

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

Estudo bioquímico do efeito de alguns flavonóides de
***Pterogyne nitens* Tulasne (Fabaceae) em processos**
oxidativos: sistema modelo “químicos”,
“enzimáticos” e “celulares”

JOSÉ CARLOS REBUGLIO VELLOSA
TESE DE DOUTORADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

ORIENTADORA: Profa. Dra. Olga Maria Mascarenhas de Faria Oliveira

ARARAQUARA
Estado de São Paulo
2008
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

Estudo bioquímico do efeito de alguns flavonóides de
***Pterogyne nitens* Tulasne (Fabaceae) em processos**
oxidativos: sistema modelo “químicos”,
“enzimáticos” e “celulares”

JOSÉ CARLOS REBUGLIO VELLOSA

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM ANÁLISES CLÍNICAS DA FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE
ARARAQUARA, UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”, COMO PARTE DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
DOUTOR EM ANÁLISES CLÍNICAS, ÁREA DE ANÁLISES CLÍNICAS – SUB ÁREA
BIOQUÍMICA

ORIENTADORA: Profa. Dra. Olga Maria Mascarenhas de Faria Oliveira

ARARAQUARA
Estado de São Paulo
2008

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

V441e Velloso, José Carlos Rebuglio
Estudo bioquímico do efeito de alguns flavonóides de *Pterogyne nitens* Tulasne (Fabaceae) em processos oxidativos: sistemas modelo “químicos”, “enzimáticos” e “celulares”. / José Carlos Rebuglio Velloso. – Araraquara, 2008.
112 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas
Orientador: Olga Maria Mascarenhas de Faria Oliveira

1.Mieloperoxidase. 2.Pteroginoside. 3.Estresse oxidativo.
4.Antioxidante. 5.*P. nitens*. 6.Bioquímica. I.Oliveira, Olga Maria Mascarenhas de Faria, orient.. II.Título.

CAPES: 40300005

TERMO DE APROVAÇÃO

NOME DO AUTOR: José Carlos Rebuglio Velloso

TÍTULO DO TRABALHO: Estudo bioquímico do efeito de alguns flavonóides de *Pterogyne nitens* Tulasne (Fabaceae) em processos oxidativos: sistemas modelo “químicos”, “enzimáticos” e “celulares”.

TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM ANÁLISES CLÍNICAS

PRESIDENTE E ORIENTADOR: Profa. Dra. Olga Maria Mascarenhas de Faria Oliveira
INSTITUIÇÃO: Instituto de Química – UNESP/Campus Araraquara - SP

SEGUNDO EXAMINADOR: Profa. Dra. Mariza Pires de Melo
INSTITUIÇÃO: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - USP/Campus Pirassununga-SP

TERCEIRO EXAMINADOR: Profa. Dra. Sandra Aparecida Assis
INSTITUIÇÃO: Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS/Campus Feira de Santana-BA

QUARTO EXAMINADOR: Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil
INSTITUIÇÃO: Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná - UNICENTRO/Campus Guarapuava-PR

QUINTO EXAMINADOR: Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti
INSTITUIÇÃO: Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/Campus Araraquara-SP

Araraquara, 29 de setembro de 2008.

“Hoje levantei pensando no que tenho a fazer antes que o relógio marque meia noite. É minha função escolher que tipo de dia terei hoje... Posso reclamar por ter que ir trabalhar ou agradecer por ter trabalho. Posso sentir tédio com o trabalho doméstico ou agradecer a Deus por ter um teto pra morar. Posso lamentar decepções com amigos ou me entusiasmar com a possibilidade de fazer novas amizades. Se as coisas não saírem como planejei, posso ficar feliz por ter hoje para recomeçar. O dia está na minha frente, esperando para ser o que eu quiser...”

(Charles Chaplin)

“Qualquer coisa que você possa fazer, ou sonha que possa fazer, comece a fazê-la. A ousadia tem em si genialidade, força e magia.”

(Goethe, 1749 – 1832)

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Enzimologia do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química do Instituto de Química – UNESP/Campus Araraquara e no Laboratório de Bioquímica Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/Campus Araraquara.

Fomento: Bolsa CAPES - Doutorado

DEDICATÓRIA

**Dedico esta tese à minha mãe, ao meu pai e à minha avó.
Em especial, dedico esta tese à minha irmã que sempre se lembrou da família.
Sem minha família não alcançaria o que alcancei.**

*“Não tenho um caminho novo.
O que eu tenho de novo é um jeito de caminhar.”
(Thiago de Melo, escritor)*

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por guiar os meus passos e proteger minha família.

À minha mãe, Celina, ao meu pai, José Carlos, e à minha avó, Amália, pelo amor, minha vida e educação.

Ao meu avô, Ernesto e à minha tia Nena, por amarem e olharem pela família.

À minha irmã Elba pelo orgulho, incentivo, amor e preocupação.

Aos meus irmãos - Ernesto, Luis, Ricardo e Celso -, meu cunhado – Paulo -, minhas cunhadas - Priscila, Jacqueline, Idalina e Rosana -, à Leninha e Bruno, pelo apoio, amor e preocupação.

Aos meus tios Raimundo e Cidália, primos Gustavo, Rodolfo, Isabela, Maria Helena pela amizade, amor e apoio.

A toda minha família, em especial ao tio Carlos Alberto, tia Tereza, tio Arlindo, Tia Lídia, Paula, Tereza Cristina, Ana Bárbara, Carla, João, Gilson, Ronaldo e Leandro, pelo carinho e apoio.

Aos grandes amigos Francisco (Netto), Samuel, Thiago, Jorge, José Mário, Fernando Gabriel e David, pela presença constante, amizade incondicional e pelos momentos de alegria.

Aos grandes amigos Omar, Najeh, Rubiana e Michelle pelo apoio e amizade incondicionais, pelas discussões e momentos de descontração e por estarem sempre próximos nos momentos mais alegres e também nos mais difíceis de minha vida.

À Profa. Olga Maria Mascarenhas de Faria Oliveira por me permitir aprender e crescer profissionalmente. Pela amizade, compreensão, preocupação e apoio em todos os momentos.

Ao professor Iguatemy Lourenço Brunetti pelo apoio e suporte oferecidos, pelas cobranças que me fortaleceram e pela amizade.

Aos amigos Ana Paula, Nathalia, Beck, Vânia, Marcelo, Kátia, Neto (Waldemar), Ricardo (Salim), Regiane e Milena pela amizade e apoio.

Às colegas Cleide, Luciana, Lauriane, e Vanessa pela ajuda e pelos momentos de descontração.

Ao Marcos e Márcia pela amizade e ensinamentos.

Às professoras Teresa e Regina pela amizade e ensinamentos.

Aos professores Vanderlan da Silva Bolzani e Luis Octávio Regasini pelo apoio e parceria.

Aos professores e funcionários do Departamento de Análises Clínicas da FCFAR-UNESP pelos anos de aprendizado.

À Laura, Claudia e Sônia pela paciência, auxílio e apoio.

Aos funcionários da Biblioteca da FCFAR pelo auxílio.

Aos professores do Departamento de Análises Clínicas da UEPG pelo apoio e liberação para a finalização deste trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

| | |
|--|------------|
| CAPÍTULO 1 | 10 |
| 1 INTRODUÇÃO | 11 |
| 1.1 Espécies Reativas do Oxigênio | 12 |
| 1.2 Peroxidases | 20 |
| 1.3 Sistemas antioxidantes | 25 |
| 1.4 <i>Pterogyne nitens</i> | 26 |
| 1.5 Flavonóides como agentes terapêuticos | 28 |
| | |
| 2 OBJETIVOS | 33 |
| | |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 35 |
| 3.1 Equipamentos e Reagentes | 36 |
| 3.2 Análise do potencial redutor dos compostos estudados | 37 |
| 3.3 Perfil de ação sobre radicais livres e espécies reativas do oxigênio não radicalares | 37 |
| 3.4 Ação sobre sistemas oxidativos catalisados por peroxidases | 39 |
| 3.5 Citotoxicidade e ação sobre estresse oxidativo em células animais | 40 |
| 3.6 Análise Estatística | 42 |
| | |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 43 |
| 4.1 Interações diretas com as espécies reativas | 44 |
| 4.2 Interações com mieloperoxidase | 53 |
| 4.3 Interações com células | 68 |
| 4.4 Resumo dos resultados | 80 |
| | |
| 5 CONCLUSÃO | 83 |
| | |
| 6 REFERÊNCIAS | 86 |
| | |
| CAPÍTULO 2 | 94 |
| | |
| ANEXOS | 110 |

RESUMO

A pesquisa de produtos naturais é uma fonte importante de informações para o desenvolvimento de novos fármacos que tenham ação em diferentes processos oxidativos teciduais. Estudou-se o perfil bioquímico para o mecanismo de ação antioxidante dos flavonóides kaempferol, afzelina, lespedina, pteroginoside, quercetina e isoquercetrina isolados de *Pterogyne nitens*. Buscou-se avaliar desde os níveis mais simples de atividade até os níveis mais complexos de interação para as atividades observadas. Nenhuma das amostras foi eficiente como *scavenger* de H₂O₂, o que se mostrou interessante na comprovação dos resultados de inibição de peroxidases observados. Mostrou-se que a variação nas estruturas dos flavonóides pode levar a diferentes padrões de atividade de acordo com o sistema avaliado, revelando assim especificidade sobre a interação estudada. A quercetina mostrou-se, em geral, o agente mais eficiente, com alteração entre as posições dos demais flavonóides. Observou-se ainda, que os flavonóides apresentam potencial lesivo contra eritrócitos e neutrófilos quando em presença de radicais livres e outras espécies reativas. Na pesquisa da ação de flavonóides e outros produtos naturais em processos oxidativos modelo deve-se buscar possíveis efeitos protetores e agressores aos sistemas biológicos traçando-se um perfil bioquímico de ação que elucide os mecanismos pelos quais tais substâncias agem.

Palavras-chave: mieloperoxidase, pteroginoside, estresse oxidativo, antioxidantes, *P. nitens*

ABSTRACT

The research on natural products field is an important source of information to the development of new medicines which act over redox oxidative processes. It was studied the biochemical profile of the antioxidant action from kaempferol, afzelin, lespedin, pterogynoside, quercetin and isoquercitrin isolated from *Pterogyne nitens*. It was intended to evaluate different interaction levels to the studied systems. None of the samples were able to act against hydrogen peroxide, what strengthens the observations on peroxidase inhibition. It was showed that chemical structural variations can lead to different activities patterns according to the studied system, revealing that exist specificity by the evaluated interaction. The flavonoid quercetin usually were the most efficient agent and the others agents had alternated position on different systems. It was observed too that the studied flavonoids were potentially lesive to the erythrocytes and neutrophils when they were put together free radicals and others reactive species. In the flavonoids and others natural products researches on model oxidative processes it must be made sought possible protective and lesive effects to biological systems by drawing the biochemical action profile of these substances.

Key words: myeloperoxidase, pterogynoside, oxidative stress, antioxidants, *P. nitens*

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

1.1 Espécies Reativas do Oxigênio

Nas últimas décadas, inúmeras pesquisas foram realizadas para esclarecer o papel dos radicais livres em processos fisiológicos, como o envelhecimento, e patológicos, tais como fibrose cística, doença respiratória aguda, asma, enfisema, câncer, aterosclerose, inflamação, injúria por reperfusão, artrite reumatóide, e danos pelo tabagismo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; VENGLARIK et al., 2003; TORRES et al., 2004).

Os organismos aeróbicos derivam o ATP (trifosfato de adenosina) da redução completa do O₂ por quatro elétrons, através do transporte mitocondrial de elétrons. Aproximadamente 98% de todo o oxigênio consumido pelas células entram nas mitocôndrias, onde são reduzidos pela citocromo c oxidase (RODRIGUES et al., 2003). Entretanto, o oxigênio pode receber menos de quatro elétrons e formar espécies reativas de oxigênio (ERO), ou radicais livres e desta forma, há produção de radicais livres pelos organismos como parte dos processos fisiológicos (RODRIGUES et al., 2003).

O envelhecimento é um evento que pode estar relacionado com as ERO (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A teoria dos radicais do oxigênio, desenvolvida por Harman em 1956, propõe que o envelhecimento poderia ser secundário ao estresse oxidativo, o qual levaria a reação de oxidação lipídica, protéica, e com o DNA, que desencadeariam alterações lentas e progressivas dos tecidos e do código genético (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Doenças freqüentes na velhice e relacionadas com o estresse oxidativo, são a Doença de Parkinson, o Acidente Vascular Cerebral, a Doença de Alzheimer, a esclerose múltipla e catarata (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Em determinadas condições, pode ocorrer elevação na produção de ERO, levando ao estresse oxidativo, durante o qual as espécies reativas podem produzir danos, tais como a lipoperoxidação das membranas celulares. Tem sido observada lesão biológica associada a sistemas geradores de superóxido, seja enzimático, fagocítico ou químico

(HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). Uma importante fonte de espécies reativas do oxigênio no organismo humano são os neutrófilos polimorfonucleares neutrófilos.

A ativação de neutrófilos por estímulos endógenos (frações do complemento, citocinas, etc.), ou por microrganismos, é seguida da ativação de uma enzima transmembrana que promove aumento do consumo do oxigênio para a produção de ânion superóxido, o precursor para uma série de espécies reativas do oxigênio (MATHY-HARTERT et al., 1997). Fagócitos, como neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, quando estimulados, elevam sensivelmente sua taxa de consumo de oxigênio no *oxidative burst*.

A geração de espécies químicas com alto potencial de reatividade (espécies reativas do oxigênio – ERO; Figura 1) como resultado do *oxidative burst* em neutrófilos, é essencial para a defesa contra microrganismos na fagocitose (BRIHEIM et al., 1984).

Como podemos observar na figura 1, duas enzimas-chave estão envolvidas na explosão oxidativa dos fagócitos, produzindo derivados do oxigênio: **i)** NADPH oxidase, um complexo enzimático de membrana, que catalisa a redução monovalente do oxigênio molecular a ânion superóxido; **ii)** a mieloperoxidase (MPO), que utiliza o peróxido de hidrogênio para oxidar o íon cloreto a HOCl (CAPELLÈIRE-BLANDIN, 1998).

Os leucócitos fagócitos são células especializadas que contém grandes quantidades de componentes da NADPH oxidase e produzem ânion superóxido em abundância. Outros tipos celulares, tais como fibroblastos, células endoteliais e células do músculo liso, também são capazes de produzirem ânion superóxido, mas elas o fazem em baixas quantidades (FRIDOVICH, 2001).

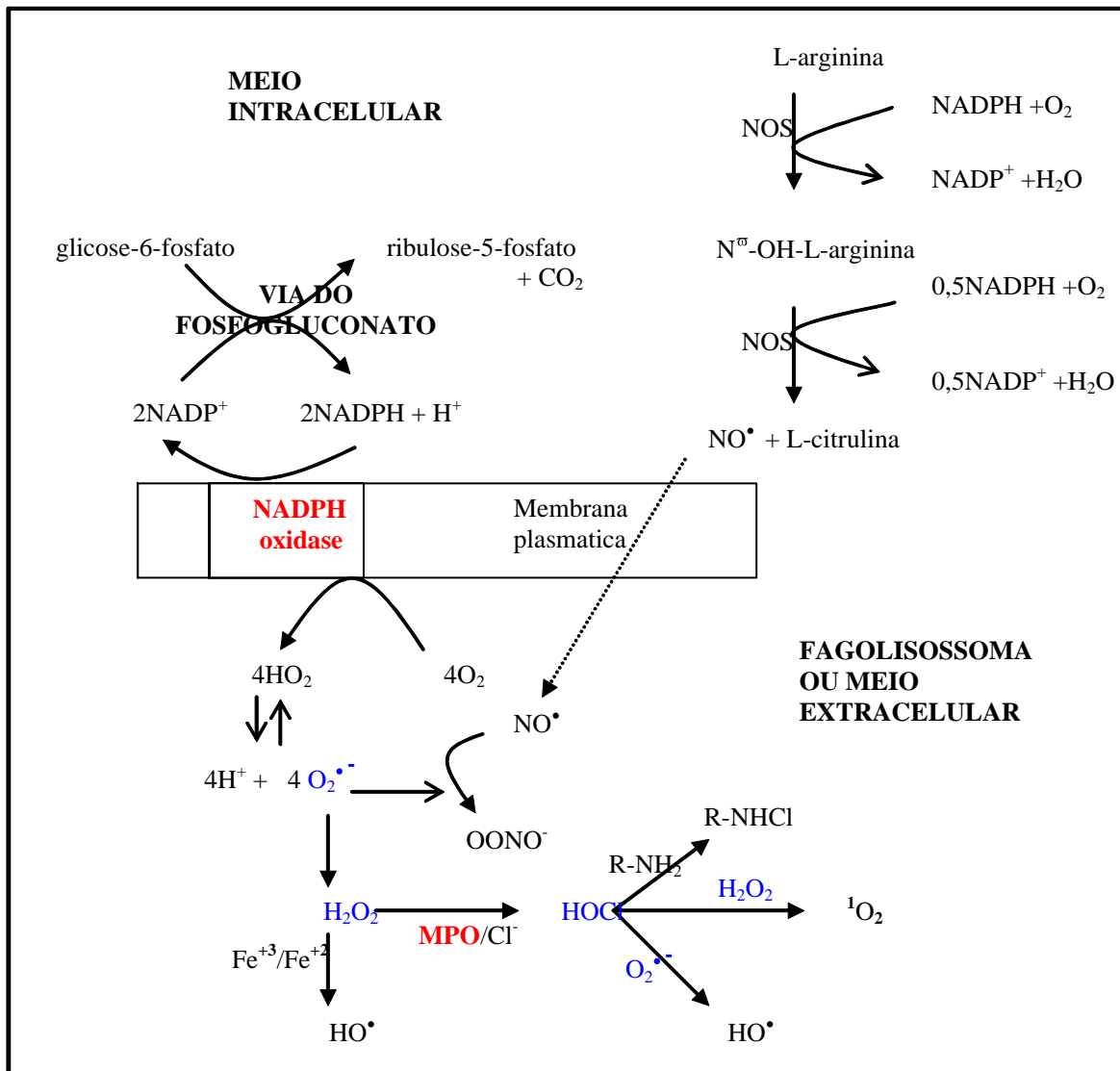


Figura 1. Possibilidades de geração de ERO no *oxidative burst* de neutrófilos (KHALIL, 2002; MACMICKING et al., 1997)

Durante o *oxidative burst* há aumento do consumo de oxigênio e da produção de diferentes ERO, tais como:

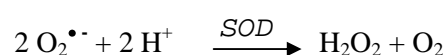
Ânion Superóxido

Pode ser escrito O₂^{•-} ou O₂⁻ e é formado após a primeira redução monoelétrica do oxigênio; ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990;

1986). Tem sido observada lesão biológica associada a sistemas geradores de superóxido, seja enzimático, fagocítico ou químico (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

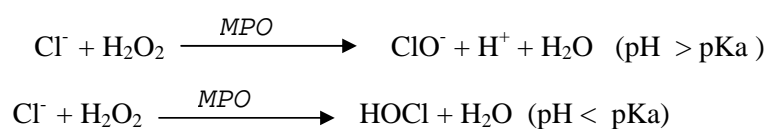
A maior parte do oxigênio consumido é convertida em peróxido de hidrogênio por dismutação do radical ânion superóxido, seja espontânea ou pela ação da superóxido dismutase (SOD).



Apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, o H₂O₂ é um metabólito extremamente deletério, porque participa da reação que produz o radical hidroxil (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Além disso, o H₂O₂ é altamente tóxico para as células, pois tem vida longa e é capaz de atravessar camadas lipídicas, podendo reagir com membranas biológicas ou com proteínas ligadas ao íon Fe⁺⁺ (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Ácido hipocloroso (HOCl)

O HOCl é formado pela oxidação de íons cloreto, catalisada pela mieloperoxidase em presença de peróxido de hidrogênio (LAPENNA; CUCCURULLO, 1996).



O HOCl pode ser considerado como o mais abundante oxidante gerado por leucócitos do sangue (LAPENNA; CUCCURULLO, 1996). O ácido hipocloroso é um oxidante extremamente forte e além de atacar biomoléculas de importância fisiológica, tais como tióis, tioéteres, aminas, aminoácidos, nucleotídeos e ascorbato (WEISS, 1989;

HALLIWELL; GUTTERIDGE,1989; EATON,1993), é capaz de gerar outras ERO, tais como, oxigênio singlete e radical hidroxil via sua reação com peróxido de hidrogênio e ânion superóxido, respectivamente (WEISS, 1989; LAPENNA; CUCCURULLO, 1996).

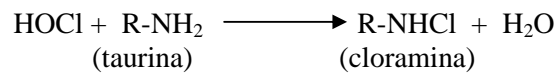
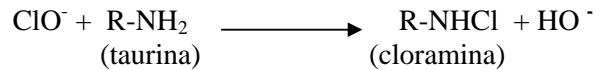
O HOCl apresenta ações: i) protetora ao nosso organismo, à medida que participa do processo de destruição de microrganismos, mas, ao mesmo tempo, ii) agressora aos tecidos, pois nem células de mamíferos nem de bactérias podem detoxicar o HOCl por via catalítica, visto que estão ausentes defesas enzimáticas contra oxidantes clorados (LAPENNA; CUCCURULLO, 1996).

A mieloperoxidase é uma proteína catiônica em pH fisiológico e, portanto, capaz de se ligar a estruturas biológicas aniônicas, tais como fosfolípídeos de membranas celulares, além de catalisar a geração de HOCl e assim favorecer injúria celular (WEISS, 1989). A mieloperoxidase foi encontrada em lesões de aterosclerose humana (DAUGHERTY et al., 1994), sugerindo função de oxidantes clorados nos processos aterogênicos (LAPENNA; CUCCURULLO, 1996). Neste contexto, o HOCl pode modificar lipoproteínas de baixa densidade para uma forma aterogênica, aparentemente como resultado da oxidação de resíduos de lisina da apoproteína B-100 (HAZELL; STOCKER, 1993; HAZEL et al., 1994).

O desenvolvimento de substâncias farmacologicamente capazes de antagonizar o HOCl, como sugerem alguns autores para drogas antiinflamatórias (WASIL et al., 1987), rifampicina e tetraciclina (WASIL et al., 1988) e captopril (ARUOMA et al., 1991), podem ajudar no combate à injúria tecidual (LAPENNA; CUCCURULLO, 1996). O seqüestro farmacológico do HOCl será terapeuticamente significativo se, na concentração da droga *in vivo*, a reação com o ácido hipocloroso for rápida o bastante para proteger as moléculas-alvo biologicamente importantes do ataque pelo HOCl (HALLIWELL,1995; LAPENNA; CUCCURULLO, 1996).

Cloraminas

O HOCl forma grupos de oxidantes conhecidos como cloraminas, através da sua reação com aminas primárias ou secundárias, prontamente disponíveis em sistemas biológicos (THOMAS et al.,1986; WEISS, 1989).

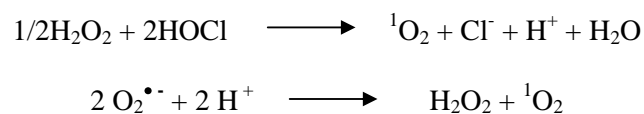


Tais cloraminas são oxidantes de vida longa e sua reatividade depende de sua lipossolubilidade. A monocloramina (NH_2Cl), formada pela reação entre HOCl e amônia, é muito lipossolúvel e mais reativa do que o próprio HOCl (BABIOR, 2000). O β -aminoácido taurina, de maior abundância em neutrófilos (ZGLICZYNSKI, 1971) e principal alvo nestas células, reage com o HOCl formando taurina cloramina (TauCl).

As cloraminas, particularmente a monocloramina, estão relacionadas à injúria gástrica observada na presença de *Helicobacter pylori*, que produz elevadas quantidades de amônia e ativa os neutrófilos que produzem ácido hipocloroso (LAPENNA; CUCCURULLO, 1996).

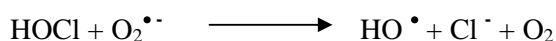
Oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$)

O estado excitado singlete do oxigênio não é um radical, visto não ter os elétrons desemparelhados, mas reage com uma grande variedade de compostos biológicos, como lipídeos de membrana. Pode ser produzido através da reação do H_2O_2 com HOCl ou pela dismutação espontânea do $\text{O}_2^{\bullet -}$ (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990):

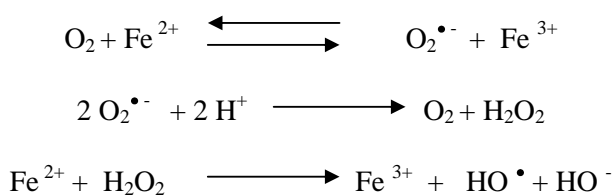


Radical hidroxil (HO•)

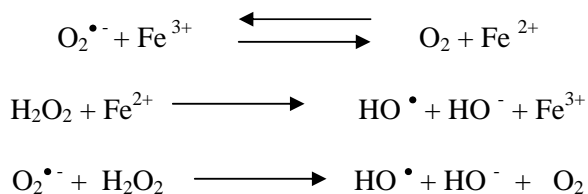
É um dos mais reativos radicais conhecidos. Pode ser gerado a partir da reação do HOCl e O₂^{•-} ou pelas reações de Fenton e Harber-Weiss.



Reação de Fenton (FERREIRA; MATSUBARA, 1997)



Reação de Harber-Weiss (FERREIRA; MATSUBARA, 1997)



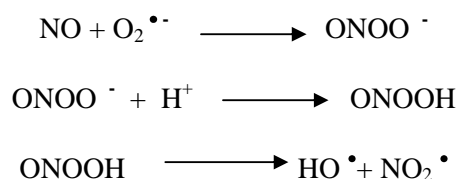
A combinação extremamente rápida do OH• com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirma sua alta reatividade (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Assim, se o radical hidroxil for produzido próximo ao DNA e a este DNA estiver fixado um metal, poderão ocorrer modificações de bases nitrogenadas, levando à inativação ou mutação do DNA (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Além disso, o radical hidroxil pode inativar várias proteínas ao oxidar seus grupos sulfidrílicos formando pontes dissulfeto (FERREIRA; MATSUBARA, 1997) e iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados (lipoperoxidação) das membranas celulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1986).

Óxido Nítrico (NO[•]) e Peróxinitrito (OONO⁻)

Em meio biológico as diferentes espécies formam-se rapidamente a partir do momento que a óxido nítrico sintase (NOS) torna-se cataliticamente ativa (MACMICKING et al., 1997). A NOS é a enzima responsável pela produção endógena de óxido nítrico através da oxidação de uma molécula de L-arginina em óxido nítrico e L-citrulina (esquema 1; MACMICKING et al., 1997). Existem duas formas de NO sintase: i) a constitutiva, com baixa atividade, está presente no endotélio vascular e sistema nervoso central e produz baixas quantidades de óxido nítrico como molécula sinalizadora; ii) a indutiva, que possui alta atividade e é produzida por fagócitos quando estes são estimulados (BABIOR, 2000).

O óxido nítrico, um radical gasoso lipossolúvel e hidrossolúvel, é uma espécie reativa do nitrogênio que, em meio aquoso, reage com o oxigênio para formar outras espécies reativas (MACMICKING et al., 1997).

O peróxinitrito (OONO⁻), produto formado pela reação do O₂^{•-} com o óxido nítrico (NO[•]) é um potente oxidante, com propriedades similares ao radical hidroxil, e reage com íon H⁺ formando ONOOH que após se decompõe em HO[•] e radical dióxido de nitrogênio (NO₂[•]). As etapas descritas encontram-se representadas a seguir:



Radical hidroperoxil (HO₂^{•-})

Representa a forma protonada do radical superóxido; existem evidências de que este seja mais reativo do que o superóxido, por sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

1.2 Peroxidases

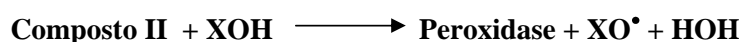
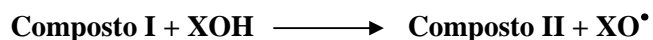
As peroxidases são enzimas que oxidam uma variedade de xenobióticos através do peróxido de hidrogênio (SAUNDERS, 1973). A enzima nativa contém um grupamento heme, geralmente ferriprotoporfirina IX, com quatro nitrogênios pirrólicos ligados ao Fe(III). A quinta posição de coordenação na porção proximal do heme está ocupada por um resíduo de histidina. A sexta posição de coordenação permanece livre na enzima nativa na porção distal do heme (O'BRIEN, 2000).

Peroxidases são encontradas tanto em animais como em vegetais, sugerindo que tais enzimas devam ser uma parte essencial de todos os seres vivos (BRUNETTI; FARIA-OLIVEIRA, 1995). As peroxidases de plantas, como a *horseradish peroxidase*, consistem de cadeias polipeptídicas contendo cerca de 300 resíduos de aminoácidos e o heme ligado não covalentemente. As peroxidases de mamíferos são muito maiores (576-738 aminoácidos) e apresentam o grupamento heme ligado covalentemente (O'BRIEN, 2000).

A peroxidase de raiz forte (HRP) é, provavelmente, a peroxidase mais estudada e pode ser facilmente extraída da planta “rábano silvestre - raiz forte”, da qual provém seu nome. Essa enzima tem uma massa molecular de 42,1 KDa, é uma hemeproteína cujo grupo prostético, a protoporfirina IX, está ligada não-covalentemente à parte protéica da molécula (O'BRIEN, 2000).

O mecanismo pelo qual a HRP age na oxidação de uma variedade de substratos se dá através de uma interação inicial da enzima nativa (pico máximo de absorvância em 403nm) com peróxido de hidrogênio promovendo alteração conformacional na enzima de tal forma a expor o sítio ativo originando o composto I (HRP I), o qual imediatamente interage com o substrato gerando a enzima na forma de composto II – HRP II (pico máximo de absorvância em 420 nm) – capaz de converter o substrato em produto e retornar à forma nativa (KHALIL, 2002).

A oxidação de xenobióticos (XOH) por peroxidases pode ser representada pelo ciclo de reações a seguir:



A família de peroxidases humanas inclui a mieloperoxidase (MPO), peroxidase eosinofílica (EPO), lactoperoxidase (LPO), peroxidase salivar (SPO), peroxidase da tireóide (TPO) e a prostaglandina endoperóxido sintase (PGHS). A histidina distal das peroxidases de mamíferos age como um catalisador do tipo ácido/básico auxiliando a desprotonação do hidroperóxido e a protonação da água após a clivagem da ligação “oxigênio-oxigênio” (O'BRIEN, 2000).

A TPO é responsável por catalisar a iodinação dos resíduos de tirosina da tireoglobulina e também por catalisar a formação da tiroxina.

MPO, EPO e LPO são encontradas, respectivamente, em grânulos de neutrófilos (lisossomos), grânulos de eosinófilos e nas células secretórias das glândulas exócrinas. A MPO e a EPO são secretadas para o fagolisossoma e para o plasma, enquanto a LPO é secretada para o leite, saliva e lágrima. Elas são capazes de oxidar respectivamente cloreto, brometo ou tiocianato (O'BRIEN, 2000).

A mieloperoxidase é um constituinte dos grânulos azurófilos de neutrófilos e, correspondendo a cerca de 5% da massa seca total (ZUURBIER et al., 1992), é secretada no meio extracelular e fagolisossomal. Está envolvida no sistema enzimático microbicida dos fagócitos (ANDREWS; KRINSKY, 1986; ARNHOLD, 2004), sendo que, na presença de

peróxido de hidrogênio, catalisa a oxidação de íons Cl^- com a formação de HOCl (HARRISON; SCHULTZ, 1976; PODREZ et al., 2000).

A MPO tem sua síntese durante os estágios mielocíticos e promielocítico da maturação de granulócitos (ANDREWS; KRINSKY, 1986). As fontes reconhecidas de mieloperoxidase são os neutrófilos e monócitos, sendo que em macrófagos teciduais ela é usualmente considerada ausente (ROS et al., 1978). Entretanto, a MPO parece atuar em macrófagos, onde se observa a ocorrência do *oxidative burst* (LEFKOWITZ et al., 1992). Alguns trabalhos sugerem que os macrófagos apresentem conteúdo de MPO adquirida de neutrófilos por dois mecanismos possíveis: i) engolfamento de neutrófilos pelos macrófagos, ou ii) engolfamento da MPO liberada pelos neutrófilos no sítio inflamatório (RODRIGUES et al., 2002). Alguns autores descrevem a capacidade de certos macrófagos em expressar mieloperoxidase quando estimulados por certas citocinas, como o fator estimulador de colônias granulocíticas-monocíticas (GM-CSF), em alguns processos patológicos, como a aterogênese (SUGIYAMA et al., 2001; RODRIGUES et al., 2002).

A estrutura da MPO compreende uma hemoproteína glicosilada de cerca de 144 KDa, catiônica em pH fisiológico, com ponto isoelétrico (pI) maior do que 11 (ANDREWS; KRYNSKI, 1986). A MPO é constituída por duas cadeias idênticas unidas por ponte dissulfeto. Cada subunidade apresenta uma cadeia leve e uma cadeia pesada. Ambas as subunidades apresentam um grupamento heme, sendo que estes operam independentemente na oxidação de íons cloreto. Esta enzima apresenta uma peculiaridade frente às demais peroxidases no que diz respeito ao seu grupamento heme. Este apresenta uma distorção como resultado da ligação covalente da protoporfirina IX ao resíduo de metionina da posição 243 (Met243) e duas ligações do tipo éster com Glu408 e Asp260. Em pH ácido a ligação à histidina distal (His95) é liberada e o heme torna-se menos distorcido, o que facilita a ligação de íons cloreto. Uma mutação na Met243 diminui a afinidade por íons cloreto (YUE et al., 1997; KOOTER et al., 1999).

O mecanismo de ação da MPO (Figura 2) envolve a reação de sua forma férrica com o H_2O_2 , para formar um intermediário redox, o composto I (MPO I), o qual oxida os íons Cl^- , Br^- e I^- e outros substratos. A MPO também pode oxidar vários substratos orgânicos (principalmente fenóis, a tirosina é um dos mais importantes desses compostos no fagolisossoma, havendo formação do radical tirosil) através de transferências sucessivas de um elétron envolvendo os intermediários MPO I e MPO II (composto II; HAMPTON et al., 1998). A MPO-FeIII reage rapidamente e de maneira reversível com o H_2O_2 formando a MPO I, que oxida haletos através de uma transferência sucessiva de 2 elétrons, em um único passo, formando seus respectivos ácidos. A MPO nativa pode ser reduzida por diferentes espécies gerando um intermediário inativo, a MPO-FeII. O composto III é formado pela ligação do ânion superóxido à MPO nativa ou pela ligação do oxigênio à MPO-FeII.

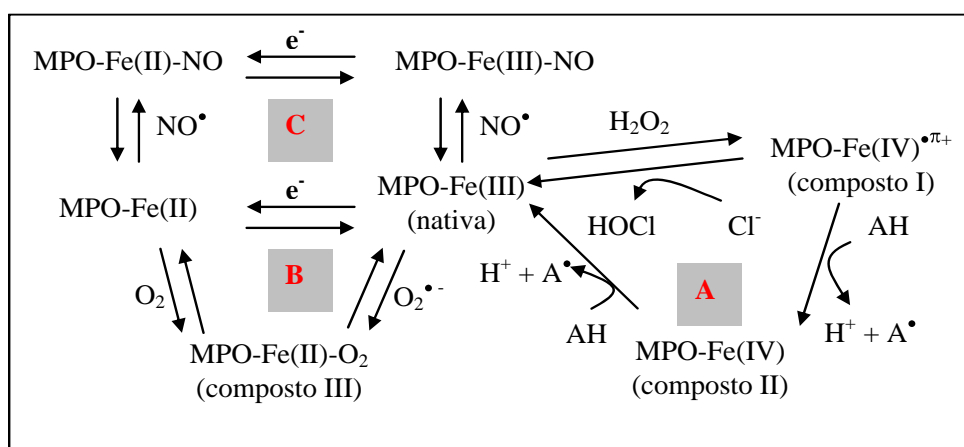


Figura 2. Mecanismo de ação da mieloperoxidase. A- ciclo peroxidásico clássico. B- reação do grupamento heme com o oxigênio. C- Ligação do óxido nítrico/modulação da atividade (ABU-SOUD; HAZEN, 2000).

O NO^\bullet reage com o ferro central de hemoproteínas. Ele é capaz de se ligar às formas férrica (Fe-III) e ferrosa (Fe-II) da MPO para gerar complexos hexacoordenados estáveis (Figura 3). Em baixas concentrações o óxido nítrico liga-se à forma ferrosa exacerbando a atividade catalítica da MPO. Em elevadas concentrações o óxido nítrico forma o complexo com a forma férrica da MPO inativando-a (Figura 2; ABU-SOUD; HAZEN, 2000).

