

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

***“CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DA AÇÃO DO
ÁCIDO GÁLICO E SEUS DERIVADOS SOBRE
PROCESSOS OXIDATIVOS IN VITRO E EX VIVO”***

Vanessa de Frias Barbosa

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Olga Maria Mascarenhas Faria Oliveira
Co-orientador: Prof^o. Dr^o. Iguatemy Lourenço Brunetti

Araraquara
2010

Vanessa de Frias Barbosa

***“CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DA AÇÃO DO
ÁCIDO GÁLICO E SEUS DERIVADOS SOBRE
PROCESSOS OXIDATIVOS IN VITRO E EX VIVO”***

Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicada à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual “Julio Mesquita Filho” campus de Araraquara como pré-requisito para obtenção do título de mestre em Biociências e Biotecnologia aplicada à Farmácia. Área de concentração: Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Olga Maria Mascarenhas Faria Oliveira
Co-orientador: Prof^o. Dr^o. Iguatemy Lourenço Brunetti

**Araraquara
2010**

Dissertação de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicada à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual “Julio Mesquita Filho” campus de Araraquara como parte dos requisitos para o título de mestre em Biociências e Biotecnologia aplicada à Farmácia. Área de concentração: Bioquímica.

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

Fomento: Bolsa FAPESP – Mestrado.

Ficha Catalográfica

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP
Campus de Araraquara

Barbosa, Vanessa de Frias

B238c

Caracterização do perfil da ação do ácido gálico e seus derivados sobre processos oxidativos *in vitro* e *ex vivo* / Vanessa de Frias Barbosa. – Araraquara, 2010.

84 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicada à Farmácia.

Orientadora: Olga Maria Mascarenhas Faria Oliveira

Co-orientador: Iguatemy Lourenço Brunetti

1. Ácido gálico (Antioxidantes). 2. Flavonóides 3. Radicais livres. 4. Estresse oxidativo. 5. Espécies reativas do oxigênio. I. Oliveira, Olga Maria Mascarenhas Faria, orient. II. Brunetti, Iguatemy Lourenço, co-orient. III. Título.

CAPES: 40500004

Agradecimentos

Aos meus pais Antonio Jose de Frias Barbosa e Salete Lizia D'Artibale de Frias Barbosa como também aos meus irmãos Danilo de Frias Barbosa e Andréa Lizia de Frias Barbosa por tudo que fizeram e fazem por mim até hoje que com certeza foi o máximo que cada um, ao seu modo, pode fazer.

Em especial quero agradecer aos meus tios, Evandro Fraga e Valeria D'Artibale Fraga pela amizade e conversas buscando sempre me ajudar a seguir o melhor caminho em busca dos meus sonhos, aos tios Carlos Alberto de Frias Barbosa e Maria de Lurdes Calixto de Frias Barbosa e ainda Milton Garcia Martins e Silvia Lucia D'Artibale Martins pela amizade, carinho, apoio e constante torcida.

À minha avó Zaira D'Artibale Macedo pelo exemplo de luta e coragem, a avó Maria Fernanda de Frias Amaral pelo carinho, e ao querido avô Eduardo de Frias Barbosa (*in memoriam*) que além da grande amizade, me incentivou na realização dos meus estudos.

Aos meus primos e primas e familiares que me acompanham nas fases e conquistas da minha vida, sintam-se carinhosamente lembrados.

As amigas, Elaine, Cilene, Vanessa, Carolina pelo convívio durante esses anos. Ao Marciano pela amizade e ajuda no laboratório. Aos amigos e companheiros de trabalho dentro do laboratório, Vânia, Clara, Renata, Ricardo, Juliana, Mauro, Omar, Michelle, Kátia, Camila.

A todos os amigos que pelo amor que me dedicam e também pela compreensão que sempre demonstraram, permitindo olhar para a vida e perceber qual é o seu verdadeiro sentido, e que muitas vezes deixamos de acompanhar por falta de tempo,

mas, não deixando de nos apoiar em tempo algum, ficando a promessa de um regresso por inteiro muito em breve.

Ao José Carlos por todo o aprendizado durante a iniciação científica.

Ao técnico e amigo Marcos, por toda a ajuda no dia a dia e apoio renovado a cada conversa.

Ao professor Iguatemy que co-orientou este trabalho, pela amizade e preciosa ajuda e disponibilidade, além dos esclarecimentos de algumas dúvidas que surgiram ao longo dessa jornada.

Ao programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/FCFAR campus Araraquara.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – pelo financiamento e pela concessão da bolsa de estudos.

Agradeço ainda a minha orientadora Olga Maria M. de Faria Oliveira por ter me aceitado e dado a oportunidade de poder trabalhar durante esses anos em seu laboratório desde a iniciação científica (mesmo com todas as cartas de justificação para a renovação de bolsa). Ela foi mais que uma orientadora, foi uma amiga, que é um exemplo de vida e de profissionalismo, sempre incentivando a todos e sendo assim nossa “mãe científica”.

“Professor é aquele que limita seus ensinamentos a quatro paredes com um giz, um quadro negro e uma platéia muda de opiniões. Educador é aquele que cumpre seu papel social, profissional e que além de tudo, sabe escutar o aluno sempre incentivando-o e preparando-o para a vida lá fora; para o mundo.”

Lista de Abreviaturas:

AAPH: 2-azo-bis(2-amidinopropane) dihydrochloride
ABTS: 2-2'azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) acid
Cl⁻: Ion cloreto
DPPH: 2-2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTNB : Ácido 5,5'-ditio-2-nitrobenzóico
eNOS: Isoforma endotelial da enzima óxido nítrico sintetase
ERN: Espécies reativas do nitrogênio
ERO : Espécies reativas de oxigênio
G0: Ácido Gálico
G1: Galato de metila
G2: Galato de etila
G3: Galato de propila
G4: Galato de butila
G5: Galato de pentila
G6: Galato de hexila
GAT: Triacetato de ácido gálico
Gi3: Galato de isopropila
Gi4: Galato de isobutila
GSH S-transferase: Glutathiona peroxidase
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
HOCl: Ácido hipocloroso
HRP : Horseradish peroxidase
iNOS: Isoforma induzida da enzima óxido nítrico sintetase
LDL: Lipoproteína de baixa densidade
LPMN: Leucócitos polimorfonucleares
MPO: Mieloperoxidase
NH₂Cl: Monocloramina (Cloro de amônia)
nNOS: Isoforma neuronal da enzima óxido nítrico sintetase
NO[•]: Radical óxido nítrico
NO₂: Óxido nítrico
NOS: Enzima óxido nítrico sintetase
O₂^{-•} : Ânion superóxido
OH[•] : Radical hidroxil
PMA : Éster de forbol miristato
ROO[•]: Radical peroxil
SARA: Síndrome da angústia respiratória aguda
SOD: enzima superóxido dismutase
TMB: Tetrametilbenzina
TNB : Ácido 5'-tio-2-nitrobenzóico
V₀: velocidade inicial
V_{máx}: velocidade máxima

Lista de Esquemas:

Esquema 1: 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.

Lista de Figuras:

Figura 1: Molécula do Ácido Gálico.

Figura 2: Possibilidades de geração de ERO no surto oxidativo de neutrófilos, em $\text{pH} < 7,4$.

Figura 3: Os fagócitos são capazes de promover a oxidação da LDL através da produção de espécies oxidantes.

Figura 4: IC_{50} do efeito de captura sobre o radical $\text{ABTS}^{•+}$ em tampão fosfato de sódio 10 mM $\text{pH} 7,4$; incubação por 30 minutos. $\lambda = 734\text{nm}$.

Figura 5: IC_{50} do efeito de captura sobre o radical DPPH ($60\mu\text{M}$) pelas amostras em etanol absoluto com incubação de 15 minutos; $\lambda = 531\text{nm}$.

Figura 6: IC_{50} do efeito de captura sobre o HOCl; tampão fosfato de sódio 50mM $\text{pH} 7,4$; TMB 2,8mM; incubação de 10 minutos e revelação com TMB $\lambda = 652\text{nm}$.

Figura 7: Inibição da captura do H_2O_2 das amostras G0, Gi3, G4 G5 e GAT em meio reacional com tampão fosfato de sódio 50mM $\text{pH} 7,4$ e TNB ($80\mu\text{M}$).

Figura 8: Inibição da captura do H_2O_2 das amostras G1 e G6 em meio reacional com tampão fosfato de sódio 50mM $\text{pH} 7,4$ e TNB ($80\mu\text{M}$).

Figura 9: Inibição da captura do H_2O_2 das amostras G2 e G3 em meio reacional com tampão fosfato de sódio 50mM $\text{pH} 7,4$ e TNB ($80\mu\text{M}$).

Figura 10: Inibição da captura do H_2O_2 da amostra Gi4 em meio reacional com tampão fosfato de sódio 50mM $\text{pH} 7,4$ e TNB ($80\mu\text{M}$).

Figura 11: IC_{50} do efeito de captura sobre o radical superóxido em meio reacional com tampão pirofosfato de sódio 25mM $\text{pH} 8,3$, NBT $90\mu\text{M}$, NADH $116\mu\text{M}$, PMS $15\mu\text{M}$. Incubação de 2 minutos e adição de ácido acético 5% e 10 minutos de incubação. $\lambda = 560\text{nm}$

Figura 12: IC_{50} do efeito de captura do radical óxido nítrico em meio reacional contendo nitroprussiato de sódio 12,5mM em tampão fosfato de sódio 50mM, $\text{pH} 7,4$. Incubação de 1 hora e meia e revela com Reagente de Griess.

Figura 13: IC_{50} do efeito de captura da Taurina Cloramina em meio reacional contendo taurina $30\mu\text{M}$ e HOCl $30\mu\text{M}$ em tampão fosfato de sódio 50mM $\text{pH} 7,4$. Incubação de 5 minutos e posterior adição de amostra. Incubação de 10 minutos e revelou com TMB.

Figura 14 e 15: Gráfico Duplo-Recíproco da inibição da HRP ($0,01\mu\text{M}$) pelas amostras em tampão fosfato de sódio 50mM, $\text{pH} 7,4$ a 25°C monitorada durante dois minutos a 470nm .

Figura 16 e 17: Cinéticas MPO/guaiacol/H₂O₂ na presença e na ausência das amostras. Meio reacional em tampão fosfato de sódio 50mM, pH7,4 a 37°C, reação foi monitorada durante dois minutos a 470nm.

Figura 18: Hemólise provocada pela amostra G0 em meio reacional contendo eritrócitos e tampão com NaCl. Incubação de 4 horas a 37°C e sob leve agitação.

Figura 19: Hemólise pelo HOCl. A seta indica o ponto que temos 40% de hemólise. Meio reacional: Tampão com NaCl, Eritrócitos a 5% e HOCl.

Figura 20: Hemólise pela amostra G0 com a presença de HOCl.

Figura 21: Hemólise provocada pela amostra Gi3 e G4 na presença de HOCl.

Figura 22: Hemólise provocada pela amostra G4.

Figura 23: Hemólise provocada pela amostra Gi4 e GAT na presença de HOCl.

Figura 24: Hemólise provocada pela amostra G5 e G6 na presença de HOCl.

Figura 25: Hemólise provocada pela amostra G5 e G6.

Figura 26: Hemólise provocada pelo radical AAPH.

Figura 27: Hemólise provocada pelas amostras na ausência do radical AAPH. Tempo de incubação de duas horas a 37°C.

Figura 28: Hemólise provocada pelo radical AAPH e amostras. Tempo de incubação de duas horas a 37°C.

Figura 29 e 30: Citotoxicidade dos Galatos sobre os neutrófilos após duas horas de incubação e revelado com o corante supra-vital azul de Trypan.

Lista de Tabelas:

Tabela 1: Espécies reativas do oxigênio.

Tabela 2: Efeitos do NO como mensageiro ou como toxina no mesmo tecido, conforme a concentração tissular relativa

Tabela 3: IC₅₀ das amostras sobre o radical ABTS^{*+}.

Tabela 4: IC₅₀ do efeito de captura sobre o radical DPPH.

Tabela 5: IC₅₀ do efeito de captura sobre o HOCl.

Tabela 6: IC₅₀ do efeito de captura sobre o radical superóxido

Tabela 7: IC 50 do efeito de captura sobre o radical óxido nítrico.

Tabela 8: IC 50 do efeito de captura sobre o radical taurina cloramina.

Índice	
Lista de Abreviaturas	4
Lista de Esquemas	5
Lista de Figuras	6
Lista de Tabelas	8
Resumo	11
1.Introdução	13
1,1 Justificativa	14
1.2 Revisão Bibliográfica	14
1.2.1 Compostos Fenólicos – Ácido Gálico e Derivados	14
1.3 Surto Oxidativo e ERO	18
1.4 Geração <i>in vivo</i> de ERO	20
1.4.1 Células Polimorfonucleares – neutrófilos	21
1.4.2 Enzima MPO	21
1.4.3 Ácido Hipocloroso – HOCl	22
1.4.4 Peróxido de Hidrogênio – H ₂ O ₂	24
1.4.5 Ânion Radical Superóxido	25
1.4.6 Óxido Nítrico - NO [•]	25
1.4.7 Cloraminas	26
1.5 Doenças Associadas às ERO e ERN	27
1.6 Outros Modelos para Verificar a Ação de Captura de Radicais	28
1.6.1 Radicais ABTS e DPPH	28
2.Objetivo	29
3.Material e Métodos	31
3.1 Preparo das Amostras	32
3.2 Equipamentos	33
3.3 Estudos com Sistemas <i>in vitro</i> Não Enzimáticos	33
3.3.1 Ensaio de Captura para o ABTS ^{*+}	33
3.3.2 Ensaio de Captura para o DPPH	33
3.3.3 Ensaio de Captura para o HOCl e H ₂ O ₂	33
3.3.4 Ensaio de Captura para o O ₂ ^{•-}	34
3.3.5 Ensaio de Captura para o Óxido Nítrico	34
3.3.6 Ensaio de Captura para Cloraminas	34
3.4 Estudos com Sistemas <i>in vitro</i> Enzimáticos.....	36

3.4.1	Ação na Oxidação do Guaiacol por HRP (peroxidase modelo clássico) ...	36
3.4.2	Ação na Oxidação do Guaiacol pela MPO Humana	36
3.5	Estudos com Sistemas Celulares “ <i>ex vivo</i> ”	34
3.5.1	Toxicidade sobre Eritrócitos: Hemólise	34
3.5.2	Toxicidade sobre Eritrócitos com o radical HOCl	35
3.5.3	Toxicidade sobre Eritrócitos com o radical AAPH	35
3.5.4	Toxicidade sobre Neutrófilos com Corante supra-vital: Azul de Trypan ..	35
3.6	Análise Estatística.....	36
3.7	Descarte de Resíduos	38
4.	Resultados e Discussão	37
4.1	Interações com sistemas <i>in vitro</i> não enzimáticos - Radicais e ERO	38
4.1.1	Ensaio de Captura para o ABTS ^{•+}	38
4.1.2	Ensaio de Captura para o DPPH	40
4.1.3	Ensaio de Captura para o HOCl	41
4.1.4	Ensaio de Captura para o H ₂ O ₂	43
4.1.5	Ensaio de Captura para o O ₂ ^{•-}	43
4.1.6	Ensaio de Captura para o Óxido Nítrico	45
4.1.6	Ensaio de Captura da Taurina Cloramina	46
4.2	Interação com Sistemas <i>in vitro</i> Enzimáticos.....	56
4.2.1	Oxidação do Guaiacol pela MPO	56
4.2.2	Oxidação do Guaiacol pela HRP	59
4.3	Interação com Células	47
4.3.1	Hemólise com HOCl	47
4.3.2	Hemólise com o Radical AAPH	52
4.3.3	Toxicidade sobre Neutrófilos com Corante Supra-Vital: Azul de Trypan	54
5.	Conclusão	62
6.	Referências Bibliográficas	64

RESUMO

Compostos fenólicos são conhecidos por possuírem propriedades antioxidantes que influenciam na qualidade dos alimentos. O ácido gálico e seus derivados apresentam propriedades antioxidantes, antimicrobiana e propriedades antimutagênicas. Neste trabalho avaliamos a ação desses compostos sobre processos oxidativos *in vitro* e *ex vivo* sendo: i) Modelos químicos na supressão de formas oxidantes de ABTS^{•+}, DPPH[•], HOCl, H₂O₂, O₂^{•-}, NO[•] e taurina cloramina; ii) Sistemas enzimáticos como HRP e MPO; iii) Sistemas celulares com polimorfonucleares e eritrócitos frente a AAPH e HOCl. Os ensaios envolvendo as espécies oxidativas na presença de ácido gálico e derivados mostraram uma boa inibição, sendo que a amostras triacetato de ácido gálico mostrou ser a melhor das amostras testadas. Em relação aos sistemas enzimáticos os dados indicam inibição não competitiva ou mista. Nos sistemas celulares foi observado: i) citotoxicidade frente às células eritrocitárias e aos polimorfonucleares, ii) a amostra galato de isopropila demonstrou menor citotoxicidade frente aos eritrócitos, iii) a amostra galato de butila foi a que apresentou relativamente menor citotoxicidade chegando a 80% de morte celular, e iv) as outras amostras chegavam a 100% de morte celular na mesma concentração. Pelos dados obtidos, concluiu-se que o ácido gálico e seus derivados são potentes antioxidantes e inibidores das peroxidases HRP (Horseradish peroxidase) e MPO (mieloperoxidase), e com alta citotoxicidade frente aos sistemas celulares estudados.

ABSTRACT

Phenolic compounds are known to have antioxidant properties that influence the quality of food. Gallic acid and its derivatives have antioxidant, antimicrobial and antimutagenic properties. In this study the action of these compounds on oxidative processes *in vitro* and *ex vivo* which: i) Models in the suppression of chemical forms of oxidizing $ABTS^{++}$, $DPPH^{\bullet}$, $HOCl$, H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$, NO^{\bullet} and taurine chloramine ii) Enzymatic systems HRP and MPO iii) cellular systems with polymorphonuclear cells and erythrocytes against AAPH and $HOCl$. Tests involving the oxidative species in the presence of gallic acid and its derivatives showed good inhibition, and the triacetate samples of gallic acid were found to be the best of the tested samples. Regarding enzyme systems data indicate non-competitive or mixed inhibition. In cellular systems were observed: i) cytotoxicity against cells to erythrocyte and polymorphonuclear ii) the sample with erythrocytes the isopropyl gallate showed less cytotoxicity compared to the others samples, iii) the sample of butyl gallate showed the relatively lower cytotoxicity reaching 80% of cell death, and iv) the other specimens came to 100% cell death at the same concentration. From the data obtained showed that the gallic acid and its derivatives are potent antioxidants and inhibitors of peroxidases HRP (horseradish peroxidase) and MPO (myeloperoxidase), and high cytotoxicity against the cell systems studied.

1 Introdução

1.1 Justificativa

Os compostos fenólicos caracterizam o maior grupo de metabolitos secundários de plantas e apresentam influencia na qualidade dos alimentos, propriedades antioxidantes e como agentes terapêuticos em diversas áreas da saúde.

Há relatos da utilização do ácido gálico, componente do metabolismo secundário das plantas, para o tratamento da microalbuminúria e relatos de que possui funções como antimelanogênico e antioxidante.

É conhecido que a síntese de análogos a partir de princípios ativos isolados naturalmente tem contribuído para a obtenção de novos agentes terapêuticos, procuramos então, isolar um composto químico biologicamente ativo incorporando grupamentos à estrutura do ácido gálico. Estudos mostraram atividades de galatos derivados do ácido gálico como antimutagênico, inibição das enzimas do citocromo P-450 além de inibir a cadeia respiratória do *Trypanossoma cruzi* e ter atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*.

Alguns derivados de ácido gálico mostraram que podem inibir a cadeia respiratória do parasita *Trypanossoma cruzi*, possuem atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e também toxicidade em hepatócitos de ratos contribuindo na disfunção mitocondrial. Além disso, estudos mostram que as propriedades antimutagênicas de alguns fenólicos como os galatos podem contribuir com a ação inibitória das enzimas do citocromo P-450.

A proteção contra doenças por compostos fenólicos é mediada por propriedades antioxidantes tais como, ação na captura de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas do nitrogênio (ERN).

Em vista de que compostos fenólicos são considerados como coadjuvantes na redução do risco de desenvolvimento de doenças como arteriosclerose, diabetes,

hipertensão, doenças coronarianas, doenças neurológicas degenerativas e câncer, ou na redução de mutagenicidade, a proposta do trabalho foi estudar e caracterizar o perfil da ação do ácido gálico e seus derivados sob processos oxidativos *in vitro* e *ex vivo*, buscando relacionar uma relação estrutura e atividade dessas moléculas.

1.2 Revisão bibliográfica.

1.2.1 Compostos Fenólicos – Ácido Gálico e Derivados

Compostos fenólicos ou polifenóis constituem um dos grupos mais numerosos de metabólitos secundários de plantas, com mais de 8000 estruturas conhecidas. Fenóis naturais podem ser desde moléculas simples (ácido benzóico e cinâmico) até componentes altamente polimerizados (lignina, melanina, tanino), com os flavonóides representando o mais comum e largamente distribuído subgrupo (BRAVO,1998).

Esses compostos têm sido muito estudados, pela sua influencia na qualidade dos alimentos e pela sua constituição que apresenta propriedades antioxidantes (SOARES, 2002). Caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes aos alimentos e conseqüentemente ao organismo, sendo, por isso, indicados para o tratamento e prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e outras doenças (KERRY & ABBEY, 1997; BRAVO, 1998; CROFT, 1998; FERGUSON & HARRIS, 1999).

