

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ESPÉCIES DE
Pterocaulon (ASTERACEAE)**

GABRIELA FERREIRA

Porto Alegre, 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ESPÉCIES DE
***Pterocaulon* (ASTERACEAE)**

Dissertação apresentada por Gabriela
Ferreira para obtenção do GRAU DE
MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof. Dra. Raquel Bridi
Co-Orientadora: Prof. Dra. Gilsane Lino von Poser

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado - Pesquisa e Desenvolvimento de matérias-primas Farmacêuticas - da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30.03.2009, pela Comissão Examinadora, constituída por:

Profa. Dr. Alice Fialho Vianna
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dr. Fernanda Urruth Fontella
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Renata Pereira Limberger
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

F383a Ferreira, Gabriela
Avaliação da atividade antioxidante de espécies de pterocaulon (asteraceae) / Gabriela Ferreira. – Porto Alegre : UFRGS, 2009. – xiii, 57 p. : il., tab.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Pterocaulon. 2. Asteraceae. 3. Compostos fenólicos. 4. Antioxidantes. 5. Radicais livres. 6. Espécies reativas de oxigênio. I. Bridi, Raquel. II. Poser, Gilsane Lino Von. III. Título.

CDU: 547.9:582.998.2

Bibliotecária responsável:
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

Os procedimentos experimentais deste trabalho foram realizados no Laboratório de Farmacognosia do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, no Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS e no Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, aos quais eu expresse meus sinceros agradecimentos.

Agradecimentos

À Deus que me dá força para superar os percalços.

À minha querida orientadora, professora Dra. Raquel Bridi, pela amizade, pela compreensão, pela sensibilidade, pela orientação, pelas oportunidades que me ofereceu, por permitir que eu ousasse.

À Dra. Gilsane Lino von Poser pelo apoio, pela orientação, pelo incentivo e pela compreensão.

À professora Dra. Alexandra Latini pela oportunidade e pelos seus ensinamentos.

Ao professor Dr. Carlos Severo Dutra por disponibilizar seu laboratório.

À minha amiga Gabriela Meirelles pelo companheirismo e pelo auxílio indispensável.

Às minhas colegas do Laboratório de Farmacognosia pela ajuda, pelos ensinamentos e por tornarem o trabalho mais agradável.

Ao pessoal do Laboratório de Bioquímica da UFSC pelo apoio e ajuda.

Ao Conselho Regional de Farmácia (CRF/RS) pela compreensão e pela flexibilidade.

Aos meus familiares pelo suporte e apoio incondicionais.

Ao meu amor, Rafael, pelo carinho, pelo incentivo e pela compreensão.

À minha mãe, meu exemplo de ser humano, pessoa em quem me inspiro para tentar melhorar a cada dia. Minha diva.

RESUMO

O uso de antioxidantes de origem vegetal para retardar o envelhecimento e na terapia de doenças degenerativas tem crescido consideravelmente nos últimos anos. Estudos para determinação da capacidade antioxidante, hepatoprotetora e neuroprotetora são cruciais para avaliação destes produtos naturais bem como para o entendimento das interações entre antioxidantes e espécies reativas de oxigênio (EROs). Muitos estudos têm avaliado o potencial antioxidante de compostos fenólicos, os quais se destacam em relação a outras classes de produtos naturais por neutralizar os danos oxidativos. A família Asteraceae compreende cerca de 1.100 gêneros, entre estes *Pterocaulon* que possui aproximadamente 25 espécies, distribuídas principalmente em regiões subtropicais da América. Ensaios fitoquímicos evidenciaram a diversidade de estruturas fenólicas, ilustrada pela presença de flavonóides e cumarinas, nas espécies de *Pterocaulon* investigadas. Tendo em vista os dados que demonstram a atividade antioxidante de compostos fenólicos, bem como a presença desses no gênero *Pterocaulon*, este estudo avaliou a capacidade antioxidante hepatoprotetora e neuroprotetora de extratos metanólicos brutos, frações *n*-hexânicas, metanólicas e diclorometanólicas de duas espécies de *Pterocaulon* (*P. alopecuroides* e *P. balansae*) nativas do Rio Grande do Sul. A fração metanólica da espécie *P. alopecuroides* apresentou os maiores teores de fenólicos totais bem como a maior capacidade de capturar os radicais peroxila formados no ensaio de determinação do potencial antioxidante total (TRAP). A avaliação da capacidade de reação com 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH[•]) demonstrou que as frações metanólicas apresentam a maior atividade antioxidante. A lipoperoxidação (LPO) espontânea e a induzida por Fe⁺⁺/ASC em cérebro de ratos foram inibidas pelas amostras. Nas maiores concentrações de fração metanólica houve aumento significativo do conteúdo de tióis não protéicos (NPSH) no tecido cerebral.

Palavras chave: *Pterocaulon*, compostos fenólicos, antioxidantes, espécies reativas de oxigênio (EROs), radicais livres.

ABSTRACT

The use of antioxidants of plant origin to delay aging and the treatment of degenerative diseases has grown considerably in recent years. Studies to determine the antioxidant, neuroprotective and liver protector activities are crucial to evaluating these natural compounds and for understanding the interactions between antioxidants and reactive oxygen species (ROS). Several studies have evaluated the antioxidant potential of phenolic compounds, which deserve prominence in the face of other classes of natural products to neutralizing oxidative damages. The Asteraceae family comprises about 1100 genera, among these, *Pterocaulon* which encompasses about 25 species distributed in subtropical regions of America. Phytochemical studies showed the diversity of phenolic structures, mainly flavonoids and coumarins in the investigated species of *Pterocaulon*. Taking into account the previously reported antioxidant activity of phenolic compounds and their presence in the genus *Pterocaulon*, this study was aimed to evaluate the neuroprotective and antioxidant hepatoprotector capacity of crude methanolic extracts and *n*-hexane, chloroform and methanol fractions obtained from the aerial parts of two species of *Pterocaulon* (*P. alopecuroides* and *P. balansae*) native from Rio Grande do Sul. The methanol fraction of the specie *P. alopecuroides* presented the highest contents of phenolic compounds and highest capacity to capture the peroxil radical formed in TRAP assay. The evaluation of the capacity to react with DPPH[•] shows that the methanol fraction presented highest antioxidant activity. The spontaneous LPO and that prompted by Fe⁺ ^{+/}ASC in mice brains were inhibited by the samples. In the highest methanol fraction concentration there was a significant increase in the NPSH content in the cerebral tissue.

Key words: *Pterocaulon*, phenolic compounds, antioxidants, Reactive oxygen species (ROS), free radicals.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resumo das ações biológicas citadas para espécies de <i>Pterocaulon</i>	6
Tabela 2: Estruturas das cumarinas citadas para o gênero <i>Pterocaulon</i>	8
Tabela 3: Rendimento do extrato bruto e das frações <i>n</i> -hexânica, diclorometânica e metanólica das espécies de <i>Pterocaulon</i>	25
Tabela 4: Teor de compostos fenólicos nas espécies de <i>Pterocaulon</i> expressos em microequivalentes de quercetina por grama de material vegetal.....	26
Tabela 5: Valores de absorvância obtidos para quercetina nas soluções padrão analisadas por espectrofotometria no UV.....	28

