

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

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS  
VEGETAIS DE PLANTAS BRASILEIRAS E SUA CONTRIBUIÇÃO  
AO ESTUDO DE INIBIÇÃO DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE**

**JOSÉ CARLOS REBUGLIO VELLOSA**  
**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS**

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

**ARARAQUARA**

**2005**

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

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS  
VEGETAIS DE PLANTAS BRASILEIRAS E SUA CONTRIBUIÇÃO AO  
ESTUDO DE INIBIÇÃO DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE**

**JOSÉ CARLOS REBUGLIO VELLOSA**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS – FCFAr/UNESP  
COMO PARTE DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
MESTRE EM ANÁLISES CLÍNICAS, ÁREA DE ANÁLISES CLÍNICAS

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

ARARAQUARA

2005

## **Ficha Catalográfica**

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

V441a Velloso, José Carlos Rebuglio  
Avaliação da capacidade antioxidante de extratos vegetais de plantas  
brasileiras e sua contribuição ao estudo de inibição da enzima  
mieloperoxidase. / José Carlos Rebuglio Velloso. – Araraquara, 2005.  
129 f.

Dissertação (Mestrado) – 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..Mieoloperoxidase. 2.Radicais livres. 3.Antioxidantes. 4.Produutos  
naturais I.Oliveira, Olga Maria Mascarenhas, orient. .II. Título.

**CDD: 616.0756**

**CAPES:40300005**

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

**NOME DO AUTOR: José Carlos Rebuglio Velloso**

**TÍTULO DO TRABALHO: “Avaliação da capacidade antioxidante de extratos vegetais de plantas brasileiras e sua contribuição ao estudo de inibição da enzima mieloperoxidase”**

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE**

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

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

**TERCEIRO EXAMINADOR: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos**  
**INSTITUIÇÃO: Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/Campus Araraquara**

**ARARAQUARA, 5 de dezembro de 2005.**

## Dados Curriculares

### 1. Dados Pessoais

Nome: José Carlos Rebuglio Velloso

Nascimento: 19/08/1979

Nacionalidade: brasileiro

Naturalidade: Araraquara/SP

Estado Civil: solteiro

Filiação

Pai: José Carlos Farto Velloso

Mãe: Celina Rebuglio Velloso

Profissão: Farmacêutico - Bioquímico

Documento de Identidade: 29782558-6

Cadastro de Pessoa Física: 219190658-30

Endereço Residencial: Av Luiz Alberto, 970, Vila Velosa – Araraquara/SP

Endereço Profissional: R Francisco Degni, s/n, Quitandinha – Araraquara/SP

### 2. Formação Acadêmica

Bacharel em **Farmácia** curso de **Farmácia-Bioquímica**, concluído em 2004, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Universidade Estadual Paulista (UNESP)

### 3. Trabalhos Científicos

#### 3.1 Trabalhos apresentados em Congressos

Velloso, JCR; Abe, MR; Formenton, VAF; Furlan, M; Brunetti, IL; Oliveira, OMMF. Avaliação do potencial antioxidante do extrato bruto etanólico da casca da raiz da *Maytenus aquifolium*. In: Congresso de Iniciação Científica da UNESP, Araraquara-SP, 2005.

Velloso, JCR; Barbosa, VF; Khalil, NM; Formenton, VAF; Furlan, M; Oliveira, OMMF. Avaliação do potencial *scavenger* de HOCl e de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do extrato bruto etanólico da casca da raiz da *Maytenus ilicifolia* e de suas partições. In: Congresso de Iniciação Científica da UNESP, Araraquara-SP, 2005.

Velloso, JCR; Claudino, CS; Khalil, NM; Fonseca, LM; Brunetti, IL; Oliveira, OMMF. Avaliação dos efeitos da nicotina e da cotinina na ação de peroxidases. In: Congresso de Iniciação Científica da UNESP, Araraquara-SP, 2005.

Velloso, JCR; Barbosa, VF; Brunetti, IL; Oliveira, OMMF. Can *Maytenus ilicifolia* aqueous extract act over oxidant species and peroxidases? In: International Congress of Pharmaceutical Sciences-CIFARP, Ribeirão Preto-SP, 2005.

Velloso, JCR; Khalil, NM; Ximenes, VF; Fonseca, LM; Brunetti, IL; Oliveira, OMMF. Hypochlorous acid scavenging properties of drugs with tertiary amine functional groups. In: International Congress of Pharmaceutical Sciences-CIFARP, Ribeirão Preto-SP, 2005.

Velloso, JCR; Khalil, NM; Claudino, CS; Barbosa, VF; Brunetti, IL; Bolzani, VS; Oliveira, OMMF. Myeloperoxidase inhibition by epicatechin from *Banisteriopsis variabilis* (Malpighiaceae) and its scavenger action over HOCl. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBQ, Aguas de Lindóia-SP, 2005.

Velloso, JCR; Khalil, NM; Claudino, CS; Barbosa, VF; Brunetti, IL; Fonseca, LM; Oliveira, OMMF. A cotinina, principal metabólito da nicotina, interfere na geração de espécies oxidantes por leucócitos polimorfonucleares neutrófilos (LPMN)?. In: Congresso de Iniciação Científica da UNESP, Ilha Solteira-SP. 2004.

Velloso, JCR; Khalil, NM; Claudino, CS; Barbosa, VF; Brunetti, IL; Oliveira, OMMF. Interferência da nicotina e da cotinina na quimiluminescência dependente de luminol (QLDL) do Sistema Mieloperoxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Luminol. In: Congresso de Iniciação Científica da UNESP, Ilha Solteira-SP. 2004.

Velloso, JCR; Khalil, NM; Ximenes, VF; Fonseca, LM; Brunetti, IL; Oliveira, OMMF. Does nicotine exacerbate tissue damage mediated by MPO?. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBQ, Caxambú-MG, 2004.

Velloso, JCR; Hakime, RA; Khalil, NM; Ximenes, VF; Brunetti, IL; Oliveira, OMMF. Efeitos do extrato de *Agaricus blazei* Murill no *oxidative burst* de leucócitos polimorfonucleares (LPMN): mieloperoxidase. In: 38 Congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial, São Paulo-SP, Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. 2004.

### 3.2 Trabalhos submetidos para publicação

Velloso, JCR; Khalil, NM; Formenton, VAF; Ximenes, VF; Fonseca, LM; Furlan, M; Brunetti, IL; Oliveira, OMMF. Antioxidant activity of *Maytenus ilicifolia* root bark. (No Prelo). **Fitoterapia**, Italia, 2005.

Hakime-Silva, RA; Velloso, JCR; Fernandes, AS; Ximenes, VF; Brunetti, IL; Oliveira, OMMF. Antioxidant activity of water extract of *Agaricus blazei* Muril (Cogumelo do Sol). **Fitoterapia**, Italia, 2005.

*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)

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

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 do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/Campus Araraquara.

Fomento: Bolsa CAPES - Mestrado



## **DEDICATÓRIA**

**Dedico esta dissertação à minha mãe, ao meu pai e à minha avó.**

## 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,  
pela minha vida e educação.

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

Aos meus irmãos, cunhadas e cunhado, pelo apoio.

Aos meus tios, tias, primos e primas pelo apoio.

À Profa. Olga Maria Mascarenhas de Faria Oliveira pela amizade, orientação,  
oportunidade de amadurecimento profissional, pela compreensão  
e apoio em todos os momentos.

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

À professora Maysa Furlan  
pelo apoio e parceria.

À professora Vanderlan da Silva Bolzani  
pelo apoio e parceria.

Ao grande amigo Najeh Maissar Khalil, pelas discussões, parcerias  
e pelos momentos de descontração.

Aos grandes amigos Francisco José Antunes Netto, José Mário Lourenço Maia e David  
William Quitério, pela amizade e pelos momentos de alegria.

Aos amigos Ricardo Hakime, Adriano, Kátia e Sandra,  
pelo apoio e parcerias.

À Vânia, à Adriana, à Andréia e ao Luis Octávio pelas amostras,  
pela parceria e discussões

Às amigas Camila, Vanessa e Mariana  
pela ajuda e amizade.

Às amigas Ana Paula, Marília, Helen e Helene  
pelos momentos de descontração.

Aos técnicos, Marcos e Valéria, do Laboratório de Bioquímica e Valdenir, do  
Laboratório de Enzimologia pela amizade e auxílio.

À CAPES pela bolsa concedida.

Muito obrigado!

# SUMÁRIO

## LISTA DE ABREVIATURAS

## RESUMO

## ABSTRACT

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>20</b>
<b>1.1 Leucócitos polimorfonucleares neutrófilos</b>	<b>21</b>
<b>1.2 Explosão Oxidativa (“Oxidative Burst”) em Fagócitos: Geração de Espécies Reativas do Oxigênio (ERO)</b>	<b>21</b>
<b>1.3 Peroxidases</b>	<b>28</b>
<b>1.4 Patologias associadas às Espécies Reativas do Oxigênio (ERO)</b>	<b>34</b>
<b>1.5 Sistemas antioxidantes no ser humano</b>	<b>38</b>
<b>1.6 Plantas medicinais e antioxidantes</b>	<b>39</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>43</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>45</b>
<b>3.1 Amostras avaliadas</b>	<b>46</b>
3.1.1 Família Leguminosae	47
3.1.2 Família Celastraceae	48
3.1.3 Família Hippocrateaceae	49
3.1.4 Família Piperaceae	50
<b>3.2 Obtenção do Extrato Bruto de Neutrófilo de Rato</b>	<b>51</b>
<b>3.3 Determinação da atividade da MPO</b>	<b>51</b>
<b>3.4 Sistemas quimiluminescentes</b>	<b>52</b>
<b>3.5 Sistemas espectrofotométricos</b>	<b>53</b>
3.5.1 Avaliação do Potencial Antioxidante	53
3.5.1.1 Atividade Antioxidante Total pelo ABTS <sup>•+</sup>	54
3.5.1.2 Atividade Scavenger de radicais pelo DPPH	55
3.5.1.3 Atividade Scavenger de HOCl, e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	55
3.5.1.4 Atividade Scavenger de Ânion Superóxido	56
3.5.1.5 Atividade Scavenger de Óxido Nítrico	57
3.5.2 Potencial de inibição da ação da MPO	57
3.5.2.1 Cinética de oxidação do luminol pela Hemina (quimiluminescência)	58
3.5.2.2 Cinética de oxidação do guaiacol pela Hemina (UV/Vis)	58
3.5.2.3 Cinética de oxidação do guaiacol pela HRP	58
3.5.2.4 Cinética de oxidação do guaiacol pela mieloperoxidase presente no extrato bruto de neutrófilo de rato	59
3.5.2.5 Cinética de oxidação do TMB pela mieloperoxidase presente no extrato bruto de neutrófilo de rato	59

<b>3.6 Análise Estatística</b>	<b>59</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>60</b>
<b>4.1 Avaliação do Potencial Antioxidante</b>	<b>61</b>
4.1.1 Atividade <i>Scavenger</i> de HOCl	61
4.1.2 Atividade <i>Scavenger</i> de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	67
4.1.3 Atividade <i>Scavenger</i> de Ânion Superóxido	68
4.1.4 Atividade <i>Scavenger</i> de Óxido nítrico	72
4.1.5 Atividade <i>Scavenger</i> de radicais pelo DPPH	75
4.1.6 Atividade Antioxidante Total pelo ABTS <sup>•+</sup>	78
<b>4.2 Ensaio enzimáticos</b>	<b>82</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b>	<b>95</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>97</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>109</b>
<b>Anexo A: Espectros de absorção das amostras avaliadas</b>	<b>110</b>
<b>Anexo B: Gráficos: Avaliação da ação sobre o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)</b>	<b>115</b>
<b>Anexo C: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa</b>	<b>121</b>
<b>Anexo D: Trabalhos submetidos para publicação</b>	<b>123</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 1C-HEX: fração hexânica do extrato do caule de *P. nitens*
- 1C-EtOH: fração etanólica do extrato do caule de *P. nitens*
- 1C-AcOEt: fração acetato de etila do extrato do caule de *P. nitens*
- 1C-BuOH: fração butanólica do extrato do caule de *P. nitens*
- 1F-Hex: fração hexânica do extrato das folhas de *P. nitens*
- 1F-EtOH: fração etanólica do extrato das folhas de *P. nitens*
- 2-DCM: extrato bruto diclorometânico da casca da raiz da *M. ilicifolia*
- 2-EtOH<sub>1</sub>: extrato bruto etanólico da casca da raiz da *M. ilicifolia* (obtido por maceração)
- 2-EtOH<sub>2</sub>: extrato bruto etanólico da casca da raiz da *M. ilicifolia* (obtido por ultrassom)
- 2-Hex: fração hexânica do extrato bruto 2-EtOH<sub>2</sub>
- 2-HexAcOEt: fração hexano-acetato de etila do extrato bruto 2-EtOH<sub>2</sub>
- 2-Hid: fração hidroalcoólica do extrato bruto 2-EtOH<sub>2</sub>
- 3-HexAcOEt: fração hexano-acetato de etila do extrato da *M. aquifolium*
- 3-Hid: fração hidroalcoólica do extrato da *M. aquifolium*
- 4-EtOH: extrato bruto etanólico da casca da raiz da *S. campestris*
- $\Delta A$ : variação de absorvância
- ABTS: 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
- A.E.: atividade específica
- DPPH: 1,1-difenil-2-picril-hidrazina
- DTNB: ácido 5-5'-ditio(2-nitrobenzóico)
- EBNR: extrato bruto de neutrófilos de rato
- EPO: peroxidase eosinofílica
- ERO: espécies reativas do oxigênio
- GSH: glutatona reduzida

GSH-Px: glutationa peroxidase

GSH-Rd: glutationa redutase

HRP: *horseradish peroxidase*

IC<sub>50</sub>: concentração que promove 50% de inibição

K<sub>M</sub>: constante de Michaelis-Menten

LDL: lipoproteína de baixa densidade

LPO: lactoperoxidase

MPO: mieloperoxidase

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NOS: óxido nítrico sintase

PBS-D: solução salina tamponada de fosfatos segundo Dulbecco

PBS-MgSO<sub>4</sub>: tampão PBS-D sem os sais de íons cloreto

PGHS: prostaglandina endoperóxido sintase

PMS: metassulfato de fenazina

S-1: 5,7-diidroxi flavona

S-2: ácido gaudichaudiânico

S-3: 1,4-diidroxi-2-(3',7'-dimetil-1'-oxo-2'-E-6'-octadienil) benzeno

S-4: 2',6'-diidroxi-4'-metoxi-diidrochalcona

SOD: superóxido dismutase

SPO: peroxidase salivar

TMB: tetrametilbenzidina

TNB: ácido 5-tio-2nitrobenzóico

TPO: peroxidase da tireóide

U.A.: unidade de atividade

$v_0$ : velocidade inicial

$v_{\max}$ : velocidade máxima



## RESUMO

Os fagócitos, em especial os leucócitos polimorfonucleares neutrófilos, produzem ânion superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ) através da redução do oxigênio por um elétron, com gasto de NADPH. A partir deste processo, grande número de oxidantes altamente microbicidas são formados, tais como HOCl,  $HO^{\bullet}$ ,  $ONOO^-$ . Tais oxidantes são produzidos com a finalidade de combater microrganismos invasores, mas eles também provocam danos e estão envolvidos em grande número de patologias. A formação de espécies reativas e radicais livres é equilibrada naturalmente pela existência de compostos e sistemas com atividades antioxidantes.

A busca por opções terapêuticas para diferentes patologias faz da pesquisa de produtos naturais um campo fértil em opções de moléculas com diferentes atividades biológicas. A relevância da 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. 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.

Foram avaliados extratos ou moléculas dos vegetais: *Pterogyne nitens*, *Maytenus ilicifolia*, *Maytenus aquifolium*, *Salacia campestris*, *Piper gaudichaudianum*, *Piper crassinervium* e *Piper aduncum*. A proposta deste trabalho é: **i)** avaliar a possibilidade de ação direta destas amostras sobre diferentes espécies reativas modelo e geradas em nosso organismo e **ii)** avaliar a inibição da mieloperoxidase, enzima

envolvida em diferentes patologias. Observamos um grande potencial das plantas estudadas como fonte de compostos com ação antioxidante. Destacam-se as frações hidroalcoólicas e hexano-acetato da *M. ilicifolia* e *M. aquifolium* sobre o ânion superóxido. Além disso, identificou-se a existência de possíveis inibidores da MPO nos diferentes vegetais estudados, destacando-se quercetina ( $IC_{50}=1,35\mu\text{g/mL}$ ), 3-HexAcOEt ( $IC_{50}=1,5\mu\text{g/mL}$ ), 2-Hid ( $IC_{50}=2,2\mu\text{g/mL}$ ), 3-Hid ( $IC_{50}=3,1\mu\text{g/mL}$ ), S-3 ( $IC_{50}=3,1\mu\text{g/mL}$ ), 2-HexAcOEt ( $IC_{50}=4,4\mu\text{g/mL}$ ), 1C-BuOH ( $IC_{50}=6,4\mu\text{g/mL}$ ) e 4EtOH ( $IC_{50}=8,9\mu\text{g/mL}$ ). Por fim, caracterizou-se o tipo de inibição promovida pela S-3 (1,4-diidroxil-2-(3',7'-dimetil-1'-oxo-2'-E-6'-octadienil) benzeno) e pela quercetina como sendo do tipo mista.

**Palavras-chave:** mieloperoxidase, radicais livres, estresse oxidativo, antioxidantes, produtos naturais.

## ABSTRACT

Phagocytes, mainly polymorphonuclear neutrophils leucocytes, yield superoxide radical ( $O_2^{\bullet -}$ ), expending NADPH. By this process, many reactive species, such as HOCl,  $HO^{\bullet}$ ,  $ONOO^-$ , are generated. These oxidants are made to fight microorganisms, but they are involved in many pathologies. Reactive species and free radicals generation are equilibrated by antioxidants.

The search of new medicines turns natural products research an important option for discovering molecules with different biological activities. Natural products research is relevant for discovering new medicines and molecules able to fight oxidant species. In evaluating the antioxidant potential of substances, it is important considerate: i) a compound should be tested at concentrations achievable *in vivo* and ii) in assaying putative antioxidants, one should use biologically relevant ROS. It is important to ask if it works directly over the oxidant or it works by regulating endogenous antioxidants defenses.

In this work, *Pterogyne nitens*, *Maytenus ilicifolia*, *Maytenus aquifolium*, *Salacia campestris*, *Piper gaudichaudianum*, *Piper crassinervium* and *Piper aduncum* were studied. The purpose of this work is: **i)** evaluate direct action of samples over different reactive species and **ii)** evaluate myeloperoxidase inhibition, an important enzyme involved in different pathologies. We observed that different evaluated plants are efficient sources of antioxidants. Moreover, different samples were able to inhibit myeloperoxidase, detaching quercetin ( $IC_{50}=1,35\mu g/mL$ ), 3-HexAcOEt ( $IC_{50}=1,5\mu g/mL$ ), 2-Hid ( $IC_{50}=2,2\mu g/mL$ ), 3-Hid ( $IC_{50}=3,1\mu g/mL$ ), S-3 ( $IC_{50}=3,1\mu g/mL$ ), 2-HexAcOEt ( $IC_{50}=4,4\mu g/mL$ ), 1C-BuOH ( $IC_{50}=6,4\mu g/mL$ ) and

4EtOH ( $IC_{50}=8,9\mu\text{g/mL}$ ). Besides, quercetin and S-3 (1,4-dihydroxi-2-(3',7'-dimethyl-1'-oxo-2'-E,6'-octadienyl) benzene) were characterized as mixed MPO inhibitors.

**Key words:** myeloperoxidase, free radicals, oxidative stress, antioxidants, natural products.

# **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 Leucócitos polimorfonucleares neutrófilos**

Leucócitos polimorfonucleares neutrófilos são as primeiras células em seres humanos a serem ativadas na defesa pelo sistema imunológico contra infecções. Estas células migram dirigidas por gradientes quimiotáticos até o local da inflamação, onde elas reconhecem e fagocitam o patógeno invasor.

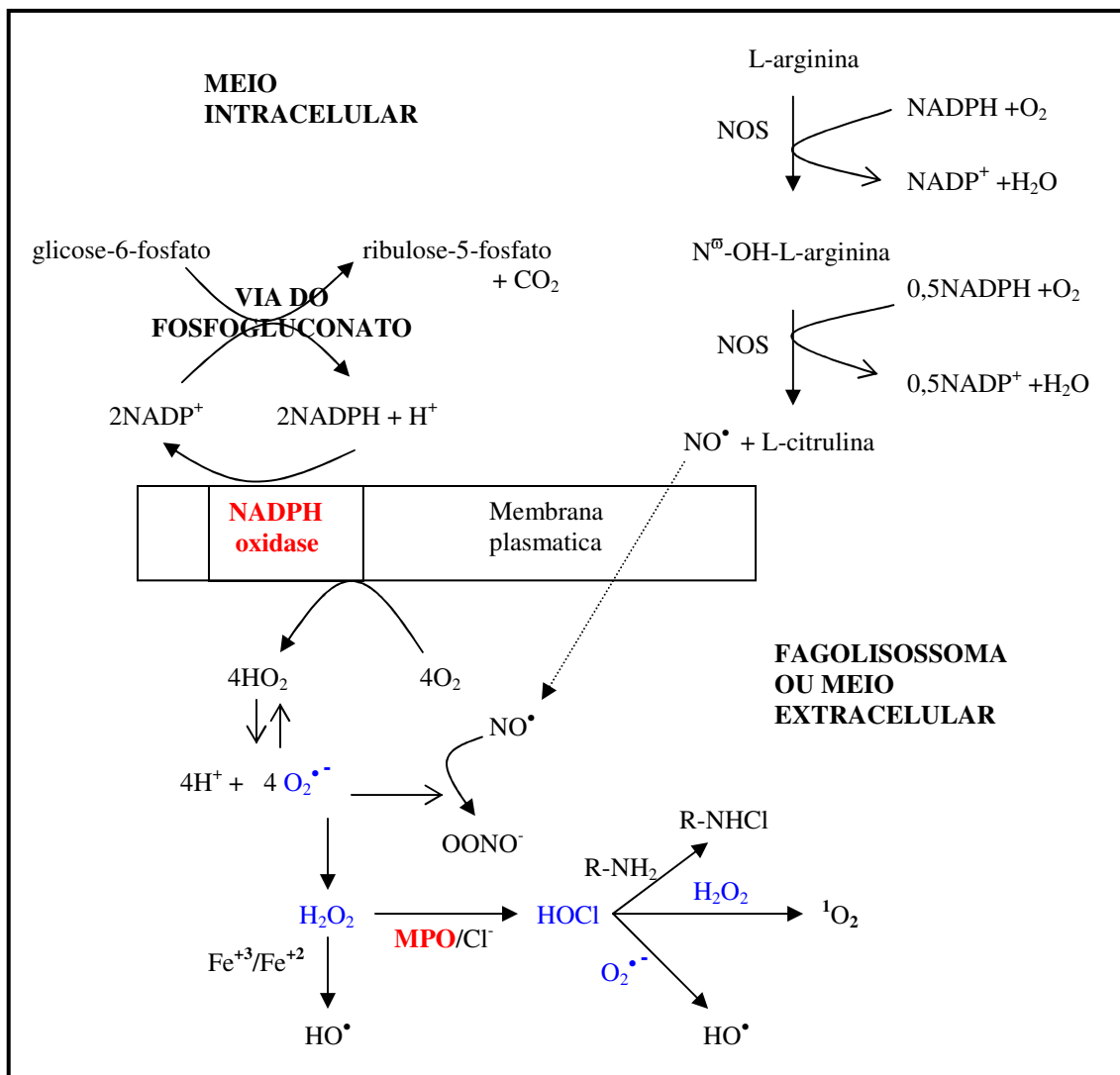
Os patógenos são expostos a um arsenal de enzimas hidrolíticas e proteínas bactericidas, estocadas em seus grânulos citoplasmáticos. Os neutrófilos apresentam quatro tipos de grânulos, que contêm diferentes enzimas e proteínas. O conteúdo destes grânulos é liberado gradualmente no fagolisossoma, ou no meio extracelular, após a ativação dos neutrófilos. A elevação de íons cálcio intracelular inicia a degranulação. Para a secreção do conteúdo de grânulos terciários e vesículas secretórias é necessária uma elevação moderada do nível de cálcio no citoplasma (para cerca de  $0,25 \mu\text{M}$ ). Estes tipos de grânulos contêm albumina, gelatinase, colagenase e outras proteínas. Para a liberação do conteúdo de grânulos secundários é necessária uma elevação maior no nível de cálcio no citoplasma (para cerca de  $0,7 \mu\text{M}$ ). Neste caso são secretadas enzimas direcionadas ao combate do patógeno, tendo por função a destruição de estruturas da parede celular. Os grânulos azurófilos apresentam níveis elevados de mieloperoxidase, a qual juntamente com a NADPH oxidase de membrana está envolvida na geração de espécies reativas do oxigênio e oxidação de biomoléculas (ARNHOLD, 2004).

### **1.2 Explosão Oxidativa (“Oxidative Burst”) em Fagócitos: Geração de Espécies Reativas do Oxigênio (ERO)**

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; Esq. 1) como resultado do *oxidative burst* em neutrófilos, é essencial para a defesa contra microrganismos na fagocitose (BRIHEIM et al., 1984).



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

Como podemos observar no esquema 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).

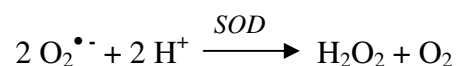
Durante o *oxidative burst* há aumento do consumo de oxigênio e da produção de diferentes ERO, tais como:

### **Ânion Superóxido**

Pode ser escrito  $O_2^{\bullet -}$  ou  $O_2^-$  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 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

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).

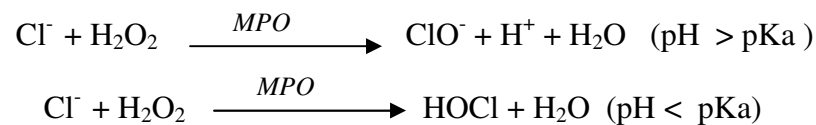




Apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é um metabólito extremamente deletério, porque participa da reação que produz o radical hidroxil (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Além disso, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é altamente tóxico 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  $\text{Fe}^{++}$  (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

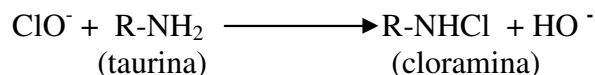
catalítica, visto que estão ausentes defesas enzimáticas contra oxidantes clorados (LAPENNA; CUCCURULLO, 1996).

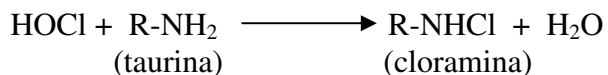
A mieloperoxidase é uma proteína catiônica em pH fisiológico e, portanto, capaz de se ligar a estruturas biológicas aniônicas, tais como fosfolipídeos de membranas celulares, além de catalisar a geração de HOCl e assim favorecer injúria celular (WEISS, 1989). A mieloperoxidase foi encontrada em lesões 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 anti-inflamatórias (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).



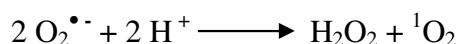
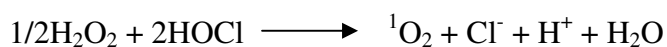


Tais cloraminas são oxidantes de vida longa e sua reatividade depende de sua lipossolubilidade. A monocloramina ( $\text{NH}_2\text{Cl}$ ), formada pela reação entre HOCl e amônia, é muito lipossolúvel e mais reativa do que o próprio HOCl (BABIOR, 2000). O  $\beta$ -aminoácido taurina, de maior abundância 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 pilori*, que produz elevadas quantidades de amônia e ativa os neutrófilos que produzem ácido hipocloroso (LAPENNA; CUCCURULLO, 1996).

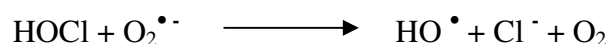
### **Oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ )**

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  $\text{H}_2\text{O}_2$  com HOCl ou pela dismutação espontânea do  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990):

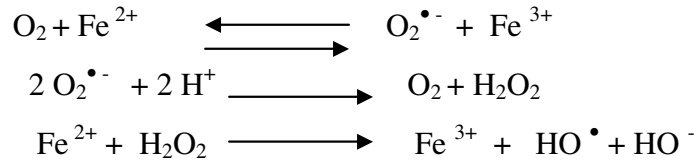


### **Radical hidroxil ( $\text{HO}^\bullet$ )**

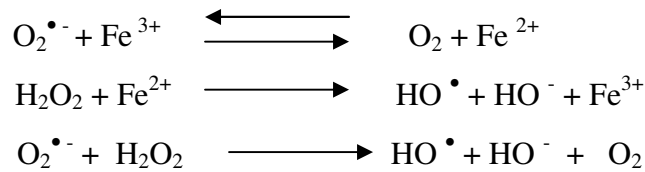
É um dos mais reativos radicais conhecidos. Pode ser gerado a partir da reação do HOCl e  $\text{O}_2^{\bullet-}$  ou pelas reações de Fenton e Harber-Weiss.



Reação de Fenton (FERREIRA; MATSUBARA, 1997)



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



A combinação extremamente rápida do  $\text{OH}^{\bullet}$  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).

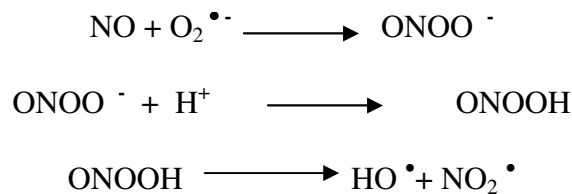
### **Óxido Nítrico ( $\text{NO}^{\bullet}$ ) e Peróxinitrito ( $\text{OONO}^-$ )**

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 ( $\text{ONOO}^-$ ), produto formado pela reação do  $\text{O}_2^{\bullet -}$  com o óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ) é um potente oxidante, com propriedades similares ao radical hidroxil, e reage com íon  $\text{H}^+$  formando  $\text{ONOOH}$  que após se decompõe em  $\text{HO}^\bullet$  e radical dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2^\bullet$ ). As etapas descritas encontram-se representadas a seguir:



### **Radical hidroperoxil ( $\text{HO}_2^{\bullet -}$ )**

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).