Compostos fenólicos são derivados do metabolismo secundário de plantas, sendo a maior parte derivada do metabolismo da glicose por diferentes reações bioquímicas, que constituem a via do ácido chiquímico ou do acetato (SIMÕES et al., 2003). O metabólito ácido gálico deriva da via do ácido chiquímico, um intermediário do metabolismo secundário, e é um componente de taninos hidrolisáveis em plantas (GRUNDHOFER et al., 2001). Na literatura pode-se encontrar relatos da utilização do ácido gálico no tratamento da microalbuminúria (SAMPSON et al; LYELL et al., 1849), e seletiva citotoxicidade contra uma variedade de tumores celulares (OHNO et al, 1999; YOSHIOKA et al., 2000).

Kim (2007) mostrou que o ácido gálico (figura 1) tem duas funções como antimelanogênico e agente antioxidante, propondo que estas duas funções fazem do ácido gálico um composto eficiente para a saúde da pele.

É bem conhecido que a síntese de análogos a partir de princípios ativos isolados naturalmente tem contribuído para a obtenção de novos agentes terapêuticos. Após isolar um composto químico biologicamente ativo, procura-se por modificações em sua estrutura molecular com a finalidade de otimizar tal atividade, incorporando novos grupamentos, ou até mesmo, “simplificando” a molécula. Como conseqüência, estas ações podem modificar suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, além de possibilitar o esclarecimento da importância desses substituintes para a respectiva atividade biológica (CECHINEL FILHO; YUNES, 2001).

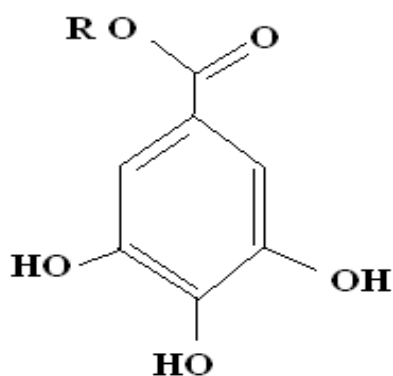


Figura 1: Molécula do ácido gálico

Alguns derivados de ácido gálico, os galatos, mostraram que podem inibir a cadeia respiratória do parasita *Trypanosoma cruzi* (LETELIER et al 1990), atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* (BOYD et al, 1981) e toxicidade em hepatócitos de ratos contribuindo na disfunção mitocondrial (NAGAKAWA et al, 1995). Além disso, estudos mostram que as propriedades antimutagênicas de alguns fenólicos como os galatos podem contribuir com a ação inibitória das enzimas do citocromo P-450 (APOSTOLIDES et al, 1997). Em vista disso, é proposta desse trabalho estudar derivados de ácido gálico de forma comparativa, verificando estrutura e reatividade.

Há um grande interesse no uso de produtos naturais como antioxidantes para a preservação de alimentos e principalmente na investigação de seus efeitos em condições

fisiopatológicas, onde ocorre o envolvimento de espécies reativas do oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN). Esses compostos são considerados como coadjuvantes na redução do risco no desenvolvimento de doenças como arteriosclerose, diabetes, hipertensão, doenças coronarianas, doenças neurológicas degenerativas e câncer (ARUOMA, 2002) ou na redução de mutagenicidade (GUPTA et al., 2002; KURODA, HARA, 1999).

A proteção contra doenças por compostos fenólicos é mediada por propriedades antioxidantes (KURODA, HARA, 1999), tais como ação de captura de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN).

De maneira simples, o termo radical livre refere-se a átomo ou molécula altamente reativo, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, sendo este não emparelhamento de elétrons o responsável pela alta reatividade desses átomos ou moléculas; na verdade, radical livre não é o termo ideal para designar os agentes patogênicos reativos, pois, alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada e, portanto, o termo a ser utilizado será ERO e ERN (FERNANDEZ et al., 2002; Tabela 1),

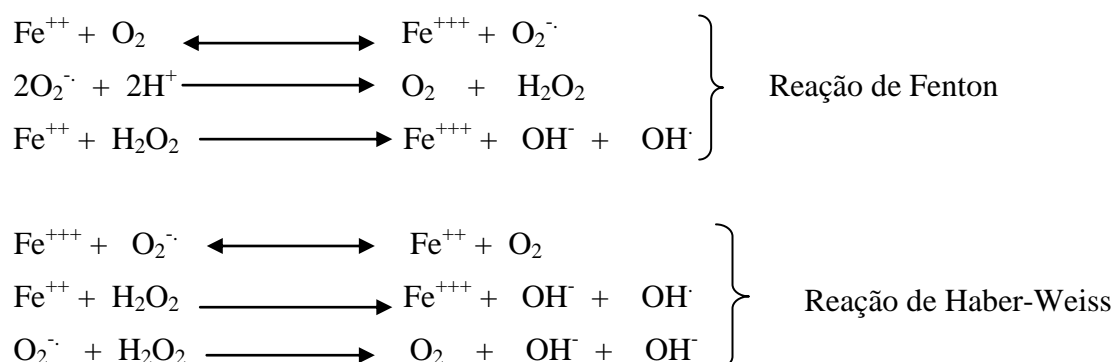
Tabela 1: Espécies reativas do oxigênio.

Radicais livres	Não radicais
Radical hidroxil (OH•)	Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)
Radical nítrico (N•O)	Ácido hipocloroso (HOCl)
Radical superóxido (O ₂ •)	Oxigênio singlete (¹ O ₂)
Radical peroxil (ROO•)	Ozônio (O ₃)
Radical alcoxil (RO•)	Taurina Cloramina

As ERN, biologicamente, possuem o óxido nítrico como fonte primária. O NO• (óxido nítrico) é sintetizado pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS) através da oxidação da L-arginina na presença de oxigênio. São três as principais isoformas de NOS: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzida (iNOS), com diferentes expressões e atividades (MONCADA et al., 1991; KISS, 2000; ESTÉVEZ; JORDÁN, 2002; LEONG et al., 2002).

O estudo sobre os mecanismos de lesões tissulares causadas pelas ERO tem, progressivamente, confirmado a ação catalítica dos metais nas reações que levam a estas lesões, o que é observado pelas reações de Fenton e Haber-Weiss. Embora o cobre possa também catalisar a Reação de Haber-Weiss, o ferro é o metal pesado mais abundante no organismo e participa nas reações de oxidação de biomoléculas

(FERRERIA, A.L.A. e MATSUBARA, L.S.; 1997). Como pode ser observado a seguir, nas reações de Fenton e de Haber-Weiss são formadas diferentes ERO:



Como já mencionado a molécula ou o sistema antioxidante pode prevenir danos às células causados pelo excesso de ERO geradas. Em geral antioxidante pode agir de duas maneiras; i) pela quelação de metais; ii) retirando o elétron livre desemparelhado quebrando a cadeia de reação de formação de radicais, ou por redução ou agindo diretamente em genes de expressão (SURH & PACKER., 2005).

Em relação aos compostos fenólicos, estes podem agir de três maneiras:

- 1) Quelação de metais prevenindo a formação do radical livre;
- 2) Indução de enzimas de fase 2 como GSH S-transferases (Glutathione peroxidase), Metiltransferases e outras;
- 3) Ação nas moléculas alvo e com alta especificidade podendo envolver, na célula, a sinalização, transcrição e expressão gênica.

1.3 Explosão oxidativa e Espécies Reativas do Oxigênio – ERO

A explosão oxidativa, refere-se a uma série de eventos metabólicos (figura 2) que ocorrem quando os fagócitos são recrutados para um local onde existe microorganismos, ou lesão tecidual.

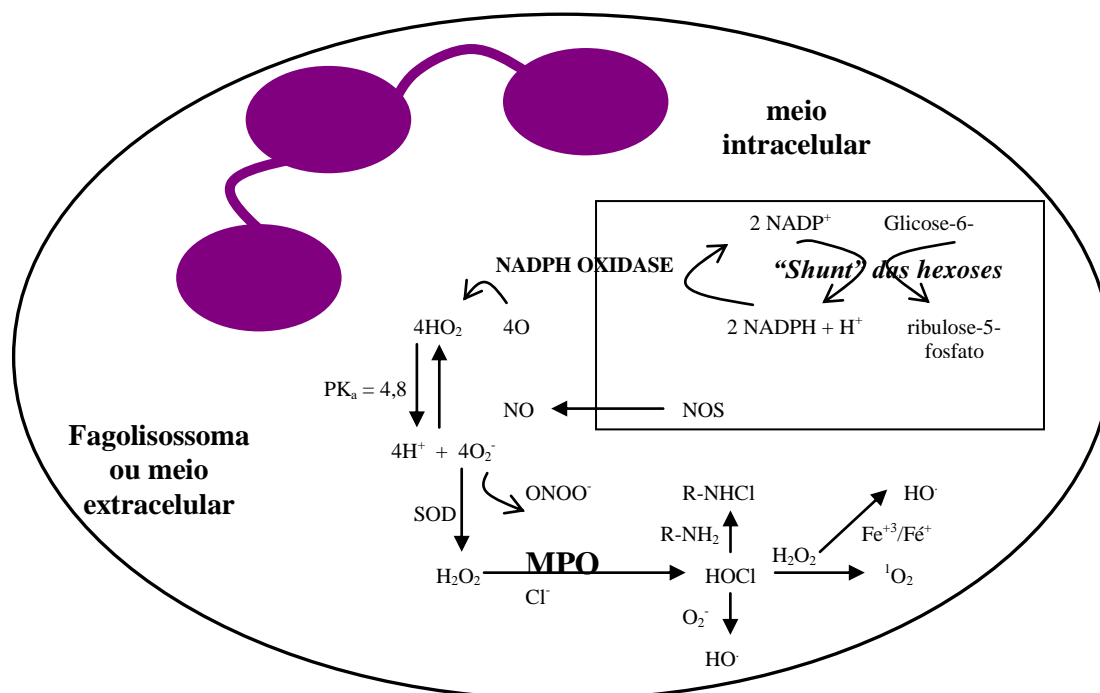


Figura 2. Possibilidades de geração de ERO no surto oxidativo de neutrófilos, em $\text{pH} < 7,4$ (Adaptado de Khalil, 2002)

Durante o surto oxidativo vários sistemas enzimáticos são ativados com a produção de agentes oxidantes (figura 1). Espécies halogênicas reativas (RHS: X_2 e HOX, onde X podem ser Cl, Br e I) são alguns dos metabólitos originados pela ativação neutrofílica (CHEN et al., 2002). Neste processo, a mieloperoxidase (MPO), assim como outras peroxidases, é capaz de catalisar a oxidação de vários compostos orgânicos usando H_2O_2 (CAPEILLEARE-BLANDIN, 1998).

Além de participar dos processos fisiológicos na defesa do organismo as ERO podem iniciar e/ou participar na evolução de muitas doenças. Há algumas evidências que anormalidades nos componentes lipídicos podem causar uma superprodução de ERO e, por sua vez, a peroxidação lipídica. Radicais livres como anion superóxido e radical hidroxil podem causar a peroxidação lipídica, podendo ser ligados à morte celular (VELLOSA et al., 2007).

Muitos estudos demonstram que os fagócitos são capazes de promover a oxidação da LDL (Lipoproteína de baixa densidade) (figura 2) através da produção de espécies oxidantes. Na aterosclerose, por exemplo, ocorre afluxo de macrófagos e lesão celular devido à grande liberação de peróxido de hidrogênio; além disso, a LDL é modificada pelas espécies oxidantes liberadas pelos neutrófilos (FERREIRA;

MATSUBARA, 1997; JERLICH et al., 2000; MERTENS et al, 2001; WOODS; DAVIES, 2003).

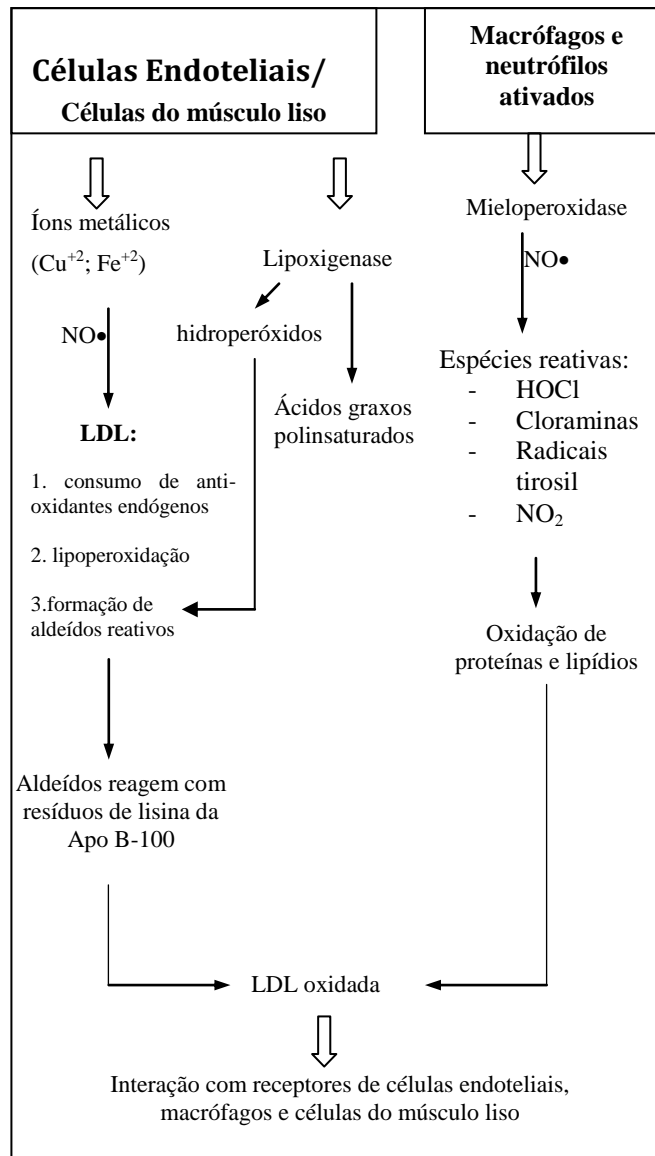


Figura 3: Os fagócitos são capazes de promover a oxidação da LDL através da produção de espécies oxidantes (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; JERLICH et al., 2000; MERTENS et al, 2001; WOODS; DAVIES, 2003).

Em relação às biomoléculas lipídicas, a enzima MPO (Mieloperoxidase) pode se ligar à LDL, com implicações importantes na modificação oxidativa da LDL (CARR et al., 2000). Os lipídios que são oxidados pelas espécies geradas na ativação dos neutrófilos são rapidamente englobados por macrófagos que posteriormente se transformam em células espumosas como parte do processo aterogênico (BABIOR, 2000).

1.4 Geração *in vivo* de ERO

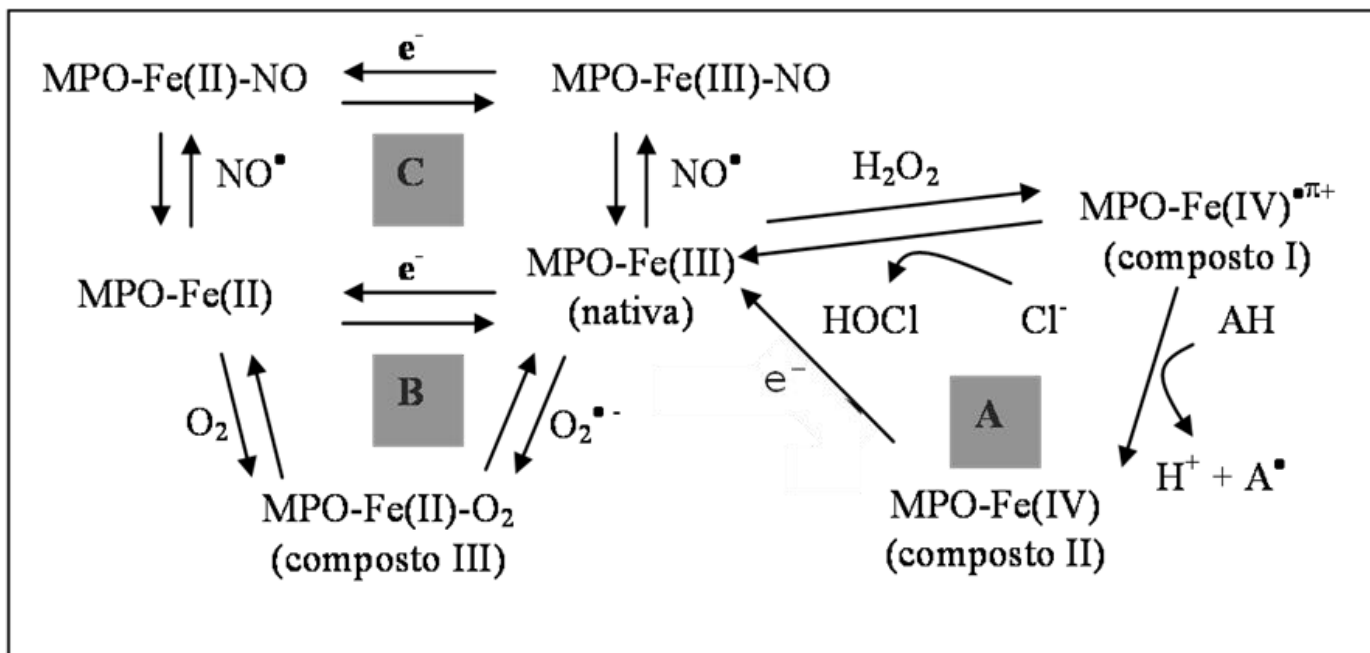
1.4.1 Células Polimorfonucleares – neutrófilos

Os leucócitos polimorfonucleares (LPMN), principalmente os neutrófilos, fagocitam e destroem microrganismos invasores e, desta maneira, desempenham um importante papel nos mecanismos de defesa do organismo em todos os níveis tissulares. Ao lado dessas funções de importância vital, a outra face da fisiologia do processo fagocitário apresenta um componente variável de auto-agressão cuja importância vem sendo cada vez mais destacada na literatura (CHAPLE, 1997). Para exercer a sua função, os LPMN devem migrar para o sítio da infecção induzidos por sinais químicos específicos, reconhecer, fagocitar e finalmente destruir o patógeno invasor. Sua atividade microbicida é um processo dinâmico que requer energia. As alterações metabólicas associadas com a ação microbicida dos LPMN são referidas como explosão oxidativa ou *burst* oxidativo ou respiratório (BABIOR, 1984). O pH do fagolisossoma, durante a fagocitose, pode variar de ~ 8,0 nos primeiros minutos e chegar a ~ 6,0 em algumas horas (HAMPTON et al, 1998).

1.4.2 Enzima MPO

A mieloperoxidase é uma proteína catiônica em pH fisiológico, capaz de se ligar a estruturas biológicas aniônicas, tais como fosfolipídios de membranas celulares, e na presença de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) e o íons Cl⁻ (cloreto) catalisa a geração de HOCl podendo levar a conseqüente injúrias, destes constituintes celulares (WEISS, 1989). A MPO foi recentemente encontrada em lesões de aterosclerose humana (DAUGHERTY et al., 1994), sugerindo ação de produtos de catálise clorinados nos processos aterogênicos (LAPENNA e CUCCURULLO, 1996).

O mecanismo da ação (esquema 1) envolve a sua forma férrica (MPO) com H₂O₂ para formar um intermediário redox (MPO I), o qual oxida Cl⁻, Br⁻ e I⁻ e outros substratos através da transferência de 2 elétrons. A MPO também pode oxidar vários substratos orgânicos através de transferências sucessivas de um elétron envolvendo os intermediários MPO I e MPO II. O O₂⁻ pode converter a MPO em MPO III ou oximieloperoxidase (HAMPTON, 1998).



Esquema 1: 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; Podrez, 2007).

Usando o H_2O_2 como doador de hidrogênio, a mieloperoxidase catalisa a oxidação de doadores não específicos de elétrons, tais como o guaiacol (MERRIL, 1980) *O*-dianisidina (BRADLEY et al, 1982) e a tetrametilbenzidina (SCHIERWAGEN et al, 1990).

A MPO é inibida, dentre outros, pela azida (DAVIES e EDWARDS, 1989), diclofenaco (ZUURBIER et al, 1992), metimazol, quercetina, , rutina, sulfato de rutina, (PINCEMAIL et al, 1988) e ácido salicilidroxâmico (DAVIES e EDWARDS, 1989).

1.4.3 Ácido hipocloroso - HOCl

Em sistemas biológicos, ele pode ser considerado como o mais tóxico e abundante oxidante gerado na ativação dos neutrófilos do sangue. O HOCl é formado ação catalítica da MPO de neutrófilos oxidando íons cloreto na presença de H_2O_2 (LAPENNA e CUCCURULLO, 1996). Segundo Weiss (1989), 10^6 neutrófilos são capazes de produzir cerca de $2 \cdot 10^{-7}$ mol de HOCl após 2 horas de incubação, o que é suficiente para destruir 150 milhões de bactérias *E.coli* em milissegundos. O ácido

hipocloroso é um oxidante extremamente forte e assim também pode atacar biomoléculas importantes como tióis, tioéteres, aminas, aminoácidos, nucleotídeos, ascorbato e ácidos poliênicos (WEISS, 1989; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; EATON, 1991), podendo ainda através de sua ação gerar outras ERO, tais como, oxigênio singlete e radical hidroxil via sua reação com peróxido de hidrogênio e ânion superóxido, respectivamente (WEISS 1989; LAPENNA e CUCCURULLO, 1996). Assim, além de participar do *killing* bacteriano, o HOCl pode provocar dano tecidual, especialmente em áreas inflamadas. Lapenna e Cuccurullo (1996) mostraram que o HOCl pode induzir liberação de zinco de ligações do tiolato como consequência da sua oxidação e, propuseram que este pode ser um mecanismo de proteção durante a inflamação; a interação do HOCl com defesas antioxidantes endógenas, como a enzima removedora de peróxidos ou só do H₂O₂, glutathione peroxidase, pode levar à sua inativação (ARUOMA e HALLIWELL, 1987). A elevada reatividade do HOCl sugere que sua ação tóxica deve ocorrer em locais próximos ao seu sítio de liberação (LAPENNA e CUCCURULLO, 1996).