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Teor de compostos fenólicos por grama de extrato seco em extratos e frações de espécies de *Pterocaulon*..... **27**
- Figura 2:** Teor de compostos fenólicos por grama de planta seca em extratos e frações de espécies de *Pterocaulon*..... **27**
- Figura 3:** Intensidade de quimioluminescência após a adição de extratos brutos metanólicos de *Pterocaulon balansae* e *Pterocaulon alopecuroides* e das frações metanólicas de *P. balansae* e *P. alopecuroides*..... **30**
- Figura 4:** Intensidade de quimioluminescência após a adição de frações diclorometânica de *Pterocaulon balansae* e *Pterocaulon alopecuroides* e das frações hexânicas de *P. balansae* e *P. alopecuroides*..... **31**
- Figura 5:** Efeito na intensidade de quimioluminescência após a adição de quercetina e trolox..... **32**
- Figura 6:** Percentual de inibição da quimioluminescência, no tempo de 1000 segundos após a adição de extrato bruto, fração metanólica e diclorometanólica de *P. balansae*, extrato bruto, fração metanólica e diclorometanólica de *P. alopecuroides*, e quercetina..... **32**
- Figura 7:** Consumo do radical DPPH[•] ao agregar diferentes concentrações do extrato bruto metanólico e das frações metanólica, diclorometânica e *n*-hexânicas de *P. balansae*..... **35**
- Figura 8:** Consumo do radical DPPH[•] ao agregar diferentes concentrações do extrato bruto metanólico e das frações metanólica, diclorometânica e *n*-hexânicas de *P. alopecuroides*..... **35**
- Figura 9:** Comparação entre consumo do radical DPPH[•] (consumo aos 50 s) para extrato bruto, fração metanólica, fração diclorometanólica e *n*-hexânica de *P. Balansae*..... **37**
- Figura 10:** Comparação entre consumo do radical DPPH[•] (consumo aos 50 s) para extrato bruto, fração metanólica, fração diclorometanólica e *n*-hexânica de *P. alopecuroides*..... **37**
- Figura 11:** Efeito do extrato bruto metanólico das espécies *P. balansae* e *P. alopecuroides* frente às substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em cérebro e fígado de ratos..... **40**
- Figura 12:** Efeito da fração metanólica das espécies *P. balansae* e *P. alopecuroides* frente às substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em cérebro e fígado de ratos..... **41**

Figura 13: Efeito do extrato bruto metanólico e da fração metanólica das espécies *P. balansae* e *P. alopecuroides* na determinação dos grupos tióis não protéicos (SHNP) em cérebro de ratos..... **44**

Figura 14: Efeito do extrato bruto metanólico e da fração metanólica das espécies *P. balansae* e *P. alopecuroides* na determinação dos grupos tióis não protéicos (SHNP) em fígado de ratos..... **45**

SUMÁRIO

1.	Introdução	1
2.	Objetivos	2
2.1	Objetivo Geral	2
2.2	Objetivos Específicos	2
3.	Revisão Bibliográfica	3
3.1	Família Asteraceae	3
3.2	Gênero <i>Pterocaulon</i>	3
3.2.1	Localização e Morfologia	3
3.2.2	Aspectos Etnofarmacológicos	4
3.2.3	Composição Química de Espécies de <i>Pterocaulon</i>	6
3.3	Estresse Oxidativo e Atividade Antioxidante	9
3.3.1	Espécies Reativas de Oxigênio	9
3.3.2	Mecanismos Antioxidantes	10
3.3.3	Antioxidantes de Origem Natural	11
3.3.3.1	Compostos Fenólicos	12
3.3.3.1.1	Flavonóides	15
3.3.3.1.2	Cumarinas	16
4.	Material e Métodos	17
4.1	Material Vegetal	17
4.2	Preparação dos Extratos	18
4.3	Determinação de Fenóis Totais	18
4.4	Avaliação da Atividade Antioxidante	19
4.4.1	Determinação do Potencial Antioxidante Total (TRAP)	19
4.4.2	Avaliação da Capacidade de Reação com DPPH	21
4.4.2.1	Ensaio Bioautográfico	21
4.4.2.2	Ensaio Espectrofotométrico	22
4.5	Estudos de Neuroproteção e Hepatoproteção	22
4.5.1	Animais Experimentais	22
4.5.2	Preparação dos Tecidos	23
4.5.3	Análise da Capacidade Antioxidante dos Extratos de <i>Pterocaulon</i> ..	23
4.5.3.1	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS)	23
4.5.3.2	Níveis de Tiois Não Protéicos (NPSH)	24

4.5.4	Análise Estatística dos Resultados	24
5.	Resultados e Discussão	25
5.1	Rendimento dos Extratos	25
5.2	Determinação de Fenóis Totais	25
5.3	Avaliação do Potencial Antioxidante Total (TRAP)	29
5.4	Avaliação da Capacidade de Reação com 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH*)	33
5.5	Estudo de Neuroproteção e Hepatoproteção	39
5.5.1	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS)	39
5.5.2	Níveis de Tiois Não Protéicos (NPSH)	43
6.	Conclusões	46
7.	Referências	48
	Anexos.....	58

1. INTRODUÇÃO

Estudos científicos na área de produtos naturais vêm sendo desenvolvidos há séculos. No entanto, apesar do considerável volume de pesquisas existentes na identificação de produtos de origem vegetal, esta área permanece com seu potencial parcialmente explorado. Apenas uma pequena parcela das espécies vegetais estimadas mundialmente foi investigada quanto a sua constituição química e uma fração ainda menor submetida a estudos biológicos (HAMBURGUER & HOSTETTMANN, 1991; VERPOORTE, 1998; BALUNAS & KINGHORN, 2005; JONE *et al.*, 2006).

Muitos estudos têm avaliado o potencial antioxidante de compostos fenólicos, os quais se destacam em relação a outras classes de produtos naturais por neutralizar os danos oxidativos (ZHENG & WANG, 2001; PAREJO *et al.*, 2003; CAI *et al.*, 2004; MILIAUSKAS *et al.*, 2004; SKERGET *et al.*, 2005; KATALINIC *et al.*, 2006). Compostos de origem vegetal incluindo tocoferóis, carotenóides, flavonóides, isoflavonóides, ácido cinâmico e cumarinas demonstram relevante capacidade antioxidante frente a radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) (ZHANG E WANG, 2004; KABEYA *et al.*, 2007).

O uso de antioxidantes de origem vegetal para retardar o envelhecimento e na terapia de doenças degenerativas, incluindo neuropatológicas, tem crescido consideravelmente (HALLIWELL, 2006a). Dessa forma, estudos para determinação da atividade antioxidante são cruciais para avaliação destas preparações, bem como para o entendimento das interações entre antioxidantes e EROs.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Considerando a atividade antioxidante já descrita para os compostos fenólicos, bem como a presença desses no gênero *Pterocaulon*, o objetivo deste estudo foi investigar o potencial antioxidante *in vitro* de extratos e frações de duas espécies de *Pterocaulon* nativas do Rio Grande do Sul, *P. alopecuroides* e *P. balansae*.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Preparar extratos metanólicos brutos e frações hexânica, diclorometanólica e metanólica a partir das partes aéreas de *P. alopecuroides* e *P. balansae*;
- ✓ Determinar o conteúdo total de compostos fenólicos presente nos extratos e frações de *P. alopecuroides* e *P. balansae*;
- ✓ Avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* dos extratos e frações de *P. alopecuroides* e *P. balansae* através da determinação do potencial antioxidante total (TRAP) e da capacidade de reação com 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH);
- ✓ Avaliar o efeito neuroprotetor e hepatoprotetor dos diferentes extratos e frações sobre os parâmetros de estresse oxidativo, conteúdo de de tióis não protéicos (NPSH) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizado de cérebro e fígado expostos a dano oxidativo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Família Asteraceae

A família Asteraceae é considerada uma das maiores entre as plantas floríferas, com aproximadamente 1535 gêneros e 23000 (BREMER, 1994; JUDD *et al.*, 1999) a 32000 espécies (PRUSKI & SANCHO, 2004), o que corresponde a 8 -10% das Angiospermas. Asteraceae ocorre em todos os continentes, exceto na Antártida, sendo muito comum em regiões temperadas. Está bem representada na América Tropical, onde existe uma estimativa de 8403 espécies distribuídas em 580 gêneros, com grupos exclusivos de áreas do Brasil, Venezuela, Peru, América Central e Antilhas. No Brasil a família está representada por aproximadamente 196 gêneros e 1900 espécies (BARROSO, 1986).