Usando o H_2O_2 como doador de hidrogênio, a mieloperoxidase catalisa a oxidação de doadores não específicos de elétrons, tais como o guaiacol (MERRILL, 1980), *O*-dianisidina (BRADLEY et al., 1982) e a tetrametilbenzidina (SCHIERWAGEN et al., 1990), cujas estruturas moleculares são apresentadas na figura 3.

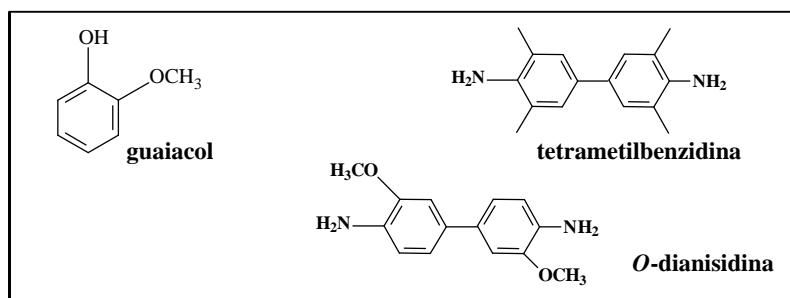


Figura 3. Estrutura molecular de alguns substratos da MPO.

A mieloperoxidase é inibida (Figura 4), dentre outros, pela azida (DAVIES; EDWARDS, 1989), diclofenaco (ZUURBIER et al., 1990), metimazol (PINCEMAIL et al., 1988), quercetina (PINCEMAIL et al., 1988), rutina (PINCEMAIL et al., 1988), sulfato de rutina (PINCEMAIL et al., 1988) e ácido salicilidroxâmico (DAVIES; EDWARDS, 1989). Em alguns trabalhos caracterizaram-se os inibidores da MPO segundo o tipo de inibição observada, tal como Pincemail e colaboradores (1988) que caracterizaram a quercetina como sendo um inibidor da MPO do tipo competitivo.

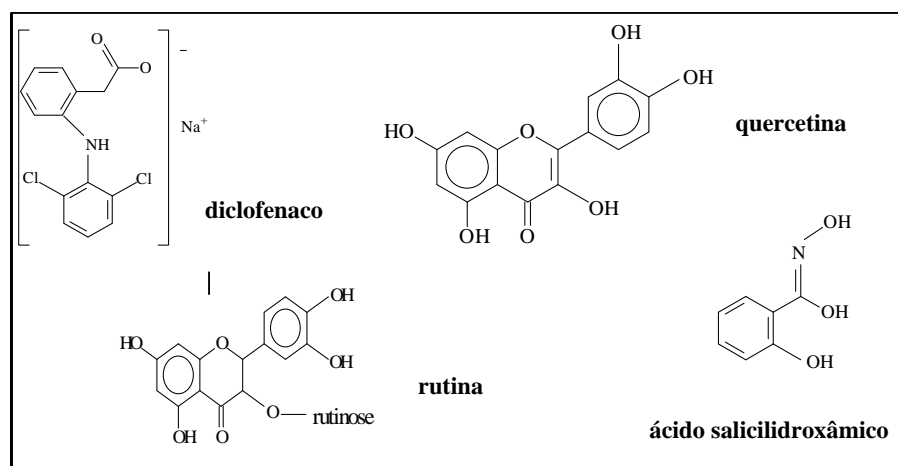


Figura 4. Estrutura molecular de alguns inibidores da MPO

1.3 Sistemas antioxidantes

A formação de espécies reativas é equilibrada naturalmente pela existência de compostos conhecidos como antioxidantes (PERCIVAL, 1988).

Um antioxidante pode ser definido como qualquer substância que, quando em pequenas quantidades, é capaz de retardar ou inibir processos oxidativos, tais como a lipoperoxidação (ATOUI et al, 2005; CHUN et al, 2005).

Em sistemas aeróbios, é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores (como as ERO) e o sistema de defesa antioxidante. As ERO, como exposto anteriormente, são geradas endogenamente como consequência direta do metabolismo do O_2 , mas também em situações não-fisiológicas, como a exposição da célula a xenobióticos, o que provoca a redução incompleta de O_2 (ROSS; MOLDEUS, 1991). Para proteger-se, a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas: i) uma delas atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão, e é constituída pela glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E; ii) a outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathiona-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px. Com exceção da vitamina E (α -tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (ROSS; MOLDEUS, 1991; HEBBEL, 1986).

Quando a disponibilidade de antioxidantes encontra-se limitada, o dano por espécies reativas pode resultar no estresse oxidativo (SWANSON, 1998). A pesquisa de produtos naturais proporciona a descoberta de novos fármacos que possam agir sobre as diferentes espécies oxidantes geradas em nosso organismo possibilitando alternativas de combate a doenças em que haja uma produção exacerbada de espécies reativas do oxigênio.

1.4 *Pterogyne nitens*

Pterogyne nitens Tulasne é uma espécie florestal que se encontra na lista das espécies nativas recomendadas para programas de recomposição de florestas em áreas de preservação permanente do estado de São Paulo e, no entanto, é ainda pouco estudada. Esta espécie pertence à família Fabaceae, subfamília Caesalpinoideae, encontrando-se distribuída desde o nordeste do Brasil até Santa Catarina e ainda no Paraguai, Bolívia e Argentina. A árvore atinge cerca de 15 metros de altura, apresenta ampla e descontínua dispersão tanto na mata primária quanto em formações secundárias (REGASINI et al., 2008 A; TONIN et al., 2005).

A *Pterogyne nitens* é uma planta conhecida popularmente no Brasil como “tipá”, “yvitaró”, “cocal”, “amendoinzeiro”, “amendoim-bravo”, “amendoim do campo”, dentre outros, de acordo com a região do país. Este é o único membro do gênero *Pterogyne* (REGASINI et al., 2008 A).

No estado de São Paulo é popularmente conhecida como “amendoim-bravo”, sendo amplamente empregada em tinturaria e também na construção civil devido às características da sua madeira moderadamente densa e resistente. Esta planta é conhecida pela beleza e odor de suas flores, bem como pela intensidade de suas folhagens e frutificação, possuindo grande valor ornamental (REGASINI et al., 2008 A). Além disso, é recomendada para reposição de mata ciliar para locais com inundações periódicas de rápida duração e reflorestamento em sítios arenosos e degradados. Esta espécie encontra-se sob risco de extinção, fazendo parte da lista de espécies recomendadas para a conservação genética no estado de São Paulo (NASSIF; PEREZ, 1997).

A *P. nitens* não apresentava valor etnofarmacológico evidenciado pela literatura até o relato de Bolzani et al. (1995) quanto à obtenção de cinco alcalóides guanidínicos, presentes em suas folhas, que apresentaram ação antitumoral frente a linhagem CHO-Aux (*chinese hamster ovary*). A literatura apresenta poucos dados das aplicações medicinais e da constituição química de *P. nitens*. Estudos etnofarmacológicos de 2007 em comunidades

guaranis do nordeste da Argentina revelam o uso das cascas do caule no tratamento de infestações parasitárias, principalmente no combate ao *Ascaris lumbricoides* (REGASINI et al., 2008 A).

Recentemente, em estudos realizados em parceria com o grupo NuBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais), Instituto de Química – UNESP – Araraquara, avaliou-se extratos brutos e frações dos caules e folhas de *P. nitens*: **i**) quanto ao potencial sequestrador de radicais livres ($O_2^{\bullet-}$, DPPH e $ABTS^{\bullet+}$) e outras espécies reativas não radicalares (NO, H_2O_2 e HOCl) e **ii**) inibição de peroxidases (*Horseshoe peroxidase* - HRP - e mieloperoxidase), obtendo-se resultados promissores (VELLOSA, 2005).

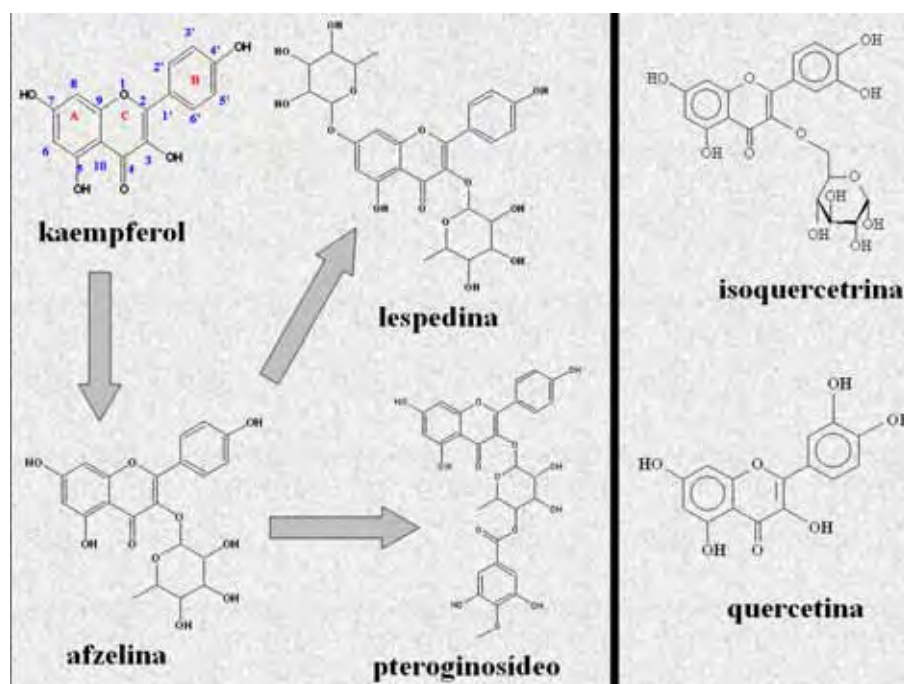


Figura 5. Estrutura molecular dos metabólitos secundários de *P. nitens* isolados pelo grupo NuBBE (anéis A, B e C da estrutura comum de flavonóides destacados na estrutura do kaempferol; as setas indicam a rota biossintética na *P. nitens*).

O extrato bruto das folhas de *P. nitens* foi estudado pelo grupo NuBBE por meio de técnicas cromatográficas (cromatografia de permeação em gel e cromatografia líquida de alta eficiência) e espectroscópicas (Ressonância Magnética Nuclear), culminando no

isolamento e caracterização dos flavonóides kaempferol, afzelina, lespedina ou kaempferitrina, pteroginoside, quercetina e isoquercetrina (Figura 5). Sendo o pteroginoside inédito frente aos diferentes compostos já isolados de plantas e, portanto, até então, não descrito em literatura (REGASINI et al, 2008 B).

1.5 Flavonóides como agentes terapêuticos

Os flavonóides são constituintes essenciais de células de vegetais superiores, nos quais apresentam diferentes funções tais como atividades regulatórias no metabolismo celular através de diferentes mecanismos como a ação conjunta com hormônios reguladores do crescimento ou ação sobre o transporte de elétrons na fosforilação oxidativa (JIANG et al., 1999; MORTENSON; THORNELEY, 1979).

Os antioxidantes presentes em extratos de plantas vêm atraindo cada vez mais a atenção dos consumidores sendo que o uso de plantas com propriedades farmacológicas também chama a atenção dos pesquisadores. As plantas medicinais desempenham um papel muito importante em saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento (MOSSI et al, 2004). Os nutricionistas estimam que a ingestão diária normal de flavonóides pelo ser humano seja em torno de 1 a 2 gramas (DE VRIES et al., 1997).

Haenen et al. (1997) verificaram que os flavonóides inibem a ação do peróxinitrito. Segundo esses autores, estas atividades antioxidantes seriam responsáveis pelos efeitos benéficos sobre o dano cardíaco coronariano. A inibição da lipoperoxidação depende da presença de antioxidantes e das atividades de enzimas como a superóxido dismutase (SOD). A rutina, por exemplo, tem sido considerada um anti - lipoperoxidante, pois pode neutralizar radicais superóxido (METHODIEWA et al., 1997).

A atividade antioxidante de compostos orgânicos é dependente de algumas características estruturais, que incluem, na maioria dos casos, a presença de grupamentos fenólicos. Desta forma, flavonóides, fenilpropanóides e outros compostos aromáticos são os

principais alvos da busca por antioxidantes (ATOUI et al., 2005). Os flavonóides são compostos fenólicos cujos valores de pK variam devido à grande variedade de estruturas possíveis. Poucos trabalhos relatam quais seriam estes valores apenas para um pequeno grupo de flavonóides, mas substâncias semelhantes a flavonóides tem sido relatadas como apresentando valores de pK entre 8 e 10,5 (HAVSTEEN, 2002), o que faz com que tais moléculas estejam na forma protonada em pH neutro.

Flavonóides constituem uma família de compostos com variações na sua estrutura a partir de uma estrutura química comum, o difenilpropano, sendo que a grande maioria dos flavonóides encontrados na natureza encontra-se na forma de glicosídeos (ligados a monossacarídeos), o que aumenta sua solubilidade em água (MEOTI, 2006). As formas agliconas (sem sacarídeo ligado) apresentam baixa estabilidade, os flavonóides que não apresentam grupos hidroxil não possuem atividade antioxidante e flavonóides que possuem a carbonila na posição 4 conjugada à dupla ligação 2-3 apresentam elevada atividade antioxidante (CAI et al., 2006).

No ser humano, os flavonóides presentes nos tecidos, devem-se à dieta na qual os vegetais fazem-se presentes. Os flavonóides podem ser absorvidos no intestino: **i)** via micelas biliares (ocorre com a porção aglicona), **ii)** por difusão passiva das agliconas através dos enterócitos ou **iii)** por transporte dos glicosídeos via transportadores de glicose nos enterócitos e posterior hidrólise por β -glicosidases liberando as agliconas (MEOTI, 2006). Após absorção, as agliconas sofrem conjugação com ácido glucurônico nos enterócitos ou nos hepatócitos, ou ainda, circulam no sangue ligados à albumina (MURATA; TERAOKA, 2003; PODHAJECER et al., 1980). Os flavonóides conjugados atravessam as membranas celulares através de proteínas carreadoras sendo capazes de atingirem diferentes tecidos. Os flavonóides são pouco solúveis em água e a conjugação eleva sua solubilidade permitindo transporte pela corrente sanguínea (MEOTI, 2006).

Geralmente os flavonóides sofrem hidroxilação nas posições 3, 5, 7, 3', 4' e 5'. Algumas destas hidroxilas encontram-se frequentemente metiladas, acetiladas ou sulfatadas. Quando os glicosídeos são formados, a ligação glicosídica se dá nas posições 3 e 7 e os carboidratos ligados comumente encontrados são raminose, glicose, glicoraminose, galactose e arabinose.

Os flavonóides também são capazes de quelar metais pesados como mecanismo de ação contra as ERO, uma vez que muitas delas originam-se em reações catalisadas por metais (KOSTYUK et al., 2004). Os íons de metais pesados são ligantes ávidos, propriedade de grande utilidade nos sistemas biológicos tais como nas hemeproteínas (PARELLADA et al., 1998). Uma das propriedades dos flavonóides mais úteis para sua aplicação terapêutica é sua habilidade *scavenger* de radicais livres. Tal atividade está relacionada ao seu potencial REDOX e à energia de ativação necessária para a ocorrência da transferência de elétrons (HAVSTEEN, 2002). Neste contexto, os flavonóides apresentam grande potencial de aplicação terapêutica uma vez que as ERO e diferentes radicais livres participam comumente em diferentes condições patológicas.

Os flavonóides são compostos fenólicos e, portanto, podem facilmente sofrer oxidação levando à formação irreversível de quinonas (MEOTI, 2006). O produto final das quinonas é a formação de polímeros das mesmas (HAVSTEEN, 2002). É comum se atribuir aos flavonóides um elevado potencial antioxidante e baixo potencial pró-oxidante. Entretanto, sabe-se que a quercetina, um dos flavonóides mais estudados, apresenta potencial pró-oxidante por sua capacidade geradora de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio conforme ilustrado na figura 6 (AWAD et al., 2000).

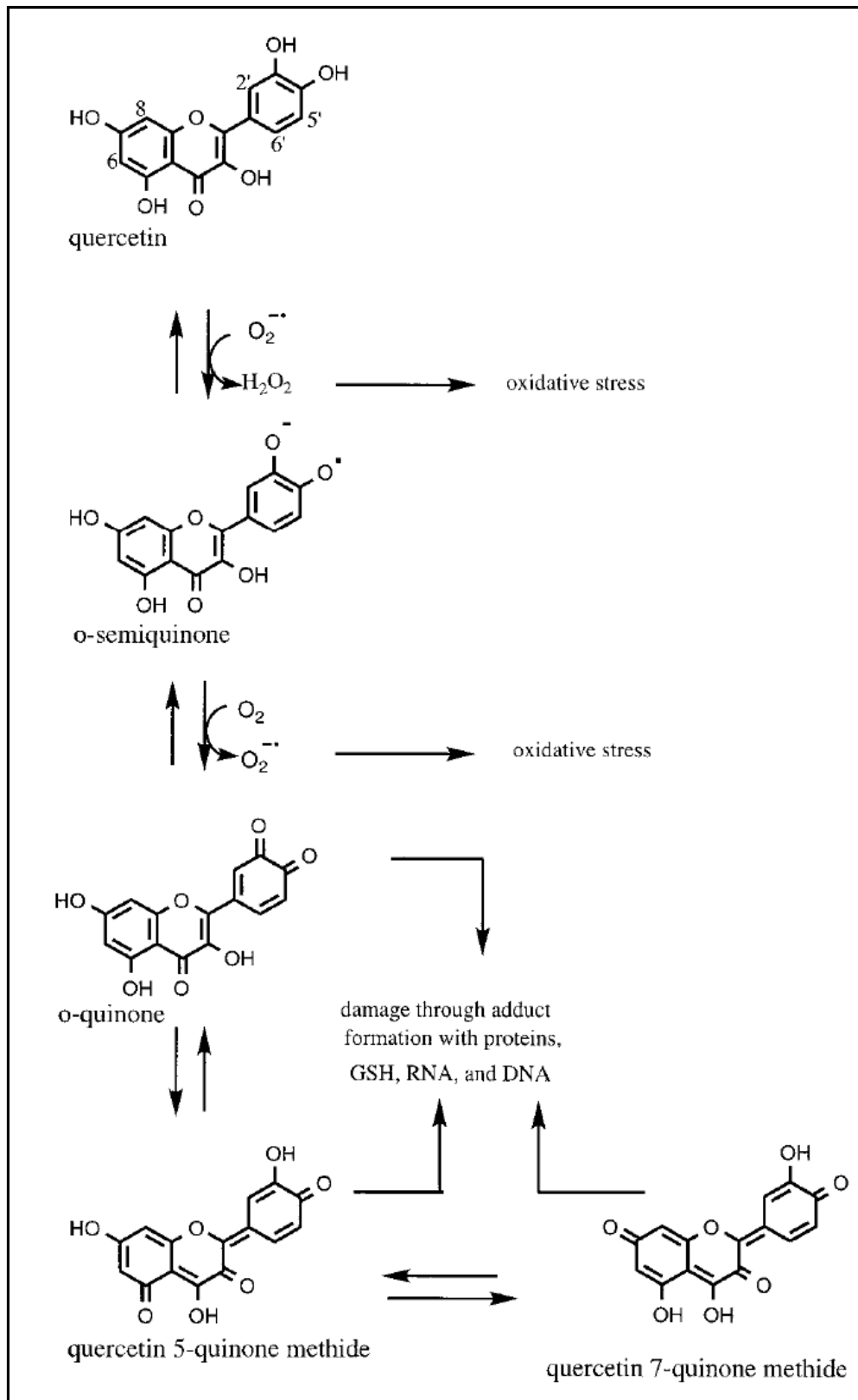


Figura 6. Rota pró-oxidante da quercetina na interação com ERO (AWAD et al., 2000)

A caracterização das diferentes propriedades bioquímicas dos flavonóides é um desafio devido à sua grande variedade estrutural, estereoquímica e reativa. Os flavonóides podem participar em quase todo tipo de reação conhecida em química orgânica (óxido redução, reações ácido-base, interações hidrofóbicas, tautomerização, isomerização, etc.) e seus substituintes podem agir por indução eletrônica, ressonância, complexação com metais pesados, dentre outras (HAVSTEEN, 2002). Os flavonóides podem adquirir quase que qualquer polaridade dependendo da existência de grupos glicosídicos, isoprenóides ou éters alifáticos em suas estruturas.

A pesquisa de produtos naturais proporciona a descoberta de novos fármacos e o estudo de plantas que apresentem substâncias que possam agir sobre as diferentes espécies oxidantes geradas em nosso organismo torna-se de grande importância. Dietas com elevado conteúdo de vegetais, frutas e grãos podem reduzir o risco de inúmeras doenças, tais como doenças cardiovasculares, câncer, reações inflamatórias e Mal de Alzheimer (ATOUI et al, 2005; CHUN et al, 2005). Tais efeitos, associados à presença de substâncias antioxidantes, mostram a importância do estudo destes agentes na busca por opções terapêuticas para diferentes patologias.

No estudo da avaliação do potencial antioxidante das amostras deve-se considerar que: i) um composto deve ser testado em concentrações disponíveis *in vivo* e ii) ao avaliar os antioxidantes, deve-se utilizar pelo menos uma espécie relevante biologicamente. Deve-se perguntar como age o antioxidante, se ele age diretamente sobre a ERO ou ele inibe a sua geração e ainda, se ele age indiretamente regulando defesas antioxidantes endógenas. Considerando-se **i)** a participação da enzima MPO, de radicais livres e outros agentes oxidantes em processos patológicos, **ii)** o crescente uso de substâncias naturais na terapêutica, e **iii)** os resultados promissores alcançados em estudos com extratos e frações de *P. nitens* no mestrado em Análises Clínicas FCFAr/UNESP (VELLOSA, 2005) elaborou-se este trabalho de Tese de doutorado.

2 OBJETIVOS

Algumas hipóteses e/ou questões são levantadas acerca do perfil bioquímico de ação dos flavonóides kaempferol, afzelina, lespedina, pteroginosídeo, quercetina e isoquercetrina:

- 1) sendo os flavonóides classicamente considerados antioxidantes, seriam eles capazes de agir de forma eficiente sobre quaisquer agentes oxidantes e radicais livres?
- 2) qual dos flavonóides em foco seria mais eficiente para cada situação estudada? Há certa especificidade de ação?
- 3) as formas agliconas são antioxidantes mais eficientes?
- 4) o número de hidroxilas livres nos anéis A e B é importante para a ação antioxidante?
- 5) os flavonóides são capazes de interferir em reações oxidativas catalizadas por peroxidases?
- 6) os flavonóides em questão são inibidores de peroxidases?
- 7) os flavonóides são substratos de peroxidases?
- 8) os flavonóides interagem com a enzima no sítio ativo? há interação com outros sítios da enzima?
- 9) as alterações estruturais nos flavonóides alteram o mecanismo de inibição de peroxidases?
- 10) a ação eficiente sobre as ERO permite ação protetora eficiente sobre biomoléculas ou estruturas biológicas?
- 11) a ação antioxidante dos flavonóides reduz a agressão que os neutrófilos sofrem pelas ERO que eles mesmos geram?

São objetivos deste trabalho, avaliar o efeito do kaempferol, afzelina, lespedina, pteroginosídeo, quercetina e isoquercetrina em diferentes processos bioquímicos oxidativos (modelos “químicos”, “enzimáticos” e “celulares”), identificando um perfil bioquímico (ERO x enzimas x células) de atividade destes compostos sobre as ERO (radicais livres ou não), caracterizando assim os mecanismos de ação e estabelecendo uma relação entre a estrutura química destes compostos com as atividades observadas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.6 Equipamentos e Reagentes

3.6.1 Equipamentos

Foram utilizadas balanças analíticas, centrífugas, estufas, banho-maria e microscópio óptico, além de material de coleta de sangue como seringas e agulhas.

Para os ensaios espectrofotométricos foram utilizadas celas de quartzo (volume de 1mL, 2mL ou 3mL) com 1 cm de caminho ótico (c.o.). As leituras foram realizadas no Espectrofotômetro HP 8453, *Diode Array*, com cela termostatzada, acoplado a um computador tipo PC Pentium III da HP.

3.6.2 Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes com elevado grau de pureza: ácido sulfúrico, fosfato trissódico, molibdato de amônio, persulfato de potássio, *2,2'-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid* (ABTS), borohidreto de sódio, ácido 5-5'-ditio-2-nitrobenzóico (DTNB), *2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH), *2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride* (AAPH), peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio, taurina, tetrametilbenzidina, nitroprussiato de sódio, metassulfato de fenazina, nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida, *nitrobluetetrazolium*, ácido acético, azul de trypan, acetato de phobol miristato (PMA), peroxidase de raiz forte (HRP tipo VI), hemina, mieloperoxidase de neutrófilos humanos.

As amostras (kaempferol, afzelina, lespedina, pteroginoside, quercetina e isoquercetrina) foram fornecidas pelos professores Dr. Luis Octávio Regasini e Dra. Vanderlan da Silva Bolzani do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química de Araraquara – UNESP.

3.7 Análise do potencial redutor dos compostos estudados

3.7.1 Redução do fosfomolibdênio

Este método foi desenvolvido por Prieto et al. (1999) com a finalidade de se quantificar diversos antioxidantes. O método se baseia na redução do molibdênio de sua forma Mo(VI) para Mo(V) pelo analito com conseqüente formação de um cromóforo verde [complexo fosfato/Mo(V)] em meio ácido e foi realizado segundo Prieto et al. (1999).

3.8 Perfil de ação sobre radicais livres e espécies reativas do oxigênio não radicalares

3.8.1 Ação scavenger das amostras sobre o radical ABTS^{•+}

Este ensaio foi padronizado por Pellegrini et al. (1999), sendo originalmente realizado em etanol absoluto. Nos ensaios avaliou-se a atividade sequestradora de radicais pelas amostras por meio do decréscimo da absorbância em 734 nm, segundo Velloso et al. (2007). A estrutura do ABTS^{•+} é ilustrada na figura 7.

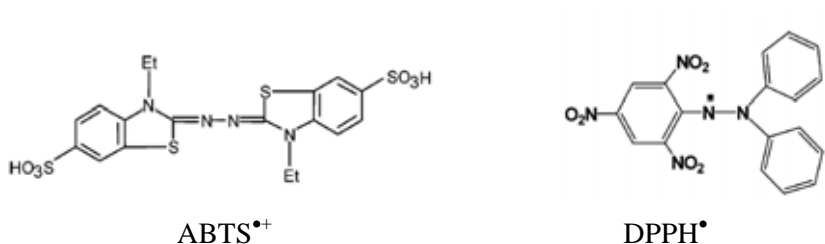


Figura 7. Estrutura molecular do ABTS^{•+} e DPPH[•].

3.8.2 Ação scavenger das amostras sobre radical DPPH

A avaliação da ação sequestradora de radicais livres das amostras também foi feita através do decréscimo da absorbância da solução de DPPH (60 µM) em 531nm, segundo Soares et al. (1997). A estrutura do radical é ilustrada na figura 7.

3.8.3 Atividade *scavenger* das amostras sobre peróxido de hidrogênio

A ação sequestradora de H_2O_2 ($\epsilon_{230\text{nm}} = 80 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; BRESTEL, 1985) foi avaliada através da oxidação do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) em ácido 5-5'-ditio-2-nitrobenzóico (DTNB) com aumento da absorvância em 412nm, segundo Velloso (2005). O TNB foi preparado segundo Ching et al (1994) e sua concentração foi determinada através de seu coeficiente de extinção molar em 412nm ($13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; CHING et al, 1994).

3.8.4 Atividade *scavenger* das amostras sobre o ácido hipocloroso

As reações foram realizadas segundo Costa et al. (2004), com adaptações para o sistema “químico”, em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4. Procede-se incubação de 10 minutos das amostras com HOCl (30 μM) e mais 5 minutos após adição de TMB (2,8 mM). A leitura das absorvâncias é feita em 652nm. A concentração solução de HOCl é determinada espectrofotometricamente, através de seu coeficiente de extinção molar em 295nm ($350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; ZGLICZYNSKI et al., 1971).

3.8.5 Atividade *scavenger* sobre taurina cloramina

As reações são realizadas segundo Costa et al. (2004), com adaptações para o sistema “químico” no qual a taurina cloramina (TauCl - 30 μM) é obtida através da reação do HOCl (30 μM) com taurina (Tau - 5mM) por 5 minutos em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4. Os analitos são adicionados à mistura seguindo-se incubação de 10 min e adição de TMB (2,8 mM). Para formação do cromóforo segue-se incubação por 5 minutos. A leitura das absorvâncias é feita em 652nm.

3.8.6 Atividade *scavenger* sobre o anion superóxido

Neste ensaio, adaptado de Kakkar et al. (1984) e realizado segundo Velloso et al. (2007), o ânion superóxido reage com o NBT para formar o cromóforo (formazana) cuja intensidade de cor, medida em 560 nm, é diretamente proporcional à concentração do radical (KAKKAR et al, 1984).

3.8.7 Atividade *scavenger* sobre Óxido Nítrico

O efeito *scavenger* das amostras em estudo sobre o óxido nítrico foi medido de acordo com Yen et al (2001), em tampão fosfato 50mM, pH7,0 e nitroprussiato de sódio 25mM. O NO presente em solução é revelado pela reação com o Reagente de Griess formando um cromóforo com pico de absorvância em 570nm. Para o cálculo da concentração utilizou-se o coeficiente de extinção molar determinado pela curva analítica, que foi obtida experimentalmente (item 4.1 e Figura 15).

3.9 Ação sobre sistemas oxidativos catalisados por peroxidases

3.9.1 Ação na oxidação do guaiacol por peroxidase modelo (clássica)

A concentração da HRP em solução foi determinada através de seu coeficiente de extinção molar em 403nm ($1,02 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; OHLSON & PAUL, 1976). A cinética de oxidação do guaiacol (2 mM) pela HRP (7 nM), H₂O₂ (0,1 mM), foi feita em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4, 37⁰C. A reação foi seguida à 470nm por 1 minuto (KHALIL, 2002). Determinou-se a velocidade de reação quando o tempo tende a zero (velocidade inicial - v_0) na ausência e na presença das amostras.

3.9.2 Ação na oxidação do guaiacol por mieloperoxidase humana

A cinética de oxidação do guaiacol (70 mM) pela MPO (8 nM), H₂O₂ (0,3 mM), foi feita em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4, 37⁰C. A reação foi seguida à 470nm por 1minuto (KHALIL, 2002). Determinou-se v_0 na ausência e na presença das amostras. Foi estudado também o tipo de inibição que estaria sendo provocada pelos flavonóides sobre a cinética de oxidação do guaiacol catalisada pela MPO (5 nM) em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4, 37⁰C. Para tanto, realizaram-se as reações com concentrações variadas do substrato guaiacol, fixando-se a concentração de peróxido de hidrogênio (0,3 mM), na ausência dos inibidores e na presença de duas concentrações distintas de cada um dos flavonóides. A partir das tangentes das cinéticas ($\Delta A \times \Delta t$)

obtiveram-se os valores de velocidade da reação, os quais foram utilizados para a construção dos gráficos duplo-recíprocos de Lineweaver-Burk ($1/v_0 \times 1/[S]$). (KHALIL, 2002).

3.9.3 Ação na oxidação do guaiacol pelo grupo prostético de peroxidases (hemina)

A Hemina foi preparada de acordo com Bastos et al. (2003) e sua concentração em solução foi determinada através de seu coeficiente de extinção molar ($58400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em 385 nm. A cinética de oxidação do guaiacol (8 mM) pela Hemina (3,3 μM), H_2O_2 (0,1 mM), foi feita em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4, 37°C . A reação foi seguida à 470 nm por 1 minuto. Determinou-se v_0 na ausência e na presença das amostras.

3.9.4 Ação na geração de HOCl/TauCl por mieloperoxidase

A interferência das amostras na reação de geração de ácido hipocloroso/TauCl pela MPO (KHALIL, 2002; COSTA et al., 2004), sendo realizada em tampão fosfato de sódio 50mM/NaCl 150mM, pH 7,4 (37°C) contendo Tau 5 mM, MPO 1 nM, H_2O_2 0,1 mM. Após 10 minutos de reação adicionou-se catalase 0,02 mg/mL e, a seguir, TMB 2,8 mM, incubação de 5 minutos. Leituras em 652 nm.

3.9.5 Atuação como substrato: Ciclo catalítico clássico da peroxidase HRP.

O estudo dos flavonóides como possíveis substratos de peroxidases foi realizado através da análise da alteração do espectro de absorção da HRP 1,8 μM com leituras em 403 nm e 420 nm (Khalil, 2002) na presença de H_2O_2 15 μM e amostras 2,5 $\mu\text{g/mL}$. Os ensaios foram realizados em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4 (37°C).

3.10 Citotoxicidade e ação sobre estresse oxidativo em células animais

3.10.1 Toxicidade sobre eritrócitos

Os eritrócitos foram obtidos após coleta de sangue total de pessoas hígdas e separadas do soro após centrifugação em 1500 rpm por 15 minutos. A ação hemolítica dos

compostos naturais foi estudada pela liberação de hemoglobina das células (VISSERS et al., 1998), medida através da leitura da absorbância ($\lambda = 414 \text{ nm}$) do sobrenadante da suspensão (eritrócitos 5%; tampão fosfato de sódio 10mM/NaCl 150mM, pH 7,4; 37⁰C) após 2 horas e meia e 4 horas de incubação.

3.10.2 Dano provocado pelo radical AAPH em eritrócitos

A ação dos compostos naturais sobre a hemólise promovida pelo radical *2'-azo-bis (2-amidinopropane) dihydrochloride* (AAPH) 25 mM (YANG et al., 2006) em suspensão de eritrócitos 5% (tampão fosfato de sódio 10mM/NaCl 150mM, pH 7,4; 37⁰C) foi avaliada pela liberação de hemoglobina pelas células após 2 horas e meia de incubação através das leituras das absorbâncias em 414 nm.

3.10.3 Ação sobre dano provocado pelo ácido hipocloroso em eritrócitos

A ação dos compostos naturais sobre a lise promovida pelo HOCl 100 μM em suspensão de eritrócitos 5% (tampão fosfato de sódio 10mM/NaCl 150mM, pH 7,4; 37⁰C) foi avaliada pela liberação de hemoglobina pelas células após 4 horas de incubação através das leituras das absorbâncias em 414 nm.

3.10.4 Toxicidade sobre neutrófilos

3.10.4.1 Marcador molecular: lactato desidrogenase

Os neutrófilos foram obtidos segundo Khalil (2002). A citotoxicidade dos compostos naturais sobre neutrófilos foi avaliada através da determinação da enzima lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante da suspensão de neutrófilos, 1×10^6 células/mL, na ausência e na presença de $2,5 \times 10^{-7}$ mol/L PMA (acetato de forbol miristato - ativador do *oxidative burst*), após 2 horas de incubação (tampão PBS-D, pH 7,4; 37⁰ C). Para este ensaio utilizou-se o Kit Labtest LDH –colorimétrico.

3.10.4.2 Corante supra-vital: azul de Trypan

A citotoxicidade dos compostos naturais sobre neutrófilos também foi avaliada através do teste com corante supra-vital Azul de Trypan (KHALIL, 2002; MIAN

et al., 2008) através de microscopia óptica com contagem em câmara hematómica (Câmara de Neubauer). Após 2 horas de incubação das amostras com a suspensão de neutrófilos 1×10^6 células/mL, na presença e na ausência de estímulo PMA em tampão PBS-D, pH 7,4 (37°C) realizou-se a contagem de células coradas (mortas) e não coradas (vivas) realizando-se cálculo de porcentagem de um total de 200 células contadas.

3.10.5 Ação sobre o *oxidative burst* de neutrófilos na produção de HOCl/TauCl

A ação dos compostos naturais sobre a geração de ERO por neutrófilos foi avaliada através da produção de TauCl por neutrófilos ativados ($2,8 \times 10^6$ células/mL) com PMA $2,5 \times 10^{-7}$ mol/L em tampão PBS-D, pH 7,4, 37°C , contendo 5mM de Tau (COSTA et al., 2004). Após 30 minutos de incubação foi adicionado TMB (2,8 mM) e seguiu-se a leitura das absorvâncias em 652 nm após 5 minutos.

3.6 Análise Estatística

Foram definidos alguns valores de concentração dos flavonóides que promovessem uma dada inibição (IC_i) a partir dos gráficos dose-resposta construídos. Buscou-se estabelecer os valores de concentração que promovessem 50% de inibição. Entretanto, em alguns casos, não foi possível se alcançar tal inibição e, portanto, utilizou-se valores de concentração que promoveram inibições inferiores a 50%, como por exemplo, IC_{13} ou IC_{41} .

