inferior a 1000 µg/ml). As demais amostras analisadas neste ensaio, as frações PS₂, PS₃, PS₄, PS₅, PS₆ e PS₇ revelaram ausência de atividade antioxidante.

Os referidos resultados sugerem que a concentração efetiva possivelmente esteja muito próxima da concentração tóxica.

Tabela 9 Avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto e frações de *Polymnia sonchifolia* e rutina, através da medida da capacidade “scavenger” $O_2^{\bullet-}$ testadas em concentrações crescentes (50, 75, 125, 250, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$)

Amostra	A.A. % ¹						CE ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
	50	75	125	250	500	1000	
PS_{EB}	sa	sa	sa	sa	sa	sa	sa
PS₂	sa	sa	sa	43,78 \pm 0,01	46,52 \pm 0,00	53,48 \pm 0,00	970,00 \pm 48,00
PS₃	sa	sa	sa	sa	sa	sa	sa
PS₄	sa	sa	sa	sa	sa	sa	sa
PS₅	sa	sa	sa	sa	sa	sa	sa
PS₆	sa	sa	sa	sa	sa	sa	sa
PS₇	sa	sa	sa	sa	sa	sa	sa
rutina	16,93 \pm 0,48	24,35 \pm 0,85	30,58 \pm 0,77	37,53 \pm 0,35	64,55 \pm 0,99	100,00	358,64 \pm 0,83

Todos os valores foram expressos como média \pm EPM e os ensaios foram realizados em triplicata
¹Redução do NBT pelo $O_2^{\bullet-}$.

²Os valores da concentração inibitória (CI₅₀) foram determinados por regressão linear.

sa - sem atividade antioxidante nas concentrações testadas.

PS_{EB} = extrato bruto; **PS₂** = fração hexano acetato 3:7; **PS₃** = fração hexano acetato 2:8; **PS₄** = fração acetato metanólica 1:1; **PS₅** = fração metanólica; **PS₆** = fração clorofórmica; **PS₇** = fração hexânica.

5.1.2.2.3 Avaliação da capacidade “scavenger” do $O_2^{\bullet-}$ pela inibição do (NBT) pela *Marlierea obscura*

Na tabela 10 estão representados os resultados referentes à avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto e frações de *Marlierea obscura*, além da rutina, sobre a capacidade “scavenger” do $O_2^{\bullet-}$, determinada através da inibição da redução do “nitro blue tetrazolium” (NBT).

Todas as amostras testadas, as frações MO, MO₁, MO₂, MO₃, revelaram ausência de atividade antioxidante neste ensaio.

Os referidos resultados sugerem que a concentração efetiva possivelmente esteja muito próxima da concentração tóxica.

Outros ensaios tanto *in vitro* quanto *in vivo* foram realizados para avaliar o potencial antioxidante desta planta, os quais serão apresentados ao longo desta dissertação.

Tabela 10 Avaliação da atividade antioxidante das frações de *Marlierea obscura* e rutina através da medida da capacidade “scavenger” $O_2^{\bullet-}$ testadas em concentrações crescentes (50, 75, 125, 250, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$)

Amostra	A.A. % ¹						CI ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) ²
	50	75	125	250	500	1000	
MO	sa	sa	sa	sa	sa	sa	sa
MO₁	sa	sa	sa	sa	sa	sa	sa
MO₂	sa	sa	sa	sa	sa	sa	sa
MO₃	sa	sa	sa	sa	sa	sa	sa
rutina	16,93 ± 0,48	24,35 ± 0,85	30,58 ± 0,77	37,53 ± 0,35	64,55 ± 0,99	100,00	358,64 ± 0,83

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

¹Redução do NBT pelo $O_2^{\bullet-}$.

²Os valores da concentração inibitória (CI₅₀) foram determinados por regressão linear.

sa - sem atividade antioxidante nas concentrações testadas.

MO = fração hexânica; **MO₁** = fração clorofórmica; **MO₂** = fração acetato de etila; **MO₃** = fração metanólica.

5.1.3 Formação e monitoramento da atividade “scavenger” do radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$)

Avaliou-se a habilidade “scavenger” do $\cdot\text{OH}$, ou quelação do ferro, pelo extrato bruto e frações de *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifolia* e *Marlierea obscura*, além da rutina, utilizando-se o ensaio de degradação da desoxirribose.

5.1.3.1 Formação e monitoramento da atividade “scavenger” do radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) pela *Ouratea parviflora*

A tabela 11 exhibe a atividade antioxidante do extrato bruto e frações de *Ouratea parviflora* além de rutina, onde observou-se que o extrato bruto etanólico apresentou forte potencial antioxidante, equivalente ao da rutina (CE_{50} inferior a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), enquanto a fração hexânica (OP_1) mostrou fraca atividade antioxidante (CE_{50} inferior a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

As demais frações OP_2 , OP_3 , OP_4 e OP_5 apresentaram importante e expressiva atividade “scavenger” do $\cdot\text{OH}$ (CE_{50} inferior a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Tais frações exibiram resultados mais promissores que o da rutina, o controle positivo do ensaio.

Tabela 11 Avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto e frações de *Ouratea parviflora*, além da rutina através da medida da capacidade “scavenger” do $\cdot\text{OH}$ testadas em concentrações crescentes dos compostos (10, 100, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$).

Amostras	AA%				CE ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) ¹
	10	100	500	1000	
OP_{EB}	42,58 ±	42,58 ±	71,57 ±	78,88 ±	169,49 ±
	0,02	0,02	0,00	0,00	10,63
OP₁	30,21 ±	31,31 ±	53,02 ±	59,49 ±	601,25 ±
	0,02	0,02	0,01	0,07	55,0
OP₂	96,77 ±	98,34 ±	98,37 ±	100 ±	<10,00
	0,22	0,02	0,02	0,00	
OP₃	75,60 ±	86,75 ±	97,33 ±	100 ±	<10,00
	0,012	0,023	0,000	0,000	
OP₄	100 ±	100 ±	100 ±	100 ±	<10,00
	0,00	0,00	0,00	0,00	
OP₅	100 ±	100 ±	100 ±	100 ±	<10,00
	0,000	0,000	0,000	0,000	
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 (CE₅₀) foram determinados por regressão exponencial ou linear
sa - sem atividade antioxidante em todas as concentrações testadas

OP_{EB} = extrato bruto; **OP₁** = fração hexânica; **OP₂** = fração clorofórmica; **OP₃** = fração acetato de etila;
OP₄ = fração hidroalcoólica; **OP₅** = fração metanólica.

5.1.3.2 Formação e monitoramento da atividade “scavenger” do radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) pela *Polymnia sonchifolia*

A tabela 12 exhibe a atividade antioxidante do extrato bruto e frações de *Polymnia sonchifolia*, além da rutina, onde observou-se que, o extrato bruto etanólico (PS_{EB}) apresentou potencial antioxidante equivalente ao da rutina (CE₅₀ inferior a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

A fração acetato metanol 1:1 (PS₄) apresentou importante e expressiva atividade “scavenger” do $\cdot\text{OH}$ (CE₅₀ inferior a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), sendo esta mais promissora, quando comparada ao controle positivo do ensaio, a rutina (CE₅₀ = 143,57 \pm 1,86 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As demais frações PS₂, PS₅, PS₆ e PS₇, apresentaram atividade “scavenger” do $\cdot\text{OH}$ (CE₅₀ inferior a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) deveras importante. Tal atividade revelou ser bem mais promissora que aquela exibida pela rutina, o controle positivo do ensaio.

A fração hexano acetato 2:8 (PS₃) revelou ausência de atividade antioxidante, em relação à ação “scavenger” do $\cdot\text{OH}$.

Tabela 12 Avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto e frações de *Polymnia sonchifolia*, além da rutina através da medida da capacidade “scavenger” do $\cdot\text{OH}$ testadas em concentrações crescentes dos compostos (10, 100, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$).

Amostras	AA%				CE ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) ¹
	10	100	500	1000	
PS_{EB}	37,61 ±	51,42 ±	56,50 ±	64,49 ±	196,36 ±
	0,01	0,00	0,01	0,00	4,30
PS₂	75,96 ±	77,11 ±	78,67 ±	85,17 ±	<10,00
	0,00	0,00	0,00	0,02	
PS₃	sa	sa	sa	sa	sa
PS₄	43,33 ±	62,49 ±	71,53 ±	73,29 ±	82,33 ±
	0,00	0,00	0,02	0,00	10,05
PS₅	65,64 ±	68,21 ±	68,31 ±	74,91 ±	<10,00
	0,01	0,00	0,00	0,00	
PS₆	58,23 ±	66,82 ±	62,12 ±	81,82 ±	<10,00
	0,01	0,01	0,01	0,00	
PS₇	72,64 ±	80,34 ±	81,34 ±	92,86 ±	<10,00
	0,01	0,01	0,01	0,01	
rutina	27,96 ±	46,00 ±	73,82 ±	85,05 ±	143,57 ±
	0,90	2,22	2,32	3,19	1,86

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

¹Os valores da concentração eficaz (CE₅₀) foram determinados por regressão linear.

sa - sem atividade antioxidante em todas as concentrações testadas.

PS_{EB} = extrato bruto; **PS₂** = fração hexano acetato 3:7; **PS₃** = fração hexano acetato 2:8; **PS₄** = fração acetato metanólica 1:1; **PS₅** = fração metanólica; **PS₆** = fração clorofórmica; **PS₇** = fração hexânica.

5.1.3.3 Formação e monitoramento da atividade “scavenger” do radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) pela *Marlierea obscura*

A tabela 13 exibe os resultados da atividade “scavenger” do radical hidroxil pela *Marlierea obscura*.

Excetuando-se a fração clorofórmica (MO_1), as demais frações : hexânica (MO), acetato de etila (MO_2) e metanólica (MO_3), revelaram importante atividade antioxidante, inclusive com os valores das concentrações efetivas mais promissores que o valor exibido pela amostra de referência, a rutina.

Tabela 13 Avaliação da atividade antioxidante das frações de *Marlierea obscura*, além da rutina, através da medida da capacidade “scavenger” do $\cdot\text{OH}$ testadas em concentrações crescentes dos compostos (10, 100, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$).

Amostras	AA%				CE ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) ¹
	10	100	500	1000	
MO	23,51 ±	48,93 ±	63,74 ±	70,78 ±	<10,00
	0,02	0,01	0,01	0,01	
MO₁	sa	sa	sa	sa	sa
MO₂	59,27 ±	62,69 ±	67,77 ±	95,94 ±	<10,00
	0,01	0,01	0,00	0,00	
MO₃	56,19 ±	67,84 ±	67,77 ±	93,87 ±	<10,00
	0,00	0,00	0,00	0,00	
rutina	27,96 ±	46,00 ±	73,82 ±	85,05 ±	143,57 ±
	0,90	2,22	2,32	3,19	

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

¹Os valores da concentração eficaz (CE₅₀) foram determinados por regressão linear.

sa - sem atividade antioxidante em todas as concentrações testadas.

MO = fração hexânica; **MO₁** = fração clorofórmica; **MO₂** = fração acetato de etila; **MO₃** = fração metanólica.

5.1.4 Proteção contra a peroxidação lipídica

Avaliou-se, neste ensaio, a proteção oferecida pelos extratos e frações de *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifolia* e *Marlierea obscura* contra a peroxidação lipídica *in vitro*, induzida por peróxido *t*-butila, em homogenato de fígado de ratos.

5.1.4.1 Proteção contra a peroxidação lipídica pela *Ouratea parviflora*

A tabela 14 sumariza o efeito protetor do extrato bruto e frações de *Ouratea parviflora* além de rutina, onde observou-se que o extrato bruto (OP_{EB}) e fração hidroalcoólica (OP₄) mostraram efeito fortemente protetor da lipoperoxidação (CE₅₀ < 31,25 ± 0,00), cujo resultado é extremamente promissor quando comparado ao flavonóide padrão, a rutina (CE₅₀ = 203,83 ± 1,44). A fração hexânica (OP₁) também revelou promissor efeito protetor da lipoperoxidação (CE₅₀ = 54,25 ± 2,14). A fração clorofórmica (OP₂) revelou atividade antioxidante, embora fraca e em alta concentração, sendo esta possivelmente tóxica (CE₅₀ superior a 1000µg/mL). A fração acetato de etila (OP₃) não apresentou efeito protetor contra a lipoperoxidação de membranas neste ensaio; já a fração hidroalcoólica (OP₅) mostrou-se promissora, cuja concentração efetiva (CE₅₀ = 108,33 ± 2,31µg/mL) foi inferior à revelada pelo flavonóide padrão, a rutina.

Para tanto, pode-se afirmar que *in vitro*, *Ouratea parviflora* mostrou ser efetiva na proteção à lipoperoxidação de membranas celulares e nucleares, podendo ser considerada antioxidante pelos resultados obtidos neste ensaio.

Embora os resultados obtidos, neste ensaio, tenham sido promissores, onde a maioria das amostras mostraram ser fortemente antioxidantes, outros ensaios serão apresentados com o intuito de corroborar com tais achados.

Tabela 14. Avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto e frações de *Ouratea parviflora*, além da rutina através da medida da proteção a lipoperoxidação em homogenato de fígado de ratos, avaliada em termos de TBARS, testadas em concentrações crescentes (31,25; 62,5; 125; 250 e 500 µg/mL),

Amostras	AA%					CE ₅₀ (µg/mL) ¹
	31,25	62,5	125	250	500	
OP_{EB}	78,14 ±	83,15 ±	85,95 ±	87,29 ±	88,09 ±	<31,25
	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
OP₁	45,46 ±	68,58 ±	71,36 ±	70,70 ±	74,90 ±	54,25 ±
	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	2,14
OP₂	<i>sa</i>	14,96 ±	15,95 ±	15,14 ±	16,64 ±	> 1000
		0,00	0,02	0,10	0,02	
OP₃	<i>sa</i>	<i>sa</i>	<i>sa</i>	<i>sa</i>	<i>sa</i>	<i>sa</i>
OP₄	68,71 ±	69,31 ±	67,80 ±	70,88 ±	79,22 ±	<31,25
	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	
OP₅	28,94 ±	46,92 ±	57,43 ±	58,90 ±	68,84 ±	108,83 ±
	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	2,31
rutina	25,08 ±	35,79 ±	45,46 ±	46,95 ±	54,02 ±	203,83 ±
	2,39	3,11	0,98	1,66	1,12	1,44

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

¹Os valores da concentração eficaz (CE₅₀) foram determinados por regressão linear.

sa - sem atividade antioxidante em todas as concentrações testadas

OP_{EB} = extrato bruto; **OP₁** = fração hexânica; **OP₂** = fração clorofórmica; **OP₃** = fração acetato de etila;

OP₄ = fração hidroalcoólica; **OP₅** = fração metanólica.