3.2 Gênero *Pterocaulon*

3.2.1. Localização e Morfologia

Pterocaulon é um gênero caracterizado principalmente pelo caule alado e pelos capítulos sésseis terminais. Conforme Cabrera e Ragonese (1978), o gênero possui uma área de distribuição bicêntrica, o que o torna um exemplo muito interessante deste tipo de distribuição. Inclui 18 espécies, das quais 12 são americanas. Em seu estudo sobre a análise geográfica das compostas sul-brasileiras, Rambo (1952) colocou o gênero pertencente ao contingente setentrional, sendo que seis espécies são encontradas em todo o território: *P. alopecuroides* (Lam.) DC., *P. angustifolium* DC., *P. balansae* Chod., *P. polystachyum* DC., *P. rugosum* (Vahl) Malme e *P. virgatum* (L.) DC.

Na Argentina existem 10 espécies, todas no norte e centro do país. Estudos sobre a flora do estado do Paraná, realizados na década de 60, revelaram a presença de quatro espécies de *Pterocaulon*, sendo elas: *Pterocaulon alopecuroides* (Lam.) DC., *Pterocaulon angustifolium* DC.,

Pterocaulon interruptum DC. e *Pterocaulon rugosum* (Vahl.) Malme (HEEMANN *et al.*, 2004). No Rio Grande do Sul foram confirmadas nove espécies: *P. alopecuroides* (Lam.) DC., *P. angustifolium* DC., *P. balansae* Chodat, *P. cordobense* Kuntze, *P. lorentzii* Malme, *P. polypterum* (DC.) Cabrera, *P. polystachyum* DC., *P. rugosum* (Vahl.) L. e *P. virgatum* (L.) DC., que vegetam preferencialmente em regiões submetidas a estresse hídrico sazonal, como campos da Campanha e planície litorânea (HEEMANN *et al.*, 2004; LIMA, 2006).

As espécies do gênero normalmente são perenes, habitando formações abertas como campos naturais, cerrados, restingas ou locais alterados. Conforme Rambo (1956), *Pterocaulon* é muito comum na região da Campanha. Segundo o mesmo autor, de todas as regiões naturais do RS, a Campanha do Sudoeste é a que melhor ostenta o caráter do campo sul-brasileiro. O autor acrescentou que as comunidades que vegetam nesta região visam à adaptação às seguintes condições: local de crescimento desabrigado, terreno com temperatura elevada e precipitação parca. Esta vegetação deve, por conseguinte, ser considerada como xerófita, isto é, composta por espécies que possuem dispositivos especiais para diminuir a transpiração. Considerações semelhantes foram feitas por Seeliger (1992) no que se refere à vegetação halófito ocorrente na região de dunas da costa marítima do sul do Brasil.

3.2.2. Aspectos Etnofarmacológicos

Plantas desse gênero são usadas popularmente com vários propósitos e, além disso, existem estudos que demonstram atividades biológicas destas espécies (**Tabela 1**) (HEEMANN *et al.*, 2004). Alguns estudos etnobotânicos (MARTINEZ-CROVETTO, 1964; 1965) revelaram o emprego de espécies de *Pterocaulon* por indígenas na Argentina, sendo usadas principalmente em casos de reumatismo, diarreias e, em algumas situações na lavagem de feridas infestadas por larvas de moscas. As partes aéreas de *Pterocaulon purpurascens* Malme e *Pterocaulon virgatum* são utilizadas na medicina popular argentina por sua propriedade digestiva, emenagoga, inseticida e como agente contra picada de cobras. As partes aéreas do *Pterocaulon polystachium* também são utilizadas na medicina tradicional argentina como repelente de

pulgas e moscas e em casos de insolação (DEBENEDETTI *et al.*, 1999; HEEMANN *et al.*, 2004; MAES *et al.*, 2006b).

Num estudo sobre a atividade antiviral de plantas medicinais australianas, as partes aéreas de *Pterocaulon sphacelatum* (Labill.), utilizadas na medicina tradicional em resfriados, infecções respiratórias, feridas de pele e doenças oculares, apresentaram grau de inibição de 75% de poliovírus tipo 1, representante da família Picornaviridae, família de RNA vírus nos quais são incluídos os rinovírus, principal causador de resfriados (DEBENEDETTI *et al.*, 1999; HEEMANN *et al.*, 2004; MAES *et al.*, 2006b). Ainda, Semple *et al.* (1999) através de fracionamento bioguiado do extrato etanólico bruto da mesma espécie, atribuiu ao flavonóide crisosfenol atividade contra o poliovírus com IC₅₀ de 0,27 µg/mL. Na medicina popular algumas espécies são comercializadas no Paraguai com indicações que vão desde a de tranqüilizante, até a de purificadora do sangue (BASUALDO *et al.*, 2004). Para a etnofarmacologia brasileira, Lorenzi (2000) cita que *P. alopecuroides* é ocasionalmente utilizado na medicina popular e, Vendruscolo e colaboradores (2005) classificaram *P. polystachyum* como espécie útil em afecções do sistema digestório.

No sul do Brasil, pesquisas etnoveterinárias recentes indicaram que espécies de *Pterocaulon* são utilizadas para tratar afecções, popularmente diagnosticadas como micoses, em pele de animais (AVANCINI, 2002). Baseado nisso, STEIN e colaboradores (2005) avaliaram a atividade antifúngica das partes aéreas de três espécies nativas do sul do Brasil (*P. alopecuroides*, *P. balansae* e *P. polystachyum*) e concluíram que as frações diclorometanólicas e hexânicas destas espécies possuem amplo espectro de ação contra determinados fungos patogênicos. Além da atividade antifúngica, um estudo recente demonstrou que a fração hexânica e diclorometanólica de *P. polystachyum* possui atividade antiprotozoária contra *Acanthamoeba castellanii* (RODIO *et al.*, 2008).

Tabela 1: Resumo das ações biológicas citadas para espécies de *Pterocaulon*.

Espécie	Ações Biológicas
<i>Pterocaulon virgatum</i> (L.)DC.	Digestiva, emenagoga, inseticida e agente contra picadas de cobras
<i>Pterocaulon purpurascens</i> Malme	Digestiva, inseticida e agente contra picada de cobras
<i>Pterocaulon polystachium</i>	Repelente de pulgas e moscas e em casos de exposição ao sol. Atividade em células de carcinoma epidermóide oral humano e DNA. Atividade contra a larva do mosquito <i>Aedes aegypti</i>
<i>Pterocaulon sphacelatum</i> (Labil.) Benth. & Hook f.ex F. Muell	Resfriados, infecções respiratórias pele sensível, irritações oculares e inibição de 75% da replicação de poliovírus tipo 1

Fonte: HEEMANN, A.C.W.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M. D. Revisão do gênero *Pterocaulon* - Aspectos fitoquímicos e Atividades Biológicas. *Visão Acadêmica*, v. 5, n. 1, p. 53-60, 2004.

3.2.3. Composição química de espécies de *Pterocaulon*

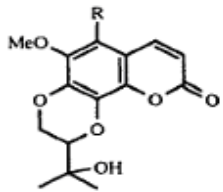
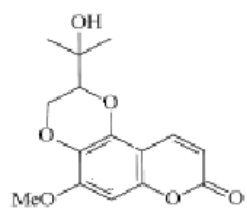
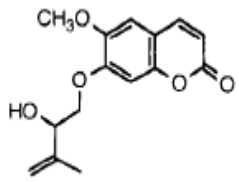
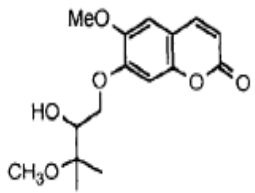