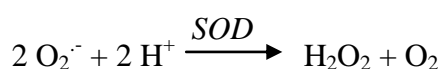
O HOCl pode modificar lipoproteínas de baixa densidade, por oxidação, para uma forma aterogênica, aparentemente como resultado da oxidação de resíduos de lisina da apoproteína B-100 (HAZELL e STOCKER, 1993; HAZEL et al., 1994). O HOCl forma também grupos de oxidantes conhecidos como cloraminas, através da sua reação com aminas primárias ou secundárias prontamente disponíveis em sistemas biológicos (THOMAS et al., 1986; WEISS, 1989).

O HOCl apresenta assim tanto ação protetora (*killing* bacteriano) como agressora aos tecidos, pois, nem células de mamíferos, nem bactérias podem detoxicar o HOCl por via catalítica (como podem fazer com o ânion radical superóxido e o peróxido de hidrogênio, devido à presença das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase), pois, defesas enzimáticas diretas contra oxidantes clorinados estão ausentes (LAPENNA e CUCCURULLO, 1996). A falta de um sistema biológico capaz de remover HOCl pode ser considerada um fenômeno negativo, além de reagir com constituintes somáticos durante processo inflamatório (EATON, 1991). Em tais condições, a presença de substâncias farmacologicamente capazes de antagonizar o HOCl pode ajudar a combater a injúria tecidual. Vários trabalhos indicaram tais propriedades em drogas antiinflamatórias (WASIL et al., 1987), rifampicina e tetraciclina (WASIL et al., 1988) e captopril (ARUOMA et al., 1991). Todavia, se os microorganismos apresentarem sistemas capazes de capturar ou combater o HOCl, os

danos teciduais podem ser ampliados, na ausência de proteção farmacológica. A este respeito, sabe-se que alguns micróbios como a *Pseudomonas aeruginosa* já se encontram protegidos contra o HOCl por uma vesícula de alginato (LEARN et al, 1987).

1.4.4 Peróxido de hidrogênio - H₂O₂

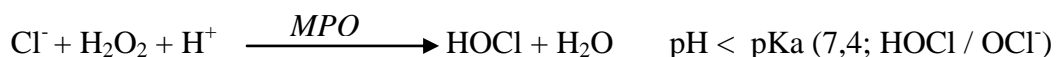
O radical superóxido é convertido a peróxido de hidrogênio pela ação da superóxido dismutase (SOD) ou por dismutação espontânea do radical ânion superóxido.



O H₂O₂ possui atividade bactericida somente em altas concentrações e sua remoção da célula ocorre por ação de enzimas antioxidantes, como catalase e glutathione peroxidase (dependente de selênio).

Apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, o H₂O₂ é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o radical hidroxil (OH·) (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Tem vida longa quando comparado com os outros radicais e é capaz de atravessar camadas lipídicas, podendo reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao íon Fe⁺⁺ (FERREIRA e MATDUBARA, 1997). Assim, é altamente tóxico para as células; esta toxicidade pode ser aumentada em presença de íons ferro (EATON, 1991), como ocorre na hemocromatose transfusional (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Nos neutrófilos, a maior parte do H₂O₂ formado é consumido pela mieloperoxidase que o utiliza para gerar o HOCl.



1.4.5 Anion Radical superóxido

O anion radical $O_2^{\bullet-}$ é formado pela redução monoelétrica do oxigênio; ocorre em quase todas as células aeróbias e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990; 1986). Apesar de ser considerado pouco reativo em soluções aquosas, tem sido observada lesão biológica secundária na presença de sistemas geradores do $O_2^{\bullet-}$, seja enzimático ou químico (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990).

1.4.6 Oxido Nítrico - NO^{\bullet}

O radical NO^{\bullet} é uma molécula gasosa simples, habitualmente encontrada no ar atmosférico em pequenas quantidades, altamente tóxica por ser um radical livre, o que a torna um agente altamente reativo. O NO liga-se à hemoglobina e outras proteínas que contém o grupo heme levando ao término de sua atividade biológica (SNYDER, 1992).

O mecanismo de sinalização intercelular é, em geral, realizado através de receptores na membrana da célula alvo; estes receptores são, habitualmente, transmembranosos tendo contato com citoplasma e desencadeando uma "cascata" de sinais intracelulares que finalizarão em uma mudança na célula. O NO é um importante mensageiro intercelular nos mamíferos superiores. Pelas suas características químicas de alta difusibilidade, a sinalização do NO é exercida diretamente em nível intracelular, sem receptores transmembranosos. Devido à sua penetração intracelular sem intermediários membranosos, o organismo utiliza o NO em funções fisiológicas em que é necessária uma resposta rápida (FILHO et al, 2000).

O NO também faz parte do arsenal de primeira defesa do organismo com poder microbicida. Assim, está demonstrada sua ação antibactericida, antiparasitária e antiviral (DRAPIER 1998; LOWENSTEIN 1993). Nestes casos, o NO atua em concentrações maiores do que as de mensageiro, sendo tóxico aos microorganismos invasores. Existe um tênue limite de concentração tissular entre a não-toxicidade às células do hospedeiro e a toxicidade necessária para ação antimicrobicida. No caso de doenças autoimunes e situações de estresse do organismo, o NO encontra-se em concentrações tóxicas para as células do organismo. Portanto, o NO atua como toxina conforme a concentração e o tecido em questão, devendo ainda ser considerada a

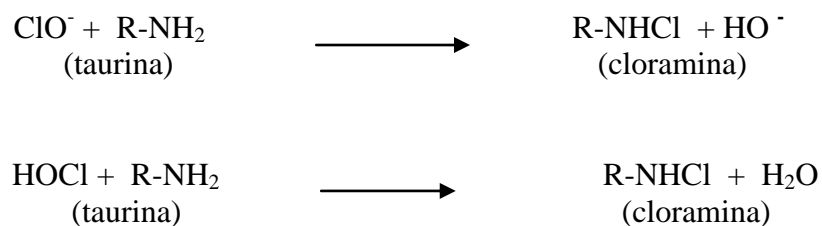
capacidade de depuração tecidual. A tabela 2 resume algumas ações teciduais do NO como mensageiro ou toxina (FILHO et al, 2000).

Tabela 2: Efeitos do NO como mensageiro ou como toxina no mesmo tecido, conforme a concentração tissular relativa (Filho et al, 2000).

Tecido	NO como mensageiro	NO como toxina
Vasos Sanguíneos	Antitrombótico, proteção contra isquemia, anti-aterosclerótico, antiadesivo plaquetário	Choque séptico, inflamação extravasamento microvascular, arteriosclerose
Coração	Perfusão coronariana	Choque séptico.
Pulmão	Manutenção ventilação-perfusão, secreção de muco e defesa imune.	Alveolite autoimune, asma, SARA.
Rins	Feed-back-túbulo-glomerular, perfusão glomerular.	Glomerulonefrite.
SNC	Memória tardia, fluxo sanguíneo e isquemia, secreção neuroendócrina, controle visual e olfativo.	Neurotoxocidade, enxaqueca, hiperalgesia.
Pâncreas	Secreção endócrina e exócrina.	Destruição das células β .
Intestino	Fluxo sanguíneo, peristáltico, secreção exócrina, proteção da mucosa, antimicrobiano e antiparasitário.	Dano de mucosa (hemorragia digestiva), mutagênese.
Tecido Imunológico	Antimicrobiano, antiparasitário, antitumoral.	Antitransplante, inflamação, choque séptico, dano tissular.

1.4.7 Cloraminas

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



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

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

1.5 Doenças associadas às ERO e às ERN

Existem evidências de que as ERO possam estar envolvidas em mais de 50 doenças ou eventos nosológicos. Nos últimos dez anos, foram realizadas inúmeras pesquisas para esclarecer o papel da ERO e ERN em processos fisiopatológicos como envelhecimento, câncer, aterosclerose, inflamação, etc. (FERREIRA e MATSUBARA, 1997), incluindo-se ainda, enfisema, doença respiratória aguda, aterosclerose, injúria por reperfusão e artrite reumatóide (BABIOR, 2000).

Dentre os processos pulmonares associados às ERO estão: enfisema, displasia broncopulmonar, pneumoconiose, toxicidade por bleomicina, paraquat, butilidroxitolueno e fibras minerais, tabagismo, asma e SARA (síndrome da angústia respiratória aguda) (BAST et al., 1991; BOVERIS et al., 1986). Nesta última síndrome, a origem das ERO parece estar associada à ativação neutrofílica pelo complemento (THOMMASEN, 1985). Está bem documentado que após a chegada dos neutrófilos no interstício pulmonar, a ativação destas células gera O_2^- que lesa diretamente a membrana das células intersticiais e do endotélio e, como consequência ocorre lesão

tissular progressiva, pois o neutrófilo ativado também libera enzimas proteolíticas que degradam a elastina do arcabouço pulmonar (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).

O envelhecimento é um evento que pode estar relacionado com as ERO. A teoria dos radicais do oxigênio, desenvolvida por Harman (1956), propõe que o envelhecimento poderia ser secundário ao estresse oxidativo, o que levaria a reações de oxidação lipídica, protéica, e no DNA, que desencadeariam reações lentas e progressivas dos tecidos e do código genético. A pergunta chave é se este estresse oxidativo tem um peso tão importante, a ponto de explicar o fenômeno de envelhecimento. Doenças frequentes na velhice e já consagradas como conseqüentes do estresse oxidativo são a Doença de Parkinson, o Acidente Vascular Cerebral, a Doença de Alzheimer, a esclerose múltipla e catarata (FERREIRA, A.L.A. e MATSUBARA, L.S.; 1997).

Na aterosclerose, a teoria proposta é de que haja afluxo de macrófagos, que, quando ativados, liberam peróxido de hidrogênio e enzimas hidrolíticas, que, além de lesarem as células vizinhas, estimulam a proliferação de músculo liso subendotelial (HALLIWELL, B. e GUTTERIDGE, J.M.C., 1990). A lesão pode ser exacerbada pelo tabagismo, 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, contribuindo para a formação da placa de ateroma (HALLIWELL, B. e GUTTERIDGE, J.M.C., 1990).

1.6 Outros Modelos para Verificar a Ação de Captura de Radicais.

1.6.1 Radicais ABTS^{•+} e DPPH

O radical catiônico do ABTS [*2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)*] é muito utilizado para avaliar as habilidades dos agentes fenólicos como captadores de radicais (PELLEGRINI et al., 1999). O ABTS^{•+} é um radical que pode ser gerado pela reação entre os sais ABTS e persulfato de potássio. A adição de

antioxidante para reduzir o $ABTS^{\bullet+}$ depende da sua atividade, concentração e do tempo de reação. A redução do radical $ABTS^{\bullet+}$ diminui a intensidade em 734nm, absorção característica do $ABTS^{\bullet+}$.

O DPPH (2-2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) é um radical estável muito usado em ensaios antioxidante na área de produtos naturais (*screening* em química orgânica). Dissolvido em etanol e utilizado nos ensaios em concentração de 60 μ M observamos uma diminuição da absorbância em 531nm, na presença de um antioxidante.

2 Objetivo

Considerando a relevância da utilização de compostos de origem natural, em especial os fenólicos na terapêutica, bem como, a prospecção de moléculas para modelagem de fármacos, modelos fármaco-foréticos, e a participação de espécies reativas (radicalares e não radicalares) em processos patológicos e em especial o envolvimento da MPO nesses processos, os objetivos desse trabalho foram: avaliar o perfil de ação do ácido gálico e derivados, sobre sistemas modelos de processos oxidativos *in vitro* e *ex-vivo*, realizando análise comparativa dos dados para verificar estrutura e reatividade nos efeitos observados.

Para isso fez-se os ensaios com:

DPPH;

ABTS;

$O_2^{\bullet-}$;

NO^{\bullet} ;

H_2O_2 ;

Enzima MPO


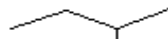
Enzima HRP

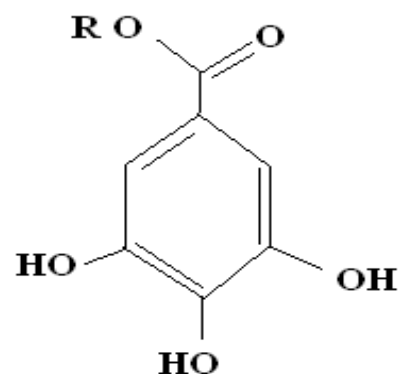
Células sanguíneas.

3 Material e Métodos

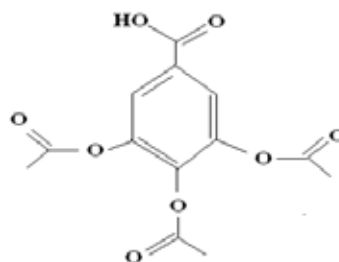
3.1 Preparo das amostras

As amostras foram obtidas em parceria com o NUBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais), coordenado pela Profa. Dra Vanderlan da Silva Bolzani, do Instituto de Química – UNESP – Araraquara. Foram acrescentadas cadeias carbônicas alifáticas na hidroxila do grupamento ácido de até seis carbonos, bem como cadeiras com pequenas ramificações e três grupamentos acetatos nas hidroxilas ligadas ao anel benzeno do ácido gálico.

- | | | |
|--------------|----------------------------|--|
| i) | Ácido gálico (G0) | R = H |
| ii) | Galato de metila (G1) | R = CH ₃ |
| iii) | Galato de etila (G2) | R = CH ₂ CH ₃ |
| iv) | Galato de n-propila (G3) | R = (CH ₂) ₂ CH ₃ |
| v) | Galato de n-butila (G4) | R = (CH ₂) ₃ CH ₃ |
| vi) | Galato de n-pentila (G5) | R = (CH ₂) ₄ CH ₃ |
| vii) | Galato de n-hexila (G6) | R = (CH ₂) ₅ CH ₃ |
| viii) | Galato de isopropila (Gi3) | R =  |
| ix) | Galato de isobutila (Gi4) | R =  |



- x)** Triacetato de Ácido gálico. (GAT)



Os compostos foram dissolvidos em etanol absoluto e foram realizadas diluições com etanol absoluto conforme o necessário para cada ensaio.

3.2 Equipamentos

Ensaio espectrofotométricos foram realizados no Espectrofômetro U-3000, Hitachi, acoplado a uma *workstation* com o software Windows 3.1, com cela termostaticada à 37°C; ou no Espectrofômetro HP 8453, Diode Array, acoplado a um computador tipo PC Pentium III da HP. Para as leituras, foram utilizadas celas de quartzo (volume de 1ml) com 1 cm de caminho ótico (c.o.).

Ensaio cinéticos foram realizados em equipamento espectrofotômetro Ocean Optics UV/VIS acoplado a um computador com Windows XP e a um *peltier* com cela termostaticada de acordo com a temperatura de cada cinética.

3.3 Estudos com sistemas *in vitro*, não enzimáticos.

3.3.1 Ensaio de Captura para o ABTS^{•+}

O radical catiônico do ABTS [2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] é corriqueiramente utilizado para avaliar as habilidades dos agentes fenólicos como *scavengers* de radicais (PELLEGRINI et al., 1999). O ABTS^{•+} é um radical gerado pela reação entre os sais ABTS e persulfato de potássio. O ensaio foi realizado segundo Pellegrini et al. (1999), observando-se o decréscimo da absorvância em 734nm, após 30 minutos de incubação com a amostra.

3.3.2 Ensaio de Captura para o DPPH.

O DPPH (radical estável) é dissolvido em etanol e utilizado nos ensaios em concentração de 60µM. O ensaio foi realizado segundo Soares et al. (1997), observando-se o decréscimo da absorvância em 531nm, após 15 minutos de incubação com a amostra.

3.3.3 Ensaio de Captura para o HOCl e H₂O₂

A ação dos compostos sobre o HOCl e sobre o H₂O₂ foi avaliada sobre o sistema de oxidação do TMB (tetrametilbenzidina) (COSTA M. et al 2004; CHAPMAN et al

2003; XIMENES et al 2005) e no sistema de oxidação do TNB a DTNB segundo Velloso (2005), respectivamente.

O TMB foi preparado com dimetilformamida, ácido acético 0,8M e iodeto de potássio 10mM. O TNB (ácido 5-tio-2nitrobenzóico) foi preparado, a partir do DTNB (ácido 5-5'-ditio (2-nitrobenzóico), com a concentração será determinada espectrofotometricamente, através do seu coeficiente de extinção molar ($13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), em 412nm (CHING et al., 1994). Da mesma forma serão determinadas as concentrações: para o HOCl ($350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ em 295nm; ZGLICZYNSKI et al., 1971) e para o H_2O_2 ($80 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ em 230nm; BRESTEL, 1985). As reações foram efetuadas em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4 a 25°C (q.s.p. volume final da reação=1mL).

3.3.4 Ensaio de Captura do $\text{O}_2^{\bullet-}$.

O ensaio foi realizado em solução de pirofosfato de sódio (25mM, pH 8,3), segundo Kakkar et al. (1984). Neste sistema o ânion superóxido é gerado pela reação entre metassulfato de fenazina e NADH, reage com NBT formando um produto colorido (formazana).

A intensidade de cor foi medida em 560nm.

3.3.5 Ensaio de Captura para o Óxido Nítrico.

O efeito de captura das amostras sobre o óxido nítrico foi avaliado de acordo com Yen et al. (2001) em tampão fosfato 50mM, pH 7,4 e nitroprussiato de sódio (25mM). O NO foi identificado com o reagente de Griess. As leituras de absorbância foram feitas no comprimento de onda de 570nm.

3.3.6 Ensaio de Captura para as Cloraminas.

O HOCl reage com o aminoácido taurina formando a taurina cloramina (ZGLICZYNSKI, 1971). O ensaio foi realizado segundo Velloso (2005) observando o decréscimo da absorbância em 652nm da reação que permanece durante 5 minutos para a formação da taurina cloramina e posteriormente mais 10 minutos de incubação na presença da amostra.

3.4 Estudos com sistemas *in vitro*, enzimáticos.

3.4.1 Ação na oxidação do guaiacol por HRP (peroxidase modelo clássico).

A concentração de HRP em solução foi determinada através do seu coeficiente de extinção molar em 403nm, $102.000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (OHLSON & PAUL, 1976). A cinética de oxidação do guaiacol pela HRP (10^{-9}M), H_2O_2 (0,3mM), foi realizado em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4 a 25°C. A reação foi seguida à 470nm por 2 minutos (KHALIL, 2002). Foi determinada a velocidade inicial (V_0) de reação através da tangente calculada a partir do gráfico de cinética no tempo de dois minutos, na ausência e presença das amostras.

3.4.2 Ação na oxidação do guaiacol pela MPO humana.

A MPO utilizada foi obtida pela separação em gelatina de células brancas humanas e estas foram congeladas para serem lisadas e então liberar a peroxidase. A oxidação do guaiacol pela MPO, H_2O_2 (0,4mM), foi feita em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4 a 37°C. A reação foi seguida à 470nm por 2 minutos (KHALIL, 2002). A V_0 foi determinada na ausência e na presença das amostras. O tipo de inibição foi estudado pelos gráficos de duplo-recíproco ($1/V_0$ versus $1/[\text{Substrato}]$) da oxidação das concentrações variadas de guaiacol pela MPO na presença de H_2O_2 em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4 37°C.

3.5 Estudo com sistemas celulares “*ex vivo*”.

3.5.1 Toxicidade sobre Eritrócitos: Hemólise.

A capacidade hemolítica do ácido gálico e seus derivados foi estudada através da liberação da hemoglobina presente dentro dos eritrócitos (VISSERS et al, 1998). A hemoglobina foi medida pela leitura da absorbância em 414nm. Essa leitura foi efetuada no sobrenadante da suspensão de células a 5% em tampão fosfato de sódio 10mM pH7,4 após a incubação por 4 horas a 37°C.

Os eritrócitos foram obtidos a partir do sangue total coletado de voluntários sadios em tubo a vácuo contendo EDTA. Essas células foram lavadas com tampão PBS (10mM de fosfato de sódio e 154mM de NaCl pH7,4).

3.5.2 Toxicidade sobre os Eritrócitos com o radical HOCl.

A capacidade de proteção do ácido gálico e seus derivados frente à hemólise provocada pelo radical HOCl foi estudada através da liberação da hemoglobina presente dentro dos eritrócitos. A liberação da hemoglobina foi medida pela leitura de absorbância em 414nm após 4 horas de incubação a 37°C.

3.5.3 Toxicidade sobre Eritrócitos com radical AAPH.

A capacidade de proteção do ácido gálico e seus derivados foi estudada através da hemólise provocada pelo radical AAPH (2'-azo-bis (2-amidinopropane) dyhydrochloride) 25mM (YANG et al, 2006) em suspensão de eritrócitos a 5% (tampão fosfato de sódio 10mM/ NaCl 150mM, pH7,4, 37°C). A liberação da hemoglobina foi avaliada após 2 horas de incubação através das leituras de absorbância em 414nm.

3.5.4 Toxicidade sobre neutrófilos com corante supra-vital: azul de Trypan.

As células foram obtidas a partir do exsudato peritoneal de ratos. A inflamação foi induzida com glicogênio de ostra e após 12 horas foram retiradas com tampão PBS sem cálcio, lavadas e ressuspendidas no mesmo tampão. Essas células foram contadas em câmara de Neubauer para saber a quantidade total de células presentes na suspensão.