Os resultados, de triplicatas, estão expressos em média \pm desvio padrão (DP). Análises realizadas através de ANOVA onde se estabelece o nível de significância como $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

*“Prestem atenção aos benditos lugares que
denominam-se com a palavra laboratório,
e tantos significados.
São os templos de futuro,
do bem estar e do desenvolvimento.
É onde a humanidade se fará maior, mais forte e melhor.
Onde se aprende a ler as obras da natureza,
obras de avanço verdadeiro e de ampla harmonia...”*
(Pasteur)

4.1 Interações diretas com as espécies reativas

Uma das propriedades que determina a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos é o seu potencial redutor, sendo que este, entretanto, não é o único fator para tal atividade. Desta forma, buscou-se avaliar o potencial de redução dos seis flavonóides estudados. O potencial redutor das amostras foi avaliado a partir da capacidade dos flavonóides em reduzirem o molibdênio de sua forma Mo(VI) para Mo(V). Podem-se observar, através da figura 8, dois conjuntos de substâncias quanto a esse potencial redutor: isoquercetrina, kaempferol e lespedina com potenciais de redução semelhantes entre si, mas inferiores aos da afzelina, pteroginoside e quercetina. Os flavonóides podem ser relacionados em ordem crescente do potencial redutor como segue: isoquercetrina = kaempferol = lespedina < afzelina = pteroginoside = quercetina.

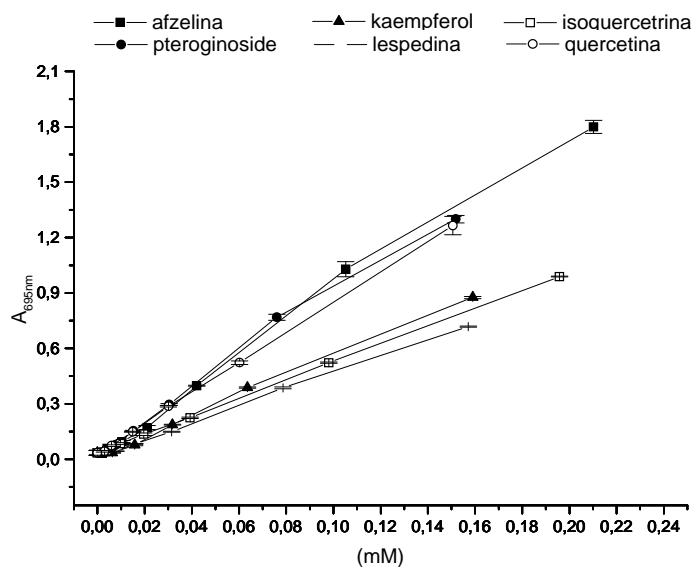


Figura 8. Redução do fosfomolibdênio – avaliação relativa do potencial redutor; 500 μ L de Solução Reagente (H_2SO_4 0,6M; Na_3PO_4 28mM; Molibdato de amônio 4mM); 50 μ L de amostra; 90 minutos de incubação em banho $90^{\circ}C$ (resfriado em temperatura ambiente); $\lambda = 695nm$.

Pelos dados obtidos, destacam-se: i) que a adição de carboidrato à hidroxila OH-3 no anel C do kaempferol aumenta o potencial redutor da molécula desde que permaneçam livres as duas hidroxilas do anel A; ii) que a adição de uma hidroxila no anel B do kaempferol originando a quercetina eleva o potencial redutor do flavonóide e, iii) que a alteração de posição de uma hidroxila do anel B da quercetina em conjunto com a adição da raminose à hidroxila da posição 3 no anel C (OH-3) reduzem a capacidade redutora da molécula. Desta forma, a hidroxila livre do anel C, provavelmente em conjunto com a insaturação presente no mesmo anel, é sítio importante para o potencial redutor dos flavonóides. Tal resultado mostra potencial dos flavonóides em questão em interferirem em processos de óxido-redução.

Além do potencial redutor, tem-se como fator importante para a atividade antioxidante dos flavonóides a habilidade *scavenger* de ERO, o que depende da conformação espacial e configuração que os mesmos apresentam, além de seu estado de ionização, o que interfere em sua capacidade de atingir o núcleo radical dos radicais livres ou de interagir com os sítios oxidativos de outras ERO não radicalares.

A capacidade dos compostos isolados da *P. nitens* em interagirem com radicais livres neutralizando-os, ou de interagirem com agentes oxidantes reduzindo-os, foram avaliadas através da ação *scavenger* sobre os radicais ABTS^{•+} e DPPH[•] e sobre as ERO TauCl, HOCl, O₂^{•-}, H₂O₂ e NO.

Nos estudos da ação de produtos naturais e outros xenobióticos sobre radicais livres é muito comum utilizar-se de radicais modelos não pertencentes aos organismos vivos para se avaliar o potencial de interação com tais moléculas. Dentre estes radicais encontram-se o ABTS^{•+} e o DPPH, sendo que, nos resultados obtidos, o radical ABTS^{•+} se mostrou um radical mais facilmente capturável pelos flavonóides do que o DPPH (Figuras 9 e 10).

A quercetina (IC₅₀ = 0,0009 mM) foi o composto mais eficiente seguida da lespedina (IC₅₀ = 0,0014 mM), kaempferol (IC₅₀ = 0,0019 mM) e isoquercetrina (IC₅₀ = 0,0021 mM) com valores muito próximos, pteroginoside (IC₅₀ = 0,0029 mM) e afzelina (IC₅₀

= 0,0042 mM). A habilidade dos flavonóides em capturar o radical $ABTS^{\bullet+}$ (Figura 9) parece estar relacionada à disponibilidade da OH-3 e à quantidade total de hidroxilas livres na molécula como um todo. Os flavonóides podem assim, ser enumerados segundo a seguinte ordem decrescente para o potencial de ação sobre o $ABTS^{\bullet+}$: quercetina > lespedina > kaempferol > isoquercetrina > pteroginoside > afzelina.

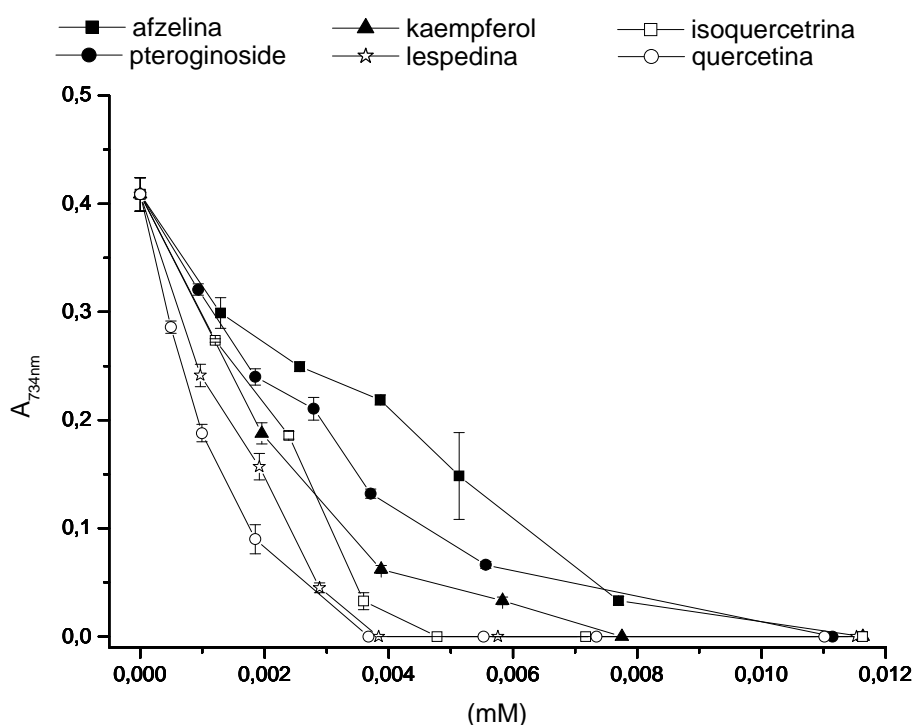


Figura 9. Ação *scavenger* de radical $ABTS^{\bullet+}$ 55 μ M; Tampão fosfato de sódio 10mM, pH7,4; incubação de 30 minutos (ausência de luz); $\lambda = 734$ nm.

Observou-se que as amostras afzelina e pteroginoside ($IC_{13} = 0,231$ mM) foram pouco eficientes como *scavengers* de radical DPPH (Figura 10). As demais amostras mostraram grande eficiência contra este radical sendo a quercetina ($IC_{50} = 0,011$ mM) a molécula que apresentou melhor resultado, seguida da lespedina ($IC_{50} = 0,013$ mM), isoquercetrina ($IC_{50} = 0,016$ mM) e kaempferol ($IC_{50} = 0,030$ mM). Os flavonóides podem

assim, ser enumerados segundo a seguinte ordem decrescente para o potencial de ação sobre o DPPH: quercetina > lespedina > isoquercetrina > kaempferol > afzelina = pteroginósido.

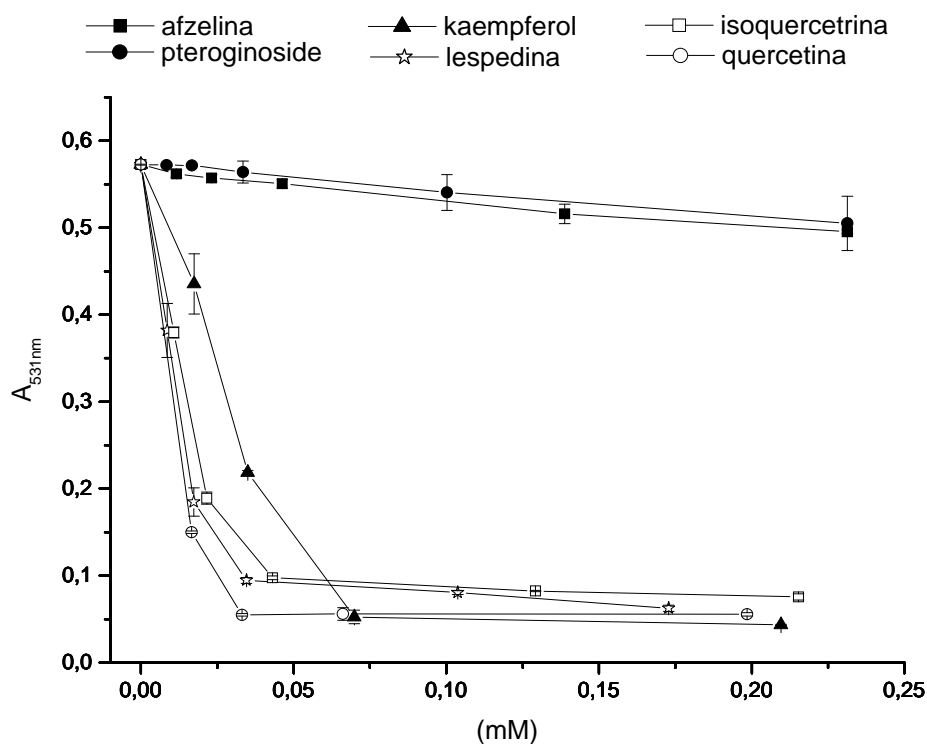


Figura 10. Ação *scavenger* de radical DPPH 60 μ M em etanol absoluto; incubação de 15 minutos (ausência de luz); $\lambda = 531$ nm.

Além dos radicais modelos é necessário fazer uso de modelos de estudo que envolvam espécies reativas que ocorram de fato em sistemas biológicos. Foram avaliadas, portanto, as ERO H_2O_2 , HOCl, TauCl, $O_2^{\bullet-}$ e NO^{\bullet} .

O ânion superóxido é uma ERO produzida constantemente no organismo humano em processos fisiológicos, como o *oxidative burst* e a respiração celular, e patológicos (processos inflamatórios exacerbados), sendo ainda uma das principais espécies envolvidas na alteração do tecido epitelial observada ao longo dos anos no processo de envelhecimento. Portanto, o ânion superóxido é um alvo farmacológico importante no que se

refere à prevenção e tratamento de patologias associadas ao estresse oxidativo. Observa-se na figura 11 grande eficiência da quercetina ($IC_{50} = 0,025$ mM) como agente *scavenger* deste radical livre. A isoquercetrina ($IC_{50} = 0,111$ mM) e o kaempferol ($IC_{50} = 0,243$ mM) também se mostraram eficientes contra o ânion superóxido, seguidas da afzelina ($IC_{30} = 0,231$ mM), pteroginoside ($IC_{32} = 0,349$ mM) e lespedina ($IC_{22} = 0,349$ mM). Desta forma, as hidroxilas livres no anel B seguidas da hidroxila livre no anel C e por fim da hidroxila livre no anel A, seriam os sítios de ação destes flavonóides na captura de $O_2^{\bullet-}$. Estes são dados extremamente importantes, mas é importante lembrar que a quercetina por exemplo interage com o ânion superóxido formando quinona, a qual reage com o oxigênio molecular gerando novamente anion superóxido, sendo este um processo que deve ocorrer também com os demais flavonóides.

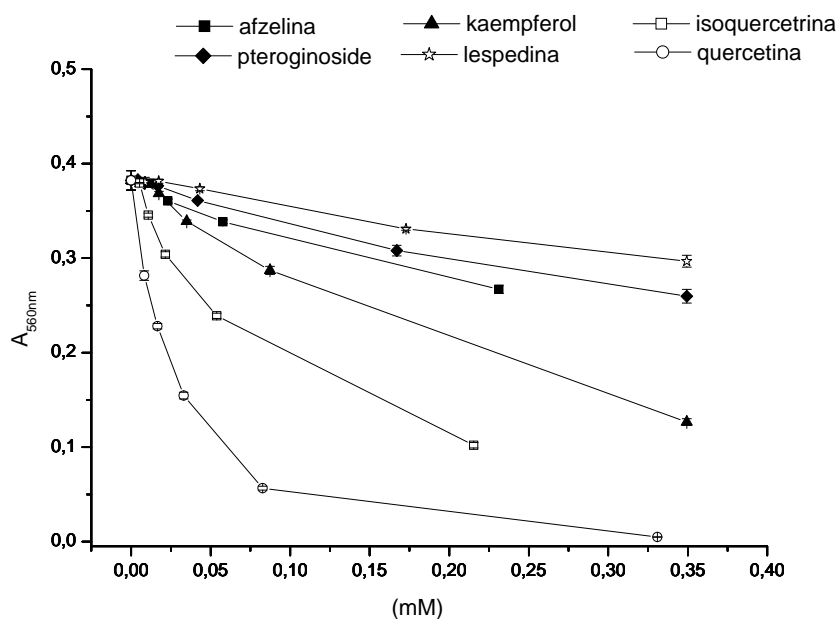


Figura 11. Ação *scavenger* de $O_2^{\bullet-}$. Meio reacional: Tampão pirofosfato de sódio 25mM, pH 8,3; NBT 45 μ M, PMS 9,3 μ M, NADH 78 μ M. Incubação de 2 minutos do sistema gerador de superóxido com as amostras na ausência de luz; adição de Ácido acético 5% e 10 minutos de incubação (ausência de luz); $\lambda = 560$ nm.

Em sistemas biológicos, o ânion superóxido rapidamente gera peróxido de hidrogênio, um oxidante não radicalar, deletério ao organismo e necessário em oxidações

catalisadas por peroxidases. Através da figura 12, observou-se que nenhum dos flavonóides é capaz de agir sobre o peróxido de hidrogênio, sendo este um dado interessante no momento em que se avalia a ação das amostras sobre peroxidases.

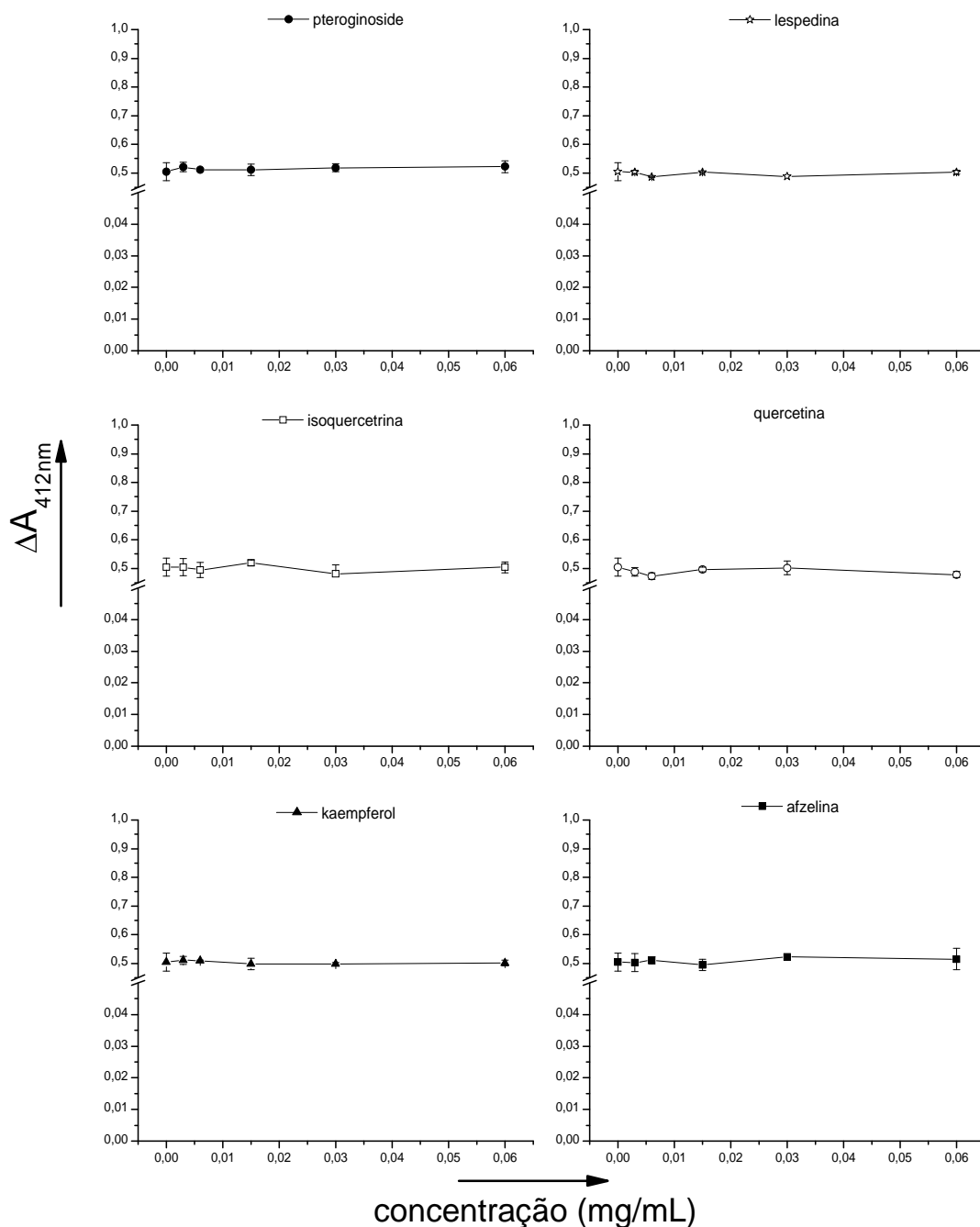


Figura 12. Ação *scavenger* de H_2O_2 (90 μM); Tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4; Incubação de 2 horas e 30 min do H_2O_2 com as amostras, adição de TNB 80 μM e incubação de 5 minutos; $\lambda = 412nm$.

O peróxido de hidrogênio é necessário à mieloperoxidase para a oxidação de haletos a seus ácidos hipohalosos, sendo, portanto um componente essencial na produção de ácido hipocloroso. O HOCl é um oxidante extremamente deletério ao organismo e responsável pela alteração de diferentes biomoléculas das estruturas celulares levando a alterações importantes constatadas no organismo em diferentes patologias. As amostras estudadas se mostraram efetivos seqüestradores de ácido hipocloroso, como pode ser observado pela figura 13, sendo a quercetina ($IC_{50} = 0,0008$ mM) e o pteroginoside ($IC_{50} = 0,0008$ mM) os mais eficientes. A afzelina ($IC_{50} = 0,0011$ mM), seguida pela lespedina ($IC_{50} = 0,0015$ mM), isoquercetrina ($IC_{50} = 0,0018$ mM) e kaempferol ($IC_{50} = 0,002$ mM) também apresentaram boa atividade contra o HOCl.

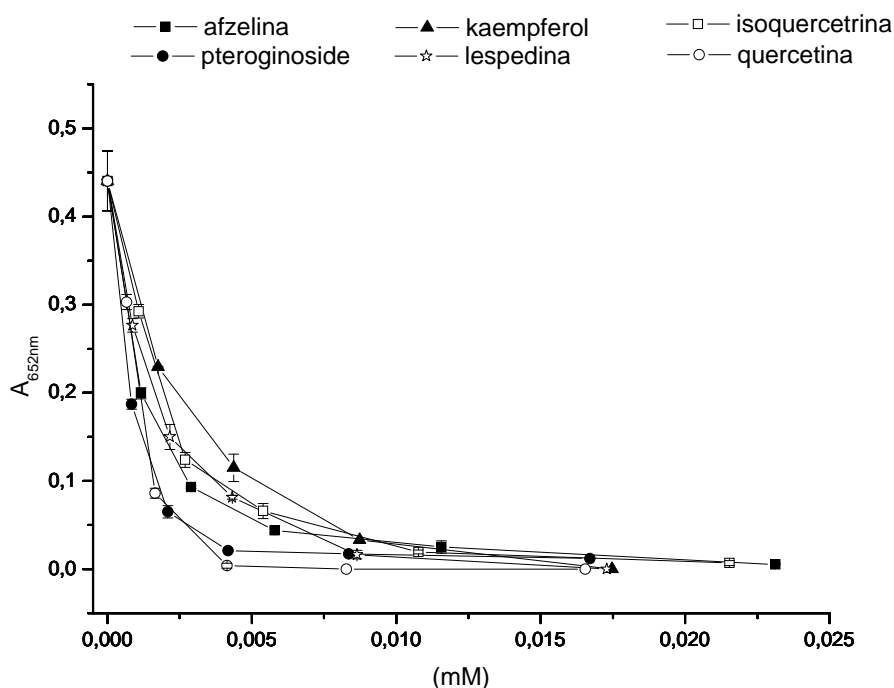


Figura 13. Ação *scavenger* de HOCl (30 μ M). Meio reacional: tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4, TMB 2,8mM. Incubação de 10 min do HOCl e revelação com TMB; $\lambda = 652$ nm.

Dentre as alterações que o ácido hipocloroso provoca está a oxidação de grupos amino livres de aminoácidos levando à formação de cloraminas, outro grupo de oxidantes não radicalares. As cloraminas são componentes importantes, por exemplo, na lesão observada

para a formação de ulcera gástrica quando a bactéria *Helicobacter pylori* se faz presente. Tal bactéria promove um processo inflamatório na mucosa gástrica onde neutrófilos produzem, através do *oxidative burst*, o HOCl. A bactéria ainda produz amônia que, ao reagir com o HOCl, gera monocloramina, a qual é bastante lesiva. As cloraminas são desta forma, alvos farmacológicos importantes a serem avaliadas na presença dos flavonóides. Para tanto, estudou-se a ação *scavenger* de taurina cloramina pelos flavonóides.

Observou-se grande diferença do potencial *scavenger* de TauCl entre os flavonóides glicosídicos e os agliconas (Figura 14), sendo superior a ação destes últimos em relação aos primeiros. Observe-se ainda que a quercetina ($IC_{50} = 0,044$ mM) demonstrou ação superior à do kaempferol ($IC_{50} = 0,092$ mM), que apresenta uma hidroxila a menos em sua estrutura molecular (anel B). A afzelina ($IC_{37} = 0,370$ mM), dentre os flavonóides glicosídicos, mostrou-se a mais eficiente, seguida do pteroginoside e a isoquercetrina ($IC_{24} = 0,401$ mM). O pior potencial *scavenger* de taurina-cloramina foi desempenhado pela lespedina ($IC_{11} = 0,415$ mM), cuja estrutura molecular apresenta bloqueio das hidroxilas OH-3 e OH-7 (anéis A e C) pelas ligações a raminoses.

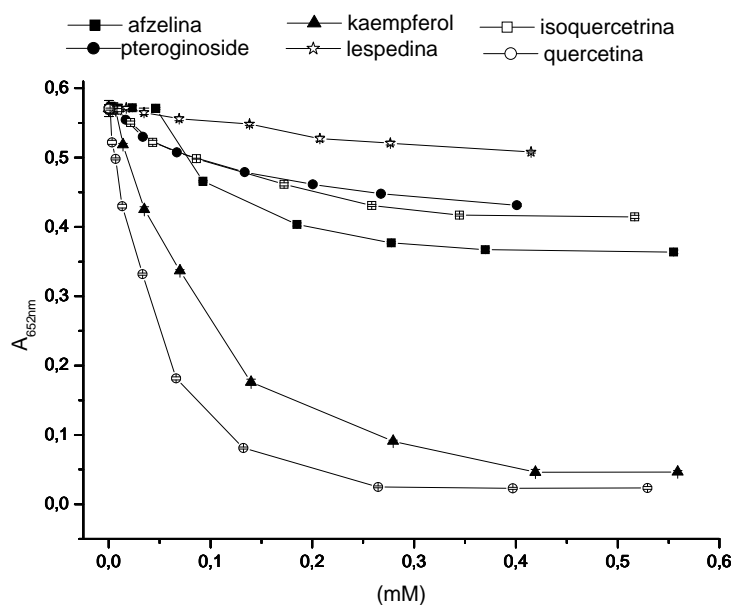


Figura 14. Ação *scavenger* de taurina-cloramina. Meio reacional: TauCl - 30 μ M; HOCl 30 μ M + Tau 5mM ; Tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4. Incubação de 10 min da TauCl com as amostras, adição de TMB 2,8mM e incubação de 5 minutos; $\lambda = 652$ nm.

Outra ERO importante no estresse oxidativo é o óxido nítrico, um radical derivado do nitrogênio e capaz de gerar um agente bastante agressor, o peróxinitrito. Assim, o NO^\bullet também é um alvo farmacológico importante para a ação dos flavonóides.

Para o estudo da ação sobre o óxido nítrico determinou-se, a partir da figura 15, o nível de NO^\bullet liberado na hidrólise do nitroprussiato de sódio como sendo $40 \mu\text{M}$.

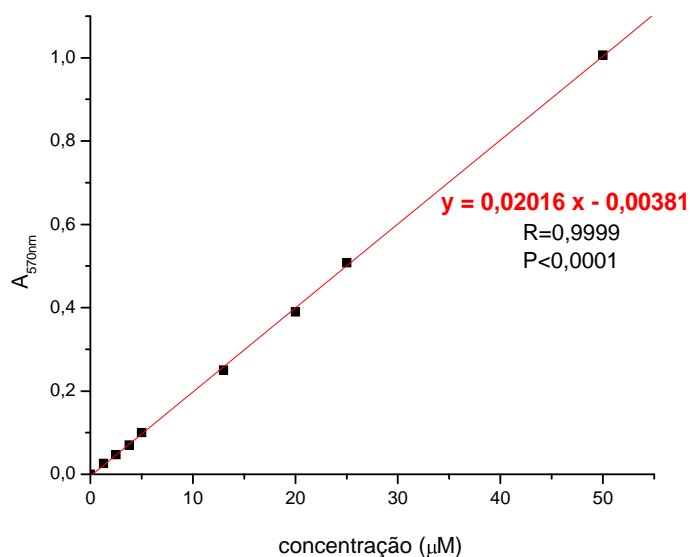


Figura 15. Curva analítica do Nitrito de sódio, ensaio com Reagente de Griess. Meio reacional: Nitroprussiato de sódio 25 mM; tampão fosfato de sódio 50mM, pH7,4; 334 μL de solução de nitrito de sódio + 200 μL de Reagente de Griess. Incubação de 5 minutos (ausência de luz).

Como pode ser observado na figura 16, a quercetina ($\text{IC}_{41} = 0,265 \text{ mM}$) mostrou-se o mais eficiente *scavenger* de óxido nítrico. A isoquercetrina apresentou potencial contra o NO semelhante ao do kaempferol (ambos com $\text{IC}_{21} = 0,172 \text{ mM}$), seguida da lespedida e pteroginoside os quais se assemelham como sequestradores de óxido nítrico ($\text{IC}_{16} = 0,185 \text{ mM}$). A afzelina mostrou ser o flavonóide menos eficiente contra o NO dentre os compostos avaliados ($\text{IC}_{07} = 0,185 \text{ mM}$). Estes dados revelam que agliconas com duas

hidroxilas no anel B são agentes importantes com atividade *scavenger* de NO. Observa-se também que dentre os flavonóides glicosídicos, a ausência de hidroxilas livres no núcleo difenilpropano reduz a atividade.

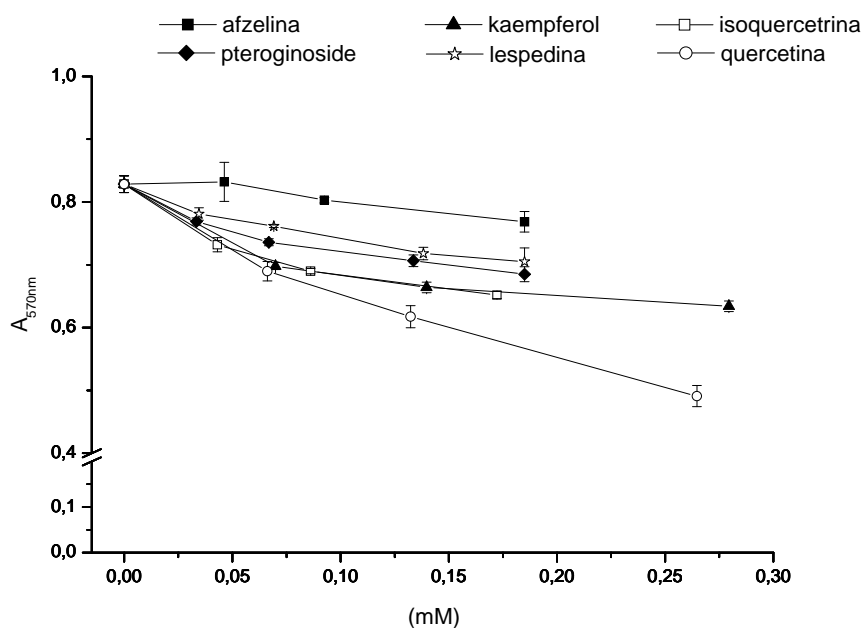


Figura 16. Ação *scavenger* de NO (40 µM). Meio reacional: Tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4; Nitroprussiato de sódio 25 mM. Incubação de 1 hora e 30 minutos (amostra + NO liberado em solução; ausência de luz); 334µL de solução da reação + 200µL de Reagente de Griess e Incubação de 5 minutos (ausência de luz); $\lambda = 570\text{nm}$.

4.2 Interações com mieloperoxidase

Além da ação direta sobre as ERO, os antioxidantes podem ter como mecanismo de ação a inibição da geração destas espécies pela interação com enzimas. Dentre as enzimas importantes do *oxidative burst* encontra-se a mieloperoxidase, que oxida diferentes substratos na presença de peróxido de hidrogênio. Assim, o estudo da inibição desta enzima é fator importante na caracterização do perfil de ação dos flavonóides deste estudo.

Realizou-se ensaio cinético com a MPO na presença de peróxido de hidrogênio utilizando-se guaiacol como substrato a ser oxidado. Pelos resultados obtidos sabe-se que as

amostras não interagem com H_2O_2 (Figura 12), sendo este um dado importante no estudo de inibição das peroxidases, pois significa que qualquer inibição que fosse observada não seria devida à captura de peróxido de hidrogênio pelas amostras.

Através dos resultados apresentados na figura 17 observou-se que as amostras são bons agentes inibidores da enzima mieloperoxidase. A quercetina ($IC_{50} = 0,012$ mM) mostra-se como o mais potente inibidor de MPO dentre os compostos testados, seguida do kaempferol ($IC_{50} = 0,035$ mM). O inibidor menos efetivo da MPO revelou-se como sendo a afzelina ($IC_{50} = 0,150$ mM). Com potencial inibitório intermediário encontram-se, em ordem decrescente, a isoquercetrina ($IC_{50} = 0,081$ mM), seguida do pteroginoside e lespedina que apresentaram ações semelhantes ($IC_{50} = 0,100$ mM). Observa-se através destes dados que a hidroxila OH-3 (anel C) é sítio importante para a interação com a MPO e sua conseqüente inibição.

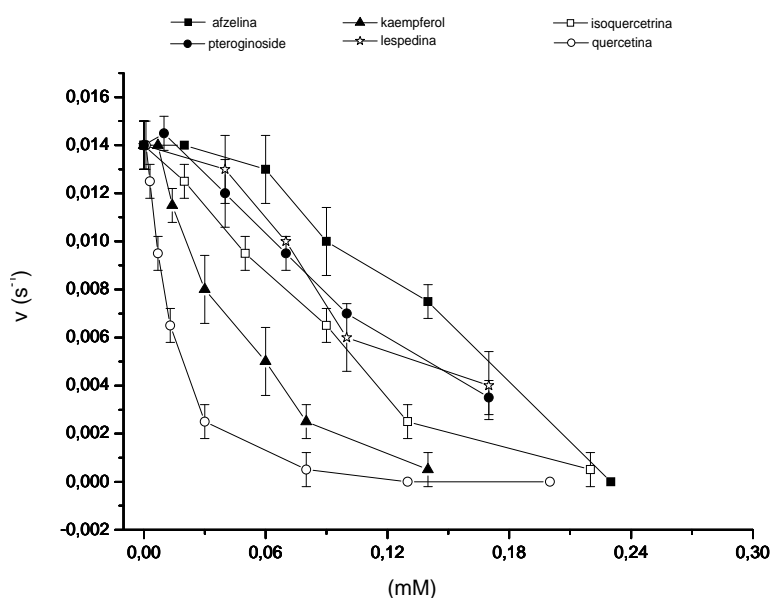


Figura 17. Inibição da oxidação do guaiacol 70 mM pela MPO 8 nM; tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4; 37°C; H_2O_2 0,3 mM; 1 minuto de reação; $\lambda = 470$ nm.

A MPO pode levar à formação de cloraminas à medida que gera o ácido hipocloroso que irá reagir com os grupos amino livre de aminoácidos. Um sistema interessante a ser abordado seria então a geração indireta de taurina cloramina pela mieloperoxidase na presença de peróxido de hidrogênio e íons cloreto em um meio contendo o aminoácido taurina. No estudo da geração enzimática (MPO/H₂O₂/Cl⁻) de HOCl com conseqüente formação de TauCl observou-se que a quercetina (IC₅₀ = 0,002 mM) foi o inibidor mais eficiente, seguida, em ordem decrescente, pelo kaempferol (IC₅₀ = 0,002 mM), pteroginosídeo (IC₅₀ = 0,005 mM), afzelina (IC₅₀ = 0,007 mM) e lespedina (IC₅₀ = 0,013 mM), sendo a isoquercetrina (IC₃₉ = 0,086 mM) o pior agente inibidor do sistema em questão (Figura 18).

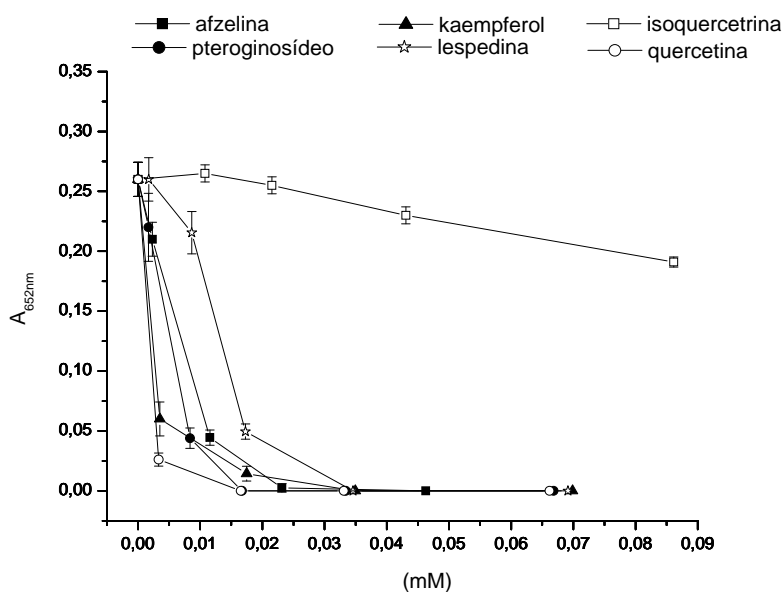


Figura 18. Inibição da geração de ácido hipocloroso/TauCl pela MPO: 37⁰C; tampão fosfato de sódio 50mM/NaCl 150mM, pH 7,4; Tau 5 mM, MPO 1 nM, H₂O₂ 0,1 mM; 10 minutos de reação; catalase 0,02 mg/mL; TMB – 2,8 mM; incubação de 5 minutos; $\lambda = 652$ nm.