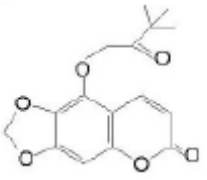
A fitoquímica como ferramenta taxonômica em Asteraceae tem sido frequentemente aplicada. Conforme Bremer (1994), a família Asteraceae possui a tendência de produzir lactonas sesquiterpênicas, e para Ribeiro e Kaplan (2002) a ocorrência de cumarinas na ordem Asterales é bastante significativa. Muitos ensaios fitoquímicos evidenciaram a presença abundante de cumarinas em todas as espécies de *Pterocaulon* já descritas (LIMA, 2006). Debenedetti e colaboradores (1996) isolaram um número elevado de cumarinas tri- e tetra oxigenadas de *P. purpurascens*, mais precisamente purpurenol, purpurasol e purpurasolol. Isopurpurasol, um regioisômero de purpurasol, foi isolado de um extrato clorofórmico de *Pterocaulon virgatum*. Também do extrato de *Pterocaulon virgatum*, outras cumarinas foram isoladas: virgatenol, virgatol, 5- hidroxí-6, 7- metilenodioxícumarina, 5- (2- hidroxí-3 - metoxí-3 -metilbutoxi)-6,7-metilenodioxícumarina, 5- (2-hidroxí-3-metil-3-buteniloxi) cumarina, sabandinol e sabandinona (**Tabela 2**). Suas estruturas foram elucidadas com base em métodos espectroscópicos. Todas essas cumarinas demonstram uma ligação benzodioxina característica, que é muito

rara em cumarinas naturais (DEBENEDETTI *et al.*, 1996, 1997, 1998, 1999; MAES *et al.*, 2006a, 2006b). Também foram isoladas cumarinas de *P. balansae*, *P. lanatum* (MAGALHÃES *et al.*, 1981), *P. polystachyum* (PALACIOS *et al.*, 1999) e *P. alopecuroides* (VILEGAS *et al.*, 1995).

No gênero *Pterocaulon* a diversidade de estruturas fenólicas é ilustrada também pela presença de flavonóides. O composto crisofenol C, pertencente ao grupo de compostos conhecidos como 4'-hidroxi-3-metoxiflavonas, foi isolado da espécie *P. sphacelatum* (SEMPLE *et al.*, 1999). Das partes aéreas de *P. alopecuroides* foi extraído um flavonóide tetraidroxi-substituído (VILEGAS *et al.*, 1995) e, num estudo recente, Alarcón e colaboradores (2008) isolaram seis flavonóides das partes aéreas da mesma espécie. Debenedetti e colaboradores (1987) isolaram e identificaram seis flavonóides do extrato diclorometanólico de *P. purpurascens*, entre eles o flavonóide quercetina. A espécie *P. virgatum* também teve flavanóis isolados e identificados (BOHLMANN *et al.*, 1981).

Outros compostos têm sido isolados em *Pterocaulon*: ácido cafeoilquínico para *P. virgatum* (MARTINO *et al.*, 1979); acetilenos tiofênicos para *P. virgatum* (BOHLMANN *et al.*, 1981); poliacetilenos para *P. alopecuroides*, *P. balansae*, *P. lanatum* e *P. rugosum* (MAGALHÃES, 1999); *P. purpurascens* (DEBENEDETTI *et al.*, 1987) e *P. alopecuroides* (VILEGAS *et al.*, 1995). As espécies *Pterocaulon alopecuroides* e *P. balansae* apresentam morfologia similar, havendo diferenciação significativa relacionada à constituição química destas espécies. Num estudo realizado com partes aéreas da espécie *Pterocaulon alopecuroides* coletada da Serra do Taboão, estado de Minas Gerais, Brasil, foram isoladas duas cumarinas oxipreniladas, e um flavononol (DEBENEDETTI *et al.*, 1996, 1997, 1998, 1999; MAES *et al.*, 2006a, 2006b).

Tabela 2: Estruturas das cumarinas citadas para o gênero *Pterocaulon*.

Substâncias	Estruturas	Fonte	Referências
1: Purpurenol 2: Purpurasol 3: Purpurasolol	 <p>1: R = OMe 2: R = H 3: R = OH</p>	<i>P. purpurascens</i>	Debenedetti <i>et al.</i> , 1996.
Isopurpurasolol		<i>P. virgatum</i>	Debenedetti <i>et al.</i> , 1999.
Virgatenol		<i>P. virgatum</i>	Debenedetti <i>et al.</i> , 1998.
Virgatol		<i>P. virgatum</i>	Debenedetti <i>et al.</i> , 1998.
Sabandinol		<i>P. virgatum</i>	Debenedetti <i>et al.</i> , 1997.
Sabandinona		<i>P. virgatum</i>	Debenedetti <i>et al.</i> , 1997.

3.3 Estresse Oxidativo e Atividade Antioxidante

3.3.1 Espécies Reativas de Oxigênio

A produção de radicais livres ocorre continuamente em todas as células vivas, como consequência de numerosos processos fisiológicos e bioquímicos. Durante o metabolismo celular aeróbico há a geração de produtos secundários, oriundos da redução do oxigênio, na ordem de 2% dos produtos finais (água e gás carbônico). Esses intermediários da redução parcial do oxigênio são conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROs), que em conjunto com as espécies reativas de nitrogênio (ERNs), possuem reatividades químicas marcadamente acentuadas (CHEESEMAN & SLATER, 1993; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2001; VALKO *et al.*, 2006).

Os organismos vivos possuem mecanismos de defesa para proteger-se dos danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs). Os danos podem ocorrer quando há um desbalanço entre a produção de EROs e sua eliminação através dos sistemas antioxidantes. Esse desequilíbrio se dá tanto pela produção excessiva de espécies reativas quanto pela depleção dos sistemas antioxidantes de defesa. Qualquer uma dessas situações ocasionará o chamado estresse oxidativo (HALLIWELL, 1991; CUI *et al.*, 2004).

O agravamento do estresse oxidativo original, pode resultar em lesões oxidativas a macromoléculas e diversas estruturas celulares que, se não forem reparadas, alteram a funcionalidade das células, tecidos e órgãos (DRÖGE, 2001; CUI *et al.*, 2004; HALLIWELL, 2006a). Tanto o estresse oxidativo agudo quanto o crônico têm sido associados à doenças degenerativas e à alterações de funções fisiológicas tais como: aterosclerose, diabetes, isquemia/reperfusão, hipertensão, doenças inflamatórias, oculares, pulmonares, hematológicas e neurológicas. O sistema nervoso é propenso ao estresse oxidativo porque apresenta um sistema de defesa antioxidante débil e situações como aumento do dano oxidativo, disfunção mitocondrial, acúmulo de proteínas oxidadas e inflamação constituem complexos processos patológicos que induzem a morte

neuronal. Além disso, as espécies reativas são carcinogênicas porque facilitam mutagênese, promoção tumoral e progressão. É crescente a evidência de que o estresse oxidativo aumenta com a idade e, com isso, o envelhecimento e a perda do condicionamento físico têm sido atribuídos, pelo menos em parte, aos efeitos crônicos destas espécies (CUI *et al.*, 2004; DRÖGE, 2005; ROBERTSON & HARMON, 2006; HALLIWELL, 2006b).

3.3.2. Mecanismos Antioxidantes

Segundo HALLIWELL (2001), antioxidantes são substâncias que, quando presentes em baixas concentrações em relação a substratos oxidáveis (carboidratos, lipídios, ácidos nucleicos ou proteínas), retardam ou previnem de modo significativo a oxidação dessas moléculas, através da inibição de reações oxidativas em cadeia de diferentes maneiras.

Dentre as defesas antioxidantes endógenas desenvolvidas por organismos aeróbicos para reduzir o acúmulo intracelular de EROs, destacam-se:

- ✓ Enzimas que cataliticamente removem radicais livres e outras espécies reativas, tais como superóxido dismutases, catalases e peroxidases
- ✓ Metaloproteínas que minimizam a disponibilidade de agentes pró-oxidantes (íons ferro e cobre e moléculas do grupo “*hemo*”), tais como transferrinas, haptoglobinas, hemopexinas e metalotioneínas
- ✓ Proteínas que protegem biomoléculas contra danos (inclusive danos oxidativos) através de outros mecanismos, tais como proteínas choque térmico
- ✓ Agentes que atuam como “scavengers” de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, ou seja, seqüestram ou neutralizam radicais livres oxidando-se nesse processo, tais como glutathione, α -tocoferol, bilirrubina e ácido úrico (LARSON, 1988; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2001; MANCUSO *et al.*, 2003; SUZUKI, 2007).