5.1.4.2 Proteção contra a peroxidação lipídica pela *Polymnia sonchifolia*

A tabela 15 sumariza o efeito protetor do extrato bruto e frações de *Polymnia sonchifolia*, além da rutina.

Excetuando-se a fração hexânica (PS₇), que não apresentou efeito protetor da lipoperoxidação, todas as demais amostras desta planta mostraram efeito fortemente protetor da lipoperoxidação ($CE_{50} < 31,25 \pm 0,00$), cujo resultado pode ser considerado extremamente promissor quando comparado ao flavonóide padrão, a rutina ($CE_{50} = 203,83 \pm 1,44$).

Para tanto, pode-se afirmar que *in vitro*, *Polymnia sonchifolia* mostrou ser efetiva na proteção à lipoperoxidação de membranas celulares e nucleares, podendo ser considerada antioxidante pelos resultados obtidos neste ensaio, o qual revelou o melhor resultado para esta planta.

Tabela 15. Avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto e frações de *Polymnia sonchifolia* e rutina através da medida da proteção a lipoperoxidação em homogenato de fígado de ratos, avaliada em termos de TBARS, testadas em concentrações crescentes (31,25; 62,5; 125; 250 e 500 µg/mL),

Amostras	AA%					CE ₅₀ (µg/mL) ¹
	31,25	62,5	125	250	500	
PS_{EB}	68,48 ± 0,035	78,59 ± 0,006	sa	sa	sa	<31,25
PS₂	59,38 ± 0,012	76,31 ± 0,000	96,74 ± 0,006	sa	sa	<31,25
PS₃	56,44 ± 0,006	71,98 ± 0,000	sa	sa	sa	<31,25
PS₄	62,46 ± 0,006	68,45 ± 0,006	87,10 ± 0,000	87,37 ± 0,035	86,27 ± 0,035	<31,25
PS₅	54,07 ± 0,000	61,44 ± 0,000	81,93 ± 0,000	94,10 ± 0,017	sa	<31,25
PS₆	99,14 ± 0,000	85,16 ± 0,006	sa	sa	sa	<31,25
PS₇	sa	sa	sa	sa	sa	sa
rutina	25,08 ± 2,39	35,79 ± 3,11	45,46 ± 0,98	46,95 ± 1,66	54,02 ± 1,12	203,83 ± 1,44

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

¹Os valores da concentração eficaz (CE₅₀) foram determinados por regressão linear.

sa - sem atividade antioxidante em todas as concentrações testadas

PS_{EB} = extrato bruto; **PS₂** = fração hexano acetato 3:7; **PS₃** = fração hexano acetato 2:8; **PS₄** = fração acetato metanólica 1:1; **PS₅** = fração metanólica; **PS₆** = fração clorofórmica; **PS₇** = fração hexânica.

5.1.4.3 Proteção contra a peroxidação lipídica pela *Marlierea obscura*

A tabela 16 sumariza o efeito protetor do extrato bruto e frações de *Marlierea obscura*, além de rutina.

Todas as frações desta planta revelaram, através deste ensaio, concentrações efetivas importantes e mais expressivas quando comparadas à amostra controle, a rutina, considerada padrão da ação antioxidante.

Para tanto, pode-se afirmar que *in vitro*, *Marlierea obscura*, mostrou ser efetiva na proteção à lipoperoxidação de membranas celulares e nucleares, podendo ser considerada antioxidante pelos resultados obtidos neste ensaio.

Tabela 16 Avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto e frações de *Marlierea obscura* e rutina, através da medida da proteção a lipoperoxidação em homogenato de fígado de ratos, avaliada em termos de TBARS, testadas em concentrações crescentes (31,25; 62,5; 125; 250 e 500 µg/mL),

Amostras	AA%					CE ₅₀ (µg/mL) ¹
	31,25	62,5	125	250	500	
MO	46,94 ±	83,88 ±	89,55 ±	93,17 ±	90,10 ±	35,29 ±
	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	3,87
MO₁	47,78 ±	62,06 ±	67,96 ±	83,37 ±	sa	32,72 ±
	0,01	0,18	0,04	0,01		4,06
MO₂	20,31 ±	25,86 ±	51,55 ±	86,92 ±	sa	121,24 ±
	0,01	0,02	0,01	0,00		5,11
MO₃	32,48 ±	49,48 ±	83,69±	87,37 ±	92,37 ±	66,17 ±
	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	7,32
rutina	25,08 ±	35,79 ±	45,46 ±	46,95 ±	54,02 ±	203,83 ±
	2,39	3,11	0,98	1,66	1,12	1,44

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

¹Os valores da concentração eficaz (CE₅₀) foram determinados por regressão linear.

MO = fração hexânica; **MO₁** = fração clorofórmica; **MO₂** = fração acetato de etila; **MO₃** = fração metanólica.

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

A partir dos dados obtidos com os ensaios de atividade antioxidante *in vitro*, selecionou-se o extrato bruto e fração hidroalcoólica de *Ouratea parviflora* para a realização dos ensaios *in vivo*. Os resultados obtidos são apresentados a seguir.

5.2.1 Avaliação do dano às membranas celulares e nucleares pela medida da proteção à 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). Neste ensaio utilizou-se como controle positivo do dano às membranas, o tetracloreto de carbono (CCl_4), agente indutor de estresse, e o controle negativo referiu-se aos animais não submetidos ao tratamento via oral com as amostras plantas. Curiosamente, não houve correlação entre os resultados obtidos *in vitro* no que tange à atividade antioxidante de OP_{EB} e OP_4 .

Os resultados são apresentados na figura 5, a seguir.

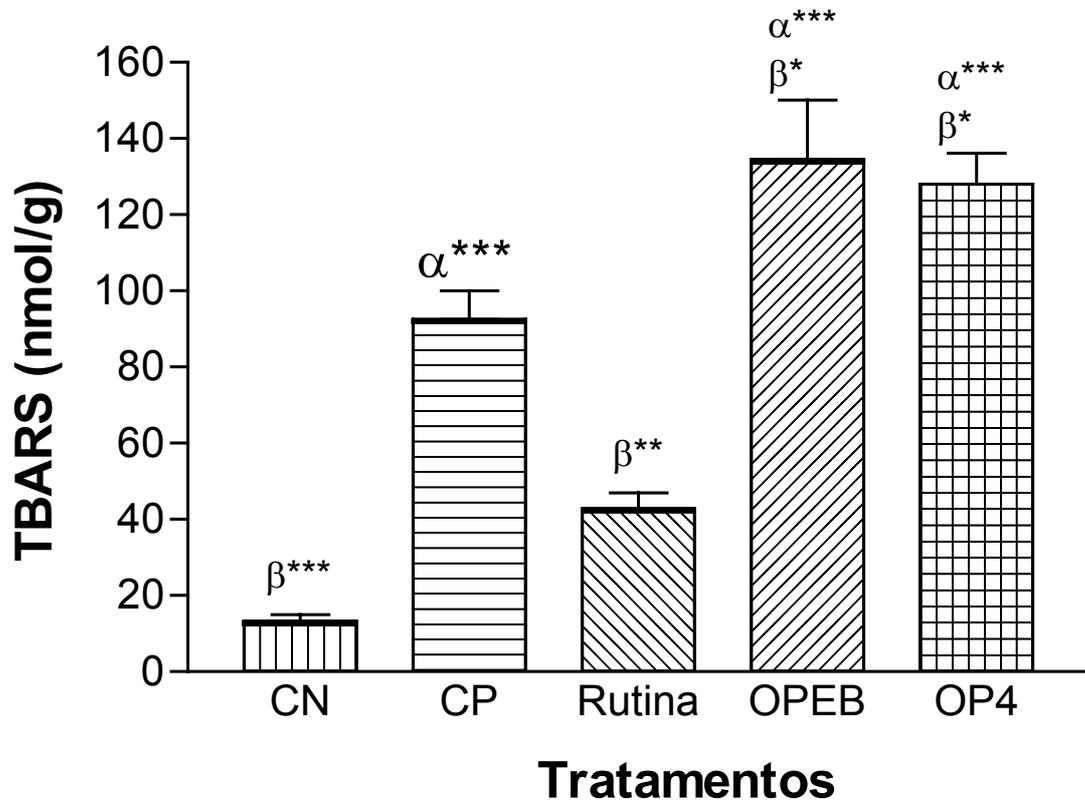


Figura 5. Índice de lipoperoxidação (TBARS nmol/g) em fígados de camundongos não tratados (controle negativo, CN), tratados com 0,5 mL / 100 g (30% v/v) de CCl_4 (controle positivo, CP), tratados com rutina (6,0 mg/kg), tratados com OP_{EB} (300 mg/kg) e tratados com OP_4 (300 mg/kg). Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 6$. (***) (**), (*) e (*) representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$), ($p < 0,01$) e ($p < 0,05$), respectivamente. (α) representa diferença estatística em relação ao CN e (β) representa diferença estatística em relação ao CP.

5.2.2 Avaliação do dano às membranas celulares e nucleares pela 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 da avaliação da concentração total de lipoperoxídidos (ensaio do TBARS) houve diferença estatisticamente significativa entre o extrato bruto (OP_{EB}) e o controle positivo, assim como entre a fração hidroalcoólica (OP_4) e o controle positivo.

Tanto OP_{EB} quanto OP_4 comportaram-se de modo equivalente ao da rutina, sugerindo que possuem efeito protetor contra a lipoperoxidação de membranas e, conseqüentemente, apresentaram atividade antioxidante. Os dados representados na figura 6 sugerem que a capacidade de proteção ao dano à membrana celular causado pelo tetracloreto de carbono (CCl_4), em termos de hidroperoxidação, foram altamente significativos para o extrato e fração analisados. Também não foi observada diferença estatística significativa entre os pré-tratamentos e o grupo controle negativo, sugerindo uma proteção destes (rutina, OP_{EB} e OP_4) ao estresse oxidativo induzido pelo agente agressor, ou seja, não se observou diferença estatística entre os grupos de animais tratados previamente à administração do CCL_4 .

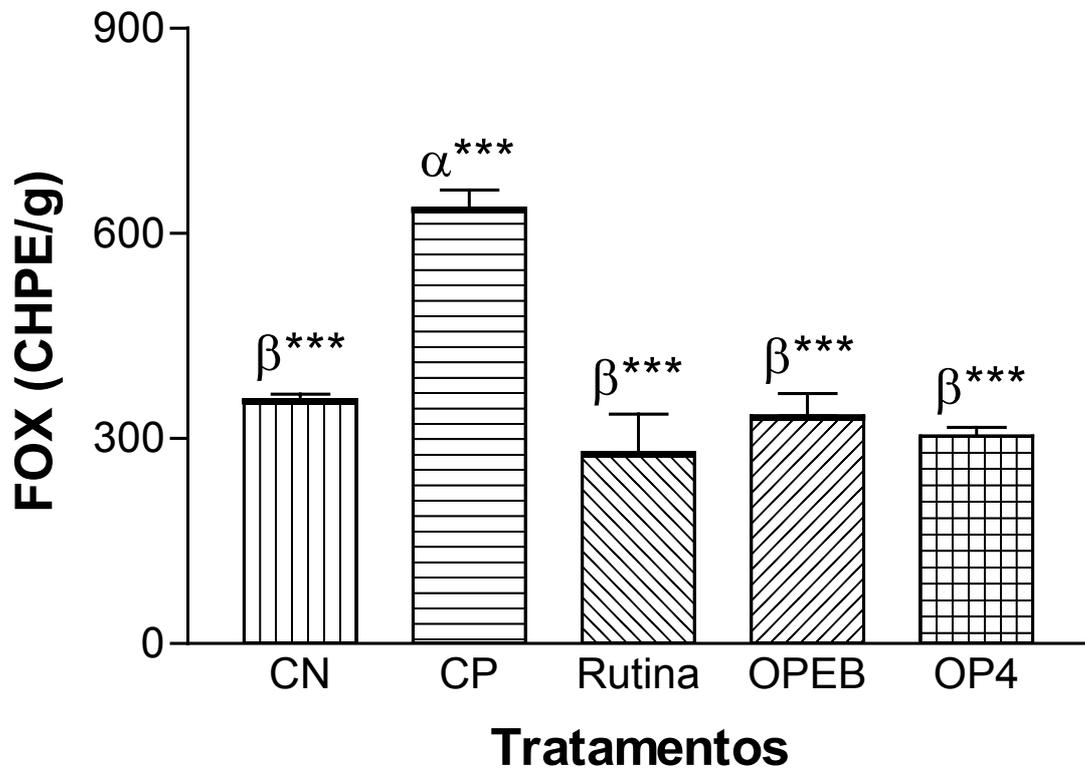


Figura 6. Índice de hidroperóxido lipídico (FOX; CHPE/g) em fígados de camundongos não tratados (controle negativo, CN), tratados com 0,5 mL / 100 g (30% v/v) de CCl_4 (controle positivo, CP), tratados com rutina (6,0 mg/kg), tratados com OP_{EB} (300 mg/kg) e tratados com OP_4 (300 mg/kg). Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, n = 6. (***) representa diferença estatística altamente significativa ($p < 0,001$). (α) representa diferença estatística em relação ao CN e (β) representa diferença estatística em relação ao CP.

5.2.3. Avaliação do dano ao DNA

Os cometas correspondentes a cada grupo de animais tratados, foram classificados em classes de acordo com o tamanho da cauda, variando de cometas sem cauda (indicativos de ausência de dano, classe1), até cometas que apresentaram cauda longa (indicativos de dano máximo, classe 5). A tabela 17 exibe as porcentagens de cometas em cada classe para cada grupo pesquisado.

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 interno do experimento com 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%). Entretanto, os cometas obtidos das células dos animais que foram submetidos ao pré-tratamento com rutina, extrato bruto (OP_{EB}) e fração hidroalcoólica (OP_4) exibiram cometas não representativos de dano, referentes às classes 1 (36,25; 36,8 e 69%, respectivamente) e 2 (56,3; 59,0 e 27,5%, respectivamente). Este resultado assemelhou-se muito às porcentagens encontradas no CN, indicando a proteção conferida pela rutina, OP_{EB} e OP_4 frente à indução de dano ao DNA promovida pelo CCl_4 .