A citotoxicidade do ácido gálico e seus derivados foi avaliada através do teste com corante supra-vital Azul de Trypan (KHALIL, 2002; MIAN et al, 2008). A citotoxicidade foi avaliada por contagem em câmara de Neubauer da suspensão de 1×10^6 células sendo contadas em um número total de 200 células entre vivas e mortas após o tempo de incubação de 2 horas. As células foram incubadas na presença e na ausência de um estímulo PMA em tampão PBS-D pH7,4 (37°C). As células consideradas vivas não são coradas pelo corante, ao contrário das mortas que são coradas porque o corante consegue penetrar nas células.

3.6 Análises Estatísticas.

Os resultados, de triplicatas, estão expressos em média e desvio padrão e foram analisados pela ANOVA onde se estabelece o nível de significância como $p < 0,05$.

3.7 Descarte de Resíduos

Os resíduos gerados serão descartados de acordo com o planejamento de gerenciamento de resíduos organizado pela Coordenadoria de Análises Clínicas e Hemoterapias (CACH) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP de acordo com a RDC número 306 de 7 de dezembro de 2004 a qual se trata do Regulamento Técnico para o Gerenciamento de Resíduos de Serviço de Saúde.

Resíduos químicos não tóxicos foram descartados na pia sob água abundante. Os resíduos químicos tóxicos orgânicos foram tratados com hipoclorito e descartados em recipientes apropriados. No caso de resíduos perfurocortantes, foram descartados em recipientes de papelão ou plástico rígidos com identificação. Resíduos químicos tóxicos foram armazenados em recipientes de plástico que não reaja com a substância ali contida com identificação.

4 Resultados e Discussão

4.1 Interações com sistemas *in vitro* não enzimáticos - Radicais e ERO.

A capacidade antioxidante de uma substância é determinada por uma série de propriedades. Uma dessas propriedades é a capacidade *scavenger* de espécies reativas do oxigênio, o que depende da conformação espacial do ácido gálico e dos galatos, além da força de interação e da capacidade de ionização que interfere em sua capacidade de atingir os radicais livres ou de interagir com os sítios oxidativos de outras espécies reativas do oxigênio (ERO).

Os resultados foram analisados e comparados em relação ao ácido gálico (G0). Escolhemos G0 como padrão por ser a molécula mais simples neste trabalho, e através das substituições nessa molécula, procurou relacionar a estrutura substituinte com a atividade de captura de radicais e ERO assim como o efeito desses compostos em sistemas celulares.

As análises foram feitas através do valor de IC₅₀ que é a menor concentração do composto capaz de capturar 50% do radical ou ERO presente no meio reacional. Comparamos também os compostos que tiveram menor IC₅₀, uma vez que mostraram serem melhores do que o padrão escolhido, com a finalidade de saber quais deles tem diferença estatística.

4.1.1 Ensaio de Captura para o ABTS^{•+}

O radical ABTS é muito usado para ensaios de potencial antioxidante e iniciamos nossos ensaios com este radical. Nesse ensaio pode-se observar (figura 4 e tabela 3), que todos os compostos estudados atingiram o IC₅₀ do ABTS^{•+} de 0,311µM a 3,48µM. A amostra que teve maior inibição em comparação com todas as outras foi o GAT mostrando ser uma amostra com maior potencial do efeito de captura do radical ABTS^{•+}.

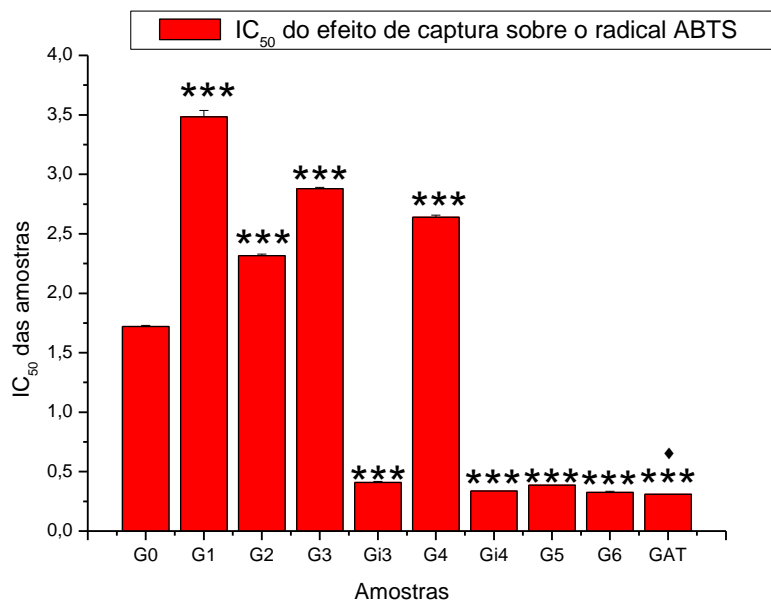


Figura 4: IC₅₀ do efeito da captura sobre o radical ABTS^{•+} em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,4; incubação por 30 minutos. $\lambda = 734\text{nm}$.

*** **P > 0,01** Quando comparadas as amostras ao G0.

♦ **P = 0,002** Quando comparadas as amostras Gi4 com GAT.

Tabela 3: IC₅₀ das amostras sobre o radical ABTS^{•+}.

Amostras	IC ₅₀ μM	Desvio Padrão
G0	1,72	0,01
G1	3,48	0,05508
G2	2,32	0,01155
G3	2,88	0,01
Gi3	0,41	0,01097
G4	2,64	0,01732
Gi4	0,34	0
G5	0,39	0
G6	0,33	0,00808
GAT	0,31	0

Quando comparada ao padrão G0, as amostras que tiveram um potencial de melhor captura sobre o radical ABTS^{•+} foram a Gi3, Gi4, G5, G6 e GAT. Isso pode indicar que os substituintes de maior cadeia carbônica ou com ramificações influenciam o efeito em relação ao ácido gálico. Na figura 4 se observa que há relevância estatística de todas as amostras quando comparadas ao G0. As três amostras com menor IC₅₀ (Gi4,

G5 e G6) foram comparadas e a amostra GAT. A amostra GAT em relação à amostra G6 não é estatisticamente diferente porém quando comparada à amostra G4 e G5 são estatisticamente diferentes. Assim para esse ensaio as amostras G6 e GAT são as melhores para a captura do radical ABTS^{•+}. O potencial de captura parece estar relacionado com o aumento do número de átomos de carbono da cadeia substituinte e também com o número de duplas ligações presentes na molécula. Para a amostra GAT há três substituintes acetatos, assim o número de duplas ligações nessa molécula é maior que nas demais amostras. A amostra pode capturar o elétron desemparelhado neutralizando o radical. Esse elétron entra em ressonância com as duplas ligações conferindo maior estabilidade para o elétron e neutralizando o radical.

4.1.2 Ensaio de Captura para o DPPH.

O radical DPPH assim como o radical ABTS também é muito usado para análise do potencial antioxidante. Como mostrado na figura 5 e tabela 4 o G1 teve inibição semelhante ao padrão. Compostos com substituintes com dois (G2) e três (G3) carbonos tiveram desempenho melhor para a capacidade de captura do radical DPPH, pois nas concentrações de 37,23 μ M e 39,04 μ M observa-se uma inibição de 50% enquanto que essa inibição somente foi atingida com o padrão em concentrações de 48,15 μ M.

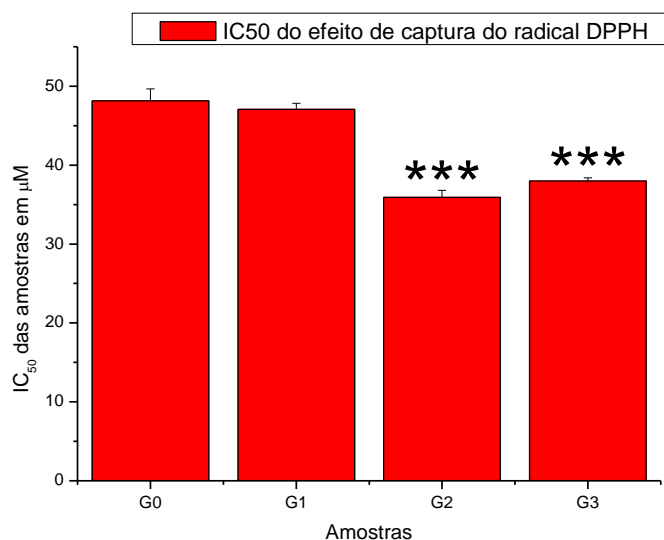


Figura 5: IC₅₀ do efeito de captura sobre o radical DPPH (60µM) pelas amostras em etanol absoluto com incubação de 15 minutos; $\lambda=531\text{nm}$.

*** **P < 0,001** Quando comparadas as amostras com o padrão G0.

Tabela 4: IC₅₀ do efeito de captura sobre o radical DPPH.

Amostras	IC ₅₀ µM	Desvio Padrão
G0	48,15	1,52207
G1	47,07	0,76265
G2	35,91	0,89152
G3	37,97	0,42036

As amostras G2 e G3 tiveram um IC₅₀ menor que o G0 indicando, que essas amostras possuem um potencial maior que as demais. Além disso, quando comparadas com o G0 essas amostras mostram diferença estatística. Quando comparadas, G2 e G3 não apresentam diferença estatística, portanto são iguais em relação ao potencial de captura do radical DPPH. Essas amostras, por terem cadeias carbônicas menores, podem conferir melhor captura do elétron desemparelhado do radical DPPH. Esse elétron entra em ressonância com as duplas ligações tanto do ácido carboxílico presente na molécula como também com as duplas ligações do anel aromático.

4.1.3 Ensaio de Captura para o HOCl.

O efeito do ácido gálico e seus ésteres sobre o HOCl, foi realizado pela redução do TMB. Na figura 6 e tabela 5 viu-se que todas as amostras apresentam maior atividade de captura para o HOCl, em relação ao G0. Entre todas as amostras, as de maior capacidade de captura foram GAT, G3 e G5 que são as amostras com maiores números de substituintes em cadeias alifáticas de 3 a 5 carbonos e o triacetato de ácido gálico. Pela análise estatística as amostras G3 e G5 quando comparadas com o GAT foram estatisticamente diferentes. Portanto o composto GAT foi o melhor em relação ao G0 e em relação às amostras que tiveram o IC₅₀ menor, G3 e G5.

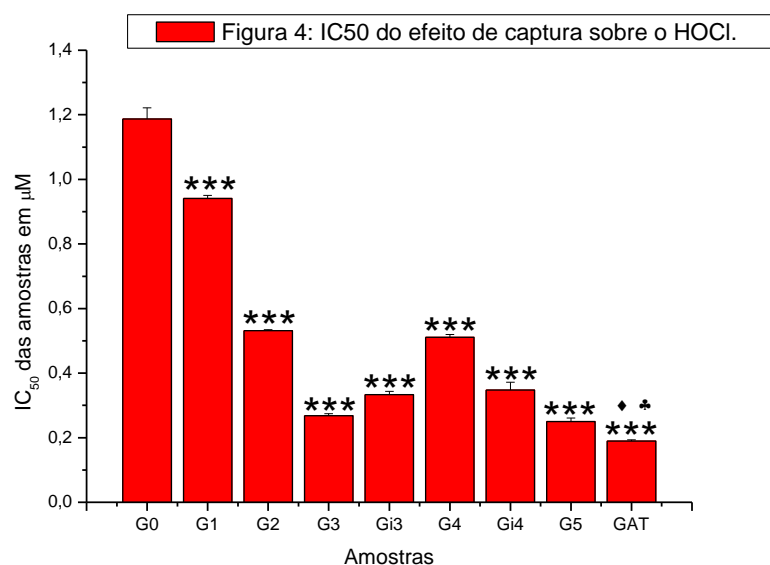


Figura 6: IC₅₀ do efeito de captura sobre o HOCl; tampão fosfato de sódio 50mM pH7,4; TMB 2,8mM; incubação de 10 minutos e revelação com TMB $\lambda = 652\text{nm}$.

*** **P < 0,001** Quando comparadas as amostras com o padrão G0.

♦ **P < 0,001** Quando comparada a amostra G3 com a amostra GAT.

♣ **P < 0,001** Quando comparada a amostra G5 com a amostra GAT.

Tabela 5: IC₅₀ do efeito de captura sobre o HOCl.

Amostras	IC ₅₀ μM	Desvio Padrão
G0	1,19	0,03512
G1	0,94	0,00971
G2	0,53	0,00346
G3	0,27	0,006
Gi3	0,33	0,01039
G4	0,51	0,0085
Gi4	0,35	0,02411
G5	0,25	0,01102
GAT	0,19	0,00404

Pelos resultados observados nesse teste quanto maior a cadeia substituinte, maior a capacidade antioxidante pela amostra a partir do substituinte com dois carbonos. O aumento da capacidade antioxidante das amostras com maiores substituintes pode estar atribuída a maior facilidade de reações de halogenação com o íon cloreto inativando assim o íon OCl⁻. Essa facilidade está ligada a cadeias maiores porque os carbonos não estão sob eletronegatividade causada pelo átomo de oxigênio. Além dessas reações, a amostra GAT, que tem melhor atividade frente a essa espécie, pode agir inativando o elétron desemparelhado através de ressonância nas duplas ligações presentes nos substituintes acetatos da molécula. Além disso, esse elétron também pode entrar em ressonância com as duplas presente no anel aromático, conferindo assim maior capacidade antioxidante dessa amostra frente ao íon OCl⁻. Todas as amostras quando comparadas com o padrão G0 tiveram uma diferença estatística relevante.

4.1.4 Ensaio de Captura para o H₂O₂.

Para o ensaio de captura para H₂O₂ as amostras não apresentaram inibição eficiente, ou seja nenhuma amostra atingiu o IC₅₀ nas concentrações testadas. Algumas amostras mostraram baixa capacidade antioxidante o que é importante, pois, é difícil substâncias capazes de capturar essa ERO. Geralmente uma substância que captura outras espécies reativas não consegue capturar H₂O₂.

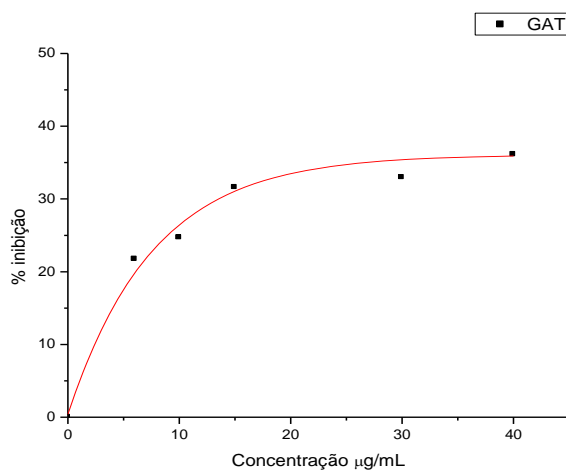
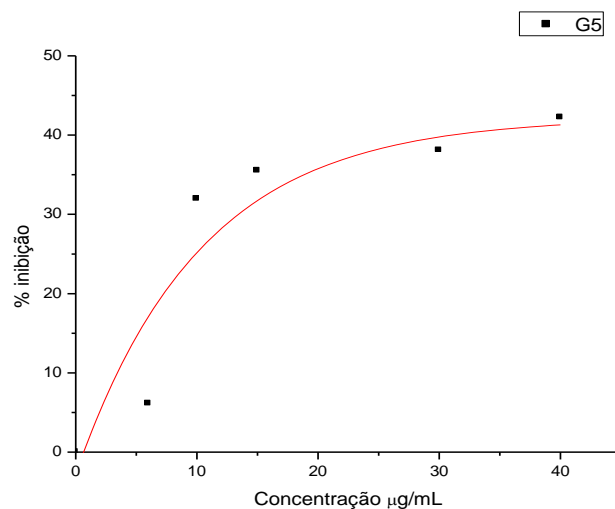
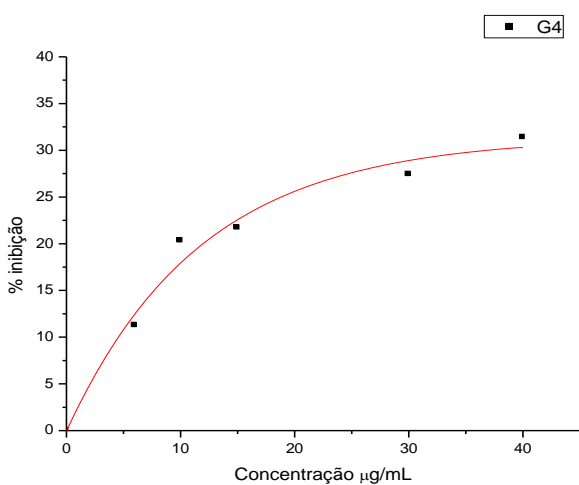
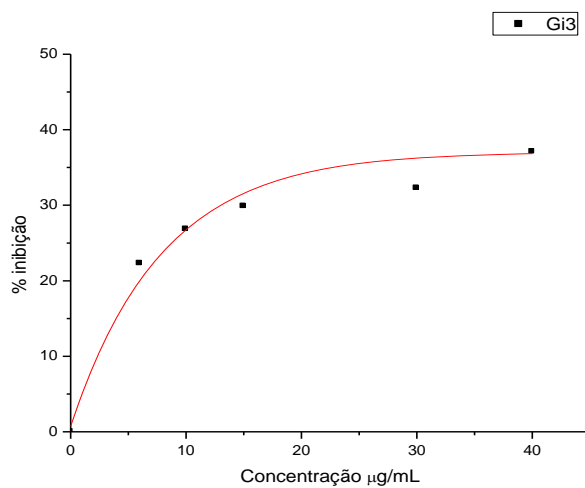
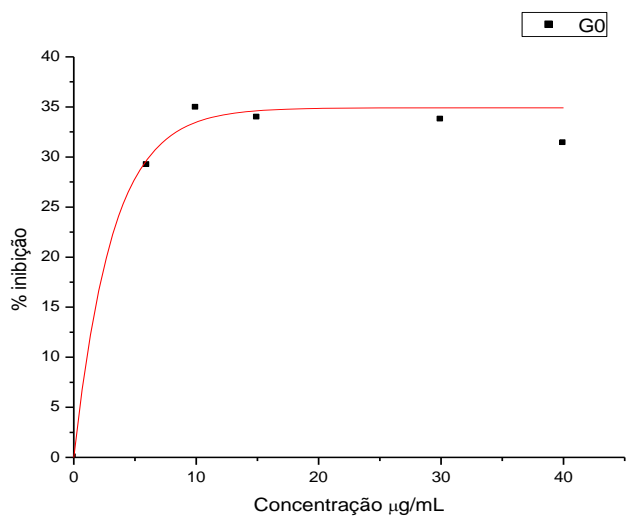


Figura 7: Inibição da captura do H_2O_2 das amostras G0, Gi3, G4 G5 e GAT em meio reacional com tampão fosfato de sódio 50mM pH7,4 e TNB (80µM).

As amostras apresentadas na figura 7 mostraram pequena capacidade antioxidante frente ao H_2O_2 . Observa-se que as amostras com cadeias carbônicas com substituintes de 3 a 5 carbonos foram as que tiveram melhor atividade dentre as amostras testadas. Pode ser devido à menor eletronegatividade do átomo de oxigênio frente aos últimos átomos de carbono, o que confere maior possibilidade de reação com os átomos de hidrogênio ocorrendo a formação de H_2O e, portanto inativação do H_2O_2 .

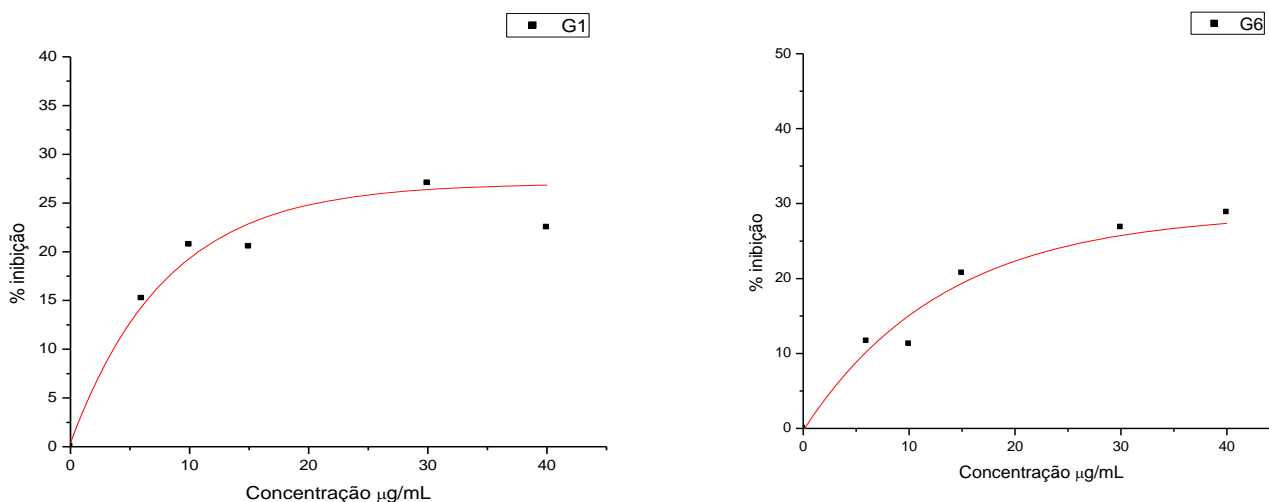


Figura 8: Inibição da captura do H_2O_2 das amostras G1 e G6 em meio reacional com tampão fosfato de sódio 50mM pH7,4 e TNB ($80\mu M$).

As amostras G1 e G6 apresentaram pequena atividade antioxidante frente ao H_2O_2 , mas com menor capacidade que as amostras citadas anteriormente. Essas amostras (figura 8), mesmo com o aumento da concentração não conseguem atingir 30% de inibição do H_2O_2 .