Antioxidantes exógenos ingressam no organismo humano através dos alimentos, e atuam através de mecanismos não enzimáticos. O sistema endógeno de defesa pode ser auxiliado favoravelmente com a introdução dessas substâncias por meio da dieta (SILVA *et al.*, 2005b; VALKO *et al.*, 2006)

Em geral as reações antioxidantes envolvem passos múltiplos incluindo a iniciação, propagação e terminação de radicais livres. Os antioxidantes classificam-se em dois grupos de mecanismos: aqueles que inibem ou retardam a formação de radicais livres a partir de seus precursores instáveis (iniciação) são chamados antioxidantes preventivos; aqueles que interrompem a reação radicalar em cadeia (propagação) chamam-se antioxidantes “*chain-breaking*”. Esse é o grupo mais estudado de antioxidantes e o mecanismo pelo qual atuam é através da transferência de átomos de hidrogênio. Especificamente, um antioxidante “*chain breaking*” (AH) doa seu átomo de hidrogênio lábil a radicais peroxila (ROO·) muito mais rapidamente que ROO· reage com o substrato. O radical A· formado é estável e é incapaz de continuar a autoxidação da cadeia (OU *et al.*, 2001).

3.3.3. Antioxidantes de origem natural

A partir do início dos anos 80 aumentou consideravelmente o interesse na busca de antioxidantes de origem natural para o emprego em produtos alimentícios ou para uso farmacêutico, com o intuito de substituir antioxidantes de origem sintética (ZHENG & WANG, 2001; SOBRATTEE *et al.*, 2005). Este interesse deve-se principalmente ao fato de que os radicais livres estão relacionados ao desenvolvimento de várias desordens orgânicas (WILLCOX *et al.*, 2004). O consumo de substâncias antioxidantes pode produzir uma ação protetora efetiva contra os processos oxidativos que naturalmente ocorrem no organismo (RICE-EVANS *et al.*, 1997; ARREDONDO *et al.*, 2004).

As propriedades antioxidantes de substâncias de origem natural apresentam várias perspectivas relacionadas ao cuidado da saúde humana. Estudos indicam que muitos dos compostos antioxidantes presentes na dieta possuem atividades antiinflamatória, antiaterosclerótica, antitumoral,

antimutagênica, anticarcinogênica, antibacteriana e antiviral. A prevenção de câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas tem sido associada ao consumo de frutas frescas, infusões e vegetais ricos em antioxidantes naturais, o que sugere que um maior consumo de tais compostos poderia diminuir o risco de mortalidade relacionado a essas enfermidades (COOK & SAMMAN, 1996; DE RIJK *et al.*, 1997; VELIOGLU *et al.*, 1998; YODIM *et al.*, 2002; CAI *et al.*, 2004; WILLCOX *et al.*, 2004; SOBRATTEE *et al.*, 2005; VALKO *et al.*, 2006).

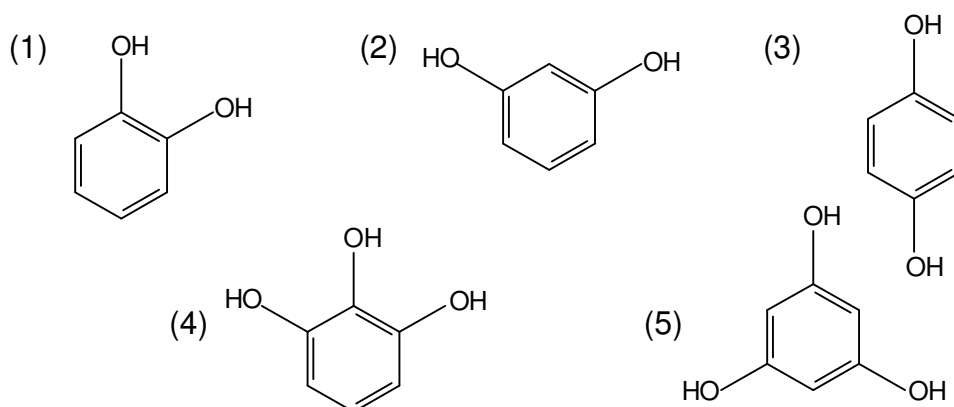
Embora não seja comum a utilização de plantas medicinais como “antioxidantes”, suas propriedades terapêuticas podem ser em parte devido à capacidade que as mesmas apresentam de neutralizar espécies reativas de oxigênio, envolvidas no desenvolvimento de enfermidades para as quais a planta é indicada (DESMARCHELIER *et al.*, 1999; DESMARCHELIER *et al.*, 2000). Na busca de novas substâncias com ação antioxidante, muitas plantas têm sido avaliadas quanto a sua capacidade de neutralização de radicais livres (DESMARCHELIER *et al.*, 1997; DESMARCHELIER *et al.*, 2000; PAREJO *et al.*, 2003; VELÁSQUEZ *et al.*, 2003; CAI *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2005b).

Espécies vegetais podem apresentar uma ampla variedade de moléculas capazes de inativar radicais livres, tais como compostos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonóides, quinonas, cumarinas, estilbenos, taninos, etc), compostos nitrogenados (alcalóides, aminas), vitaminas (E, C), terpenóides (carotenóides), bem como muitos outros metabólitos endógenos que exercem ação antioxidante (LARSON, 1988; VELIOGLU *et al.*, 1998; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2001; DESMARCHELIER *et al.*, 2000; NG *et al.*, 2000; ZHENG & WANG, 2001; SOBRATTEE *et al.*, 2005; O'BRIEN *et al.*, 2006).

3.3.3.1. Compostos Fenólicos

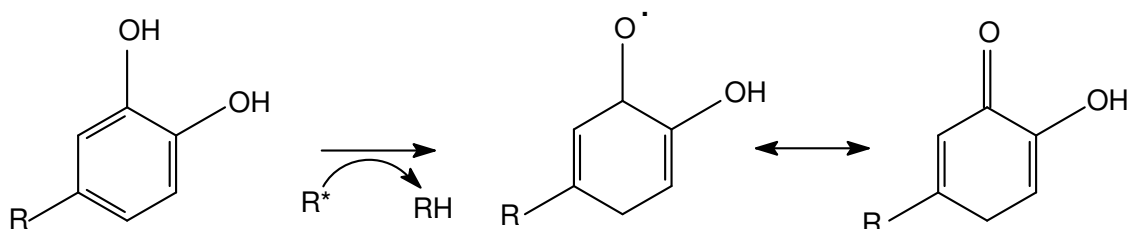
Os compostos fenólicos pertencem a um grupo de substâncias que inclui uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas. O termo fenólico pode ser definido quimicamente como uma estrutura que possui pelo menos um anel aromático no qual, ao menos um hidrogênio encontra-se substituído por um grupamento hidroxila, incluindo funções derivadas, como éster,

metiléter, glicosídeos, entre outros. No entanto, uma definição puramente química de fenóis como metabólitos secundários de plantas não é totalmente satisfatória, sendo necessário considerar a origem biossintética para a classificação dessas substâncias. Cada classe de composto apresenta ampla variação estrutural, principalmente pela presença de diferentes substituintes em um esqueleto aromático comum. Muitas classes de polifenóis encontrados na natureza apresentam-se como derivados dos grupos catecol (1), resorcinol (2), hidroquinona (3), pirogallol (4) ou floroglucinol (5) (HARBORNE, 1989; CARVALHO *et al.*, 2003; SOOBRAATTEE *et al.*, 2005).