Tabela 17. 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 CCl₄ (controle positivo, CP), pré-tratados com rutina (6,0 mg/kg), pré-tratados com OP_{EB} (300 mg/kg), pré-tratados com OP₄ (300 mg/kg) e posteriormente com CCl₄.

	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	36,3 %	56,3 %	7,5 %	0 %	0 %
OP_{EB}	36,8 %	59,0 %	4,2 %	0 %	0 %
OP₄	69,0 %	27,5 %	3,5 %	0 %	0 %

A quantificação do dano ao DNA após 24 horas de tratamento com o agente indutor (CCl₄) foi realizada através do índice de dano ao DNA, onde após a classificação dos cometas, cada grupo recebeu uma pontuação (Figura 7).

O índice de dano ao DNA apresentado pelo CCl₄ exibiu diferença estatística altamente significativamente quando comparado ao CN ($p < 0,001$). Por outro lado, os pré-tratamentos com a rutina, OP_{EB} e OP₄ exibiram resultados importantes, protegendo o DNA do dano oxidativo causado pelo CCl₄, os quais exibiram diferença estatística altamente significativa ($p < 0,001$) em relação ao CP, e os índices de dano destes compostos foram equivalentes ao apresentado pelo CN do ensaio.

Comparando-se com a rutina, o melhor resultado foi exibido por OP_{EB}, o qual apresentou índice de dano aproximado ao da rutina. Tal resultado indica que o extrato bruto (OP_{EB}) na concentração em que foi administrado aos animais (300 mg/Kg) não foi tóxica. Já a fração hidroalcoólica (OP₄), revelou-se efetivamente protetora do dano oxidativo induzido pelo agente agressor, exibindo diferença estatística significativa não apenas em relação ao controle positivo ($p < 0,001$) mas também em relação à rutina ($p < 0,01$). Desta forma, a fração hidroalcoólica (OP₄) mostrou-se mais efetiva do que a própria rutina.

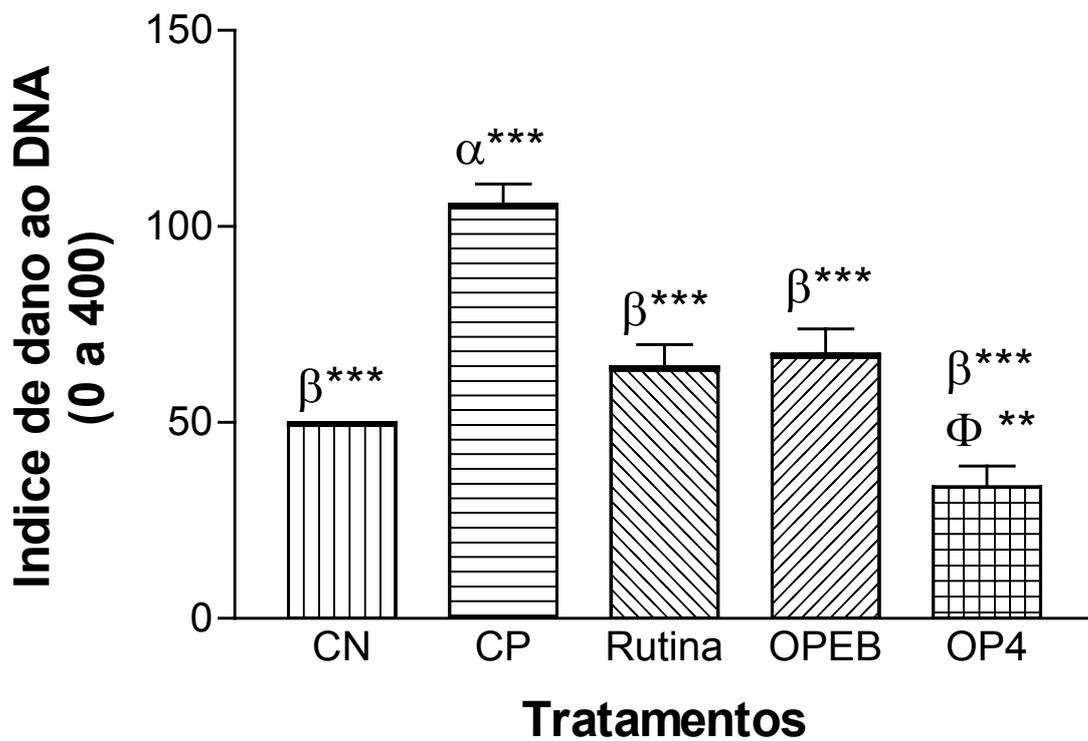


Figura 7. Dano ao DNA em sangue total de camundongos não tratados (controle negativo, CN), tratados com 0,5 mL/100 g (30% v/v) de CCl_4 (controle positivo, CP), pré-tratados com rutina (6,0 mg/kg), pré-tratados com OP_{EB} (300 mg/kg), pré-tratados com OP_4 (300 mg/kg) e, posteriormente com CCl_4 . Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 6$. (***) e (**) representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$) e ($p < 0,01$) respectivamente. (α) representa diferença estatística em relação ao CN, (β) representa diferença estatística em relação ao CP, e Φ representa diferença estatística em relação à rutina.

5.2.4 Avaliação do dano oxidativo a macromoléculas protéicas

Os dados obtidos, conforme pode ser observado na figura 8, mostraram que o tratamento dos camundongos com o agente indutor de estresse, o tetracloreto de carbono (CCl_4), ocasionou uma elevação estatisticamente significativa ($p < 0,01$) na carbonilação de proteínas, quando comparada ao controle negativo, que não sofreu tratamento.

Entretanto, o tratamento prévio realizado com o extrato bruto (OP_{EB}), a fração hidroalcoólica (OP_4) e o controle rotina, foi capaz de bloquear este estresse oxidativo de modo altamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle positivo.

Comparando-se os tratamentos prévios do extrato bruto (OP_{EB}) e fração hidroalcoólica (OP_4) ao controle rotina, observou-se que estes mostraram-se mais efetivos que a rotina em evitar o estresse oxidativo de macromoléculas protéicas, especialmente a OP_4 .

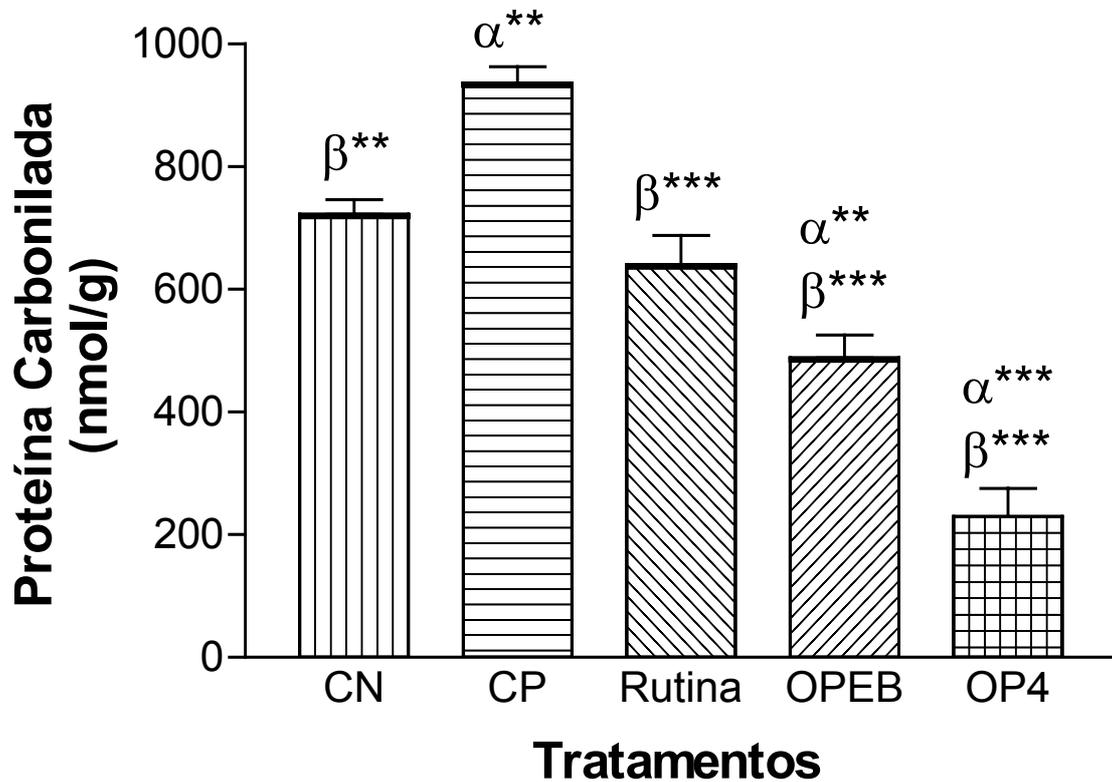


Figura 8. Índice de carbonilação de proteínas (nmol/g) em fígados de camundongos não tratados (controle negativo, CN), tratados com 0,5 mL / 100 g (30% v/v) de CCl_4 (controle positivo, CP), tratados com rutina (6,0 mg/kg), tratados com OP_{EB} (300 mg/kg) e tratados com OP_4 (300 mg/kg). Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, n = 6. (***) e (**) representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$) e ($p < 0,01$), respectivamente. (α) representa diferença estatística em relação ao CN e (β) representa diferença estatística em relação ao CP.

5.2.5. Avaliação da concentração de glutatona reduzida – GSH

Os resultados apresentados na figura 9 mostram que o CCL₄ causou uma forte depleção da GSH (65,31%) e que esta diminuição não foi compensada pelo tratamento prévio, tanto com a rutina, quanto com o extrato bruto (OP_{EB}) e fração hidroalcoólica (OP₄). Os dados obtidos mostraram também que ocorreu uma maior depleção ($p < 0,01$ e $p < 0,05$) nos grupos previamente tratados com os referidos produtos de *Ouratea parviflora*, quando comparados ao grupo controle positivo tratado somente com CCL₄, sugerindo um possível efeito adicional.

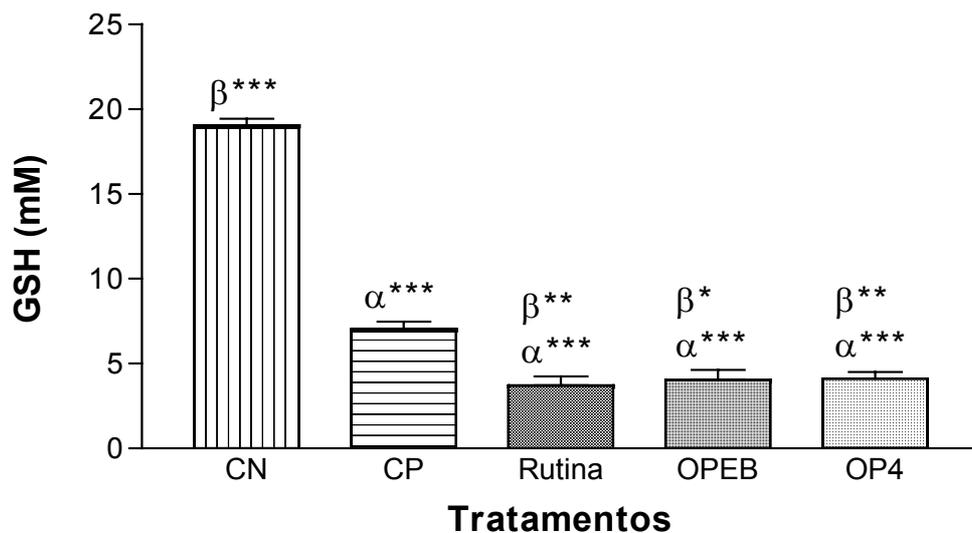


Figura 9. Concentração de GSH hepática (mM) em fígados de camundongos não tratados (controle negativo, CN), tratados com 0,5 mL / 100 g (30% v/v) de CCL₄ (controle positivo, CP), tratados com rutina (6,0 mg/kg), tratados com OP_{EB} (300 mg/kg) e tratados com OP₄ (300 mg/kg). Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, n = 6. (***) e (**) representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$) e ($p < 0,01$), respectivamente. (α) representa diferença estatística em relação ao CN e (β) representa diferença estatística em relação ao CP.

5.2.6. Avaliação da atividade da enzima catalase - CAT

Os resultados apresentados na figura 10 demonstram que o CCl_4 causou uma pequena elevação, porém não significativa estatisticamente, com relação ao controle negativo. Tal elevação foi aparentemente revertida pelo tratamento prévio com o extrato bruto (OP_{EB}), e manteve-se equivalente com relação à fração hidroalcoólica (OP_4).

Curiosamente, o tratamento prévio com a rutina elevou sensivelmente a atividade da CAT quando comparada ao grupo controle ($p < 0,001$), e quando comparada ao grupo controle positivo ($p < 0,001$).

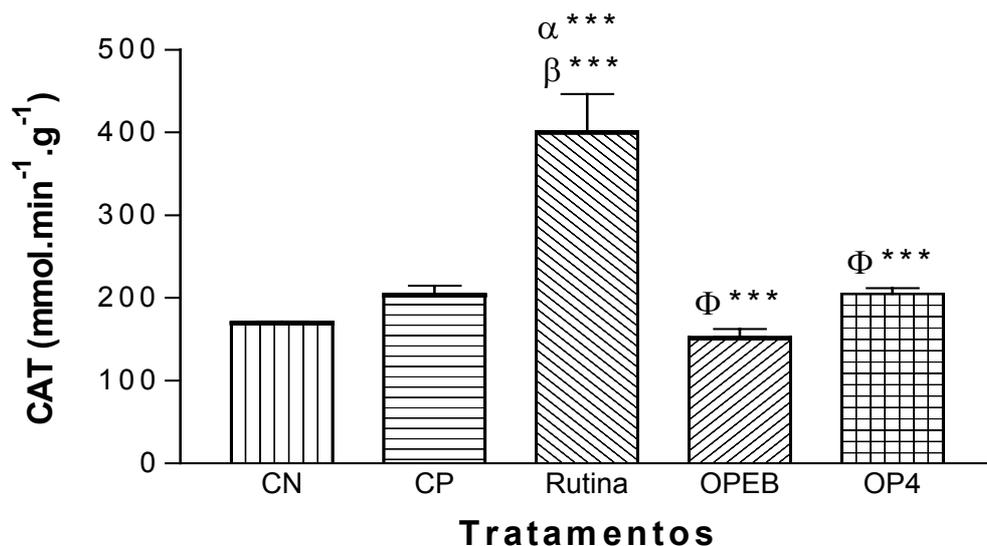


Figura 10. Atividade da enzima catalase ($\text{mmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) em fígados de camundongos não tratados (controle negativo, CN), tratados com 0,5 mL / 100 g (30% v/v) de CCl_4 (controle positivo, CP), tratados com rutina (6,0 mg/kg), em tratados com OP_{EB} (300 mg/kg) e tratados com OP_4 (300 mg/kg). Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 6$. (***) representa diferença estatística altamente significativa ($p < 0,001$). (α) representa diferença estatística em relação ao CN, (β) representa diferença estatística em relação ao CP e Φ representa diferença estatística em relação à rutina.