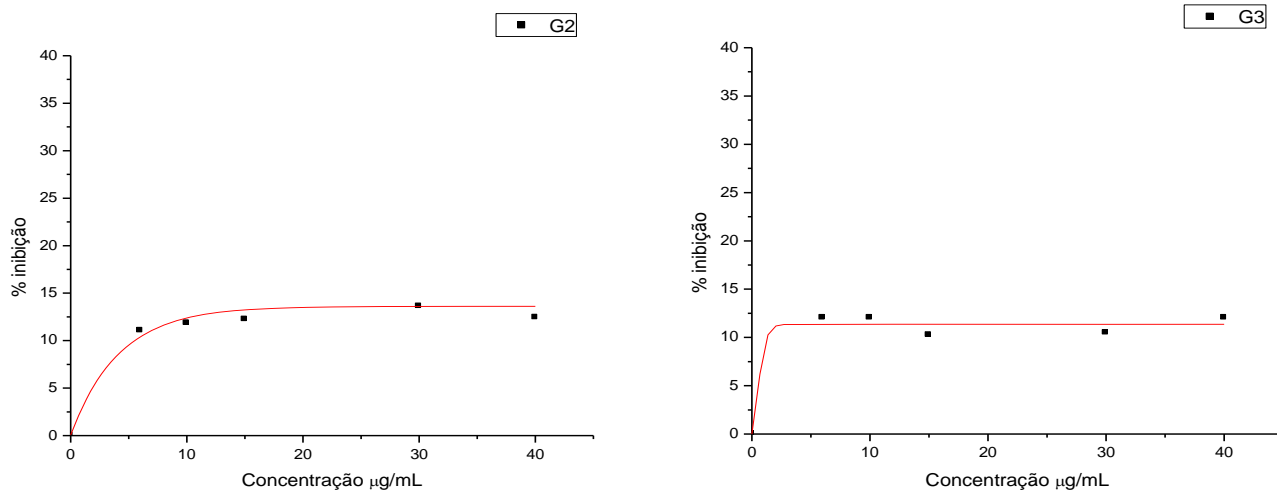


Figura 9: Inibição da captura do H_2O_2 das amostras G2 e G3 em meio reacional com tampão fosfato de sódio 50mM pH7,4 e TNB ($80\mu M$).

As amostras G2 e G3 (figura 9) apresentaram apenas 10 % de inibição como mostrada nas figuras. Como são amostras com substituintes menores, a baixa atividade de captura do H_2O_2 pode estar relacionada com a menor quantidade de átomos de hidrogênio nas cadeias substituinte conferindo então, menor capacidade de reagir com essa ERO.

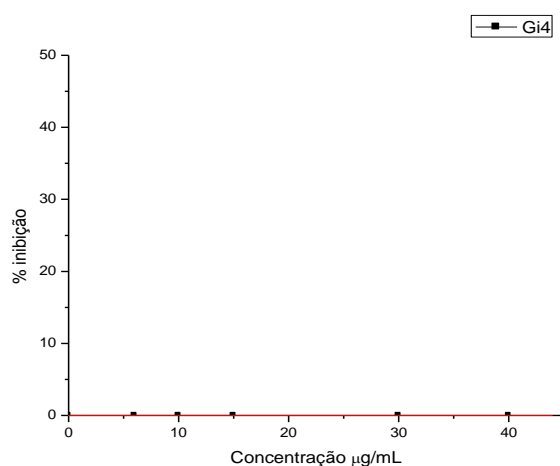


Figura 10: Inibição da captura do H_2O_2 da amostra Gi4 em meio reacional com tampão fosfato de sódio 50mM pH7,4 e TNB ($80\mu M$).

Na figura 10, a amostra Gi4 não apresentou capacidade de seqüestro do H_2O_2 . A amostra G0 demonstrou atividade frente ao H_2O_2 , porém quando adicionado o substituinte com quatro carbonos de cadeia ramificada não há atividade. Isso demonstra que para esse ensaio essa substituição inativa a atividade do ácido gálico.

Estudos com alguns antioxidantes, por exemplo, β - caroteno, α -tocoferol, quercetina e ácido ascórbico, mostraram que a capacidade de captura do peróxido de hidrogênio não está relacionada à lipofilicidade das moléculas e sim a outros requisitos estruturais (ARNOUS et al, 2002)

4.1.5 Ensaio de Captura para o $O_2^{\cdot-}$.

Neste ensaio, podemos observar que a amostra GAT foi a mais eficiente quando comparada ao G0 (tabela 6 e figura 11). Amostras como Gi3, G4 e G5 mostraram inibição sobre o radical superóxido, mas não com tanta eficiência como a amostra GAT. As amostras Gi3 e G4, não têm diferença estatística entre si, mas quando comparadas com a amostra G5 tiveram diferença estatística. Já a amostra G5 mostrou melhor inibição do que as amostras Gi3 e G4 e quando comparada com a amostra GAT foram estatisticamente diferentes. Neste ensaio pode ocorrer a ressonância do elétron livre do radical, pois a amostra GAT possui mais duplas ligações como descrito para o radical ABTS. Substâncias derivadas de flavonóides podem ser bons antioxidantes, pois os flavonóides têm efetiva ação antioxidante para a captura de anion superóxido (ROBACK e GLYGLEWSKI, 1988).

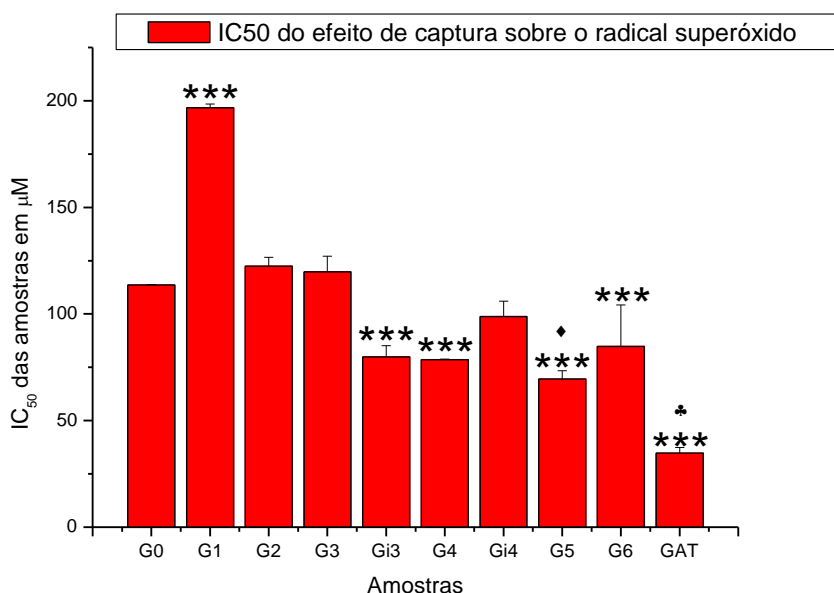


Figura 11: IC₅₀ do efeito de captura sobre o radical superóxido em meio reacional com tampão pirofosfato de sódio 25mM pH8,3, NBT 90μM, NADH 116 μM, PMS 15 μM. Incubação de 2 minutos e adição de ácido acético 5% e 10 minutos de incubação. $\lambda = 560\text{nm}$

*** **P < 0,001** Amostras comparadas com o padrão G0

♦ **P < 0,001** Amostras Gi3 e G4 comparadas com o G5.

♣ **P < 0,001** Amostra G5 comparada com a GAT.

Tabela 6: IC₅₀ do efeito de captura sobre o radical superóxido

Amostras	IC ₅₀ μM	Desvio Padrão
G0	113,53	0,34064
G1	196,65	1,84578
G2	122,47	4,15005
G3	119,80	7,275
Gi3	79,89	5,28081
G4	78,55	0,26558
Gi4	98,83	7,15767
G5	69,52	3,81605
G6	84,72	19,50854
GAT	34,80	2,59116

4.1.6 Ensaio de Captura de Óxido Nítrico.

A figura 12 e Aa tabela 7 apresentam os dados das amostras G1, G2 e G3, mostrando maior inibição comparada com o ácido gálico. Pode-se observar que as amostras com menores substituintes tiveram um potencial de captura do radical óxido nítrico melhor do que as demais amostras. Essas amostras possuem substituintes de 1 (um) átomo de carbono até 3 (três) átomos de carbono na cadeia.

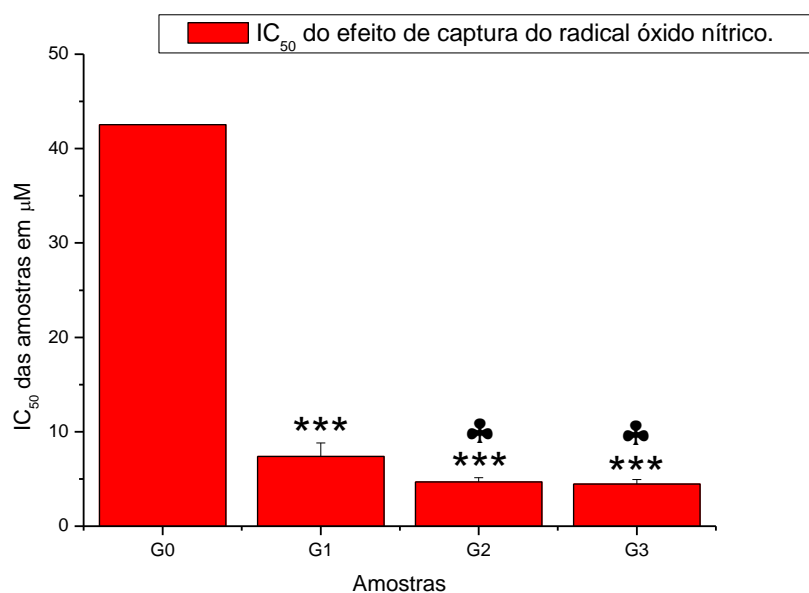


Figura 12: IC₅₀ do efeito de captura do radical óxido nítrico em meio reacional contendo nitroprussiato de sódio 12,5mM em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4. Incubação de 1 hora e meia e revela com Reagente de Griess.

*** **P < 0,001** Amostras comparadas com o padrão G0.

♣ **P < 0,005** Amostra G1 comparada com as amostras G2 e G3.

Comparando estatisticamente as amostras pelo IC₅₀ (tabela 7) há diferença significativa entre a amostra G0 e as amostras G1, G2 e G3. Isso significa que essas amostras têm o mesmo efeito sobre o radical óxido nítrico quando comparadas com G0. Comparando a amostra G1 com as amostras G2 e G3 houve diferença estatística significativa.

Tabela 7: IC₅₀ do efeito de captura sobre o radical óxido nítrico.

Amostras	IC ₅₀ µM	Desvio Padrão
G0	42,54	0
G1	7,37	1,45523
G2	4,69	0,44061
G3	4,46	0,47697

4.1.7 Ensaio de captura da Taurina Cloramina.

Na figura 13 e tabela 8 pode-se observar que a amostra GAT foi a única que apresentou inibição sobre o radical taurina cloramina. Esse resultado pode ser explicado porque os substituintes dessa molécula proporcionam maior polaridade e assim podem reagir melhor com as cloraminas. A amostra GAT mostrou atividade superior que o G0 indicando ter um maior potencial antioxidante, possivelmente pelo mesmo motivo citado em ensaios como de captura de $ABTS^{\bullet+}$ e radical superóxido.

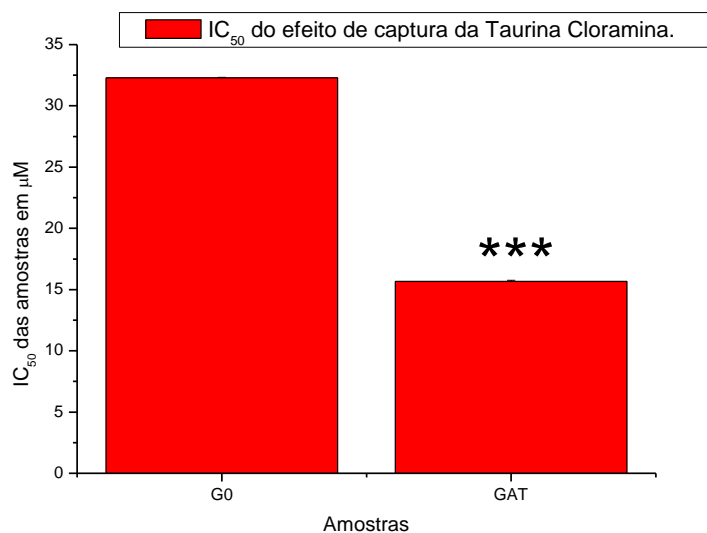


Figura 13: IC₅₀ do efeito de captura da Taurina Cloramina em meio reacional contendo taurina 30µM e HOCl 30µM em tampão fosfato de sódio 50mM pH 7,4. Incubação de 5 minutos e posterior adição de amostra. Incubação de 10 minutos e revelação com TMB.

*** $P < 0,001$ Amostra G0 comparada com a amostra GAT.

Observando na tabela 8 pode-se observar que quando comparado o IC₅₀ das amostras temos diferença estatística significativa.

Tabela 8: IC₅₀ do efeito de captura sobre o radical taurina cloramina.

Amostras	IC₅₀ μM	Desvio Padrão
G0	32,29	0,04583
GAT	15,67	0,08185

4.2 Interação com sistemas *in vitro*, enzimáticos.

4.2.1 Oxidação do guaiacol pela HRP.

A HRP é uma peroxidase clássica no estudo de inibição ou catalisação por peroxidases. Assim para avaliar a possível especificidade das amostras em inibir a MPO estudou-se a inibição da HRP, através da oxidação do guaiacol na presença de peróxido de hidrogênio.

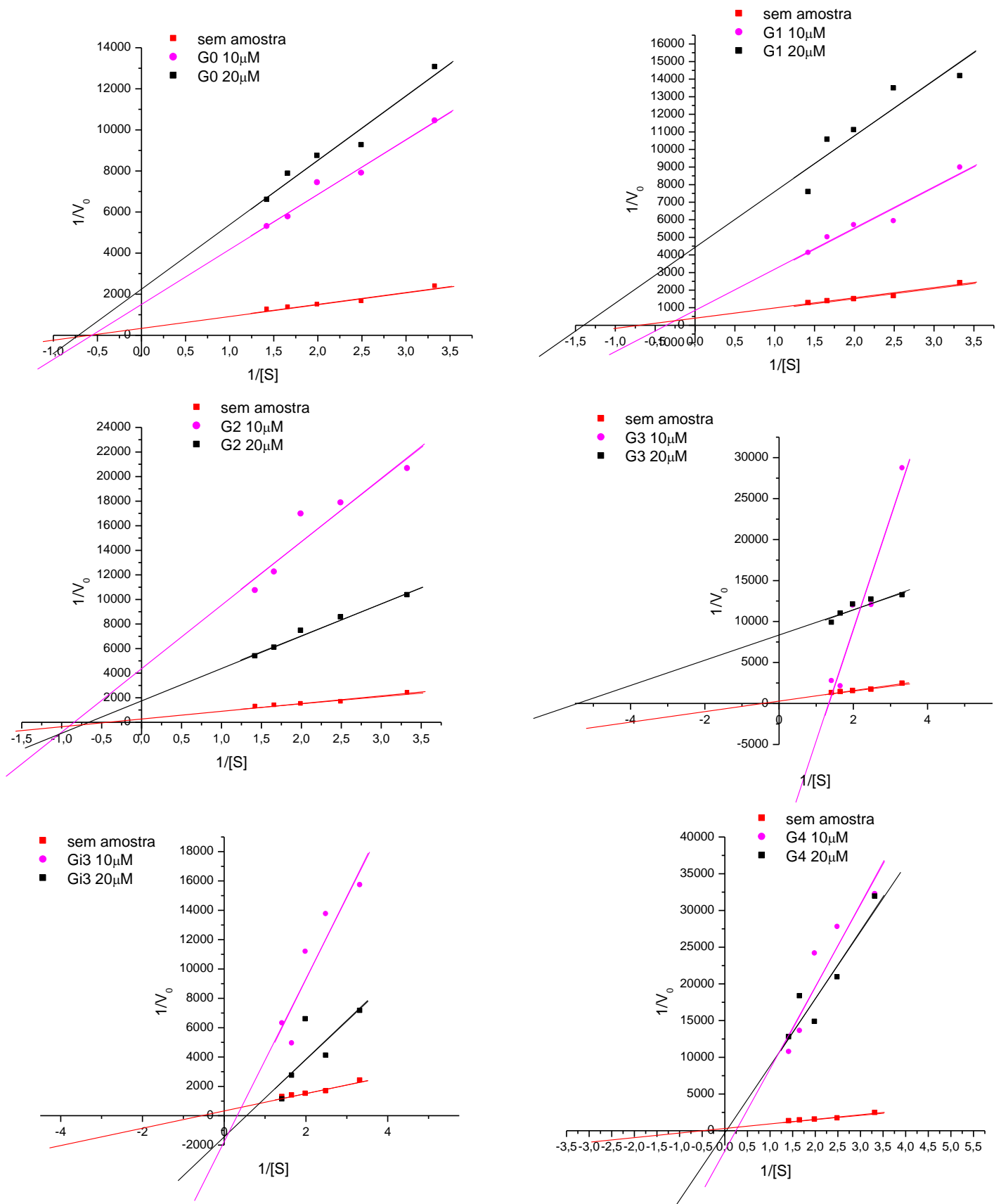


Figura 14: Gráfico Duplo-Recíproco da inibição da HRP ($0,01\mu\text{M}$) pelas amostras em tampão fosfato de sódio 50mM , $\text{pH}7,4$ a 25°C monitorada durante dois minutos a 470nm .

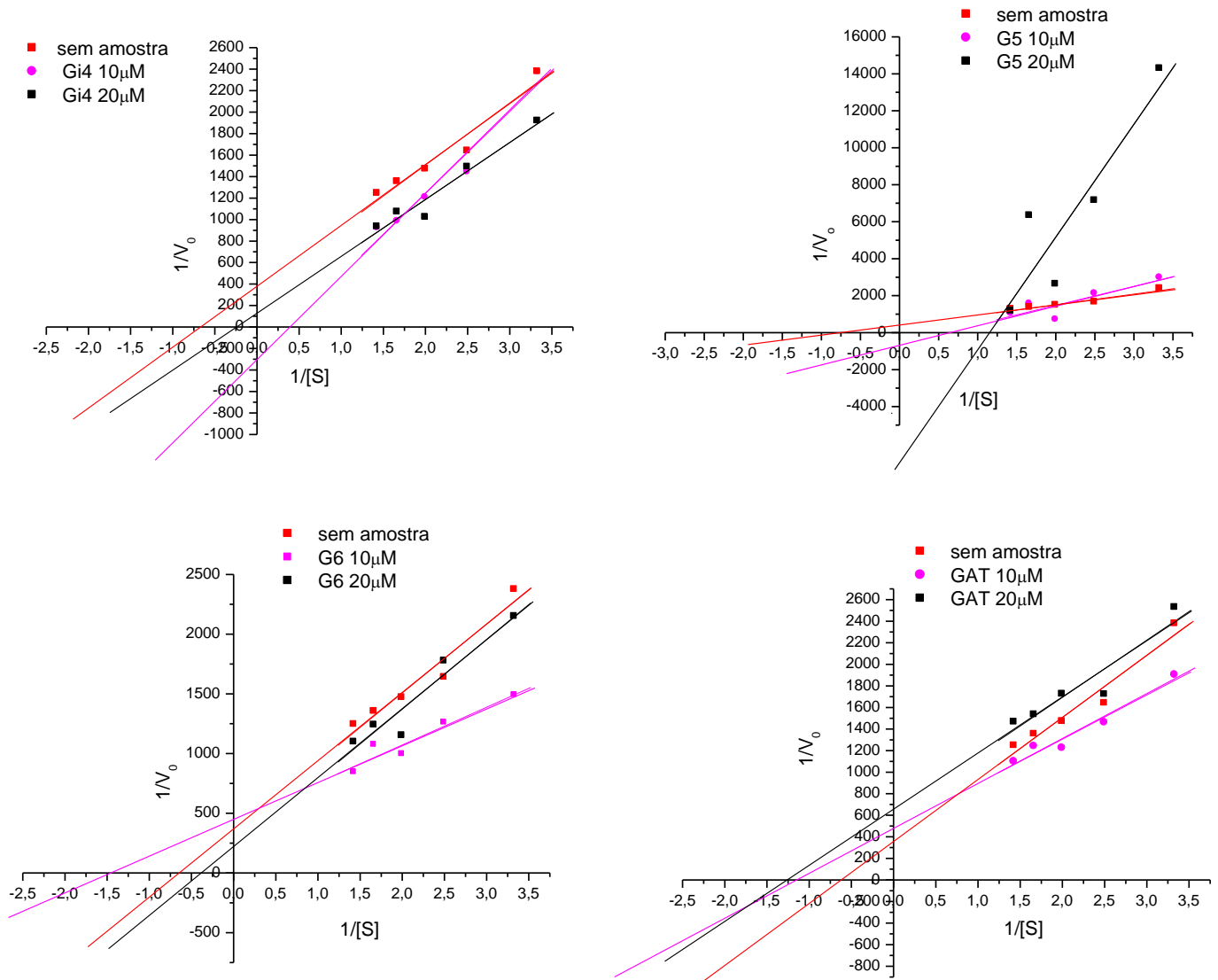


Figura 15: Gráfico Duplo-Recíproco da inibição da HRP ($0,01\mu\text{M}$) pelas amostras em tampão fosfato de sódio 50mM , $\text{pH}7,4$ a 25°C monitorada durante dois minutos a 470nm .