A inibição observada pode ser fruto da interação direta dos flavonóides com as espécies reativas geradas nesse sistema (HOCl produzido enzimaticamente pela MPO e TauCl gerada através de reação do HOCl com taurina em solução) à medida que todas as amostras

foram efetivas contra tais ERO. Todas as amostras se apresentaram, nas condições de ensaio, como eficientes *scavengers* da espécie oxidante biológica HOCl (Figura 13). Os flavonóides mostraram também ação *scavenger* sobre TauCl, sendo kaemferol e quercetina os mais eficientes (Figura 14). Nesse caso, com o sistema enzimático MPO/H₂O₂/Cl⁻, tem-se inibição da reação pela inibição da MPO e/ou supressão do produto HOCl, na presença das amostras. Pode-se então, atribuir os efeitos observados na figura 18 ao conjunto dos mecanismos de ação dos flavonóides de *P. nitens*: i) ação direta sobre HOCl e TauCl e ii) inibição da MPO.

Foi estudado também o tipo de inibição que estaria sendo provocada pelos flavonóides sobre a cinética de oxidação do guaiacol catalisada pela mieloperoxidase. Os duplo-recíprocos (Figuras 19 a 24) fornecem os parâmetros cinéticos k_M (constante de Michaelis-Menten) e v_{Max} (velocidade máxima) que são utilizados na avaliação do tipo de inibição observada e são obtidos a partir da intersecção da reta com os eixos x e y. Tais parâmetros na ausência dos flavonóides estão contidos na tabela I, a qual ainda apresenta a equação geral das retas obtidas nos duplos-recíprocos e os respectivos valores dos coeficientes angulares (a) e lineares (b).

Tabela I. Parâmetros cinéticos da cinética de oxidação do guaiacol na ausência de inibidores.

| | a | b | k_M | v_{Max} |
|-----------------------|--------|---------------------------|-------|-----------|
| sem inibidor | 3209,8 | 35,9 | 89 | 0,028 |
| equação: $y = ax + b$ | | $x = -1/k_m$ $y = 1/vmax$ | | |

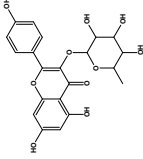
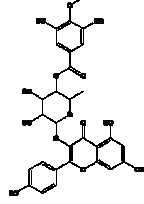
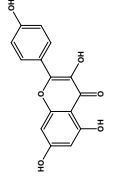
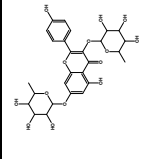
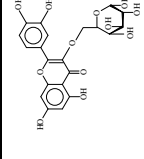
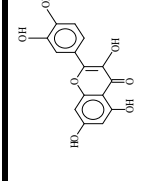
O resultado da inibição da cinética de oxidação do guaiacol catalisada pela MPO forneceu os valores aparentes dos parâmetros cinéticos estudados - k_M ap e v_{Max} ap - que são listados na tabela II, a qual apresenta ainda o tipo de inibição observado e a estrutura molecular de cada flavonóide estudado.

Os flavonóides agliconas, kaempferol e quercetina, apresentaram-se como típicos inibidores mistos, pois se observou elevação nos valores aparentes de k_M e redução nos valores aparentes de v_{Max} frente aos valores obtidos na ausência dos inibidores (Tabela II).

A quercetina havia sido caracterizada como inibidor competitivo por Pincemail e colaboradores em 1988 através do sistema no qual a o-dianisidina era utilizada como substrato para a MPO. Entretanto, neste trabalho atual, em que se utilizou mieloperoxidase purificada de neutrófilo humanos, caracterizou-se a quercetina como inibidor misto, quando o guaiacol foi utilizado como substrato.

Em relação aos dados apresentados na tabela II para os flavonóides glicosídicos observa-se redução nos valores aparentes de k_M de v_{Max} frente aos valores obtidos na ausência dos inibidores o que caracterizaria tais compostos como inibidores incompetitivos. Tal classificação não pode ser utilizada, entretanto, pois o gráfico duplo-recíproco característico para este tipo de inibição apresenta retas paralelas para as reações na ausência e presença de inibidor, diferentemente do que pode ser observado nas figuras 19, 20, 22 e 23. Na inibição incompetitiva, a ligação do inibidor aumenta a afinidade de ligação do substrato pelo sitio ativo da enzima (o que torna menor o valor de k_M), gera um complexo ternário inibidor-enzima-susbrato improdutivo e reduz a velocidade máxima possível de ser alcançada, o que caracteriza o tipo de inibição. Os valores obtidos na tabela II poderiam ser justificados, além da interação com a própria enzima, por uma possível interação dos flavonóides com o produto oxidado do guaiacol, o que daria a falsa impressão de que o sistema teria diminuída a sua capacidade de gerar o referido produto, levando à falsa interpretação da ocorrência de inibição incompetitiva através dos valores de k_M e v_{Max} .

Tabela II. Inibição da MPO: parâmetros cinéticos na presença dos inibidores, obtidos a partir dos gráficos 12 a 17.

| | a | b | $k_M \cdot ap$ | $v_{Max \cdot ap}$ | EFEITO DO INIBIDOR | TIPO DE INIBIÇÃO | ESTRUTURA MOLECULAR |
|--------------------------|---------|-------|----------------|--------------------|------------------------------|------------------|---|
| afzelina 0,5 µg/mL | 2165,7 | 78,3 | 28 | 0,013 | $k_{m \cdot ap} < k_m$ | ? |  |
| afzelina 2,5 µg/mL | 1746,6 | 105,4 | 17 | 0,009 | $V_{max \cdot ap} < V_{max}$ | | |
| pteroginósido 2,5 µg/mL | 2356,8 | 79,5 | 30 | 0,013 | $k_{m \cdot ap} < k_m$ | ? |  |
| pteroginósido 4,0 µg/mL | 1907,2 | 111,2 | 17 | 0,009 | $V_{max \cdot ap} < V_{max}$ | | |
| kaempferol 2,5 µg/mL | 3581,6 | 39,7 | 90 | 0,025 | $k_{m \cdot ap} > k_m$ | MISTA |  |
| kaempferol 4,0 µg/mL | 4065,1 | 41,9 | 97 | 0,024 | $V_{max \cdot ap} < V_{max}$ | | |
| lespedina 2,5 µg/mL | 2523,7 | 65,6 | 38 | 0,015 | $k_{m \cdot ap} < k_m$ | ? |  |
| lespedina 4,0 µg/mL | 2041,7 | 98,7 | 21 | 0,010 | $V_{max \cdot ap} < V_{max}$ | | |
| isoquercetrina 2,5 µg/mL | 2600,1 | 123 | 21 | 0,008 | $k_{m \cdot ap} < k_m$ | ? |  |
| isoquercetrina 4,0 µg/mL | 1973,8 | 197,8 | 10 | 0,005 | $V_{max \cdot ap} < V_{max}$ | | |
| quercetina 2,5 µg/mL | 5839,6 | 51,3 | 114 | 0,020 | $k_{m \cdot ap} > k_m$ | MISTA |  |
| quercetina 4,0 µg/mL | 10664,9 | 62,1 | 172 | 0,016 | $V_{max \cdot ap} < V_{max}$ | | |

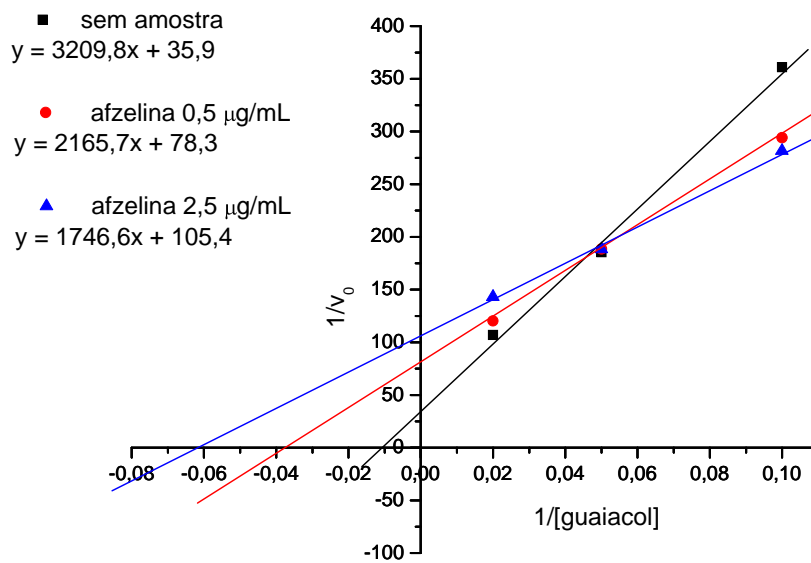


Figura 19. Gráfico Duplo-Recíproco da Inibição da MPO pela afzelina: MPO 5 nM; H_2O_2 0,3 mM; guaiaicol em concentrações variáveis; afzelina 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e 2,5 $\mu\text{g/mL}$; tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4; 37°C ; 1 minuto de reação; $\lambda = 470$ nm.

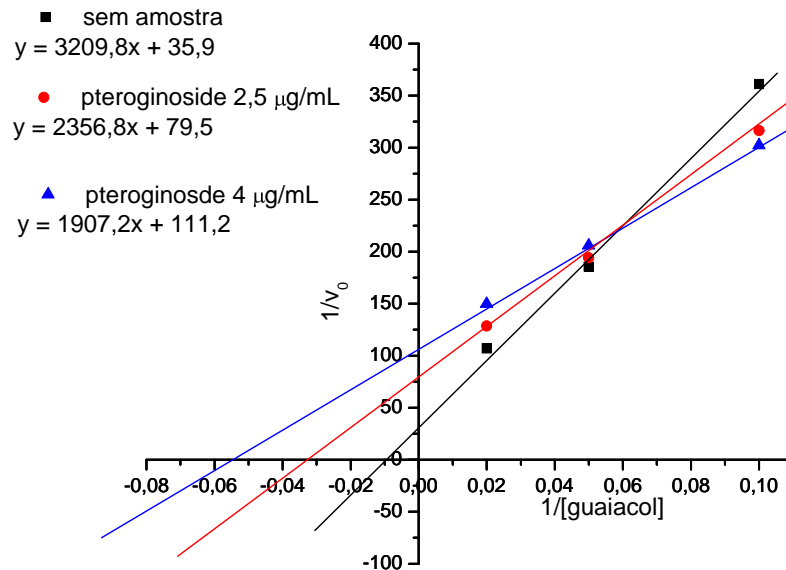


Figura 20. Gráfico Duplo-Recíproco da Inibição da MPO pelo pteroginoside: MPO 5 nM; H_2O_2 0,3 mM; guaiaicol em concentrações variáveis; pteroginoside 2,5 $\mu\text{g/mL}$ e 4,0 $\mu\text{g/mL}$; tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4; 37°C ; 1 minuto de reação; $\lambda = 470$ nm.

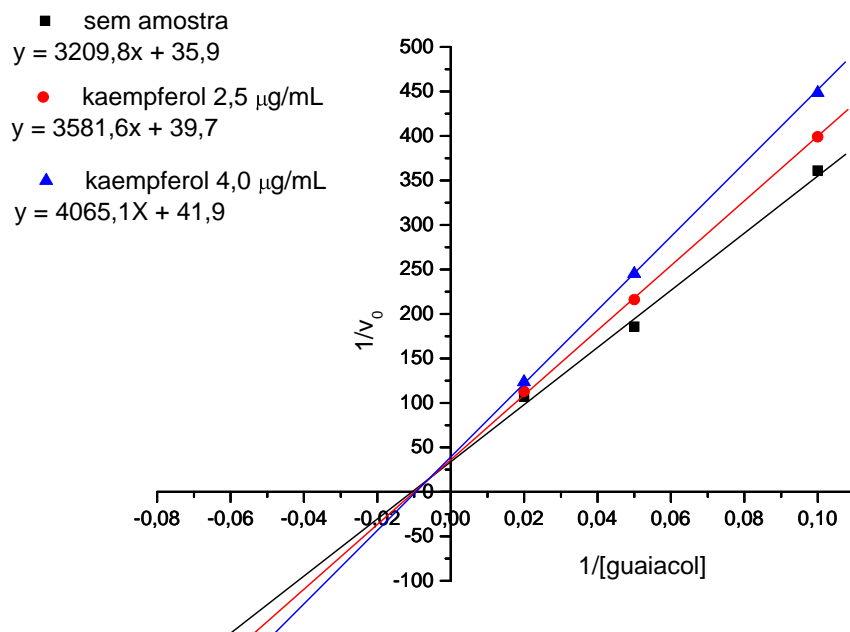


Figura 21. Gráfico Duplo-Recíproco da Inibição da MPO pelo kaempferol: MPO 5 nM; H_2O_2 0,3 mM; guaiacol em concentrações variáveis; kaempferol 2,5 $\mu\text{g/mL}$ e 4,0 $\mu\text{g/mL}$; tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4; 37°C; 1 minuto de reação; $\lambda = 470$ nm.

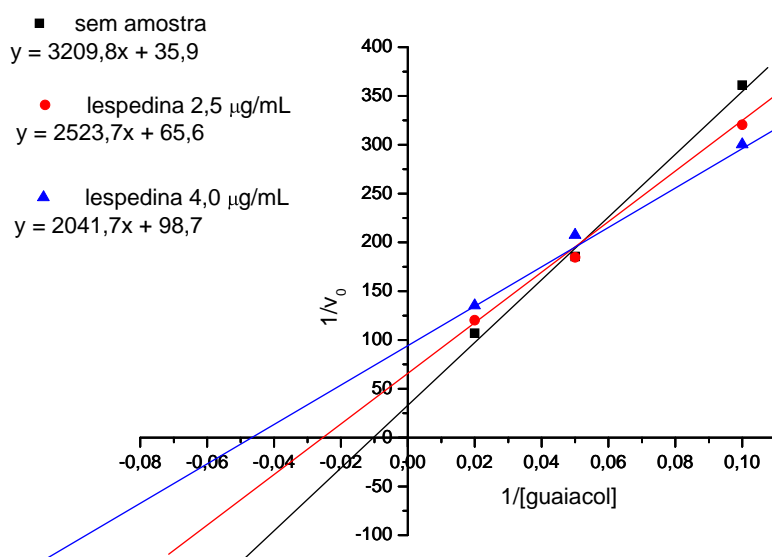


Figura 22. Gráfico Duplo-Recíproco da Inibição da MPO pela lespedina: MPO 5 nM; H_2O_2 0,3 mM; guaiacol em concentrações variáveis; lespedina 2,5 $\mu\text{g/mL}$ e 4,0 $\mu\text{g/mL}$; tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4; 37°C; 1 minuto de reação; $\lambda = 470$ nm.

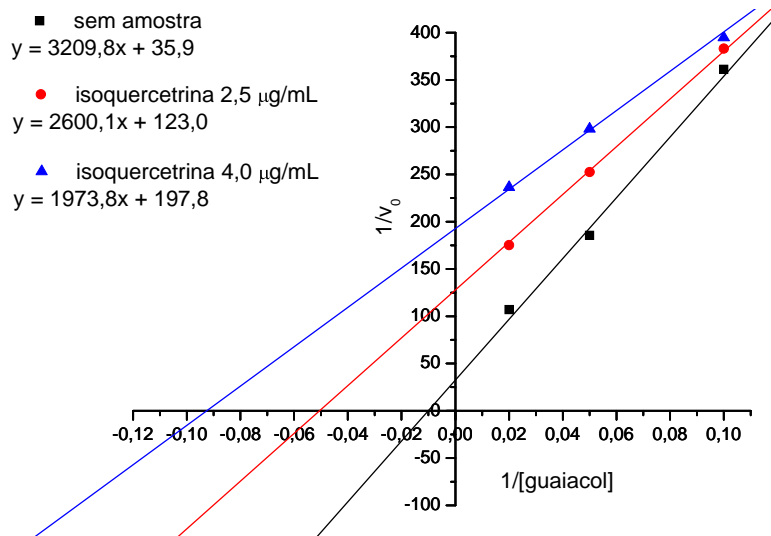


Figura 23. Gráfico Duplo-Recíproco da Inibição da MPO pela isoquercetrina: MPO 5 nM; H_2O_2 0,3 mM; guaiacol em concentrações variáveis; isoquercetrina 2,5 $\mu\text{g/mL}$ e 4,0 $\mu\text{g/mL}$; tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4; 37°C; 1 minuto de reação; $\lambda = 470$ nm.

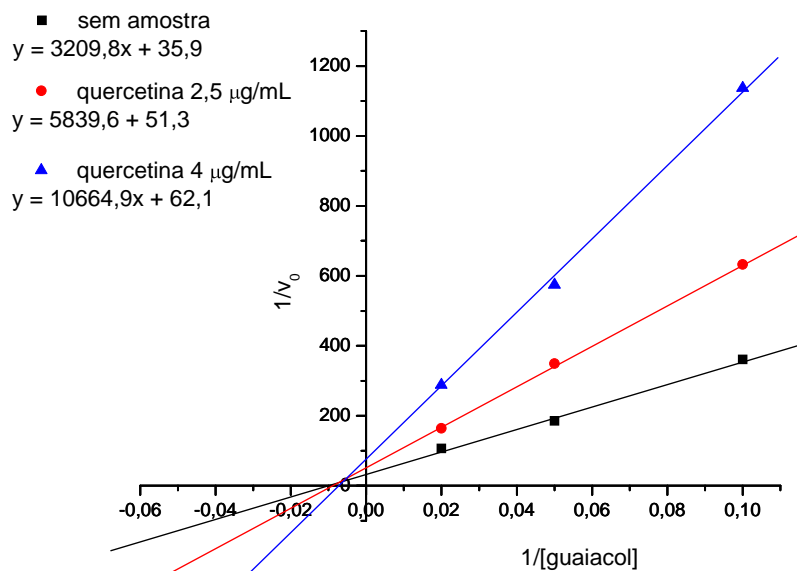


Figura 24. Gráfico Duplo-Recíproco da Inibição da MPO pela quercetina: MPO 5 nM; H_2O_2 0,3 mM; guaiacol em concentrações variáveis; quercetina 2,5 $\mu\text{g/mL}$ e 4,0 $\mu\text{g/mL}$; tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4; 37°C; 1 minuto de reação; $\lambda = 470$ nm.

A fim de se compreender melhor a ação dos flavonóides sobre a mieloperoxidase, estudou-se a ação dos flavonóides sobre a HRP, uma peroxidase clássica em estudos de oxidação de xenobióticos por peroxidases, sendo que, em reações catalisadas por peroxidases em geral, a HRP é frequentemente utilizada como modelo (KHALIL, 2002). Desta forma, como meio de avaliar se há especificidade absoluta na inibição das amostras pela MPO, realizou-se estudo de inibição da HRP através do ensaio de oxidação do guaiacol na presença de peróxido de hidrogênio.

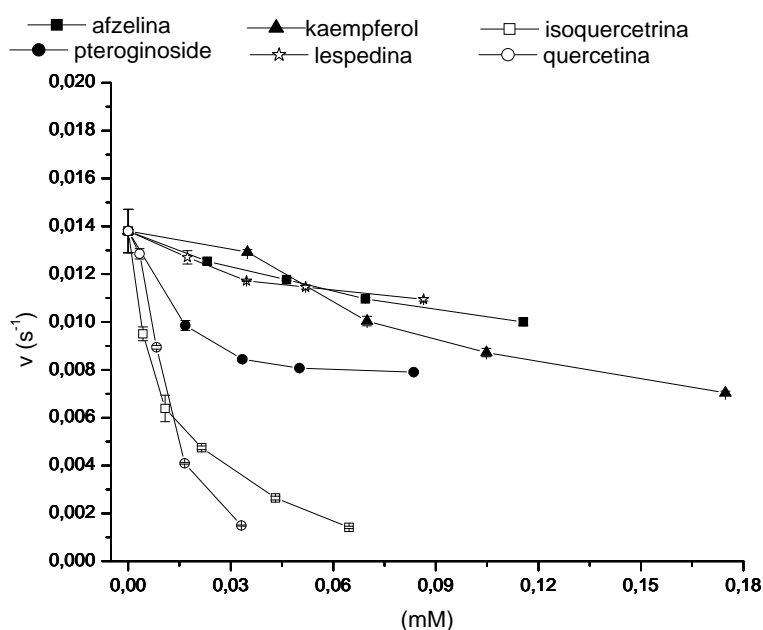


Figura 25. Inibição da oxidação do guaiacol 2 mM pela HRP 7 nM; tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4; 37°C; H₂O₂ 0,1 mM; 2 minutos de reação; $\lambda = 470$ nm.

Como pode ser observado na figura 25, os flavonóides estudados também apresentam a capacidade de inibir a HRP, uma peroxidase de origem vegetal, cujo grupo prostético (ferriprotoporfirina IX) não se apresenta ligado covalentemente às cadeias laterais dos aminoácidos que formam o sítio ativo da enzima. Os dados mostram ação semelhante para a afzelina e lespedina ($IC_{21} = 0,090$ mM), seguidas do

ligeiramente mais eficiente kaempferol ($IC_{37} = 0,105$ mM), sendo estes os compostos menos eficientes como inibidores neste sistema. Apresentando maior eficiência estão a quercetina ($IC_{50} = 0,010$ mM e $IC_{90} = 0,033$ mM) e a isoquercetrina ($IC_{50} = 0,010$ mM e $IC_{73} = 0,033$ mM), sendo a quercetina o melhor inibidor. O pteroginoside ($IC_{43} = 0,083$ mM) apresenta-se com potencial inibitório intermediário aos dois grupos de compostos mencionados. A partir destes dados pode-se inferir que há participação importante do anel B na interação com o sítio ativo da HRP, a qual se torna aumentada com a presença de duas hidroxilas neste anel.

A HRP é uma enzima muito útil devido a sua fácil obtenção e custo reduzido relativo a peroxidases animais, sendo importante para a avaliação de diferentes substâncias como substratos de peroxidases. A HRP, na presença de peróxido de hidrogênio e de um substrato, tem inicialmente queda da absorbância em 403 nm e elevação em 420 nm (formação do composto II) e com a formação do produto, ao final do ciclo, observa-se elevação da absorbância em 403 nm e queda em 420 nm indicando o retorno da HRP à sua forma nativa.

Os flavonóides foram então avaliados como possíveis substratos de peroxidases utilizando-se das propriedades espectrofotométricas relatadas para esta enzima. As figuras 26 a 31 mostram a ocorrência de alteração conformacional da HRP, avaliada através de espectrofotometria, na presença dos compostos estudados, o que, portanto, os caracteriza como substratos de peroxidase (proporcionaram a ocorrência do ciclo catalítico clássico da HRP), a despeito dos tempos relativamente elevados para o retorno da enzima à sua forma nativa quando comparados a ótimos substratos como o luminol e guaiacol por exemplo (KHALIL, 2002).

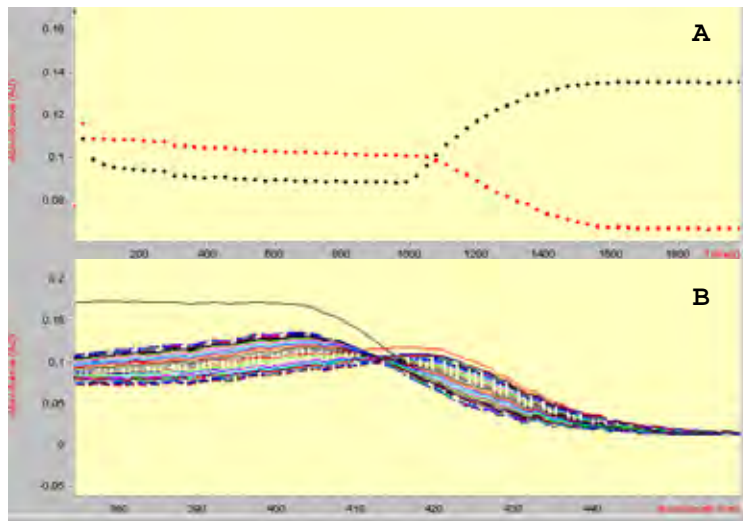


Figura 26. Ciclo catalítico clássico da HRP: estudo da afzelina como substrato de peroxidases; HRP 1,8 μ M; tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4; 37⁰C; H₂O₂ 15 μ M; afzelina 2,5 μ g/mL; minutos de reação. Gráfico 19A: λ = 403 nm (●●●●) e 420 nm (●●●●).

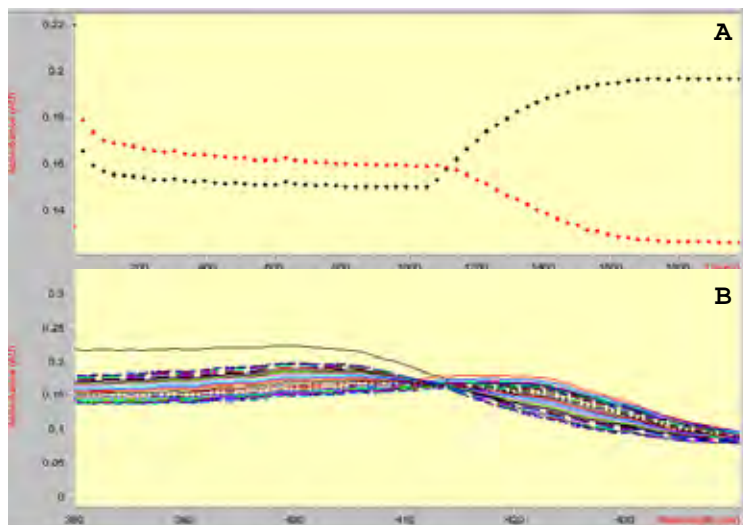


Figura 27. Ciclo catalítico clássico da HRP: estudo do pteroginósido como substrato de peroxidases; HRP 1,8 μ M; tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4; 37⁰C; H₂O₂ 15 μ M; pteroginósido 2,5 μ g/mL; minutos de reação. Gráfico 20A: λ = 403 nm (●●●●) e 420 nm (●●●●).

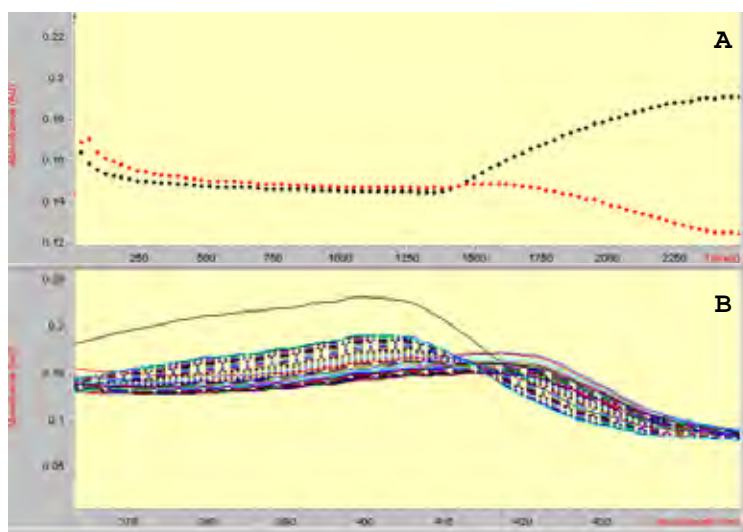


Figura 28. Ciclo catalítico clássico da HRP: estudo do kaempferol como substrato de peroxidases; HRP 1,8 μ M; tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4; 37 $^{\circ}$ C; H₂O₂ 15 μ M; kaempferol 2,5 μ g/mL; minutos de reação. Gráfico 21A: λ = 403 nm (●●●●) e 420 nm (●●●●).

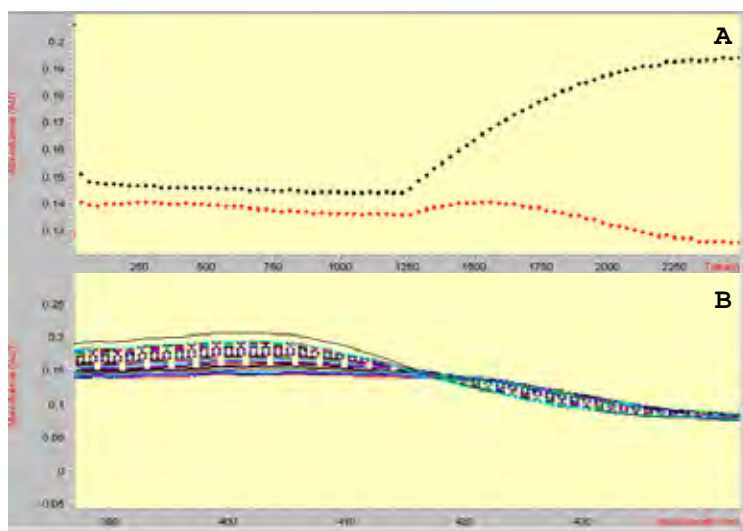


Figura 29. Ciclo catalítico clássico da HRP: estudo da lespedina como substrato de peroxidases; HRP 1,8 μ M; tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4; 37 $^{\circ}$ C; H₂O₂ 15 μ M; lespedina 2,5 μ g/mL; minutos de reação. Gráfico 22A: λ = 403 nm (●●●●) e 420 nm (●●●●).

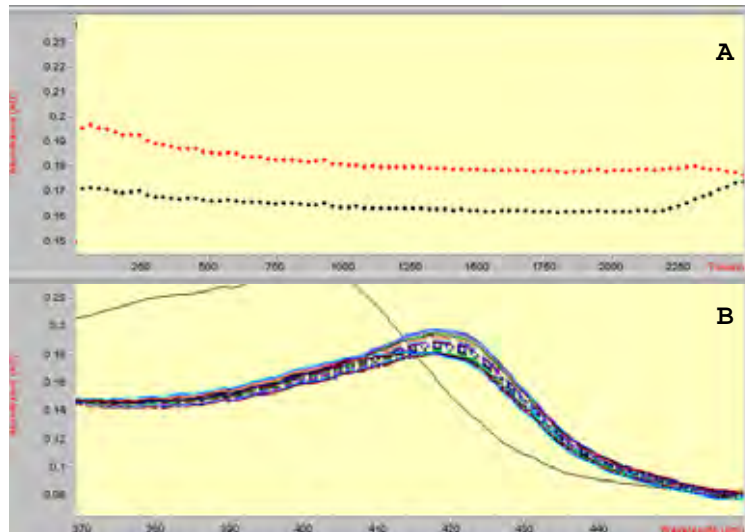


Figura 30. Ciclo catalítico clássico da HRP: estudo da isoquercetina como substrato de peroxidases; HRP 1,8 μ M; tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4; 37⁰C; H₂O₂ 15 μ M; isoquercetina 2,5 μ g/mL; minutos de reação. Gráfico 23A: $\lambda = 403$ nm (●●●●) e 420 nm (●●●●).

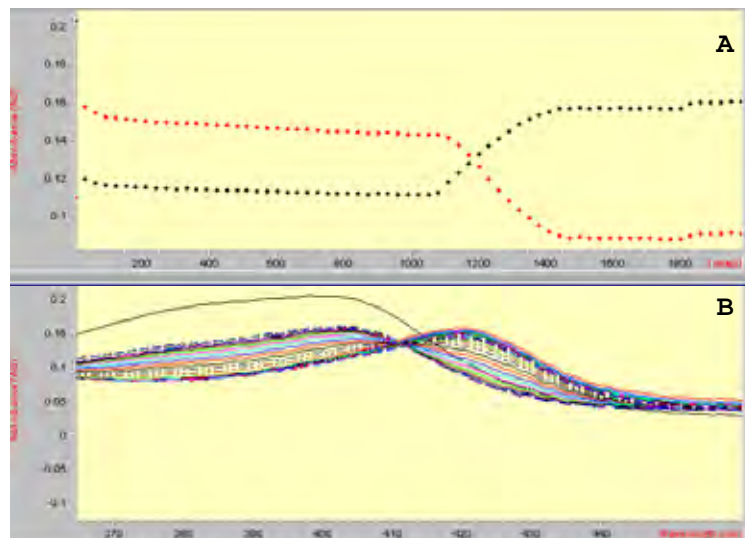


Figura 31. Ciclo catalítico clássico da HRP: estudo da quercetina como substrato de peroxidases; HRP 1,8 μ M; tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4; 37⁰C; H₂O₂ 15 μ M; quercetina 2,5 μ g/mL; minutos de reação. Gráfico 24A: $\lambda = 403$ nm (●●●●) e 420 nm (●●●●).

Através da figura 32 observou-se que as amostras são capazes de inibir a oxidação do guaiacol por peroxidases pela interação com o grupo Heme das mesmas. Nestes ensaios (Figura 32) observou-se maior inibição proporcionada pela quercetina ($IC_{50} = 0,008$ mM), seguida, em ordem decrescente de inibição, da isoquercetrina ($IC_{50} = 0,013$ mM), lespedina ($IC_{50} = 0,032$ mM), kaempferol ($IC_{50} = 0,048$ mM) e afzelina ($IC_{50} = 0,109$ mM). Quanto ao pteroginosídeo ($IC_{50} = 0,023$ mM e $IC_{73} = 0,112$ mM), observa-se ação semelhante à da isoquercetrina em baixas concentrações e proporcionalmente aos demais compostos, eficiência drasticamente diminuída em concentrações maiores.

Assim como observado no ensaio de oxidação do guaiacol pela HRP, observa-se novamente, com estes resultados, a importância das duas hidroxilas livres no anel B dos flavonóides para a interação dos mesmos com o sítio ativo de peroxidases, do qual o grupo Heme faz parte.

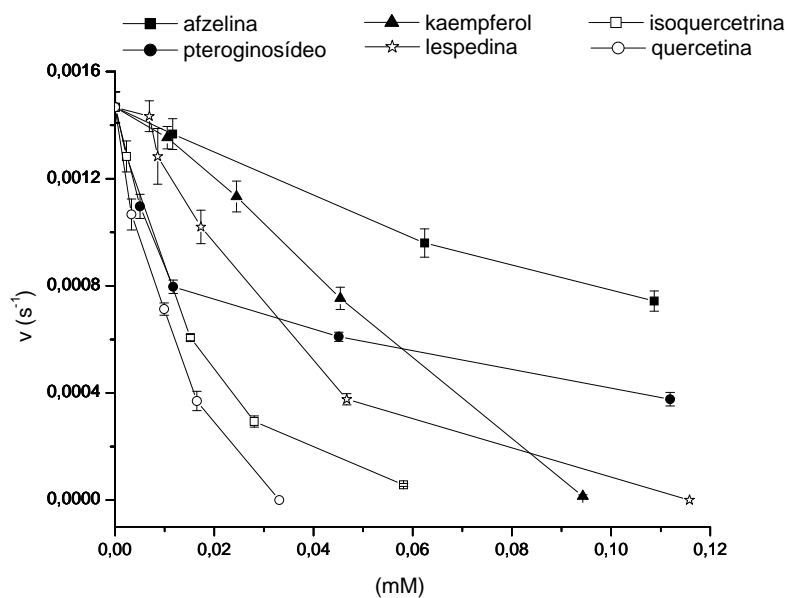


Figura 32. Inibição da oxidação do guaiacol 8 mM pela Hemina 3,3 μ M, H₂O₂ 3,3 mM; tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4; 37°C; H₂O₂ 0,1 mM; 2 minutos de reação; $\lambda = 470$ nm.

Os flavonóides estudados são inibidores da mieloperoxidase com potencial como substratos de peroxidases e que interagem de diferentes maneiras com a HRP e MPO, seja nos respectivos sítios catalíticos formados pelo grupo prostético ou em outras partes das estruturas protéicas. Como parte dos estudos de inibição de peroxidases pelos metabólitos isolados da *P. nitens*, optou-se pela realização da cinética de oxidação do guaiacol pelo grupo prostético de peroxidases, a ferriprotoporfirina IX, em sua forma livre (Hemina), a fim de se avaliar a interação dos compostos com as peroxidases em seus sítios ativos via uma possível interação com o grupamento Heme.

È interessante ressaltar que nenhum dos efeitos inibitórios dos flavonóides sobre a MPO, HRP e Hemina podem ser atribuídos a uma possível interação dos produtos naturais com o peróxido de hidrogênio, o que reduziria a disponibilidade desta ERO ao sistema enzimático e levaria à inibição do mesmo.

4.3 Interações com células

No estudo bioquímico da interferência de xenobióticos em processos oxidativos julgou-se necessária a avaliação da ação dos mesmos em células animais. Para tanto, optou-se por estudar a ação sobre eritrócitos de seres humanos, dada a susceptibilidade dos mesmos a radicais livres e outras ERO e aos efeitos que o dano oxidativo sobre tais células podem acarretar ao organismo humano, sendo estas células responsáveis pelo transporte de oxigênio entre os tecidos.

Em um primeiro momento, buscou-se avaliar se as amostras por si só apresentariam algum potencial citotóxico sobre os eritrócitos. Elas foram avaliadas em diferentes concentrações na presença dos eritrócitos em diferentes tempos de incubação (Figuras 33 e 34).