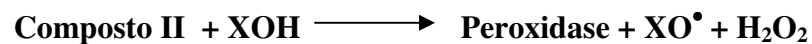
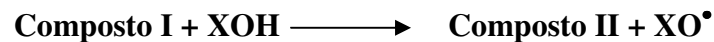
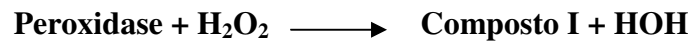
### **1.3 Peroxidases**

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).

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



### ***Horseradish peroxidase (HRP)***

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).

## Peroxidasas humanas e Mieloperoxidase

A família de peroxidases humanas inclui: mieloperoxidase (MPO), peroxidase eosinofílica (EPO), lactoperoxidase (LPO), peroxidase salivar (SPO), peroxidase da tireóide (TPO) e a prostaglandina endoperoxídeo sintase (PGHS). A histidina distal das peroxidases de mamíferos age como um catalisador do tipo ácido/básico auxiliando a desprotonação do hidroperoxídeo 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  $\text{Cl}^-$  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).

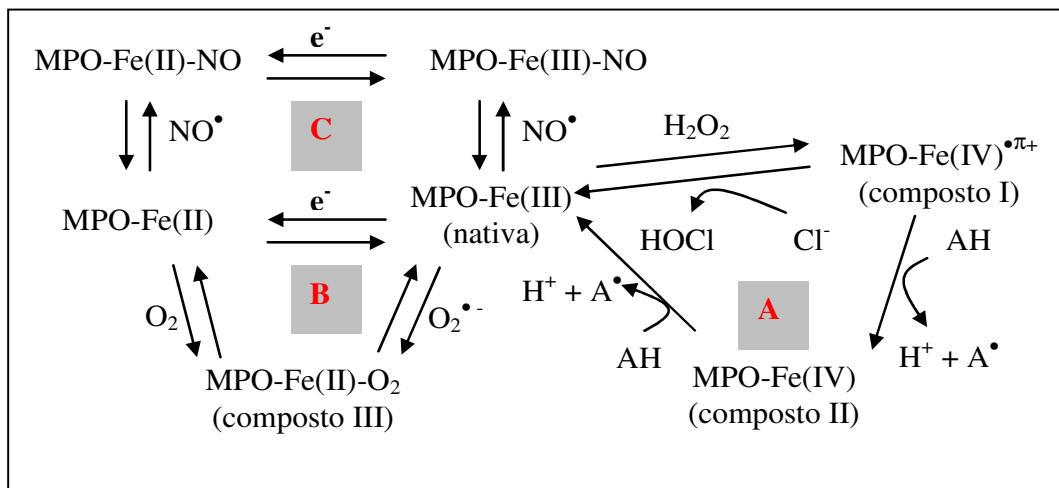
Alguns trabalhos sugerem que os macrófagos apresentem conteúdo de MPO adquirida de neutrófilos por dois mecanismos possíveis: i) engolfamento de neutrófilos pelos macrófagos, ou ii) engolfamento da MPO liberada pelos neutrófilos no sítio inflamatório (RODRIGUES et al., 2002). Alguns autores descrevem 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 heme proteína 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 (Esq. 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.,



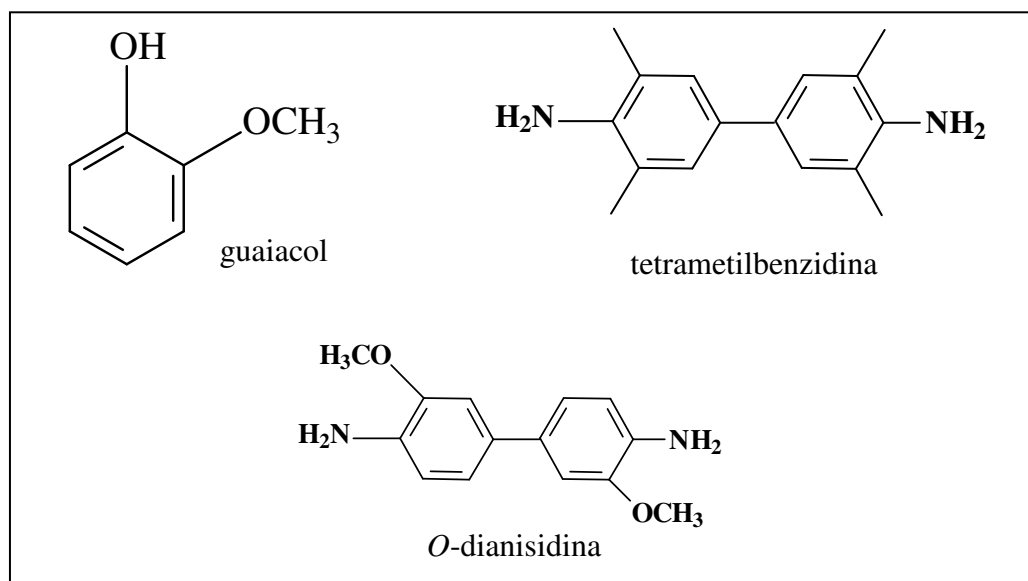
1998). A MPO-FeIII reage rapidamente e de maneira reversível com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  formando a MPO I, que oxida haletos através de uma transferência sucessiva de 2 elétrons, em um único passo, formando seus respectivos ácidos. A MPO nativa pode ser reduzida por diferentes espécies gerando um 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.



**Esquema 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).**

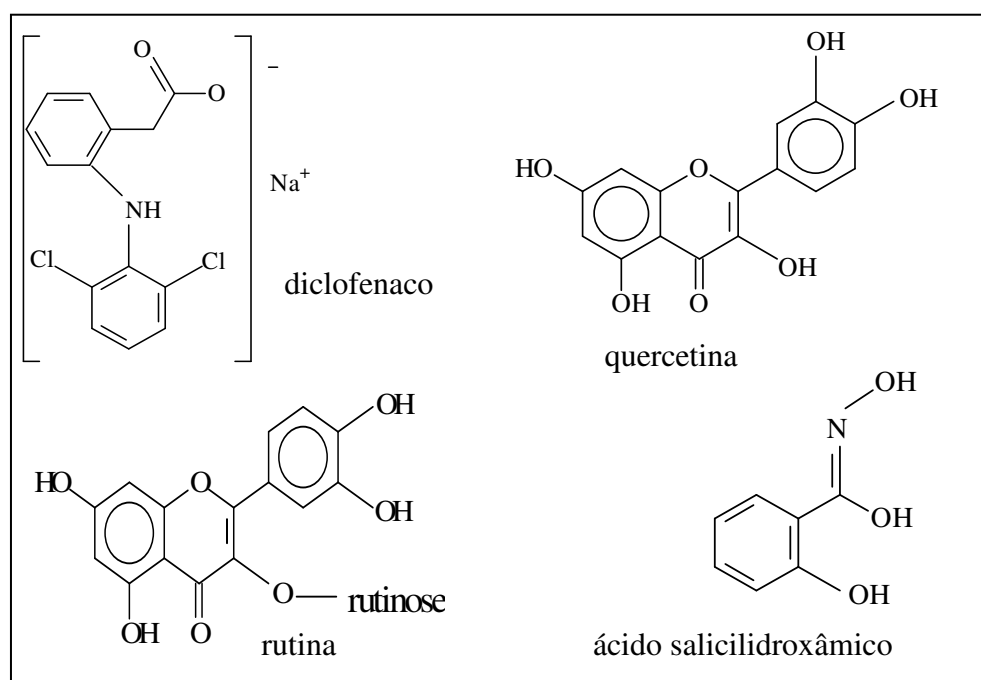
O  $\text{NO}^\bullet$  reage com o ferro central de hemoproteínas. Ele é capaz de se ligar às formas férrica (Fe-III) e ferrosa (Fe-II) da MPO para gerar complexos hexacoordenados estáveis (Esq. 2). Em baixas concentrações o óxido nítrico liga-se à forma ferrosa exacerbando a atividade catalítica da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

Usando o  $\text{H}_2\text{O}_2$  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 1.



**Figura 1: Estrutura molecular de alguns substratos da MPO**

A mieloperoxidase é inibida (Figura 2), 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).



**Figura 2: Estrutura molecular de alguns inibidores da MPO**

Atualmente a mieloperoxidase tem sido objeto de estudo como marcador de patologias no auxílio diagnóstico e na terapêutica. Relatos recentes sugerem que a mieloperoxidase pode ser útil como: i) indicador precoce da necessidade da inserção de sonda torácica na efusão pleural (SEGURA, 2004); ii) valor prognóstico em pacientes com doenças torácicas (ASSELBERGS et al., 2004); iii) índice com valor preditivo de risco em pacientes com doenças coronárias agudas (BALDUS et al., 2003).

#### **1.4 Patologias associadas às Espécies Reativas do Oxigênio (ERO)**

Os fagócitos, em especial os leucócitos polimorfonucleares neutrófilos, produzem ânion superóxido através da redução do oxigênio por um elétron, com gasto de NADPH. A maior parte do  $O_2^{\bullet -}$  reage com ele mesmo para formar peróxido de hidrogênio (BABIOR, 2000). A partir destes agentes, grande número de oxidantes altamente microbicidas são formados, tais como HOCl,  $HO^{\bullet}$ ,  $ONOO^-$ , dentre outros (BABIOR, 2000). Tais oxidantes são produzidos com a finalidade de combater microrganismos invasores, mas eles também provocam danos nos tecidos próximos, conhecendo-se seu envolvimento em grande número de patologias (FLOYD, 1990; HATHERILL, 1991; BABIOR, 2000). Existem evidências de que as ERO possam estar envolvidas em mais de 50 doenças (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Nas últimas décadas, foram realizadas inúmeras pesquisas para esclarecer o papel dos radicais livres em processos fisiopatológicos como envelhecimento, câncer, aterosclerose, inflamação (FERREIRA; MATSUBARA, 1997), enfisema, doença respiratória aguda, injúria por reperfusão e artrite reumatóide (BABIOR, 2000).

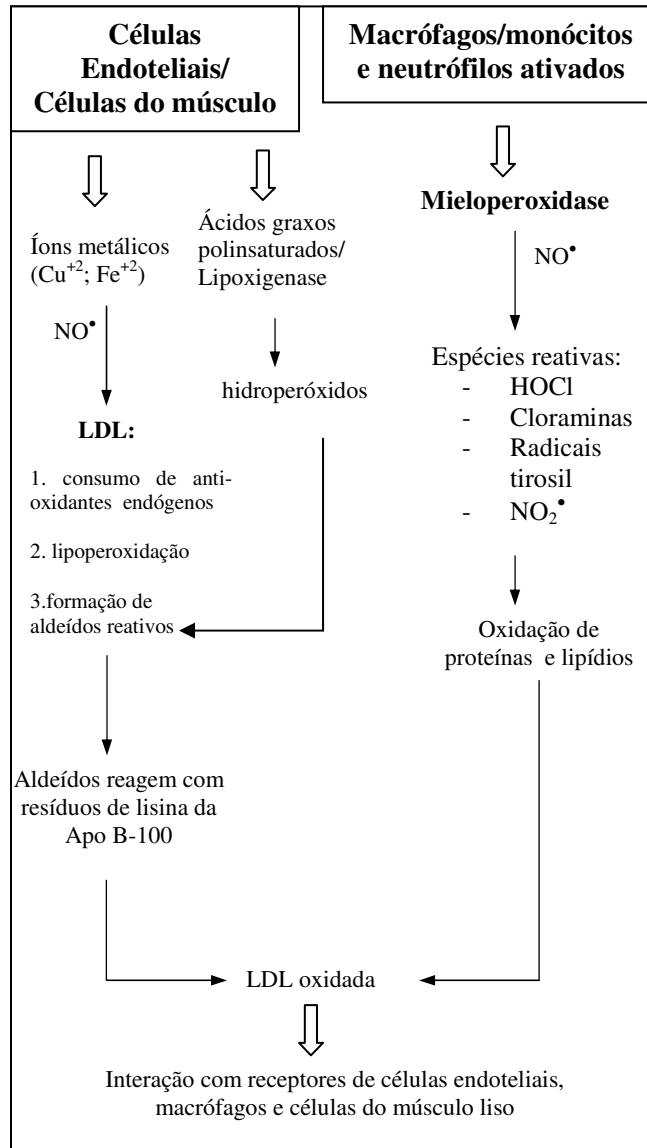
O envelhecimento é um evento que pode estar relacionado com as ERO (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A teoria dos radicais do oxigênio, desenvolvida por Harman em 1956, propõe que o envelhecimento poderia ser secundário ao estresse oxidativo, o qual levaria a reação de oxidação lipídica, protéica, e com o 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).

A modificação química de proteínas é parte do processo de desenvolvimento de diferentes patologias, desde desordens como diabetes e aterosclerose até o envolvimento no processo de envelhecimento. Aldeídos são importantes agentes modificadores de proteínas que podem ser gerados no organismo por uma variedade de processos enzimáticos ou não enzimáticos. Aldeídos reativos podem ser produzidos por oxidases, desidrogenases e peroxidação lipídica. A mieloperoxidase também pode gerar aldeídos reativos a partir de aminoácidos livres, via geração de ácido hipocloroso (ANDERSON et al., 1999)

Muitos estudos demonstram que os fagócitos são capazes de promover a oxidação da LDL (lipoproteína de baixa densidade) através da produção de espécies oxidantes (Esquema 3; MERTENS, 2001). Na aterosclerose ocorre o influxo de macrófagos e liberação de peróxido de hidrogênio e enzimas hidrolíticas, que ao lesarem as células vizinhas estimulam a proliferação de músculo liso subendotelial (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). A LDL também é modificada pelas espécies oxidantes liberadas pelos neutrófilos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; JERLICH et al., 2000; WOODS; DAVIES, 2003). A enzima MPO liga-se à LDL, com implicações importantes em sua modificação oxidativa (CARR et al., 2000). Os macrófagos geralmente englobam a LDL por meio do receptor de LDL, sendo que o processo cessa quando o conteúdo de LDL no macrófago está elevado. Entretanto, a LDL oxidada não entra na célula por meio deste receptor, mas sim através do receptor *scavenger* (na verdade um grupo de receptores). A internalização de LDL oxidada, diferentemente da nativa, não é regulada pelo receptor, o que permite que quantidades mais elevadas de LDL sejam englobadas e formem-se as células espumosas como parte do

processo aterogênico (BABIOR, 2000). A lesão pode ser exacerbada pela fumaça do cigarro que por ser rica em ferro, catalisa a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), o que estimula a internalização de colesterol nos macrófagos, os quais, conseqüentemente, se convertem em células espumosas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).



**Esquema 3: Mecanismo da oxidação da LDL (MERTENS, 2001)**

As complicações cardiovasculares, tais como o infarto do miocárdio, o derrame cerebral, a ulceração venosa, e a isquemia com injúria por reperfusão, parecem estar

associadas com a ativação de fagócitos na microcirculação e produção de ERO (MAZZONI; SCHMIDT-SHONBERN, 1996). A injúria por reperfusão é um dano provocado após a restauração da circulação em uma área isquêmica; tal injúria é atribuída às ERO que são produzidas por neutrófilos no sítio da lesão (BABIOR, 2000).

Dentre os processos pulmonares associados às ERO estão: lesão conseqüente ao tabagismo, asma, enfisema, displasia broncopulmonar, pneumoconiose e toxicidade a fármacos ou xenobióticos, tais como bleomicina, paraquat e butilidroxitolueno, (BAST et al., 1991; BOVERIS et al., 1986). Está bem documentado que após a chegada dos neutrófilos no interstício pulmonar, a ativação destas células gera o radical ânion superóxido, que lesa diretamente a membrana das células intersticiais e do endotélio e, como conseqüência, ocorre lesão tissular progressiva, pois o neutrófilo ativado também libera enzimas proteolíticas que degradam a elastina do arcabouço pulmonar (SEOW et al., 1994; CRYSTAL, 1991). Há fortes indícios de que a formação do edema pulmonar seja resultante da produção exagerada de peróxido de hidrogênio, radical hidroxil e superóxido pelos neutrófilos (BOVERIS, et al., 1986). Estudos têm relacionado algumas das doenças associadas ao hábito de fumar com o aumento de neutrófilos e macrófagos em tabagistas. No pulmão normal os macrófagos são células residentes enquanto os neutrófilos são praticamente inexistentes. Entretanto, em indivíduos fumantes há um grande aumento no número dessas células e com alterações morfológicas, que podem ser as responsáveis pela bronquite crônica e o enfisema (REPINE et al., 1997).

A asma é uma desordem inflamatória na qual os eosinófilos são as principais células efetoras. Estas células sanguíneas acumulam-se nas vias aéreas e, como conseqüência de sua ativação, promovem danos tissulares. A concentração de peroxidase eosinofílica encontra-se aumentada nos fluidos broncoalveolares de asmáticos. Os neutrófilos também são frequentemente encontrados nas vias aéreas e, como conseqüência de sua

ativação, promovem danos tissulares. Ambos, eosinófilos e neutrófilos, geram diferentes oxidantes que participam dos danos tissulares nas vias aéreas (ALDRIDGE et al., 2002).

### **1.5 Sistemas antioxidantes no ser humano**

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

Um antioxidante é definido como qualquer substância, quando em pequenas quantidades, capaz de retardar ou inibir processos oxidativos, como, por exemplo, 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<sub>2</sub>, mas também em situações não-fisiológicas, como a exposição da célula a xenobióticos, o que provoca a redução incompleta de O<sub>2</sub> (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 ( $\alpha$ -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).

## 1.6 Plantas medicinais e antioxidantes

A prevenção às doenças tem sido aceita como a maneira mais promissora de se controlar patologias. O consumo de frutas e vegetais auxilia na prevenção de processos degenerativos diminuindo a incidência e a taxa de mortalidade por câncer ou doenças cardiovasculares, por exemplo. A prevenção que as frutas e os vegetais promovem contra estas patologias tem sido atribuída à ação de antioxidantes presentes nestes alimentos (YEN et al., 2001).

Devido ao potencial carcinogênico de antioxidantes sintéticos, os antioxidantes naturais são alvos alternativos para minimizar ou retardar os processos de deterioração oxidativa em alimentos e para o desenvolvimento de alimentos funcionais. Diferentes compostos antioxidantes presentes na dieta desempenham importantes funções em retardar o desenvolvimento de doenças crônicas tais como doenças cardiovasculares, câncer, reações inflamatórias e Mal de Alzheimer. A atividade antioxidante de compostos fenólicos de plantas deve-se às suas propriedades REDOX e estruturas químicas, que possibilitam a estes compostos exercerem a função de neutralizar radicais livres, quelar metais reativos e agirem como *quenchers* de oxigênio no estado singlete e triplete (CHUN et al., 2005).

Compostos fenólicos oriundos do metabolismo secundário das plantas são bons agentes antioxidantes naturais (ATOUI et al., 2005). Os antioxidantes presentes em extratos de plantas vêm atraindo cada vez mais a atenção dos consumidores e 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). Extratos de frutas, cereais, e de diferentes vegetais, e seus produtos derivados, têm mostrado atividades antioxidantes efetivas em diferentes sistemas modelos (SUN; HO, 2005).



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.

O uso de extratos de vegetais no tratamento de patologias é um hábito difundido no Brasil, o que pode ser explicado, ao menos em parte, pelo baixo custo e pela crença de que tais produtos não promovem efeitos tóxicos.

Bolzani et al. (1995) identificaram ação anticâncer por parte do extrato metanólico das folhas de *Pterogyne nitens*. O fracionamento de extratos de plantas através de estudos bio-dirigidos levam ao isolamento de moléculas com atividades biológicas (BOLZANI et al., 1999).

A Família Celastraceae compreende cerca de 50 gêneros e 800 espécies distribuídas principalmente nas regiões tropical e subtropical. O gênero *Maytenus* consiste de espécies lenhosas e arbustivas, tradicionalmente empregadas na medicina popular, tais como a *Maytenus ilicifolia* e a *Maytenus aquifolium*. Foram relatadas a presença de triterpenos aromáticos, agentes oxidantes, flavonóides, triterpenos e glucosídeos nestas espécies (DUARTE; DEBUR, 2005). A *Maytenus ilicifolia* e *Maytenus aquifolium* são popularmente conhecidas no Brasil como “Espinheira Santa” devido à aparência de suas folhas e às suas propriedades terapêuticas (JORGE et al., 2004). As folhas de plantas da família Celastraceae são amplamente usadas na medicina popular no Brasil como analgésicos, anti-inflamatórios e anti-ulcerogênicos, sendo a eficácia e segurança confirmadas por estudos farmacológicos e clínicos (CORREA, 1984; SOARES et al., 2004). Souza-Formigoni et al. (1991) comprovaram a ação protetora do chá de folhas de *M. ilicifolia* e *M. aquifolium* contra o desenvolvimento de úlceras em animais, com ação comparada à da cimetidina.

Triterpenos quinonametídeos são produtos naturais de ocorrência restrita às famílias Celastraceae e Hippocrateaceae. Muitos representantes desta classe são conhecidos por suas propriedades medicinais, sendo usados como agentes antimicrobianos, agentes anticâncer e agentes antimaláricos. Algumas espécies de *Salacia* (família Hippocrateaceae) são utilizadas na Índia, Sri-Lanka e China como medicamentos tradicionais da medicina popular para o tratamento de reumatismo, doenças de pele e anti-inflamatórios. Terpenos com propriedades antioxidantes são raros, mas alguns exemplos são conhecidos, como o rosmanol, e também alguns triterpenos quinonametídeos como o celastrol e a pristimerina. Carvalho et al. (2005) observaram a ação anti-radical de triterpenos quinonametídeos presentes no extrato diclorometânico da casca da raiz da *Salacia campestris*. O uso de espécies de Hippocrateaceae e Celastraceae na medicina popular deve estar relacionado ao seu conteúdo de flavonóides e triterpenos quinonametídeos (CARVALHO et al., 2005).

O gênero *Piper* da família Piperaceae está amplamente distribuído em vegetações de florestas tropicais. Este gênero contém mais de 1000 espécies e é caracterizado por plantas arbustivas (WADT et al., 2004). *Piper aduncum*, uma pequena árvore cujo nome popular é “pimenta-de-macaco” (BASTOS; ALBUQUERQUE, 2004), ao invadir um ambiente, geralmente suprime as espécies dominantes e naturais daquele ambiente (NOVOTNY et al., 2003). A população dos trópicos utiliza as plantas do gênero *Piper* para muitos propósitos, tais como alimento, ornamento, perfumes, inseticida, alucinógenos e como medicamento. Muitos dos compostos isolados destas plantas apresentam atividade antimicrobiana (WADT et al., 2004). Extratos de *P. aduncum* são popularmente usados na América do Sul como medicamento, devido à sua ação antimicrobiana e antifúngica (HARTEMINK, 2001), sendo usada também contra dores de estômago. Foi identificada, em extrato de folhas da *P. crassinervium*, ação contra fungos do gênero *Cladosporium* (DANELUTTE et al., 2003). São comumente isolados de espécies de *Piper*, cromenos e

derivados do ácido benzóico, moléculas que exibem atividades antimicrobianas, fungicida e inseticida (BALDOQUI et al., 1999).

A busca por opções terapêuticas para diferentes patologias faz da pesquisa de produtos naturais um campo fértil em opções de moléculas com diferentes atividades biológicas. As plantas apresentam em seus metabólitos secundários uma grande fonte de possíveis fármacos devido à diversidade de moléculas com as mais variadas estruturas e propriedades químicas. A relevância da 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.

## **2 OBJETIVOS**

Considerando-se o crescente uso de substâncias naturais no combate a diferentes patologias, a participação da MPO em processos patológicos e a importância do combate às espécies oxidantes formadas no organismo, são objetivos deste trabalho: i) avaliar o potencial antioxidante/anti-radical do ácido úrico e do trolox (padrões antioxidantes) e de amostras (extratos, frações e compostos isolados obtidos de vegetais da flora brasileira) fornecidas pelas professoras Dra. Vanderlan da Silva Bolzani e Dra. Maysa Furlan (Dep. de Química Orgânica-IQ/UNESP - **Projeto Biota**); ii) avaliar tais amostras frente à catálise enzimática da mieloperoxidase buscando identificar a presença de possíveis inibidores desta enzima. Nesse sentido avaliou-se o efeito das diferentes amostras nos seguintes sistemas:

A) Sistemas químicos – avaliação do potencial antioxidante/anti-radical

- i) DPPH
- ii) ABTS  $\bullet^+$
- iii) TNB/HOCl
- iv) TNB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- v) NADH/PMS/NBT – ação sobre o O<sub>2</sub>  $\bullet^-$
- vi) Nitroprussiato de sódio/ Reagente de Griess – ação sobre o NO  $\bullet$

B) Sistemas enzimáticos e modelo - avaliação da inibição da MPO

- i) Hemina/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/luminol
- ii) Hemina/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/guaiacol
- iii) HRP/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/guaiacol
- iv) EBNR/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/guaiacol
- v) EBNR/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Cl<sup>-</sup>/TMB

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

As reações quimiluminescentes foram monitoradas em Luminômetro BioOrbit, Modelo 1251, dotado de dispensadores automatizados, acoplado a uma *workstation* com o *software Multiuse v 2.0 for 1251 luminometer by BioOrbit*. Para os Ensaio espectrofotométricos foram utilizadas celas de quartzo (volume de 1mL ou 2mL) com 1 cm de caminho ótico (c.o.) e as leituras foram realizadas no Espectrofotômetro HP 8453, Diode Array, com cela termostalizada, acoplado a um computador tipo PC Pentium III da HP.

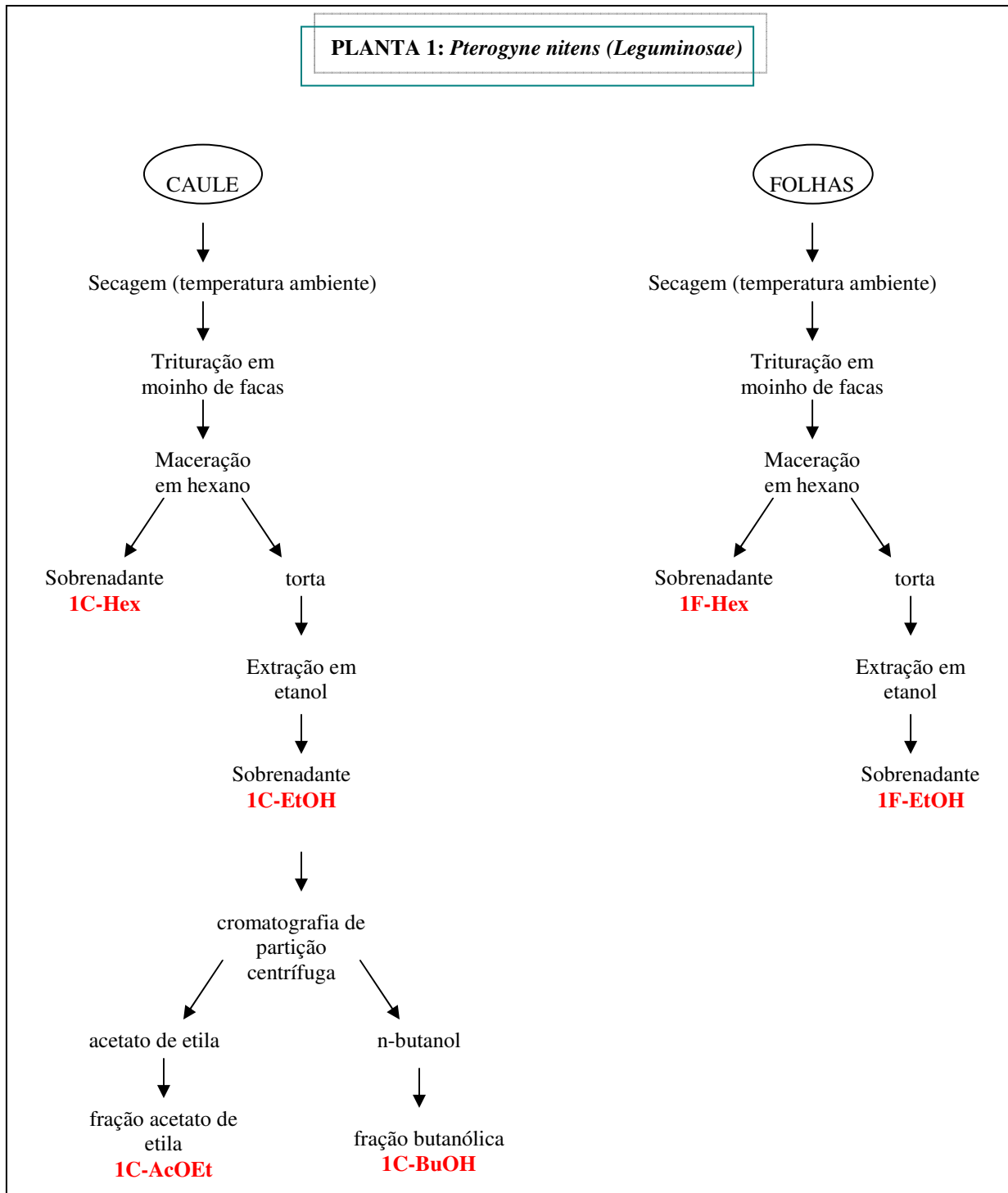
Para a realização dos ensaios as amostras foram dissolvidas em etanol absoluto na concentração de 1mg/mL. A partir destas, foram feitas diluições necessárias para os testes.

### **3.1 Amostras avaliadas**

As amostras testadas são provenientes de pesquisas desenvolvidas no Laboratório de Química Orgânica do Instituto de Química de Araraquara-UNESP pelas professoras Dra. Maysa Furlan e Dra. Vanderlan da Silva Bolzani e seus alunos colaboradores, mestrados e doutorandos. Tais pesquisas visam identificar e isolar os compostos presentes nos extratos de diferentes órgãos das plantas estudadas. São plantas da flora brasileira que apresentam aplicação na medicina popular ou, que apresentem, em sua composição, componentes com potencial antioxidante.

Como este estudo foi realizado em parceria e concomitante às pesquisas desenvolvidas naquele laboratório, no momento, poucas das amostras fornecidas puderam ser de compostos isolados, sendo que em sua maioria foram avaliados extratos brutos e frações de diferentes órgãos vegetais. A identificação das amostras é feita nos itens 3.1.1 a 3.1.4, onde são esquematizados os métodos de obtenção dos extratos e frações e também são mostradas as estruturas moleculares dos compostos isolados. Os espectros de absorção das amostras são mostrados no ANEXO A.