Como observado nas figuras 14 e 15 as amostras apresentam capacidade inibidora da HRP.

A HRP age na oxidação de uma variedade de substratos através de uma interação inicial da enzima nativa com peróxido de hidrogênio, promovendo alteração conformacional na enzima, e assim expondo o seu sitio ativo originando a HRP-I, que interage imediatamente com o substrato formando o composto HRP-II. A HRP-II é capaz de converter o substrato em produto e assim voltar à forma nativa (KHALIL, 2002). As amostras apresentaram inibição não competitiva ou mista. Inibições mistas geralmente ocorrem em reações catalisadas por enzimas com dois ou mais substratos. Pelos resultados mostrados, as amostras apontam inibição em um sistema que varia a

concentração do guaiacol sendo assim elas podem se ligar a sítios diferentes do sítio de oxidação do guaiacol.

4.2.2 Oxidação do guaiacol pela MPO.

Nesse sistema enzimático MPO/Guaiacol/ H_2O_2 na presença e na ausência das amostras analisamos através do gráfico Duplo-Recíproco ou de Lineweaver-Burk o tipo de inibição causada pelas amostras. O método constitui na capacidade das amostras de inibirem a enzima MPO sendo assim, a formação da forma do guaiacol oxidada (dihidroguaiacol) não ocorre. As amostras possuem a capacidade muito pequena de capturar o H_2O_2 , além disso, a concentração de H_2O_2 usada para a reação com MPO é bem maior que a usada no teste de captura dessa ERO, portanto a não formação do dihidroguaiacol deve ser apenas pela inibição enzimática. As cinéticas foram acompanhadas à 470nm durante dois minutos.

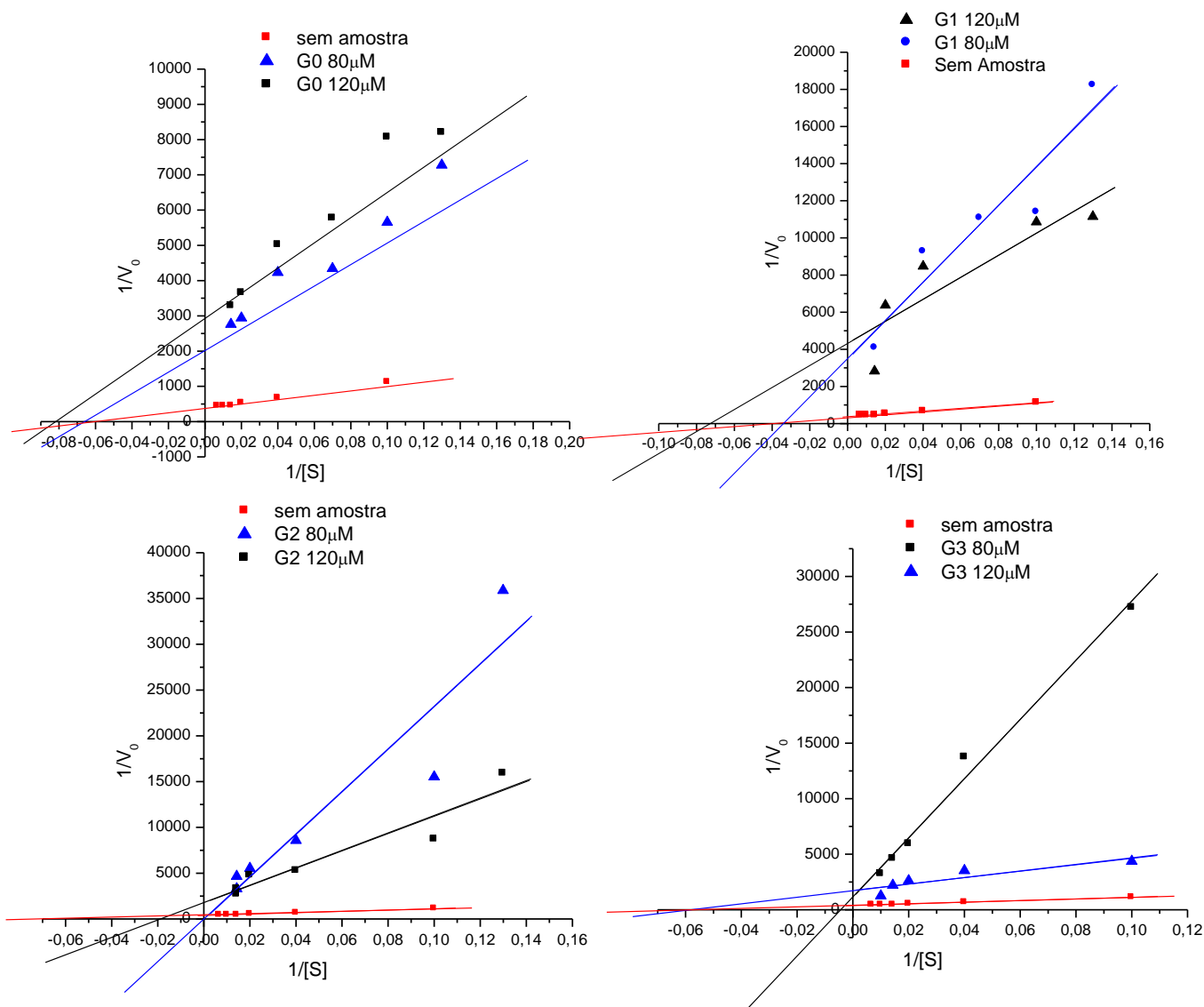


Figura 16: Cinéticas MPO/guaiacol/ H_2O_2 na presença e na ausência das amostras. Meio reacional em tampão fosfato de sódio 50mM, pH7,4 a 37°C, reação foi monitorada durante dois minutos a 470nm.

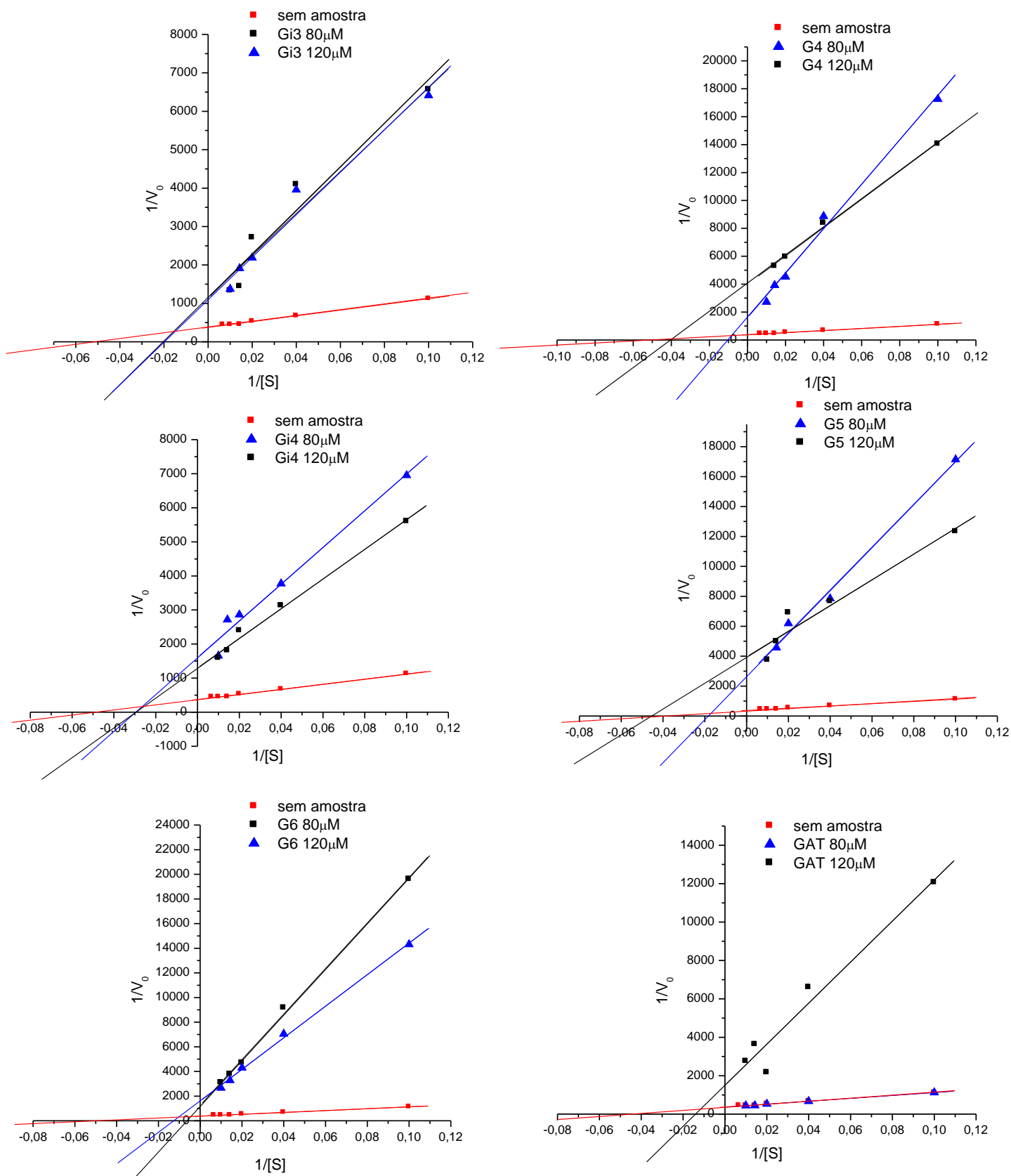


Figura 17: Cinéticas MPO/guaiacol/ H_2O_2 na presença e na ausência das amostras. Meio reacional em tampão fosfato de sódio 50mM, pH7,4 a 37°C, reação foi monitorada durante dois minutos a 470nm.

Os gráficos das figuras 16 e 17 mostram a variação do substrato guaiacol frente a duas concentrações de amostra ou na ausência de amostra, fixando o H_2O_2 . A partir das tangentes das cinéticas obtiveram-se as velocidades iniciais de cada reação, os quais foram utilizados para a construção do gráfico Duplo-Recíproco. Neste tipo de gráficos pode-se obter a constante de Michaelis-Menten (K_M) e velocidade máxima ($V_{máx}$) que são utilizados para estudar o tipo de inibição apresentada pelas amostras. O K_M é a constante que relaciona a velocidade de uma reação enzimática com a concentração de substrato. Essa constante pode estabelecer um valor aproximado para o nível celular de substrato além do que, também identificar inibidores fisiologicamente importantes. As amostras tiveram inibição maior que 75% nas concentrações testadas por isso, fez-se o estudo de inibição e não a concentração inibitória de 50% (IC_{50}) da MPO. Observa-se o tipo de inibição não competitiva ou mista. Como na inibição da enzima HRP, as amostras podem se ligar a sítios diferentes do sítio ativo do substrato guaiacol.

Nas concentrações utilizadas obteve-se mais de 75% de inibição das duas enzimas testadas. Para a HRP a concentração utilizada de amostra para o mesmo valor de inibição foi menor do que a utilizada para MPO, portanto as amostras demonstram melhor capacidade de inibir a enzima HRP.

4.3 Interação com células.

4.3.1 Hemólise com HOCl.

Depois de um estudo mostrando que as amostras possuem capacidade antioxidante frente às ERO avaliou-se também a citotoxicidade das amostras frente às células vermelhas, eritrócitos, do sangue humano. Essas células são suscetíveis a radicais livres e outras ERO. Primeiramente foi realizada a interação das amostras com os eritrócitos na ausência dos agentes HOCl e AAPH. Foi realizado um branco para cada agente porque o tempo de incubação de cada ensaio é diferente.

Para o ensaio de hemólise com o HOCl todas as amostras, na ausência de HOCl, mostraram citotoxicidade e tiveram o mesmo comportamento que o G0 (figura 18). Aumentando a concentração da amostra G0 no sistema a absorbância diminui e notamos uma coloração esverdeada indicando uma possível redução do íon ferro contido na hemoglobina livre no meio (figura 18).

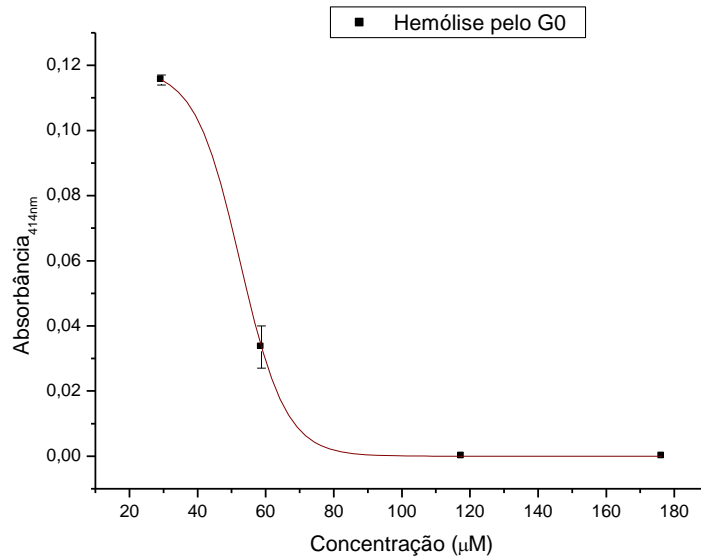


Figura 18: Hemólise provocada pela amostra G0 em meio reacional contendo eritrócitos e tampão com NaCl. Incubação de 4 horas a 37°C e sob leve agitação.

A amostra G0, não foi capaz de proteger as células vermelhas como o esperado. A concentração de HOCl presente na reação é sempre constante e foi ajustado para apresentar uma hemólise de 40%. Como as amostras mostraram ser hemolíticas nas concentrações testadas, essa concentração foi escolhida para observar: ou o possível aumento da hemólise ou a sua proteção na presença de um radical hemolítico como HOCl (figura 19).

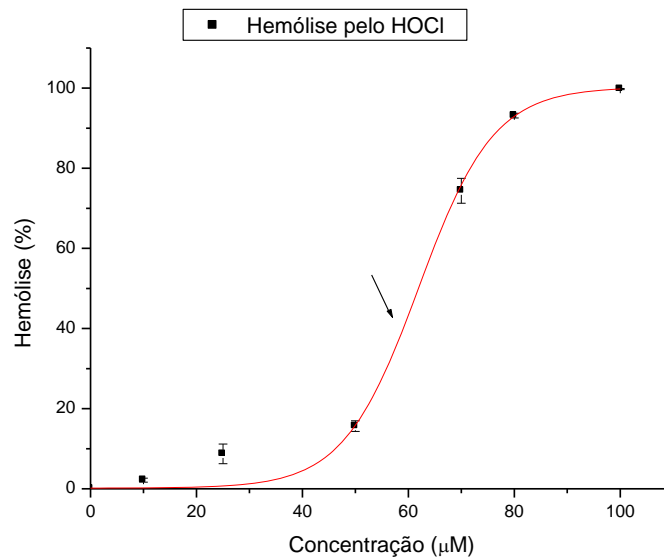


Figura 19: Hemólise pelo HOCl. A seta indica o ponto que temos 40% de hemólise. Meio reacional: Tampão com NaCl, Eritrócitos a 5% e HOCl.

Observa-se que G0 e HOCl no sistema, a porcentagem de hemólise aumenta. Esse aumento deve ser causado pela ação do radical HOCl somado à ação hemolítica da amostra (figura 20). Essa soma não pode ser quantificada, pois em concentrações maiores houve a diminuição da absorbância no comprimento de onda observado causado pela coloração esverdeada.

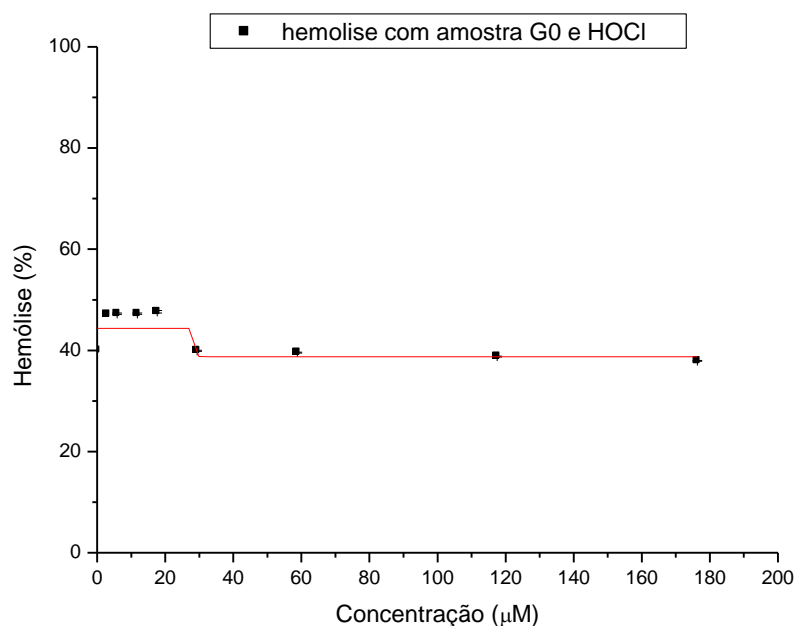


Figura 20: Hemólise pela amostra G0 com a presença de HOCl.

Pensando que as amostras poderiam estar reagindo com o HOCl e formando um produto de reação muito mais hemolítico então foi feito o espectro das amostras com e sem o HOCl. Observamos que nenhuma banda é formada mostrando que possivelmente não há formação de um novo composto, o que pode indicar que não há reação entre as amostras e o HOCl. Portanto se as amostras não reagem com o HOCl, então a hemólise aumentada pode ser somente pela ação das amostras afinal a concentração do HOCl foi constante.

Para a amostra G0 observa-se que o aumento da hemólise foi pequeno quando comparada com a porcentagem de hemólise provocada pelo HOCl na reação, sendo a maior porcentagem de hemólise de 47%.

As amostras G1, G2 e G3 tiveram o mesmo comportamento apresentado pelo G0.

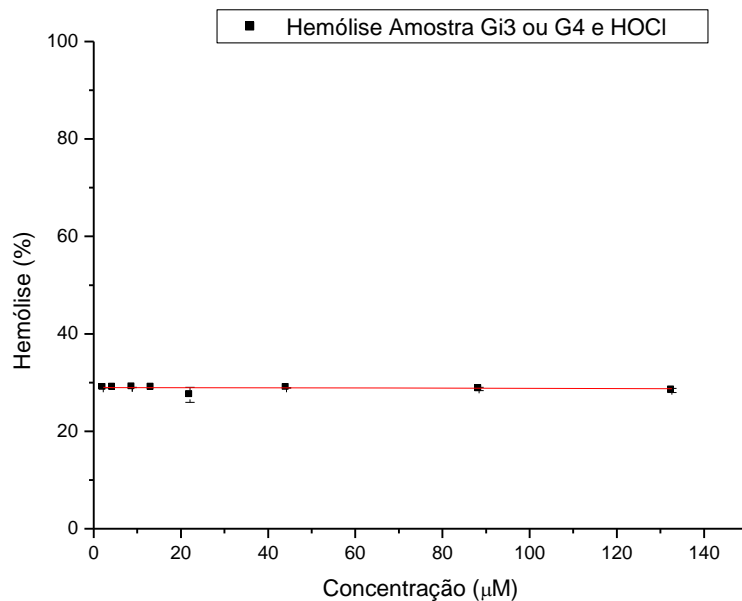


Figura 21: Hemólise provocada pela amostra Gi3 ou G4 e HOCl.

Na figura 21 pode-se observar que as amostras Gi3 e G4 tiveram uma pequena proteção diminuindo a hemólise provocada pelo HOCl. Além disso, a amostra Gi3 não demonstrou hemólise nas concentrações testadas e nem mesmo a coloração esverdeada quando em contato com a hemoglobina liberada das hemácias lisadas. Pode ter ocorrido a interação da amostra com a membrana eritrocitária protegendo-a. A amostra G4 apresentou hemólise nas concentrações testadas e a coloração esverdeada nas maiores concentrações (figura 22).

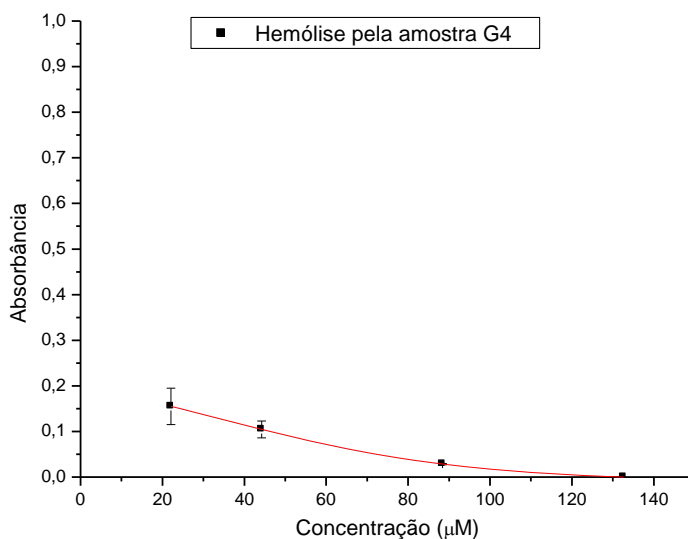


Figura 22: Hemólise provocada pela amostra G4.