5.2.7. Avaliação da atividade da enzima glutationa-S-transferase - GST

Os resultados obtidos a partir do ensaio referente à atividade da GST estão apresentados na figura 11. Como pode-se observar, diferentemente da CAT, esta enzima não teve sua atividade alterada pelo tratamento com o CCL₄. Por outro lado, tanto o tratamento prévio com a rutina quanto com o extrato bruto (OP_{EB}) e fração hidroalcoólica (OP₄), de forma semelhante à CAT causou uma sensível elevação da atividade enzimática quando comparado ao grupo controle normal ($p < 0,001$), ou quando comparado ao grupo controle positivo ($p < 0,001$).

Observou-se também que houve diferença estatística altamente significativa ($p < 0,001$) entre o extrato bruto (OP_{EB}) e fração hidroalcoólica (OP₄) quando comparados à rutina, entretanto o melhor resultado foi exibido pela fração hidroalcoólica (OP₄).

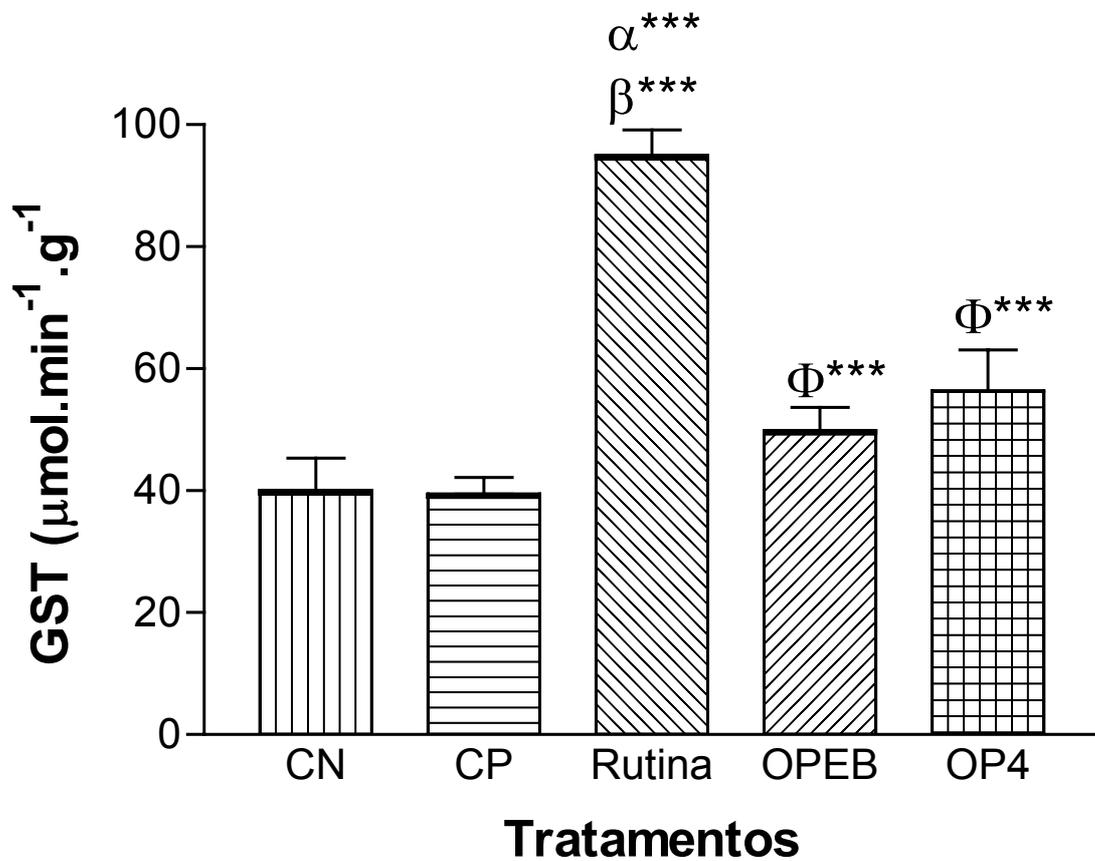


Figura 11. Atividade da GST hepática ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$) em fígados de camundongos não tratados (controle negativo, CN), tratados com 0,5 mL / 100 g (30% v/v) de CCl_4 (controle positivo, CP), tratados com rutina (6,0 mg/kg), tratados com OP_{EB} (300 mg/kg) e em tratados com OP_4 (300 mg/kg). Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 6$. (***) representa diferença estatística altamente significativa ($p < 0,001$). (α) representa diferença estatística em relação ao CN, (β) representa diferença estatística em relação ao CP, (Φ) representa diferença estatística em relação à rutina.

5.3 Marcadores de função hepática

5.3.1 Avaliação da atividade da enzima aspartato amino transferase (AST)

Na figura 12 são apresentados os resultados obtidos com respeito à atividade enzimática da AST. 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, a qual foi revertida, de modo altamente significativo ($p < 0,001$), pelo tratamento prévio OP_4 , diferentemente da rutina e OP_{EB} .

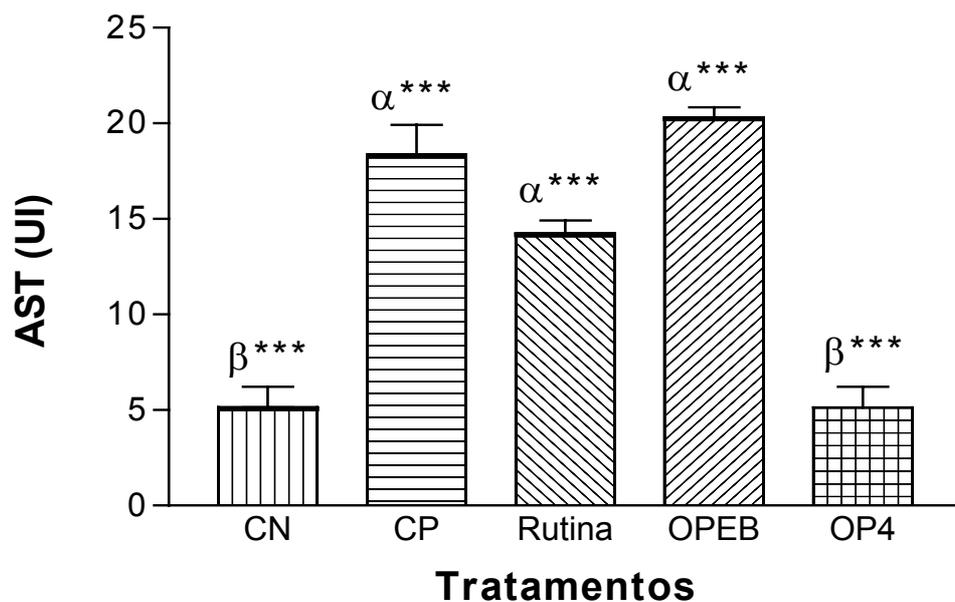


Figura 12. Atividade da AST (UI) em fígados de camundongos não tratados (controle negativo, CN), tratados com 0,5 mL / 100 g (30% v/v) de CCl_4 (controle positivo, CP), tratados com rutina (6,0 mg/kg), tratados com OP_{EB} (300 mg/kg) e tratados com OP_4 (300 mg/kg). Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 6$. (***) representa diferença estatística altamente significativa ($p < 0,001$). (α) representa diferença estatística em relação ao CN e (β) representa diferença estatística em relação ao CP.

5.3.2 Avaliação da atividade da enzima alanina amino transferase (ALT)

A figura 13 mostra que, diferentemente da atividade da AST, a atividade da ALT apresentou elevações estatisticamente significativas somente para o CP ($p < 0,001$), quando comparada ao CN. Curiosamente quando comparados ao CP, a rutina, OP_{EB} e OP_4 apresentaram uma redução significativa na atividade desta enzima sugerindo um certo efeito hepatoprotetor para estes compostos.

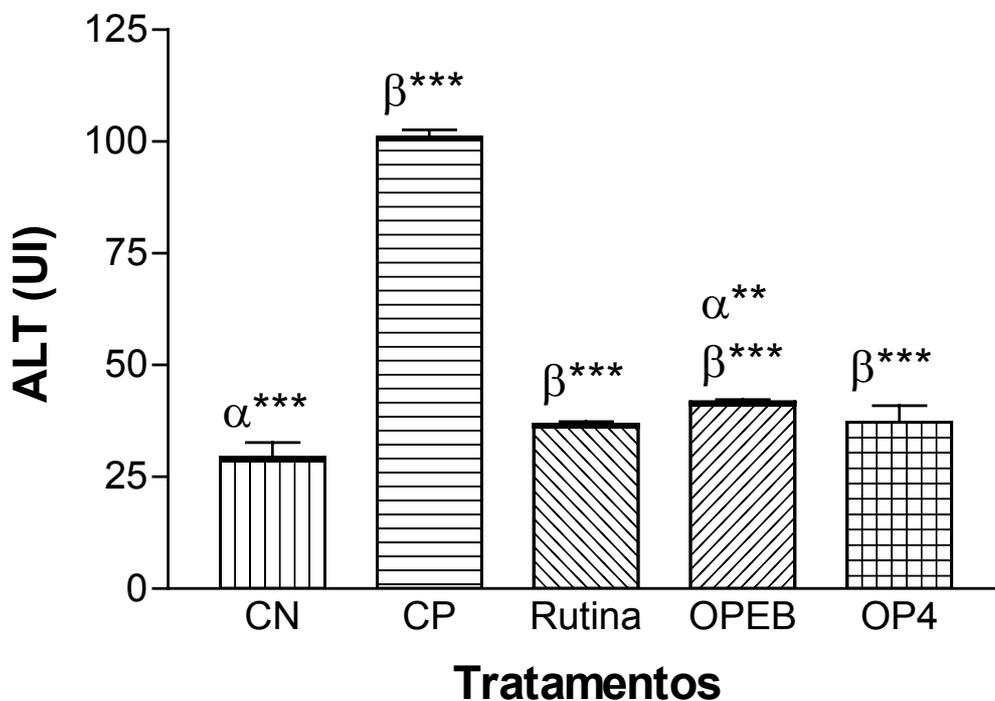


Figura 13. Atividade da ALT (UI) em fígados de camundongos não tratados (controle negativo, CN), tratados com 0,5 mL / 100 g (30% v/v) de CCl_4 (controle positivo, CP), tratados com rutina (6,0 mg/kg), tratados com OP_{EB} (300 mg/kg) e em tratados com OP_4 (300 mg/kg). Todos os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 6$. (***) e (**) representam diferenças estatísticas altamente significativas ($p < 0,001$) e ($p < 0,01$), respectivamente. (α) representa diferença estatística em relação ao CN e (β) representa diferença estatística em relação ao CP.

5.4 Avaliação da atividade antiinflamatória

5.4.1 Ensaio do edema de pata induzido pela carragenina

De acordo com o observado na figura 14, houve diferença significativa no que tange ao aumento do volume do edema, no decorrer do período do ensaio referente aos animais controles negativos, ou seja, que não sofreram tratamento prévio com as plantas medicinais.

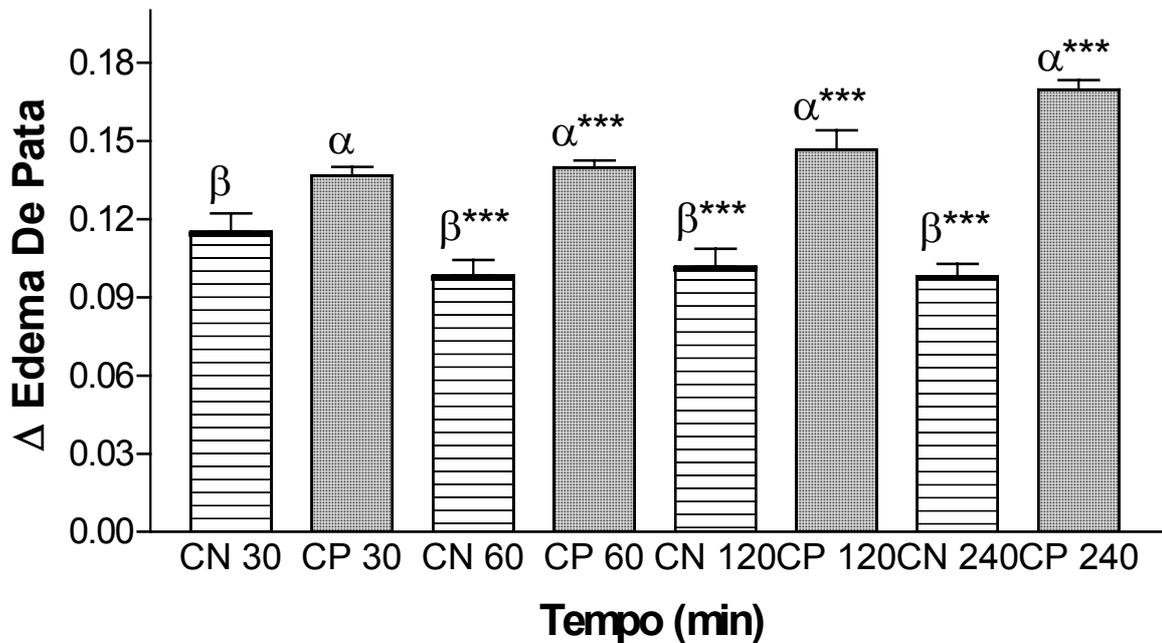


Figura 14. Grupo de animais (n=6), tratados via oral com solução PBS 1 hora antes da administração via intraplantar de PBS nos controles negativos (CN) e do agente flogístico carragenina nos controles positivos (CP), no intervalo de tempo de 30 min a 240 min. Todos os valores foram expressos como média ± EPM referentes à variação (Δ) do edema. (***) representa diferença estatística altamente significativa ($p < 0,001$). (α) representa diferença estatística em relação ao CN e (β) representa diferença estatística em relação ao CP.