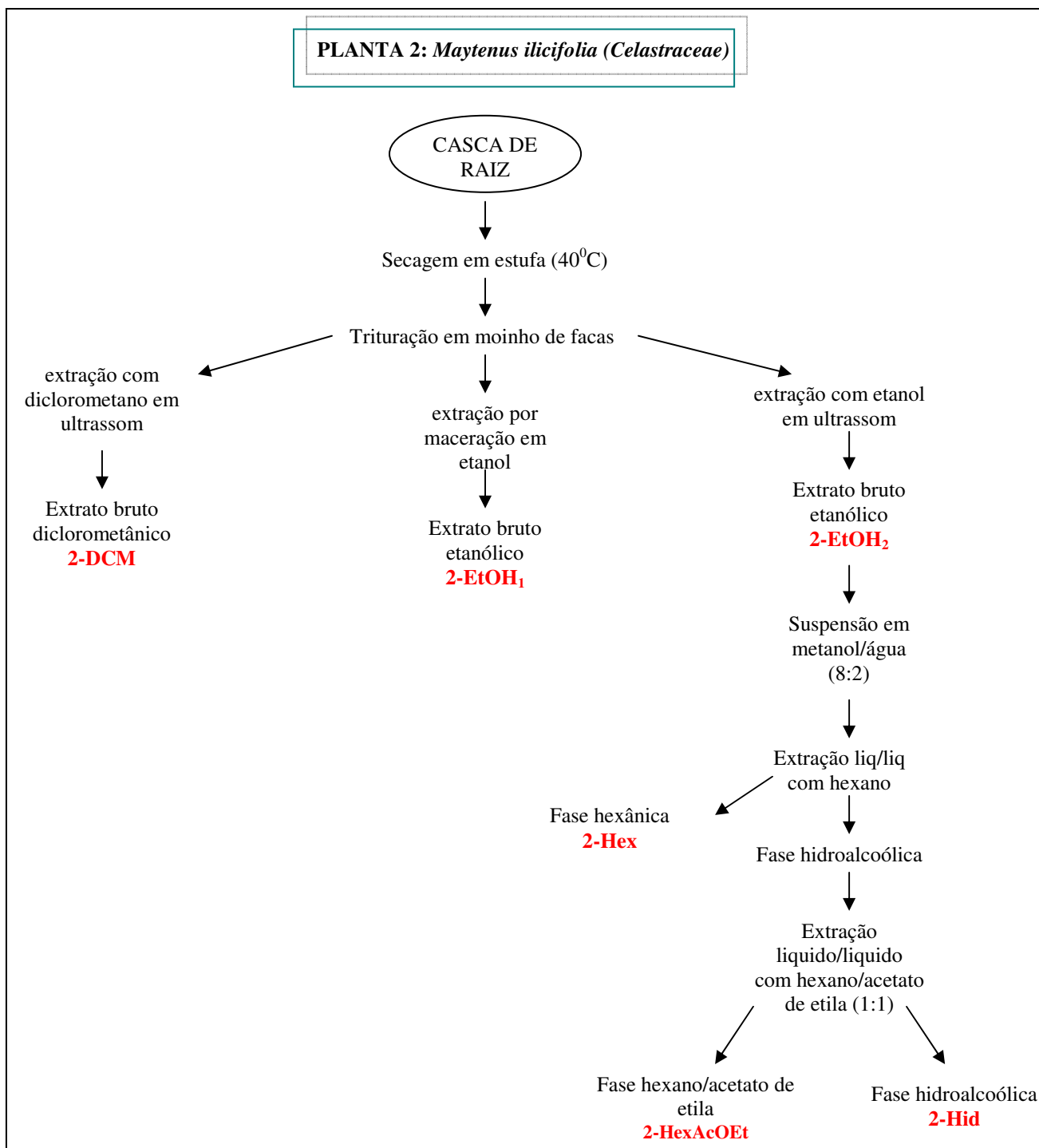
### 3.1.1 Família Leguminosae

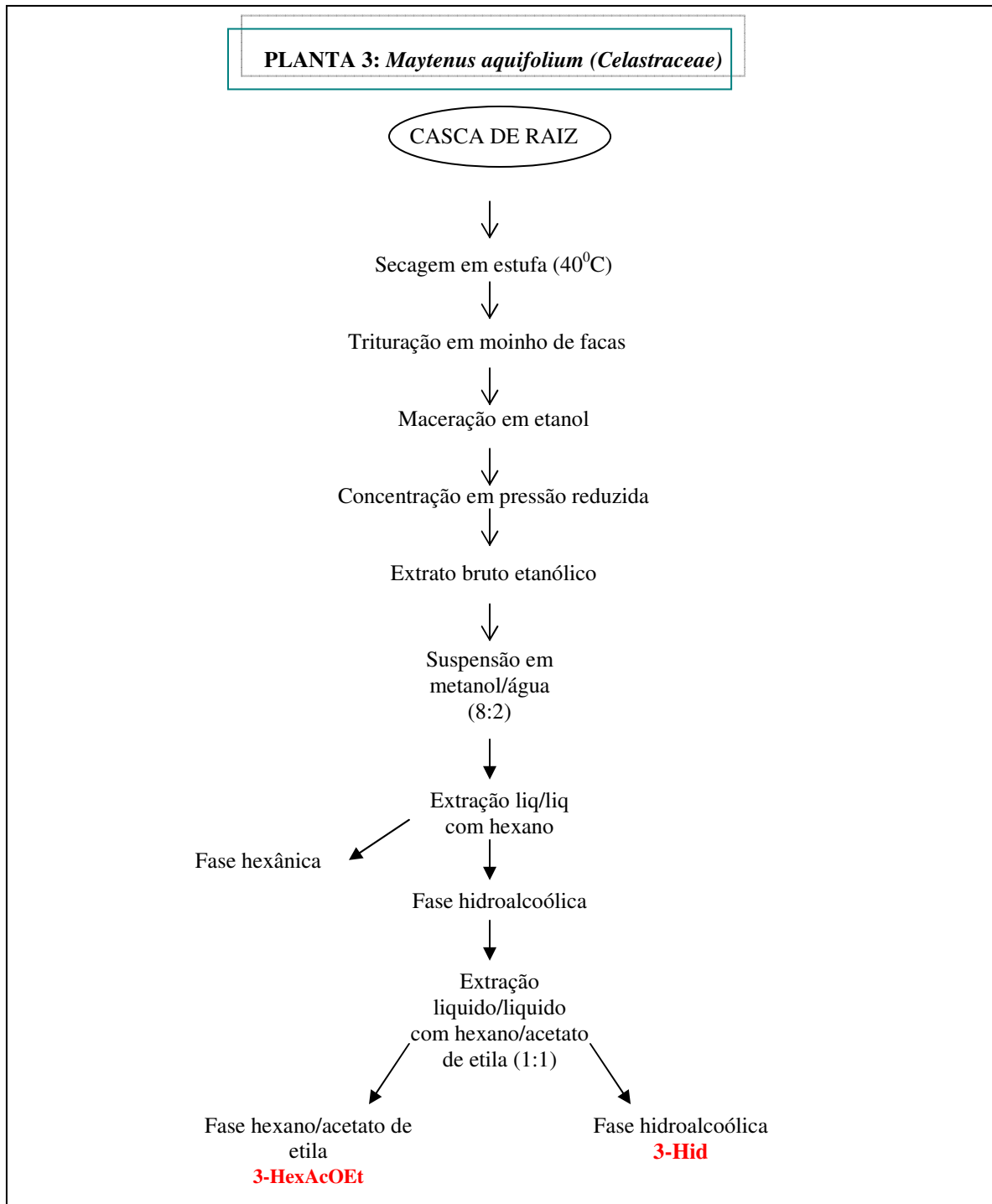


Esquema 4: Obtenção dos extratos e frações da *Pterogyne nitens*.



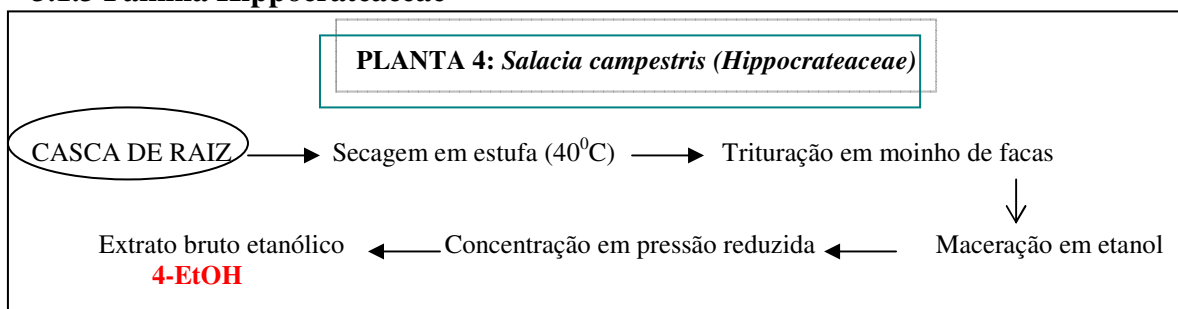
## 3.1.2 Família Celastraceae

Esquema 5: Obtenção dos extratos e frações da *Maytenus ilicifolia*.



Esquema 6: Obtenção dos extratos e frações da *Maytenus aquifolium*.

### 3.1.3 Família Hippocrateaceae



Esquema 7: Obtenção do extrato da *Salacia campestris*

## 3.1.4 Família Piperaceae

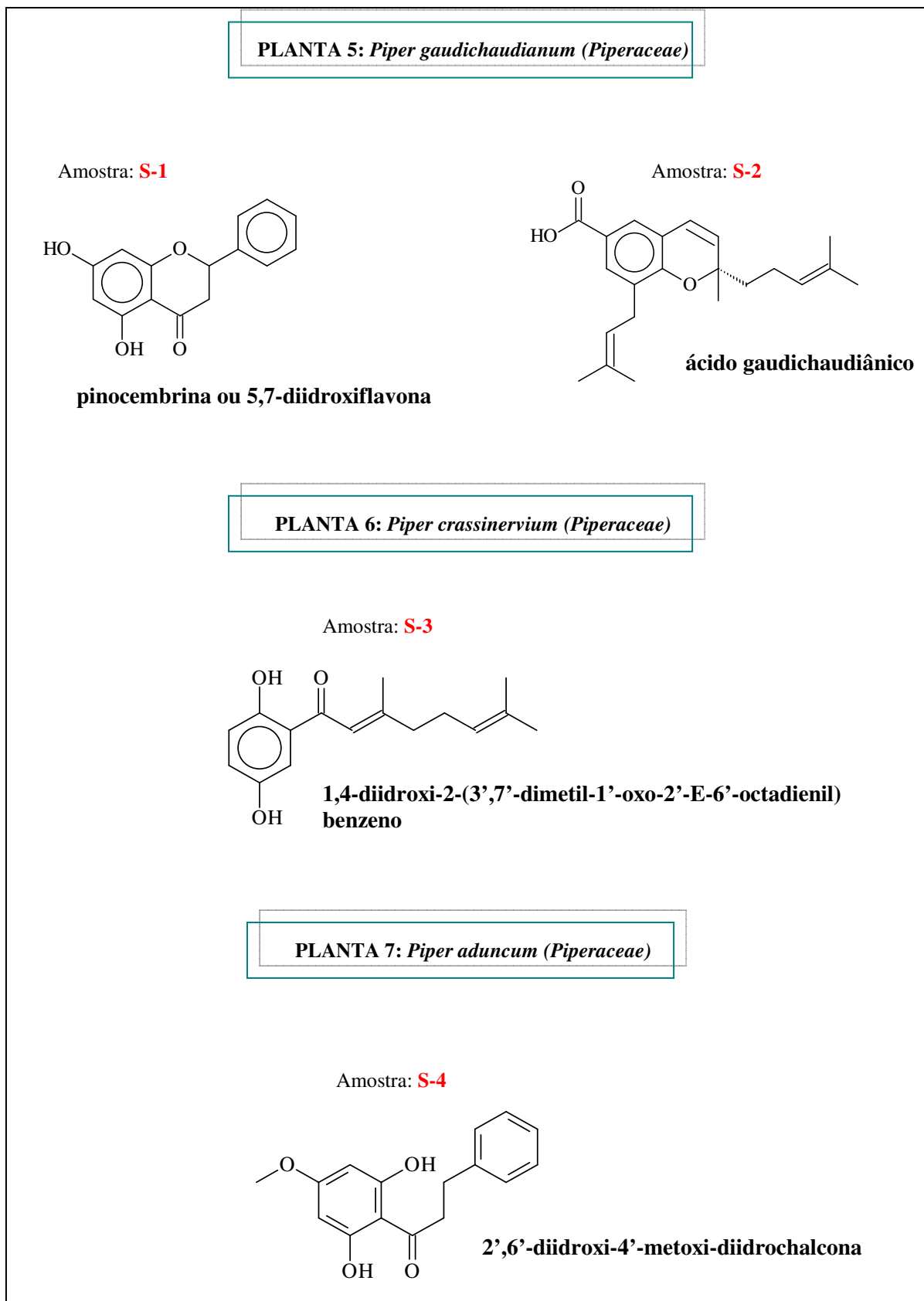


Figura 3: Estruturas moleculares das substâncias isoladas

### **3.2 Obtenção do Extrato Bruto de Neutrófilo de Rato (EBNR) com MPO (KHALIL, 2002)**

Em cada animal (macho, entre 100-160 gramas) injetou-se, intraperitonealmente, 5 mL de solução de glicogênio de ostra a 1% em NaCl a 0,85%. Segundo Fonseca (1991), 12 horas após a administração de 10mL de glicogênio de ostra 0,5% no peritônio do rato, são encontrados cerca de 94% de neutrófilos e 3% de macrófagos/monócitos no exsudato peritoneal. Sendo assim, após doze horas o animal foi sacrificado e a cavidade abdominal foi lavada, injetando-se 20 mL de tampão PBS-D sem cálcio e colhendo-se o lavado peritoneal através de sucção com seringa heparinizada (10 UI) e agulha; este foi, então, transferido para um tubo cônico siliconizado e centrifugado a 200 x g, por 3 minutos. As células sedimentadas foram lavadas por duas vezes com PBS-MgSO<sub>4</sub> e ressuspensas em 500µL do mesmo tampão. Esta suspensão é mantida em freezer a -20°C, por aproximadamente 12 horas. Após, tal tratamento, ocorre a ruptura de todas as células, sendo esse extrato centrifugado (2 minutos/200 x g) e o sobrenadante separado, sendo este o EBNR. Os procedimentos aqui descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, parecer n° 09/2005 (ANEXO C).

### **3.3 Determinação da atividade da MPO no EBNR (DESSER et al., 1972).**

**DEFINIÇÃO:** Uma unidade de atividade de MPO promove aumento da absorvância, em 470nm, da ordem de 1,0 por minuto, em pH 7,0 (tampão fosfato de potássio 50mM) e 25<sup>0</sup>C, calculada através da velocidade inicial da cinética da reação na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5mM) e de guaiacol (100mM) como substrato.

O cálculo para a determinação da U.A. segue a equação 1 (tubo “branco”): substitui-se o EBNR por igual volume de tampão).

$$\text{U.A./mL de extrato} = \frac{(A_{470\text{nm}}^{1\text{min}} - B_{470\text{nm}}^{1\text{min}}) \times V_T}{(1,0) \times V_{\text{EBNR}}} \quad \text{Equação 1}$$

- $A_{470\text{nm}}^{1\text{min}}$  = absorvância do “teste” em 470nm, após 1 minuto.
- $B_{470\text{nm}}^{1\text{min}}$  = absorvância do “branco” em 470nm, após 1 minuto.
- $V_T$  = volume total da reação.
- $V_{\text{EBNR}}$  = volume de extrato bruto adicionado na reação.
- 1,0 = caminho óptico da cubeta.

Com os dados de U.A. de MPO e conteúdo protéico total do EBNR, pode-se calcular a atividade específica (A.E.) da MPO no extrato bruto: A.E. = U.A. / mg proteína dosada.

**Dosagem de proteína totais:** A dosagem de proteínas totais no EBNR foi feita utilizando-se o kit Microprote segundo BRADFORD modificado, o qual utiliza o corante Comassie azul brilhante para detectar quantidades mínimas de proteínas (BRADFORD, 1976).

### 3.4 Sistemas quimiluminescentes

Em meio tamponado e na presença de hemina, ou de enzimas como HRP ou MPO, e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o luminol sofre oxidação gerando diferentes radicais e emitindo luz. O sinal é intensificado na presença de íons cloreto no sistema com mieloperoxidase, pois há formação de ácido hipocloroso que também oxida o luminol (MERENYI et al., 1990; MIYASAWA et al., 1994; DODEIGNE et al., 2000; XIAO et al., 2000; ALLEN, 2000). Na avaliação da atividade peroxidásica, ao serem utilizados ensaios quimiluminescentes (os quais utilizam

luminol como substrato, em meio neutro), exige-se controle rigoroso, pois se deve estar atento ao potencial antioxidante das amostras a serem testadas, pois elas podem interagir com os radicais formados pela ação da MPO ao invés de inibirem sua atividade catalítica, o que levaria a uma interpretação errônea dos resultados.

Avaliou-se a interferência das amostras sobre a oxidação do luminol (100 $\mu$ M) pela hemina (80nM) e peróxido de hidrogênio (50 $\mu$ M). A concentração final de luminol foi determinada pelo seu coeficiente de extinção molar,  $\epsilon_{347\text{ nm}} = 7636\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (ALLEN; LOOSE, 1976). Comparou-se os valores das integrais das curvas INTENSIDADE DE LUZ(mV) x TEMPO(segundos) na presença e na ausência das amostras testadas.

### 3.5 Sistemas espectrofotométricos

#### 3.5.1 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE

Para os ensaios antioxidantes foram avaliados, além das amostras de vegetais, também o ácido úrico e trolox (Figura 4) como agentes antioxidantes padrão.

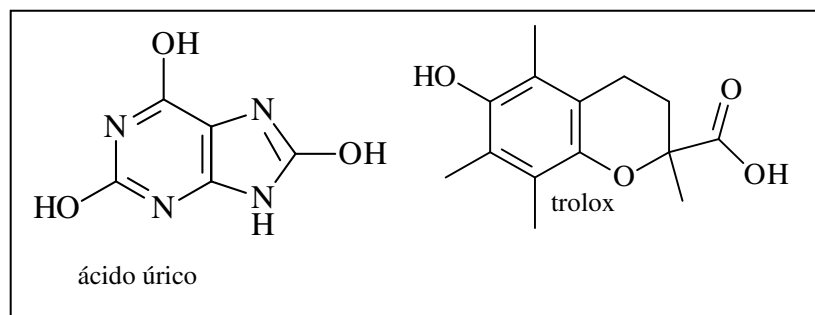


Figura 4: Estruturas moleculares dos padrões antioxidantes

Para os cálculos das porcentagens de inibição foi utilizada uma das seguintes equações, sendo “X” o comprimento de onda (nm) em que são feitas as leituras e específico para cada cromóforo dos sistemas utilizados:

$$\text{INIBIÇÃO (\%)} = \left( 1 - \left( \frac{A_{Xnm\_TESTE}}{A_{Xnm\_MAX}} \right) \right) \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde:  $A_{Xnm\_MAX}$  é a absorvância na ausência de amostra e  
 $A_{Xnm\_TESTE}$  é a absorvância na presença de amostra.

$$\text{INIBIÇÃO (\%)} = \left( 1 - \left( \frac{A_{Xnm\_MAX} - A_{Xnm\_TESTE}}{A_{Xnm\_MAX} - A_{Xnm\_MIN}} \right) \right) \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde:  $A_{Xnm\_MAX}$  é a absorvância na ausência do agente oxidante e de amostra,  
 $A_{Xnm\_MIN}$  é a absorvância na presença do agente oxidante e ausência de amostra  
 $A_{Xnm\_TESTE}$  é a absorvância na presença do agente oxidante e de amostra.

### 3.5.1.1 Atividade Antioxidante Total pelo ABTS<sup>•+</sup>

O radical catiônico do ABTS [2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] (Figura 5) é corriqueiramente utilizado para avaliar as habilidades dos flavonóides e agentes fenólicos como *scavengers* de radicais (PELLEGRINI et al., 1999). Este radical é gerado em solução segundo Pellegrini et al. (1999), com substituição, em nossos ensaios, do etanol por tampão fosfato de potássio 10mM. Este radical é utilizado nas reções em concentrações de 55µM (diluição de 1:88 em relação ao radical preparado). O ABTS<sup>•+</sup> apresenta picos nos comprimentos de onda 630nm, 734nm e 812nm (PELLEGRINI et al., 1999). Nos ensaios avaliou-se a ação antioxidante pelo decréscimo da absorvância em 734nm, após 30 minutos de incubação na presença das amostras. Os resultados foram

expressos em média  $\pm$  desvio padrão das porcentagens de inibição calculadas através da equação 2.

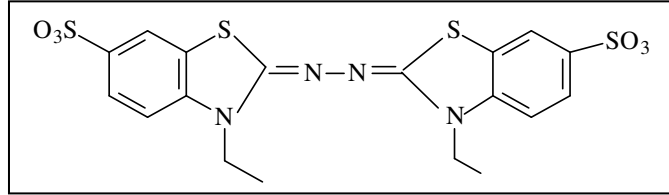


Figura 5: Estrutura molecular do ABTS.

### 3.5.1.2 Atividade *Scavenger* de radicais pelo DPPH (SOARES et al., 1997)

Em tubos de ensaio pipetou-se a amostra (em diferentes concentrações), e, a seguir, DPPH (Figura 6) em concentração final 60 $\mu$ M. Completaram-se os volumes para 1mL com etanol absoluto. Incubou-se a mistura por 15 minutos, ao fim dos quais se leu a absorbância em 531nm. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão das porcentagens de inibição calculadas através da equação 2.

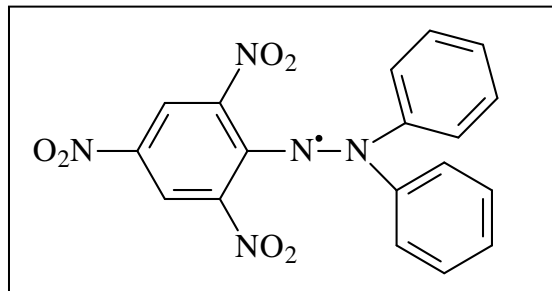


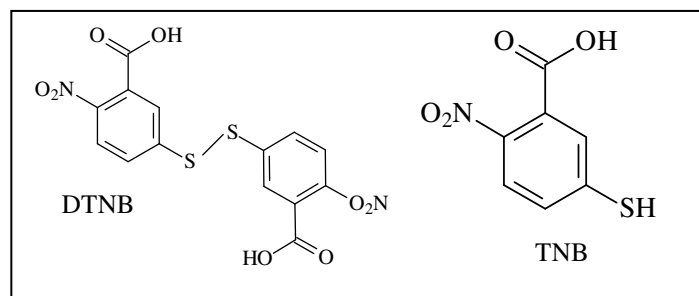
Figura 6: Estrutura molecular do DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazina)

### 3.5.1.3 Atividade *Scavenger* de HOCl, e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

O TNB (ácido 5-tio-2nitrobenzóico; Figura 7) foi preparado, a partir do DTNB (ácido 5-5'-ditio(2-nitrobenzóico); Figura 7), segundo Ching et al. (1994) e sua concentração foi determinada espectrofotometricamente, através de seu coeficiente de



extinção molar em 412nm ( $13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ; CHING et al., 1994). Da mesma forma determinou-se as concentrações para o HOCl ( $350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  em 295nm; ZGLICZYNSKI et al., 1971) e para o  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $80 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  em 230nm; BRESTEL, 1985). As reações foram efetuadas em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,0 à  $25^\circ\text{C}$ . Em tubos de ensaio pipetou-se a amostra (em diferentes concentrações), seguida por tampão (q.s.p. volume final da reação=1mL), TNB ( $80\mu\text{M}$ ) e HOCl ( $22\mu\text{M}$ ), ou  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $100\mu\text{M}$ ). Incubou-se por 15 minutos (para ensaio com HOCl) ou por 2 horas (para ensaio com peróxido de hidrogênio) e leu-se a absorbância em 412nm. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão das porcentagens de inibição calculadas através da equação 3.



**Figura 7: Estruturas moleculares do DTNB e do TNB**

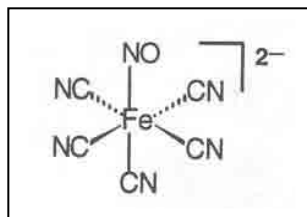
#### 3.5.1.4 Atividade *Scavenger* de Ânion Superóxido

O ânion superóxido reage com o NBT para formar uma formazana. A intensidade de cor é diretamente proporcional à concentração do radical (KAKKAR et al., 1984). O ensaio foi realizado em solução de pirofosfato de sódio (25mM, pH 8,3), sendo que a mistura reacional continha  $25\mu\text{L}$  de metassulfato de fenazina  $372\mu\text{M}$ ,  $75\mu\text{L}$  de NBT  $600\mu\text{M}$ ,  $50\mu\text{L}$  de NADH  $1560\mu\text{M}$  e diferentes concentrações das amostras vegetais em volume final de 1mL. As reações foram iniciadas pela adição de NADH. Após incubação por 90 segundos a  $25^\circ\text{C}$  foram adicionados  $100\mu\text{L}$  de ácido acético glacial e  $900\mu\text{L}$  tampão pirofosfato de sódio. Após vigorosa agitação a intensidade de cor da mistura foi medida em 560nm. Os

resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão das porcentagens de inibição calculadas através da equação 2.

### 3.5.1.5 Atividade *Scavenger* de Óxido Nítrico

O efeito *scavenger* das amostras sobre o óxido nítrico foi medido de acordo com Yen et al. (2001). Foram adicionadas em tubos diferentes concentrações das diferentes amostras. A seguir adicionou-se tampão fosfato 50mM, pH 7,0 (q.s.p. volume final de 1mL) e nitroprussiato de sódio (concentração final 25mM; Figura 8). Incubou-se, na ausência de luz e em 25<sup>0</sup>C, por 1 hora e meia e retirou-se uma alíquota de 250 $\mu$ L à qual foi adicionado 150 $\mu$ L do reagente de Griess (YEN et al., 2001). Esta nova mistura foi incubada, na ausência de luz e em 25<sup>0</sup>C, por 15 minutos. Finalmente, fez-se a leitura das absorvâncias em 570nm. Durante a incubação de 1 hora e meia, nitrito é liberado em solução. Este nitrito reage com a sulfanilamida e com o dihidrocloreto de naftiletlenodiamino em uma reação de diazotação, formando um cromóforo com pico de absorvância em 570nm. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão das porcentagens de inibição calculadas através da equação 2.



**Figura 8: Estrutura molecular do nitroprussiato de sódio.**

### 3.5.2 POTENCIAL DE INIBIÇÃO DA AÇÃO DA MPO

No ensaio quimiluminescente comparou-se as integrais das cinéticas de emissão de luz, com e sem amostras (1 minuto de reação), enquanto nos ensaios

espectrofotométricos compararam-se as velocidades iniciais das cinéticas ( $v_0$ ), calculadas através dos gráficos “produto formado vs. tempo de reação” ( $v_0 = \Delta A / \Delta t$ ).

### **3.5.2.1 Cinética de oxidação do luminol pela hemina (quimiluminescência)**

Em tampão Fosfato de potássio 50mM, pH 7,4, testou-se as amostras (10 $\mu$ g/mL, 1 $\mu$ g/mL e 0,1 $\mu$ g/mL) na cinética de oxidação do luminol (0,1mM) pela hemina (80nM) e peróxido de hidrogênio (0,05mM).

### **3.5.2.2 Cinética de oxidação do guaiacol pela hemina (UV/Vis)**

Em tampão fosfato de potássio 50mM, pH 7,4, testou-se as amostras (10 $\mu$ g/mL, 1 $\mu$ g/mL e 0,1 $\mu$ g/mL) na cinética de oxidação do guaiacol (5mM) pela hemina (3 $\mu$ M) e peróxido de hidrogênio (2,5mM). A cinética foi monitorada em 470nm pela formação do produto da reação (guaiacol oxidado).

### **3.5.2.3 Cinética de oxidação do guaiacol pela HRP (KHALIL, 2002)**

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). Em tampão PBS-D, a 37<sup>0</sup>C, temos HRP 7nM e guaiacol 2mM, com e sem amostras (10 $\mu$ g/mL, 1 $\mu$ g/mL e 0,1 $\mu$ g/mL). A reação é iniciada com a adição de peróxido de hidrogênio (0,1mM) e monitorada em 470nm por 1minuto. Determinou-se  $v_0$ .

#### **3.5.2.4 Cinética de oxidação do guaiacol pela mieloperoxidase presente no extrato bruto de neutrófilo de rato (DESSER et al., 1972)**

Em tampão PBS-MgSO<sub>4</sub>, a 37<sup>0</sup>C, EBNR (MPO 0,10U) e guaiacol 100mM, com e sem amostras (10µg/mL). A reação é iniciada com a adição de peróxido de hidrogênio (0,5mM) e monitorada em 470nm por 1minuto. Determinou-se v<sub>0</sub>.

Para a determinação dos valores de IC<sub>50</sub> das amostras na cinética de oxidação do guaiacol pela MPO, testaram-se diferentes concentrações das mesmas no sistema EBNR(MPO 0,10U)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0,2mM)/guaiacol(20mM).

#### **3.5.2.5 Cinética de oxidação do TMB pela mieloperoxidase presente no extrato bruto de neutrófilo de rato (ANDREWS; KRYNSKI, 1986)**

Em tampão fosfato 20mM/NaCl 100mM, pH 6,0, a 37<sup>0</sup>C, EBNR (MPO 0,10U) e TMB 1,6mM, com e sem amostras (10µg/mL). A reação é iniciada com a adição de peróxido de hidrogênio (0,5mM) e monitorada em 655nm por 1minuto. Determinou-se v<sub>0</sub>.

### **3.6 Análise Estatística**

Os resultados, de triplicatas (exceto quando indicado), são expressos em média ± desvio padrão (DP). Análises realizadas através de ANOVA onde se estabelece o nível de significância como p<0,05.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 4.1 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE

Quando as ERO são geradas *in vivo*, muitos antioxidantes as combatem. Suas importâncias relativas dependem de qual espécie foi gerada, como, onde e qual alvo de dano é avaliado. Por exemplo: quando o plasma é exposto ao dióxido de nitrogênio ou ozônio, o ácido úrico é protetor, mas este promove ínfima proteção contra o ácido hipocloroso. Mas, quando o estresse oxidativo é o mesmo e avaliam-se diferentes alvos, obtêm-se diferentes respostas. Por exemplo: a fase gasosa da fumaça do cigarro causa lipoperoxidação no plasma, que pode ser evitada pelo ácido ascórbico; entretanto, este não protege contra o dano oxidativo das proteínas (HALLIWELL, 1995).