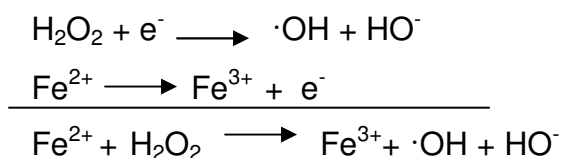
Estudos têm demonstrado uma relação direta entre a atividade antioxidante e o conteúdo de substâncias fenólicas em plantas (VELIOGLU *et al.*, 1998; ZHENG & WANG, 2001; PAREJO *et al.*, 2003; CAI *et al.*, 2004; MILIAUSKAS *et al.*, 2004; KATALINIC *et al.*, 2006). Polifenóis apresentam estrutura química adequada para produzir ação antioxidante devido as suas propriedades redox, uma vez que possuem anéis aromáticos com substituintes hidroxílicos, que atuam como doadores de H ou elétrons, desempenhando um importante papel na captação e neutralização de radicais livres, tais como o oxigênio triplete e singlete e peróxidos (Esquema 1) (RICE-EVANS *et al.*, 1997; ZHENG & WANG, 2001). BURDA E OLESZEK (2001) e HEIM e colaboradores (2002) sugerem que a capacidade antioxidante de compostos fenólicos é induzida principalmente pelo número e pela localização de radicais hidroxila e de ligações duplas. Por outro lado, é possível que a substituição glicosídica diminua a capacidade antioxidante (HEIM *et al.*, 2002). FYLAKTAKIDOU e colaboradores (2004)

verificaram que a capacidade *scavenger* das duas cumarinas glicosídicas (esculina e fraxina) é menor do que as respectivas agliconas.



Esquema 1: Mecanismo de redução de substâncias fenólicas.

Ainda, fenóis com dois grupamentos hidroxílicos adjacentes ou outros substituintes com capacidade quelante, podem ligar-se a íons de metais de transição, tal como o ubíquo Fe^{2+} dos sistemas biológicos, inibindo a reação de Fenton (Esquema 2), uma importante fonte de EROs (YOKOZAWA *et al.*, 1997; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).



Esquema 2: Reação de Fenton

Compostos fenólicos podem prevenir o câncer através da ação antioxidante e/ou modulação de muitas proteínas, são capazes ainda de inibir a carcinogênese atuando nos processos moleculares de iniciação, promoção e progressão (YANG *et al.*, 2001). Estudos com espécies vegetais utilizadas tradicionalmente na prevenção do câncer demonstraram forte correlação entre a ação antioxidante destas e o conteúdo de substâncias fenólicas, revelando que ácidos fenólicos, flavonóides, taninos, cumarinas, lignanas, estilbenos e

curcuminóides são os componentes antioxidantes dominantes nas plantas testadas (Cai *et al.*, 2004).

3.3.3.1.1 Flavonóides

Os flavonóides possuem um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados e/ou seus derivados funcionais (ésteres, glicosídeos). A família inclui as antocianidinas, flavonóis, flavanóis, flavanonas e flavonas. Entre os metabólitos secundários de vegetais estes compostos aparecem com relativa abundância (RICE-EVANS, *et al.*, 1996; ZUANAZZI, 1999).

A maioria dos representantes de flavonóides possui 15 átomos de carbono (C₆-C₃-C₆) em seu núcleo fundamental, o qual se constitui de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas. Quando o composto está na forma conjugada com açúcares é conhecido como heterosídeo, e sem o açúcar (forma livre) é chamado de aglicona ou genina (COOK & SAMMAN, 1996; ZUANAZZI, 1999).

Em relação ao potencial antioxidante, os flavonóides constituem o grupo mais representativo desta classe, para os quais muitos trabalhos destacam a relação existente entre a sua estrutura química com ação antioxidante (COOK & SAMMAN, 1996; RICE-EVANS *et al.*, 1997; AMIC *et al.*, 2003). Essas substâncias, abundantes em frutas, vegetais e plantas medicinais, apresentam uma forte capacidade de neutralizar radicais livres, além de serem considerados menos tóxicos do que antioxidantes sintéticos tais como butil-hidroxi-anisol (BHA) e butil-hidroxi-tolueno (BHT) (HOLLMAN & KATAN, 1997; PIETTA, 2000).

Estudos têm demonstrado que a peroxidação lipídica pode ser inibida por flavonóides, que atuam como fortes moléculas seqüestradoras de ânion superóxido (O₂⁻) e radical hidroxila (·OH) e *quencher* do oxigênio singlete (¹O₂), sendo esta atividade intimamente associada com sua estrutura química, especialmente ao número de grupamentos hidroxila ligados ao esqueleto básico e também a sua configuração. Tem sido proposto que estes compostos atuam como doadores de átomos de hidrogênio ao radical peroxila, inibindo, então, a autooxidação de ácidos graxos através da terminação da reação em

cadeia (COOK & SAMMAN, 1996; SOBRATTEE *et al.*, 2005). Estes compostos podem ainda prevenir o dano oxidativo através de suas propriedades quelantes de íons metálicos que participam da produção de EROs via reação de Fenton, bem como mediante a inibição de enzimas tais como lipoxigenase, ciclooxigenase, xantina oxidase, entre outras (COOK & SAMMAN, 1996).

3.3.3.1.2 Cumarinas

As cumarinas são largamente distribuídas no Reino Vegetal e algumas dessas são fisiologicamente ativas (CHAICHI *et al.*, 2003). TORRES e colaboradores (2006) realizaram um estudo sobre a capacidade antioxidante de cumarinas sintéticas e isoladas de espécies vegetais, com diferentes padrões de substituição, e verificaram que as 7,8-diidroxiladas são muito ativas frente a radicais superóxido. A atividade *scavenger* de furanocumarinas frente ao radical 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH*) é correlacionada com o número de hidroxilas fenólicas presentes nas suas estruturas. As cumarinas O-substituídas foram menos ativas, enquanto cumarinas fenólicas demonstraram atividade antioxidante maior. REI WU e colaboradores (2007), num ensaio comparativo entre quatro cumarinas isoladas de *Cortex fraxini* (esculetina, esculetina, fraxina, fraxetina) e antioxidantes de atividade conhecida (catequina, quercetina, trolox, ácido ascórbico e butil-hidroxitolueno), demonstraram que a esculetina teve a maior atividade *scavenger* frente aos radicais DPPH e ABTS [2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)].

A cumarina preniletina parece proteger as células humanas de estresse oxidativo induzido por peróxidos. A alta concentração de preniletina nas plantas pode ser diretamente relacionada com o mecanismo de proteção das células da planta contra o dano oxidativo e contra a peroxidação lipídica (LIU *et al.*, 1999). Esse processo, que ocorre também nas biomembranas, é complexo e envolve formação e propagação de radicais e rearranjo de ligas duplas em lipídios insaturados. Utilizando as etapas de iniciação e propagação da peroxidação lipídica microssomal. RA e colaboradores (1998) avaliaram a propriedade antioxidante de vários compostos cumarínicos, esses reduziram em torno de 90% a peroxidação lipídica. Ainda, diidroxí- e diacetoxicumarinas

demonstraram habilidade de interromper a reação em cadeia do radical e a propagação da peroxidação.

Alguns estudos demonstram a relação estrutura-atividade com a finalidade de selecionar ou planejar compostos mais ativos. Um estudo realizado por REI WU e colaboradores (2007) estabeleceu que substituição *ortho*-diidroxil e uma ligação dupla numa posição específica representam uma importante função na propriedade antioxidante de cumarinas simples. Um grupo hidroxila na posição 7 das cumarinas simples é necessário para sua atividade antioxidante e alguma substituição entre C₆-C₈, incluindo grupos glicosídicos ou metóxi, talvez reduza sua capacidade *scavenger* frente a radicais. Num estudo recente, ZHANG e WANG (2004) compararam a atividade *scavenger* frente ao radical peróxil de uma série de cumarinas. As que continham uma ligação catecol mostraram-se mais efetivas na “captura” do radical peróxil, demonstrando que o grupo catecol representa uma função chave no aumento da atividade antioxidante de cumarinas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos de preparação do material vegetal e obtenção dos extratos e frações foram realizados no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

A determinação de fenóis totais bem como a avaliação da capacidade de reação com 2,2 difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foram realizadas na Central Analítica da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

A determinação do potencial antioxidante total (TRAP) foi realizada no Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

O estudo de neuroproteção e hepatoproteção foi realizado no Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo, Departamento de

Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC.