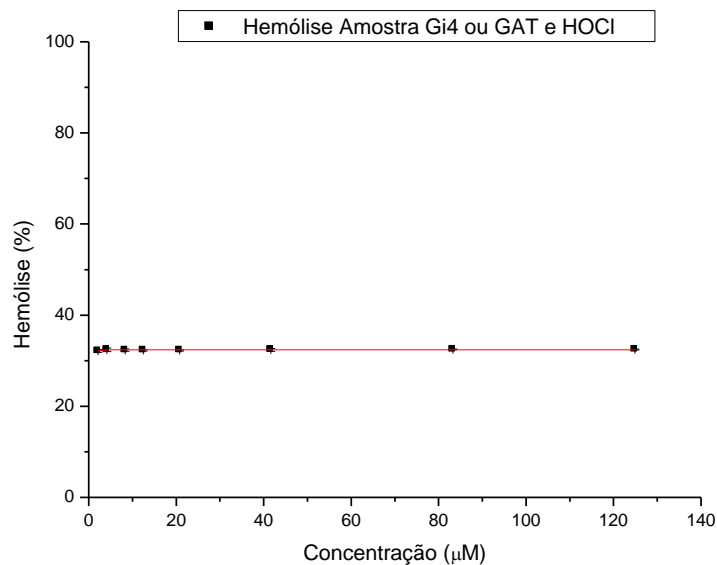


Figura 23: Hemólise provocada pela amostra Gi4 ou GAT na presença de HOCl.

As amostras Gi4 e GAT demonstraram pequena proteção com porcentagem de hemólise média de 32% sendo menor que a provocada pelo HOCl de 40% (figura 23). Apesar de apresentar pequena proteção não foram melhores que as amostras Gi3 e G4 que tiveram porcentagem de hemólise de aproximadamente 28%. Essa proteção das amostras Gi3 e G4, pode ser explicada por uma possível interação dos galatos de cadeias carbônicas entre três e quatro carbonos com a membrana eritrocitária, protegendo a célula somado à captura de HOCl, como mostrado nos ensaios de captura desse radical.

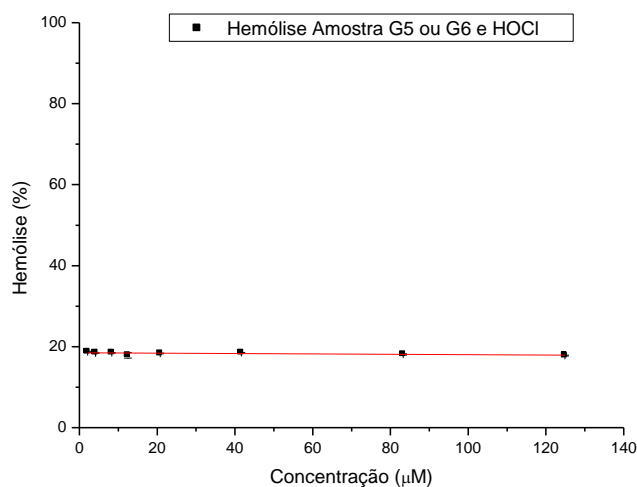


Figura 24: Hemólise provocada pela amostra G5 ou G6 na presença de HOCl.

De acordo com a figura 24 as amostras G5 e G6 mostraram ação protetora, com apenas 18% de hemólise, porém não se pode afirmar isso, pois, houve a interferência da coloração esverdeada característica de reação de redução do ferro presente na molécula de hemoglobina. Essas amostras possuem cadeia carbônica alifática com 5 e 6 carbonos conferindo maior lipofilicidade para a molécula. Por esse motivo essa amostra pode ter melhor interação com a membrana do eritrócito podendo então lisar a célula e reduzir o íon ferro presente na hemoglobina liberada, apresentando falsa proteção quando se observa apenas a absorbância (figura 25).

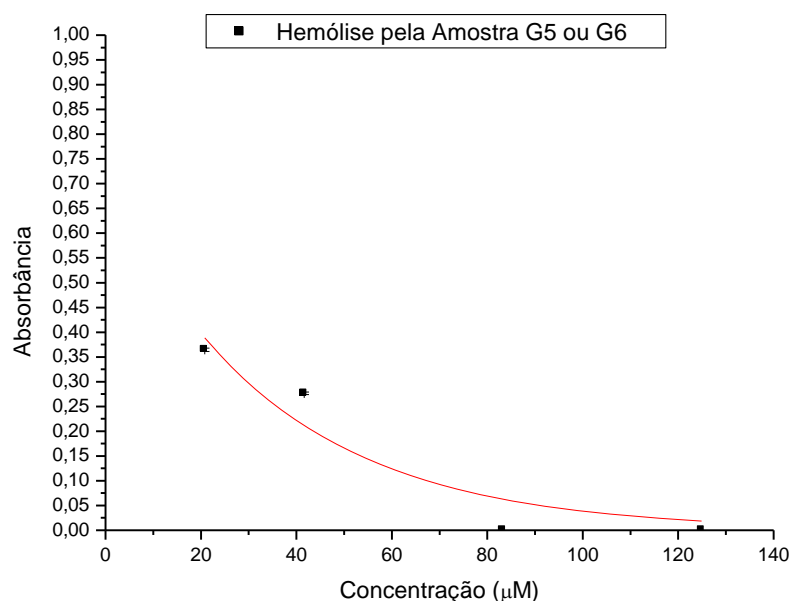


Figura 25: Hemólise provocada pela amostra G5 ou G6.

4.3.2 Hemólise com o radical AAPH.

Em muitos estudos com eritrócitos como modelos de danos oxidativos em membranas celulares é utilizado o radical que já está na forma livre em fase aquosa AAPH (2,2'-azo-bis (2-amidinopropane) dyhydrochloride), capaz de promover lipoperoxidação de membrana e assim o rompimento da membrana eritrocitária, hemólise (ZHU et al., 2002).

Foi avaliada primeiramente a citotoxicidade das amostras apenas com as células, ou seja na ausência do radical AAPH, no tempo de incubação deste ensaio que é de duas horas. Para o radical AAPH também procuramos a concentração desse radical que

provoca 40% de hemólise pelas mesmas razões apresentadas no ensaio de hemólise com o radical HOCl, ou seja observar o possível aumento da hemólise ou sua proteção (figura 26).

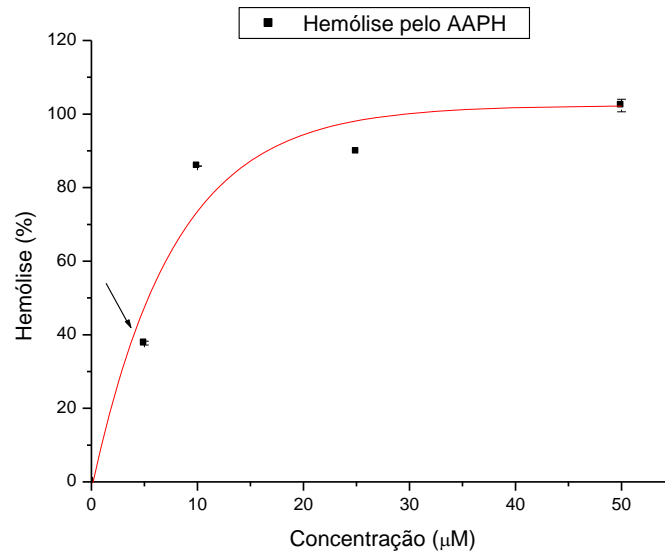


Figura 26: Hemólise provocada pelo radical AAPH.

As amostras demonstraram pequena hemólise conforme aumentamos a molaridade. A máxima molaridade testada mostrou hemólise de apenas 4,2% aproximadamente (figura 27).

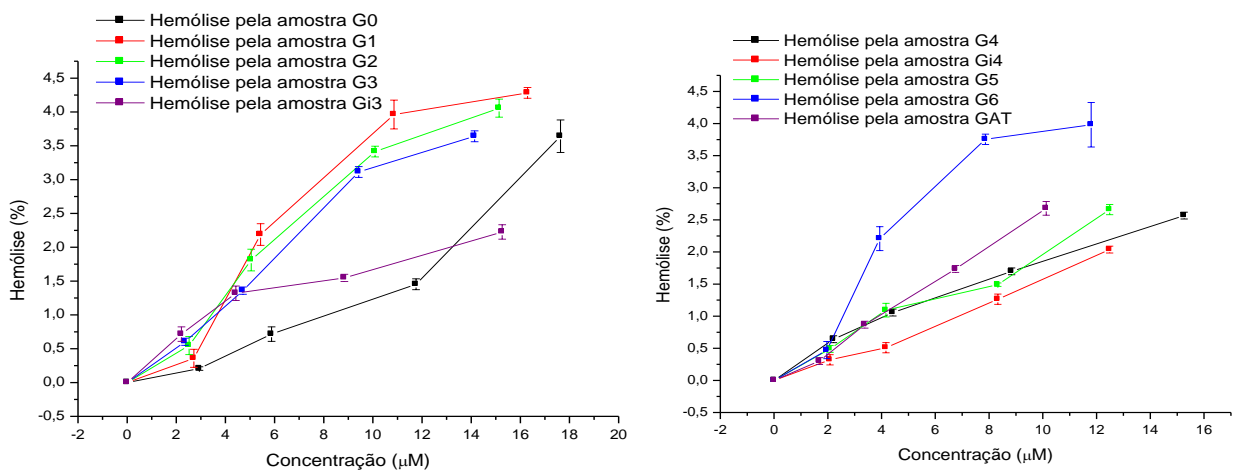


Figura 27: Hemólise provocada pelas amostras na ausência do radical AAPH.

Tempo de incubação de duas horas a 37°C.

Assim como com o HOCl para o AAPH foi encontrado a concentração que promove 40% de hemólise pelo radical AAPH. Na hemólise provocada pelo AAPH, as amostras não apresentaram potencial protetor (figura 28).

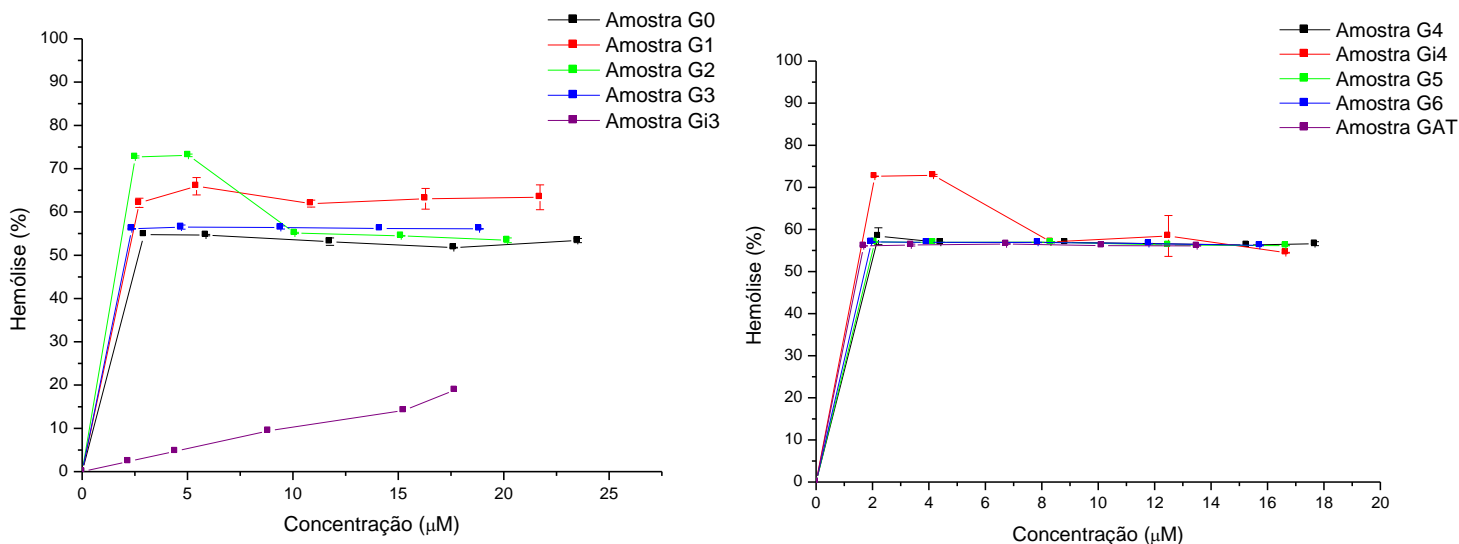


Figura 28: Hemólise provocada pelo radical AAPH e amostras. Tempo de incubação de duas horas a 37°C.

As amostras mostraram que não protegem a hemólise provocada pelo radical AAPH. A única amostra que mostrou possível proteção foi a Gi3, isso pode ser explicado pela conformação da cadeia isopropila que pode estar proporcionando, como visto com o radical HOCl, uma melhor interação ou com a membrana do eritrócito promovendo a proteção ou a interação com o próprio radical AAPH.

4.3.3 Toxicidade sobre neutrófilos com corante supra-vital: azul de Trypan.

A fim de esclarecer a citotoxicidade dos galatos, realizou-se o ensaio de viabilidade celular com o corante supra-vital azul de Trypan. Esse corante não tem a capacidade de penetrar nas células vivas, mas nas células danificadas o corante penetra deixando as células com coloração azulada. Portanto pode-se verificar se as amostras possuem a capacidade de penetrar nas células. O ensaio foi realizado com células retiradas do exsudato peritoneal de ratos após 12 horas que a inflamação foi induzida. O controle da viabilidade celular foi realizado por contagens das células em tempos

variados até seis horas após as células terem sido retiradas. A viabilidade foi maior do que 95%, ou seja, até 6 horas as células ainda permaneceram vivas e assim viáveis para realização do ensaio. O ensaio foi realizado na presença e na ausência de PMA que desencadeia o *oxidative burst* nos polimorfonucleares.

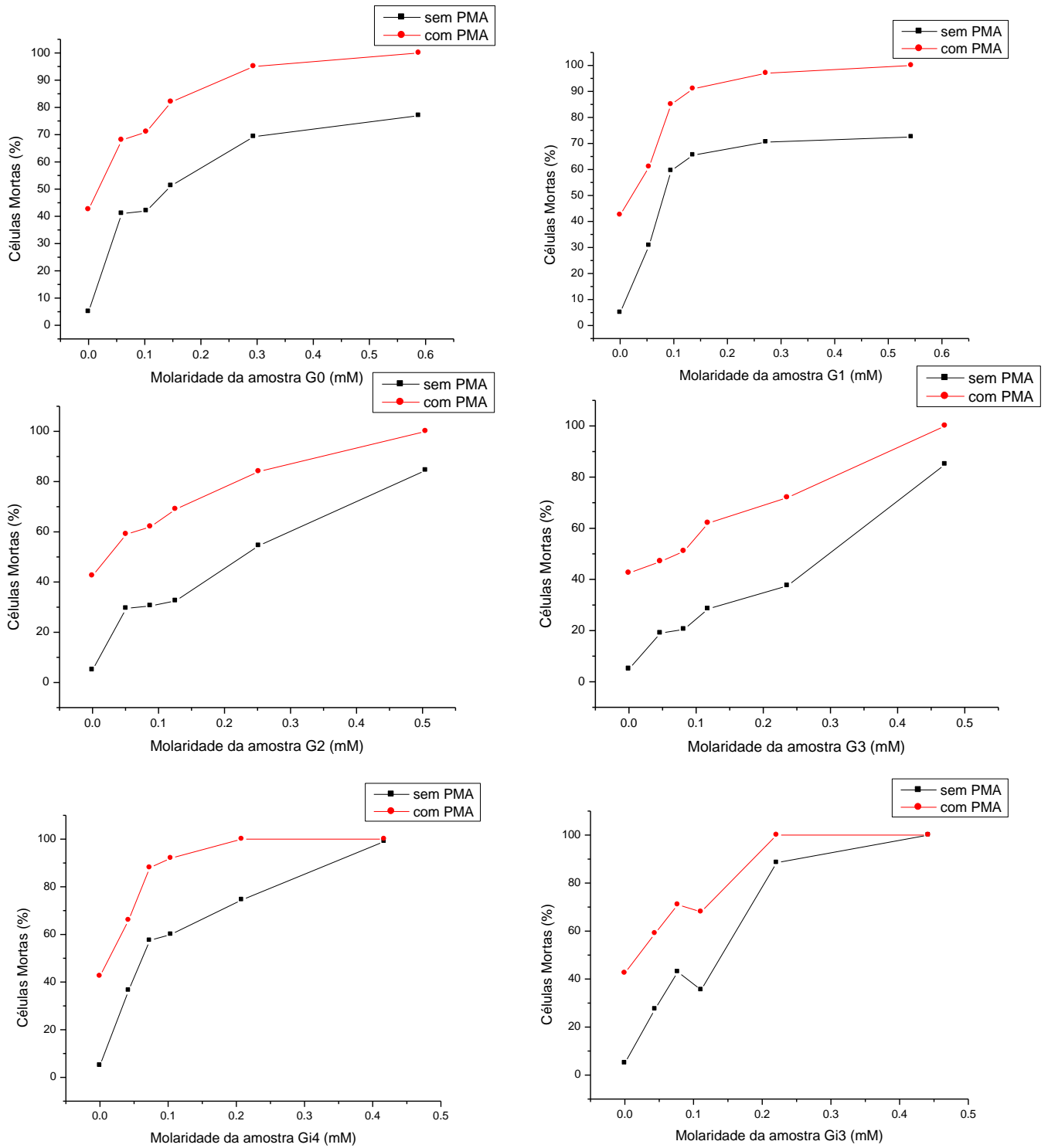


Figura 29: Citotoxicidade dos Galatos sobre os neutrófilos após duas horas de incubação e revelado com o corante supra-vital azul de Trypan.

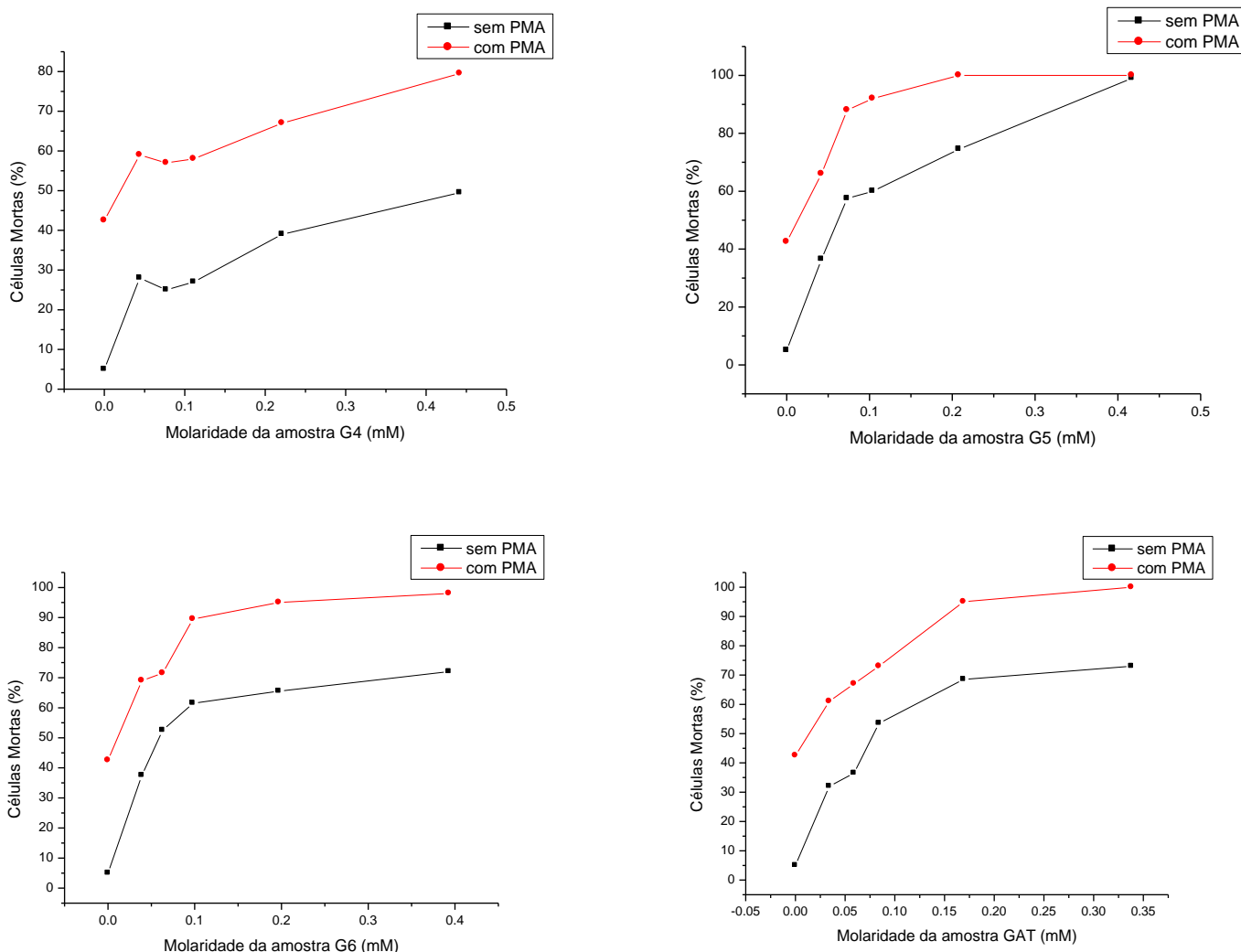


Figura 30: Citotoxicidade dos Galatos sobre os neutrófilos após duas horas de incubação e revelado com o corante supra-vital azul de Trypan.

A figura 29 e 30 mostra que o ácido gálico e seus derivados foram citotóxicos para os neutrófilos na ausência do PMA confirmando então a citotoxicidade dessas amostras. Pode-se observar ainda na figura 29 e 30 que com o estimulante do *oxidative burst*, PMA, ouve maior dano celular. Essa citotoxicidade pode ser pela formação de produtos mais tóxicos a partir de interação do PMA com os galatos ou pela transformação enzimática dos compostos via MPO.