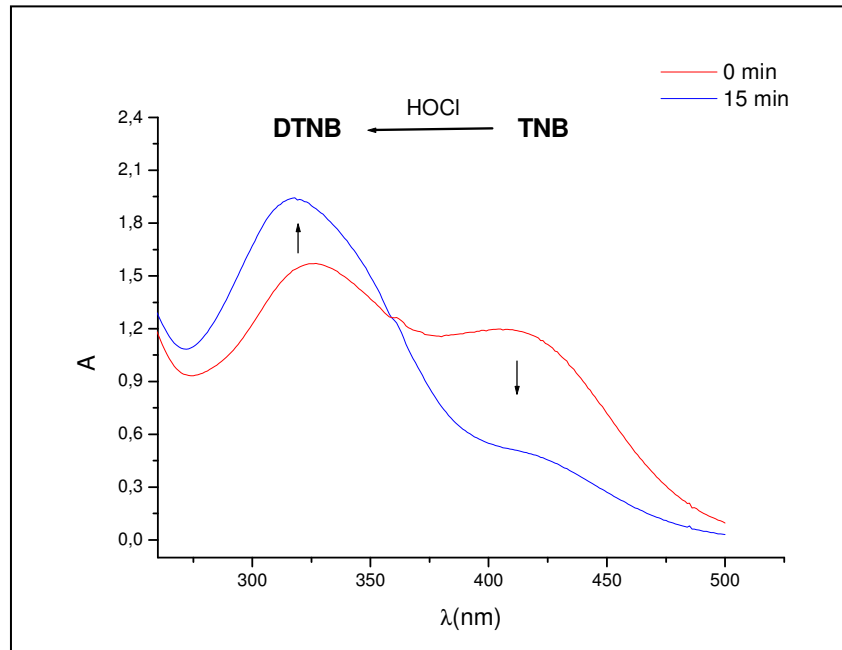
No estudo da avaliação do potencial antioxidante das amostras deve-se considerar que: i) um composto deve ser testado em concentrações disponíveis *in vivo* e ii) ao avaliar os antioxidantes, deve-se utilizar pelo menos uma espécie relevante biologicamente. Deve-se perguntar como age o antioxidante, se ele age diretamente sobre a ERO ou ele inibe a sua geração e ainda, se ele age indiretamente regulando defesas antioxidantes endógenas.

Foram analisadas diferentes espécies reativas (radicalares ou não) modelos (DPPH e ABTS<sup>•+</sup>) ou existentes em sistemas biológicos (HOCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e NO<sup>•</sup>). Além das amostras de fonte vegetal, testaram-se também substâncias com reconhecida ação antioxidante: o ácido úrico (um antioxidante endógeno) e Trolox (um análogo da vitamina E).

### 4.1.1 Atividade *Scavenger* de HOCl

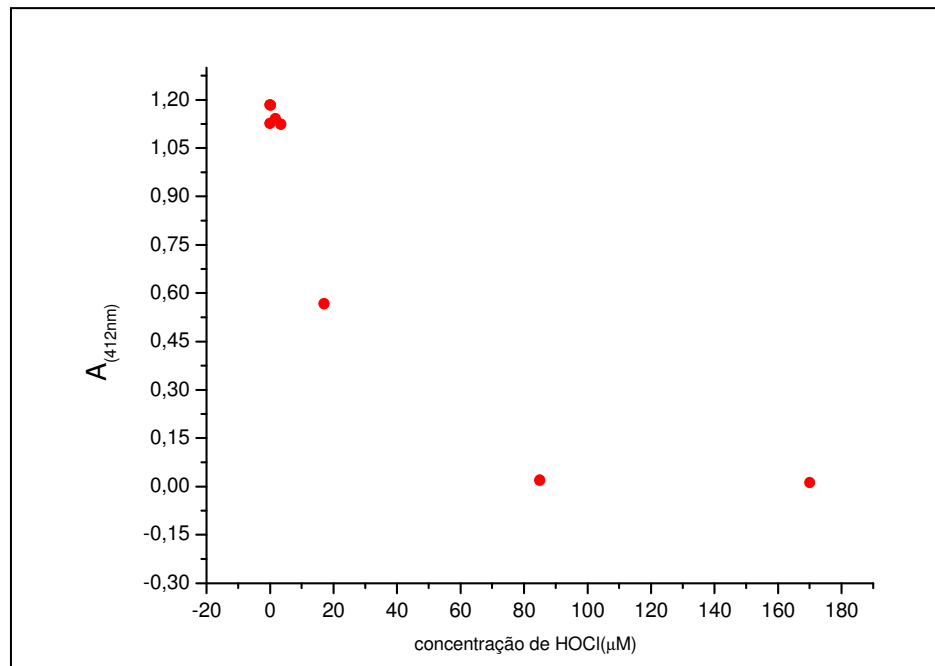
A ação das amostras sobre o ácido hipocloroso foi avaliada através do ensaio de oxidação do TNB a DTNB, acompanhada através do desaparecimento de TNB pela queda da absorvância em 412nm (gráfico 1). Esta queda é comparada na ausência e na presença da amostra avaliada pelo cálculo de porcentagem de inibição apresentado anteriormente (equação 3). Constroem-se os gráficos dose-resposta, relacionando a inibição à

concentração avaliada de amostra. Pela análise destes gráficos são determinados os valores de  $IC_{50}$  através da curva de tendência traçada pelo programa ORIGIN.



**Gráfico 1:** Oxidação do TNB 80 $\mu$ M (t=15min) pelo ácido hipocloroso 22 $\mu$ M.

A fim de se conhecer o comportamento do sistema, variou-se a concentração de ácido hipocloroso a reagir com o TNB 80 $\mu$ M (gráfico 2). Estabeleceu-se uma relação na qual aproximadamente 2 moléculas de TNB reajam com 1molécula de HOCl, diferentemente da proporção encontrada por Ching et al. (1994), que estabeleceram a estequiometria como sendo 1,3TNB: 1HOCl.



**Gráfico 2:** Oxidação do TNB 80μM (t=15min) em função da concentração de ácido hipocloroso.

Alguns autores avaliam a ação de diferentes amostras sobre o HOCl pelo método do TNB por meio de um monitoramento contínuo da queda da absorvância na ausência e na presença da amostra estudada, diferentemente da maneira seguida nesta dissertação, onde as amostras foram avaliadas comparando-se a absorvância final e inicial do tempo de incubação na ausência e na presença das amostras. Paino et al. (2005) avaliaram a ação do diclofenaco sobre o HOCl através do monitoramento contínuo da concentração do TNB avaliada pela sua absorvância em 412nm. De fato, há pouca diferença entre as técnicas, sendo que o método adotado nesta dissertação nos permite a realização de diferentes reações simultaneamente.

A partir das curvas dose-resposta construídas, podemos inferir que o ácido úrico apresentou menor valor de IC<sub>50</sub> do que o trolox, o que o indicaria como sendo melhor padrão. Entretanto, observamos que o trolox atingiu um maior patamar de inibição do que o ácido úrico, o que demonstra um maior potencial antioxidante (Gráfico 3A).



Foram avaliados extratos e frações das folhas e do caule da *P. nitens*, sendo que o extrato etanólico da folha apresentou ação mais eficiente do que o extrato do caule. Observamos que a fração hexânica da folha foi mais eficiente do que a respectiva fração do caule (Gráfico 3B). O caule teve ainda outras duas frações avaliadas, sendo a fração butanólica mais eficiente do que a fração acetato de etila (Gráfico 4).

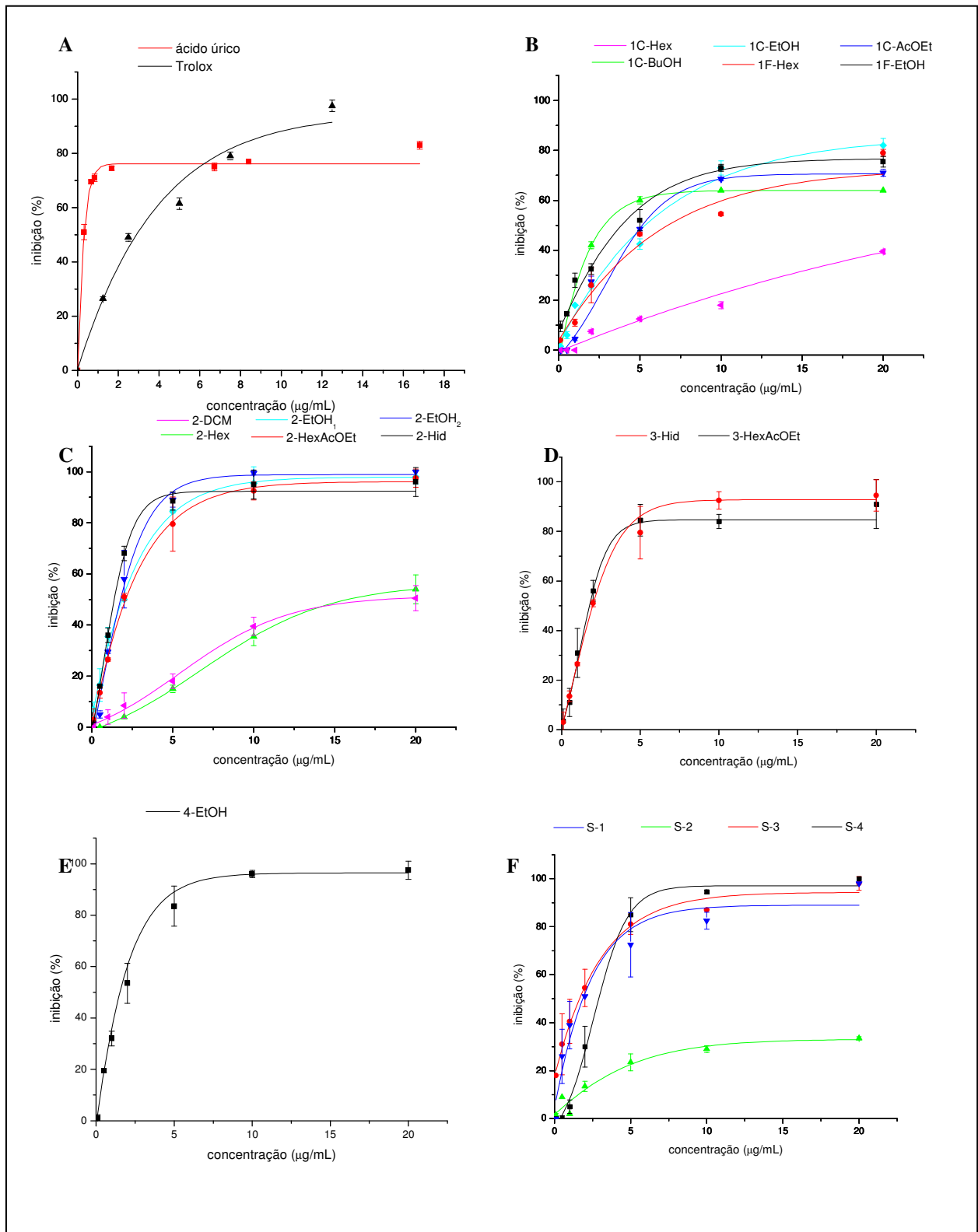
Sobre as amostras da *M. ilicifolia*, observou-se que dentre os extratos brutos, apresentaram maior eficiência aqueles obtidos por extração em etanol, sendo o extrato diclorometânico menos eficiente. Observou-se ainda, que o extrato etanólico obtido por ultrassom foi ligeiramente mais eficiente do que o obtido por maceração, provavelmente devido ao maior poder de penetração do ultrassom sobre as estruturas da casca da raiz do vegetal (Gráfico 3C).

No gráfico 3C, observa-se que a fração hexânica (2-Hex) foi pouco eficiente quando comparada às frações hidroalcoólica (2-Hid) e hexano-acetato (2-HexAcOEt). A fração hidroalcoólica mostrou-se *scavenger* de HOCl ligeiramente mais eficiente do que a fração hexano-acetato.

O gráfico 3D nos mostra que não houve diferença significativa entre as frações hidroalcoólica e hexano-acetato de etila do extrato bruto da *M. aquifolium*.

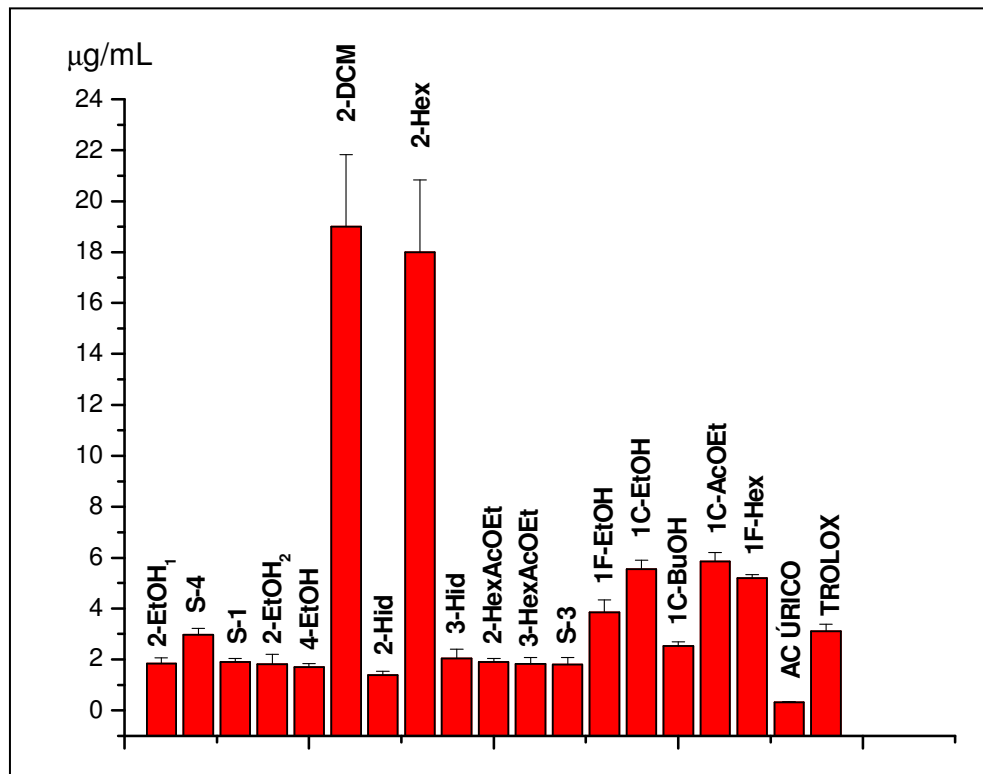
Observa-se também que o extrato bruto da *S. campestris* (4-EtOH) foi tão eficiente quanto o extrato bruto 2-EtOH<sub>2</sub> da *M. ilicifolia* na ação sobre o ácido hipocloroso.

Dentre as substâncias isoladas de Piperaceae, observamos que em ordem crescente de eficiência temos: S-2 < S-4 < S-1 ~ S-3. Sendo que todas foram menos eficientes do que o ácido úrico, mas somente a S-2 foi menos eficiente do que o trolox.



**Gráfico 3:** Sistema TNB (80µM), 25°C, tampão fosfato 50mM, pH 7,0 - Ação scavenger sobre o HOCl (22µM). **A** - padrões ; **B** - *P. nitens*; **C** - *M. ilicifolia*; **D** - *M. aquifolium*; **E** - *S. campestris*; **F** - substâncias isoladas de Piperaceae.

Sendo assim, pode-se observar que todas as amostras promoveram inibição neste sistema sendo que dentre as doses testadas, apenas as amostras S-2 e 1C-Hex não alcançaram inibição de 50%, o que mostra que tais amostras são relativamente fracas como *scavengers* de ácido hipocloroso.



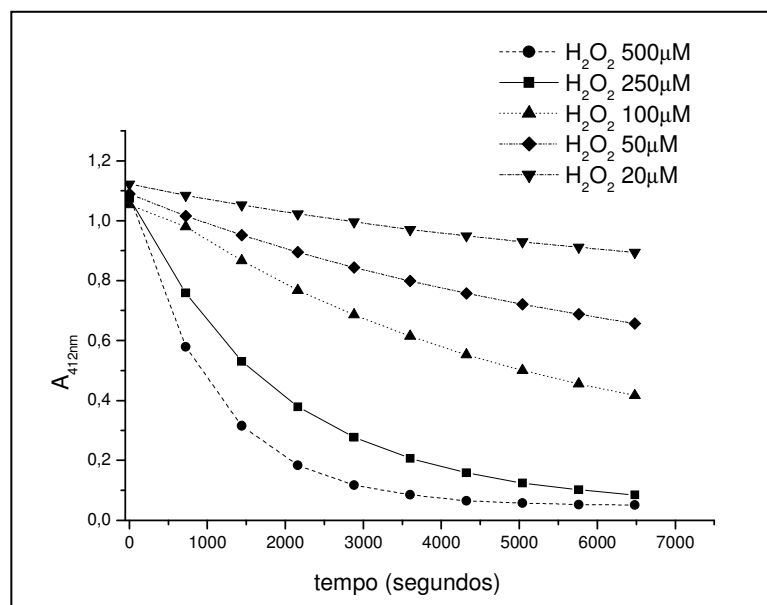
**Gráfico 4:** Valores de IC<sub>50</sub> na inibição da oxidação do TNB (80µM) pelo HOCl (22µM)

No gráfico 4 estão os valores de IC<sub>50</sub> (média±DP) obtidos dos gráficos dose-resposta construídos. O ácido úrico foi o mais potente agente *scavenger* de HOCl (baixas concentrações e alta eficiência; Gráfico 4) enquanto as amostras 2-DCM e 2-Hex foram os piores. Não houve extrato, fração ou substância isolada de fonte vegetal com IC<sub>50</sub> sobre o HOCl próximo ao do ácido úrico. Algumas das amostras – 2-EtOH<sub>1</sub>, S-4, S-1, 2-EtOH<sub>2</sub>, 4-EtOH, 2-Hid, 3-Hid, 2-HexAcOEt, 3-HexAcOEt, S-3 e 1C-BuOH - tiveram ação equivalente

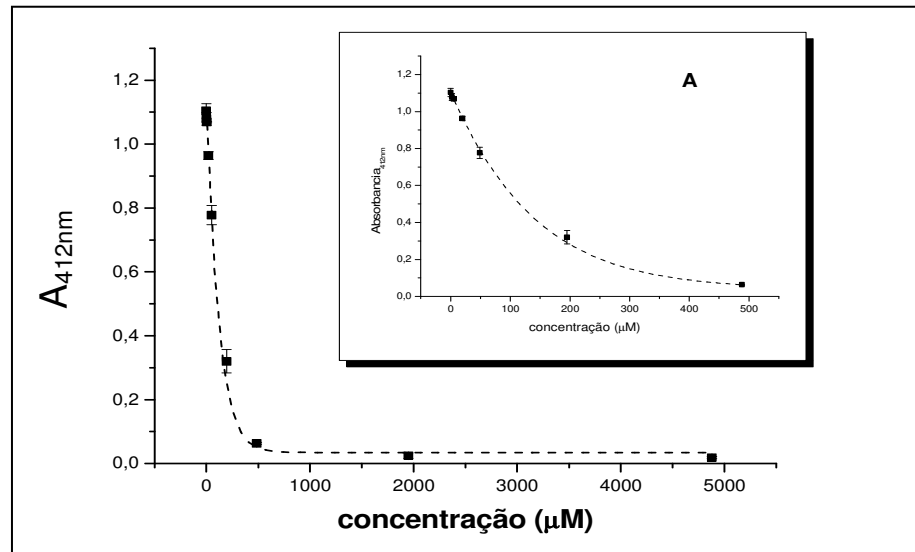
ou superior (menor  $IC_{50}$ ) à do Trolox, um agente consagrado como antioxidante e muito utilizado em estudos com espécies oxidantes.

#### 4.1.2 Atividade Scavenger de $H_2O_2$

A interferência das amostras na oxidação do TNB pelo peróxido de hidrogênio também foi estudada. O peróxido de hidrogênio, assim como o ácido hipocloroso, oxida o TNB a DTNB com queda da absorbância em 412nm. Por ser uma reação de oxidação mais lenta do que a observada com o HOCl, avaliou-se qual seria o tempo de reação em que não haveria variação da absorbância (gráfico 5), a fim de se estabelecer o tempo adequado para a incubação dos testes a serem realizados. A partir deste dado, definiu-se o tempo de incubação de 2 horas para nossos ensaios. Testaram-se diferentes concentrações de  $H_2O_2$  (Gráficos 5 e 6) e escolheu-se aquela (100 $\mu$ M) que promoveu queda de aproximadamente 0,65 na absorbância em 412nm.



**Gráfico 5:** Cinéticas de oxidação do TNB 80 $\mu$ M por diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio em função do tempo (t=2horas)



**Gráfico 6:** Oxidação do TNB 80µM (t=2horas) em função da concentração de peróxido de hidrogênio; A – ampliação da região de menores concentrações.

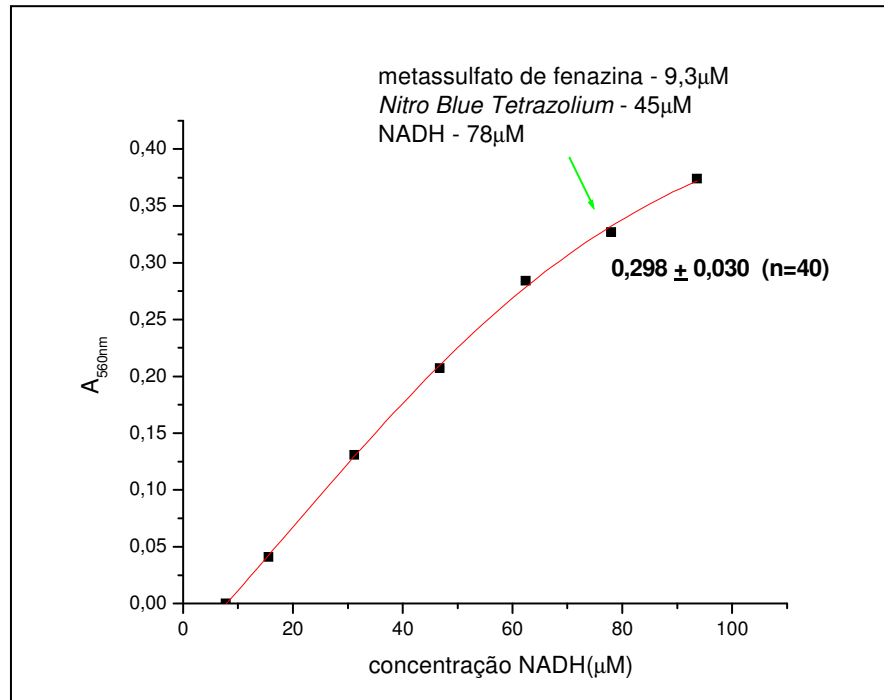
Nas condições avaliadas, nenhuma das amostras promoveu inibição (considerando  $p < 0,05$ ) nas doses em que foram testadas (gráficos de barras do ANEXO B).

#### 4.1.3 Atividade *Scavenger* de Ânion Superóxido

No sistema gerador de ânion superóxido, adaptado de Kakkar (1984), esta espécie é gerada pela reação entre NADH e metassulfato de fenazina (PMS). O ânion superóxido produzido é revelado em solução pela reação com o sal de tetrazólio (NBT) gerando uma formazana com máximo de absorvância em 560nm. Na presença de *scavengers* de ânion superóxido, a intensidade da absorvância torna-se menor devido à menor disponibilidade de  $O_2^{\bullet-}$  para reagir com o NBT.

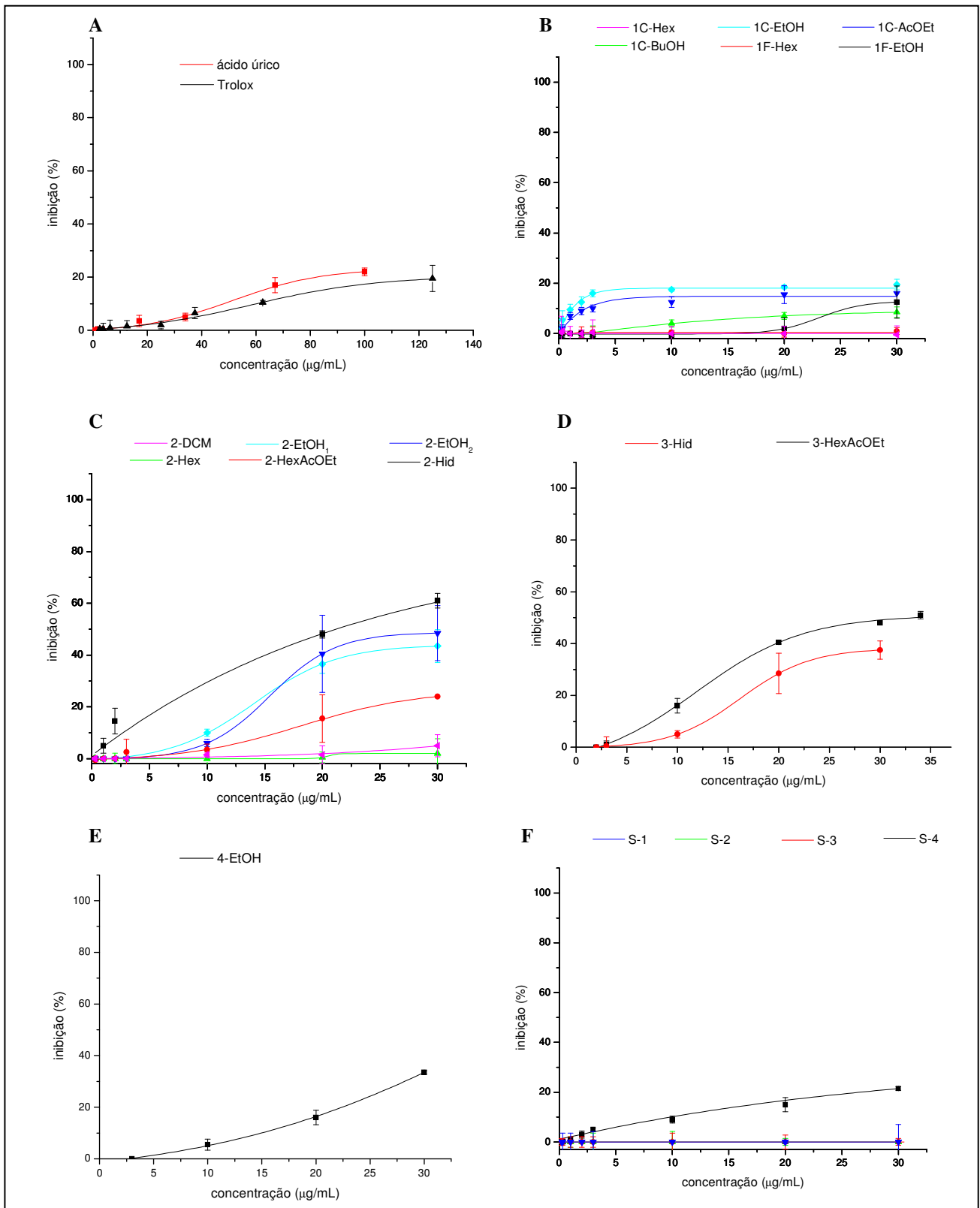
Neste sistema, é necessário que o NBT esteja em excesso em relação ao ânion superóxido produzido, para que se possa ter uma correta avaliação da ação das diferentes amostras estudadas. Para verificar tal condição, optou-se por variar a concentração de NADH no sistema em que NBT e PMS permanecem com concentrações constantes. O

aumento da absorbância em função da concentração de NADH indica que o NBT está em excesso em relação ao ânion superóxido nas condições escolhidas para o ensaio com as amostras (Gráfico7).



**Gráfico 7:** Oxidação do NBT (45µM) pelo sistema NADH/PMS, em função da concentração de NADH.

Soares et al. (1997) avaliaram o extrato da pimenta *Thymus zygis* sobre o ânion superóxido gerado por um sistema químico semelhante ao utilizado nesta dissertação, cuja diferença está nas concentrações dos componentes do sistema. Eles observaram que os extratos avaliados apresentaram inibição máxima de cerca de 45% com a concentração de 24µg/mL. Fernandes et al. (2004) avaliaram a ação de diferentes anti-inflamatórios sobre o ânion superóxido gerado pelo sistema NADH/PMS, observando propriedade *scavenger* deste radical pela indometacina, acetaminofeno e etodolac.



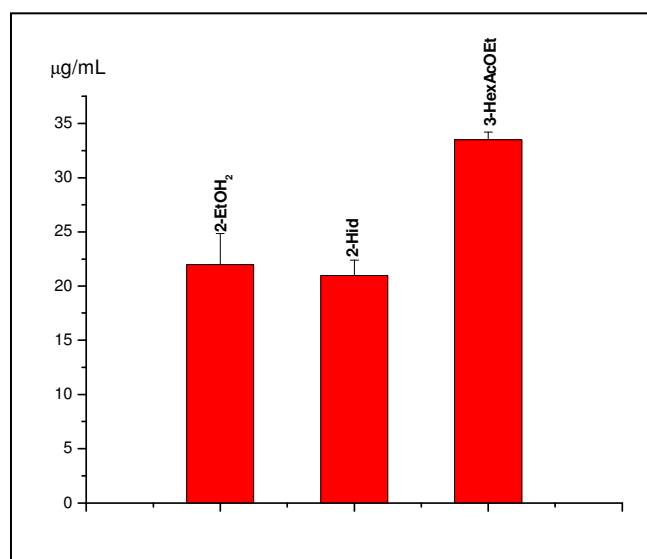
**Gráfico 8:** Ação scavenger sobre o  $O_2^{\bullet-}$ . A - padrões ; B - *P. nitens*; C - *M. ilicifolia*; D - *M. aquifolium*; E - *S. campestris*; F - substâncias isoladas de Piperaceae

Através do gráfico 8, observa-se que o ácido úrico é um *scavenger* de  $O_2^{\bullet-}$  ligeiramente melhor do que o trolox. Observa-se ainda, que dentre as substâncias isoladas avaliadas somente a S-1 apresentou inibição significativa sobre o sistema, sendo ainda mais eficiente do que os padrões avaliados.