Os solventes e reagentes empregados no trabalho foram de procedência Próton Química[®], Nuclear[®], Cromoline[®] e CRQ[®].

4.1. Material Vegetal

O material vegetal utilizado nas análises consistiu-se nas partes aéreas (folhas, ramos e sumidades floridas) das espécies *P. alopecuroides* e *P. balansae*. Estas plantas, de ocorrência natural nos municípios de Guaíba e Gravataí, estado do Rio Grande do Sul, foram coletadas nessas localidades, respeitando-se os períodos de floração e frutificação indicadas para o gênero, conforme a literatura. As plantas foram identificadas pelo Prof. Dr. Nelson Matzembaker do Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil. As exsiccatas 59571 correspondente a *P. alopecuroides* e 59572 correspondente a *P. balansae* foram depositadas no herbário da Universidade Federal de Rio Grande do Sul (ICN).

4.2. Preparação dos extratos

Após a coleta, o material vegetal foi selecionado, seco em ambiente arejado ao abrigo da luz. As plantas secas foram trituradas em moinho de facas e divididas em duas porções para preparo do extrato bruto e das frações. O extrato bruto foi obtido submetendo uma porção do material vegetal seco à extração com metanol, por maceração estática a frio. Em paralelo, a outra porção do material vegetal foi fracionada também por maceração estática, utilizando-se solventes em polaridade crescente, na ordem *n*-hexano, diclorometano e metanol. O tempo médio de maceração com cada um dos solventes foi de três meses. A eliminação do solvente e concentração dos extratos foi realizada sob pressão reduzida, em aparelho de evaporação rotatório, utilizando-se temperatura não superior a 55°C.

4.3 Determinação de fenóis totais

As concentrações de fenóis totais dos extratos bruto metanólico, e frações metanólica, diclorometânica e *n*-hexânica foram determinadas de acordo com o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON E ROSSI, 1965), utilizando quercetina como substância de referência (IVANOVA *et al.*, 2005). O reagente de Folin-Ciocalteu é constituído por uma solução de íons poliméricos complexos formados a partir dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico, que oxidam fenolatos e com sua redução formam complexos de coloração azul. Brevemente, a amostra (em diluição apropriada para a medida espectrofotométrica) foi oxidada com 5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu sendo essa reação neutralizada com volumes variáveis de solução saturada de carbonato de sódio (7,5%), necessário para completar o volume final de reação em 10 mL. Esta mesma mistura, substituindo-se a amostra por água destilada, foi utilizada como branco no espectrofotômetro. Após incubação por 45 minutos a temperatura ambiente, a absorvância da solução de coloração azul resultante do processo foi medida a $\lambda = 765$ nm em espectrofotômetro UV-visível Hewlett Packard 8452A. A quantificação foi realizada com base em uma curva padrão de quercetina (soluções metanólicas nas concentrações de 0; 0,65; 1,30; 1,95; 3,25 e 6,5 $\mu\text{g/mL}$). Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como equivalentes de quercetina (EQ/g: miligramas de quercetina por grama de extrato seco), utilizando para o cálculo a seguinte equação (1):

$$(1) C = cV/m$$

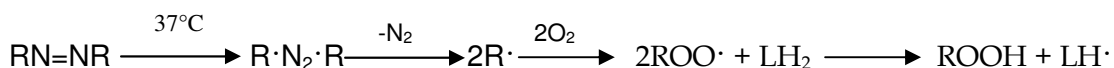
Onde, “C” é o conteúdo total de substâncias fenólicas presentes na amostra (mg de quercetina/g de extrato seco); “c” é a concentração de quercetina estabelecida através da curva padrão (mg/mL), “V” é o volume final de reação (mL) e “m” é a massa de extrato utilizado na leitura de absorvância (g) (MILIAUSKAS *et al.*, 2004).

4.4 Avaliação da Atividade Antioxidante

4.4.1 Determinação do potencial antioxidante total (TRAP)

A medida do TRAP (*Total Radical-trapping Antioxidant Parameter*), que avalia a capacidade antioxidante total de misturas complexas, foi realizada segundo LISSI e colaboradores (1992) utilizando cintilador Wallac 1409. Este é um método sensível e reprodutível, podendo ser utilizado para determinar a capacidade antioxidante de misturas, tais como extratos de plantas (DESMARCHELIER *et al.*, 1997).

Esta determinação foi realizada pela medida da intensidade de quimioluminescência do luminol induzida na presença de radicais peroxila formados pela decomposição térmica de 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) (ABAP) (Esquema 3) (LISSI *et al.*, 1992; EVELSON *et al.*, 2001).



Esquema 3: Mecanismo de quimioluminescência do luminol

A adição de misturas complexas de antioxidantes, tais como fluidos biológicos e extratos de plantas a uma solução contendo radicais peroxila produzidos pelo ABAP, leva a uma diminuição na quimioluminescência, por determinado período, denominado tempo de indução, que é proporcional à concentração de antioxidantes presentes na amostra (LISSI *et al.*, 1992).

A mistura de reação (3 mL) foi constituída por uma solução contendo a fonte de radicais livres (ABAP 10mM) em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4 e 10 µL da solução de luminol (5,6 mM, preparada em NaOH 0,1M), utilizado como amplificador do sinal de quimioluminescência. Foi realizada a contagem da mistura de reação (ABAP + luminol) por 80 segundos (contagens a cada 20 segundos) e posteriormente adicionaram-se as amostras.

Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), um análogo hidrossolúvel de α-tocoferol, e quercetina foram utilizados como substâncias antioxidantes de referência. Amostras foram testadas separadamente (10 µL)

utilizando-se diferentes concentrações de quercetina (160, 120 e 80µM), trolox (160 µM) e extratos brutos, frações metanólicas, frações diclorometano e frações hexânicas das espécies *P. alopecuroides* e *P. balansae*. As amostras foram dissolvidas em etanol. O etanol utilizado para solubilizar as amostras não interfere no resultado das análises.

A medida de quimioluminescência foi realizada durante o período necessário para um regresso a aproximadamente 20% do valor basal ou por um período de aproximadamente 23 minutos (contagens a cada 20 segundos). As medidas foram realizadas em duplicata e os resultados expressos em cpm/min considerando a concentração final na mistura de reação.

4.4.2 Avaliação da capacidade de reação com DPPH

4.4.2.1. Ensaio Bioautográfico

O ensaio com DPPH[•] foi realizado preliminarmente como um método rápido de *screening*, utilizando bioautografia de CCD (CONFORTI *et al.*, 2002). Através dessa técnica é possível uma avaliação da atividade antioxidante das amostras testadas, em função da capacidade das mesmas em neutralizar o radical livre estável DPPH, de coloração violeta, e cuja redução promove a formação de coloração amarela, devido à formação de difenil-picril-hidrazina. Para tanto, utilizou-se pequenas alíquotas das frações *n*-hexano, diclorometano e metanol, aplicadas em placas cromatográficas de sílica gel. Os sistemas eluentes foram constituídos de diclorometano, diclorometano:metanol (99:1) e (95:5) para a fração *n*-hexânica; diclorometano:metanol (95:5) e (90:10) para a fração diclorometano e acetato de etila:metanol:água (100:13,5:10) para a fração metanólica e extrato bruto. Após a eluição e secagem das placas, essas foram nebulizadas com solução de DPPH[•] e examinadas alguns minutos após a nebulização. Compostos com capacidade de redução do radical DPPH apareceram como manchas amarelas contra o fundo de cor violeta.