A tabela 18 sumariza as médias obtidas pela diferença entre o volume da pata esquerda (a qual administrou-se veículo PBS) e a pata direita (a qual administrou-se a carragenina) entre todos os tratamentos.

Tabela 18. Atividade antiinflamatória induzida por OP_{EB}, OP₄, PS_{EB} e MO₃ (300 mg/Kg), administrados por via oral em camundongos (n=6), sobre o edema de pata induzido, uma hora antes, pela injeção intraplantar da carragenina (300 µg/pata). Os animais controle receberam apenas veículo (PBS).

Grupos	*mg/Kg	Δ do edema de pata induzido pela carragenina				Inibição edema (%)
		Média ± E.P.M.				
		30 min	60 min	120 min	240 min	
CN	PBS	0,022 ± 0,006	0,042 ± 0,005	0,043 ± 0,017	0,072 ± 0,007	ai
OP_{EB}	300	0,032 ± 0,009	0,032 ± 0,009	0,033 ± 0,013	0,058 ± 0,013	ai
OP₄	300	0,028 ± 0,011	0,015 ± 0,009	0,026 ± 0,010	0,080 ± 0,023	ai
PS_{EB}	300	0,025 ± 0,002	0,032 ± 0,009	0,038 ± 0,012	0,062 ± 0,010	ai
MO₃	300	0,025 ± 0,008	0,015 ± 0,009	0,025 ± 0,017	0,053 ± 0,026	ai

ai (ausência de inibição).

Embora, aparentemente nos tempos 60 e 120 minutos, tenha ocorrido inibição do edema pelo tratamento prévio com as plantas medicinais (300 mg/Kg) via oral, a análise estatística não revelou diferenças significativas entre os diferentes tratamentos. A figura 15 a seguir ilustra os dados supracitados na tabela 18.

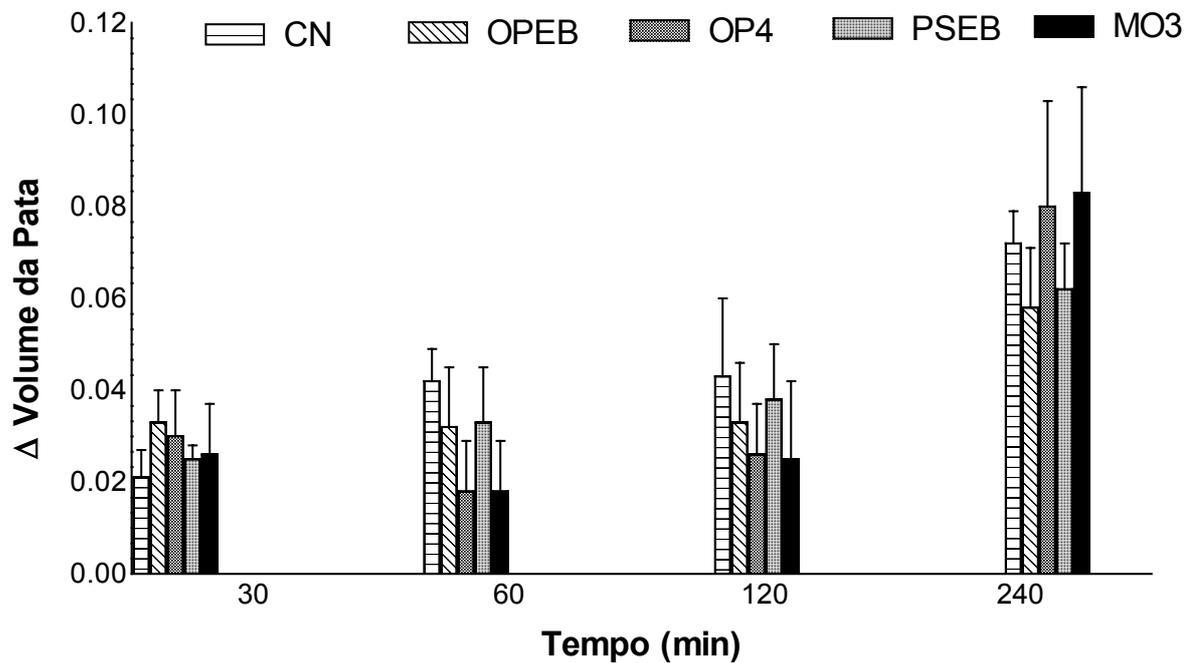


Figura 15. Grupos de animais ($n=6$) tratados via oral com PBS, além de OP_{EB} , OP_4 , PS_{EB} e MO_3 (300 mg/Kg), uma hora antes da administração via intraplantar do agente flogístico, no intervalo de tempo de 30 a 240 min. Todos os valores foram expressos como média \pm EPM referentes à variação (Δ) do edema.

6 DISCUSSÃO

6.1 Atividade antioxidante *in vitro*

Avaliou-se a atividade antioxidante *in vitro* de determinados produtos extraídos de plantas medicinais por meio de uma triagem que incluiu vários ensaios, enzimáticos e não enzimáticos. Tais ensaios mensuraram a relativa habilidade “scavenger” de radicais livres e proteção contra a lipoperoxidação.

A rutina é um flavonóide largamente distribuído no reino vegetal, estando presente em várias plantas que apresentam importante atividade antioxidante. DALL’ACQUA e INNOCENTIL (2004), também utilizaram esta substância como padrão para avaliar a atividade antioxidante de extratos da *Chaerophyllum hirsutum*, obtendo resultado de CE_{50} 7,8 mM, resultado este semelhante ao obtido neste estudo.

O presente trabalho demonstrou-se que a capacidade de captação do radical livre DPPH pela rutina foi maior que a dos extratos e frações das plantas medicinais pesquisadas (tabelas 2, 3 e 4). Apesar de não apresentarem atividade antioxidante semelhante à da rutina, *Ouratea parviflora* (excetuando-se a fração acetato de etila OP₃, a qual exibiu fraca atividade antioxidante ($CE_{50}>500\mu\text{g/mL}$), *Polymnia sonchifolia* e *Marlierea obscura* (excetuando-se a fração clorofórmica MO₁, a qual exibiu fraca atividade antioxidante com ($CE_{50}>1000\mu\text{g/mL}$), todas apresentaram importante atividade de captação do radical DPPH indicando serem, candidatas promissoras à continuidade e, conseqüente aprofundamento dos estudos referentes à atividade antioxidante. Ademais, não há relato na literatura relativamente à capacidade “scavenger” do radical DPPH tanto de *Ouratea parviflora*, quanto de *Polymnia sonchifolia* e *Marlierea obscura*, o que enaltece ainda mais a produção de tais resultados.

A rutina é um flavonóide bem conhecido (DUKE, 1992), extensivamente estudado, e são conhecidas suas múltiplas atividades farmacológicas, incluindo ação antibacteriana, antiviral, antiprotozoária, antitumoral, antialérgica, antiinflamatória, antidiarréica, antiulcerativa, antiespasmódica, antimutagênica, protetora do miocárdio, vasodilatadora, e sendo que a ação imunomoduladora também

foi relatada (JANBAZ et al., 2002; LA CASA et al., 2000). É também considerado um importante agente antioxidante por inibir a lipoperoxidação e capturar o radical $\cdot\text{OH}$ e o $\text{O}_2^{\cdot-}$ (NEGRÉ-SALVAYRE et al., 1991; BOMBARDELLI e MORAZZONI, 1993; METODIEWA et al., 1997).

Neste contexto, já foi postulado na literatura a eficiente capacidade de captação de radicais DPPH associada à presença de compostos fenólicos (ACKER et al., 1996; HEIM TAGLIAFERRO e BOBILYA, 2002) nos extratos de plantas medicinais, como é o caso da vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído), um produto natural derivado da planta *Vanilla planifolia*. A presença de componentes fenólicos em *Vanilla planifolia* conferiu atividade “scavenger” frente ao radical livre DPPH (KUMAR et al., 2002). TANG et al (2004) pesquisaram extratos de 33 plantas da medicina tradicional chinesa, os quais continham compostos fenólicos em sua composição, e tais extratos diminuíram a concentração do radical DPPH. Neste contexto, o extrato metanólico de *Sesamum indicum*, planta cultivada na Índia e amplamente utilizada na medicina aiurvédica, revelou atividade “scavenger” em relação ao DPPH pela presença de compostos fenólicos e antocianinas e, corroborando com os resultados deste trabalho, a CE_{50} foi linearmente dependente da concentração da amostra (SUJA et al., 2004). LEE et al. (2003) pesquisaram extratos de plantas que contém compostos fenólicos tais como *Areca catechu* e *Areca dulcíssima*, as quais exibiram importante ação “scavenger” ($\text{CE}_{50} = 1,8\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), além de *Cinnamomum cassia*, *Paeonia suffruticosa* e *alpinia officinarum* ($\text{CE}_{50} = 5,0; 5,9 \text{ E } 6,7\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente), sendo que, analogamente ao resultado obtido neste estudo, as amostras exibiram atividade dose-dependente.

Segundo CIOFFI et al. (2002), extratos obtidos de folhas secas de *Tachigalia paniculata*, planta nativa da América do Sul, a qual contém flavonóides na sua composição como a miricetina, exibiu ação “scavenger” do radical DPPH e ânion superóxido, inibindo a ação da XO. *Aspalathus linearis*, planta medicinal utilizada na África do sul e que contém compostos fenólicos exibiu ação “scavenger” do radical DPPH e ânion superóxido através do NBT (JOUBERT et al., 2004).

A produção exagerada de $\text{O}_2^{\cdot-}$ em sistemas biológicos está relacionada a efeitos deletérios, como dano às células endoteliais, peroxidação lipídica e danos ao DNA (NARDI et al., 2003). Contudo, substâncias antioxidantes que possam reduzir a

quantidade de $O_2^{\bullet-}$ nos sistemas biológicos, podem vir a colaborar no bom funcionamento das células e na prevenção de doenças associadas às EROs.

No presente trabalho a capacidade antioxidante dos extratos e frações de *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifolia* e *Marlierea obscura*, além da própria rutina, em seqüestrar o $O_2^{\bullet-}$ gerado pelo sistema enzimático xantina / XO foi pesquisada no presente trabalho. Inicialmente foi avaliada a atividade dos produtos das plantas supracitadas sobre a inibição da enzima que catalisa a formação de $O_2^{\bullet-}$ e ácido úrico. O extrato etanólico de *Ouratea parviflora* e todas as frações deste extrato, exibiram importante inibição da XO (TABELA 5). Entretanto, o extrato bruto (OP_{EB}) expressou o melhor resultado, ocasionando a maior inibição enzimática, sugerindo desta forma que, indiretamente, *Ouratea parviflora* possui importante e expressiva atividade antioxidante em virtude de a XO ser um dos mais importantes sistemas geradores de ânion superóxido *in vivo*. Com relação à *Polymnia sonchifolia* (TABELA 6), apenas a fração acetato metanól 1:1 (PS4) apresentou efeito inibidor moderado, embora revelou ser mais expressivo que o da rutina. Já as frações de *Marlierea obscura* (TABELA 7) não apresentaram efeito inibidor da enzima, e conseqüentemente, não foram efetivas em impedir a formação de $O_2^{\bullet-}$ e ácido úrico.

Dados semelhantes aos obtidos neste estudo 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 XO, 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, desta forma, que diversos flavonóides e compostos fenólicos são considerados antioxidantes não somente pela inibição da XO, mas também pela ação de capturar radicais livres (COS et al., 2000).

Posteriormente, avaliou-se a capacidade antioxidante de *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifolia* e *Marlierea obscura*, além da rutina, em inibir a redução do NBT pelo $O_2^{\bullet-}$, gerado pela reação catalisada pela XO. Novamente a *Ouratea parviflora* (TABELA 8) apresentou a atividade antioxidante mais expressiva dentre as plantas pesquisadas, sendo que o extrato bruto (OP_{EB}) exibiu moderada atividade antioxidante. Já as frações do extrato etanólico de *Ouratea parviflora*, revelaram fraca atividade antioxidante quando comparadas ao controle rutina. Com relação a *Polymnia sonchifolia* (TABELA 9) apenas a fração hexano acetato 3:7 (PS2) exibiu

moderada atividade antioxidante, diferentemente dos demais produtos desta planta, os quais revelaram ausência de atividade antioxidante, bem como os extratos de *Marlierea obscura* (TABELA 10).

O radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) é a espécie mais reativa encontrada em meios biológicos, reagindo no próprio sítio onde foi gerado, sendo responsável por grande parte dos danos celulares provenientes das EROs, causando quebras na estrutura do DNA, lipoperoxidação de membranas e também, oxidação protéica (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Para determinar se *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifolia* e *Marlierea obscura*, além da rutina poderiam, de alguma forma, afetar a formação ou os efeitos deste radical, utilizou-se um método de geração de $\cdot\text{OH}$ que se baseia na oxidação da desoxirribose provocada por $\cdot\text{OH}$, produzido pela reação de H_2O_2 com o ferro. Todas as plantas pesquisadas apresentam importante atividade antioxidante neste ensaio, pois foram capazes de inibir a degradação da desoxirribose de maneira dependente da concentração. *Ouratea parviflora* (TABELA 11) apresentou forte potencial antioxidante equivalente ao da rutina, sendo que OP_{EB} apresentou forte atividade antioxidante enquanto que a fração hexânica (OP_1) exibiu fraca atividade antioxidante. No entanto, obteve-se resultados surpreendentemente positivos com relação às frações clorofórmica (OP_2), acetato de etila (OP_3), hidroalcoólica (OP_4) e metanólica (OP_5), as quais exibiram atividades antioxidantes bem mais promissoras que o da rutina, o flavonóide padrão utilizado. Estes resultados estão de acordo com CZINNER et al. (2000), os quais 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 “scavengers” do $\cdot\text{OH}$. Em *Ouratea parviflora* ocorrem flavonóides como a rutina, apigenina e amentoflavona, e, a ação “scavenger” possivelmente esteja associada a tais componentes. Com relação à *Polymnia sonchifolia* e *Marlierea obscura*, a maioria das frações revelou resultados promissores no ensaio que avalia a capacidade de captação do radical $\cdot\text{OH}$, provavelmente pelo fato destas plantas possuírem flavonoides como a quercitina em sua composição química.