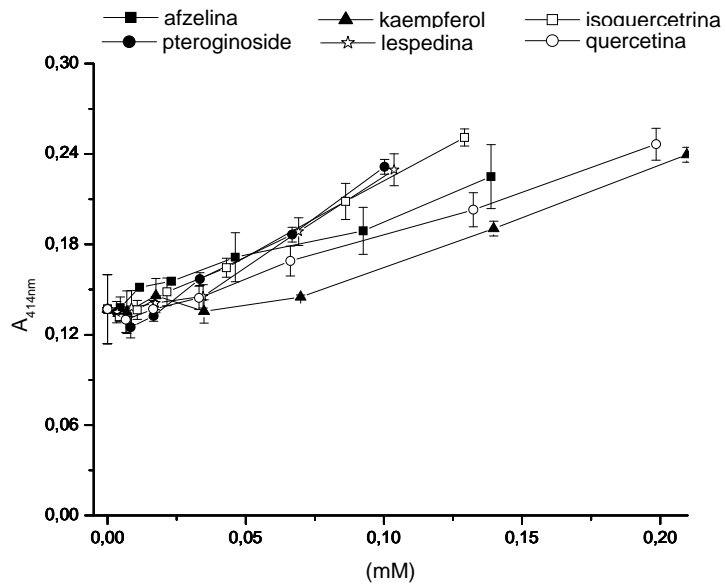


Figura 33. Ação hemolítica dos compostos naturais: suspensão de eritrócitos 5%; 2 horas e meia de incubação; 37°C; tampão fosfato de sódio 10mM/NaCl 150mM, pH 7,4; $\lambda = 414$ nm.

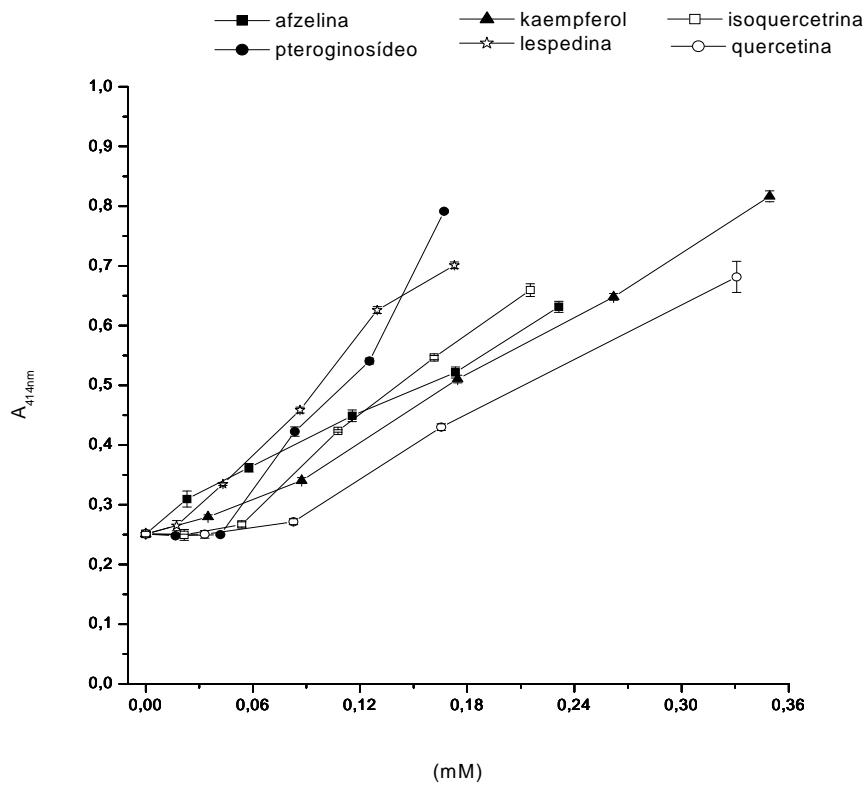


Figura 34. Ação hemolítica dos compostos naturais: suspensão de eritrócitos 5%; 4 horas de incubação; 37°C; tampão fosfato de sódio 10mM/NaCl 150mM, pH 7,4; $\lambda = 414$ nm.

Através das figuras 33 e 34, observou-se que as amostras são bons agentes hemolíticos e, portanto capazes de prejudicar o sistema de transporte de oxigênio via eritrócitos. A hemólise observada é intensificada à medida que se elevam as concentrações das amostras e o tempo de incubação, sendo que as amostras glicosídicas apresentam potencial hemolítico superior aos das agliconas (kaempferol e quercetina). Isto pode indicar a importância (mas não essencialidade) dos carboidratos ligados como sítios de interação com marcadores de superfície dos eritrócitos facilitando o desarranjo da estrutura da membrana plasmática destas células e levando à instabilidade do meio intracelular pela abertura de poros e alteração osmótica, culminando na lise constatada.

A citotoxicidade apresentada sobre eritrócitos, associada ao potencial inibitório de peroxidases e ERO, desperta interesse à medida que o potencial benéfico dos flavonóides apresenta, portanto, restrição quanto à aplicação dos mesmos na terapêutica.

Dados os resultados até aqui apresentados indagou-se quais seriam os efeitos sobre os eritrócitos quando os flavonóides estivessem presentes junto aos radicais livres e outras ERO. Desta forma, estudou-se a hemólise na presença dos flavonóides e radical livre AAPH e dos flavonóides em presença do ácido hipocloroso.

Numerosas pesquisas têm utilizado os eritrócitos como modelo para o estudo do dano oxidativo de membranas biológicas. Em muitos destes estudos, são utilizados radicais livres de fase aquosa, tais como o *2,2'-azo-bis (2-amidinopropane) dihydrochloride* (AAPH), capazes de atacar membranas eritrocitárias causando lipoperoxidação e promovendo hemólise (ZHU et al., 2002).

A figura 35 mostra que na ausência dos flavonóides o radical AAPH apresenta grande ação hemolítica sendo que a ocorrência de hemólise é reduzida com a adição dos flavonóides de forma dose-dependente. Isto pode ser explicado por uma

possível afinidade entre os flavonóides e o radical de intensidade tal que torne praticamente inexistente a interação dos flavonóides com as células e reduza a interação destas com o radical. Com isso, há formação de produto(s) menos hemolítico(s).

Na hemólise promovida pelo radical AAPH, o pteroginoside ($IC_{50} = 0,0022$ mM) apresentou o melhor potencial protetor com valores próximos aos da quercetina ($IC_{50} = 0,0035$ mM) e afzelina ($IC_{50} = 0,0035$ mM), seguidos do kaempferol ($IC_{50} = 0,0053$ mM) e lespedina ($IC_{50} = 0,0063$ mM). A isoquercetrina ($IC_{50} = 0,0230$ mM) apesar de também ter sido efetiva na inibição da hemólise apresentou o menor potencial de ação.

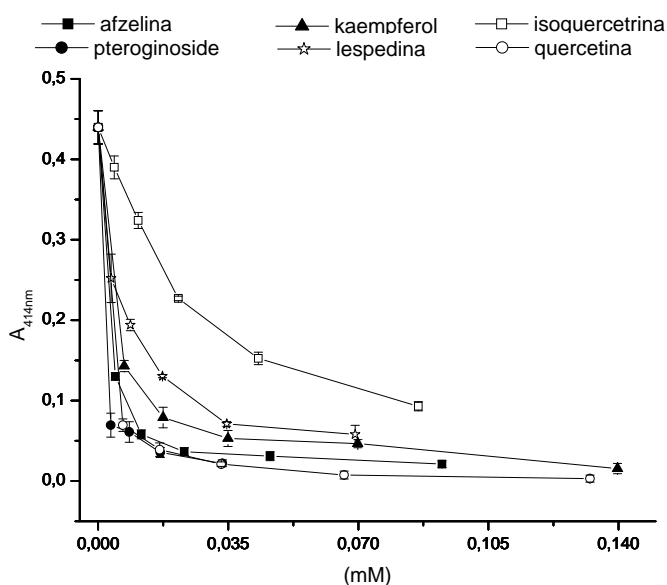


Figura 35. Ação dos compostos naturais sobre a hemólise promovida pelo radical AAPH 25 mM: suspensão de eritrócitos 5%; 2 horas e meia de incubação; 37°C; tampão fosfato de sódio 10mM/NaCl 150mM, pH 7,4; $\lambda = 414$ nm.

As células vermelhas do sangue também têm sido amplamente utilizadas no estudo do dano celular promovido por neutrófilos ativados, sendo que a hemólise não é um processo causado primariamente por cloraminas, mas sim, um dano

dependente do ácido hipocloroso, sendo este o principal agente responsável por promover a lise dos eritrócitos (VISSERS et al., 1998).

Na presença do ácido hipocloroso, as amostras tiveram exacerbados seu potencial hemolítico, bem como promoveram mais danos do que o próprio ácido hipocloroso sozinho. Observou-se nas figuras 34 e 36 que o kaempferol na ausência de HOCl foi o flavonóide menos lesivo aos eritrócitos, mas na presença de HOCl passou a ser um dos mais hemolíticos.

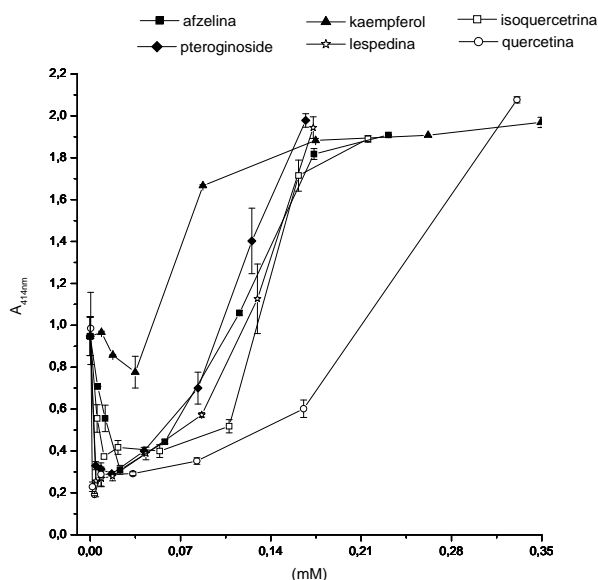


Figura 36. Ação dos compostos naturais sobre a hemólise promovida pelo HOCl 100 μ M: suspensão de eritrócitos 5%; 4 horas de incubação; 37°C; tampão fosfato de sódio 10mM/NaCl 150mM, pH 7,4; $\lambda = 414$ nm.

A exacerbação da hemólise apresentada na figura 36 para todas as amostras pode ser devida ao sinergismo entre as ações dos flavonóides e do oxidante ou ainda devido à formação de produtos mais lesivos às células que se formaram com a reação de cada um dos flavonóides com o ácido hipocloroso. Nas menores concentrações de flavonóides parece haver uma proteção, mas, provavelmente, com o aumento da concentração de cada flavonóide há também aumento na concentração do

seu produto formado que a partir de um dado nível passa a ter sua ação hemolítica revelada pelo sistema.

È importante destacar que os agentes antioxidantes ora estudados poderão, portanto, apresentar efeito benéfico ou prejudicial ao dano oxidativo frente às diferentes espécies reativas presentes, dependendo da afinidade pelas mesmas e também da inocuidade do produto formado pela reação do flavonóide com o radical livre e outras ERO.

Além dos eritrócitos, células alvo de ERRO, mas que não produzem tais espécies, optou-se por estudar a ação dos flavonóides também sobre neutrófilos, sendo estes, importantes sistemas geradores de ERO através do *oxidative burst* e componentes importantes de lesão tecidual em processos inflamatórios exacerbados. Este estudo foi avaliado através da produção de TauCl por neutrófilos estimulados com PMA (Figura 37). A inibição deste sistema foi alcançada de forma mais eficiente pela quercetina ($IC_{50} = 0,007$ mM). O pteroginosídeo, o kaempferol e a lespedina apresentaram mesmo potencial de ação ($IC_{50} = 0,017$ mM). Os compostos que provocaram menor inibição foram a isoquercetrina ($IC_{50} = 0,031$ mM) e a afzelina ($IC_{50} = 0,045$ mM).

Os resultados obtidos na figura 37 são explicados por uma série de mecanismos que ocorreriam em conjunto nos neutrófilos ativados, a saber: **i)** ação direta sobre as ERO geradas no *oxidative burst*, incluindo o ânion superóxido (inicialmente gerado pela NADPH oxidase da membrana das células e que gera o peróxido utilizado pela mieloperoxidase), o HOCl (gerado pela MPO do fagolisossoma), cloraminas (geradas com a reação do HOCl com resíduos de aminoácidos), óxido nítrico (produzido no citoplasma) e radicais gerados pelas reações destas ERO com outros grupos de moléculas presentes nos neutrófilos; **ii)** inibição da geração do ácido hipocloroso e oxidação de biomoléculas através da inibição da enzima mieloperoxidase;

iii) citotoxicidade sobre os neutrófilos desestruturando a cascata geradora de ERO (seria esta uma possibilidade?). Não se pode deixar de levar em consideração a interação dos flavonóides com ânion superóxido gerando peróxido de hidrogênio e quinonas que ao reagirem com o oxigênio molecular regeneram o ânion superóxido.

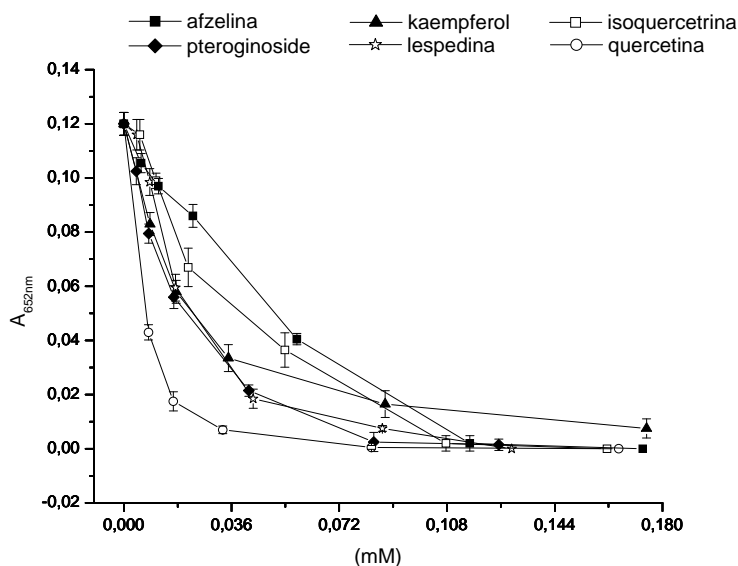


Figura 37. Ação dos compostos naturais sobre a geração de ERO por neutrófilos: suspensão de neutrófilos $2,8 \cdot 10^6$ células/mL; Tau 5mM, PMA $2,5 \cdot 10^{-7}$ mol/L, TMB 2,8 mM; 30 minutos de incubação; 37°C ; tampão PBS-D, pH 7,4; $\lambda = 652$ nm.

Uma possível toxicidade aos neutrófilos passou então a ser de interesse a fim de validar a hipótese explicativa para a inibição observada na figura 37. Dada a praticidade, sensibilidade e reprodutibilidade do método, optou-se pela determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LD) no sobrenadante da suspensão de neutrófilos, como molécula marcadora de dano celular.

A suspensão de neutrófilos utilizada nos ensaios foi, então, congelada por 12 horas e descongelada no momento do uso a fim de que houvesse lise de todos os neutrófilos e a enzima LD fosse obtida no sobrenadante após centrifugação por 10 minutos em 2500 rpm. A LD foi então dosada nesse sobrenadante na ausência e na

presença dos flavonóides em diferentes concentrações. Observou-se que para todas as amostras, o nível de LD diminuía com o aumento da concentração dos flavonóides de tal forma a atingir níveis inferiores aos basais observados na ausência de componentes citotóxicos. A explicação de tal fato se dá pela inibição da enzima lactato desidrogenase pelos flavonóides. Tal situação impossibilita a utilização da LD como marcador de citotoxicidade.

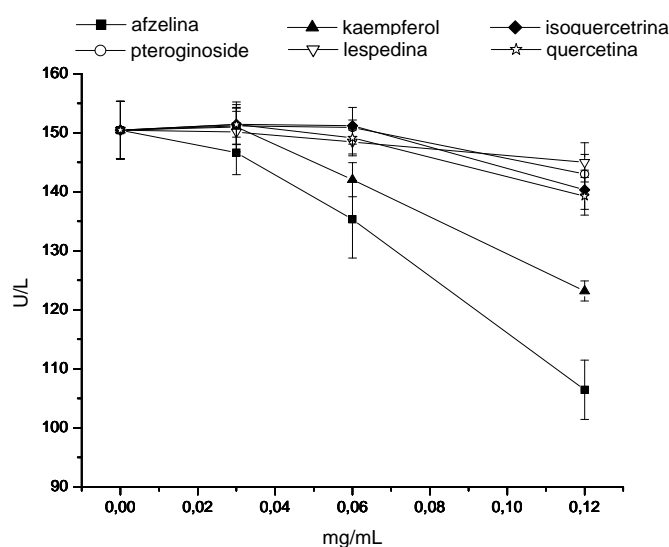


Figura 38. Inibição da enzima lactato desidrogenase no extrato bruto de neutrófilos de ratos pelos compostos naturais: sobrenadante da suspensão de neutrófilos 1.10^6 células/mL após congelamento/descongelamento; 2 horas de incubação; 37°C ; tampão PBS-D, pH 7,4; $\lambda = 500$ nm.

A fim de se esclarecer um possível efeito citotóxico dos compostos naturais em questão como uma das possíveis razões para a inibição do *oxidative burst* optou-se por um segundo método, a coloração dos neutrófilos com corante supra-vital azul de Trypan, o qual cora as células que sofreram dano a ponto de desestruturar a membrana citoplasmática e permitir a entrada do corante no citoplasma da célula (o corante não penetra a célula íntegra). Os ensaios foram realizados na ausência e na presença dos flavonóides, bem como na ausência e presença da ativação dos neutrófilos

através do estímulo solúvel PMA que desencadeia o *oxidative burst* nessas células

(Figura 39).

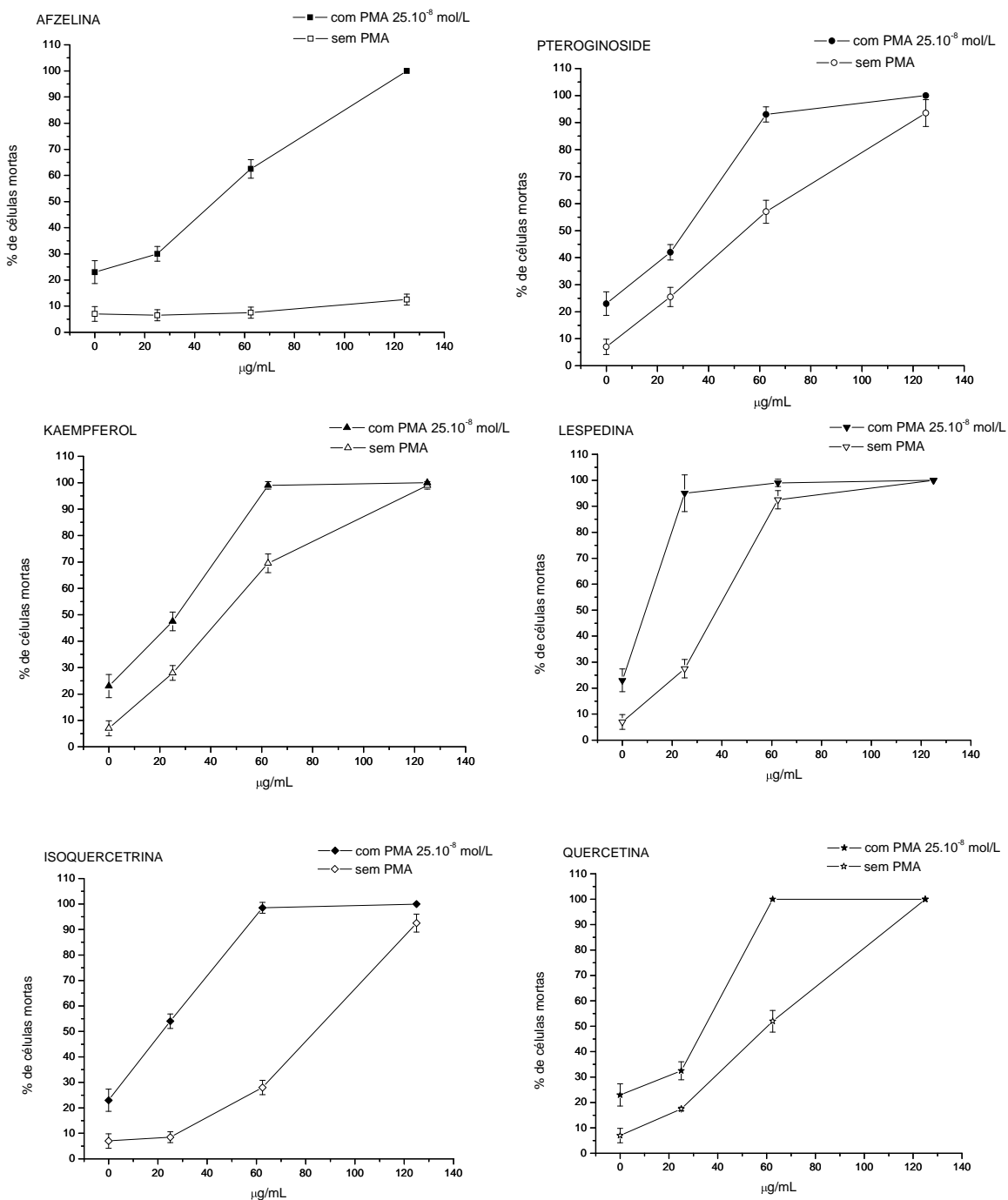


Figura 39. Citotoxicidade dos compostos naturais sobre neutrófilos – teste com corante supra-vital Azul de Trypan: suspensão de neutrófilos 1.10^6 células/mL; PMA $2,5.10^{-7}$ mol/L, 2 horas de incubação; 37^0 C; tampão PBS-D, pH 7,4; microscopia óptica em câmara hematimétrica.

Os resultados mostrados na figura 39 mostram que as amostras de forma dose-dependente são citotóxicas aos neutrófilos, segundo a seguinte ordem decrescente de citotoxicidade: lespedina > pteroginosídeo > isoquercetrina > kaempferol > quercetina > afzelina (tabela III). Fica clara também, pela figura 39, a exacerbação do dano provocado pelas amostras aos quando o *oxidative burst* é iniciado com a adição de PMA.

Qualquer um dos flavonóides promoveu em uma mesma concentração danos superiores quando da ocorrência do *oxidative burst*. Isto se deve, provavelmente, à formação de produtos mais tóxicos seja a partir da reação dos flavonóides com as ERO geradas pelos neutrófilos ativados, ou ainda, pela transformação enzimática dos compostos via MPO. Anion superóxido, peróxido de hidrogênio e quinonas (que se complexariam, formando agregados insolúveis) são possíveis produtos a se formarem. Outra hipótese provável seria a ocorrência de sinergismo entre a toxicidade de cada um dos flavonóides com o efeito da ativação dos neutrófilos.

Tabela III. Morte de neutrófilos inativos e ativados provocada pelos flavonóides.

| | mg/mL | mM | porcentagem de neutrófilos mortos (%) | |
|----------------|-------|------|---------------------------------------|----------|
| | | | inativos | ativados |
| afzelina | 0,125 | 0,29 | 13 | 100 |
| pteroginoside | 0,063 | 0,11 | 57 | 94 |
| kaempferol | 0,063 | 0,22 | 70 | 100 |
| lespedina | 0,025 | 0,04 | 28 | 95 |
| isoquercetrina | 0,063 | 0,14 | 28 | 99 |
| quercetina | 0,063 | 0,21 | 52 | 100 |

Avaliando-se os dados apresentados nos diferentes sistemas estudados, os produtos gerados da interferência dos flavonóides no *oxidative burst* poderiam ser obtidos a partir da reação destes flavonóides com quaisquer ERO, à medida que todas as amostras mostraram ser capazes de interagir com diferentes radicais livres e espécies reativas não-radicalares.

Observou-se a importância de se estudar um perfil de ação bioquímica, pois, a despeito do que é habitual de se encontrar em trabalhos semelhantes, definiu-se efeitos das atividades dos flavonóides traçadas em seu mecanismo da ação, buscando a compreensão da interferência dos mesmos em processos oxidativos simples a processos oxidativos mais complexos como os observados nos sistemas celulares (Figura 40).

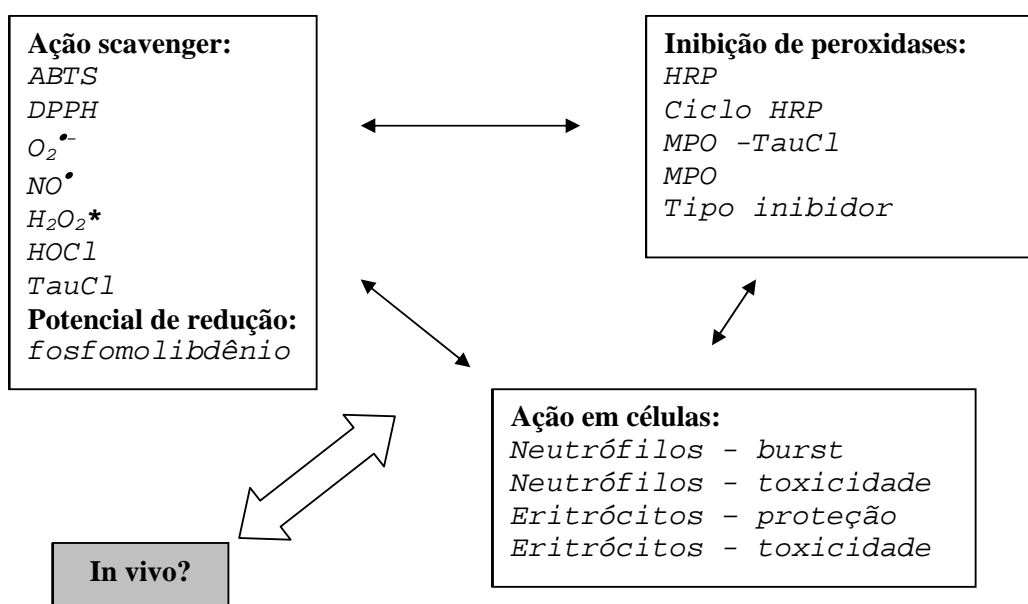


Figura 40. Perfil de ação sobre processos oxidativos na compreensão do mecanismo de ação dos flavonóides.

Tal estudo visa contribuir com o que já se conhece acerca da complicada bioquímica dos flavonóides buscando-se a possibilidade de aplicação terapêutica dos mesmos e avaliando-se a possibilidade de ocorrência de diferentes efeitos adversos e

tóxicos, ou ainda, indicar potenciais de interferência em procedimentos que envolvam reações de óxido redução em testes diagnósticos de pacientes em tratamento com tais moléculas.

Neste trabalho observou-se que atividade antioxidante depende do número e configuração dos grupos hidroxil nos fenóis, assim como da existência de outros grupamentos, tais como em flavonóides glicosídicos. Diferentes padrões de substituintes nos anéis A e B, bem como a existência de ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 do anel C e também a existência de uma carbonila na posição 4 deste mesmo anel interfere na atividade dos flavonóides. A adição de açúcar à aglicona diminui a atividade dos flavonóides, mas uma molécula adicional de açúcar ao glicosídeo pode alterar de diferentes maneiras a atividade de acordo com o radical ou sistema em questão, mostrando haver especificidade na ação dos flavonóides glicosídicos e agliconas sobre os sistemas oxidativos.

As formas glicosídicas e agliconas podem exibir especificidade de ação, a qual deve estar relacionada à:

- 1) potencial de redução da molécula em questão,
- 2) ocorrência de ressonância dos elétrons nas estruturas,
- 3) conformação que o flavonóide adquire aumentando ou diminuindo o acesso do mesmo ao núcleo radical da ERO,
- 4) energia de ativação necessária para os sistema atingir a conformação adequada para formação de produto,
- 5) alteração da solubilidade do flavonóide aumentando ou reduzindo sua concentração no meio reacional,
- 6) facilidade dos flavonóides em quelar metais pesados essenciais nos sítios ativos de diferentes enzimas,

7) acessibilidade dos flavonóides ao sítio ativo de enzimas que catalizam as reações de óxido-redução,

8) afinidade dos flavonóides por biomoléculas das membranas das células, de acordo com sua polaridade e carga adquirida no meio estudado, definindo interações com açúcares, lipídios e proteínas da superfície das membranas e tendo maior ou menor acesso às rotas bioquímicas geradoras das ERO ou ainda acesso às próprias ERO.

4.4 Resumo dos resultados

Através do conjunto de resultados pode-se avaliar o grau de complexidade da utilização destes flavonóides como agentes terapêuticos, pois à medida que são capazes de inibir processos oxidativos, também apresentam potencial de torná-los mais lesivos aos sistemas biológicos. Os resultados obtidos são resumidos a seguir:

a. Redução do fosfomolibdênio

- *isoquercetrina = kaempferol = lespedina < afzelina = pteroginoside = quercetina*

b. Ação scavenger das amostras sobre o radical ABTS^{•+}

- *quercetina > lespedina > kaempferol > isoquercetrina > pteroginoside > afzelina*

c. Ação scavenger das amostras sobre radical DPPH

- *quercetina > lespedina > isoquercetrina > kaempferol > afzelina = pteroginoside*

d. Atividade scavenger das amostras sobre peróxido de hidrogênio

- *Nenhuma das amostras promoveu inibição em quaisquer das doses testadas*

e. Atividade scavenger das amostras sobre o ácido hipocloroso

- *quercetina = pteroginoside > afzelina > lespedina > isoquercetrina > kaempferol*

f. Atividade scavenger sobre taurina cloramina

- *quercetina > kaempferol > afzelina > pteroginoside = isoquercetrina > lespedina*

g. Atividade scavenger sobre o anion superóxido

- *quercetina > isoquercetrina > kaempferol > afzelina > pteroginoside > lespedina*

h. Atividade scavenger sobre Óxido Nítrico

- *quercetina > isoquercetrina = kaempferol > lespedina = pteroginoside > afzelina*

i. Ação na oxidação do guaiacol por peroxidase modelo (clássica)

- *quercetina > isoquercetrina > pteroginoside > kaempferol > afzelina = lespedina*

- *todas mostraram ser substratos da HRP*

j. Ação na oxidação do guaiacol por mieloperoxidase humana

- *quercetina > kaempferol > isoquercetrina > pteroginoside = lespedina > afzelina*

- *quercetina e kaempferol: inibidores mistos*

k. Ação na oxidação do guaiacol pelo grupo prostético de peroxidases

(hemina)

- *quercetina > isoquercetrina > lespedina > kaempferol > pteroginoside > afzelina*

l. Ação na geração de HOCl/TauCl por mieloperoxidase

- *quercetina ~ kaempferol > pteroginoside > afzelina > lespedina > isoquercetrina*

m. Toxicidade sobre eritrócitos

- *pteroginoside = isoquercetrina > lespedina > afzelina > kaempferol > quercetina*

n. Dano provocado pelo radical AAPH em eritrócitos

- *houve proteção*

- *pteroginoside > quercetina = afzelina > kaempferol > lespedina > isoquercetrina*

o. Ação sobre dano provocado pelo ácido hipocloroso em eritrócitos

- *Houve exacerbação do dano*

- *pteroginoside > quercetina = afzelina > kaempferol > lespedina > isoquercetrina*

p. Ação sobre o oxidative burst de neutrófilos na produção de HOCl/TauCl

- *interferiu no “oxidative burst”*

- *quercetina > pteroginoside = kaempferol = lespedina > isoquercetrina > afzelina*

q. Toxicidade sobre neutrófilos

- *os flavonóides testados são inibidores da lactato desidrogenase*

- *as amostras de forma dose-dependente são citotóxicas aos neutrófilo: lespedina > pteroginosídeo > isoquercetrina > kaempferol > quercetina > afzelina*

- *formação de produtos mais tóxicos a partir da reação dos flavonóides com as ERO geradas pelos neutrófilos ativados*

CONCLUSÃO

*“Existem homens que lutam um dia e são bons.
Existem homens que lutam um ano e são melhores.
Outros que lutam vários anos e são muito bons.
Mas existem aqueles que lutam a vida inteira. Estes são imprescindíveis.”*
(Bertold Brecht)

Neste trabalho pode-se observar que todas as amostras testadas apresentaram ação sobre os sistemas *in vitro* e *ex-vivo* estudados. Dentre as ações, observadas através dos efeitos de cada composto nos ensaios realizados, destacam-se as ações antioxidantes diretas e indiretas sobre as ERO.

Observou-se que as amostras estudadas foram capazes de interferir no *oxidative burst*, fato observado pela redução dos níveis de TauCl presente em solução proporcionalmente à elevação das concentrações dos flavonóides. Através dos demais sistemas estudados, pode-se propor múltiplos mecanismos de ação de tais compostos a fim de justificar os efeitos observados: **i)** ação direta sobre o $O_2^{\bullet-}$, **ii)** ação direta sobre o HOCl, **iii)** ação direta sobre a TauCl, **iv)** inibição da geração do HOCl pela MPO (mecanismos variados: interação com grupamento Heme, interação com cadeias laterais de aminoácidos que compõem o sítio ativo e/ou interação com cadeias laterais de aminoácidos da estrutura enzimática em sítios diferentes do sítio catalítico), **v)** toxicidade direta sobre os neutrófilos, ou ainda, **vi)** toxicidade sobre neutrófilos provocada pelos produtos da interação dos flavonóides com $O_2^{\bullet-}$, HOCl, TauCl, NO e outros radicais e oxidantes gerados durante o *oxidative burst* (HO^{\bullet} , $OONO^{\bullet-}$, lipoperóxidos, etc)

Destacam-se ainda, o potencial citotóxico sobre eritrócitos e neutrófilos, o qual torna-se claramente exacerbado na presença das espécies reativas. Merece destaque, portanto, o fato de que moléculas antioxidantes, frequentemente descritas como benéficas e plausíveis de serem aplicadas na terapêutica, não estão alheias a possíveis efeitos prejudiciais que possam promover ao ser humano e, portanto, como qualquer fármaco rotineiramente utilizado, deverão apresentar os chamados efeitos colaterais e efeitos adversos. Não obstante, tal fato não impossibilita a utilização de tais

compostos no tratamento de patologias variadas nas quais os radicais livres possam ser os responsáveis por causar ou exacerbar os danos aos tecidos. Para tanto, tornam-se necessários estudos aprofundados quanto a DL50 de cada composto e estudos de outros parâmetros toxicológicos, bem como variados efeitos farmacológicos, que determinem com segurança a aplicabilidade dos mesmos na terapêutica.

Este trabalho proporcionou ainda um estudo estrutura-atividade no qual se avaliou como a alteração na estrutura química básica de um flavonóide alteraria a ação do mesmo nos diferentes sistemas estudados, permitindo identificar quais sítios químicos nos flavonóides seriam importantes para cada uma das ações.

É clara a necessidade da continuidade da pesquisa, através de novos projetos, a fim de se estudar as possibilidades de interações de acordo com a variabilidade de estruturas conformacionais encontradas para os flavonóides, ou ainda se estudar os produtos formados nas reações e as ações destes nos sistemas. Além disso, é necessária a realização de estudos da ação *in vivo* destas avaliando-se os efeitos das mesmas em condições fisiológicas não alteradas e diferentes condições de dano oxidativo impostas aos animais (tais como *Diabetes mellitus*, hepatotoxicidade induzida por etanol ou tetracloreto de carbono, danos renais induzidos por drogas, etc.), bem como a administração de diferentes doses e por períodos variáveis de duração. Desta forma, completar-se-ia o perfil de ação dos compostos e ainda avaliar-se-ia seu potencial terapêutico para aplicação em seres humanos e ainda os possíveis efeitos tóxicos das mesmas através de diferentes parâmetros toxicológicos.

REFERÊNCIAS

ABU-SOUD, H. M.; HAZEN, S. L. Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 5425-5430, 2000.

ANDREWS, P. C.; KRINSKY, N. I. Human myeloperoxidase and hemi-myeloperoxidase. **Methods in Enzymology**, v. 12, p. 369-378, 1986.

ARNHOLD, J. Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry**, v.69, p. 4-9, 2004.

ARUOMA, O. I.; AKANMU, D.; CECCHINI, R.; HALLIWELL, B. Evaluation of the ability of the angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril to scavenge reactive oxygen species. **Chemical and Biological Interactions**, v. 77, p. 303-314, 1991.

ATOUI, A.K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v.89, p.27-36, 2005.

AWAD, H.M.; BOERSMA, M.G.; VERVOORT, J.; RIETJENS, I.M.C.M. Peroxidase-catalyzed formation of quercetin quinone methide-glutathione adducts. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 378, p. 224-233, 2000.

BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **American Journal of Medicine**, v.109, p. 33-44, 2000.

BASTOS, E.L.; ROMOFF, P.; ECKERT, C.R.; BAADER, W.J. Evaluation of Antiradical Capacity by H₂O₂-Hemin-Induced Luminol Chemiluminescence. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7481-7488, 2003

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, p. 618-622, 1982.

BRESTEL, E.P. Co-oxidation of luminol and hydrogen peroxide . Implications for neutrophil chemiluminescence. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 126, p. 482-488, 1985.

BOLZANI, V. S.; GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I. Bioactive guanidine alkaloids from *Pterogyne nitens*. **Journal of Natural Products**, v. 58, p. 1683-1688, 1995.