Como esses radicais são formados no interior das células para a proteção quando agentes estranhos são fagocitados, pode-se dizer que as amostras não penetram nas células. Pois se houvesse a entrada das amostras para o interior das células haveria a proteção contra as ERO formadas, uma vez que as amostras possuem capacidade de sequestrar as ERO.

5 Conclusão

Pelos dados obtidos pode-se concluir que com o aumento do número de átomos de carbono e complexidade do substituinte maior potencial antioxidante frente alguns sistemas estudados. A amostra GAT foi a que mostrou melhor capacidade de captura de alguns radicais e agentes oxidantes. Como citado antes, pode ser pela quantidade de duplas ligações presente na molécula.

Frente aos sistemas enzimáticos estudados – peroxidases – todas as amostras mostraram inibição. Tanto para a HRP como para a MPO, a análise gráfica mostrou tipo de inibição característica de não competitiva ou mista, e apresentaram melhor capacidade de inibição com a HRP comparada a MPO.

As amostras demonstraram ser citotóxicas, pois se observou uma acentuada hemólise e morte das células PMN, nas concentrações testadas. Para a hemólise com o HOCl fica mais difícil uma análise de soma do efeito hemolítico por causa da possível redução do íon ferro presente na molécula da hemoglobina. Em relação à hemólise provocada pelo radical AAPH a única amostra que teve uma possível proteção foi a Gi3. Quanto ao ensaio com células PMN e, corante azul de Trypan, se pode concluir que as amostras além de serem citotóxicas não conseguem entrar nas células.

6 Referências Bibliográficas

1. ABU-SOUD, H.M.; HAZEN, S.L. Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* 275: 5425-5430, 2000.
2. APOSTOLIDES Z., BALENTINE D.A, HARBOWY M.E., HARA Y., WEISBURGER J.H., Inhibition of PhIP mutagenicity by catechins and by theaflavins and gallate esters, *Mutat. Res.*, vol. 389 (23), p.167–172, 1997.
3. A. ARNOUS, C. PETRAKIS, D.P. MAKRIS, P. KEFALAS, A peroxyoxalate chemiluminescence-based assay for the evaluation of hydrogen peroxide scavenging activity employing 9,10-diphenylanthracene as the fluorophore. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 48 (2002) 171–177.
4. ARUOMA, O.I.; AKANMU, D.; CECCHINI, R. and HALLIWELL, B. Evaluation of the ability of the angiotensin-converting enzyme inhibitor paptopril to scavenge reactive oxygen species.; *Chem. Biol. Interact.*; vol 77; p. 303-314; 1991.
5. ARUOMA, O. I. Neuroprotection by dietary antioxidants: new age of research. *Nahrung. Food Nahrung*, Dec; 46(6):381-2, 2002.
6. ARUOMA, O.I. and HALLIWELL, B. Action of hypochlorous acid on the antioxidant protective enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase. *Biochem. J.*, vol.248, p. 973-976, 1987. In LAPENNA, D. and CUCCURULLO, F. Hypochlorous acid and its Pharmacological Antagonism: An update picture. *Gen. Pharmacol.*, vol.27, p. 1145-1147, 1996.
7. BABIOR, B.M. Phagocytes and Oxidative Stress., *Am J Med.*, v.109, p. 33-44, 2000.
8. BAST, A.; HAENEN G.R.M.M.; DOELMAN, C.J.A. Oxidants and Antioxidants: state of the art. *Am.J.Med.*, vol.91, p.2-13, 1991. In: FERREIRA, A.L.A. e MATSUBARA, L.S.; *Radicais Livres: conceitos, doenças*

- relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Rev.Ass. Med. Brasil., 43(1), p.61-68, 1997.
9. BOVERIS, A.; CADENAS, E.; REITER, R.; CHANCE, B.; JAMIEESON, D. The relation of free radical production to hyperoxia. Annu Rev Physiol, vol.48, p.703-719, 1986. In: FERREIRA, A.L.A. e MATSUBARA, L.S.; Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Rev.Ass. Med. Brasil., 43(1), p.61-68, 1997.
 10. BRAVO L., Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, Nutr. Rev., 56, 317–333, 1998.
 11. BRESTEL, E.P.; Co-oxidation of luminol and hydrogen peroxide. Implications for neutrophil chemiluminescence. Biochem. Biophys. Res. Comm., v. 126, p. 482-488, 1985.
 12. BOYD L., BEVERIDGE E.G., Antimicrobial activity of some alkyl esters of gallic acid (3,4,5 trihydroxybenzoic acid) against *Escherichia coli* NCTC 5933 with particular reference to n-propyl gallate, Microbios v.120 (30), p. 73–85, 1981.
 13. CAPELLEARE - BLANDIN C., Oxidation of guaiacol by myeloperoxidase: a two-electron-oxidized guaiacol transient species as a mediator of NADPH oxidation. Biochem. J., Dec 1; 336 (Pt 2):395-404, 1998.
 14. 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.
 15. CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas Mediciniais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna. Chapecó: Editora Universitária ARGOS, Parte I, Cap. 1, 47-75, 2001.

16. CHAPMAN A.L., WINTERBOUM C.C., BRENNAN S.O. Characterization of non-covalent oligomers of proteins treated with hypochlorous acid. *Biochemical Journal*, vol. 375, p. 33-40, 2003.
17. CHEN, Y.R, DETERDING, L.J., STURGEON, B. E., TOMER, K.B., MASON, R.P., Protein oxidation of cytochrome C by reactive halogen species enhances its peroxidase activity. *J. Biol. Chem.*, 277(33): 29781-91, 2002.
18. 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. *Anal Biochem.*, v. 218, p. 377-381, 1994.
19. COSTA M.; XIMENES VF.; FONSECA LM. Hypochlorous acid inhibition by acetoacetate: implications on neutrophil functions. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 27, p. 1183-1187, 2004.
20. CROFT, K.D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of the New York Academy of Science*, New York, v.854, p.435-442, 1998.
21. CRYSTAL, R.G. Oxidants and respiratory tract epithelial injury: pathogenesis and strategies for therapeutic intervention. *Am J Med.*; vol91; p39S-44S; 1991. In: FERREIRA, A.L.A. e MATSUBARA, L.S.; *Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo*. *Rev.Ass. Med. Brasil.*, 43(1), p.61-68, 1997.
22. DAUGHERTY, A.; DUNN, J.L.; RATERI, D.I. and HEINECKE, J.W. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest.*;, vol94; p.437-444, 1994
23. DAVIES, B.; EDWARDS, S. W. Inhibition of mieloperoxidase by salicylhydroxamic acid. *Biochemical Journal*, v.258, p.801-806, 1989.

24. DRAPIER JC, WEIZESBIN J, HIBBS J.B. Interferon gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine cytotoxic effects or mechanism in murine macrophages. *European J Immuno*, 18: 1587-159, 1998.
25. EATON, J.W., Catalases and peroxidases and Glutathione and Hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary (editorial; comment); *J Lab Clin Med*; vol 118; p. 3-4; 1991. In: FERREIRA, A.L.A. e MATSUBARA, L.S.; *Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo*. *Rev.Ass. Med. Brasil.*, 43(1), p.61-68, 1997.
26. ESTÉVEZ, A. G.; JORDÁN, J. Nitric oxide and superoxide, a deadly cocktail. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 962, p. 207-211, 2002.
27. FERGUSON, L.R., HARRIS, P.J. Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fiber and phytochemicals. *European Journal of Cancer Prevention*, Oxford, v.8, n.1, p.17-25, 1999.
28. FERNADEZ, M. T.; MIRA, L. M.; FLORENCIO, M. H.; JENNINGS, K. R. Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study. *J Inorg Biochem*, 92, 105–111, 2002.
29. FERREIRA, A.L.A. e MATSUBARA, L.S.; *Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo*. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v.43, p.61-68, 1997
30. FILHO, R.F., ZILBERSTEIN, B., Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções*. *Rev. Ass. Med. Brasil*, vol.46(3), p. 265-271, 2000.
31. FLOYD, R.A. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J*; vol. 4; p. 2587-2597; 1990. In: FERREIRA, A.L.A. e

- MATSUBARA, L.S.; Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Rev.Ass. Med. Brasil., 43(1), p.61-68, 1997.
32. GRUNDHOFER, P.; NIEMETZ, R.; SCHILLING, G.; GROSS, G. G. Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolysable tannins. *Phytochemistry*, v. 57; p. 915-927, 2001.
33. GUPTA, S.; SAHAA, B.; GIRI, A. K. Comparative antimutagenic and anticlastogenic effects of green tea and black tea: a review. *Mutat Res*, 512, 37–65, 2002.
34. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C.; Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview; *Methods Enzymol*; vol186; p.1-85; 1990. In: FERREIRA, A.L.A. e MATSUBARA, L.S.; Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Rev.Ass. Med. Brasil., 43(1), p.61-68, 1997.
35. HALLIWELL, B. Antioxidant characterization Methodology and mechanism. *Biochem. Pharmacol.*, vol49; p.1341-1348; 1995. In: LAPENNA, D. and CUCCURULLO, F. Hypochlorous acid and its Pharmacological Antagonism: An update picture. *Gen. Pharmacol.*, vol.27, p. 1145-1147, 1996.
36. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C.; Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Ach Biochem Biophys*, vol.246, p.501-514, 1986. In: FERREIRA, A.L.A. e MATSUBARA, L.S.; Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Rev.Ass. Med. Brasil., 43(1), p.61-68, 1997.
37. HATHERILL, J.R.; TILL, G.O.; WARD, P.A. Mechanisms of oxidant-induced changes in erythrocytes. *Agents-Actions*; vol32; p.351-358; 1991. In: FERREIRA, A.L.A. e MATSUBARA, L.S.; Radicais Livres: conceitos, doenças

- relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Rev.Ass. Med. Brasil., 43(1), p.61-68, 1997.
38. HAZEL, L.J. and STOCKER, R. Oxidation of Low density lipoprotein with hypochlorite causes transformation of the lipoprotein into a high-uptake form for macrophages. Biochem. J., vol.290, p.165-172, 1993. In: LAPENNA, D. and CUCCURULLO, F. Hypochlorous acid and its Pharmacological Antagonism: An update picture. Gen. Pharmacol., vol.27, p. 1145-1147, 1996.
39. HAZEL, L.J. VAN DEN BERG, J.J.M. and STOCKER, R. Oxidation of Low density lipoprotein with hypochlorite causes aggregation that is mediated by modification of lysine residue rather than lipid peroxidation. Biochem. J., vol.302, p.297-304, 1994. In: LAPENNA, D. and CUCCURULLO, F. Hypochlorous acid and its Pharmacological Antagonism: An update picture. Gen. Pharmacol., vol.27, p. 1145-1147, 1996.
40. 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. Biochim Biophys Acta., v.1481, p.109-118, 2000.
41. KAKKAR, P.; DAS, B.; VISWANATHAN, P. N. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. Indian J Biochem Biophys, v. 21, p. 130-132, 1984.
42. KHALIL, N.M. Interação nicotina-peroxidases (Mieloperoxidase e Horseradish): implicações no Burst oxidativo de leucócitos polimorfonucleares. 99f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

43. KERRY, N.L., ABBEY, M. Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibits low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis*, Limerick, v.135, n.1, p.93-102, 1997.
44. KIM, J.Y.; Antimelanogenic and Antioxidant Properties of Gallic Acid; *Biol. Pharm. Bull.*, 30(6), 1052-1055, 2007.
45. KISS, J. P. Role of nitric oxide in the regulation of monoaminergic neurotransmission. *Brain Research Bulletin*, v. 52, p. 459-466, 2000.
46. KURODA, Y.; HARA, Y. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mutat Res*, 436(1): 69–97, 1999.
47. LAPENNA, D. and CUCCUROLLO, F. Hypochlorous acid and its Pharmacological Antagonism: An update picture. *Gen. Pharmacol.*; vol.27; p. 1145-1147, 1996.
48. LEARN, D.B.; BRESTEL, E.P. and SEETHARAMA, S. Hypochlorite scavenging by *Pseudomonas aeruginosa* alginate. *Infect. Immunol.*, vol.55, p.1813-1818, 1987. In: LAPENNA, D. and CUCCUROLLO, F. Hypochlorous acid and its Pharmacological Antagonism: An update picture. *Gen. Pharmacol.*, vol.27, p. 1145-1147, 1996.
49. LETELIER M.E.; RODRIGUEZ E., WALACE A., LORCA M., REPETTO Y., MORELLO A., ALDUNATE J., Trypanosoma cruzi: A possible control of transfusion- induced chagas disease by phenolic antioxidants, *Exp. Parasitol.*, vol.71, p. 357–363, 1990.
50. LEONG, S. K.; RUAN, R.S.; ZHANG, Z. A critical assessment of the neurodestructive and neuroprotective effects of nitric oxide. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 962, p. 161-181, 2002.

51. LYELL, J. On the use of gallic acid in the treatment of albuminuria. *The Lancet*, v.54, p. 608 – 609, 1849.
52. LOWENSTEIN C, ALLEN G, WALKER A, ROSE N, SNYDER S, HERSKOWITZ A. Nitric oxide inhibits viral replication in myocarditis. *Circulation*, 88: IG-IH, 1993.
53. MERTENS, A.; HOLVOET, P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *The FASEB Journal*, v.15, p.2073-2084, 2001.
54. MIAN, M.F.; KANG, C.; LEE, S.; CHOI, J.H.; BAE, S.S.; KIM, S.H.; KIM, Y.H.; RYU, S.H.; SUH, P.G.; KIM, J.S.; KIM, E. Cleavage of focal adhesion kinase is an early marker and modulator of oxidative stress-induced apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 171, p.57–66, 2008. MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Review*, v. 43, p. 109-142, 1991.
55. MORRIS, C.M.; The acid ionization constant of HOCl from 5 to 35o.; *J. Phys. Chem.*, vol70, p.3798-3805; 1966. In: LAPENNA, D. and CUCCURULLO, F. Hypochlorous acid and its Pharmacological Antagonism: An update picture. *Gen. Pharmacol.*, vol.27, p. 1145-1147, 1996.
56. NAGAKAWA Y., TAYAMA S., Cytotoxicity of propyl gallate and related compounds in rat hepatocytes, *Arch.Toxicol.* v.69 (3), p.204–208, 1995.
57. OHNO, Y.; FUKUDA, K.; TAKEMURA, G.; TOYOTA, M.; WATANABE, M.; YASUDA, N.; XINBIN, O.; MARUYAMA, R.; AKAO, S.; GOTOU, K.; FUJIVARA, T.; FUJIVARA, H. Induction of apoptosis by gallic acid in lung cancer cells. *Anticancer Drugs*, 10, 845-851, 1990.
58. 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 Enzymol.*, v. 299, p. 379-389, 1999.
59. ROBAK J, GRYGLEWSKI IR: Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol* 1988, 37:837-841.
60. SAMPSON, G. On the use of gallic acid in cases of albuminous urine. *The Lancet*, v. 54, p. 577 – 578, 1849.
61. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade/UFRGS/Editora da UFSC, 2003.
62. SNYDER S.H., BREDET D.S. Biological role of nitric oxide. *Science Am*, 266: 68-77, 1992.
63. SOARES, J. R.; DINIS, T. C.; CUNHA, A. P.; ALMEIDA, L. M. Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis*. *Free Radic Res.*, v. 26, p. 469-478, 1997.
64. SOARES S.E., Phenolic acids as antioxidants, *Nutr. Rev. Campinas*, 15(1):71-81, jan./abr. 2002.
65. SURH, Y. J; PACKER, L., *Oxidative Stress, Inflammation, and Health*. 1nd ed. Califórnia, CRC Press Taylor & Francis group. Cap. 1 p.1-7, 2005.
66. THOMAS, E.L.; GRISHAM, M.B; JEFFERSON, M.M. Preparation and characterization of chloramines; *Methods Enzymol.*, vol.132, p.569-585, 1986. In: LAPENNA, D. and CUCCURULLO, F. Hypochlorous acid and its Pharmacological Antagonism: An update picture. *Gen. Pharmacol.*, vol.27, p. 1145-1147, 1996

67. THOMMASEN, H.V. The role of the polymorphonuclear leukocyte in the pathogenesis of the adult respiratory distress syndrome. *Clin Invest Med.*, vol. 8, p185-194, 1985. In: FERREIRA, A.L.A. e MATSUBARA, L.S.; *Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.* *Rev.Ass. Med. Brasil.*, 43(1), p.61-68, 1997.
68. VELLOSA, J.C.R., KHALIL, N.M., FOSECA, L.M., BRUNETTI, I.L., OLIVEIRA, O.M.M.F., Does Cotinine Act Reactive Oxygen Species and Peroxidases? *Eclética*, 32 (1), 65-70, 2007
69. VELLOSA, JCR. Avaliação da capacidade antioxidante de extratos vegetais de plantas brasileiras e sua contribuição ao estudo de inibição da enzima mieloperoxidase. Dissertação de Mestrado, 129 f., FCFAR-UNESP, 2005.
70. VISSERS, MC; STERN, A; KUYPERS, F; VAN DEN BERG, JJ; WINTERBOURN, CC. Membrane changes associated with lysis of red blood cells by hypochlorous acid. *Free Radical Biol Med*, v. 16, p. 703–12, 1994.
71. 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? *Biochem. Pharmacol.*, vol37, p.775-778, 1988. In: LAPENNA, D. and CUCCURULLO, F. Hypochlorous acid and its Pharmacological Antagonism: An update picture. *Gen. Pharmacol.*, vol.27, p. 1145-1147, 1996.
72. 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. *Biochem. Pharmacol.*, vol.36, p.3847-3850, 1987. In: LAPENNA, D. and

- CUCCURULLO, F. Hypochlorous acid and its Pharmacological Antagonism: An update picture. *Gen. Pharmacol.*, vol.27, p. 1145-1147, 1996.
73. WEISS, S.J. Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.*, vol.320, p.365-376, 1989. In: LAPENNA, D. and CUCCURULLO, F. Hypochlorous acid and its Pharmacological Antagonism: An update picture. *Gen. Pharmacol.*, vol.27, p. 1145-1147, 1996.
74. WOODS, A. A.; DAVIES, J. J. Fragmentation of extracellular matrix by hypochlorous acid. *Biochem J.*, v. 376, p. 219-227, 2003.
75. XIMENES V.F., PAINO I.M., OLIVEIRA O.M.F., FONSECA L.M., BRUNETTI I.L, Indole ring oxidation by activated leukocytes prevents the production of hypochlorous acid. *Braz J Med Biol Res.*, vol. Nov; 38(11), p.1575-83, 2005.
76. YANG, H.L.; CHEN, S.C.; CHANG, N.W.; CHANG, J.M.; LEE, M.L.; TSAI, P.C.; FU, H.H.; KAO, W.W.; CHIANG, H.C.; WANG, H.H.; HSEU, Y.C. Protection from oxidative damage using *Bidens pilosa* extracts in normal human erythrocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, p.1513-1521, 2006.
77. YEN, G. C.; LAI, H. H.; CHOU, H. Y. Nitric oxide scavenging and antioxidant effects of *Uraria crinita* root. *Food Chem.*, v. 74, p. 471-478, 2001.
78. YOSHIOKA, K.; KATAOKA, T.; HAYASHI, T.; HASEGAWA, M.; ISHI, Y.; HIBASAMI, H. Induction of apoptosis by gallic acid in human stomach cancer KATO III and colon adenocarcinoma COLO 205 cell lines. *Oncol. Rep*, 6, 1221-1223, 2000.
79. ZGLICZYNSKI, TJM; STELMASZYNSKA, T; DOMANSKA, J; OSTROWISKI, W. Chloramines as intermediates of oxidation reaction of amino acids by myeloperoxidase. *Biochim Biophys Acta*, v. 235, p. 419-24, 1971.

80. ZHU, Q.Y.; HOLD, R.R.; LAZARUS, S.A.; OROZCO, T.J.; KEEN, C.L.
Inhibitory Effects of Cocoa Flavonols and Procyanidin Oligomers on Free
Radical-Induced Erythrocyte Hemolysis. *Exp. Biol. Med.*, v.227, p.321-329,
2002.

Anexos



Protocolo CEP/FCF/CAr. nº 04/2008

Interessado: VANESSA DE FRIAS BARBOSA

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

Projeto: Caracterização do perfil da ação de compostos fenólicos de origem natural sobre processos oxidativos *in vitro* e *ex vitro*

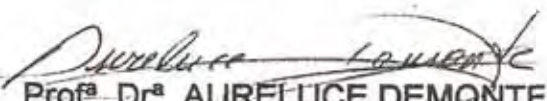
Parecer nº 03/2008 – Comitê de Ética em Pesquisa

O projeto "Caracterização do perfil da ação de compostos fenólicos de origem natural sobre processos oxidativos *in vitro* e *ex vitro*", encontra-se adequado em conformidade com as orientações constantes da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS.

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

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

Araraquara, 5 de março de 2008.


Prof.ª Dr.ª AURELUCE DEMONTE
Coordenadora do CEP

unesp



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



Protocolo CEP/FCF/CAr. nº 17/2007

Interessado: VANESSA DE FRIAS BARBOSA

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

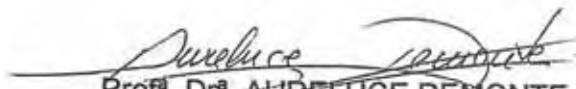
Projeto: Caracterização do perfil da ação de compostos fenólicos de origem natural sobre processos oxidativos *in vitro* e *ex vitro*

Parecer nº 04/2008 – Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considera o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Caracterização do perfil da ação de compostos fenólicos de origem natural sobre processos oxidativos *in vitro* e *ex vitro*", estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa, com no máximo três folhas (espaço 1,5 e letra 12) deverá ser entregue em março de 2010.

Araraquara, 5 de março de 2008.


Prof.^a. Dr.^a. AURELUCE DEMONTE
Coordenadora do CEP