Dentre as amostras da *P. nitens*, observa-se menor eficiência das amostras obtidas das folhas, sendo mais eficientes as frações etanólica e acetato do caule.

Destacam-se na inibição deste sistema as amostras obtidas das plantas da família Celastraceae, sendo as mais eficientes as frações hidroalcoólica da *M. ilicifolia*, seguida do extrato bruto 2-EtOH<sub>2</sub> desta mesma planta e da fração 3-HexAcOEt da *M. aquifolium*.

Tiveram valor de IC<sub>50</sub> determinado (gráfico 9) as amostras 2-EtOH<sub>2</sub> (22µg/mL), 2-Hid (21µg/mL) e 3-HexAcOEt (34µg/mL), indicando estas serem boas *scavengers* de ânion superóxido. As amostras 2-EtOH<sub>1</sub>, 4-EtOH, 3-Hid, 3-HexAcOEt, 1F-EtOH, 1C-EtOH, 1C-BuOH, 1C-AcOEt, ÁCIDO ÚRICO e TROLOX promoveram inibição sobre o ânion superóxido sem, no entanto, alcançar 50% nas doses testadas.



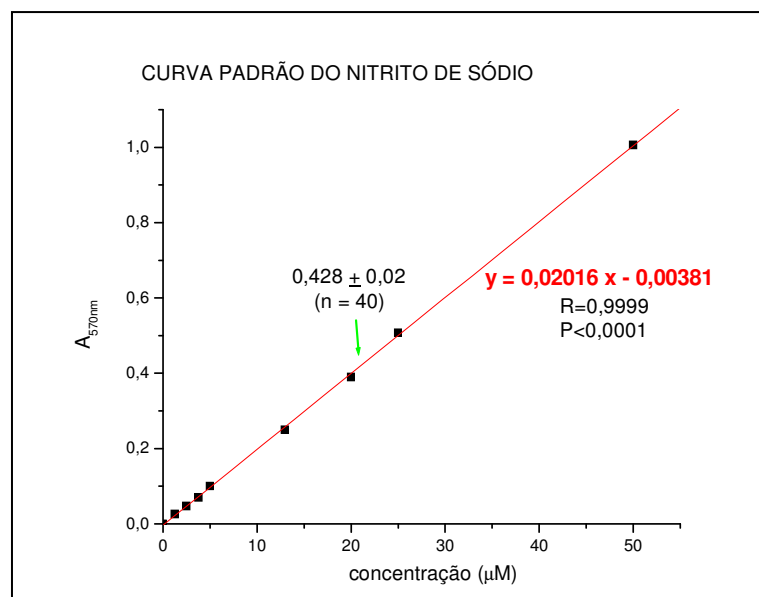
**Gráfico 9:** Valores de IC<sub>50</sub> na inibição da oxidação do NBT pelo anion superóxido (atividade *scavenger* de anion superóxido)



#### 4.1.4 Atividade *Scavenger* de Óxido Nítrico

No estudo sobre o óxido nítrico, o mesmo é gerado a partir do nitroprussiato de sódio em solução. O nitroprussiato de sódio se decompõe em solução aquosa liberando  $\text{NO}^\bullet$ , que, em condições aeróbias, reage com o oxigênio produzindo nitrito, que podem ser dosados através do Reagente de Griess pela formação de um cromóforo com máximo de absorvância em 570nm. A absorvância neste comprimento de onda é proporcional ao óxido nítrico disponível em solução. Sendo assim, na presença de agente *scavenger* de  $\text{NO}^\bullet$ , a absorvância diminui. A diferença da absorvância na ausência e na presença da amostra é avaliada através do cálculo de porcentagem de inibição que é relacionado à concentração nos gráficos dose-resposta. Yen et al. (2001) observaram uma ação dose-dependente de extratos metanólico e acetato de etila, da leguminosa *Uraria crinita* sobre o óxido nítrico, pelo método utilizado neste trabalho, sendo que o extrato acetato de etila mostrou-se mais eficiente.

A fim de se determinar a concentração de  $\text{NO}^\bullet$ , construiu-se uma curva padrão com nitrito de sódio e, pela equação da reta obtida e valores de absorvância do sistema do nitroprussiato de sódio, determinou-se o nível de  $\text{NO}^\bullet$  avaliado em  $21 \pm 0,8 \mu\text{M}$  (Gráfico 10).



**Gráfico 10:** Oxidação do Reagente de Griess em função da concentração de nitrito de sódio.

Os dados obtidos mostram que o trolox não apresenta propriedade *scavenger* de  $\text{NO}^\bullet$ , pois até mesmo em concentrações bastante elevadas não houve inibição (gráfico 11A).

Dentre as amostras de *P. nitens*, a fração butanólica do caule foi a mais eficiente, sendo que os extratos etanólicos de caule e folha apresentaram ação semelhante. As frações hexânicas não interferiram no sistema (Gráfico 11B).

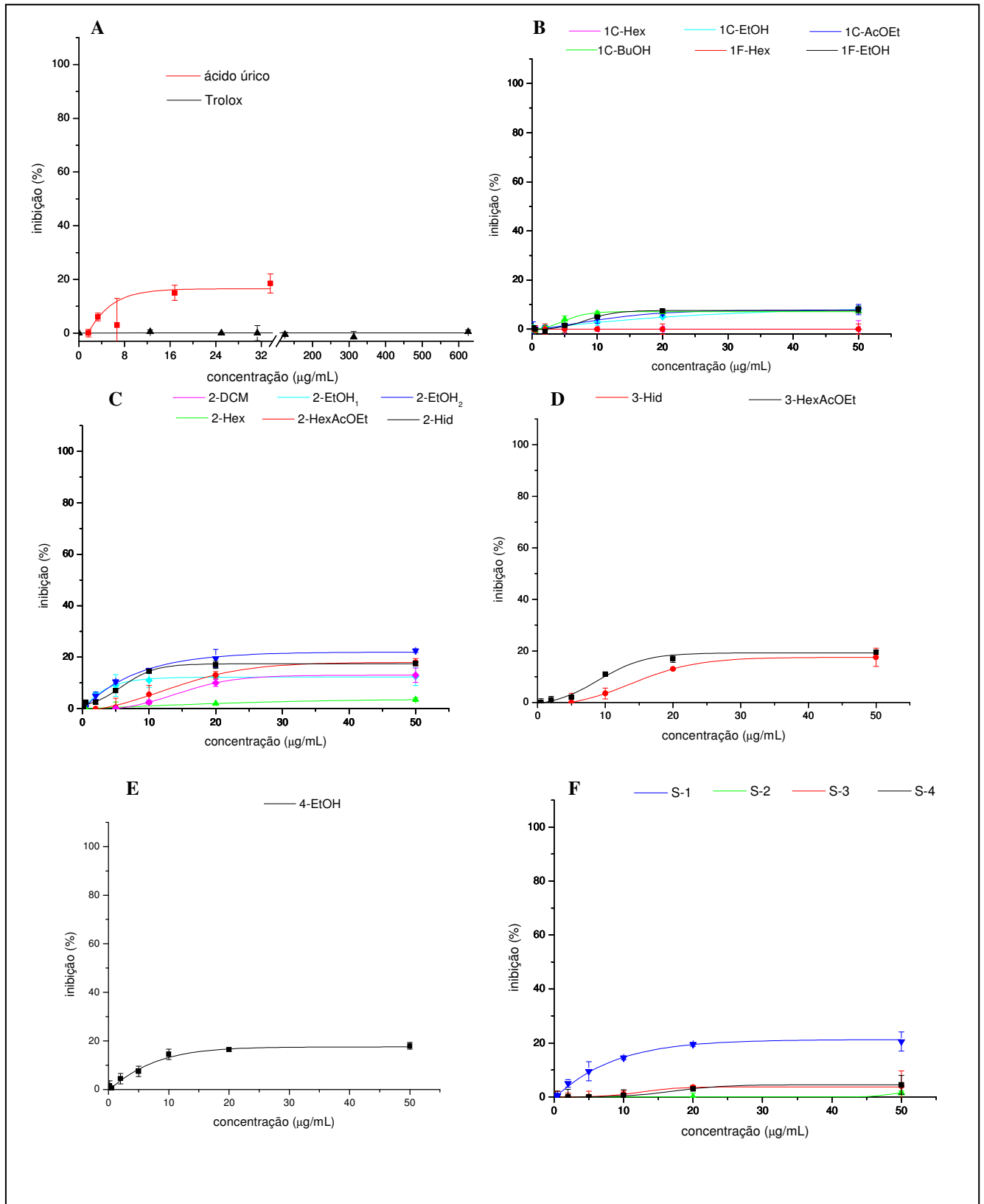
Dentre as amostras da *M. ilicifolia*, a fração hexânica praticamente não interferiu, sendo mais eficientes o extrato bruto etanólico obtido por ultrassom e sua fração hidroalcoólica (Gráfico 11C).

A fração 3-HexAcOEt da *M. aquifolium* foi mais eficiente do que a fração hidroalcoólica.

O extrato bruto da *S. campestris* foi menos eficiente do que o extrato bruto 2-EtOH<sub>2</sub> da *M. ilicifolia* (gráfico 11E).

Dentre as substâncias isoladas de Piperaceae, observou-se que em ordem crescente de eficiência temos: S-1 > S-4 ~ S-3. Sendo a S-1 mais eficiente do que o ácido úrico.

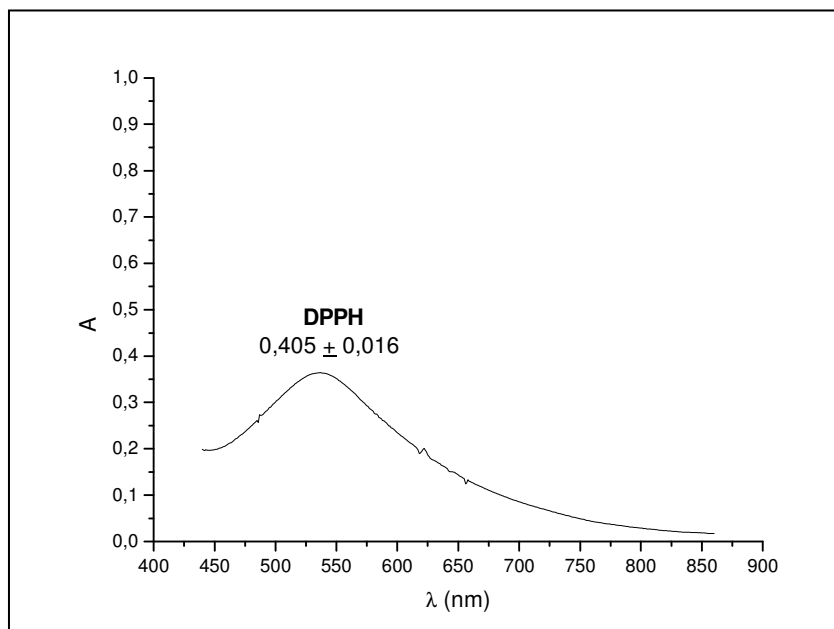
Observou-se que nenhuma das amostras foi capaz de promover 50% de inibição na ação do óxido nítrico sobre o reagente de Griess. Não promoveram inibição significativa, as amostras S-2, 2-Hex, 1C-Hex, 1F-Hex e trolox. As maiores inibições foram obtidas com: ácido úrico (15% com 11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 2-Hid (17% com 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e S-1 (19% com 17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).



**Gráfico 11:** Ação scavenger sobre o  $\text{NO}^\bullet$ . A - padrões ; B - *P. nitens*; C - *M. ilicifolia*; D - *M. aquifolium*; E - *S. campestris*; F - substancias isoladas de Piperaceae.

#### 4.1.5 Atividade *Scavenger* de radicais pelo DPPH

O DPPH é um radical estável muito utilizado nos estudos com antioxidantes. Como se pode ver no gráfico 12, ele apresenta máximo de absorção em 531nm, comprimento de onda utilizado para avaliar a ação das amostras. Na presença de *scavengers* deste radical, a intensidade da absorbância em 531nm diminui e a diferença da absorbância na ausência e na presença das amostras nos fornece a porcentagem de inibição, relacionada nos gráficos dose-resposta apresentados.



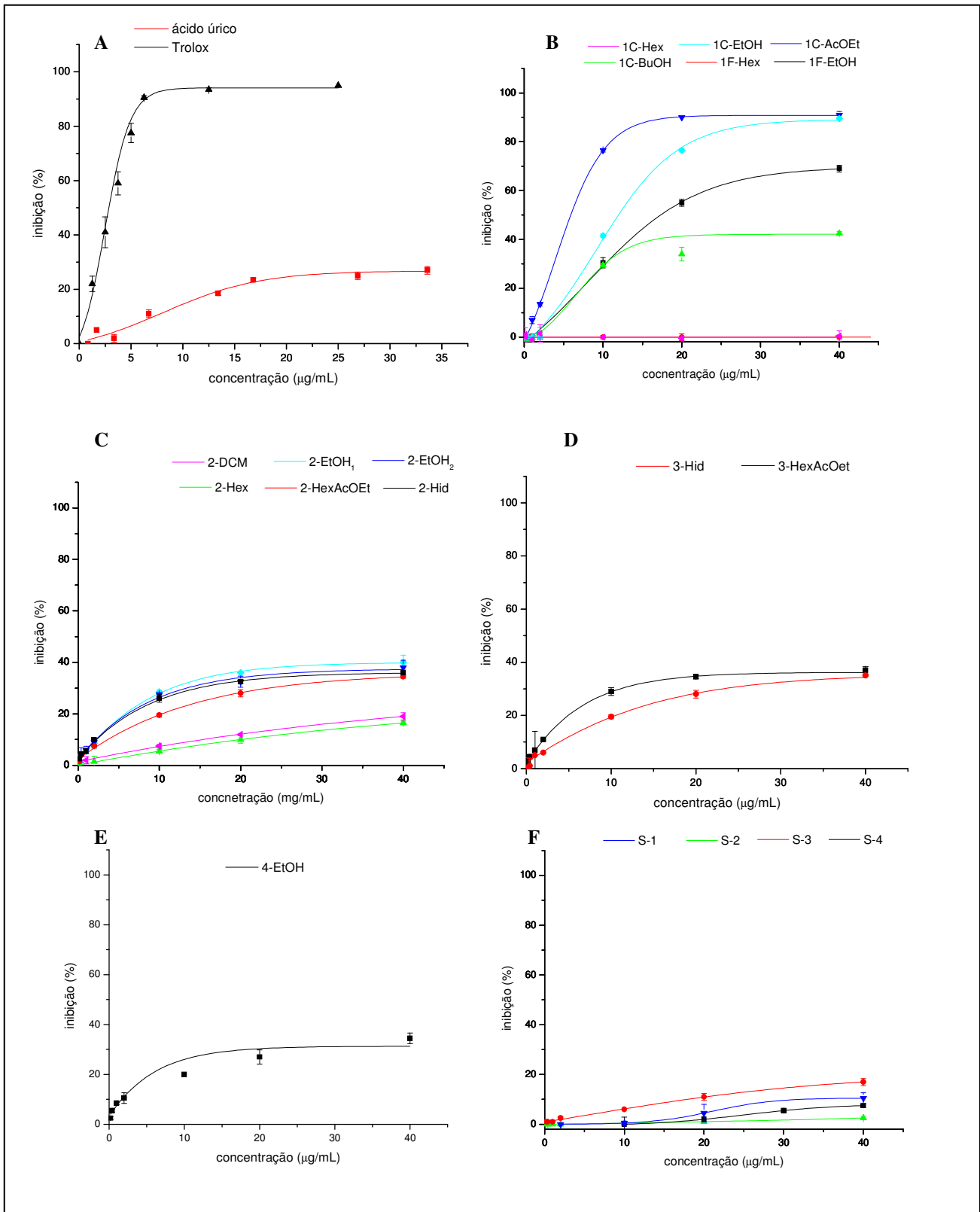
**Gráfico 12:** Espectro de absorção do DPPH

O trolox é um antioxidante muito utilizado como padrão nos ensaios de avaliação da ação de diferentes amostras sobre o radical DPPH. Dentre as amostras descritas em artigos científicos com ação sobre o DPPH temos, frutas (BANERJEE et al., 2005), cogumelos (CUI, et al., 2005) e plantas (Gorinstein et al., 2003), como o eucalipto ( $IC_{50}=8,93\mu\text{g/mL}$ ) e derivados de vegetais, tais como o chá verde chinês ( $IC_{50}=5,63\mu\text{g/mL}$ ) e o chá preto ( $IC_{50}=6,32\mu\text{g/mL}$ ; ATOUI et al., 2005). Em nossos ensaios, observamos que o trolox age sobre 50% do radical em solução quando sua concentração ( $IC_{50}$ ) está em torno de

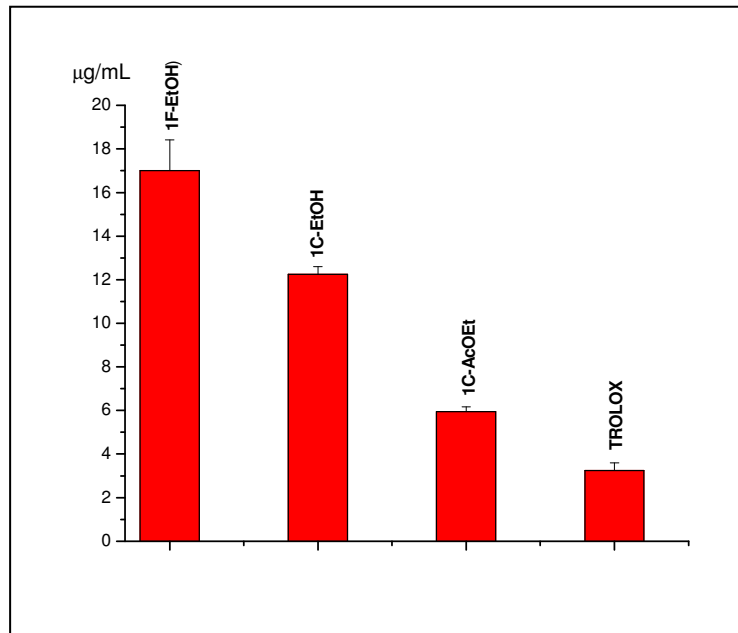
3µg/mL. Atoui et al. (2005) determinaram que o valor de IC<sub>50</sub> para o trolox no ensaio do DPPH seria de cerca de 3,5µg/mL, valor próximo ao determinado neste trabalho.

Os resultados obtidos mostram que nas condições testadas nenhuma amostra foi tão eficiente quanto o Trolox (gráfico 13A). Destacaram-se neste sistema as amostras da *P. nitens*, sendo as mais eficientes as frações acetato e etanólica do caule e a fração etanólica das folhas (Gráfico 13B). Novamente o extrato diclorometânico e a fração hexânica da *M. ilicifolia* foram pouco eficientes frente as demais amostras (Gráfico 13C). O extrato bruto, 2-EtOH<sub>2</sub>, da *M. ilicifolia* foi novamente superior ao da *S. campestris*. Dentre as substâncias isoladas, mostrou-se mais eficiente neste sistema a S-3, sem, no entanto, ser melhor do que o ácido úrico (molécula referência).

Tiveram IC<sub>50</sub> determinados (Gráfico 14): 1F-EtOH - 17µg/mL, 1C-EtOH - 12µg/mL, 1C-AcOEt 6µg/mL e Trolox - 3µg/mL. As amostras S-2, 1C-Hex e 1F-Hex não apresentaram capacidade em reagir com o DPPH e diminuir a leitura em 531nm. As demais amostras apresentaram ação sobre o DPPH, mas não atingiram 50% de inibição. Dentre estas amostras, as maiores inibições alcançadas foram em torno de 40%, mas com doses acima de 30µg/mL.



**Gráfico 13:** Ação *scavenger* sobre o radical DPPH (60µM). **A** - padrões ; **B** - *P. nitens*; **C** - *M. ilicifolia*; **D** - *M. aquifolium*; **E** - *S. campestris*; **F** - substâncias isoladas de Piperaceae.



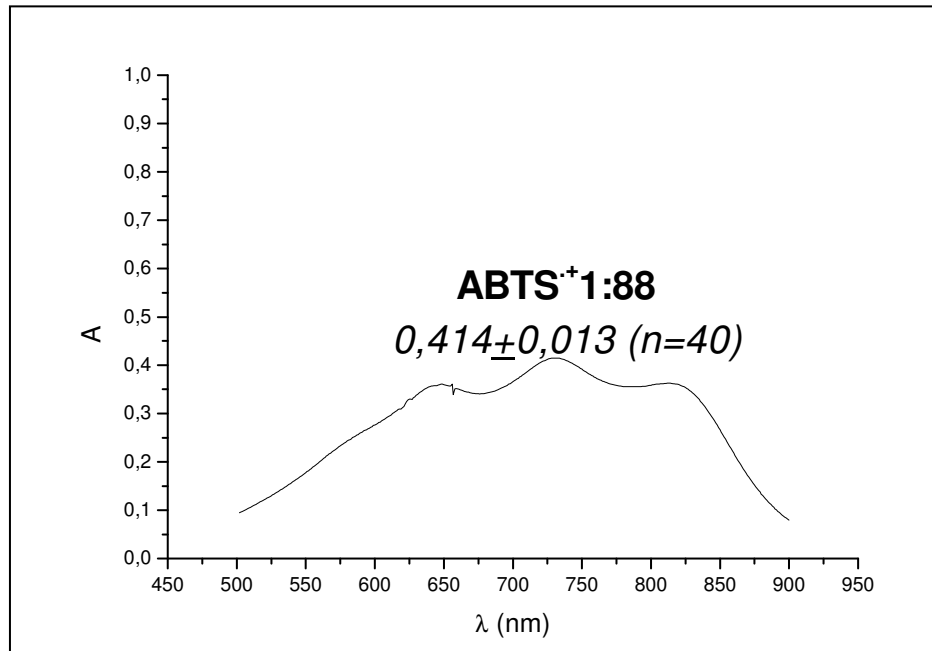
**Gráfico 14:** Valores de IC<sub>50</sub> na supressão do radical DPPH.

#### 4.1.6 Atividade Antioxidante Total pelo ABTS<sup>•+</sup>

Neste sistema, o radical é gerado pela reação do ABTS com persulfato de potássio. O radical gerado (ABTS<sup>•+</sup>) apresenta 3 picos de absorção, sendo o maior em 734nm, comprimento de onda utilizado nos ensaios (Gráfico 15). Na presença de *scavengers* deste radical, a intensidade da absorbância em 734nm diminui e a diferença da absorbância na ausência e na presença das amostras nos fornece a porcentagem de inibição a ser relacionada nos gráficos dose-resposta apresentados.

O radical ABTS<sup>•+</sup>, segundo Pellegrini et al. (1999) é usado na avaliação da habilidade *scavenger* de radicais de diferentes compostos fenólicos. Pellegrini et al. (1999) avaliaram a ação do trolox sobre este radical e observaram um valor de IC<sub>50</sub> de cerca de 1,7µg/mL enquanto em nosso trabalho determinou-se este valor, nas condições de nossos ensaios, como sendo 0,7µg/mL. Estes mesmos autores ainda avaliaram o potencial do licopeno, do β-caroteno e da fração lipofílica do extrato do tomate como *scavengers* de

ABTS<sup>•+</sup>. Outros autores avaliaram diferentes amostras frente ao ABTS<sup>•+</sup>, como extrato do orégano (CHUN et al., 2005) e o extrato da leguminosa *Uraria crinita* (YEN et al., 2001).

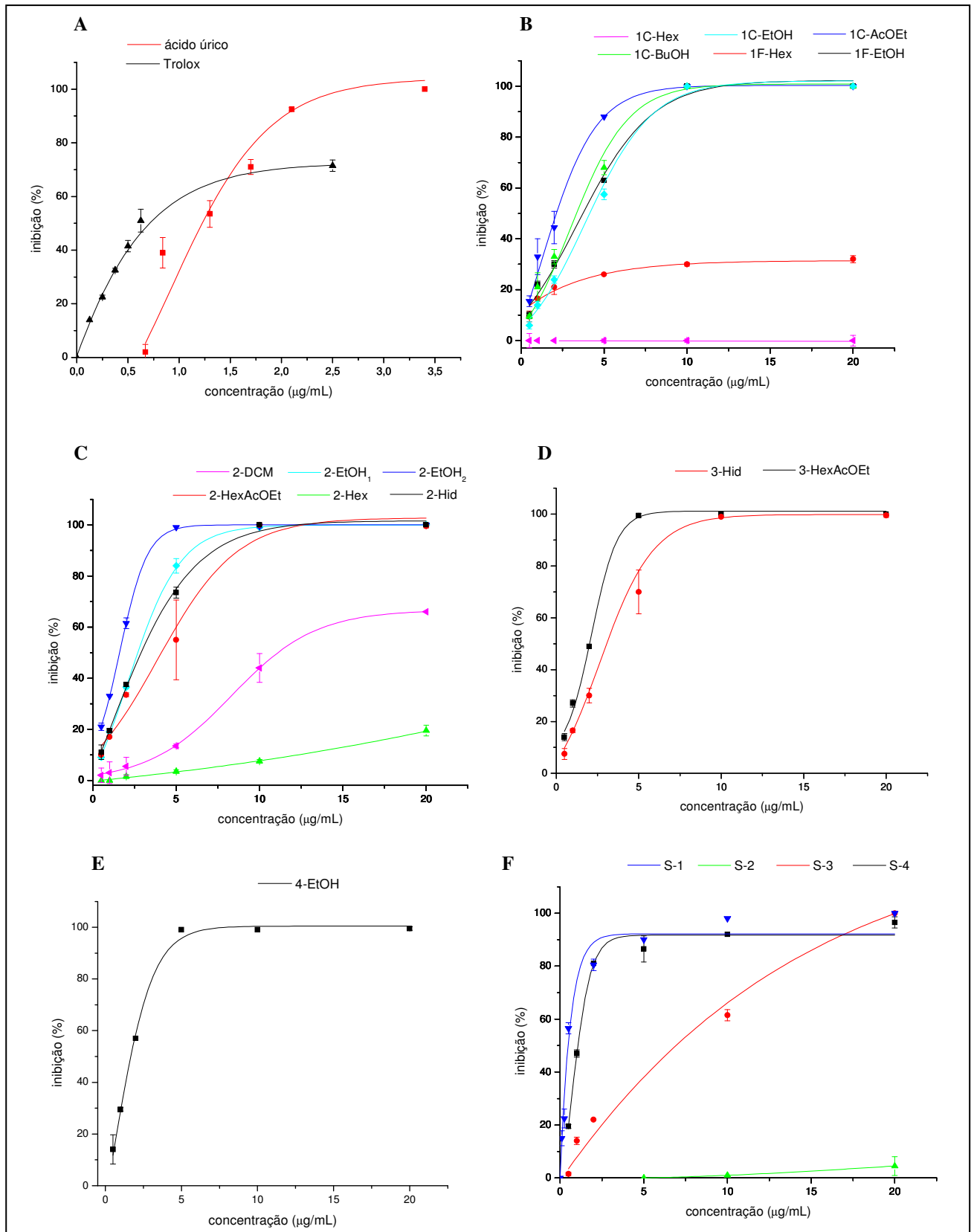


**Gráfico 15:** Espectro de absorção do ABTS<sup>•+</sup>

O trolox apresentou menor valor de IC<sub>50</sub>, o que indicaria maior eficiência do que o ácido úrico. Entretanto, o patamar de inibição alcançado pelo trolox foi inferior ao do ácido úrico indicando ter este maior potencial de ação contra o radical (Gráfico 16A). As substâncias isoladas apresentaram a seguinte ordem de eficiência: S-1 > trolox > ácido úrico = S-4 > S-3. A amostra S-2 não inibiu.

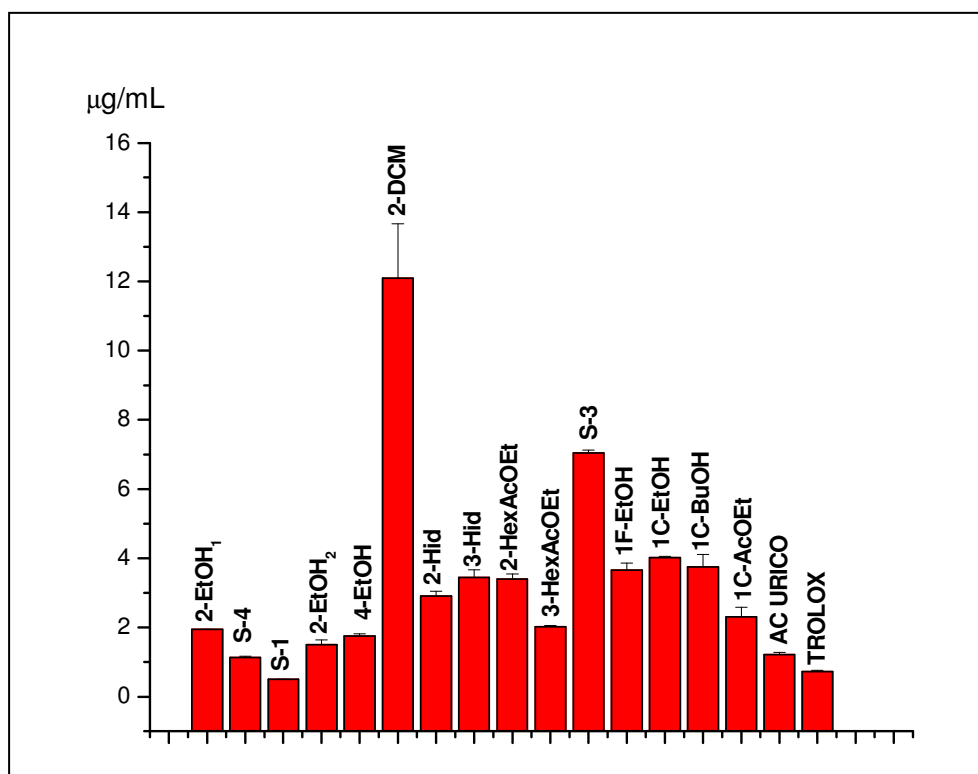
Os extratos etanólico de caule e folha de *P. nitens* apresentaram ação semelhante contra o ABTS<sup>•+</sup>, sendo amostras mais eficientes a fração acetato e butanólica do caule. As frações hexânica de caule e folha foram as menos eficientes (Gráfico 16B).





**Gráfico 16:** Ação scavenger sobre o  $ABTS^{\bullet+}$ . **A** - padrões ; **B** - *P. nitens*; **C** - *M. ilicifolia*; **D** - *M. aquifolium*; **E** - *S. campestris*; **F** - substâncias isoladas de Piperaceae.