A proteção contra a peroxidação lipídica foi avaliada utilizando como substrato alvo homogenato de fígado de ratos (CHEN e TEPPEAL, 1996). Neste

ensaio, a peroxidação foi induzida pelo peróxido *t*-butila. As três plantas pesquisadas revelaram resultados importantes quando comparadas à rutina. No que tange a *Ouratea parviflora* (TABELA 14), excetuando-se a fração acetato de etila (OP₃) que não apresentou atividade provavelmente por não conter compostos fenólicos, todos os demais produtos de *Ouratea parviflora* apresentaram importante efeito protetor da lipoperoxidação, sendo que o extrato bruto (OP_{EB}) e a fração hidroalcoólica (OP₄) protegeram melhor as membranas celulares e nucleares (CE₅₀ < 31,25 µg.mL⁻¹) dos efeitos da lipoperoxidação do que a rutina (CE₅₀ = 203,83 ± 1,44). Nas mesmas condições experimentais, o extrato etanólico e todas as frações de *Polymnia sonchifolia* (TABELA 15), excetuando-se a fração hexânica (PS₇), também apresentaram maior eficiência (CE₅₀ < 31,25 µg.mL⁻¹) quando comparados à rutina (CE₅₀ = 203,83 ± 1,44 µg.mL⁻¹). Com relação à *Marlierea obscura* (TABELA 16) a proteção contra a lipoperoxidação de membranas também mostrou-se eficiente, sendo que as frações hexânica (MO) e clorofórmica (MO₁) exibiram (CE₅₀ = 35,29 ± 3,87 µg.mL⁻¹ e 32,72 ± 4,06 µg.mL⁻¹) respectivamente. Sendo assim, mais expressivas que a da rutina (CE₅₀ = 203,83 ± 1,44 µg.mL⁻¹). Tais resultados vão ao encontro dos relatos existentes na literatura, onde observa-se efeito inibitório de compostos fenólicos, como flavonóides, por serem estes, doadores de hidrogênio, mecanismo de ação básico dos antioxidantes (SESTILI et al., 2002; NARDI et al., 2003; SHULDT et al., 2004; KWON et al., 2004; TANG et al., 2004).

Com exceção dos ensaios DPPH e radical hidroxil, a atividade antioxidante do extrato bruto (OP_{EB}) apresentou-se sempre maior que a rutina nos demais ensaios *in vitro* realizados. O extrato etanólico de *Ouratea parviflora* (OP_{EB}), (OP₄) e a fração (PS₂) do extrato de *Polymnia sonchifolia* apresentaram ação “scavenger” tanto para O₂^{•-} quanto [•]OH, o que poderia explicar sua elevada proteção contra a lipoperoxidação de membranas celulares.

Para tanto, a partir dos resultados exibidos pelos ensaios *in vitro* com relação à atividade antioxidante das referidas plantas medicinais, selecionou-se a planta que revelou melhor potencial antioxidante que, no caso, foi *Ouratea parviflora*, destacando-se, dentre seus produtos, o extrato bruto (OP_{EB}) e a fração hidroalcoólica (OP₄), que contém o flavonóide rutina, para avaliação subsequente da atividade antioxidante *in vivo*.

6.2 Atividade antioxidante *in vivo*

O tetracloreto de carbono (CCl_4) é um hidrocarboneto halogenado, muito utilizado em processos de síntese orgânica de compostos clorados, particularmente compostos aromáticos halogenados, e também na indústria têxtil de lavagem a seco, sendo um agente químico altamente tóxico (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999), causando principalmente, danos hepáticos e renais. A exposição ao CCl_4 pode acarretar o desenvolvimento de tumor e cirrose hepática, além de necrose tubular aguda nos rins (JUNNILA, 2000; OZTURK et al., 2003).

Os efeitos tóxicos do CCl_4 no fígado já foram extensivamente documentados na literatura (OHTA et al., 2000). Sua ativação metabólica pelo citocromo P450 gerando radicais livres, isto é, o triclorometano e o radical peroxil do triclorometano, são utilizados para caracterizar a peroxidação de lipídios e a oxidação de proteínas, o que geralmente é responsável pela hepatotoxicidade deste composto (OZTURK et al., 2003). Algumas investigações sugerem que os efeitos nefrotóxicos do CCl_4 estão associados principalmente com a produção de radicais livres (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 deste 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 radicais $\cdot\text{OH}$ na ausência da catalase (WANG et al., 1998).

No presente estudo, o CCl_4 foi utilizado para induzir a peroxidação lipídica endógena, a qual foi avaliada em termos de detecção dos derivados lipoperóxidos, através de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). Como demonstrado na figura 5, o CCl_4 induz a lipoperoxidação uma vez que houve um aumento significativo da concentração de TBARS (606%) neste grupo. Observamos que apenas a rotina foi capaz de reverter este índice de lipoperoxidação hepática causada pelo CCl_4 , sugerindo que este composto conferiu proteção às membranas celulares contra o ataque oxidativo de radicais livres, uma vez que, como já

comprovado experimentalmente *in vitro* por relatos existentes na literatura, este composto possui grande atividade antioxidante. Ainda com relação 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. Curiosamente, no presente trabalho, o ensaio TBARS *in vivo* (FIGURA 5) não comprovou os resultados obtidos *in vitro* (TABELA 14) com relação aos produtos OP_{EB} e OP₄ de *Ouratea parviflora*. Poderíamos especular que talvez tenha havido um problema referente à absorção intestinal ou celular destes produtos, pois diferentemente, no ensaio *in vitro*, os resultados revelaram-se distintos. É importante ressaltar que no ensaio com o DPPH, todos os produtos das plantas foram diretamente solubilizados em etanol absoluto (PA), ao passo que nos outros ensaios *in vivo* foram solubilizados em uma solução etanol (PA) e água ultrapura, bidestilada e, dependendo de sua lipossolubilidade total poderiam ter dificuldade em atravessar a barreira lipídica das membranas celulares.

Conforme postulado na década de 80, e de acordo com HERMES-LIMA e STOREY 1995, a quantificação espectrofotométrica do TBARS não pode ser considerada uma técnica muito precisa para determinar-se o conteúdo de lipoperóxidos formados nos tecidos, isto pelo fato de o ensaio superestimar os níveis reais de malondialdeído, uma vez que o ácido tiobarbitúrico pode reagir com outros compostos presentes no meio biológico que tenham função aldeído. Entretanto, este método é considerado efetivo para estudos comparativos de estresse oxidativo onde outros aldeídos capazes de reagir com o TBA também sejam produtos da peroxidação lipídica (RAMOS-VASCONCELOS e HERMES-LIMA, 2003).

Além da avaliação da lipoperoxidação pelo TBARS, que quantifica a lipoperoxidação de forma geral, também procuramos mensurar 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 6), curiosamente OP_{EB} e OP₄, que contêm rutina, apresentaram capacidades de proteção contra a hidroperoxidação semelhantes entre si e em relação à rutina, corroborando os achados do ensaio TBARS *in vitro* (TABELA 14), diferentemente do que observou-se no ensaio com TBARS *in vivo* (FIGURA 6).

Com o intuito de confirmar a hipótese de que o CCl₄, além de causar importante dano pela peroxidação lipídica, também seria indutor de danos oxidativos

significativos ao DNA, utilizou-se o ensaio cometa. Trata-se de um ensaio de alta sensibilidade na detecção de quebras de fitas simples e duplas de DNA em células eucarióticas individuais além de, virtualmente, poder ser utilizado para detectar possíveis danos ao DNA de quaisquer células eucarióticas (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 ao DNA (FIGURA 7) de 120,4%. Dados existentes na literatura demonstram que o CCl_4 induz uma fragmentação importante 24 horas após administração (NATH, LI e RANDERATH, 1990).

A rutina utilizada como composto de referência, capaz de proteger o DNA do ataque oxidativo dos radicais livres do CCl_4 , foi capaz de reduzir o dano a este ácido nucléico em 35,34% (FIGURA 7). Em trabalho semelhante, utilizando peróxido t-butila como agente agressor, 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, revelando o efeito sinérgico das mesmas. Segundo YAMAGUCHI et al. (2005) os flavonóides possuem importante atividade como agentes antioxidantes por mecanismos "scavenger" de radicais livres com formação de pequenos radicais fenoxil reativos dos flavonóides, o que impediria o ataque oxidativo ao DNA. Os mesmos autores relataram que, em termos de potencial citoprotetor, a quercetina teria maior atividade de proteção ao dano ao DNA, seguido da rutina, a qual também apresenta eficiência elevada.

O OP_{EB} também foi capaz de reduzir significativamente o dano ao DNA causado pelo CCl_4 , não havendo diferença estatística significativa entre os referidos tratamentos prévios e o grupo controle negativo, mostrando um efeito protetor sobre o DNA de hepatócitos, ainda não relatado na literatura. Com relação à fração OP_4 , o DNA foi mais fortemente protegido, observando-se uma elevação estatisticamente significativa na proteção à fragmentação deste ácido nucleico ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo controle positivo e de com relação a rutina. Este resultado promissor revela que a fração OP_4 foi mais efetiva em proteger possíveis danos ao DNA do que a própria rutina, de ação congênere.

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 considerado um marcador desta modificação oxidativa (LEVINE, 1990; LEVINE, 2002). Dados existentes na literatura sugerem que o CCl_4 induz a carbonilação das proteínas dos hepatócitos de camundongos (SHEWEITA, ABD EL-GABAR e BASTAWY, 2001). Segundo AHAMED et al. (2000), o CCl_4 pode induzir hipertrofia hepática, necrose dos hepatócitos além de causar acúmulo de triacilgliceróis, diminuindo o conteúdo de GSH, aumentando a lipoperoxidação, danificando a membrana, deprimindo a síntese de proteínas e a atividade de várias enzimas. Os resultados obtidos mostraram que o CCl_4 causou uma elevação de 40,5% na carbonilação de proteínas (FIGURA 8). Tanto OP_{EB} quanto OP_4 apresentaram uma proteção mais expressiva que a rutina sobre o dano oxidativo às proteínas (FIGURA 8). Tais resultados são extremamente importantes, pois demonstram que o extrato etanólico desta planta e sua fração hidroalcoólica (OP_{EB} e OP_4) respectivamente, exibem um importante e significativo efeito citoprotetor contra o ataque oxidativo do CCl_4 às proteínas, pois evita a carbonilação destas e, também, reforça os dados anteriormente apresentados relativos à proteção contra a peroxidação lipídica (HPO) *in vivo* e, com relação ao dano ao DNA.

Com relação às defesas antioxidantes, o CCl_4 demonstrou causar uma forte depleção de GSH total hepática (65,3%) nos animais expostos (FIGURA 9), o que provavelmente promoveu dano à proteína e lipoperoxidação no grupo controle positivo. Nota-se que o conteúdo de GSH nos grupos tratados com rutina, OP_{EB} e OP_4 também apresentou uma depleção, talvez pela toxicidade inerente ao CCl_4 porém, os 3 produtos possivelmente estariam atuando de forma similar à GSH, a qual é utilizada como substrato para a GPx, para a conversão do H_2O_2 em H_2O , ou neutralização direta de EROs, pois conseguiram reverter os danos oxidativos (TBARS, fragmentação do DNA, carbonilação de proteínas) mesmo com os níveis de GSH relativamente baixos.

No estudo de OZTURK et al. (2002), o CCl_4 induziu dano renal por ser um agente oxidativo agressor, provocando um aumento significativo da atividade da SOD e CAT, confirmando o resultado obtido na figura 10, a qual demonstra que o CCl_4 causou uma pequena elevação, porém estatisticamente significativa ($p < 0,05$), na atividade da CAT. Curiosamente, o tratamento prévio com rutina elevou sensivelmente a atividade da CAT, quando comparada ao grupo controle negativo ($p < 0,001$) e quando comparada ao grupo controle positivo ($p < 0,001$). Segundo GAO

et al. (2003), de modo oposto a atividade da CAT em fígado de ratos tratados pela rotina provocou um decréscimo significativo da atividade desta enzima. Já a elevação que o CCl₄ provocou, aparentemente não foi revertida pelo tratamento prévio com OP_{EB} e OP₄, quando comparada ao grupo controle negativo e ao grupo controle positivo, diferentemente do observado com a rotina.

A GST e a GSH desempenham importante papel na detoxificação de muitos agentes tóxicos (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 *op cit*, o CCl₄ induziu dano ao fígado, e conseguiu inibir a atividade da GST em aproximadamente 30% quando comparado ao controle. Entretanto, de acordo com SOTELO-FÉLIX et al. (2002), o CCl₄ não modificou a atividade da GST quando comparado como o grupo controle, semelhantemente aos resultados obtidos no presente trabalho, pois a enzima não teve sua atividade alterada pelo tratamento com o CCl₄ (figura 11). Por outro lado, o tratamento prévio com rotina e de forma semelhante à CAT causou uma sensível elevação (112,6%) da atividade enzimática quando comparado ao grupo controle normal. Enquanto que, para HIROSE et al. (1999), a rotina aumentou a atividade enzimática da GST em 29%. Já o tratamento prévio com OP_{EB} e OP₄ aumentou a atividade da GST, sugerindo que estes produtos de *Ouratea parviflora* poderiam ser ativadores desta enzima de conjugação.

Como o CCl₄ é um agente hepatotóxico, NISHIDA et al., 1998; GYAMGI et al., 1999, analisaram a atividade das transaminases nos intervalos de 12 h e 24 h após a administração, os quais observaram um aumento da AST e ALT séricas, associado-os ao dano hepatocelular. Corroborando tais observações, o tratamento com CCl₄ causou uma elevação (365,6%) na atividade da AST (FIGURA 12), quando comparado com o CN, que não foi revertido pelo tratamento com a OP_{EB}. No entanto, a rotina e a OP₄ obtiveram uma elevação, significativamente menor, da atividade desta enzima sugerindo um efeito hepatoprotetor. Da mesma forma, a atividade enzimática da ALT apresentou elevação estatisticamente significativa de (346,0%) nos animais tratados com CCl₄ quando comparados ao grupo controle negativo (FIGURA 13). Curiosamente, quando comparados ao grupo controle positivo, tratado exclusivamente com CCl₄, a rotina, OP_{EB} e OP₄ apresentaram uma diminuição significativa na atividade desta enzima, sugerindo um efeito hepatoprotetor para o extrato e frações de *Ouratea parviflora*, especialmente para a

fração hidroalcoólica (OP₄). JANBAZ et al. (2002) demonstraram que a rutina exerce efeito protetor contra danos hepáticos causados pelo CCl₄, onde os animais previamente tratados com a rutina preveniram a elevação dos níveis sanguíneos das transaminases induzidas por CCl₄.