BRIHEIM, G.; STENDAHL, O.; DAHLGREN, C. Intra- and extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. **Infection and Immunity**, v. 45, p. 1-5, 1984.

BRUNETTI, I. L.; FARIA-OLIVEIRA, O. M. M. Sistemas quimiluminescentes com peroxidase (EC:1.11.1.7) e suas aplicações em análises clínicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 16, p. 55-77, 1995.

CAPEILLÈRE-BLANDIN, C. Oxidation of guaiacol by myeloperoxidase: a two-electron-oxidized guaiacol transient species as a mediator of NADPH oxidation. **Biochemical Journal**, v. 336, p. 395-404, 1998.

CHING, T.; JONG, J.; BAST, A. A method for screening hypochlorous acid scavengers by inhibition of the oxidation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid: application to anti-asthmatic drugs. **Analytical Biochemistry**, v. 218, p. 377-381, 1994.

CHUN, S.S.; VATTEM, D.A.; LIN, Y.T.; SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v.40, p.809-816, 2005.

COSTA, M.; XIMENES, V. F.; FONSECA, L. M. Hypochlorous acid inhibition by acetoacetate: implications on neutrophil functions. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, p. 1183-1187, 2004

DAUGHERTY, A.; DUNN, J. L.; RATERI, D. I.; HEINECKE, J. W. Myeloperoxidase, acatalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. **Journal of Clinical Investigations**, v. 94, p. 437-444, 1994.

DAVIES, B.; EDWARDS, S. W. Inhibition of myeloperoxidase by salicylhydroxamic acid. **Biochemical Journal**, v. 258, p. 801-806, 1989.

DE VRIES, J. H.; JANSSEN, P. L.; HOLLMAN, P. C.; VAN STAVEREN, W. A.; KATAN, M. B. Consumption of quercetin and kaempferol in freelifving subjects eating a variety of diets. **Cancer Letters**, p.114, p.141– 144, 1997.

EATON, J.W. Defenses against hypochlorous acid: Prying the neutrophil's rapier thrust. **J. Lab. Clin. Med.**, v.121, p.197-198, 1993.

FERREIRA, A.L.A. e MATSUBARA, L.S. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43(1), p.61-68, 1997.

FRIDOVICH, I. Oxidative stress. **Encyclopedia of life sciences**, 2001.

HAENEN, G.R.M.M.; PAQUAY J.B.G.; KORTHOUWER R.E.M. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 236, p. 591-603, 1997.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 246, p. 501-514, 1986.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, v. 186, p.1-85, 1990.

HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophils phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, v. 92, p. 3007-3017, 1998.

- HARRINSON, J. E.; SCHULTZ, J. Studies on the Chlorinating activity of myeloperoxidase. **Biological Chemistry**, v. 251, p. 1371-7134, 1976.
- HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p.67–202, 2002.
- HAZEL, L. J.; VAN DEN BERG, J. J. M.; STOCKER, R. Oxidation of low density lipoprotein with hypochlorite causes aggregation that is mediated by modification of lysine residue rather than lipide peroxidation. **Biochemical Journal**, v. 302, p. 297-304, 1994.
- HAZEL, L. J.; STOCKER, R. Oxidation of low density lipoprotein with hypochlorite causes transformation of the lipoprotein into a high-uptake form for macrophages. **Biochemical Journal**, v. 290, p. 165-172, 1993.
- HEBBEL, R. P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 107, p. 401-404, 1986.
- JIANG, Z., SWEN, L.R.; RUSHING, B.G.; DEVANATAN, S.; TOLLIN, G.; BAUER, C.E. Bacterial photoreceptor with similarity to photoactive yellow protein and plant phytochromes. **Science**, v. 285, p. 406-409, 1999.
- KAKKAR, P.; DAS, B.; VISWANATHAN, P. N. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 21, p. 130-132, 1984.
- KHALIL, N. M. Interação nicotina-peroxidases (Mieloperoxidase e *Horseradish*): implicações no *Burst* oxidativo de leucócitos polimorfonucleares. 2002. 99f. **Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas)** – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.
- KOOTER, I. M.; MOGUILEVSKY, N.; WEVER, R. The sulphonium ion linkage in myeloperoxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 26794-26802, 1999.
- KOSTYUK, V.A.; POTAPOVICH, A.I.; STRIGUNOVA, E.N.; KOSTYUK, T.V. AFANAS'EV, I.B. Experimental evidences that flavonoid metal complexes may act as mimics of superoxide dismutase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 428, p.204-208 , 2004.
- LAPENNA, D.; CUCCUROLLO, F. Hypochlorous acid and its Pharmacological Antagonism: An update picture. **Geneneral Pharmacology**, v.27, p. 1145-1147, 1996.
- LEFKOWITZ, D. L.; MILLS, K.; MORGAN, D.; LEFKOWITZ, S. S Macrophage activation and immunomodulation by myeloperoxidase. **Experimental Biology and Medicine**, v. 199, p. 204-210, 1992.
- MACMIKING, J.; XIE, Q.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annual Review of Immunology**, v. 15, p. 323-350, 1997.

- MATHY-HARTERT, M.; BOURGEOIS, E.; GRULKE, S.; DEBY-DUPONT, G.; CAUDRON, I.; DEBY, C.; LAMY, M.; SERTEYN, D. Purification of myeloperoxidase from equine polymorphonuclear leucocytes. **Canadian Journal of Veterinary Research.**, v. 62, p. 127-132, 1998.
- METODIEWA, D.; KOCHMAN, A.; KAROLCZAK, S. Evidence for antiradical and antioxidant properties of four biologically active N, N-Diethylaminoethyl-ethers of flavanone oximes: a comparison with natural polyphenolic flavonoid (Rutin) action. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 41, p.1067-1075, 1997.
- MEOTI, F.C. Análise dos mecanismos de ação antinociceptiva e antiinflamatória do flavonóide miricitrina: estudos *in vivo* e *in vitro*. 2006, 137f., **Tese (Doutorado em Bioquímica toxicológica)** – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.
- MERRILL, D. P. Purification of human myeloperoxidase by concanavalin A-Sepharose affinity chromatography. **Preparative Biochemistry**, v. 10, p. 133-150, 1980.
- MIAN, M.F.; KANG, C.; LEE, S.; CHOI, J.H.; BAE, S.S.; KIM, S.H.; KIM, Y.H.; RYU, S.H.; SUH, P.G.; KIM, J.S.; KIM, E. Cleavage of focal adhesion kinase is an early marker and modulator of oxidative stress-induced apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 171, p.57–66, 2008.
- MORTENSON, L.E.; THORNELEY, R.N. Structure and function of nitrogenase. **Annual Review of Biochemistry**, v.48, p.387-418 , 1979.
- MOSSI, A.J.; CANSIAN, R.L.; CARVALHO, A.Z.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, V.; MAZUTTI, M.; FILHO, I.N.; ECHEVERRIGARAY, S. Extraction and characterization of volatile compounds in *Maytenus ilicifolia*, using high-pressure CO₂. **Fitoterapia**, v.75, p.168-178, 2004.
- MUROTA, K.; TERAQ, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 417, p.12-17 , 2003.
- NASSIF, S.M.L.; PEREZ, S.C.J.G.A. Germinação de sementes de amendoim-do-campo (*Pterogyne nitens* Tul.): influência dos tratamentos para superar a dormência e profundidade de semeadura. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 19, p.171-178, 1997.
- O'BRIEN, P. J. Peroxidases. **Chemico-Biological Interactions**, v. 129, p. 113-139, 2000.
- OHLSON, P.I.; PAUL, K.G. The molar absorptivity of horseradish peroxidase. **Acta chemica Scandinavica. Series B: Organic chemistry and biochemistry**, v. 31, p. 373-375, 1976.
- PARELLADA, J.; SUAREZ, G.; GUINEA, M. Inhibition of zinc metalloproteinases by flavonoids and related phenolic compounds: structure activity relationships. **Journal of Enzyme Inhibition**, v.13, p.347– 359, 1998.

PELLEGRINI, N.; RE, R.; YANG, M.; EVANS, C.R. Screening of dietary Carotenoids and Carotenoid-Rich Fruit Extracts for Antioxidant Activities Applying 2,2'-Azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6 sulfonic acid Radical Cation Decolorization Assay. **Methods in Enzymology**, v.299, p.379-389, 1998.

PERCIVAL, M. Antioxidants. **Clinical Nutrition Inside**, v. 31, p. 1-4, 1998.

PINCEMAIL, J.; DEBY, C.; THIRION, A.; DE BRUYN-DISTER, M.; GOUTIER, R. Human myeloperoxidase activity is inhibited in vitro by quercetin. Comparison with three related compounds. **Experientia**, v. 44, p. 450-453, 1988.

PODHAJECER, O.L.; FRIEDLANDER, M.; GRAZIANI, Y. Effect of liposome-encapsulated quercetin on DNA synthesis, lactate production, and cyclic adenosine 30:50 monophosphate level in Ehrlich ascites tumor cells. **Cancer Research**, v.40, p.1344-1350, 1980.

PODREZ, E. A.; ABU-SOU, H. M.; HAZEM, S. L. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, p. 1717-1725, 2000.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolibdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v.269, p.337-341, 1999.

REGASINI, L.O.; FERNANDES, D.C.; GAMBOA, I.C.; SILVA, D.H.S.; FURLAN, M.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E. J.; CARDOSO-LOPES, E.M.; YOUNG, M.C.M.; TORRES, L.B.; VELLOSA, J.C.R.; OLIVEIRA, O.M.M.F. Constituintes químicos da flores de *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae). **Química Nova**, v. 31, p. 802-806, 2008 A.

REGASINI, L.O.; VELLOSA, J.C.R.; SILVA, D.H.S.; FURLAN, M.; OLIVEIRA, O.M.M.F.; KHALIL, N.M.; BRUNETTI, I.L.; YOUNG, M.C.M.; BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S. Flavonols from *Pterogyne nitens* and their evaluation as myeloperoxidase inhibitors. **Phytochemistry**, v. 69, p.1739-1744, 2008 B.

RODRIGUES, M. R.; RODRIGUEZ, D.; RUSSO, M.; CAMPA, A. macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 292, p. 869-873, 2002.

RODRIGUES, H.G.; DINIZ, Y.S., FAINE, L.A.; ALMEIDA, J.A.; FERNANDES, A.A.H.; NOVELLI, E.L.B. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol-HDL. **Revista de Nutrição (Campinas)**, v. 16, p. 315-320, 2003.

ROS, A.; WEVER, R.; ROOS, D. Characterization and quantification of the peroxidase in human monocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 525, p. 37-44, 1978.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In: VIGO-PELFREY, C. (Ed): Membrane lipid oxidation. 1th ed. **Boca Raton: CRC Press**, 1991, p.151-170.

SAUNDERS, B. C. Peroxidases and catalases. In: EICHHORN, G.L. (Ed.), **Inorganic Biochemistry**. Amsterdam: Elsevier, 1973, p. 988-1021.

SCHIERWAGEN, C.; BYLUND-FELLENIUS, A. C.; LUNDBERG, C. Improved method for quantification of tissue PMN accumulation measured by myeloperoxidase activity. **Journal of Pharmacological Methods**, v. 23, p. 179-186, 1990.

SOARES, J. R.; DINIS, T. C.; CUNHA, A. P.; ALMEIDA, L. M. Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis*. **Free Radical Research**, v. 26, p. 469-478, 1997.

SWANSON, C. Vegetables, fruits, and cancer risk: The role of phytochemicals. In: BIDLACK, W. R.; OMAYE, S. T.; MESKIN, M. S.; JAHMER, D. **Phytochemicals: a new paradigm**. Lancaster PA: Technomic Publishing, 1998, p. 1-12.

THOMAS, E.L.; GRISHAM, M.B; JEFFERSON, M.M. Preparation and characterization of chloramines. **Methods in Enzymology**, v.132, p.569-585, 1986.

TONIN, G.A.; GATTI, A.B.; CARELLI, B.P.; PEREZ, S.C.J.G.A. Influência da temperatura de condicionamento osmótico na viabilidade e no vigor de sementes de *Pterogyne nitens* Tull. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, p.35-43, 2005.

TORRES, R.L.; TORRES, I.L.S.; GAMARO, G.D.; FONTELLA, F.U.; SILVEIRA, P.P.; MOREIRA, J.S.R.; LACERDA, M.; AMORETTI, J.R.; RECH, D.; DALMAZ, C.; BELLÓ, A.A. Lipid peroxidation and total radical-trapping potential of the lungs of rats submitted to chronic and sub-chronic stress. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p.185-192, 2004.

VELLOSA, J.C.R; BARBOSA, V.F.; KHALIL, N.M.; SANTOS, V.A F. F. M.; FURLAN; M.; BRUNETTI, I.L.; OLIVEIRA, O.M.M.F. Profile of *Maytenus aquifolium* action over free radicals and reactive oxygen species. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 447-453, 2007.

VELLOSA, JCR. Avaliação da capacidade antioxidante de extratos vegetais de plantas brasileiras e sua contribuição ao estudo de inibição da enzima mieloperoxidase. 2005, 129 f., **Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas)** – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

VENGLARIK, C.J.; CALLE, J.G.; WIGLEY, A.F.; MALLE, E.; WATANABE, N.; FORMAN, H.J. Hypochlorous acid alters bronchial epithelial cell membrane properties and prevention by extracellular glutathione. **Journal of Applied Physiology**, v.10, p.1152, 2003.

VISSERS, M.C.M.; CARR, A.C.; CHPMAN, A.L.P. Comparison of human red cell lysis by hypochlorous and hypobromous acids: insights into the mechanism of lysis. **The Biochemical Journal**, v.330, p.131-138, 1998

WASIL, M.; HALLIWELL, B.; MOORHOUSE, C. P.; HUTCHINSON, D. C. S.; BAUM, H. Biologically significant scavenging of myeloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid by some anti-inflammatory drugs. **Biochemical Pharmacology**, v. 36, p. 3847-3850, 1987.

WASIL, M.; HALLIWELL, B.; MOORHOUSE, C. O. Scavenging of hypochlorous acid by tetracycline, rifampicin and some other antibiotics: a possible antioxidant action of rifampicin and tetracycline? **Biochemical Pharmacology**, v. 37, p. 775-778, 1988.

WEISS, S.J. Tissue destruction by neutrophils. **The New England journal of medicine**, v.320, p.365-376, 1989.

YANG, H.L.; CHEN, S.C.; CHANG, N.W.; CHANG, J.M.; LEE, M.L.; TSAI, P.C.; FU, H.H.; KAO, W.W.; CHIANG, H.C.; WANG, H.H.; HSEU, Y.C. Protection from oxidative damage using *Bidens pilosa* extracts in normal human erythrocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, p.1513-1521, 2006.

YEN, G.C.; LAI, H.H.; CHOU, H.Y. Nitric oxide scavenging and antioxidant effects of *Uraria crinita* root. **Food Chemistry**, v.74, p.471-478, 2001.

YUE, K. T.; TAYLOR, K. L.; POWERS, L. S. X-Ray absorption and resonance raman spectroscopy of human myeloperoxidase at neutral and acid pH. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1338, p. 282-294, 1997.

ZGLICZYNSKI, T.J.M.; STELMASZYNSKA, T.; DOMANSKA, J.; OSTROWISKI, W. Chloramines as intermediates of oxidation reaction of amino acids by myeloperoxidase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 235, p. 419-424, 1971.

ZHU, Q.Y.; HOLT, R.R.; LAZARUS, S.A.; OROZCO, T.J.; KEEN, C.L. Inhibitory Effects of Cocoa Flavanols and Procyanidin Oligomers on Free Radical-Induced Erythrocyte Hemolysis. **Experimental Biology and Medicine**, v.227, p.321-329, 2002.

ZUURBIER, K. W; VAN DEN BERG, J. D.; VAN GELDER, B. F.; MUIJSERS, A. O. Human Hemi-myeloperoxidase. Initial chlorinating activity at neutral pH, compound II and III formation, and stability towards hypochlorous acid and high temperature. **European Journal of Biochemistry**, v. 205, p. 737-742, 1992.

CAPÍTULO 2



Flavonols from *Pterogyne nitens* and their evaluation as myeloperoxidase inhibitors

Luis Octávio Regasini^a, José Carlos Rebuglio Velloso^b, Dulce Helena Siqueira Silva^a,
Maysa Furlan^a, Olga Maria Mascarenhas de Oliveira^b, Najeh Maissar Khalil^c,
Iguatemy Lourenço Brunetti^c, Maria Claudia Marx Young^d,
Eliezer Jesus Barreiro^e, Vanderlan Silva Bolzani^{a,*}

^a Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, NuBBE – Núcleo de Biotecnologia, Biotecnologia e Ecofisiologia de Produtos Naturais, Araraquara, SP, CP 355, CEP 14801-970, Brazil

^b Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, CP 355, CEP 14801-900, Brazil

^c Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, SP, CP 302, CEP 14801-902, Brazil

^d Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Instituto de Botânica, Paula, SP, CP 3005, CEP 01061-970, Brazil

^e Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, LASSBIO, Rio de Janeiro, CP 68006, CEP 21944-910, Brazil

Received 11 July 2007; received in revised form 11 October 2007

Available online 7 April 2008

Abstract

A myeloperoxidase inhibitory kaempferol derivative, namely pterogynoside (1), was isolated from fruits of *Pterogyne nitens*, along with six known flavonols, kaempferol, afzelin, kaempferitrin, quercetin, isoquercitrin and rutin. The structures of all compounds were elucidated primarily from 1D and 2D NMR spectroscopic analyses, as well as by high resolution mass spectrometry. All flavonols were screened to identify secondary metabolites as potential myeloperoxidase (MPO) inhibitors, and at concentrations of 0.50–50 nM, quercetin (5), isoquercitrin (6) and rutin (7) exhibited strong inhibitory effects with IC_{50} values of 1.22 ± 0.01 , 3.75 ± 0.02 and 3.60 ± 0.02 , respectively. The MPO activity detected for the new derivative 1 was markedly decreased (IC_{50} 10.3 ± 0.03) when compared with known flavonols 5–7, and interestingly increased when tested against ABTS scavenging activity.

© 2008 Published by Elsevier Ltd.

Keywords: *Pterogyne nitens*; Fabaceae; Acetylated flavonol; Myeloperoxidase; Antioxidant

1. Introduction

Myeloperoxidase (MPO) is a heme-enzyme present in human neutrophils and plays a role in infection and inflammation, converting hydrogen peroxide and chloride to hypochlorous acid and water (Winterbourn et al., 2000). Although hypochlorous acid has important roles in killing microorganisms, it also possesses high reactivity and the ability to damage macromolecules by oxidation (Teixeira et al., 2003). The excessive MPO activity and reactive oxy-

gen species (ROS), especially HOCl, production are implicated in many inflammatory processes (Heinecke et al., 1993; Grzel et al., 2004), including atherosclerosis, cancer, and Alzheimer's disease; the search for new myeloperoxidase inhibitors from natural sources has become a staple in drug discovery.

Pterogyne nitens (Fabaceae) is popularly named in Brazil as "tipá", "viraró", "cocal", "amendoimzeiro", "amendoim-bravo", according to the region where this plant grows. It is a beautiful legume tree, and the sole member of the genus *Pterogyne*, which is distributed mainly in Brazil, Bolivia, Paraguay and Argentina, and can reach a height of 5–12 m. (Burkart, 1952). Its wood is also widely

* Corresponding author. Tel.: +55 16 33016660; fax: +55 16 33227932.
E-mail address: bolzani@iq.unesp.br (V.S. Bolzani).

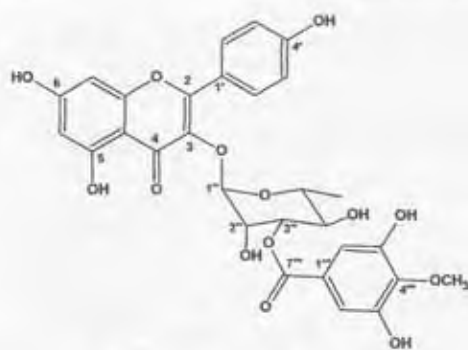


Fig. 1. Chemical structure of compound 1.

used in building construction and, to our knowledge, there are no reports on ethnomedicinal uses for this species (Lorenzi, 1998).

Our previous studies on *P. nitens* have resulted in the isolation of flavones, and five guanidine alkaloids, which exhibited selective activity towards a DNA repair-deficient strain of yeast *Saccharomyces cerevisiae*, suggesting potential anti-cancer activity (Bolzani et al., 1995). In our continuing interest in searching for new biologically active metabolites from plants of the Cerrado and Atlantic Forest regions, we have investigated the fruits of this plant, collected at the Botanical Garden, São Paulo, in May 2003. We report herein the isolation, and structural elucidation of one new flavonol rhamnoside, namely pterogynoside (1) and six known flavonols: kaempferol (Mitscher et al., 1985), afzelin (Salama et al., 1981), kaempferitrin (Pizzolatti et al., 2003), quercetin, isoquercitrin and rutin (Maricham et al., 1978). Additionally, these compounds were screened for MPO inhibitory activity, using a guaiacol oxidation method (Capellero-Blandin, 1998). The new flavonol 1 was also analyzed for the scavenging of DPPH and ABTS free radicals activities and its antioxidant potential was evaluated (see Fig. 1).

2. Results and discussion

Shade-dried, powdered fruits of *P. nitens* were first defatted with *n*-hexane and exhaustively extracted by maceration with ethanol. The solvent was evaporated at low temperature under reduced pressure to yield a syrup which was suspended in methanol–water (4:1) and then successively partitioned with ethyl acetate and *n*-butyl alcohol. The resulting fractions were subjected to successive column chromatography separation steps to yield pterogynoside (1) along with six known flavonols.

Pterogynoside (1) was isolated as yellow prisms, m.p. 272–273 °C, and gave a positive reaction with ferric chlo-

ride, indicating it as a phenol derivative. The IR spectrum exhibited strong absorption bands due to phenolic hydroxyl (3280 cm⁻¹), chelated hydroxy group (3265 cm⁻¹), conjugated ester (1695 cm⁻¹), conjugated ketone (1650 cm⁻¹) and aromatic C=C absorptions (1612, 1593, 1550 and 1508 cm⁻¹). The UV spectrum displayed absorptions (λ_{max}) (log ϵ) at 316 (4.53) and 297 (4.29), indicating the existence of oxy-aromatic systems, compatible with a flavonol structure (Mahdy et al., 1970; Agrawal et al., 1989). The UV spectra recorded in EtOH and shift reagents such as KOH, NaOAc and AlCl₃ suggested the presence of free hydroxy groups at C-4', C-7 and C-5, respectively. Its elemental composition C₂₉H₂₆O₁₄, with 17° of unsaturation, was deduced from its HRESIMS, which showed a deprotonated molecular ion ([M-H]⁻) at *m/z* 597.5087 (calcd for C₂₉H₂₆O₁₄, 597.5081) consistent with its ¹³C NMR data (Table 1, Supporting Information). The CID (collision induced dissociation) experiments using the product ion scan mode (MS²) allowed characterization and establishment of the fragmentation pathway of pterogynoside, with an intense (64%) kaempferol peak at *m/z* 285 in the negative ion mode. The positive ion mode also gave an intense kaempferol peak at *m/z* 287. Further MS analysis showed a deprotonated ion peak at *m/z* 597, and a product ion at *m/z* 431 indicating the presence of one hexose residue in compound 1. Its ¹H and ¹³C NMR and DEPT spectra evi-

Table 1
¹H (500 MHz) and ¹³C NMR (126 MHz) spectroscopic data for flavonol 1 in methanol-d₄.

| Position | Δ_C (mult.) ^a | Δ_H (mult.) ^b J (Hz) | gHMBC |
|----------|---------------------------------|--|--------------|
| 2 | 159.2 (s) | – | H-2' |
| 3 | 136.0 (s) | – | H-1'' |
| 4 | 179.5 (s) | – | – |
| 5 | 163.1 (s) | – | H-6 |
| 6 | 99.9 (d) | 8.10 (d, 2.0) | H-8, H-10 |
| 7 | 165.9 (s) | – | H-6, H-8 |
| 8 | 94.4 (d) | 6.29 (d, 2.0) | H-6, H-10 |
| 9 | 158.5 (s) | – | H-8 |
| 10 | 106.9 (s) | – | – |
| 1' | 112.6 (s) | – | – |
| 2'' | 131.9 (d) | 7.74 (d, 9.0) | – |
| 3'',5'' | 116.6 (d) | 6.87 (d, 9.0) | – |
| 4' | 161.5 (s) | – | H-2',H-3' |
| 1'' | 103.6 (d) | 5.38 (d, 1.5) | H-3, H-3' |
| 2'' | 69.8 (d) | 4.38 (dd, 3.2, 1.5) | – |
| 3'' | 75.5 (d) | 5.11 (dd, 9.8, 3.2) | H-1'', H-4'' |
| 4'' | 70.6 (d) | 3.58 (dd, 9.8, 9.5) | H-6'' |
| 5'' | 72.3 (d) | 3.37 (dd, 9.5, 6.5) | H-6'', H-3'' |
| 6'' | 17.3 (q) | 0.89 (d, 6.5) | H-3'' |
| 1''' | 126.8 (s) | – | – |
| 2''' | 110.5 (d) | 7.06 (s) | – |
| 3''' | 151.5 (s) | – | H-2''' |
| 4''' | 141.2 (s) | – | H-2''' |
| 5''' | 167.7 (s) | – | H-3''' |
| 6''' | 80.7 (q) | 3.77 (s) | – |

^a Multiplicities were deduced from DEPT 90° and DEPT 135° experiments.

^b Assignments were deduced from HMQC correlations and comparison with literature data (Agrawal et al., 1989).

denced the presence of a 5,7,4"-trisubstituted flavonol moiety, in addition to 4"-methylgallate and α -*r*-rhamnopyranosyl residues. The assignment of all proton and carbon signals followed from extensive analysis of ^1H - ^1H gCOSY, gHMBC, and gHMBC spectra (Table 1). The ^{13}C NMR spectrum of **1** presented 29 carbons deduced from DEPT 90°, DEPT 135° and gHMBC techniques as one methyl, thirteen methines, one methoxy and fourteen quaternary carbons, including two carbonyl groups at δ 167.7 and δ 179.5, attributed to ester and ketone groups, respectively. The ^1H NMR and ^1H - ^1H gCOSY spectra (Table 1) showed an A_2M_2 spin system assigned to the hydrogen signals at δ 7.74 (2H, *d*, $J=9.0$ Hz, H-2", 6') and 6.87 (2H, *d*, $J=9.0$ Hz, H-3', 5') attributed to a 1,4-disubstituted aromatic ring; and a pair of doublets at δ 6.10 (1H, *d*, $J=2.0$ Hz, H-6) and 6.29 (1H, *d*, $J=2.0$ Hz, H-8) for the trioxxygenated A ring of compound **1**, suggesting a kaempferol moiety for its aglycone. Additionally, the ^1H NMR resonances at δ 5.38 and 0.89 evidenced an α -rhamnopyranosyl moiety, which was confirmed by observation of correlated signals at δ 103.6, δ and δ 17.7 in the HMBC spectrum. A cross-peak between the signals for C-3 (δ 136.0) and the anomeric hydrogen H-1" (δ 5.38) in the gHMBC spectrum indicated the position of the rhamnosyl unit at C-3 of the kaempferol moiety. Further analysis of 1D and 2D NMR spectroscopic data (Table 1) indicated an additional methylgallate unit in compound **1**, which was placed at C-3" of the rhamnopyranosyl moiety due to the downfield chemical shift observed for H-3" (δ 5.11), and a gHMBC cross-peak of H-3" with the carbonyl ester C-7" (δ 167.7). An additional gHMBC correlation was observed between the signal at δ 141.2 (C-4") and δ 3.77 (OMe) which confirmed the position of the methoxy group at C-4". Hence, the structure of pterogynoside (**1**) was completely elucidated, and established as kaempferol-3-*O*-(3"-*O*-4"-methylgallate- α -*r*-rhamnoside). Additionally, six known flavonols were isolated and identified as kaempferol (**2**) (Mitscher et al., 1985), afzelin (**3**) (Salama et al., 1981), kaempferitrin (**4**) (Pizzolatti et al., 2003), quercetin (**5**), isoquercitrin (**6**) and rutin (**7**) (Markham et al., 1978). Their identification was based on analyses of ^1H , ^{13}C NMR and MS data, as well as by comparison with authentic material available in our laboratory. Furthermore, this is the first report of flavonol glycosides from *P. nitens*.

Although a broad spectrum of biological activities has already been demonstrated for flavonoids (Middleton et al., 2000; Cuzzocrea et al., 2001; Havsteen, 2002; Molace et al., 2005), few studies have been devoted to the myeloperoxidase inhibitory activity of this class of natural polyphenols (Kato et al., 2003).

Myeloperoxidase production is triggered by inflammatory mediators resulting in acceleration of superoxide anion (O_2^-) conversion to hydrogen peroxide and other ROS especially HOCl, which reacts further to generate singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) and hydroxyl radical (HO^\bullet) as powerful oxidizing agents. Such species are involved in oxidative stress-related diseases as atherosclerosis, cancer, Alzheimer

Table 2
Myeloperoxidase (MPO) inhibitory activity and free radical scavenging activity (FRSA) towards ABTS and DPPH of flavonols 1-7

| Compound | MPO inhibition IC ₅₀ (nM) ^a | Free radical scavenging activity | |
|-------------------------------------|--|---|---|
| | | ABTS IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ^b | DPPH IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ^b |
| Pterogynoside (1) | 10.3 ± 0.03 | 8.10 ± 0.1 | >80.0 |
| Kaempferol (2) | 8.30 ± 0.03 | 18.0 ± 0.5 | 17.8 ± 0.8 |
| Afzelin (3) | 13.9 ± 0.04 | 17.0 ± 0.7 | >80.0 |
| Kaempferitrin (4) | 15.8 ± 0.05 | 18.5 ± 0.2 | 55.8 ± 0.8 |
| Quercetin (5) ^c | 1.22 ± 0.01 | 4.12 ± 0.2 | 2.60 ± 0.1 |
| Isoquercitrin (6) | 3.75 ± 0.02 | 4.37 ± 0.2 | 2.77 ± 0.4 |
| Rutin (7) | 3.60 ± 0.02 | 4.85 ± 0.2 | 3.15 ± 0.3 |
| Trolox ^d | – | 0.63 ± 0.3 | 4.72 ± 0.4 |

^a IC₅₀ values were determined by regression linear and expressed as means ± SD of three replicates.

^b Quercetin was used as positive control (Kato et al., 2003).

disease etc., which evidences the importance of research towards new MPO inhibitors.

All isolates were assayed for their MPO inhibitory activity (Table 2), evidencing a key role of the B ring oxygenation pattern on the level of activity. Compounds **5–7**, presenting a catechol derived B-ring, exhibited IC₅₀ values of 1.22, 3.75 and 3.60 nM, respectively, indicating a higher MPO inhibitory activity than compounds **1–4**, which are kaempferol derivatives, thus presenting a monohydroxy phenolic B ring. The aglycone quercetin (**5**) was used as positive control (Kato et al., 2003) and presented higher activity than its glucosides isoquercitrin (**6**) and rutin (**7**), suggesting an important role of the free hydroxyl at C-3 for enhancement of the MPO inhibitory activity. This trend has also been observed for kaempferol derivatives **1–4**, as the glucosides pterogynoside (**1**), afzelin (**3**) and kaempferitrin (**4**) exhibited IC₅₀ values of 10.3, 13.9 and 15.8 nM, respectively, and were less active than the aglycone kaempferol (**2**, IC₅₀ 8.3 nM). These results indicate a clear positive correlation between MPO inhibitory activity and antioxidant properties of flavonoids as shown in Table 2. The catechol on B ring and the α,β -unsaturated carbonyl moieties have been extensively pointed out as the main features in flavonoids associated with enhanced free radical stabilization after one hydrogen radical donation for the antioxidant activity (Van Acker et al., 1996). The presence of a galloyl group, e.g. in flavonoids, has also been associated with increased antioxidant capacity (Heijnen et al., 2002). In this respect, the presence of an additional galloyl unit in compound **1** might explain its higher MPO inhibitory activity, when compared with compounds **3** and **4**.

The antioxidant activity of the isolates was evaluated by measuring free radical scavenging effects using two different assays, the ABTS radical cation decolorization assay and the DPPH radical scavenging activity assay. Quercetin derivatives **5–7** showed higher scavenging activity towards ABTS radical, with values of IC₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) of 4.12, 4.37 and 4.85, and DPPH with values of 2.60, 2.77 and 3.15, respectively, than kaempferol derivatives **1–4** (Table 2), indicating a major role of the catechol moiety on the B-ring

of flavonoids for enhancement of the free radical scavenging activity. Additionally, among compounds 1–4, increasing activities were observed for pterogynoside (1) and kaempferol (2), which confirms the importance of the free hydroxyl groups on C-3 (in 2) and the enhancement of RSA due to the galloyl group (in 1) in both assays. Among compounds 5–7, quercetin (5) exhibited higher activity than its 3-*O*-glucosyl derivatives 6 and 7, which confirmed the influence of the free-hydroxy group at C-3 for potentiating the free radical scavenging activity of flavonoids.

3. Concluding remarks

In summary, flavonoids with either the catechol moiety or α,β -unsaturated carbonyl with the free hydroxyl group at C-3 have shown best anti-radical and MPO inhibitory properties, which corroborates the involvement of MPO in redox processes. The absence of such features in pterogynoside (1) has been counteracted by the galloyl moiety on C-3' leading to MPO inhibitory activity comparable to kaempferol (2), and higher free radical scavenging ability than 2 or its glucosides 3 and 4.

Flavonoids from *P. nitens* presented potent inhibition towards the pro-oxidant and pro-inflammatory enzyme myeloperoxidase and potent radical scavenging effects, which may be particularly important because they are easily available in the plant kingdom (Middleton et al., 2000) and are able to protect biological systems against stress phenomena such as lipid peroxidation, as shown for a variety of kaempferol derivatives exhibiting high antioxidant selectivity (Gebre-Mariam et al., 2005), and for quercetin and its derivatives, which have been shown to protect cells against H₂O₂-induced oxidative stress and calcium dysregulation (Wang and Joseph, 1999).

4. Experimental

4.1. General methods

Melting points were recorded on a Microquímica MQAPF-301 melting point apparatus. The 1D – (¹H, ¹³C and DEPT) and 2D – (¹H – ¹H gCOSY, gHMBC and gHMBC) NMR experiments were recorded on a Varian INOVA 500 spectrometer (11.7 T) at 500 MHz (¹H) and 126 MHz (¹³C), using the solvents as an internal standard. Negative-ion high resolution mass spectra were recorded on HRMS ultraTOFQ-ESI-TOF instrument (Bruker Daltonics). IR spectra absorptions were measured on a Perkin Elmer 1600 FT-IR spectrometer using KBr discs, whereas UV spectra were acquired on a Perkin Elmer UV-vis Lambda 14P spectrophotometer. Optical rotations were measured on a Polamat A Carl Zeiss Jena polarimeter. Analytical HPLC was performed on a Varian Pro Star 230 using a Phenomenex C-18 column (250 mm × 4.6 mm). Column chromatography (CC) was performed over

reversed-phase silica gel 230–400 mesh (Merck). TLC was performed using Merck silica gel 60 (>230 mesh) and pre-coated silica gel 60 PF₂₅₄ plates. Spots on TLC plates were visualized under UV light and by spraying with anisaldehyde-H₂SO₄ reagent followed by heating at 120 °C. Preparative HPLC was carried out using a Varian Prep-Star 400 system using a Phenomenex C-18 (250 mm × 21.2 mm) preparative column. Sephadex LH-20 was purchased from Pharmacia Biotech, Sweden. All enzymatic or scavenging free radical assays were performed using a Spectrophotometer HP 8543, Diode Array. Guaiacol, ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) were purchased from Sigma Chemical®. All other reagents were analytical grade and commercially available. MPO was purchased from Planta Natural Products®.

4.2. Plant material

Fruits of *P. nitens* were collected in the Botanic Garden of São Paulo, São Paulo State, Brazil, in May 2003. A voucher specimen (SP204319) has been deposited in the herbarium of the Botanic Institute (São Paulo State, Brazil).

4.3. Extraction and isolation

The shade-dried fruits (2 kg) of *P. nitens* were ground and defatted with *n*-hexane (15 L × 5, at room temperature, for two weeks) and exhaustively extracted by maceration with EtOH (25 L × 5) at room temperature. The combined ethanol extracts were concentrated in vacuo (< 40 °C) to yield 8.0 g of a syrupy residue. The concentrate was then diluted with CH₃OH:H₂O (4:1) and successively partitioned with EtOAc and *n*-BuOH. After removal of the solvent, each extract yielded 2.5 and 3.8 g, respectively. The EtOAc residue was subjected to silica gel (230–400 mesh) CC eluted with EtOAc/MeOH gradient (0–100% MeOH) to afford eight fractions (E1–E8) and free aglycones 2 (220.9 mg) and 5 (150.8 mg). Fraction E6 (397.8 mg) was further purified by RP-HPLC [MeOH:H₂O:AcOH (58:42:0.1), UV detection at 254 nm; flow rate 10 mL/min] affording acylated flavonol 1 (115.9 mg) and two flavonol monoglycosides 3 (82.9 mg) and 6 (78.7 mg).