Dentre as amostras da *M. ilicifolia* foram mais eficientes os extratos brutos etanólicos, sendo melhor aquele obtido por ultrassom, seguidos da fração hidroalcoólica. Foram menos eficientes a fração hexânica e o extrato diclorometânico (Gráfico 16C). O extrato bruto etanólico da *S. campestris* apresentou mesma eficiência do extrato bruto etanólico da *M. ilicifolia* obtido por ultrassom. A fração 3-HexAcOEt, da *M. aquifolium*, foi mais eficiente do que sua respectiva fração hidroalcoólica (Gráfico 16D).



**Gráfico 17:** Valores de IC<sub>50</sub> na supressão do radical ABTS<sup>•+</sup>.

Na avaliação da atividade antioxidante pela supressão do radical ABTS<sup>•+</sup>, a amostra mais eficiente como *scavenger* deste radical foi a S-1 com IC<sub>50</sub> de 0,5µg/mL sendo o Trolox a segunda amostra com menor IC<sub>50</sub> (0,7µg/mL); nenhuma dentre as demais amostras teve IC<sub>50</sub> menor que o do Ácido Úrico, sendo este igual ao da S-4 e 2-EtOH<sub>2</sub> (gráfico 17). Não agiram sobre o ABTS<sup>•+</sup>: S-2 e 1C-Hex e não tiveram IC<sub>50</sub> determinado nas condições testadas: 2-Hex e 1F-Hex.

## 4.2 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

Neste caso, buscou-se avaliar a possível interferência das amostras sobre a ação da: **i)** hemina/heme (grupamento prostético de peroxidases), **ii)** HRP (peroxidase modelo extraída de vegetal) e **iii)** MPO presente no EBNR.

No ensaio quimiluminescente, procurou-se avaliar a área dos gráficos obtidos pela medição da intensidade de luz (mV) em função do tempo de reação. Neste tipo de metodologia com luminol, onde diferentes radicais são gerados (KHALIL, 2002), a interferência da ação antioxidante/anti-radical das amostras já era esperada. Isto foi constatado pelo fato de todas as amostras em todas as concentrações avaliadas terem diminuído o valor da integral da curva em comparação à obtida na ausência das amostras. Observou-se que todas as amostras inibiram as reações quimiluminescentes (hemina/luminol) em todas as doses testadas (Tabela I). Entretanto, quando o substrato revelador foi o guaiacol, apenas as amostras 4-EtOH, 2-Hid, 3-HexAcOEt, S-3, 1C-EtOH e 1C-BuOH promoveram inibição e somente na maior dose testada, como pode ser visto na tabela II.

Devido à interferência do potencial antioxidante das amostras sobre o ensaio quimiluminescente, optou-se por não se realizar a análise da cinética da HRP ou da MPO por este método. Os estudos continuaram através de espectrofotometria UV/Vis; analisando-se neste caso a velocidade inicial da reação enzimática.

**Tabela I:** Oxidação do luminol(0,1mM) pela hemina(80nM) /H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0,05mM) na ausência e na presença de amostras em diferentes concentrações; integrais das curvas – média±DP (p<0,05) para 1min de reação; v<sub>F</sub>=1mL, 25<sup>0</sup>C, Tampão fosfato de potássio 50mM, pH7,4.

AMOSTRAS	integrais (média±DP)		
	10µ/mL	1µg/mL	0,1µg/mL
<i>2-DCM</i>	245±33	29903±2635	48455±3939
<i>2-EtOH<sub>1</sub></i>	52±1	2088±270	19979±178
<i>2-EtOH<sub>2</sub></i>	38±1	2090±316	14904±1253
<i>2-Hid</i>	40±4	1106±40	18755±4347
<i>2-HexAcOEt</i>	51±8	1989±291	20006±2829
<i>2-Hex</i>	209±28	3983±117	33658±2662
<i>3-Hid</i>	64±7	2085±624	18590±270
<i>3-HexAcOEt</i>	35±1	368±11	3880±164
<i>4-EtOH</i>	38±0	3280±196	33195±1048
<i>S-4</i>	42±9	338±54	35287±6499
<i>S-3</i>	37±0	1261±40	15452±4227
<i>S-1</i>	215±29	2859±873	13224±4375
<i>S-2</i>	14148±5194	23551±172	41437±2839
<i>1F-EtOH</i>	90±27	1871±462	29783±824
<i>1C-Hex</i>	1330±267	18844±3040	35352±4173
<i>1C-EtOH</i>	44±5	2465±269	6541±320
<i>1C-BuOH</i>	45±1	3057±212	27969±892
<i>1C-AcOEt</i>	69±5	1863±277	19647±1684
<i>1F-Hex</i>	1545±79	2155±157	16480±2149
<b>SEM AMOSTRA</b>	51711±5351		

**Tabela II:** Oxidação do guaiacol(5mM) pela hemina(3 $\mu$ M) /H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(2,5mM) na ausência e na presença de amostras em diferentes concentrações; valores de  $v_0$  – média $\pm$ DP ( $p < 0,05$ );  $v_F = 2$  mL, 25<sup>0</sup>C, Tampão fosfato de potássio 50mM, pH7,4.

AMOSTRAS	$v_0$ ( $1.10^{-4} s^{-1}$ )		
	10 $\mu$ /mL	1 $\mu$ g/mL	0,1 $\mu$ g/mL
<i>2-DCM</i>	57 $\pm$ 7	58 $\pm$ 5	55 $\pm$ 0
<i>2-EtOH<sub>1</sub></i>	57 $\pm$ 5	56 $\pm$ 2	55 $\pm$ 0
<i>2-EtOH<sub>2</sub></i>	53 $\pm$ 4	53 $\pm$ 8	55 $\pm$ 0
<i>2-Hid</i>	<b>39<math>\pm</math>4</b>	55 $\pm$ 6	52 $\pm$ 4
<i>2-HexAcOEt</i>	55 $\pm$ 2	56 $\pm$ 7	55 $\pm$ 4
<i>2-Hex</i>	57 $\pm$ 4	49 $\pm$ 2	53 $\pm$ 4
<i>3-Hid</i>	53 $\pm$ 2	54 $\pm$ 5	55 $\pm$ 1
<i>3-HexAcOEt</i>	<b>12<math>\pm</math>0</b>	57 $\pm$ 4	57 $\pm$ 4
<i>4-EtOH</i>	<b>23<math>\pm</math>2</b>	56 $\pm$ 7	51 $\pm$ 1
<i>S-4</i>	54 $\pm$ 11	52 $\pm$ 5	54 $\pm$ 6
<i>S-3</i>	<b>1<math>\pm</math>1</b>	59 $\pm$ 4	57 $\pm$ 1
<i>S-1</i>	54 $\pm$ 6	56 $\pm$ 5	58 $\pm$ 1
<i>S-2</i>	60 $\pm$ 1	57 $\pm$ 6	55 $\pm$ 1
<i>1F-EtOH</i>	56 $\pm$ 9	54 $\pm$ 3	49 $\pm$ 2
<i>1C-Hex</i>	54 $\pm$ 1	58 $\pm$ 1	56 $\pm$ 6
<i>1C-EtOH</i>	<b>35<math>\pm</math>0</b>	54 $\pm$ 5	55 $\pm$ 7
<i>1C-BuOH</i>	<b>30<math>\pm</math>4</b>	54 $\pm$ 7	54 $\pm$ 1
<i>1C-AcOEt</i>	48 $\pm$ 0	51 $\pm$ 4	53 $\pm$ 4
<i>1F-Hex</i>	55 $\pm$ 0	57 $\pm$ 4	57 $\pm$ 2
<b>SEM AMOSTRA</b>	54 $\pm$ 7		

No ensaio espectrofotométrico com a HRP, uma peroxidase modelo muito utilizada nos estudos com peroxidases, também foram testadas 3 concentrações das amostras de plantas: 10 $\mu$ g/mL, 1 $\mu$ g/mL e 0,1 $\mu$ g/mL. Como pode-se observar na tabela III, as amostras que inibiram a cinética de oxidação do guaiacol pela HRP foram 2-EtOH<sub>1</sub>, S-4, 2-EtOH<sub>2</sub>, 4-EtOH, 2-Hid, 2-HexAcOEt, S-3 e 1C-AcOEt

**Tabela III:** Oxidação do guaiacol(2mM)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0,1mM) pela HRP(7nM) na ausência e na presença de amostras em diferentes concentrações; em destaque estão valores de  $v_0$  em que houve inibição ( $p < 0,05$ );  $v_F = 2\text{mL}$ ,  $37^\circ\text{C}$ , Tampão PBS-D.

AMOSTRAS	$v_0$ ( $1.10^{-4} \text{ s}^{-1}$ )		
	10 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	0,1 $\mu\text{g/mL}$
<i>2-DCM</i>	145 $\pm$ 7	145 $\pm$ 20	135 $\pm$ 7
<i>2-EtOH<sub>1</sub></i>	<b>95<math>\pm</math>7</b>	145 $\pm$ 7	143 $\pm$ 4
<i>2-EtOH<sub>2</sub></i>	<b>105<math>\pm</math>7</b>	135 $\pm$ 7	140 $\pm$ 0
<i>2-Hid</i>	<b>115<math>\pm</math>7</b>	140 $\pm$ 10	130 $\pm$ 10
<i>2-HexAcOEt</i>	<b>100<math>\pm</math>10</b>	145 $\pm$ 7	145 $\pm$ 7
<i>2-Hex</i>	140 $\pm$ 0	150 $\pm$ 10	130 $\pm$ 10
<i>3-Hid</i>	135 $\pm$ 20	140 $\pm$ 0	135 $\pm$ 7
<i>3-HexAcOEt</i>	130 $\pm$ 10	155 $\pm$ 7	155 $\pm$ 7
<i>4-EtOH</i>	<b>70<math>\pm</math>10</b>	145 $\pm$ 7	135 $\pm$ 7
<i>S-4</i>	<b>120<math>\pm</math>0</b>	135 $\pm$ 7	135 $\pm$ 20
<i>S-3</i>	<b>95<math>\pm</math>7</b>	145 $\pm$ 7	145 $\pm$ 7
<i>S-1</i>	135 $\pm$ 7	140 $\pm$ 10	140 $\pm$ 10
<i>S-2</i>	155 $\pm$ 7	140 $\pm$ 0	145 $\pm$ 7
<i>1F-EtOH</i>	130 $\pm$ 0	150 $\pm$ 0	155 $\pm$ 7
<i>1C-Hex</i>	155 $\pm$ 7	155 $\pm$ 7	145 $\pm$ 20
<i>1C-EtOH</i>	135 $\pm$ 7	145 $\pm$ 7	150 $\pm$ 0
<i>1C-BuOH</i>	130 $\pm$ 10	155 $\pm$ 7	145 $\pm$ 20
<i>1C-AcOEt</i>	<b>115<math>\pm</math>7</b>	145 $\pm$ 20	145 $\pm$ 7
<i>1F-Hex</i>	145 $\pm$ 7	140 $\pm$ 10	150 $\pm$ 0
<b>SEM AMOSTRA</b>	144 $\pm$ 10		

A inibição pelas amostras nos estudos cinéticos com Hemina (tabela II) e HRP (tabela III), na oxidação do guaiacol, restringiram-se à dose de 10 $\mu\text{g/mL}$ . Optou-se por testar a mesma dose sobre as cinéticas da mieloperoxidase frente a diferentes substratos

(guaiacol e TMB/Cl<sup>-</sup>). Nos estudos cinéticos da MPO (EBNR), as amostras 2-EtOH<sub>1</sub>, 2-EtOH<sub>2</sub>, 2-Hid, 2-HexAcOEt, 3-Hid, 3-HexAcOet, 4-EtOH, S-3, 1C-EtOH, 1C-BuOH promoveram redução de v<sub>0</sub> (e portanto inibiram) seja quando o substrato oxidado foi o guaiacol ou o TMB/Cl<sup>-</sup> (Tabela IV).

**Tabela IV:** Interferência das amostras (10µg/mL) na cinética da MPO(0,10U)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0,5mM) com guaiacol 100mM ou TMB 1,6mM; em destaque estão os valores diferentes do controle - p<0,05); 37<sup>0</sup>C, Vf=2mL; 1 minuto de reação.

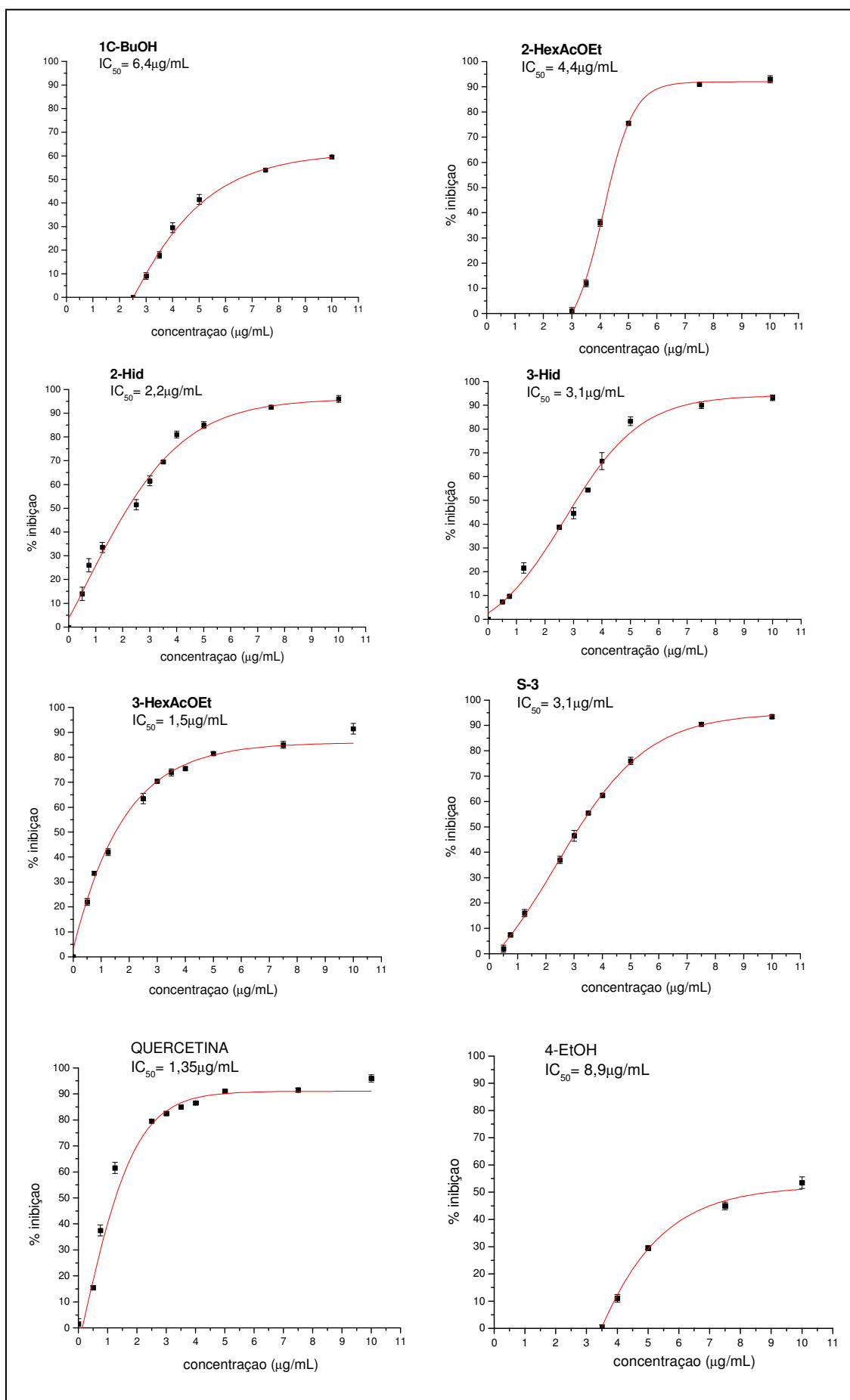
AMOSTRAS	v <sub>0</sub> (1.10 <sup>-4</sup> s <sup>-1</sup> )	
	guaiacol	TMB
<b>CONTROLE</b>	<b>40±4</b>	<b>30±2</b>
<i>2-DCM</i>	39±0,7	28±0,7
<i>2-EtOH<sub>1</sub></i>	<b>10±1</b>	<b>16±1</b>
<i>2-EtOH<sub>2</sub></i>	<b>5±0,7</b>	<b>9±0,7</b>
<i>2-Hid</i>	<b>8±0,2</b>	<b>11±1</b>
<i>2-HexAcOEt</i>	<b>10±0,7</b>	<b>18±2</b>
<i>2-Hex</i>	42±4	31±0,7
<i>3-Hid</i>	<b>24±0,7</b>	<b>16±0,4</b>
<i>3-HexAcOEt</i>	<b>21±1</b>	<b>21±0,7</b>
<i>4-EtOH</i>	<b>8±0,2</b>	<b>15±1</b>
<i>S-4</i>	34±4	27±3
<i>S-3</i>	<b>10±0,7</b>	<b>16±3</b>
<i>S-1</i>	35±4	30±3
<i>S-2</i>	40±5	31±1
<i>1F-EtOH</i>	30±3	26±2
<i>1C-Hex</i>	40±0	31±0
<i>1C-EtOH)</i>	<b>14±1</b>	<b>18±0,7</b>
<i>1C-BuOH</i>	<b>19±1</b>	<b>14±0,7</b>
<i>1C-AcOEt</i>	41±2	29±0,7
<i>1F-Hex</i>	40±2	30±2

Os resultados obtidos correspondem a um forte indício de que tais amostras sejam inibidores de MPO ou contenham substâncias com tal ação. Acredita-se que, no ensaio de oxidação do guaiacol por peroxidases, a interferência do potencial antioxidante das amostras seja baixa à medida que algumas amostras com grande potencial antioxidante, em outros sistemas estudados, não promoveram inibição das reações.

Através dos resultados obtidos e observando-se as etapas de obtenção dos extratos e suas partições selecionou-se as amostras 2-Hid, 2-HexAcOEt, 3-Hid, 3-HexAcOEt, 4-EtOH, S-3 e 1C-BuOH para a determinação do  $IC_{50}$  sobre a cinética de oxidação do guaiacol pela MPO (EBNR) utilizando-se como inibidor padrão a quercetina (Gráfico 18).

Observou-se que, dentre as amostras que tiveram  $IC_{50}$  calculado para a cinética de oxidação do guaiacol pela MPO do EBNR, a quercetina apresentou baixo valor o que indica elevado potencial de inibição da enzima. As amostras avaliadas também apresentaram valores de  $IC_{50}$  baixos e apesar de não alcançarem o potencial de inibição da quercetina, mostram-se excelentes fontes de inibidores do sistema mieloperoxidase. Tais amostras, portanto merecem ser posteriormente estudadas a fim de se caracterizar quais compostos de suas composições apresentam a propriedade de atuar como inibidores da MPO, bem como definir o tipo de inibição que promovem sobre tal enzima



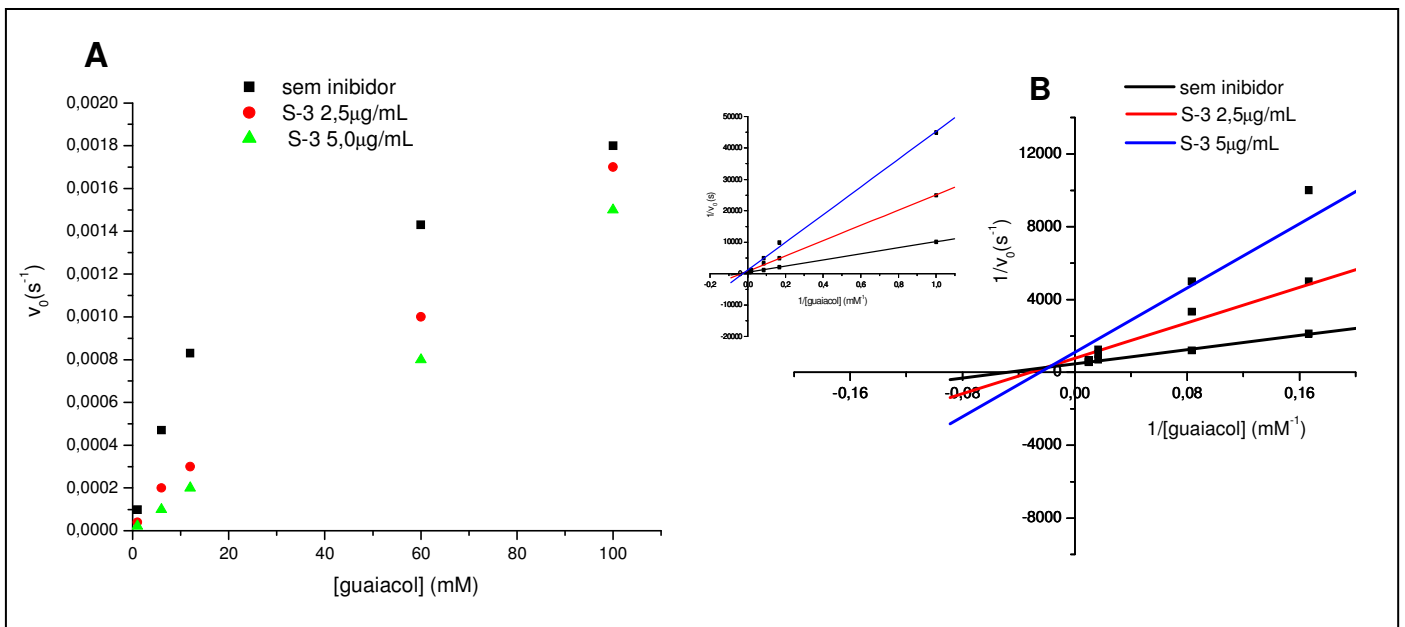


**Gráfico 18:** Curvas dose-resposta e valores de IC<sub>50</sub> das amostras selecionadas no sistema EBNR(MPO 100mU)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0,2mM)/guaiacol(20mM); tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,0; 25°C.

A amostra S-3, por ser a única substância isolada dentre as amostras selecionadas, foi estudada visando a construção do gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk, a determinação da constante de Michaelis-Menten ( $k_M$ ) e a caracterização do tipo de inibição promovida no sistema enzimático MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/guaiacol utilizando-se a quercetina como inibidor padrão da MPO (gráficos 19 e 20; tabelas V e VI).

**Tabela V:** Caracterização da inibição da MPO pela S-3 a partir do gráfico 19 (valores de  $k_M$  e  $v_{max}$ )

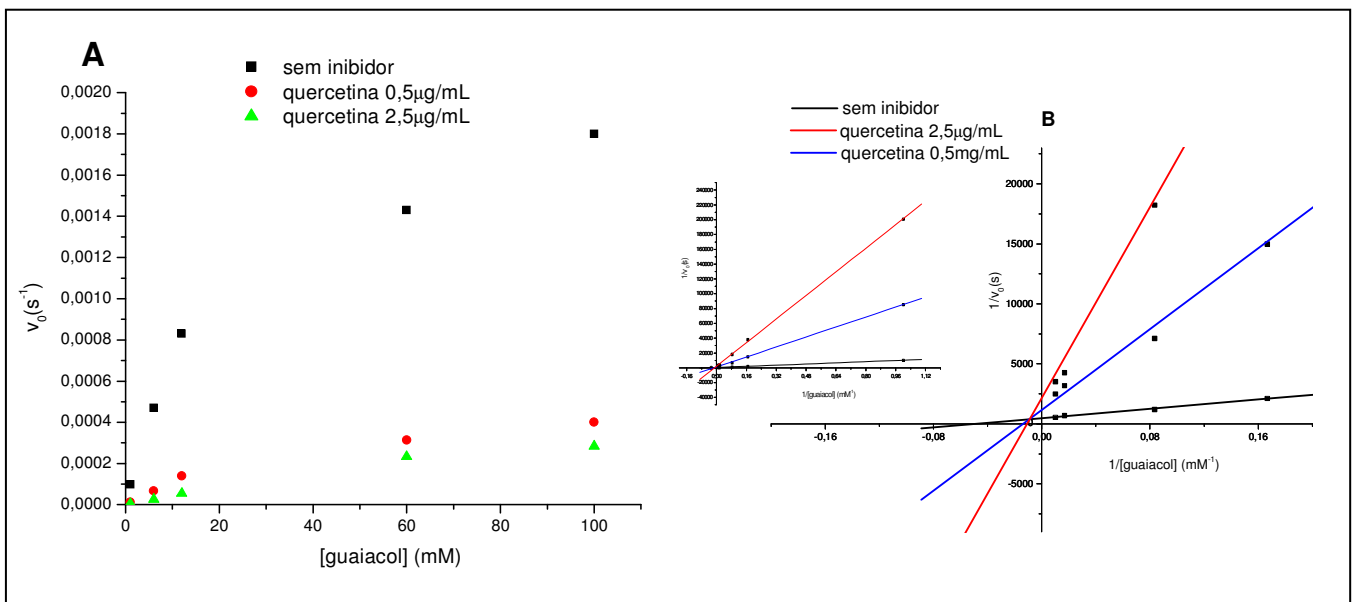
ENSAIO	$k_M$ (mM)	$v_{MAX}$	Tipo de inibição provável
sem inibidor	20,5	0,00211	
S-3 2,5 $\mu$ g/mL	30,9	0,00127	Mista
S-3 5 $\mu$ g/mL	39,7	0,00090	



**Gráfico 19:** A-Gráfico de Michaelis-Menten ( $v_0 \times [\text{guaiacol}]$ ), na presença e na ausência de S-3); B-Duplo-recíproco ( $1/v_0 \times 1/[\text{guaiacol}]$ ) de Lineweaver-Burk; MPO(EBNR) 75mU, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,2mM, para diferentes concentrações de guaiacol na ausência ou na presença da S-3 (incerto: escala modificada de B); Tampão fosfato 50mM, pH 7,0, 25°C.

**Tabela VI:** Caracterização da inibição da MPO pela quercetina a partir do gráfico 20 (valores de  $k_M$  e  $v_{MAX}$ )

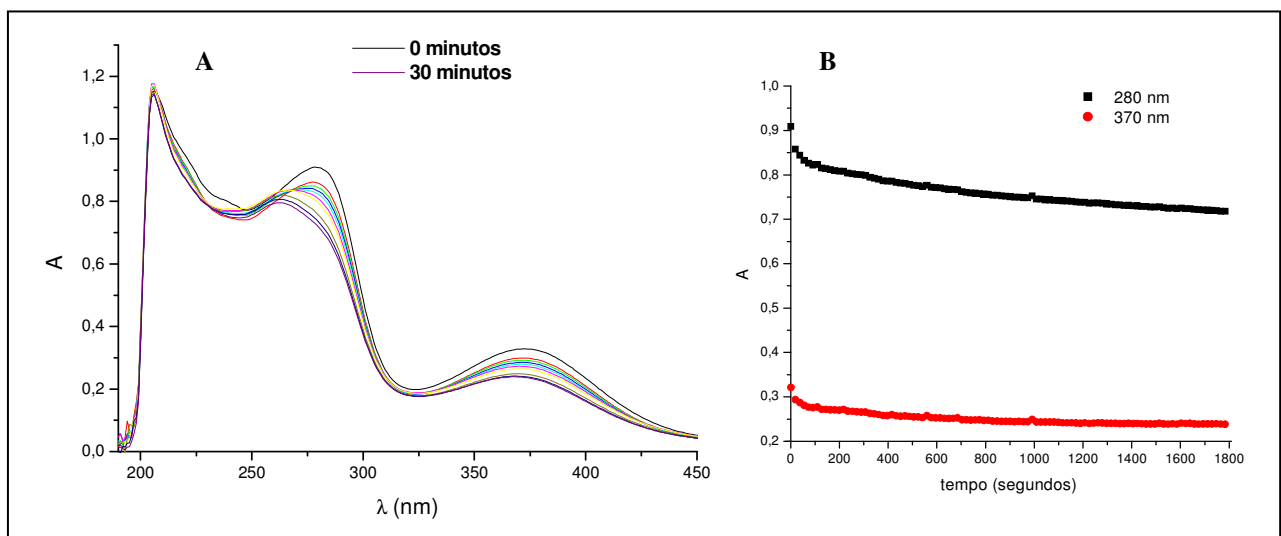
ENSAIO	$k_M$ (mM)	$v_{MAX}$	Tipo de inibição
sem inibidor	20,5	0,00211	Mista
quercetina 0,5 $\mu$ g/mL	72,6	0,00086	
quercetina 2,5 $\mu$ g/mL	93,0	0,00047	



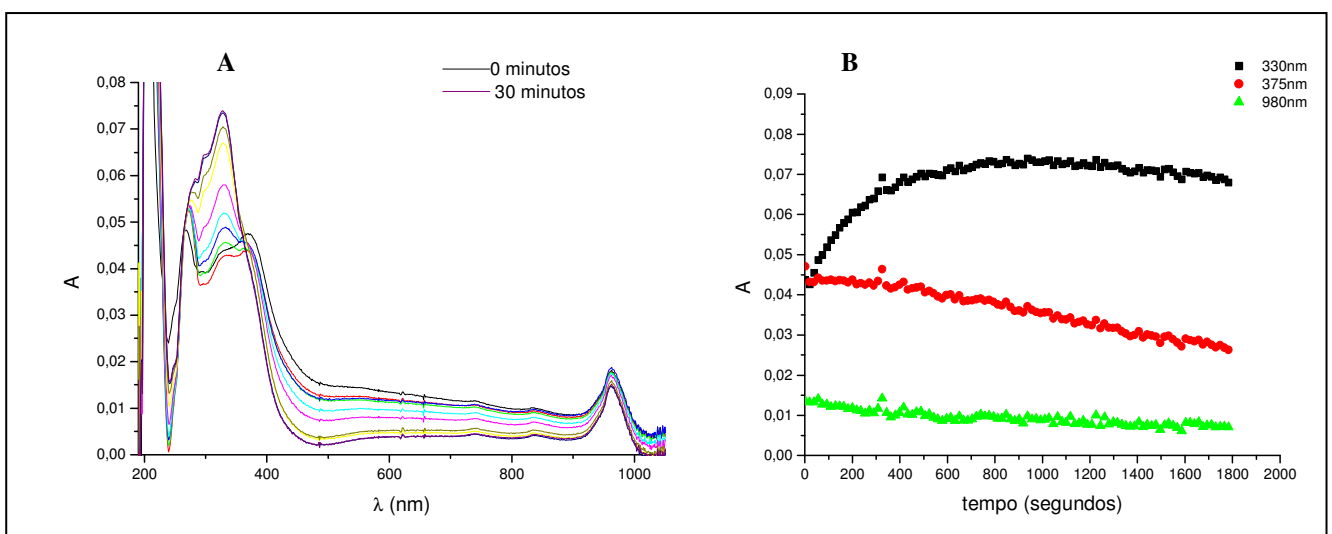
**Gráfico 20:** A-Gráfico de Michaelis-Menten ( $v_0 \times [\text{guaiacol}]$ ), na presença e na ausência de quercetina; B-Duplo-recíproco ( $1/v_0 \times 1/[\text{guaiacol}]$ ) de Lineweaver-Burk; MPO(EBNR) 75mU,  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,2mM, para diferentes concentrações de guaiacol na ausência ou na presença de quercetina (incerto: escala modificada de B); Tampão fosfato 50mM, pH 7,0, 25°C.