6.3 Atividade antiinflamatória

Muitos esforços têm sido realizados no sentido de identificar modelos experimentais apropriados para cada tipo de reação inflamatória como asma brônquica, artrite reumatóide, retocolite ulcerativa, dentre outros. Protocolos experimentais nos quais o processo inflamatório é induzido agudamente, têm sido utilizados para estudos desta reação, abordando a participação de mediadores químicos de diferentes tipos celulares, além de possibilitar a avaliação de fármacos com suposta atividade antiinflamatória. Entre os modelos pode-se citar : indução de edema de pata, pleurisia, bolsa de ar no dorso, artrite e implantes de esponjas embebidas com agentes irritantes no subcutâneo (SEDGWICK e WILLOUGHBY, 1989).

Com o intuito de validar o uso popular de *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifolia* e *Marlierea obscura* como plantas antiinflamatórias, optou-se neste trabalho, pela utilização do teste da indução do edema de pata pela carragenina em camundongos. Este método foi originalmente descrito em ratos por Winter et al. (1962), no entanto, tem se observado um perfil semelhante de atividade antiinflamatória na resposta em camundongos (SUGISHITA et al., 1981).

Este teste caracteriza-se pela injeção intraplantar de um polissacarídeo de origem marinha, a carragenina, que gera um quadro de inflamação aguda e é caracterizado pela liberação seqüencial de mediadores inflamatórios. Durante a primeira hora, o edema gerado é mediado por histamina e serotonina e, após este período, o aumento da permeabilidade vascular é mantida por cininas como a bradicinina. Em torno de duas horas os processos edematogênicos são mediados pelas prostaglandinas, associados à migração de leucócitos à região inflamada (WILLIA 1969; DI ROSA et al., 1971).

No grupo de animais tratados previamente com veículo (PBS), via oral e intraplantar, a injeção intraplantar de carragenina (300µg/pata) promoveu a formação de edema progressivo, o qual foi avaliado nos tempos 0, 30, 60, 120 e 240 minutos

(FIGURA 15 e TABELA 18). A injeção intraplantar de carragenina, em camundongos controles, produziu um edema que se desenvolveu no intervalo de 0 a 4 horas, altamente significativo ($p < 0,001$) em relação aos submetidos à injeção intraplantar e oral com veículo PBS (FIGURA 14).

Tem sido descrito na literatura que o edema de pata induzido pela carragenina, seria um modelo eficaz para o estudo de fármacos antiinflamatórios (HIGGS et al., 1980; SEIBERT et al., 1994). Curiosamente, com relação aos animais tratados previamente via oral, 1 hora antes da administração do agente flogístico com extrato bruto (OP_{EB}), fração hidroalcoólica (OP_4), extrato bruto (PS_{EB}) e fração hexânica (MO) não houve diminuição, estatisticamente significativa, do edema em todos os intervalos de tempo analisados (TABELA 18). Se por um lado, não se esperava observar alterações significantes estatisticamente, em relação ao grupo controle, nos primeiros 30 minutos do ensaio, o mesmo perfil foi igualmente observado nos demais intervalos de tempo do ensaio. Tal resultado sugere que a administração, via oral, dos extratos e frações das referidas plantas não foi efetiva na redução do efeito edematogênico induzido pela carragenina. Entretanto, tal diminuição do edema não se mostrou significativa segundo a análise estatística dos dados, mas de acordo com a figura 15, as frações OP_4 e MO_3 , revelaram uma tendência em diminuir o edema induzido nos tempos 60 e 120 minutos, concordando com os ensaios relativos à atividade antioxidante.

Diversos modelos de inflamação têm sido utilizados para avaliar o potencial antiinflamatório de alguns extratos de plantas. Isto se deve ao fato de que, apesar da maioria das reações inflamatórias apresentarem características comuns, sua etiologia e manifestações clínicas diferem significativamente, necessitando portanto, de modelos específicos que reproduzam as características básicas. Desta forma é fácil compreender porque os modelos experimentais relativos ao tratamento de doenças inflamatórias são deveras diversificados (SEDGWICK e WILLOUGHBY, 1989).

Os resultados não conclusivos a respeito da atividade antiinflamatória das plantas medicinais estudadas no presente trabalho, em que o ensaio da indução de edema de pata não se mostrou específico, não descartam a possibilidade de que as plantas medicinais de fato, possuam potencial atividade antiinflamatória, de acordo com os relatos etnobotânicos e etnofarmacológicos. Para tanto, haverá a necessidade da realização de ensaio baseado no modelo da pleurisia, por tratar-se

de um modelo que confere uma avaliação mais abrangente. O modelo da pleurisia pode avaliar não só o extravasamento de líquido, como também a migração celular (SALEH, CALIXTO e MEDEIROS, 1996; DALMARCO, FRÖDE e MEDEIROS, 2002), além da participação de citocinas, enzimas e mediadores químicos (FRÖDE, FERREIRA e MEDEIROS, 2001) através da utilização de diferentes agentes flogísticos. Segundo GEREMIAS (2004), a técnica da pleurisia possui vantagens em relação ao edema de pata pois, a partir da coleta do lavado na cavidade pleural, é possível analisar e quantificar os componentes celulares e humorais da inflamação, sem necessitar recorrer a procedimentos complicados na sua extração e quantificação. Uma outra vantagem adicional da pleurisia é a sua fácil execução, visto que diferentes agentes flogísticos (específicos e não específicos) podem ser estudados. De modo geral, a inflamação produzida na cavidade pleural é lenta e prolongada, em comparação àquela desenvolvida na pele no ensaio do edema de pata. Isto se deve ao fato de haver diferenças na resposta do mediador inflamatório, na drenagem linfática, bem como nos tipos celulares envolvidos (GEREMIAS, 2004). Diferentemente, na pele estes mediadores induzem rapidamente a formação de edema (VINEGAR, TRUAX e SELPH, 1976).

7. CONCLUSÕES

De maneira geral, os resultados deste estudo indicam que:

Tanto o extrato bruto de *Ouratea parviflora* bem como suas frações pesquisados na triagem dos ensaios *in vitro* [extrato bruto (OP_{EB}), fração hexânica (OP₁), fração clorofórmica (OP₂), fração acetato de etila (OP₃), fração hidroalcoólica (OP₄) e fração metanólica (OP₅)], dentre os quais destacaram-se o extrato bruto (OP_{EB}) e fração hidroalcoólica (OP₄), apresentaram importante atividade antioxidante *in vitro*, pois foram efetivos em promover a ação “scavenger” de radicais DPPH, ânion superóxido e hidroxil além de proteger contra a lipoperoxidação em concentrações menores ou similares à da rutina, reconhecido agente antioxidante.

A atividade antioxidante *in vitro* do extrato bruto e frações de *Polymnia sonchifolia* revelou-se efetiva, mais precisamente o extrato bruto, com relação à ação “scavenger” do radical DPPH, de radicais hidroxil, e na proteção contra a lipoperoxidação de membranas celulares e nucleares; entretanto, não foi efetiva na captação e neutralização do ânion superóxido.

As frações do extrato etanólico de *Marlierea obscura* não apresentaram atividade “scavenger” de ânion superóxido, sendo que a fração metanólica (MO₃) foi a mais efetiva na captação do radical livre DPPH, bem como na proteção à lipoperoxidação de membranas celulares e nucleares (ensaio TBARS). As frações hexânica (MO), acetato de etila (MO₂) e metanólica (MO₃) foram equivalentes na captação do radical hidroxil, cuja ação “scavenger” foi efetivamente promissora em relação à rutina.

O tetracloreto de carbono (CCl₄) mostrou-se efetivo em induzir o estresse oxidativo e dano celular no fígado dos camundongos, entretanto o extrato bruto e fração hidroalcoólica de *Ouratea parviflora* não atuaram na proteção contra o ataque do CCl₄ nos ensaios TBARS *in vivo* e nas atividades de CAT e GST.

Todavia, com relação à hidroperoxidação (ensaio FOX), tanto a rutina quanto o extrato bruto e fração hidroalcoólica de *Ouratea parviflora* foram altamente efetivos na proteção de dano às membranas celulares induzido pelo CCl₄.

Ao avaliar-se possíveis danos causados às proteínas, observou-se que a rutina foi altamente efetiva em reverter ou proteger tais danos; já com relação ao extrato bruto e fração hidroalcoólica de *Ouratea parviflora*, ambos revelaram-se mais

efetivos ainda que a rutina, embora a fração hidroalcoólica tenha apresentado melhor efeito protetor de dano a macromoléculas protéicas.

Tanto a rutina quanto o extrato bruto e fração hidroalcoólica de *Ouratea parviflora*, apresentaram importante atividade na proteção tecidual no ensaio da GSH, diferentemente da GST, já comentada.

Ao avaliar-se as condições hepáticas dos camundongos, observou-se que, com relação a ALT(TGP), tanto a rutina quanto o extrato bruto e fração hidroalcoólica de *Ouratea parviflora* protegeram de modo efetivamente significativo ($p < 0,001$) da ação do CCL₄, assegurando dessa forma, a viabilidade da realização dos ensaios nos quais utilizou-se o fígado dos animais para análise da suposta ação antioxidante pesquisada neste trabalho.

Ao avaliar-se o dano ao DNA dos camundongos, os resultados indicam que, tanto a rutina quanto o extrato bruto e fração hidroalcoólica de *Ouratea parviflora*, protegeram de modo altamente significativo da ação do CCL₄, sendo que a fração hidroalcoólica de *Ouratea parviflora* revelou ser mais efetiva, inclusive, que a própria rutina.

No que tange à atividade antiinflamatória dos produtos pesquisados concluiu-se que a estratégia experimental adotada neste trabalho não foi a mais adequada, ou que, haveria a necessidade da realização de outros ensaios mais enfáticos, visto que o ensaio do edema de pata avalia apenas o efeito antiedematogênico das referidas plantas medicinais, sem considerar tanto as células quanto as enzimas que atuam no processo inflamatório. Para este fim, o ensaio mais adequado seria o da pleurisia induzida pela carragenina em detrimento do edema de pata induzido pela mesma.

Entretanto, o resultado obtido no ensaio realizado neste estudo não invalida o uso popular, o qual associa as referidas plantas medicinais às suas propriedades antiinflamatórias.

8. PERSPECTIVAS

Estudos adicionais serão necessários para melhor elucidar, tanto o mecanismo de ação antioxidante quanto antiinflamatória das referidas plantas medicinais, os quais não foram realizados pela indisponibilidade de tempo.

Com relação à triagem *in vitro* do potencial antioxidante de *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifolia* e *Marlierea obscura*, outros ensaios serão necessários para corroborar os resultados deste trabalho. Dentre tais ensaios pode-se citar : avaliação das enzimas : SOD, GPX, GR, glicose-6-P-desidrogenase, além dos conteúdos da glutathiona total e oxidada.

Avaliar o possível dano ao DNA dos hepatócitos pelo fato de o fígado ser responsável pela detoxificação de substâncias tóxicas.

Empregar o ensaio micronúcleo objetivando consolidar se o dano ao DNA, observado no ensaio cometa, pode ou não ser revertido pelo sistema de reparo ao DNA.

Testar em cultura de células *in vitro* as várias concentrações dos extratos e frações das referidas plantas medicinais e avaliar a concentração efetiva e concentração tóxica das mesmas.

Ademais, com relação à potencial atividade antiinflamatória das referidas plantas medicinais, consagradas pelo uso popular, far-se-á necessária a realização do ensaio da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos, sendo este mais conclusivo na avaliação proposta neste trabalho no sentido de validar o uso popular de *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifolia* e *Marlierea obscura*.

8. BIBLIOGRAFIA

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

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

AHERNE, S.A. E 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.

ALI et al., Mechanisms of inflammation and leucocyte activation. **Med. Clin. North. Am.**, **81**: 1-28, 1997.

AMARAL, A.C.F.; KUSTER, R.M.; BESSA, W.S.; BARNES, R.A.; KAPLAN, M.A.C.; WESSJOHANN, L.A. Flavonoids and other phenolics from leaves of two *Marlierea* species (Myrtaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**. V.29, p.653-654, 2001.

BACH, D.; SCHMITT, M.; EBELING, L. Phytopharmaceutical and synthetic agents in the treatment of benign prostatic hyperplasia (BPH). **Phytomedicine**, v. 3, n. 4, p. 309-313, 1996.

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

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

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

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

BLOCK, L. C., et al. Chemical and pharmacological examination of antinociceptive constituents of *Wedelia paludosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, n. 1, p. 85-89, 1998.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. **Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species**. In: CLERCH, L; MASSARO, D. Oxygen, Gene Expression, and Cellular Function. Marcel Decker: New York, v. 105, p 1-25, 1997.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CECHINEL FILHO, V.; BRESOLIN, T.M.B. **Ciências farmacêuticas : contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí, UNIVALI. 239p. 2003.

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

CHEN, J.H; HO, C.T. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, v.45, p.2374-2378, 1997.

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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 44, p. 854-858, 1996.

CIOFFI, G.; D'AURIA, M.; BRACA, A.; MENDEZ, J.; CASTILLO, ^a; MORELLI, I.; DE SIMONE, F.; DE TOMMASI, N. Antioxidant and free-radical scavenging activity of constituents of the leaves of *Tachigalia paniculata*. **J. Nat. Prod.** V.65, p. 1526-1529, 2002.

CIRINO, C.; FIORUCCI, S.; SESSA, W.C. Endotelial nitric oxide synthase : the cinderella of inflammation? **Trends in Pharmacol. Sci.**, **24** : 91-95, 2003.

COS, P.; CALOMME, M.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J.; VANDEN BERGUE. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as antioxidant and pro-oxidant compounds. In: RAHMAN. **Studies in Natural Products Chemistry**. Pakistan: Elsevier, 2000. p. 307-341.

CONE, J.B. Inflammation. **Am. J. Surgery.**, **182** : 558-562, 2001.

CORRÊA, L. Classificação das inflamações. Disponível em <http://www.usp.br/fo/lido/patogeral/patoarteinfl9.htm> Acesso em 01 de janeiro de 2004.

COS, P.; YING, L.; CALOMME, M.; HU, J. P.; CIMANGA, K.; POEL, B. V.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J.; VANDEN BERGUE, D. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xantine oxidase and superoxide scavengers. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 71-76, 1998.

CRANSHAW, J.H.; GRIFFITHS, M.J.D. inflammatory process in the acute respiratory distress syndrome. **Curr. Anesthesia Crit Care.**, **14** : 66-73, 2003.