The *n*-BuOH residue was dissolved into MeOH and submitted to gel filtration on Sephadex LH-20 eluted with MeOH, affording 23 fractions (B1–B23). After TLC comparison, fractions B12–B19 were combined (488.3 mg) and purified by RP-HPLC using MeOH:H₂O:AcOH (68:32:0.1) as mobile phase, with UV detection at 254 nm and flow rate of 12 mL/min, affording flavonol diglycosides 4 (150.7 mg) and 7 (299.0 mg).

4.4. Kaempferol-3-*O*-(3'-*O*-4'-methylgallate-*o*-*r*-rhannoside) (1)

Yellowish prisms (MeOH); m.p. 272–273 °C; [α]_D²² – 131 (MeOH, *c*, 1.0); UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ): 316 (4.53), 297

(4.29). IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3280, 3265, 1695, 1650, 1612, 1593, 1550, 1508. ESIMSMS spectra showed $[\text{M}+\text{H}]^+$ and $[\text{M}-\text{H}]^-$ peaks at m/z 599 and m/z 597, respectively. ESIMSMS gave product ion from $[\text{M}+\text{H}]^+$ at m/z 287 ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$, kaempferol)⁺. ESIMSMS product ions from $[\text{M}-\text{H}]^-$ were observed at m/z 431 ($\text{M}-\text{H}-4^{\text{th}}\text{-O-methyl-gallate}^-$ ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$), m/z 285 ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$, kaempferol)⁻. HRESIMS (negative ion mode) (m/z) 597.5087; ($\text{M}-\text{H}$, calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{O}_{14}$: 597.5079). For ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) and ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) spectroscopic data, see Table 1.

4.5. Assay for MPO inhibitory activity

MPO inhibitory effects of flavonols 1–7 were evaluated through guaiacol oxidation in presence of myeloperoxidase (8 nM) and hydrogen peroxide (0.3 mM). The reactions were spectrophotometrically followed at 470 nm, calculated from the initial linear rate of reaction using guaiacol (70 mM) as substrate for the peroxidase inhibitory activity, and were compared at different sample concentrations of compounds 1–7 (0.50–50 nM) and in their absence (Kato et al., 2003). The IC_{50} values were calculated from the rates calculated on the basis of inhibition percentage expressed in concentration–response curves.

4.6. Evaluation of radical scavenging activity (RSA)

Radical scavenging activity (RSA) of compounds 1–7 was determined using DPPH[•] (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS^{•+} [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] as reagents. Sample solutions of 1–7 and Trolox[®] at various concentrations (10–100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in EtOH were individually added to 0.6 mM DPPH in EtOH. The mixture was incubated in the dark at 25 °C for 30 min (Soares et al., 1997; Duarte-Almeida et al., 2006). Remaining DPPH was determined colorimetrically at 531 nm by blanking against absolute ethanol. ABTS^{•+} was prepared by reacting 5 mL of ABTS (7 mM) water soln. with 88 μL of 140 mM potassium persulphate (ratio 1:0.35) and the mixture allowed to stand in the dark at room temperature for 12–16 h before use. Prior to assay ABTS^{•+} stock soln. was diluted with $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (100 mM, pH 7.0 diluted 1:10 before use) buffer soln. (ratio 1:88). One milliliter ABTS^{•+} was added to glass test tubes containing different concentrations of compound 1 and Trolox[®] (0.5–7.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and mixed for 15 s. Tubes were incubated for 30 min at room temperature. Scavenging capacity was read spectrophotometrically by monitoring the decrease in absorbance at 734 nm. A lower absorbance of the reaction mixture indicated higher free radical scavenging activity (Pellegrini et al., 1999). Anti-radical abilities against ABTS^{•+} and DPPH[•] species were expressed by using mean values obtained from triplicates as percentage of radical reduced (inhibition%) calculated from the equation: Inhibition% = $[1 - (A_{\text{sample}}/A) \times 100]$, where A is test absorbance without sample (only solvent and free radicals) and A_{sample} is test absorbance with compounds 1–7 or Trolox[®].

Acknowledgements

This work was funded by grants from the “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo”, FAPESP (Brazil), as part of the Biota-FAPESP – The Biodiversity Virtual Institute Program (www.biotausp.org.br); Grant No. 03/021767-7 awarded to Dr. Bolzani, principal investigator. V. da S.B., D.H.S.S., M.F. and L.O.R. also acknowledge CNPq and FAPESP for researcher and students fellowships.

References

- Agrawal, P.K., Thakur, R.S., Bansal, M.C., 1989. Flavonoids. In: Agrawal, P.K. (Ed.), Carbon-13 NMR of Flavonoids, vol. 39. Elsevier Science Publishers B.V., New York, pp. 95–182.
- Bolzani, V.S., Guastalika, A.A.L., Kingston, D.G.I., 1995. Bioactive guanidine alkaloids from *Pterogyne nitens*. J. Nat. Prod. 58, 1683–1688.
- Burkart, A., 1952. Las Leguminosas Argentinas. Armé Agency, Buenos Aires, p. 156.
- Capelless-Blandin, C., 1998. Oxidation of guaiacol by myeloperoxidase: a two-electron-oxidized guaiacol transient species as a mediator of NADPH oxidation. Biochem. J. 336, 395–404.
- Cuzzocrea, S., Riley, D.P., Caputi, A.P., Salvemini, D., 2001. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. Pharmacol. Rev. 53, 135–159.
- Duarte-Almeida, J.M., Santos, R.J., Genovese, M.L., Lajolo, F.M., 2006. Evaluation of the antioxidant activity using the β -carotene/linoleic acid system and DPPH scavenging method. Ciência Tecnol. 28, 446–452.
- Gebre-Mariam, T., Asret, K., Getie, M., Endale, A., Neubert, R., Schmidt, P.C., 2005. In vitro availability of kaempferol glycosides from cream formulations of methanolic extract of the leaves of *Melilotus elegans*. Eur. J. Pharm. Biopharm. 60, 31–38.
- Gurel, A., Armutcu, F., Sahin, S., Sogut, S., Ozyurt, H., Gulce, M., Kutlu, N.O., Akyol, O., 2004. Protective role of γ -tocopherol and caffeic acid phenethyl ester on ischemia-reperfusion injury via nitric oxide and myeloperoxidase in rat kidneys. Clin. Chim. Acta 339, 33–41.
- Havsteen, B.H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacol. Therap. 96, 67–202.
- Heinicke, J.W., Li, W., Daehnk, H.L., Goldstein, J.A., 1993. Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophages. J. Biol. Chem. 268, 4069–4077.
- Heijnen, C.G.M., Haenen, G.R.M.M., Oostven, R.M., Stalpers, E.M., Bast, A., 2002. Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. Free Radical Res. 36, 575–581.
- Kato, Y., Nagao, A., Terao, J., Ozawa, T., 2003. Inhibition of myeloperoxidase-catalyzed tyrosylation by phenolic antioxidants in vitro. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67, 1136–1139.
- Lorenzi, H., 1998. Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil, Plantarum, Nova Odessa, p. 162.
- Mahry, Y.J., Markham, K.R., Thomas, M.B., 1970. The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag, New York.
- Markham, K.R., Ternai, B., Stanley, R., Geiger, H., Mabry, T.J., 1978. ^{13}C NMR studies of flavonoids - III. Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. Tetrahedron 34, 1389–1397.
- Maddipati, E., Kamdarwani, C., Theoharides, T.C., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implication for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacol. Rev. 52, 673–751.
- Mitcher, L.A., Gollapudi, S.R., Drake, S., Osburn, D.S., 1985. Amonophthalbol, an antimicrobial agent from *Aspergillus niger*. Phytochemistry 24, 1481–1483.

- Mollace, V., Muscoli, C., Mazini, E., Cuzzocrea, A., Salvemini, D., 2005. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacol. Rev.* 57, 217–252.
- Pellegrini, N., Re, R., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Method Enzymol.* 299, 379–389.
- Pizzolati, M.G., Cunha, A., Szpoganicz, B., Sousa, E., Braz-Filho, R., Schripsema, J., 2003. Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae). *Quim. Nova* 26, 466–469.
- Salama, O., Chaudhuri, R.K., Sticher, O., 1981. A figsan glucoside from *Euphrasia reuteriana*. *Phytochemistry* 20, 2603–2604.
- Soures, J.R., Dinis, T.C., Cunha, A.P., Almeida, L.M., 1997. Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis*. *Free Radical Res.* 26, 469–478.
- Teixeira, A., Morfin, M.P., Cordova, C.A.S., Charfó, C.C.T., Lima, V.R., Creczynski-Pasa, T.B., 2003. Melatonin protects against pro-oxidant enzymes and reduces lipid peroxidation in distinct membranes induced by the hydroxyl and ascorbyl radicals and by peroxynitrite. *J. Pineal Res.* 35, 262–268.
- Van Acker, S.A.B.E., Vanden Berg, D.-J., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H., Van Bennekum, W.P., Van der Vijgh, W.J.F., Bast, A., 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biol. Med.* 20, 331–342.
- Wang, H., Joseph, J.A., 1999. Structure-activity relationships of quercetin in antagonizing hydrogen peroxide-induced calcium dysregulation in PC12 cells. *Free Radical Biol. Med.* 27, 683–694.
- Winterbourn, C.C., Visser, M.C., Kettle, A.J., 2000. Myeloperoxidase. *Curr. Opin. Hematol.* 7, 53–58.

Myeloperoxidase Inhibitory and Radical Scavenging Activities of Flavones from *Pterogyne nitens*

Daniara Cristina FERNANDES,^a Luis Octávio REGASINI,^a José Carlos Rebuglio VELLOSO,^b Patrícia Mendonça PAULETTI,^a Ian CASTRO-GAMBOA,^a Vanderlan Silva BOLZANI,^a Olga Maria Mascarenhas OLIVEIRA,^b and Dulce Helena Siqueira SILVA^{a,b}

^a NuBBE-Núcleo de Biotecnologia, Biotecnologia e Ecofisiologia de Produtos Naturais, Department of Organic Chemistry, Institute of Chemistry, UNESP-São Paulo State University, Araraquara, SP, CP 355, CEP 14801-970, Brazil; and

^b Department of Biochemistry and Chemical Technology, Institute of Chemistry, UNESP-São Paulo State University, Araraquara, SP, CP 355, CEP 14801-970, Brazil.

Received December 22, 2007; accepted February 12, 2008; published online February 18, 2008

Two new flavone glucosides, nitensosides A and B (1, 2), together with four known compounds, sorbifolin (3), sorbifolin 6-O- β -glucopyranoside (4), pedaltin (5), and pedaltin 6-O- β -glucopyranoside (6) were isolated from *Pterogyne nitens*. Their structures were elucidated from 1D and 2D NMR analysis, as well as by high resolution mass spectrometry. All the isolated flavones were evaluated for their myeloperoxidase (MPO) inhibitory activity. The most active compound, pedaltin, exhibited IC₅₀ value of 3.75 μ M on MPO. Additionally, the radical-scavenging capacity of flavones 1–6 was evaluated towards ABTS and DPPH radicals and compared to standard compounds quercetin and Trolox[®].

Key words Flavone; *Pterogyne nitens*; myeloperoxidase; antioxidant; radical scavenging

The vast knowledge accumulated in recent years about inflammatory diseases has permitted a better understanding of the mechanism of action of the several mediators. In this context, some enzymes such as cyclooxygenases, nitric oxide synthase and myeloperoxidase (MPO) have been widely recognized as powerful targets for the action of anti-inflammatory agents.^{1–3} MPO is a leukocyte-derived heme peroxidase which has long been considered as a microbial enzyme centrally linked to the unspecific immune defense system. MPO plays an important role in oxidants production by polymorphonuclear neutrophils (PMNs). It uses hydrogen peroxide (H₂O₂) and chloride gas to catalyze the production of hypochlorous acid (HOCl), which contributes to both microbial killing, and subsequent oxidative injury of host tissue triggering severe inflammatory disorders,⁴ including rheumatoid arthritis,⁵ inflammatory bowel disease (IBD),⁶ cystic fibrosis,⁷ neonatal lung injury,⁸ and adult respiratory distress syndrome.⁹ Thus, the search for new MPO inhibitors from natural sources can provide prototypes for the anti-inflammatory drug discovery, and design of novel therapeutic strategies.

Pterogyne nitens TULASNE (Fabaceae) popularly known as “cocal”, “yvira-rô”, “amendoimzeiro”, “balsamo” is a highly branched and ca. 5–12 m high tree.¹⁰ Its wood is used for house building, for furniture and to make bows.¹¹ In folk medicine, stem barks have been used as antiparasitic agent e.g., for treatment of ascariasis.¹² As previously reported, the leaves of *P. nitens* yielded five guanidine alkaloids, which exhibited cytotoxic activity against the DNA-repair-deficient yeast mutant RS 321 and moderate cytotoxicity against CHO Aux BI cells.¹³ Preliminary study on additional biological activities of *P. nitens* indicated a strong inhibition of rat paw edema suggesting the presence of anti-inflammatory compounds in its leaves EtOH extract which prompted us to investigate its chemical composition and evaluate the antioxidant and MPO inhibitory properties of the isolates.

Experimental

Plant Material Leaves of *Pterogyne nitens* were collected in the Botanic Garden of São Paulo, SP, Brazil, in May 2003, and a voucher specimen (SP204319) has been deposited in the herbarium of the Botanic Institute (SI, Brazil).

Isolation and Purification The shade-dried leaves (2.3 kg) of *P. nitens* were ground and defatted with *n*-hexane (1:1) v/v, at room temperature and exhaustively extracted by maceration with ethanol (2.7 l v/v) at room temperature. The ethanol extract was concentrated under reduced pressure to yield 9.2 g of a syrupy residue. The concentrate was then diluted with MeOH:H₂O (4:1) and successively partitioned with EtOAc and *n*-butanol. After solvent removal using a rotaevaporator, each partition phase yielded 3.0 and 4.2 g, respectively. The EtOAc residue (1.5 g) was chromatographed by gel permeation over Sephadex LH-20 eluted with methanol to afford eleven fractions (E1–E11). Chromatographic purification of fraction E5 (232 mg) by RP-HPLC [MeOH:H₂O:AcOH (46:53.5:0.5), UV detection at 274 nm; flow rate 10 ml/min] led to the isolation of compounds 1 (84 mg) and 6 (47 mg). Fraction E8 (112 mg) was purified by RP-HPLC [MeOH:H₂O:AcOH (55:44.5:0.5), UV detection at 274 nm; flow rate 13 ml/min], affording compound 3 (22 mg). TLC analysis of fraction E11 indicated it was pure, and led to its identification as compound 5 (130 mg). The butanol fraction (1.8 g) was dissolved in MeOH and submitted to gel filtration on Sephadex LH-20 eluted with MeOH, affording 14 fractions (B1–B14). After TLC comparison, fractions B4–B6 were combined (333 mg) and purified by RP-HPLC (MeOH:H₂O:AcOH (68:31.5:0.5), UV detection at 274 nm and flow rate 12 ml/min), to yield compounds 2 (66 mg) and 4 (89 mg).

Radical Scavenging Activity (RSA) Antioxidant activity of compounds 1–6 was determined using DPPH[•] (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS^{•+} [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] as reagents.^{14,15} Sample solutions of 1–6 and positive controls at various concentrations (33.3–1.7 μ M) in MeOH were individually added to 67.6 μ M DPPH in MeOH. The mixture was incubated in the dark at 25 °C for 30 min. Remaining DPPH was determined colorimetrically at 517 nm by comparing with methanol (negative control) in a microplate reader. ABTS^{•+} was prepared by reacting 5 ml of ABTS (7 mM) water solution with 88 μ l of 140 mM potassium persulphate (ratio 1:0.35) and the mixture allowed to stand in the dark at room temperature for 12–16 h before use. Prior to assay, ABTS^{•+} stock solution was diluted with KH₂PO₄/K₂HPO₄ (100 mM, pH 7.0 diluted 1:10 before use) buffer solution (ratio 1:88). ABTS^{•+} solution (1 ml) was added to glass test tubes containing different concentrations of compounds 1–6 and positive controls (0.5–7.0 μ g/ml) and mixed for 15 s. Tubes were incubated for 30 min at room temperature. Scavenging capacity was read spectrophotometrically by monitoring the decrease in absorbance at 734 nm. A lower absorbance of the reaction mixture indicated higher free radical

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: dhalva@iq.unesp.br

scavenging activity. Anti-radical abilities against ABTS^{•+} and DPPH[•] species were expressed by using mean values obtained from triplicates as percentage of radical reduced (% inhibition) calculated from the equation: % inhibition = $[1 - (A_{\text{sample}}/A) \times 100]$, where A is test absorbance without sample (only solvent and free radicals) and A_{sample} is test absorbance with compounds 1–4 or positive controls.

Myeloperoxidase Inhibitory Activity Inhibitory effects of 7-methoxyflavones 1–6 on MPO were evaluated through galactol oxidation in presence of myeloperoxidase (8 ms) and hydrogen peroxide (0.3 ms).¹⁹ The reactions were spectrophotometrically followed at 470 nm, calculated from the initial linear rate of reaction using galactol (70 ms) as substrate for the peroxidase inhibitory activity, and were compared at different sample concentrations of compounds 1–6 (0.50–50 μM) and in their absence. The IC_{50} values were obtained from the rates calculated on the basis of % inhibition expressed in concentration-response curves.

Results and Discussion

Nitensoside A (1) was obtained as yellow amorphous powder. Its IR spectrum showed absorption bands at 3427 (OH), 1656 (α,β -unsaturated C=O), 1606, 1502, 1452 (C=C, aromatic), and a broad band at 1160 cm^{-1} , indicating the presence of a glucosyl unit (Fig. 1). The UV spectrum displayed two strong absorption bands at 274 nm and 338 nm. These results strongly suggested that compound 1 is a flavonoid glycoside.^{17,18} Analysis of the ¹H-NMR data (Table 1) revealed characteristic resonances of aromatic and glycosidic protons (including two anomeric protons) and one methoxy group. The signals at δ 4.92 (1H, d, $J=7.0$ Hz, H-1'), δ 4.45 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H-1''), δ 3.40 (1H, m, H-6a''), δ 3.70 (1H, dd, $J=10.0, 1.5$ Hz, H-6b''), and δ 1.04 (1H, d, $J=6.0$ Hz, H-6'') suggested the presence of one β -glucopyranosyl and one α -rhamnopyranosyl unit in compound 1, which was con-

firmed after inspection of the ¹³C-NMR data set (Table 1) and observation of gHMBC correlations of sugar protons to their respective carbon signals, especially those at δ 102.4 (C-1''), δ 100.6 (C-1''), δ 66.6 (C-6'') and δ 17.7 (C-6''). In the aromatic moiety of compound 1, signals at δ 7.96 (2H, d, $J=8.5$ Hz, H-2', 6'), 6.94 (2H, d, $J=8.5$ Hz, H-3', 5'), 6.87 (1H, s, H-8) and 6.81 (1H, s, H-3) suggested that the aglycone was an apigenin derivative (5,7,4'-trihydroxyflavone).^{17,19} The singlet at δ 6.87 was assigned to H-8 of the flavone A-ring on the basis of its characteristic ¹³C-NMR resonance at δ 91.5.¹⁷ The position of the methoxy group was assigned at C-7 on the basis of observed gHMBC and NOESY correlations (Fig. 2). The NOESY 1D spectrum showed a strong interaction between the methoxy proton signal at δ 3.90 and H-8 whereas a gHMBC correlation was observed between the signals at δ 158.7 (C-7) and δ 3.90, which confirmed the position of the methoxy group at C-7. A singlet observed at δ 13.0 was assigned to the C-5 hydroxy proton. These observations confirmed the aglycone unit as 5,6,4'-trihydroxy-7-methoxyflavone (sorbifolin), which was consistent with the protonated aglycone [sorbifolin + H]⁺ ion at m/z 301 observed in first-order LR-ESI-MS (positive mode) of compound 1. A cross-peak between the signals for

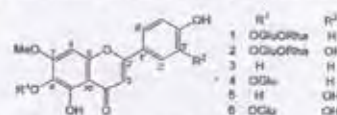


Fig. 1. Structures of Compounds 1–6

Table 1. ¹H- (500 MHz) and ¹³C-NMR (125 MHz) Data for Flavone Glucosides 1 and 2 in DMSO-*d*₆

| Position | 1 | | | 2 | | |
|----------|--------------------|-----------------------------------|-----------------|--------------------|--------------------------------|-----------------------|
| | δ_c (mult.) | δ_{H^a} mult., J (Hz) | gHMBC | δ_c (mult.) | δ_{H^a} mult., J (Hz) | gHMBC |
| 2 | 164.0 (s) | — | H-3, H-2', H-6' | 164.1 (s) | — | H-3, H-2', H-6' |
| 3 | 102.7 (s) | 6.81 (s) | — | 102.7 (s) | 6.67 (s) | — |
| 4 | 182.2 (s) | — | H-3 | 182.1 (s) | — | H-3 |
| 5 | 151.7 (s) | — | 5-OH | 152.8 (s) | — | — |
| 6 | 128.1 (s) | — | H-8, H-1', 5-OH | 128.0 (s) | — | H-8, H-1' |
| 7 | 158.7 (s) | — | H-8, 7-OMe | 158.7 (s) | — | H-8, 7-OMe |
| 8 | 91.5 (d) | 6.87 (s) | — | 91.4 (d) | 6.79 (s) | — |
| 9 | 152.8 (s) | — | H-8 | 151.7 (s) | — | H-8 |
| 10 | 104.9 (s) | — | H-3, H-8, 5-OH | 104.8 (s) | — | H-3, H-8 |
| 1' | 121.2 (s) | — | H-3, H-3', H-5' | 121.5 (s) | — | H-3, H-2', H-5', H-6' |
| 2' | 128.5 (d) | 7.96 (d, $J=8.5$) | H-6' | 113.5 (d) | 7.50 (d, $J=2.0$) | H-6' |
| 3' | 115.9 (d) | 6.94 (d, $J=8.5$) | H-5' | 145.7 (s) | — | H-2', H-5' |
| 4' | 161.2 (s) | — | H-2', H-6' | 149.7 (s) | — | H-2', H-6' |
| 5' | 115.9 (d) | 6.94 (d, $J=8.5$) | H-3' | 115.9 (d) | 6.88 (d, $J=8.5$) | — |
| 6' | 128.5 (d) | 7.96 (d, $J=8.5$) | H-2' | 119.0 (d) | 7.42 (dd, $J=8.5, 2.0$) | H-2', H-5' |
| 1'' | 102.4 (d) | 4.92 (d, $J=7.0$) | H-2'' | 102.4 (d) | 4.89 (d, $J=7.0$) | H-2'' |
| 2'' | 74.0 (d) | 3.24 (m) | H-3'' | 74.0 (d) | 3.22 (m) | H-3'' |
| 3'' | 75.7 (d) | 3.22 (m) | H-2'' | 75.7 (d) | 3.19 (m) | H-2'' |
| 4'' | 70.0 (d) | 3.10 (m) | H-3'' | 70.0 (d) | 3.08 (m) | H-3'', H-4'' |
| 5'' | 76.4 (d) | 3.12 (m) | — | 76.4 (d) | 3.10 (m) | — |
| 6'' | 66.6 (t) | 3.40 (m); 3.70 (dd, $J=11, 1.5$) | H-1'' | 66.5 (t) | 3.39 (m); 3.68 (d, $J=11$) | H-1'' |
| 1''a | 100.6 (s) | 4.45 (d, $J=1.5$) | H-6a'', H-6b'' | 100.5 (s) | 4.43 (br s) | H-6''a |
| 2''a | 70.3 (d) | 3.42 (m) | — | 70.3 (d) | 3.40 (m) | H-3'' |
| 3''a | 70.6 (s) | 3.30 (m) | H-1'' | 70.5 (s) | 3.26 (m) | H-1'' |
| 4''a | 71.8 (s) | 3.10 (m) | H-6'' | 71.8 (s) | 3.08 (m) | H-6'' |
| 5''a | 68.1 (s) | 3.26 (m) | H-6'' | 68.1 (s) | 3.24 (m) | H-6'' |
| 6''a | 17.7 (q) | 1.04 (d, $J=6.0$) | H-4'', H-5'' | 17.7 (q) | 1.01 (d, $J=6.5$) | H-4'', H-5'' |
| 7-OMe | 56.4 (q) | 3.90 (s) | — | 56.4 (q) | 3.88 (s) | — |
| 5-OH | — | 13.0 (br s) | — | — | 13.0 (br s) | — |

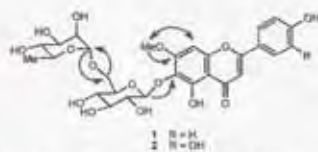


Fig. 2. Selected gHMBC (Single Arrow) and NOESY (Double Arrow) Correlations for Compounds 1 and 2

C-6 (δ 128.1) and the anomeric proton (δ 4.92) in the gHMBC spectrum indicated the position of the glucopyranosyl unit at C-6 of the flavone moiety. Assignment of the inner sugar resonances was achieved by using the anomeric proton resonance at δ 4.92 as a starting point for the interpretation of ^1H - ^1H -COSY and gHMBC datasets. The coupling constant of the anomeric proton ($J=7.0\text{ Hz}$) confirmed the β -linkage of the first glucosyl moiety. The downfield shift of C-6' (+5.5 ppm) and upfield shift of C-5' (-1.4 ppm) glucopyranosyl moiety resonances, respectively, compared to sorbifolin-6- O - β -glucopyranoside,¹⁰ indicated that the rhamnopyranosyl moiety was attached at C-6'. Moreover, the gHMBC correlation between the signals at δ 100.6 (C-1'') and δ 3.70 (H-6'') confirmed the C-6'- O -C-1'' interglycosidic linkage of compound 1. The high resolution ESI mass spectrum of compound 1 showed a deprotonated molecular ion peak $[\text{M}-\text{H}]^-$ at 607.1657 m/z , in agreement with the calculated mass for the molecular formula $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{O}_{15}$ (607.1657).

Compound 2 was obtained as amorphous yellow powder and its HR-ESI-MS (negative mode) showed a deprotonated molecular ion at m/z 623.1600 (Calcd 623.1657) associated to the molecular formula $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{O}_{16}$. The UV and IR spectra of 2 were similar to those of compound 1 suggesting a 6- O -glucosylflavone derivative. The IR of 2 showed a broad hydroxyl band at 3427 cm^{-1} , and an α,β -unsaturated carbonyl absorption at 1656 cm^{-1} , in addition to a C-O stretching band at 1045 cm^{-1} , indicating a glycosidic substance. The UV spectrum of 2 exhibited absorption maxima typical of a flavone at 270 nm and 349 nm. The ^1H - and ^{13}C -NMR data (Table 1) suggested that compound 2 had the same 7-methoxyflavone skeleton as compound 1, except for the presence of a hydroxy group at C-3'. In fact, the major difference between compounds 1 and 2 was the aromatic spin system displayed by the B ring hydrogens, which were resolved as one ABX spin system at δ 7.42 (1H, dd, $J=8.5, 2.0\text{ Hz}$, H-6'), δ 7.50 (1H, d, $J=2.0\text{ Hz}$, H-2'), and δ 6.88 (1H, d, $J=8.5\text{ Hz}$, H-5') for compound 2. The ^{13}C -NMR spectrum of compound 2 presented 28 signals, deduced from distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT) 90°, DEPT 135° and gHMBC experiments as one methyl, one methylene, fifteen methines, one methoxyl and ten quaternary carbons, including one α,β -unsaturated ketone at δ 182.1, which confirmed the flavone core. Similarly as for nitensoside A, the position of methoxy group and sugar units, as well as the interglycosidic linkage were deduced from gHMBC and NOESY 1D experiments. A gHMBC correlation of signals at δ 158.7 (C-7) and δ 3.88 (OMe) in addition to NOESY interaction of signals at δ 3.88 and δ 6.79 (H-8) indicated the position of the methoxy group at C-7. Cross-peaks between signals at δ 128.0 (C-6) and δ 4.89 (H-1''), and between signals at δ 66.5 (C-6'') and δ 4.43

(H-1'') led to the establishment of glucosylation at C-6 and the C-6''- O -C-1'' interglycosidic linkage in compound 2. Further gHMBC correlations gave additional support to the structure of this new pedalin glucoside derivative (Fig. 2). Thus based on spectrometric data analysis, the structures of flavones 1 and 2 were elucidated as sorbifolin 6- O - α -rhamnopyranosyl(1''- \rightarrow 6'')- β -glucopyranoside, and pedalin 6- O - α -rhamnopyranosyl(1''- \rightarrow 6'')- β -glucopyranoside, two new naturally occurring compounds named as nitensoside A and B, respectively. In addition, four known 7-methoxyflavones were isolated and identified as sorbifolin (3),²⁰ sorbifolin 6- O - β -glucopyranoside (4),²⁰ pedalin (5),²⁰ and pedalin 6- O - β -glucopyranoside (6).¹¹

The antioxidant activity of the isolates was evaluated by measuring free radical scavenging effects using two different assays, the ABTS radical cation decolorization assay and the DPPH radical scavenging activity assay.^{14,15} Pedalin derivatives had better radical scavenging activity than sorbifolin derivatives, probably due to presence of the *ortho*-dihydroxy group (catechol residue on ring B), which is responsible for enhanced free radical stabilization after one hydrogen radical donation for the antioxidant capacity.^{21,22} Pedalin derivatives 2, 5 and 6 showed higher scavenging activity towards ABTS radical, with IC_{50} (μM) values of 5.02, 1.36 and 4.07, respectively; and towards DPPH with IC_{50} values of 11.0, 5.22, and 8.19, respectively, than sorbifolin derivatives 1, 3 and 4 (Table 2), evidencing a major role of the catechol moiety on the B-ring of flavonoids for enhancement of the free radical scavenging activity. Additionally, among pedalin derivatives, increased activities were observed for pedalin (5) when compared to its glucosides 2 and 6 in both assays, evidencing the influence of the free hydroxy group at C-6, to generate an additional catechol group (on ring A), and therefore potentiating its free radical scavenging activity. The presence of two catechol moieties on pedalin provided even higher activity towards ABTS than for the reference compound quercetin (IC_{50} 4.12 μM), as observed previously for glucosyl-xanthones.²³ Similarly, this trend has also been observed for sorbifolin, which showed lower IC_{50} (5.7 μM towards ABTS, and 13.5 μM towards DPPH) than its 6- O -glucosyl derivatives 1 and 4, thus confirming the importance of the 5,6-dihydroxy moiety on ring A for enhanced antiradical activity of 7-methoxyflavones.

Although a broad spectrum of the effects on mammalian enzyme systems has already been demonstrated for flavonoids,²⁴ few studies have been devoted to the MPO inhibitory activity of this class of natural polyphenols.^{25,26} MPO inhibitory activity has been proven to be dependent on the redox status of biological systems and has been evaluated in this study by a reference method with modifications.¹⁶ The results have been summarized in Table 2 and evidence the importance of the catechol system on rings A and/or B for increased MPO inhibitory activity. Compounds 2, 5 and 6, displaying a 3',4'-dihydroxy phenolic moiety, exhibited IC_{50} values of 19.2, 3.8, and 15.8 nM, respectively, indicating a higher MPO inhibitory activity than compounds 1, 3 and 4, which are sorbifolin derivatives, thus presenting a monohydroxy phenolic B ring. Glucosides 1, 2, 4 and 6 showed slightly lower activities than their free aglycones, suggesting an important role of the free hydroxyl at C-6. Altogether, these results indicate a clear positive correlation between

Table 2. MPO Inhibition and ABTS and DPPH Radical Scavenging Activity of Flavones 1–6^a

| Compounds | MPO (na) | ABTS radical (µM) | DPPH radical (µM) |
|------------------------|------------|-------------------|-------------------|
| 1 | 23.9 ± 0.5 | 15.3 ± 0.3 | 14.7 ± 0.5 |
| 2 | 19.2 ± 0.1 | 5.0 ± 0.5 | 11.0 ± 0.3 |
| 3 | 19.2 ± 0.1 | 5.7 ± 0.4 | 13.5 ± 0.5 |
| 4 | 22.0 ± 0.3 | 6.3 ± 0.4 | 14.0 ± 0.7 |
| 5 | 3.8 ± 0.1 | 1.4 ± 0.3 | 5.2 ± 0.1 |
| 6 | 15.8 ± 0.1 | 4.1 ± 0.5 | 8.2 ± 0.2 |
| Quercetin ^b | 1.2 ± 0.1 | 4.2 ± 0.5 | 2.6 ± 0.5 |
| Trolox ^{b,c} | — | 0.6 ± 0.1 | 4.7 ± 0.7 |

a) DPPH = 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; ABTS = 2,2'-azobis(3-ethylbenzothiazole-6-sulphonic acid); IC₅₀ values were determined by linear regression and expressed as means ± S.D. of replicate experiments. b) Quercetin was used as positive control for MPO inhibition.²⁶ c) Trolox[®] and quercetin were used as positive controls for RSA assays.

MPO inhibitory activity and radical scavenging properties of flavonoids as shown on Table 2, which might be important for treating inflammation derived diseases.

Conclusion

The association of antiradical properties and MPO inhibitory activity observed for flavones 1–6, tested in this study, indicates this might be a rational approach in the search for bioactive natural products. In conclusion, this study has demonstrated that the isolated flavones might be considered as potential candidates for the development of anti-inflammatory agents, since they present antiradical properties and inhibit myeloperoxidase, a key enzyme involved in inflammatory processes.

Acknowledgements This work was funded by grants from the "Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo", FAPESP (Brazil), as part of the Biota-FAPESP—The Biodiversity Virtual Institute Program (www.biota.org.br); Grant No. 04/07932-7 awarded to D.H.S.S., P.I. D.C.F., L.O.R., J.C.R.V., P.M.P., V.S.B. and D.H.S.S. also acknowledge FAPESP and CNPq for researcher and students fellowships.

References and Notes

- Barnes F, Chang K. F., Page C. P. *Pharmacol. Rev.*, **50**, 515–596 (1998).
- Di Rosa M., Lalesti A., Iannaro A., Sautelin L., *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **54**, 229–238 (1996).
- Sautelin L. A., Ialenti A., Iannaro A., Di Rosa M., *Re J. Pharmacol.*

- 114, 323–328 (1995).
- Winterbourn C. C., Vissers M. C. M., Kettle A. J. *Curr Opin. Hematol.*, **7**, 53–58 (2000).
- Edwards S. W., Haller M. B., *Immunol. Today*, **18**, 320–324 (1997).
- Dhawan S. S., Kandpal M., Vaidhakar G., Rath B., Kadam S. S., *Eur. J. Med. Chem.*, **42**, 885–890 (2007).
- Regelema W. E., Siefferman C. M., Herms J. M., Elliot G. B., Clausen C. C., Gray B. H., *Pediatr. Pulmonol.*, **19**, 1–9 (1995).
- Bus L. H., Daifow B. A., Winterbourn C. C., *Pediatr. Res.*, **47**, 640–645 (2000).
- Clabot F., Mitchell I. A., Gutteridge J. M., Evans T. W., *Eur. Respir. J.*, **11**, 745–757 (1998).
- Lorezti H., "Árvores brasileiras: Manual de identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil," Vol. 1, Plantarum, Nova Odessa, 1998, p. 162.
- Burkart A., "Las Leguminosas Argentinas," *Argent. Agency, Buenos Aires*, 1952, p. 156.
- Crioto M., Martínez M. R., Pochettino M. L., Remorini C., Sy A., Teves L., *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, **2**, 1–12 (2007).
- Bolrani V. S., Gunatilaka A. A. L., Kingston D. G. I., *J. Nat. Prod.*, **58**, 1683–1688 (1995).
- Seares J. R., Dinis T. C., Cunha A. P., Almeida L. M., *Free Rad. Res.*, **28**, 469–478 (1997).
- Pellegrini N., Re R., Yang M., Rice-Evans C., *Methods Enzymol.*, **299**, 379–389 (1999).
- Capellero-Blandin C., *Biochem. J.*, **336**, 395–404 (1998).
- Mahy T. J., Markham K. R., Thomas M. B., "The Systematic Identification of Flavonoids," Springer-Verlag, New York, 1970, pp. 84–120.
- Agrawal P. K., Thakur R. S., Bansal M. C., "Carbon-13 NMR of Flavonoids," Vol. 39, ed. by Agrawal P. K., Elsevier, New York, 1989, pp. 95–182.
- Markham K. R., Geiger H., "The Flavonoids: Advances in Research Since 1986," ed. by Harborne J. B., Chapman and Hall, London, 1993, pp. 441–497.
- Zhang X. F., Hu B. L., Wang S. X., *Acta Bot. Sin.*, **36**, 645–648 (1994).
- Van Acker S. A. B. E., Vanden Berg D.-J., Trump M. N. J. L., Griffioen D. H., Van Bennekom W. P., Van der Vliet A. J. E., Bast A., *Free Rad. Biol. Med.*, **20**, 331–342 (1996).
- Seyoum A., Atkes K., El-Fiky E. K., *Phytochemistry*, **67**, 2058–2070 (2006).
- Pudetti P. M., Castro-Gamboa L., Silva D. H. S., Young M. C. M., Tomazela D. M., Eberlin M. N., Bolzani V. D., *J. Nat. Prod.*, **66**, 1384–1387 (2003).
- Middleton E., Kandaswami C., Theobalds T. C., *Pharmacol. Rev.*, **52**, 673–751 (2000).
- Kato Y., Nagao A., Terao J., Osawa T., *Biomol. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 1136–1139 (2003).
- Russo R., Vieira T. O., Leal P. C., Nunes R. J., Yunes R. A., Creczynski-Pasa T. B., *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 6409–6413 (2006).