Observou-se, a partir dos dados obtidos dos duplo-recíprocos (gráficos 19 e 20), apresentados nas tabelas V e VI, que a inibição apresentada pela quercetina e pela S-3 é do tipo mista, diferentemente do que Pincemail et al. (1988) haviam observado para a quercetina, que segundo tais autores seria inibidor competitivo.

A fim de se observar se quercetina e S-3 sofreriam transformação pelo sistema MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, estudou-se a ação da MPO em presença de peróxido de hidrogênio sobre as amostras. Os resultados encontram-se nos gráficos 21 e 22, onde se observa uma pequena alteração dos espectros de absorção e a variação da absorbância em função do tempo (em 30 minutos de reação) nos comprimentos de onda dos respectivos picos de absorção destes espectros.



**Gráfico 21:** A - Alteração espectral da S-3 (25µg/mL) pelo sistema EBNR(MPO 250mU)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0,7mM), tampão fosfato 50mM, pH7,0; 25°C; B - Variação da absorbância (280nm e 370nm) em função do tempo (segundos).



**Gráfico 22:** A - Alteração espectral da quercetina (25µg/mL) pelo sistema EBNR(MPO 250mU)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0,7mM), tampão fosfato 50mM, pH7,0; 25°C; B - Variação da absorbância (330nm, 375nm e 980nm) em função do tempo (segundos).

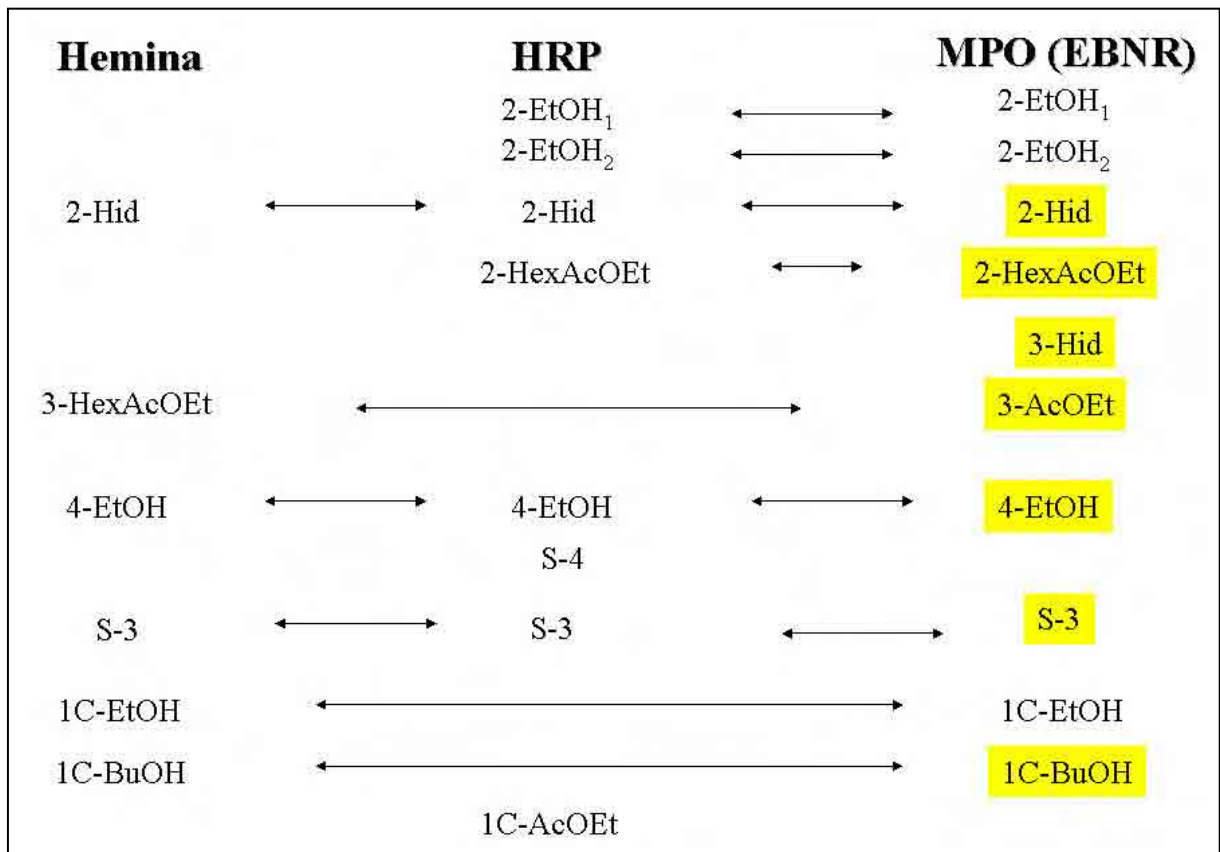
A inibição do tipo mista é observada para enzimas que catalisam reações com dois ou mais substratos, tais como a mieloperoxidase. Se um inibidor se liga ao sítio ativo do substrato cuja concentração está sendo variada (como é o caso do guaiacol em nossos ensaios), ele pode atuar como inibidor competitivo daquele substrato. Caso o inibidor esteja se ligando ao sítio de ligação do substrato cuja concentração é mantida constante, ele pode atuar como inibidor misto ou incompetitivo do substrato de concentração variável. Sendo assim, pelos resultados apresentados, nos quais a quercetina e a S-3 atuam como inibidores mistos em um sistema em que varia-se a concentração de guaiacol, é provável que a interação destas duas amostras avaliadas ocorra em sítios diferentes do sítio ativo de oxidação do guaiacol.

### **Resumo dos resultados**

- ***Pterogyne nitens***: Observou-se que as frações etanólicas do caule e das folhas de *P. nitens* foram mais eficientes contra as espécies avaliadas do que as correspondentes frações hexânicas. A fração acetato do caule mostrou-se mais eficiente contra DPPH,  $O_2^{\bullet -}$  e  $ABTS^{\bullet +}$ , em comparação com a fração n-butanol que mostrou-se mais eficiente contra o HOCl. Foram semelhantes contra  $NO^{\bullet}$ .
- ***Maytenus ilicifolia***: A extração com diclorometano gerou um extrato pouco eficiente contra as espécies avaliadas, quando comparada às frações etanólicas. Por sua vez, a extração com etanol por ultrassom gerou um extrato ligeiramente mais eficiente contra as espécies do que a extração por maceração. A fração hexânica

mostrou-se pouco eficiente contra as espécies avaliadas; enquanto a fase hidroalcoólica gerou, após extração com acetato de etila, as frações hidroalcoólica e hexano-acetato de etila, ambas eficientes, mas com superioridade da primeira.

- ***Maytenus aquifolium***: Em geral, a fração hexano-acetato de etila foi mais eficiente do que a fração hidroalcoólica.
- ***Salacia campestris***: Em geral, o extrato bruto da *S. campestris* foi menos eficiente do que o extrato bruto 2-EtOH<sub>2</sub> da *M. ilicifolia*.
- Dentre as substâncias isoladas, avaliando-se o conjunto dos ensaios antioxidantes, observou-se que a S-1 apresentou o maior potencial, seguida da S-3 e da S-4. A S-2 apresentou-se ineficiente contra a maioria das espécies avaliadas.
- eficiência das amostras na inibição da MPO segundo os valores de IC<sub>50</sub> encontrados: **Quercetina = 3-HexAcOEt > 2-Hid > 3-Hid = S-3 > 2-HexAcOEt > 1C-BuOH > 4-EtOH.**
- S-3 e quercetina foram caracterizadas como inibidores do tipo misto, sendo a quercetina um inibidor mais potente de MPO do que a S-3.



**Figura 9:** Diagrama de identificação de amostras que apresentaram ação inibitória sobre os diferentes sistemas enzimáticos (hemina, HRP e MPO) estudados por espectrofotometria. Em amarelo estão as amostras selecionadas para determinação de valores de IC<sub>50</sub> sobre o sistema de oxidação do guaiacol pela MPO do EBNR.

## 5 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, avaliou-se *in vitro* a possibilidade de ação direta das amostras sobre diferentes espécies reativas modelo e geradas em nosso organismo. Além disso, procurou-se avaliar a inibição da mieloperoxidase, enzima responsável por gerar ácido hipocloroso, uma espécie envolvida em diferentes patologias.

Pelos resultados obtidos, verificou-se o grande potencial das plantas estudadas como fonte de compostos com ação antioxidante e anti-radical. Obviamente, estudos posteriores em sistemas *ex vivo* (com células) e *in vivo* merecem ser realizados e, este estudo inicial, aqui realizado, abre diferentes possibilidades para tal pesquisa.

Além disso, identificou-se a existência de possíveis inibidores da MPO nos diferentes vegetais estudados e ainda caracterizamos o tipo de inibição promovida por parte de uma das substâncias isoladas, a S-3 e do padrão inibidor, a quercetina, como sendo do tipo mista.

## **6 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.

ALDRIDGE, R. E.; CHAN, T.; VAN DALEN, C. J.; SENTHILMOHAN, R.; WINN, M.; VENGE, P.; TOWN, G. I.; KETLLE, A. J. Eosinophil peroxidase produces hypobromous acid in the airways of stable asthmatics. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, p. 847-856, 2002.

ALLEN, R. C.; LOOSE, L. D. Phagocytic activation of luminol-dependent chemiluminescence in rabbit alveolar and peritoneal macrophages. **Biochemical Biophysical Research Communication**, v. 69, p. 245-253, 1976.

ALLEN, R. C.; DALE, D. C.; TAYLOR Jr., F. B. Blood phagocyte luminescence: gauging systemic immune activation. **Methods in Enzymology**, v. 305, p. 591-609; 2000.

ANDERSON, M. M.; REQUENA, J. R.; CROWLEY, J. R.; THORPE, S. R.; HEINECKE, J. W. The myeloperoxidase system of human phagocytes generates N<sup>ε</sup>-carboxymethyllysine on proteins: a mechanism for producing advanced glycation end products at sites of inflammation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 104, p. 103-113, 1999.

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.

ASSELBERGS, F. W.; REYNOLDS, W. F.; COHEN-TERVAERT, J. W.; JESSURUN, G. A. J.; TIO, R. A. Myeloperoxidase polymorphism related to cardiovascular events in coronary artery disease. **The American Journal of Medicine**, v. 116, p. 429-430, 2004.

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.

BABIOR, B. M.; COHEN, H. J. Measurement of neutrophil function: phagocytosis degranulation, the respiratory burst and bacterial killing. **Methods in hematology: Leucocyte function**. New York: Churchill Livingstone, 1981, v. 13.

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

BALDOQUI, D. C.; KATO, M. J.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M. A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 899-902, 1999.

BALDUS, S.; HEESCHEN, C.; MEINERTZ, T.; ZEIHNER, A. M.; EISERICH, J. P.; MUNZEL, T.; SIMOONS, M. L.; HAMM, C. W. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. **Circulation**, v. 108, p.1440-1445, 2003.

BANERJEE, A.; DASGUPTA, N.; DE, B. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. **Food Chemistry**, v. 90, p. 727-733, 2005.

BAST, A.; HAENEN G. R. M. M.; DOELMAN, C. J. A. Oxidants and antioxidants: state of the art. **American Journal of Medicine**, v. 91, p. 2-13, 1991.

BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 555-557, 2004.

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.

BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A. J.; ARAÚJO, A. R.; SILVA, D. H.; LOPES, M. N. Search for antifungal and anticancer compounds from native plant species of Cerrado and Atlantic Forest. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 71, p. 181-187, 1999.

BOVERIS, A.; CADENAS, E.; REITER, R.; CHANCE, B.; JAMIEESON, D. The relation of free radical production to hyperoxia. **Annual Review of Physiology**, v. 48, p.703-719, 1986.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

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 Biophysical Research Communication**, v. 126, p. 482-488, 1985.

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 Farmarmacêuticas**, 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.

CARR, A. C.; MYZAK, M. C.; STOCKER, R.; McCALL, M. R.; FREI, B. Myeloperoxidase binds to low-density lipoprotein: potential implications for atherosclerosis. **FEBS Letters**, v. 487, p. 176-180, 2000.

CARVALHO, P. R. F.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Antioxidant quinonemthide triterpenes from *Salacia campestris*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 2, p. 367-372, 2005.

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.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Ministério da Agricultura, Ed. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro, v. 6, p. 134-135, 1984.

CRYSTAL, R. G. Oxidants and respiratory tract epithelial injury pathogenesis and strategies for therapeutic intervention. **American Journal of Medicine**, v. 91; p. 39S-44S, 1991.

CUI, Y.; KIM, D. S. ;PARK, K. C. Antioxidant effect of *Inonotus obliquus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 79-85, 2005.

DANELUTTE, A. P.; LAGO, J. H. G.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Antifungal flavones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium* Kunth. **Phytochemistry**, v. 64, p. 555-559, 2003.

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.

DESSER, R. K.; HIMMELHOCH, S. R.; EVANS, W. H.; JANUSKA, M.; MAGE, M.; SHELTON, E. Guinea pig neutrophil and eosinophil peroxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 148, p. 452-465, 1972.

DODEIGNE, C.; THUMUS, L.; LEJEUNE, R. Chemiluminescence as diagnostic tool. A Review. **Talanta**, v. 51, p. 415-439, 2000.

DUARTE, M. R.; DEBUR, M. C. Stem and leaf morphoanatomy of *Maytenus ilicifolia*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 41-49, 2005.

EATON, J. W. Defenses against hypochlorous acid: parrying the neutrophil's rapier thrust. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 121, p. 197-198, 1993.

FERNADES, E.; COSTA, D.; TOSTE, S. A.; LIMA, J. L. F. C.; REIS, S. In vitro scavenging activity for reactive oxygen and nitrogen species by nonsteroidal anti-inflammatory indole, pyrrole, and oxazole derivative drugs. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, p. 1895-1905, 2004.

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, p. 61-68, 1997.

FLOYD, R. A. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. **The FASEB Journal**, v. 4, p. 2587-2597, 1990.

FONSECA, L. M. **Efeito da nicotina nas Funções de Leucócitos Polimorfonucleares Neutrófilos *in vitro***. 1991. 127f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1991.

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

GORINSTEIN, S.; MARTIN-BELLOSA, O.; KATRICH, E.; LOJEK, A.; CIZ, M. GLIGELMO-MIGUEL, N.; HARUENKIT, R.; PARK, Y. S.; JUNG, S. T.; TRAKHTENBERG, S. Comparison of the main biochemical compounds and the antioxidant activity of some Spanish olive oils as determined by four different radical scavenging tests. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 14, p. 154-159, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press, Oxford, 1989. In: LAPENNA, D. and CUCCURULLO, F. Hypochlorous acid and its pharmacological antagonism: an update picture. **General Pharmacology**, v.27, p. 1145-1147, 1996.

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.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization methodology and mechanism. **Biochemical Pharmacology**, v. 49; p. 1341-1348; 1995.

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.

HARTEMINK, A. E. Biomass and nutrient accumulation of *Piper aduncum* and *Imperata cylindrica* fallows in the humid lowlands of Papua New Guinea. **Forest Ecology and Management**, v. 144, p. 19-32, 2004.

HATHERILL, J. R.; TILL, G. O.; WARD, P. A. Mechanisms of oxidant-induced changes in erythrocytes. **Agents-Actions**, v. 32, p. 351-358, 1991.

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.

HOOGLAND, H.; KUILENBURG, A.; RIEL, C. R.; MUIJSERS, A. O.; WEVER, R. Spectral properties of myeloperoxidase compounds II and III. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 16, p. 76-82, 1987.

JERLICH, A.; FRITZ, G.; KHARRAZI, H.; HAMMEL, M.; TSCHABUSCHNIG, S.; GLATTER, O.; SCHAUR, R. J. Comparison of HOCl traps with myeloperoxidase inhibitors in prevention of low density lipoprotein oxidation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1481, p. 109-118, 2000.

JORGE, R. M.; LEITE, J. P. V.; OLIVEIRA, A. B.; TAGLIATI, C. A. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activity of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 93-100, 2004.

KAKKAR, P.; DAS, B.; VISWANATHAN, P. N. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. **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**. 2000. 99f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

KOOTER, I. M.; MOGUILEVSKY, N.; WEVER, R. The sulphonium ion linkage in myeloperoxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 26794-26802, 1999.

LAPENNA, D.; CUCCUROLLO, F. Hypochlorous acid and its pharmacological antagonism: an update picture. **General 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.

MATHESON, N. R.; WONG, P. S.; TRAVIS, J. Isolation and properties of human neutrophil myeloperoxidase. **Biochemistry**, v. 20, p. 325-330, 1981.

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.

MAZZONI, M. C.; SCHMID-SCHONBERN, G. W. Mechanisms and consequences of cell activation in microcirculation. **Cardiovascular Research**, v. 32, p. 709-719, 1996.

MERENYI, G.; LIND, J.; ERIKSEN, T. E. Luminol chemiluminescence: chemistry, excitation, emitter. **Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence**, v. 5, p. 53-56, 1990.

MERTENS, A.; HOLVOET, P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. **The FASEB Journal**, v. 15, p. 2073-2084, 2001.

MERRILL, D. P. Purification of human myeloperoxidase by concanavalin A-Sepharose affinity chromatography. **Preparative Biochemistry**, v. 10, p. 133-150, 1980.

MIYASAWA, T.; FUJIMOTO, K.; SUZUKI, T.; YASUDA, K. Determination of phospholipid hydroperoxides using luminol chemiluminescence-high-performance liquid chromatography. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 324-329, 1994.

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 CO<sub>2</sub>. **Fitoterapia**, v. 75, p. 168-178, 2004.

NOVOTNY, V.; MILLER, S. E.; CIZEK, L.; LEPS, J.; JANDA, M.; MASSET, Y.; WEIBLEN, G. D.; DARROW, K. Colonising aliens: caterpillars (Lepidoptera) feeding on *Piper aduncum* and *P. umbellatum* in rainforests of Papua New Guinea. **Ecological Entomology**, v. 28, p. 704-716, 2003.

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**, v. 31, p. 373-375, 1976.

PAINO, I. M. M.; XIMENES, V. F.; FONSECA, L. M.; KANEGAE, M. P. P.; KHALIL, N.M.; BRUNETTI, I. L. Effect of therapeutic plasma concentrations of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the production of reactive oxygen species by activated rat neutrophils. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 543-551, 2005.

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.

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.

REPINE, J. E.; BAST, A.; LANKHORST, I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 156, p. 341-357, 1997.

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.

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.

SEGURA, R. M. Useful clinical biological markers in diagnosis of pleural effusion in children. **Paediatric Respiratory Reviews**, supplement 1, p. s205-s212, 2004.

SEOW, W. K.; THONG, Y. H.; NELSON, R. D.; MACFARLANE, G. D.; HERZBERG, M.C. Nicotine-induced release of elastase and eicosanoids by human neutrophils. **Inflammation**, v. 18, p. 119-127, 1994.

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.

SOARES, L. A. L.; OLIVEIRA, A. L.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R. Development and validation of a LC-method for determination of catechin and epicatechin in aqueous extractives from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 787-790, 2004.

SOUZA-FORMIGONI, M. L. O.; OLIVEIRA, M. G. M.; MONTEIRO, M. G.; SILVEIRA-FILHO, N. G.; BRAZ, S.; CARLINI, E. A.; Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 34, p. 21-27, 1991.

SUN, T.; HO, C. T. Antioxidant activities of buckwheat extracts. **Food Chemistry**, v. 90, p. 743-749, 2005.

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.

WADT, L. H. O.; EHRINGHAUS, C.; KAGEYAMA, P. Y. Genetic diversity of "Pimenta longa" genotypes (*Piper* spp., Piperaceae) of the Embrapa Acre germplasm collection. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 74-82, 2004.

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.

WOODS, A. A.; DAVIES, J. J. Fragmentation of extracellular matrix by hypochlorous acid. **The Biochemical Journal**, v. 376, p. 219-227, 2003.

XIAO, C.; KING, D. W.; PALMER, D. A.; WESOLOWSKI, D. J. Study of enhancement effects in the chemiluminescence method for Cr (II) in the ng l<sup>-1</sup> range. **Analytical Clinica Acta**, v. 415, p. 209-219, 2000.

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.

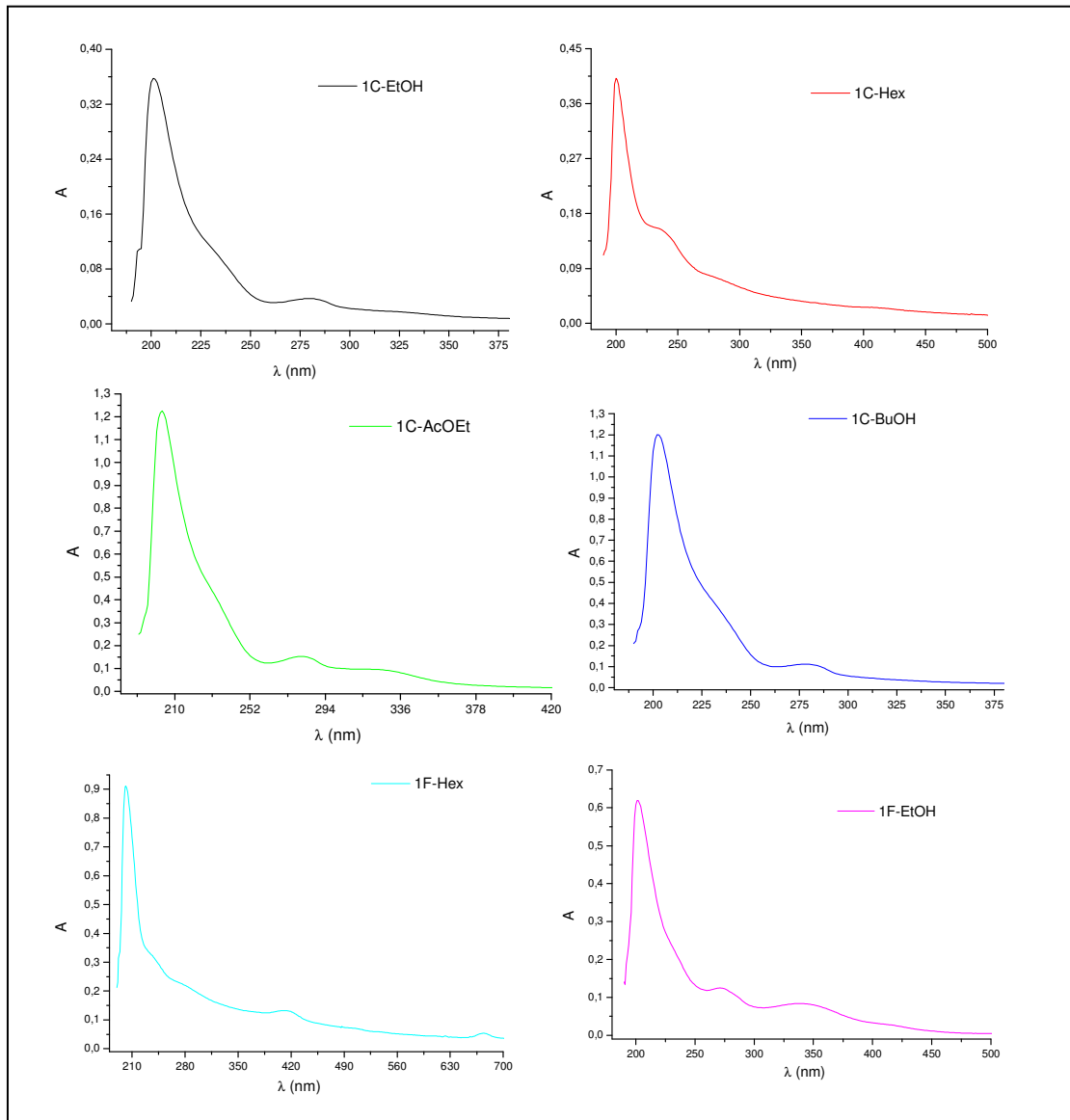
ZGLICZYNSKI, T. J. M.; STELMASZYNSKA, T.; DOMANSKA, J.; OSTROWISKI, W. Chloramines as intermediates of oxidation reaction of amino acids by myeloperoxidase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 235, p. 419-424, 1971.

ZUURBIER, K. W.; BAKKENIST, A. R.; FOKKENS, R. H.; NIBBERING, N. M.; WEVER, R.; MUIJSERS, A. O. Interaction of myeloperoxidase with diclofenac. Inhibition of the chlorinating activity of myeloperoxidase by diclofenac and oxidation of diclofenac to dihydroxyazobenzene by myeloperoxidase. **Biochemical Pharmacology**, v. 40, p. 1801-1808, 1990.

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.

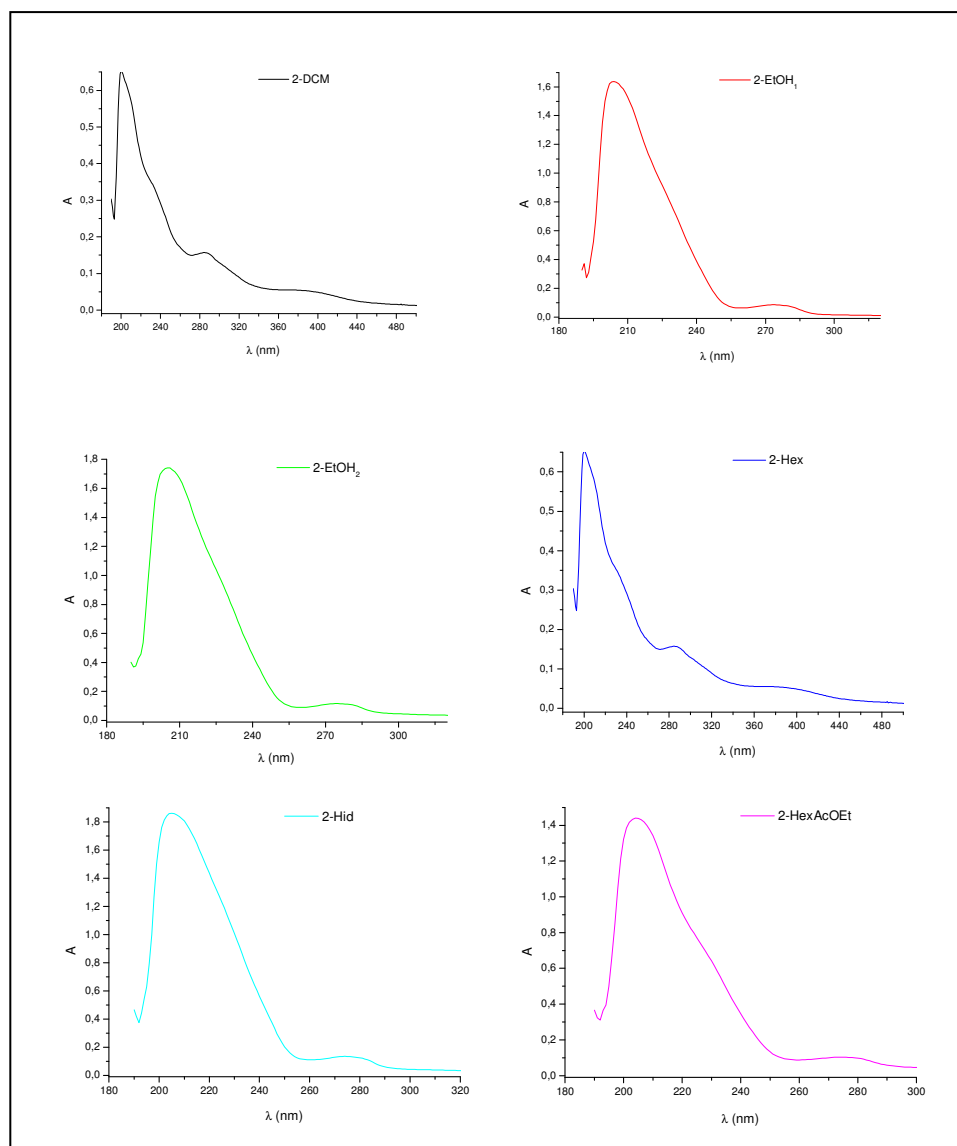
# **A N E X O S**

**ANEXO A**  
**Espectros de absorção das amostras avaliadas**

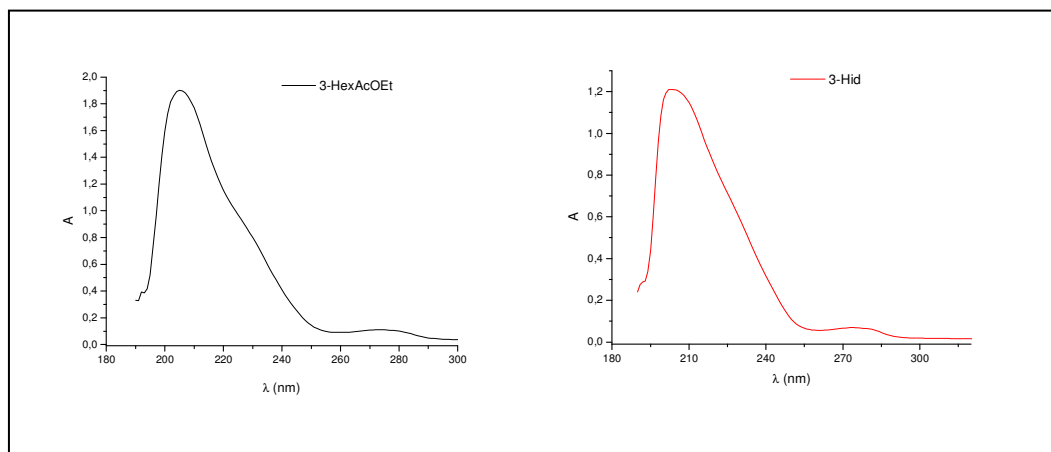


**Gráfico A1:** espectros de absorção das amostras (20µg/mL) de *P. nitens*.

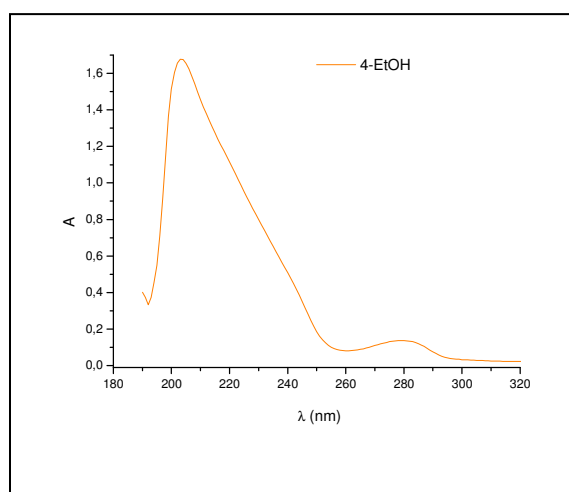




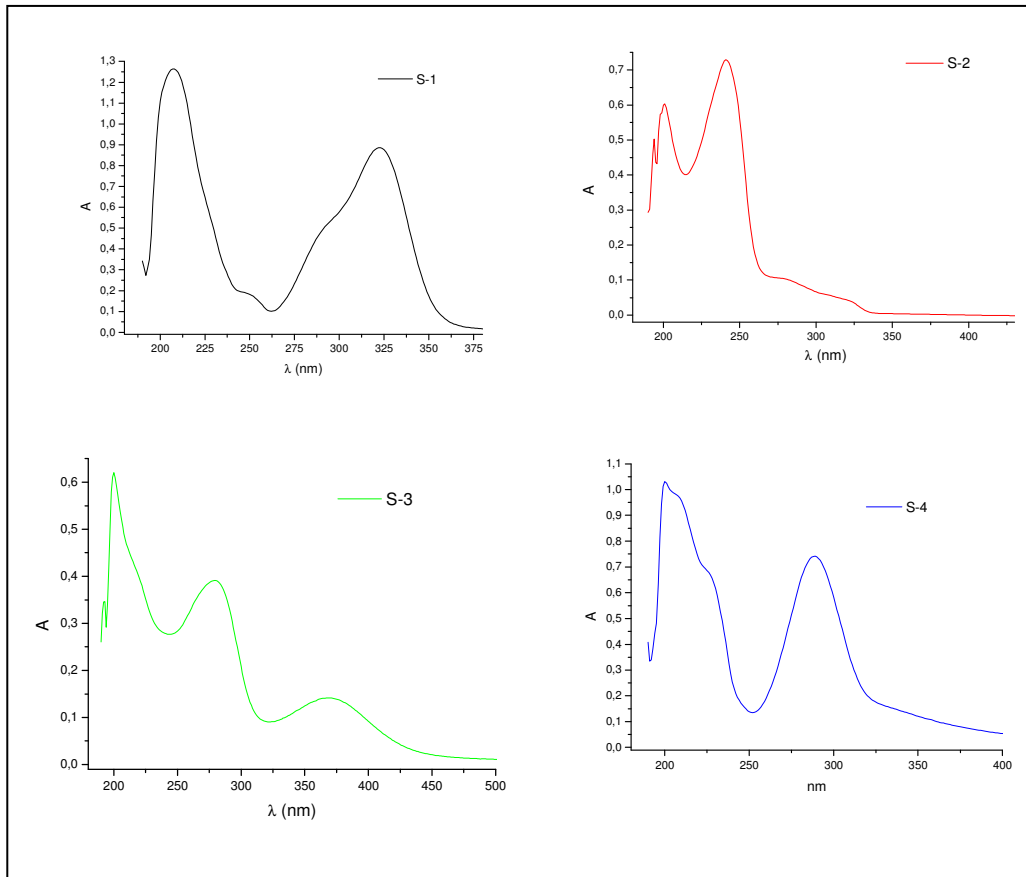
**Gráfico A2:** espectros de absorção das amostras (20μg/mL) de *M. ilicifolia*