CRISTONI, A.; PIERRO, F.; BOMBARDELLI, E. Botanical derivatives for the prostate. **Fitoterapia**, v. 71, p. 21-28, 2000.

CUZZOCREA, S.; ZINGARELLI, B.; HAKE, P.; SALZMAN, A.L.; SZABO, C. Antiinflammatory effects of mercaptoethylguanidine a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger in carrageenan-induced models of inflammation. **Free Radicals Biol Med.**, 24: 450-459, 1998.

CUZZOCREA et al., Role of IL-6 in the pleurisy and lung injury caused by carrageenan. **J. Immunol.**, **163** : 5094-5104, 1999.

CUZZOCREA et al., Inducible nitric oxide synthase-knockout mice exhibit resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. **Am. J. respir. Crit. Care. Med.**, **162** : 1859-1866, 2000

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

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

DALMARCO, E.M.; FRODE, T.S.; MEDEIROS, Y.S. Effects of methotrexate upon inflammatory parameters induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Mediators Inflamm.**, **162** : 1859-1866, 2000.

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

DAVIES, M.G.; HAGEN, P.O. Systemic inflammatory response syndrome. **Br. Surg.**, v.27, p.920-935, 1997.

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

DUTHIE, G.G.; WAHLE, K.W.J.; JAMES, W.P.T. Oxidants, antioxidants and cardiovascular diseases. **Nutrition Research Review**, v.2, p.51-62, 1989.

DI GIULIO, R. T.; BENSON, W. H.; SANDERS, B. M.; VAN VELD, P. A. Biochemical Mechanisms: Metabolism, Adaptation, and Toxicity. In: **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. In: **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47-95, 2002.

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

FACINO, R.M.; CARINI, G.; ALDINI, G. **Drugs** **46**: 15-21, 1993.

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

FELICIO, J.D., GONÇALEZ, E., BRAGGIO, M.M., CONSTANTINO, L., ALBASINI, A., LINS, A. P. **PLANTA MEDICA** **61**, 11. 1995.

FELICIO, J.D.; ROSSI, M.H.; PAK, H.R.; GONÇALEZ, E.; BRAGGIO, M.M.; DAVID, J.M.; CORDEIRO, I. Biflavonoids from *Ouratea multiflora*. **Fitoterapia**, v.72, p.453-455, 2001.

FELICIO, J.D.; ROSSI, M.H.; BRAGGIO, M.M.; GONÇALEZ, E.; PAK, H.R.; CORDEIRO, I.; FELICIO, R.C. Chemical constituents from *Ouratea parviflora*. **Biochemical Systematics and Ecology**. V.32, p.79-81, 2004.

FRANGOIANNIS, N.G.; SMITH, C.W.; ENTMAN, M.L. The inflammatory response in myocardial infarction. **Cardiovasc. Research**, **53**:31-47, 2002.

FOTI, M. C.; DAQUINO, C. AND 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.

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

GEREMIAS, D.S. **Avaliação da atividade antiinflamatória do SSR180575, um ligante do receptor benzodiazepínico periférico, no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos**. Dissertação de Mestrado em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

HAANEN, C. & VERMES, I. **Mediators of inflammation**, **4**: 5-15, 1995.

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

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

HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. In: Encyclopedia of Life Sciences. **Nature Publishing Group**, 2001. p. 1-7.

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

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

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

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

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

HERSH, D.; WEISS, J.; ZYCHLINSKY, A. How bacteria initiate inflammation : aspects of the emerging story. **Curr. Opin. Microbiol.**, 1: 43-48, 1998.

HEYWOOD, V.H. **Flowering plants of the world.** Oxford University Press, London, pp.84.1978.

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

ISMAILI, H.; MILELLA, L.; FKIH-TETOUANI, S.; ILIDRISSI, A.; CAMPORESE, A.; SOSA, S.; ALTINIER, G.; DELLA LOGIA, R.; AQUINO, R. In vivo topical anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of two extracts of *Thymus satureoides* leaves. **Journal of Ethnopharmacology.** V.91, p. 31-36, 2004.

JALVEZ, J.; ZARZUELO, A.; CRESPO, M.E.; LORENTE, M.D.; OCETE, M.^a; JIMENEZ, J. **Planta Medica**, v.59, p.333, 1993.

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.

JOUBERT, E.; WINTERTON, P.; BRITZ, T.J.; FERREIRA, D. Superoxide anion and DPPH radical scavenging capacity of rooibos (*Aspalathus linearis*) aqueous extracts, crude phenolic fractions, tannin and flavonoids. **Food Research International.** V.37, p.133-138, 2004.

JUNNILA, M.; RAHKO, T.; SUKURA, A., 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.

KAKUTA, H., TAKUHIKO, S., HASHIDORO, Y., MIZUTANI, J. *Ent-kaurenic acid and related compounds from glandular trichome exudate and leaf extracts of *Polymnia sonchifolia**. **Biomet. Biotech. Biochem.** **56**, 1562-1564.1992.

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

LANDRUM, L.R.; KAWASAKI, M.L. **Brittonia**, v.49, p. 508, 1997.

LATEY, F. Aspects of inflammation. **Journal of bodywork and movement therapies**, **2**: 124-131, 2001.

LEE, S.E.; HWANG, H.J.; HA, J.S.; JEONG, H.S.; KIM, J.H. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. **Life Sciences** v. 73, p.167-169, 2003.

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

LEVINE, R. L. *et al.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 464-478, 1990.

LEY, K. Integratiom of inflammatory signals by rooling neutrophils. **Immunol. Rev.**, **186** :8-18, 2002.

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

MADDOX, L.I.; SCHWARTZ, D.A. The patophysiology of asthma. **Annual Review of Medicine**, **53** : 477-498, 2002.

MATOS, F.J.A. Introdução a fitoquímica experimental, 1988 in YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais : sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó : ARGOS. 46-75p. 2001.

MCKAY, C.R. IMHOF, B.A. Cell adhesion in immune system. **Immunol. Today.**, **14**: 99-112, 1993.

MBING, J.N.; PEGNYEMB, D.E.; TIH, R.G.; SONDEGAM, B.L.; BLOND, A.; BODO, B. Two biflavonoids from *Ouratea flava* stem bark. **Phytochemistry**, **63**, 427-431, 2003.

MBING, J.N.; BASSOMO, M.Y.; PEGNYEMB, D.E.; TIH, R.G.; SONDEMGAM, B.L.; BLOND, A.; BODO, B. constituents of *Ouratea flava*. **Biochemical Systematics and Ecology**, n.31, p.215-217, 2003.

MENSOR L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; dos SANTOS, T. C.; COUBE, C. S. e LEITÃO S. G. Screenig of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant

Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. **Phytotherapy Research**, v. 15, 127-130, 2001.

MIDDLETON, E; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, v52, p.673-751, 2000.

MIESEL, R.; SANOCKA, M.; KURTPISZ, D.; KROGER, H.; **Inflammation 19**: 347-361, 1995.

MILES, A.M. & GRISHAM, M.B. **Methods enzymol.**, **234** : 555-572, 1994.

MONTORO, P.; BRACA, A.; PIZZA, C.; DE TOMMASI, N. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. **Food Chemistry**. Article in press, 2004.

MOREIRA, I.C.; SOBRINHO, D.C.; de CARVALHO, M.G.; BRAZ-FILHO, R. **Phytochemistry**, v.35, p.1567, 1994.

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

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

NATH, R. G.; LI, D. and 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. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, p. 65-85, 2000.

NORDBERG, J. e ARNER E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian Thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001

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

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

OLZEWER, E. Radicais livres em Medicina / Efrain Olszewer. São Paulo: Fundo Editorial Byk, 2. ed., 204 p. 1995.

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

PAKULSKI, G.; BUDZIANOWSKI, J. **Phytochemistry**, n. 41, p. 775, 1996.

PATTERSON, C.E.; LUM, H. Update on pulmonary edema : the role and regulation endothelial barrier function. **Endothelium**,8: 75-115, 2001.

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

PEREZ-GARCIA, F.; MARIN, E. Anti-inflammatory action of *Pluchea sagittalis* involvement of an antioxidant mechanism. **Life Sciences**, v.59, n.24, p.2033-2040, 1996.

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

POLLA, B.S.; STUBBE, H.; KATENGWA, S.; MARIDONNEAU-PARINI,I.; JACQUIER-SARLIN. **Inflammation** 19: 363-378, 1995.

PRESTON, T. J., ABADI, A., WILSON, L. et. al. Mitochondrial contributions to cancer cell physiology: potential for drug development. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 49, p. 45-61. 2001.

RECKNAGEL RO, GLENDE EA, DOLAK JA, Waller RE. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. **Pharmacol Ther**. v. 43, p. 139–154. 1989.

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

RODRIGUES, M.R.; RODRIGUEZ, D.; RUSSO, M.; CAMPA, A. macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity. **Biochem. Biophys Res. Commun.**, 292: 869-873, 2002.

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

SALEH, T.S.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. Antiinflammatory effects of theophilline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. **Br. J. pharmacol.**, 118: 811-819, 1996.

SCANDALIOS, J. G. Introduction. **Free Radicals in Biology and Medicine**. v. 23, p. 471- 472, 1997.

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

SEDGWICK, A.D.; WILLOUGHBY, D.A. Animal models for testing drugs on inflammatory reactions. In: **TEXTBOOK OF IMMUNOPHARMACOLOGY**, New York, p.253-261, 1989.

SESTILI, P.; DIAMANTINI, G.; BEDINI, A. *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. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 32 (1), p. 67-103, 1992.

SHEWEITA, S.A.; ABD EL-GABAR, M. AND 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.

SIEGELMAN, M.H.; STANESCU, L.E.; ESTESS, P. The CD-44 initiates pathway of T-cell extravasation uses VLA-4 but not LFA-1 for firm adhesion. **J. Clin. Invest.**, **105**: 683-691, 2000.

SIES, H. **Strategies of antioxidant defense**. **Eur. J. Biochem.** v. 215, p. 213-219, 1993.

SIES, H. **Antioxidants in disease mechanisms and therapy**. Academic Press. **Advances in Pharmacology** v.38, pp.707, 1997.

SILVERIO, F. D., *et al.* Effects of long-term treatment with *Serenoa repens* (Permixon) on the concentrations and regional distribution of androgens and epidermal factor in benign prostatic hyperplasia. **The prostate**, v. 37, p. 77-83, 1998.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento** – Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. 5^a ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, p.291-320, 2003.

SIQUEIRA, J.S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. 1Ed. Rio de Janeiro, MedSi, 2000.

SOTELO-FÉLIX, J.I.; MARTINEZ-FONG, D.; MURIEL, P.; SANTILLÁN, R.L.; CASTILLO, D.; YAHUACA, P. Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 81, p. 145-154, 2002.

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

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

SUJA, K.P.; JAYALEKSHMY, A.; ARUMUGHAN, C. Free radical scavenging behavior of antioxidant compounds of Sesame (*Sesamum indicum* L.) in DPPH system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V.52, p. 912-915, 2004.

TAKASUGI, M.; MASUDA, T. Three hydroxyacetophenone-related phytoalexins from *Polymnia sonchifolia*. **Phytochemistry**, v.43, n.5, p.1019-1021, 1996.

TANG, S.Y.; WHITEMAN, M.; PENG, Z.F.; JENNER, A.; YONG, E.L.; HALLIWELL, B. Characterization of antioxidant and antiglycation properties and isolation of active ingredients from traditional Chinese medicines. **Free radical biology and medicine**. Article in press. 2004.03.017

TANG, S.Y.; WHITEMAN, M.; PENG, Z.F.; JENNER, A.; YONG, E.L.; HALLIWELL, B. Characterization of antioxidant and antiglycation properties and isolation of active ingredients from traditional Chinese medicines. **Free Radical Biology & Medicine**. Article in press. 2004.03.017

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

TORRES, S.R.; FRODE, T.S.; NARDI, G.M.; VITA, N.; REEB, R.; FERRARA, P.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M.; FARGES, R.C. Antiinflammatory effects of peripheral benzodiazepine receptor ligands in two mouse models of inflammation. **Ero J Pharmacol.**, **408** : 199-211, 2000.

TROUILLAS, P. et al., Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. **Food Chemistry**, v.80, p.399-407, 2003.

VASCONCELOS, A.C. Patologia geral em hipertexto. Disponível em <http://www.icb.ufmg.br/pat/pathip.htm> Acesso em 24 de dezembro de 2004.

VELANDIA, J.M., de CARVALHO, M.G.; BRAZ-FILHO, R. **Química Nova**, v.21, p.397, 1998.

VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L. Quantitative studies of the pathway to açude carrageenan inflammation. **Fed. Proc.**, **41** : 2588-2595, 1976.

VISIOLU, F.; BELLOMO, G.; GALLI, C. Free radical scavenging properties of olive oil polyphenols. **Biochemical and biophysical Research Communications**, v.247, p.60-64, 1998.

VISIOLU, F.; GALLI, C. Natural antioxidants and prevention of coronary heart disease : the potential role of olive oil and its minor constituents. **NMCD**, v.5, p.306-314.

VIVOT, E.; MUNOZ, J.D.; CRUANES, M.C.; CRUANES, M.J.; TAPIA, A.; HIRSCHMANN, G.S.; MARTINEZ, E.; DI Sapio, O.; GATTUSO, M.; ZACCHINO, S. Inhibitory activity of xanthine-oxidase and superoxide scavenger properties of *Inga verna* subsp. *affinis*. Its morphological and micrographic characteristics. **Journal of Ethnopharmacology**. 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. **Hepatology Research**. v. 10, p. 237–247, 1998.

WANG, L.-F. AND ZHANG, H.-Y. A Theoretical Investigation on DPPH Radical-Scavenging Mechanism of Edaravone. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 13, p. 3789–3792, 2003.

WHISLER, R.L.; GOYETTE, M.A.; GRANTS, I.V.; NEWHOUSE, Y.G. **Arch. Biochem. Biophys.**, **319** : 23-35, 1995.

WINYARD, P.G.; ZHANG, Z.; CHIDWICK, K.; BLAKE, D.R.; CARREL, R.W.; MURPHY, G. Proteolytic inactivation of human α 1 antitrypsin by human stromelysin. **FEBS Lett.** 279, p.91-94, 1991.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais : sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó : ARGOS. 523p. 2001.

ZARDINI, E. Ethnobotanical notes on “Yacon” *Polymnia sonchifolia* (Asteraceae). **Economy Botany** **45**, 72-85.1991.