CONSTITUINTES QUÍMICOS DAS FLORES DE *Pterogyne nitens* (CAESALPINIOIDEAE)¹Luís Octávio Regasini, Daniara Cristina Fernandes, Ian Castro-Gambao, Dulce Helena Siqueira Silva, Mayra Furlan e Vanderlan da Silva Bolzani²

Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Rua Francisco Degni, s/n, 14800-900 Araraquara - SP, Brasil

Eliezer Jesus Barreiro

Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, CP 68006, 21944-190 Rio de Janeiro - RJ, Brasil

Elaine Monteiro Cardoso-Lopes, Maria Cláudia Mary Young e Lúcia Brandão Torres

Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Instituto de Botânica, Av. Miguel Scaffano, 5687, 04301-012 São Paulo - SP, Brasil

José Carlos Rebuglio Veloso e Olga Maria Mascarenhas de Oliveira

Departamento de Bioquímica e Tecnologia, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Rua Francisco Degni, s/n, 14800-900 Araraquara - SP, Brasil

Recebido em 15/1/08, aceito em 17/2/08, publicado na web em 23/6/08

CHEMICAL CONSTITUENTS OF THE FLOWERS OF *Pterogyne nitens* (CAESALPINIOIDEAE). The phytochemical investigation of the flowers of *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae) resulted in the isolation and identification of nine phenolic derivatives, quercetin 5-O-sophorose, isoflavan, xanthone, nortetraacetin, cathic, ferulic, coumaric, chlorogenic and gallic acid, besides two guanidine alkaloids, pterogyneine, pterogyneidine. This is the first time these compounds have been reported in *P. nitens* flowers. As this is a monospecific genus, these secondary metabolites may have taxonomical significance. Their structures were assigned on the basis of spectroscopic analysis, including two-dimensional NMR techniques.

Keywords: *Pterogyne nitens*; flavonóides; guanidínia alcalóides.

INTRODUÇÃO

Pterogyne nitens Tulane (Fabaceae – Caesalpinioideae), uma espécie pertencente a um gênero monoespecífico, é popularmente conhecida como “amendoim-do-campo”, “amendoim-bravo”, “bil-sano”, “yvi-carri”, “cocal”, “tipe” etc. Na América Latina esta espécie arbórea ocorre na Argentina, Bolívia, Paraguai e Brasil. No território brasileiro ocorre com frequência na região de Mata Atlântica e Cerrado compreendida entre o Ceará até o Paraná.¹

“Amendoim-bravo”, como é popularmente conhecida no estado de São Paulo, é amplamente empregada na construção civil devido às características da sua madeira (moderadamente densa e resistente).² *P. nitens* também conhecida pela beleza e odor de suas flores, bem como pela intensidade de suas folhagens e frutificação possui grande valor ornamental sendo, portanto, recomendada para arborização de vias urbanas e rodovias e na disposição de mata ciliar em locais com inundações periódicas. Esta espécie habita as remanescentes de vegetação paulista e encontra-se sob risco de extinção, fazendo parte da lista de espécies recomendadas para a conservação genética no estado de São Paulo.³

A literatura apresenta poucos dados das aplicações medicinais e da constituição química de *P. nitens*. Estudos etnofarmacológicos em comunidades guaranis do nordeste da Argentina revelam o uso das cascas do caule no tratamento de infestações parasitárias, principalmente no combate ao “tacho”, nome popular de *Ascaris lumbricoides*.⁴ Em trabalhos fitoquímicos anteriores, foram isolados cinco alcalóides guanidínicos das folhas e caules de *P. nitens*, os quais mostraram atividade citotóxica sobre linhagens tumorais

de *Saccharomyces cerevisiae*, sugerindo atividade antitumoral potencial desses alcalóides.⁵

Dada a emergência de preservação da espécie ameaçada de extinção, o estudo sobre a composição micromolecular das flores de *P. nitens* foi bastante significativo para o registro do perfil metabólico da espécie. Desse estudo foram isolados e identificados onze constituintes: quatro flavonóides, quatro derivados do ácido cinâmico, dois alcalóides guanidínicos e o ácido gálico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identificação de todas as substâncias foi realizada com base na comparação de dados espectroscópicos de RMN de ¹H, RMN de ¹³C, gCOSY, gHMQC, gHMBC, NOESY 1D e compensação desses dados com aqueles disponíveis na literatura.

A análise dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C permitiu caracterizar as substâncias 1-4 como derivados do ácido cinâmico, com uma feição comum caracterizada por um par de dubletos entre δ_{H} 7,58-7,49 ($J = 16,0$ Hz, 1H) e δ_{H} 6,40-6,13 ($J = 16,0$ Hz, 1H), típicos do sistema *trans*-alceno de derivados aromáticos C₆-C₇. Os demais valores atribuídos aos sinais correspondentes ao anel aromático demonstram sutis diferenças na série 1-4. Os sinais em δ_{H} 7,12 (d, $J = 2,5$ Hz), δ_{H} 7,04 (dd, $J = 2,5$ e 8,5 Hz) e δ_{H} 6,85 (d, $J = 8,5$ Hz) observados no espectro de RMN de ¹H de 1 foram atribuídos aos hidrogênios H-2, H-6 e H-5, respectivamente. Esses dados sugerem a presença de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído, permitindo concluir que o derivado de ácido cinâmico em análise é o ácido caféico.⁶

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C da substância 2 apresentaram o mesmo perfil de sinais daqueles observados para 1, exceto pela presença do singlete em δ_{H} 3,90 (OH), atribuído a uma metoxila. A

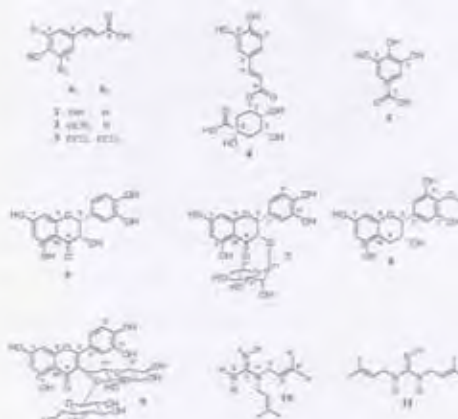
¹Financiamento à Profa. Helena Maria C. Ferraz
²e-mail: bolzani@iq.usp.br

ligação do grupo metoxílico ao anel aromático foi estabelecida pela correlação observada entre os sinais em δ_c 3,90 (OCH₃) e 147,9 (C-5), no mapa de contornos g HMBC. Assim, a substância 2 pôde ser caracterizada como sendo ácido ferúlico.¹⁰ Os espectros de RMN de ¹H da substância 3 apresentaram dois singletos δ_c 6,98 (2H) e δ_c 3,80 (6H), os quais foram atribuídos aos hidrogénios metínicos H-2 e H-6 e aos dois grupos metoxílicos, respectivamente. Os demais dados espectrais confirmaram a posição dos dois grupos metoxílicos nos carbonos C-3 e C-5 e permitiram identificar a estrutura molecular de 3 como sendo ácido sinápico.¹⁰ Os dados dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C de 4 foram quase similares àqueles observados para o ácido caféico 1. Na estrutura de 4, além dos sinais de uma unidade de ácido caféico analisados a partir dos espectros de RMN de ¹³C, foram diagnosticados um conjunto de sinais compatíveis com uma unidade de ácido quínico. O espectro de RMN de ¹H apresentou sinais para três hidrogénios metínicos em δ_c 3,56 (dd, $J = 3,5$ e 10,0 Hz, H-4), 3,92 (d, $J = 3,5$ Hz, H-4) e 5,06 (td, $J = 3,5$ e 10,0 Hz, H-5) e para hidrogénios metílicos na região compreendida entre δ_c 1,08 e 1,99 (H-2 e H-6), os quais confirmaram a presença de uma unidade derivada do ácido quínico. A ligação do grupo cafeoila à unidade de ácido quínico foi estabelecida pela correlação observada entre os sinais em δ_c 5,06 (H-5) e δ_c 165,7 (C-9'), no mapa de contornos g HMBC. Os valores observados para os acoplamentos de H-4 com H-3 e H-5 indicaram uma relação axial-equatorial entre H-4 e H-3 ($J = 3,5$ Hz) e axial-axial entre H-4 e H-5 ($J = 10,0$ Hz) confirmando as posições diastereoisoméricas para os grupos cafeoila e a hidroxila (4-OH). Os experimentos de NOESY 1D mostraram um aumento na intensidade do sinal em δ_c 3,92 (H-3) pela irradiação do sinal atribuído ao hidrogénio H-4 (3,56) e ausência de NOE quando da irradiação do sinal em δ_c 5,06 (H-5), consolidando a configuração relativa proposta. Tais informações foram confirmadas com dados da literatura, indicando que a estrutura de 4 corresponde ao ácido 5-O-cafeoilquínico.¹⁰ Os dados obtidos dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C permitiram caracterizar a substância 5 como sendo ácido gallico.¹⁰

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C permitiram inferir que a substância 6 pertence à classe dos flavonóides. Entre outras feições destacam-se o conjunto de sinais do espectro de ¹³C em δ_c 73,6, 85,0 e 198,3 atribuídos aos carbonos C-3, C-2 e C-4, respectivamente, indicando que 6 possui a estrutura de um diidrofloreonil. Um par de dupletos em δ_c 5,91 ($J = 2,0$ Hz, 1H) e δ_c 5,88 ($J = 2,0$ Hz, 1H) foram atribuídos ao anel A 5,7,9,10-tetra-substituído. Os sinais em δ_c 6,96 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H), δ_c 6,80 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H) e δ_c 6,84 (dd, $J = 2,0$ e 8,0 Hz, 1H) corroboram o padrão 1,3,6-tri-substituído para o anel B. Ainda o espectro de RMN de ¹H de 6 apresentou um par de dupletos em δ_c 4,90 ($J = 12,0$ Hz, 1H) e 4,49 ($J = 12,0$ Hz, 1H), os quais foram atribuídos aos hidrogénios H-2 e H-3, respectivamente. A constante de acoplamento apresentada por estes dois dupletos ($J = 12$ Hz) sugere um acoplamento do tipo axial-axial, concludindo à proposição de que o anel B e o grupo hidroxila 3-OH mantêm uma relação *cis*. Estes dados analisados em consonância com os de RMN de ¹³C permitiram caracterizar 6 como sendo taxifilina.¹¹ Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C de 7 indicaram uma estreita similaridade entre 6 e 7. A única diferença notada entre os espectros das duas substâncias refere-se aos sinais característicos de uma unidade glicosídica em 7. O sinal em δ_c 17,8, atribuído ao carbono metílico C-6' e o conjunto de sinais em δ_c 100,1 (C-1'), 71,7 (C-4'), 70,4 (C-3'), 70,1 (C-2') e 69,0 (C-5') permitiram caracterizar a unidade monossídica como sendo uma ramirose. O espectro de RMN de ¹H demonstrou a presença de um duplete em δ_c 4,04 que foi atribuído ao hidrogénio anomérico H-1', cuja constante de acoplamento de 1,5 Hz inferiu a configura-

ção α para a unidade de ramirose. A correlação deste duplete e o sinal em δ_c 75,7 atribuído ao carbono C-3, observada no mapa de contornos g HMBC, sugere que a unidade de ramirose se encontra ligada ao carbono C-3. Os dados espectroscópicos analisados para 7 indicaram tratar-se da estrutura da taxifilina.¹¹ A análise polarimétrica dos diidrofloreonóis 6 e 7 indicou valores de rotação óptica específicos de +17° ($c = 1,02$ MeOH, 27 °C) e -22° ($c = 0,82$, MeOH, 27 °C), respectivamente. Esses dados sugerem as configurações absolutas *RR* dos carbonos C-2 e C-3 presentes nas estruturas moleculares de 6 e 7, os quais se mostraram compatíveis com os valores descritos na literatura.¹¹

O espectro de RMN de ¹H da substância 8 apresentou três sinais característicos de hidrogénios aromáticos: δ_c 6,53 (s, 2H), 5,93 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H) e 5,95 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H) indicando tratar-se também de um flavonóide. Os sinais correspondentes a dois hidrogénios metílicos em δ_c 2,72 (dd, $J = 3,0$ e 17,0 Hz) e δ_c 2,86 (dd, $J = 5,0$ e 17,0 Hz) foram atribuídos aos hidrogénios H-4a e H-4b, respectivamente e permitiram atribuir a estrutura de uma catequina para 8. Os sinais relativos aos carbonos em δ_c 100,1 e 157,0 e 29,1 analisados em conjugação com as correlações observadas no mapa de contornos g COSY para os hidrogénios H-4a, H-4b e H-7 ajudaram a confirmar a proposição de uma catequina para 8. Os experimentos de NOESY 1D foram empregados visando confirmar a estereoquímica relativa de C-2 e C-3. A irradiação em δ_c 2,73 (H-4a) causou aumento na intensidade do sinal em δ_c 4,19 (m, H-3). A irradiação do sinal em δ_c 2,86 (H-4b) também levou ao aumento de intensidade em δ_c 4,19 (H-3), indicando a proximidade destes hidrogénios. No entanto, pela intensidade dos NOE observados os sinais em δ_c 2,86 (H-4b) e δ_c 4,19 (H-3) estão posicionados na mesma face do plano do anel ao qual estão ligados. A irradiação do sinal em δ_c 2,73 (H-4a) também causou um incremento em δ_c 4,78 (s, H-2), indicando uma correlação 1,3-difacial entre H-4a e H-2. Ao irradiar-se o sinal em δ_c 4,19 (H-3), houve um ganho de intensidade em δ_c 4,78 (H-2) e δ_c 2,73 (H-4a) coerente com uma relação *cis* entre H-2, H-3 e H-4a. Estes dados analisados em consonância com as constantes de acoplamento destes sinais permitiram atribuir a configuração relativa proposta. O mapa de contornos g HMBC demonstrou uma intensa correlação entre o sinal em δ_c 3,80 (s, 3H), atribuído a um hidrogénio metoxílico e o sinal em δ_c 136,0, o qual está relacionado ao carbono C-4', sugerindo que o grupo metoxílico se encontra ligado ao carbono C-4'. A medida da rotação óptica específica de 8 ($\alpha_D^{25} = -50^\circ$ ($c = 1,22$, acetona) indicou ao



configurações *R* e *S* dos carbonos C-2 e C-3, similares aos valores encontrados para a epigallocatequina.¹⁴ Os dados apresentados são compatíveis com estrutura da catequinaquina,¹⁵ confirmando sua identidade com **8**.

A análise dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C permitiu caracterizar a substância **9** também como um flavonóide. O espectro de RMN de ¹³C apresentou os sinais em δ_c 177,3, 155,4 e 132,9 atribuídos aos carbonos C-4, C-2 e C-3, respectivamente, evidenciando a subclasse dos flavonóis. Os sinais em δ_c 144,7 e 148,7 atribuídos aos carbonos C-7' e C-4', respectivamente, evidenciaram um flavonol cujo anel B encontra-se 1',3',4'-trissubstituído. Adicionalmente, os sinais de RMN de ¹³C compreendidos entre δ_c 60,6 e δ_c 82,6 analisados com os sinais de RMN de ¹H em δ_H 5,66 (d, *J*=7,5 Hz, 1H) e δ_H 4,58 (d, *J*=7,5 Hz, 1H) correspondentes a dois hidrogênios anoméricos indicaram duas subunidades de glicose e, com base no valor da constante de acoplamento (*J*=7,5 Hz) para estes dois dupletos, verificou-se tratar de duas subunidades de β -glicose. Os experimentos de gHMBC demonstraram duas correlações entre os dupletos em δ_H 5,66 e δ_H 4,58 atribuídos aos hidrogênios anoméricos H-1' e H-1'', respectivamente, e o sinal em δ_c 82,6 sugerindo que a ligação interglicosídica seja do tipo 2''-4'1''. O mapa de contornos gHMBC de **9** também apresentou uma correlação entre o sinal em δ_c 132,9 atribuído ao carbono C-3 e o dupletos em δ_H 5,66, levando à conclusão que a posição de *O*-glicosilação se encontra em C-3. Pelos dados obtidos pode-se caracterizar **9** como sendo quercetina 3-*O*-sotroside.¹⁶

Análise dos dados de RMN de ¹³C das substâncias **10** e **11** indicou tratar-se de alcalóides de estruturas bastante similares. Entre outras características destacam-se a presença de sinais em torno de δ_c 155,7 e 156,9 (C-2) típico de carbonos guanidínicos e um conjunto de cinco sinais relacionados às subunidades isoprenílicas em torno de δ_c 17,8/17,7; δ_c 25,2/25,1; δ_c 39,0/38,7; δ_c 119,2/119,0 e δ_c 125,8/126,0. A análise desses dados indicou que **10** e **11** contém um núcleo guanidínico substituído por unidades hemiterpênicas. Dado evidenciado por dois singletos em δ_H 1,62 (H-2') e δ_H 1,68 (H-5') atribuídos aos hidrogênios dos grupos metílicos, um dupletos em δ_H 3,72 (d, *J*=6,5, H-1') e um triplo em δ_H 5,16 (t, *J*=6,5, H-2') relacionados aos hidrogênios metilínicos e metínicos, respectivamente, para **10**. Da mesma forma, dados similares caracterizaram a estrutura de **11**, indicando que as estruturas em questão se tratam de alcalóides guanidino-prenilados. A única diferença entre os alcalóides **10** e **11** deve-se ao padrão de substituição do núcleo guanidínico. No alcalóide **10** o sinal δ_c 3,72 (*J*=6,5 Hz), atribuído aos hidrogênios H-1', apresenta-se como um dupletos devido ao acoplamento com H-2'. Adicionalmente, a ausência do hidrogênio aromático na estrutura alcaloídica indicou o padrão *N,N*-disubstituído para **10**, que foi caracterizado como sendo a pterogitina.¹⁷ No alcalóide **11**, a presença de um triplo em δ_H 7,72 (t, *J*=6,5, 1H) devido ao acoplamento do hidrogênio aromático do núcleo guanidínico com H-1' da unidade hemiterpênica indicou que a substituição terpênica ocorre nos nitrogênios vizinhos da estrutura guanidínica. Análise de todos os dados indica que **11** possui padrão *N,N'* de substituição isoprenílica. Fundamentado nestas análises, a substância **11** foi caracterizada como a pterogitina,¹⁸ um isômero constitucional do alcalóide **10**.

As substâncias **1-11** foram avaliadas quanto à sua capacidade de inibição sobre micoperoxidase (MPO), uma heme-enzima abundante em polimorfonucleares (PMNs), e considerada uma macromolécula-chave na resposta imunológica inespecífica à vários agentes invasores, principalmente bactérias. A MPO é responsável pela conversão de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e íons cloro em água e ácido hipocloroso (HOCl) que, por sua vez, atua como um potente agente antimicrobiano. Além disso, o excesso da

atividade de MPO e subsequente produção exagerada de HOCl catalisa em um intenso estresse oxidativo para os PMNs. A literatura correlaciona essa injúria oxidativa promovida por MPO e HOCl com inúmeros processos inflamatórios, tais como artrite reumatóide, fibrose cística, doença inflamatória intestinal (IBD), injúria pulmonar neonatal, etc. Dessa forma, a busca por inibidores de MPO a partir de fontes naturais torna-se de grande valia na descoberta de novos agentes anti-inflamatórios.¹⁹

Dentre as substâncias ensaiadas com MPO, apenas as substâncias **5** e **9** mostraram-se ativas, com CI_{50} de 17,5 e 3,72 μ M, quando comparadas à quercetina, utilizada como controle positivo, que apresentou um CI_{50} de 1,22 μ M. O valor de CI_{50} da quercetina apresenta-se inferior àquela observado para o seu glicosídeo **9**, sugerindo a importância de uma hidroxila livre na posição 3 para atividade de inibição de MPO. As demais substâncias mostraram-se inativas (CI_{50} > 100 μ M), incluindo a substância **6**, um análogo hidrogenado da quercetina. Essa observação sugere que uma interação síndica entre os carbonos C-2 e C-3 no núcleo flavonóide para uma ação inibitória sobre MPO.

Os extratos e frações obtidos das flores de *P. nitens* tiveram sua capacidade antioxidante avaliada no ensaio em eremoplastas reveladas com β -caroteno, mostrando-se ativos, uma vez que mantiveram a coloração laranja nos pontos de aplicação. As substâncias fenólicas isoladas neste estudo são provavelmente as responsáveis pela atividade antioxidante dessas frações detectadas pelo teste preliminar com β -caroteno e que foi anteriormente relatado por Cai e colaboradores, que demonstram a capacidade sequestradora de radicais livres das substâncias **1-9** nos ensaios com DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) e ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)).²⁰ A atividade sequestradora de radicais exibida pelos derivados fenólicos vem sendo amplamente discutida na literatura e está correlacionada a fatores mesoméricos que conferem a esse grupo funcional uma alta reatividade como doadores de elétrons.²¹ Os alcalóides guanidínicos **10** e **11** tiveram seu poder antioxidante avaliado sobre os radicais DPPH e ABTS. Os resultados indicaram que os alcalóides são inativos no teste com DPPH (CI_{50} > 200 μ M) e mostraram atividade baixa sobre o radical ABTS, apresentando CI_{50} de 87,7 e 190,0 μ M, sendo a quercetina como controle positivo (CI_{50} de 7,64 e 3,12 μ M para os radicais DPPH e ABTS, respectivamente).

O estado químico das flores de *P. nitens* culamou no isolamento de onze substâncias de três classes químicas distintas: flavonóides (flavonóis, diidrofleavonóis e catáquinas), derivados do ácido cínico e alcalóides. Dentre esses, somente as substâncias **10** e **11** já haviam sido relatadas como pertencentes ao metabolismo de *P. nitens*. Este trabalho permitiu concluir ainda que os metabólitos secundários acumulados nas flores desta espécie são predominantemente de natureza fenólica. A descrição dos constituintes acumulados em *P. nitens* é também de grande valia tendo em conta que sua madeira vem sendo empregada indiscriminadamente pela construção civil e, por tratar-se de um gênero monoespecífico, esta leguminosa está seriamente ameaçada de extinção.²

PARTE EXPERIMENTAL

Procedimentos experimentais gerais

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C e experimentos bidimensionais foram realizados em espectrômetro Varian INOVA-500[®] operando a 500 MHz para o núcleo de ¹H e 125 MHz para o núcleo de ¹³C. TMS foi utilizado como referência interna. Os dados de rotação óptica foram obtidos no polarímetro Polarat A Carl Zeiss Jena[®]. As análises por CLAE no modo analítico foram realizadas em equi-

pamento ProStar/Varian[®] acoplado ao detector ProStar 330[®] de arranjos de diodos, injetando coluna analítica Phenomenex[®] Fenil-Hexila (250 x 4,60 mm; 5 µm). No modo preparativo, as análises por CLAE foram realizadas em equipamento ProStar/Varian[®] acoplado ao detector ProStar-UV[®], utilizando-se coluna Phenomenex Fenil-Hexila (250 x 21,2 mm; 10 µm). Nas separações em coluna aberta foram utilizadas gel de sílica derivatizada C-18 (40-63 µm, Merck[®]), gel de sílica para cromatografia flash (35-70 µm) e para cromatografia de exclusão molecular (Sephades[®] LH-20). As análises por cromatografia em camada delgada foram realizadas com cromatoplaques de gel de sílica G60 (0,25 mm). Após o desenvolvimento das cromatoplaques estas foram visualizadas sob luz ultravioleta ($\lambda = 254$ e 365 nm) e reveladas com solução de anilindol em ácido sulfúrico seguido de aquecimento.

Material vegetal

As flores de *P. nitens* foram coletadas no Instituto de Botânica, São Paulo - SP no mês de abril de 2003, pela Dra. M. C. M. Young. O material botânico foi identificado como sendo *Pterogyne nitens* (Fabaceae - Caesalpinioideae) pela Dra. I. Cordeiro, do mesmo Instituto. Uma exsiccata (SP204319) encontra-se depositada no herbário "Maria Euclides P. Kaufmann" do Instituto de Botânica, São Paulo - SP.

Extração e isolamento

As flores (1,8 kg) foram secas à temperatura ambiente por 15 dias e, posteriormente, submetidas à moagem empregando moedor de facas. O pó obtido (1,5 kg) foi levado à maceração empregando hexano e posteriormente maceração em etanol. Após evaporação, o extrato hexânico (3,8 g) foi analisado por RMN de ¹H e CCDC mostrando tratar-se de uma mistura complexa de terpenos. O extrato etanólico (15,0 g) foi dissolvido em uma mistura de metanol:água (7:3) e posteriormente submetido à partição líquido-líquido empregando acetato de etila e *n*-butanol.

A fração AcOEt (3,8 g) foi submetida à cromatografia em coluna de permutação em gel (Sephades[®], LH-20, 180 x 5 cm), eluída em MeOH, obtendo-se 25 subfrações de 75 mL. A subfração AcOEt-17 (43,0 mg) foi submetida à cromatografia flash em coluna de gel de sílica (28 x 3 cm), eluída em modo gradiente (CHCl₃/MeOH, 100 a 50%), obtendo-se os ácidos cafeico (1; 12,0 mg), ferúlico (2; 14,0 mg) e sinápico (3; 7,0 mg). A subfração AcOEt-20 (79 mg) foi submetida à cromatografia em coluna de fase reversa (8 x 3 cm) empregando misturas de MeOH:H₂O (30 a 80%), resultando no isolamento de dois flavonóides, taxifolina (6; 14 mg) e curatocarpina (8; 15 mg).

A fração *n*-butanólica (3,0 g) foi submetida à cromatografia por exclusão molecular (LH-20, Sephadex, 180 x 5 cm) eluída em MeOH, resultando em 22 subfrações de 70 mL. A subfração BuOH-7 (280 mg) foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica (28 x 4 cm), eluída em misturas de CHCl₃/MeOH (10 a 30%), obtendo-se dois alcalóides guanidínicos, pterogina (10; 98 mg) e pterogidina (11; 90 mg). A subfração BuOH-12 (120 mg) foi submetida à cromatografia em coluna de fase reversa (10 x 3 cm), eluída em MeOH:H₂O (1:1), obtendo-se estilbina (7; 27 mg). A subfração BuOH-18 (97 mg) foi submetida à CLAE-UV preparativo [MeOH:H₂O (50:50), $\lambda = 254$ nm, fluxo = 11,0 mL/min], avaliando no isolamento do flavonol glicosilado (9; 18 mg).

A fração hidroalcolólica (1,7 g) foi inicialmente submetida à cromatografia de permutação em gel (Sephades[®], LH-20, 120 x 5 cm), eluída em MeOH, obtendo-se 13 subfrações de 35 mL. A subfração HA-5 foi identificada como ácido gálico (5; 11 mg) e a subfração HA-12, como sendo o ácido 5-*O*-cafeoilgálico (4; 22 mg).

Atividades antioxidante e inibitória sobre micoperoxidase (MPO)

Para os ensaios em CCD reveladas com β -caroteno, as amostras foram eluídas e reveladas com uma solução diclorometânica de β -caroteno a 0,02%. Após revelação, a cromatoplaça foi mantida à exposição de luz solar até total perda de coloração. Os pontos que mantiveram a coloração laranja indicaram a presença de substâncias antioxidantes.²³ Os ensaios de capacidade sequestradora de radicais livres realizados para as substâncias 10 e 11 seguiram protocolos relatados na literatura com pequenas modificações.²³

A atividade inibitória sobre MPO das substâncias 1-11 foi avaliada segundo o método de oxidação do guaiacol. O meio reacional constituído de uma mistura de MPO (5,0 nM), peróxido de hidrogênio (0,3 mM) e guaiacol (70 mM) foi utilizado para a avaliação da ação de MPO na presença das substâncias em estudo e do controle positivo queratina. As substâncias foram dissolvidas em DMSO nas concentrações 0,50; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0 e 100 nM. Após o tempo de reação (4 h), o meio reacional foi lido em espectrofotômetro (470 nm). A atividade inibitória foi expressa em IC_{50} , valor calculado a partir da plotagem de um gráfico correlacionando velocidade inicial versus absorbância, obtendo-se, assim, as curvas concentração-resposta.²³

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Programa BIOTA-FAPESP (Instituto Virtual da Biodiversidade, www.biota.org.br), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). L. O. Regasini e D. C. Fernandes agradecem à FAPESP pelas bolsas, respectivamente, de Doutorado e Iniciação Científica concedidas.

REFERÊNCIAS

1. Balzan, A.; Los Leposmitos Argentinos. Arnel Agency: Buenos Aires, 1952.
2. Carvalho, P. E. R.; *Extratos florestais brasileiros: caracterização, utilização, potencialidades e uso da madeira*. EMBRAP-CNPQ: Colombo, 1994.
3. Lorenzi, H.; *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Plantarum: Nova Odessa, 1992.
4. Cristó, M.; Martínez, M. R.; Pacheco, M. L.; Benassi, C.; Yu, A.; Torres, L.; *J. Ethnobiology Ethnomedicine* 2007, 2, 1.
5. Holman, V. S.; González, A. A. L.; Kingston, D. G. I.; *J. Nat. Prod.* 1998, 58, 1063.
6. Nóbis, V. F.; Filho, V. C.; Delle Monache, F.; Benassi, J. C.; Christman, I. L.; Odeiro, R. C.; Yates, P. A.; *Quim. Nova* 2003, 26, 331.
7. Young, H. S.; Kim, M. S.; Park, H. J.; Chung, H. Y.; Choi, J. S.; *Arch. Pharm. Res.* 1992, 15, 322.
8. Duan, L.-X.; Feng, B.-M.; Chen, F.; Liu, J.-Y.; Li, F.; Wang, Y.-Q.; Pei, Y.-H.; *J. Asian Nat. Prod. Res.* 2007, 9, 557.
9. Chemtob, A.; Zawadzky, R.; Brecher, H.; Brüllhart, T.; *Physicochemistry* 1988, 27, 2767; Carboth, J.; Neiers, L.; Chazy, M.; Bergh, D. V.; Viteznik, A.; *Physicochemistry* 1992, 11, 1979.
10. Ma, X.; Wu, L.; Jin, Y.; Tian, W.; *J. Chromatogr. A* 2005, 1078, 212.
11. Modha, K. R.; Tinnai, B.; *Tetrahedron* 1976, 32, 2699; Agrawal, P. K.; Bussal, M. C.; Preker, L. J.; Foa, L. V. *Em Carbons 13 NMR of Flavonoids - Studies in Organic Chemistry* 79; Agrawal, P. K., ed.; Elsevier Science Publishers B.V.: Amsterdam, 1995, vol. 58; Harborne, J. B. *The Flavonoid Biochemistry in research since 1980*; Chapman & Hall: London, 1993.
12. Moshay, B.; Pellissier, Y.; Lhonneste, H.; Ghawi, C.; Choumrat, J.-P.; Milot, J.; Mayard, P.; *J. Ethnopharmacol.* 2006, 106, 272.
13. Min, B.; Lee, S.; Kim, J.; Lee, J.; Kim, T.; Kim, D.; Kim, Y.; Jeong, H.; Lee, H.; Nakamura, N.; Miyashita, H.; Hattori, M.; *Biol. Pharm. Bull.* 2003, 50, 1042; Han, L.; Nishiyama, H.; Tomiyoshi, M.; Baba, K.; Kinoshita, Y.; Okura, H.; *J. Nat. Prod.* 1998, 61, 1096.
14. Yoshida, K.; Mizutani, M.; Gotohara, N.; Inoue, N.; *Chem. Pharm. Bull.* 1998, 39, 656.

19. Goswami, S.; Shrivastava, D. H. S.; Zorod, M. V. B.; Bolant, V. S.; Francis, S. C.; Sharma, A. M. S.; Pathak, M.; *Physiother. Res.* **2003**, *17*, 913.
20. Rajput, S. O. A.; Williams, L. A. D.; *Physiotherapy* **1996**, *44*, 1397.
21. Rajput, S. O. A.; Mishra, J. O.; Khatwani, W.; *Nat. Prod. Sci.* **1997**, *7*, 3.
22. Gami, R. A.; Ojha, O. O.; Prasad, M. E.; *Experientia* **1949**, *25*, 1020.
23. Wintersbone, C. C.; Vissari, M. C. M.; Karthi, A. J.; *Care Opin. Biomed.* **2008**, *7*, 53; Edwards, S. W.; Hildet, M. B.; *Journal Today* **1997**, *18*, 320.
24. Rajput, S. O. A.; Sarfaraz, C. M.; Hiron, J. M.; Dhillon, G. R.; Chawla, C. C.; Garg, B. H.; *Palliative Palliative* **1995**, *79*, 1; Dhawan, S. S.; Goyal, W.; Vaidyanath, G.; Kati, B.; Khatwani, S. S.; *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 863; Rao, J. H.; Dey, H. A.; Wintersbone, C. C.; *Indian Res.* **2008**, *47*, 440; Chatur, P.; Mishra, J. A.; Ghatge, J. M.; Suman, T. W.; *Int. J. Pharm.* **1998**, *11*, 745.
25. Cai, C.; Luo, Q.; Sun, M.; Guo, H.; *Eur. Sci.* **2004**, *76*, 2157; Cai, C.; Sun, M.; Xing, J.; Luo, Q.; Guo, H.; *Eur. Sci.* **2006**, *78*, 2872.
26. Bhakina, O.; Virdalun, F.; Fugerech, K. V.; *Ann. Bot.* **2003**, *91*, 170; Carli, N.; *Curr. Top. Med. Chem.* **2001**, *1*, 509; Knecht, P.; Karpalchuk, J.; Jarricot, R.; Rivarola, H.; Hollova, M.; Rostagno, A.; Halaburda, T.; Avram, A.; *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**, *75*, 590; Yang, B.; Kozel, A.; An, K.; Kim, J.; *Anal. Sci.* **2001**, *17*, 399.
27. Post, D. E.; Miller, E. E.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1904**, *61*, 1064.
28. Sauer, J. R.; Davis, T. C.; Gamba, A. P.; Almeida, L. M.; *Free Radical Res.* **1997**, *36*, 400; DeBenedictis, N.; Bi, R.; Yang, M.; Rice-Draug, C.; *Methods Enzymol.* **1999**, *209*, 379.
29. Kato, Y.; Nigam, A.; Tran, J.; Osumi, T.; *Biosci. Biomed. Biotechnol.* **2003**, *47*, 110; Capelino-Hartig, C.; *Biotech. J.* **1998**, *216*, 205.

ANEXOS

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



Protocolo CEP/FCF/CAr. nº 07/2007 – Animais em Pesquisa
Interessado: JOSÉ CARLOS REBUGLIO VELLOSA
Orientador: Profa. Dra. Olga Maria Mascarenhas de Faria Oliveira
Título do Projeto: Efeito de metabólitos secundários de *Pterogyne nitens*
sobre neutrófilos de ratos

Parecer nº 24/2007 – Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considera o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Efeito de metabólitos secundários de *Pterogyne nitens* sobre neutrófilos de ratos", estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, manifestando FAVORÁVEL à sua execução.

Araraquara, 29 de junho de 2007.

Profa. Dra. MARIA VIRGINIA C. SCARPA
Coordenadora do CEP



Protocolo CEP/FCF/CAr nº 04/2007

Interessado: JOSÉ CARLOS REBUGLIO VELLOSA

Orientador: Profa. Dra. OLGA MARIA M. DE FARIA OLIVEIRA

Projeto: Efeito de compostos isolados da *Pterogyne nitens* sobre a hemólise provocada por radicais livres e agentes oxidantes não-radicalares

Parecer nº 26/2007 – Comitê de Ética em Pesquisa

O projeto "Efeito de compostos isolados da *Pterogyne nitens* sobre a hemólise provocada por radicais livres e agentes oxidantes não-radicalares", encontra-se adequado em conformidade com as orientações constantes da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS.

Por essa razão, o Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade considera o referido projeto estruturado dentro de padrões éticos e é de PARECER FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório do projeto de pesquisa deverá ser entregue em março de 2009 no qual deverá constar o Termo de Consentimento Livre Esclarecido dos sujeitos da pesquisa.

Araraquara, 31 de julho de 2007.

Profª. Drª. MARIA VIRGINIA C. SCARPA
Coordenadora do CEP