**Gráfico A3:** Espectros de absorção das amostras (20µg/mL) de *M. aquifolium*.

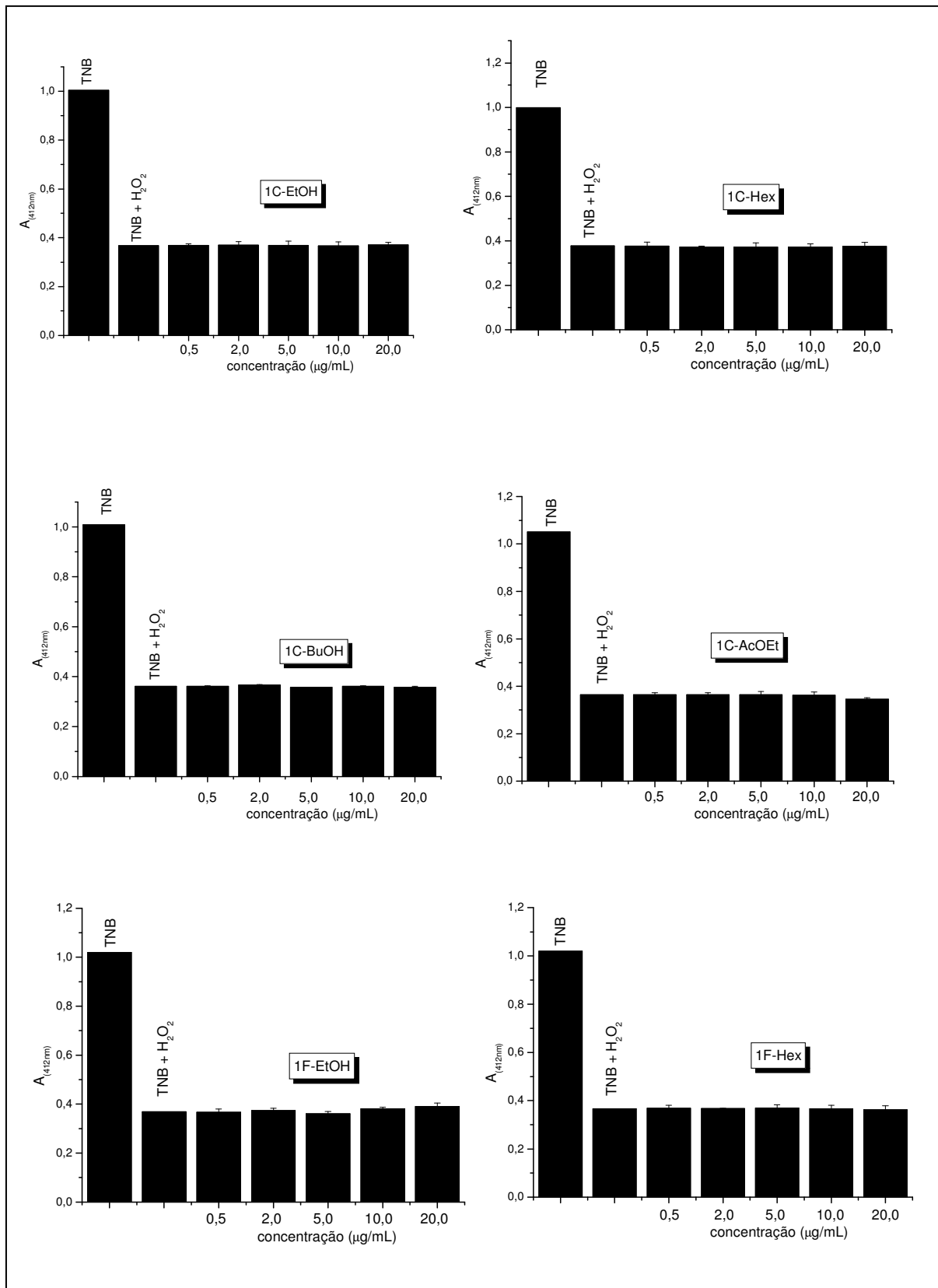


**Gráfico A4:** Espectro de absorção do extrato bruto (20µg/mL) da *S. campestris*

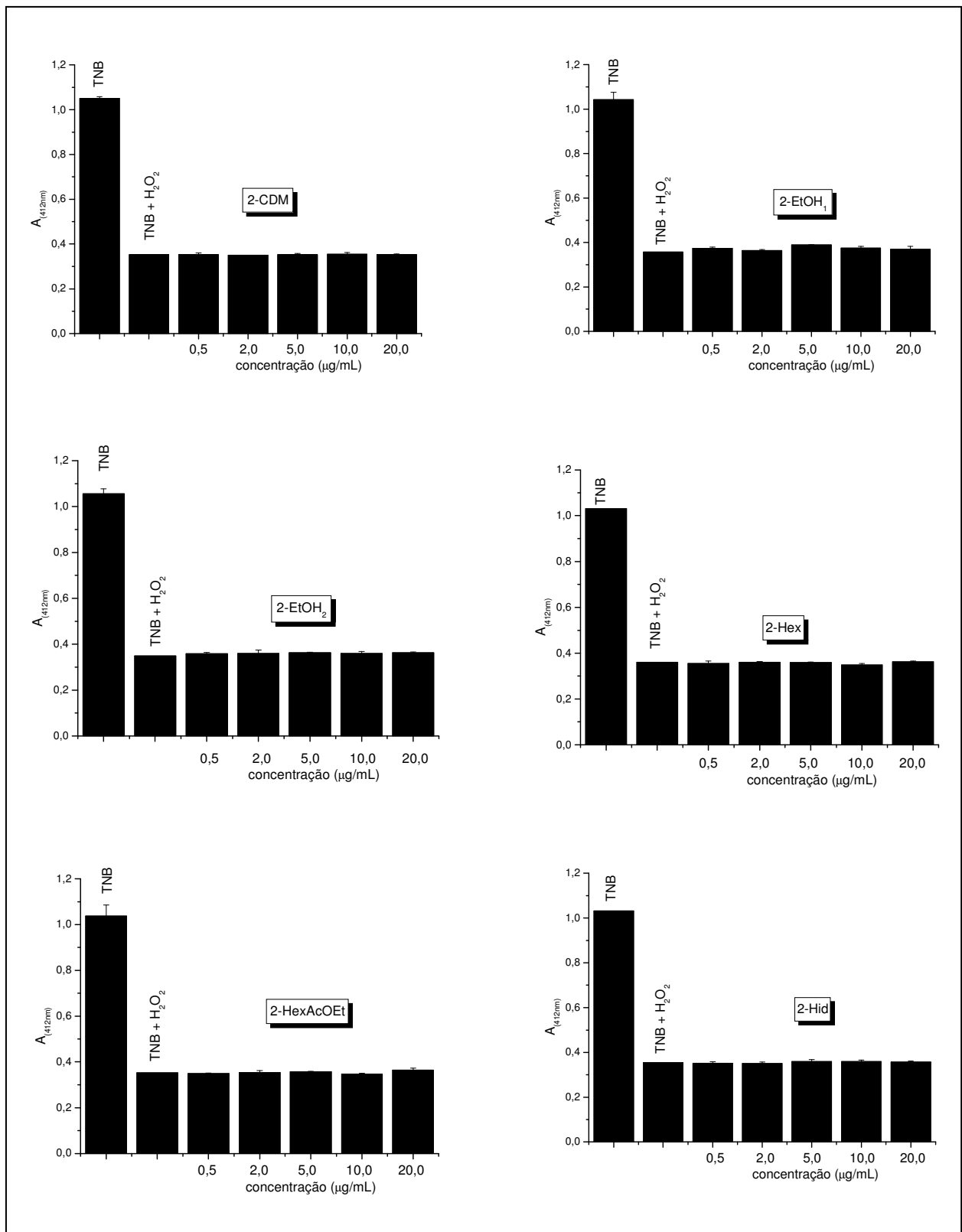


**Gráfico A5:** Espectros de absorção das amostras (20 $\mu$ g/mL) isoladas de plantas da família Piperaceae.

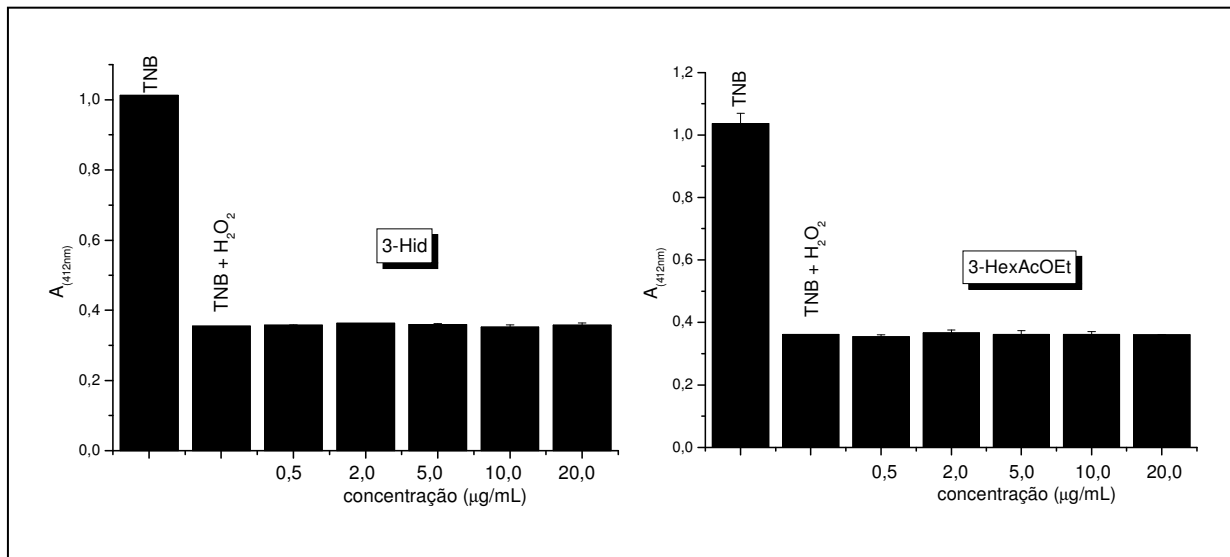
**ANEXO B**  
**Gráficos: Avaliação da ação sobre o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**



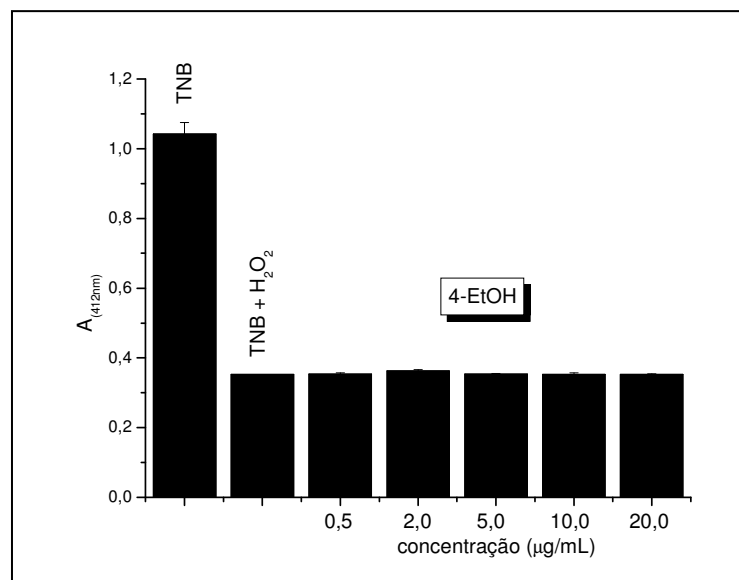
**Gráfico B1:** Ação das amostras de *P. nitens* no sistema TNB(80 $\mu\text{M}$ )/  $\text{H}_2\text{O}_2$ (100 $\mu\text{M}$ )



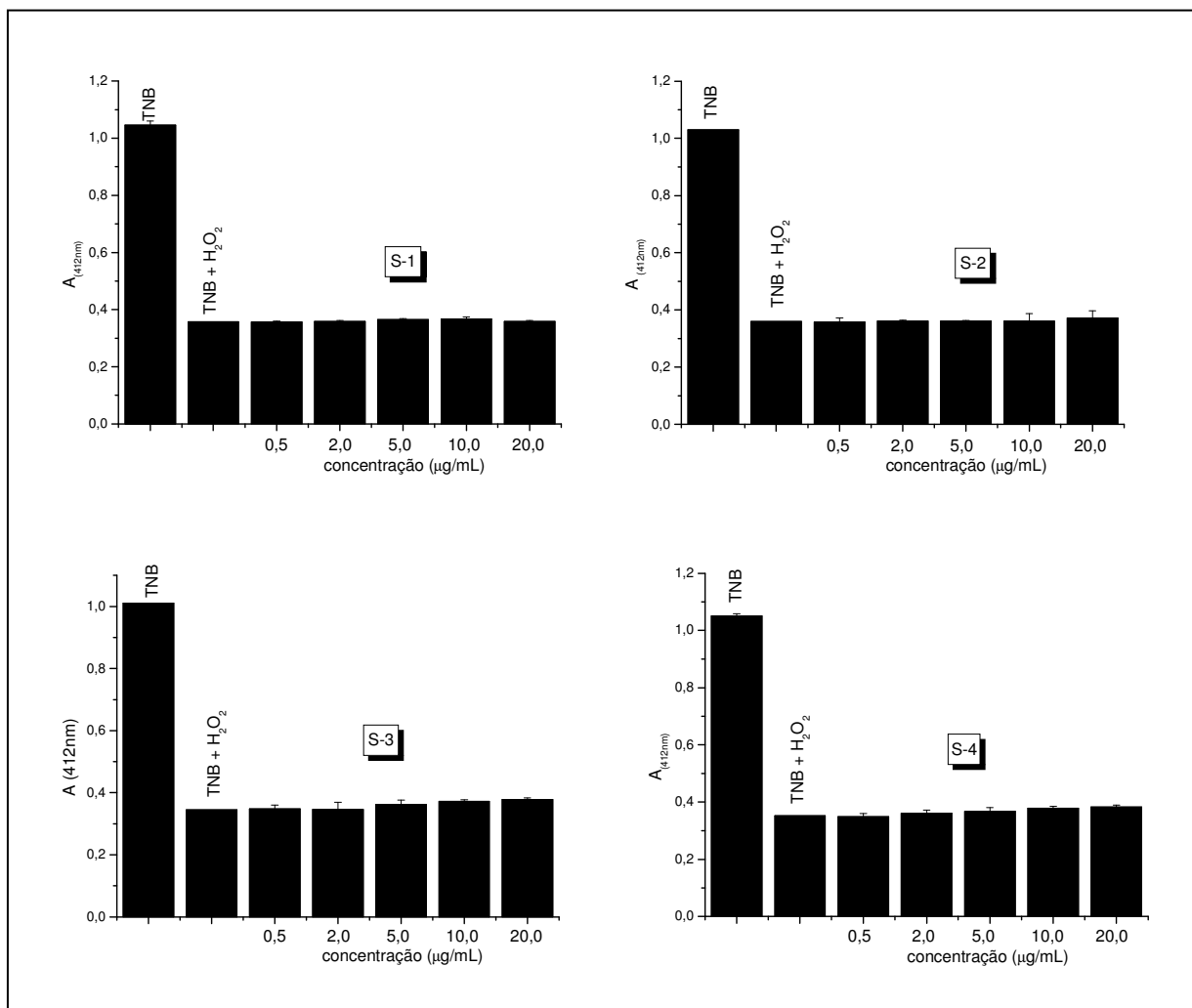
**Gráfico B2:** Ação das amostras de *M. ilicifolia* no sistema TNB(80 $\mu\text{M}$ )/  $\text{H}_2\text{O}_2$ (100 $\mu\text{M}$ )



**Gráfico B3:** Ação das amostras de *M. aquifolium* no sistema TNB(80µM)/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(100µM)

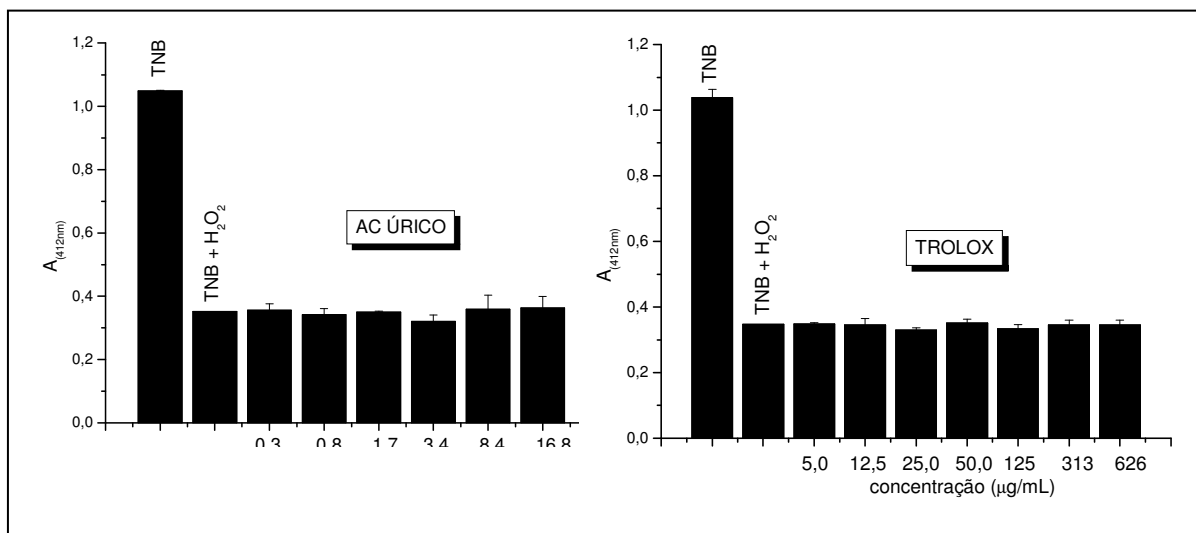


**Gráfico B4:** Ação das amostras de *S. campestris* no sistema TNB(80µM)/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(100µM)



**Gráfico B5:** Ação das amostras isoladas de plantas da família Piperaceae no sistema TNB(80µM)/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(100µM).





**Gráfico B6:** Ação dos padrões no sistema TNB(80µM)/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(100µM).

**ANEXO C**  
**Parecer do Comitê de ética em pesquisa**

Protocolo CEP/FCF/CAr. nº 05/2005 – Animais em Pesquisa

Interessado: JOSÉ CARLOS REBUGLIO VELLOSA

Orientador: OLGA MARIA MASCARENHAS DE FARIA OLIVEIRA

Projeto: AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE  
EXTRATOS VEGETAIS DE PLANTAS BRASILEIRAS E SUA  
CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE INIBIÇÃO DA ENZIMA  
MIELOPEROXIDASE

**Parecer nº 09/2005 – Comitê de Ética em Pesquisa**

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade considera o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Avaliação da capacidade antioxidante de extratos vegetais de plantas brasileiras e sua contribuição ao estudo de inibição da enzima mieloperoxidase", estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA e é de PARECER FAVORÁVEL à sua execução.

Araraquara, 30 de março de 2005.

Prof.ª Dr.ª MARIA VIRGINIA S. GOMES DE OLIVEIRA  
Coordenadora do CEP

**ANEXO D**  
**Trabalhos submetidos para publicação**



unesp

INSTITUTO DE QUÍMICA

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química

Laboratório de Enzimologia



April 19, 2005

Professor F. Pelizzoni  
Editor - in - Chief, *Fitoterapia*  
Milan, Italy

Dear Professor Pelizzoni:

I'm sending you copy of the manuscript, entitled "**Antioxidant activity of *Maytenus ilicifolia* root bark**", for submission as short report to publication on *Fitoterapia* scientific journal, by e-mail in an attachment format.

Thank you for your attention.

Best regards,

Prof. Dr. Olga Maria Mascarenhas Faria Oliveira

Prof. Dr. Olga Maria Mascarenhas Faria Oliveira  
UNESP – Instituto de Química  
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química  
R. Prof. Francisco Degni, s/ n. – Cx.P.355  
CEP 14801 900 – Araraquara – SP, Brasil.  
e-mail: [olga@iq.unesp.br](mailto:olga@iq.unesp.br).  
Fone: +55 16 3301 6680.  
Fax: +55 16 33222308

Mensagem não sinalizada. [ [Sinalizar](#) - [Marcar como não lida](#) ]

**De:** "Mirra Alida" <alida.mirra@indena.com>  [Ver detalhes do contato](#)

**Para:** "josevellosa@yahoo.com.br" <josevellosa@yahoo.com.br>

**Assunto:** Fitoterapia

**Data:** Wed, 29 Jun 2005 17:00:54 +0200

Dear Dr. Velloso,

this is to inform you that your paper:

"Antioxidant activity of Maytenus ilicifolia root bark" has been accepted for publication in Fitoterapia with some corrections.

I will send you the corrected version as it will be possible for your approval.

Thank you  
Best regards

Francesca Pelizzoni (Mrs)

## Short report

### Antioxidant activity of *Maytenus ilicifolia* root bark

JCR Velloso<sup>a,b,\*</sup>, NM Khalil<sup>a,b</sup>, VAF Formenton<sup>c</sup>, VF Ximenes<sup>b</sup>, LM Fonseca<sup>b</sup>, M Furlan<sup>c</sup>, IL Brunetti<sup>b</sup>, OMMF Oliveira<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Biochemistry and Technology Chemistry Department, Instituto de Química, UNESP, Araraquara-SP, Brazil*

<sup>b</sup>*Clinical Analysis Department, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara-SP, Brazil*

<sup>c</sup>*Organic Chemistry Department, Instituto de Química, UNESP, Araraquara-SP, Brazil*

\*Corresponding author; Tel.: +55-16-33016680; fax: +55-16-33222308

Address: UNESP Instituto de Química, Diretoria, R. Prof. Francisco Degni, s/n., Quitandinha, Araraquara-SP, Brasil

E-mail address: [josevellosa@yahoo.com.br](mailto:josevellosa@yahoo.com.br) (Velloso, JCR)

---

#### Abstract

*Maytenus ilicifolia* is an important plant with potential on cancer treatment and has been largely used in Brazil and others countries. We have evaluated the crude ethanolic extract of *Maytenus ilicifolia* as a potential antioxidant source using an assay based on the bleaching of the radical monocation 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS<sup>•+</sup>) and by HOCl scavenger capacity. Trolox and Uric acid were

used as positive controls. The results indicated *M. ilicifolia* root bark as a great source of antioxidants based on its potential as scavenger of radicals.

*Key words:* oxidant species, *Maytenus ilicifolia*, root bark, oxidative damage, hypochlorous acid

---



April 28, 2005

Professor F. Pelizzoni  
Editor - in - Chief, *Fitoterapia*  
Milan, Italy

Dear Professor Pelizzoni:

I'm sending you copy of the manuscript, entitled "**Antioxidant activity of water extract of *Agaricus blazei* Muril ("Cogumelo do Sol")**", for submission as short report to publication on *Fitoterapia* scientific journal, by e-mail in an attachment format.

Thank you for your attention.

Best regards,

Prof. Dr. Olga Maria Mascarenhas Faria Oliveira

Prof. Dr. Olga Maria Mascarenhas Faria Oliveira  
UNESP – Instituto de Química  
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química  
R. Prof. Francisco Degni, s/ n. – Cx.P.355  
CEP 14801 900 – Araraquara – SP, Brasil.  
e-mail: [olga@iq.unesp.br](mailto:olga@iq.unesp.br).  
Fone: +55 16 3301 6680.  
Fax: +55 16 33222308



De: Mirra Alida <alida.mirra@indena.com>  
Para: "Olga Maria M. Faria Oliveira" <olgaenzimologia@yahoo.com.br>  
Assunto: R: Short Report submission  
Data: Mon, 11 Jul 2005 12:21:43 +0200

Dear Prof. Oliveira,  
this is to inform you that I received your paper:  
"Antioxidant activity of water extract of *Agaricus blazei Muril* ("Cogumelo do Sol")" but it is not yet  
under revision .  
Due to the high amount of papers received the revision could require several months.

Thank you  
Best regards

Francesca Pelizzoni (Mrs)

—Messaggio originale—

**Da:** Olga Maria M. Faria Oliveira [mailto:olgaenzimologia@yahoo.com.br]  
**Inviato:** giovedì 28 aprile 2005 19.05  
**A:** Pelizzoni Francesca  
**Oggetto:** Short Report submission

We're sending the manuscript and the letter in attachment.

Thanks

Olga M.M.F. Oliveira  
Ricardo A. Hakime Silva

---

Converse com seus amigos em tempo real com o Yahoo! Messenger  
<http://br.download.yahoo.com/messenger/>

## Short report

### Antioxidant activity of water extract of *Agaricus blazei* Muril ("Cogumelo do Sol")

RA Hakime-Silva<sup>a\*</sup>, JCR Velloso<sup>a,b</sup>, NM Khalil<sup>a,b</sup>, AS Fernandes<sup>a</sup>, VF Ximenes<sup>b</sup>, IL Brunetti<sup>b</sup>, OMMF Oliveira<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Biochemistry and Technology Chemistry Department, Instituto de Química, UNESP, Araraquara-SP, Brazil

<sup>b</sup>Clinical Analysis Department, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara-SP, Brazil

\*Corresponding author; Tel.: +55-16-33016680; fax: +55-16-33222308

Address: UNESP, Instituto de Química, Diretoria, R. Prof. Francisco Degni, s/ n., Quitandinha, Araraquara-SP, Brasil

E-mail address: [oligantzinologia@vahoo.com.br](mailto:oligantzinologia@vahoo.com.br) (Hakime-Silva, RA)

---

## Abstract

Fungi and mushrooms that present nutritional and medicinal properties, possess also an antioxidant action, and have attracted researcher's attention as free radicals scavengers. In this work, it was demonstrated, *in vitro*, the antioxidant activity of water solutions of *Agaricus blazei* Murill using two different chemicals assays, which are models for studying antioxidant capacity: the extract works over radicals 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and ABTS<sup>•+</sup>[2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation radical] producing 50%

inhibition by using 0,02µg/mL and 0,2µg/mL respectively, as soon as cysteine produced the same effect with 2µg/mL (over ABTS<sup>•+</sup>) and 5µg/mL (over DPPH).

*Key words:* oxidant species, free radicals, *Agaricus blazei* Murill, antioxidant capacity, DPPH

---