4.4.2.2. Ensaio Espectrofotométrico

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante frente ao radical estável DPPH[•] foi realizada através de medidas espectrofotométricas do consumo deste radical, na presença de substâncias antioxidantes (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995). Para tanto, alíquotas de soluções metanólicas dos extratos brutos, frações metanólicas, frações diclorometano e frações hexânicas, em diferentes concentrações, foram adicionadas em cubetas contendo 3 mL da solução etanólica 60µM do radical (Coeficiente de absorção molar $_{517\text{nm}}$: 11500M⁻¹cm⁻¹). Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como a média. A medida de absorvância, realizada em espectrofotômetro UV-visível Hewlett Packard 8452A, foi iniciada imediatamente após a mistura das soluções. O decréscimo de absorvância foi acompanhado a $\lambda=517$ nm e em temperatura de 25°C, com medições a cada 5 segundos e posteriormente a cada 10 segundos, com um tempo total de reação de 360 segundos para todas as amostras. Etanol foi utilizado como branco no espectrofotômetro. Quercetina foi utilizada como substância antioxidante de referência.

4.5 Estudos de neuroproteção e hepatoproteção

4.5.1 Animais experimentais

Foram utilizados ratos Wistar fêmeas de 30 dias de vida fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC – Brasil. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12h/12h em temperatura controlada (22 ± 1 °C), com livre acesso a água e ao alimento. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da UFSC, protocolo número PP00122 (anexos) e a utilização dos animais seguiu os Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório (Principles of Laboratory Animal Care, Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América, NIH, publicação número 85-23, revisada em 1985).

4.5.2 Preparação dos tecidos

No dia dos experimentos os animais foram sacrificados por decapitação com guilhotina. O cérebro e o fígado foram imediatamente dissecados sobre placa de Petry a 0 °C. Os tecidos foram homogeneizados com seis volumes do meio de incubação (1:6, p/v) composto por tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, contendo KCl 140 mM, e centrifugados a 750 g por 10 minutos a 4°C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante, uma suspensão de organelas incluindo as mitocôndrias, foi separado e utilizado para as medidas (LATINI, *et al*; 2002).

Os sobrenadantes foram incubados durante 1 hora a 37 °C com o extrato bruto ou com a fração metanólica de *Pterocaulon alopecuroides* e *Pterocaulon balansae* nas concentrações de 25 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml e 100 µg/ml em um meio que continha uma mistura de Fe⁺² (25 µM) e ascorbato (250 µM). Os parâmetros de estresse oxidativo foram medidos imediatamente após as incubações.

4.5.3 Análise da capacidade antioxidante dos extratos de Pterocaulon

A capacidade antioxidante dos diferentes extratos vegetais foi investigada em homogeneizados de cérebro e fígado de ratos nos quais foi induzido estresse oxidativo mediante a adição de uma mistura contendo Fe⁺² e ascorbato. Foram analisados os seguintes parâmetros de estresse oxidativo:

4.5.3.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)

A determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) foi baseada no método descrito por ESTEBAUER & CHEESEMAN (1990) no qual o malondialdeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica, reage com ácido tiobarbitúrico e forma um complexo colorido. Alíquotas pré-tratadas de sobrenadante de cérebro e fígado de ratos (200 µL), foram adicionadas de 250ul de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Após centrifugação a 13.000 g para

separar as proteínas, foram adicionados 200 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% contendo 7,1% de sulfato de sódio. Os tubos foram colocados em banho fervente por 25 minutos e, após retirados, foram resfriados em água. A leitura foi feita em espectrofotômetro a $\lambda = 540$ nm. A quantidade de TBA-RS foi calculada a partir dos valores de coeficiente de extinção como nmol TBA-RS / mg proteína (Coeficiente de absorção molar $_{540\text{nm}}$: $15.6000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e expressos como percentual do controle.

4.5.3.2 Conteúdo de tiois não protéicos (NPSH)

A determinação do conteúdo de tiois não protéicos (NPSH) nos sobrenadantes foi baseada no método descrito por ELLMAN (1959). Alíquotas pré-tratadas de sobrenadante de cérebro de ratos foram acidificadas com 250 µl de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 13.000 *g* durante 5 minutos a 4 °C. O pellet contendo as proteínas foi descartado, e a uma alíquota do sobrenadante contendo os SHNP livres foi adicionado de tampão fosfato de potássio 1M, pH 7.4 e 25 µl de DTNB (Ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico) 500 µM preparado em tampão fosfato de potássio 0,8 M, pH 7,4. A coloração resultante da reação entre DTNB e grupos tióis atinge o máximo em 5 minutos e é estável por cerca de 30 minutos. A absorvância das amostras foi lida a $\lambda = 412$ nm. A quantidade de NPSH foi calculada a partir dos valores de coeficiente de extinção como nmol NPSH / mg proteína (Coeficiente de absorção molar $_{412\text{nm}}$: $13,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e expressos como percentual do controle.

Dosagem de proteínas:

A dosagem de proteínas foi realizada de acordo com o método de Bradford e colaboradores (1951), usando como padrão uma solução de albumina bovina.

4.5.4 Análise estatística dos resultados

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão. A significância estatística dos resultados foi determinada pela análise da variância One-Way (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey quando apropriado, utilizando o software para cálculos estatísticos Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 16).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento dos extratos

O rendimento dos extratos brutos e das frações *n*-hexânica, diclorometânica e metanólica das duas espécies de *Pterocaulon* avaliadas em relação à atividade antioxidante estão apresentados na tabela 3. Para os cálculos de rendimento empregou-se a massa seca de material vegetal. Dentre os extratos brutos metanólicos, *P. balansae* apresentou o maior rendimento. Considerando o fracionamento, a fração metanólica apresentou o maior rendimento em ambas as espécies. A fração de menor rendimento foi a *n*-hexânica da espécie *P. alopecuroides*.

Tabela 3: Rendimento do extrato bruto e das frações *n*-hexânica, diclorometânica e metanólica das espécies de *Pterocaulon* expressos como gramas de extrato seco por 100 gramas de planta seca.

<i>P. alopecuroides</i>	g extrato/100g planta	<i>P. balansae</i>	g extrato/100g planta
Extrato Bruto	11,20	Bruto	20,79
<i>n</i>-Hexano (*)	0,94 (22,2)	<i>n</i>-Hexano (*)	1,29 (14,7)
Diclorometano (*)	1,91 (45,2)	Diclorometano (*)	1,8 (20,4)
Metanol (*)	6,85 (132,0)	Metanol (*)	8,14 (55,3)

(*) Valores entre parênteses indicam a porcentagem de massa das frações relativa à quantidade presente no extrato bruto correspondente.

5.2 Determinação de fenóis totais

Muitos estudos têm descrito que os polifenóis presentes nos vegetais inibem o estresse oxidativo devido a sua atividade *scavenger* de radicais livres

in vitro e *in vivo* (MANACH, *et al.*, 2004; RICE-EVANS, *et al.*, 1996). Dessa forma, a quantificação de fenólicos em vegetais é útil para atribuir-lhes propriedades funcionais. O conteúdo de fenólicos totais foi quantificado pelo método de Folin-Ciocalteu. Embora esse método possa superestimar o conteúdo total de compostos fenólicos, até o presente momento, esse é o método mais utilizado para estimar os fenólicos totais (DEEPA, *et al.*, 2007).

Considerando as altas concentrações de substâncias fenólicas presentes em diversos produtos de origem vegetal com ação antioxidante, os teores de fenólicos totais dos extratos brutos metanólicos e das frações foram comparados para uma avaliação prévia sobre o possível potencial antioxidante das mesmas.

Os resultados obtidos através do método de Folin-Ciocalteu para a quantificação de compostos fenólicos presentes nas espécies de *Pterocaulon* analisadas estão apresentadas na tabela 4. Os valores correspondem a uma média de três experimentos, obtidos com base na curva padrão de quercetina, e estão expressos em EQ/g. Também são apresentados os teores de compostos fenólicos em relação ao extrato seco (figura 1) e em relação à planta seca (figura 2). A curva padrão apresentou-se linear na faixa de concentração empregada, apresentando coeficiente de determinação 0,9955. A tabela 4 apresenta as absorvâncias médias encontradas para o padrão quercetina, nas diferentes concentrações.

Tabela 4: Teor de compostos fenólicos nas espécies de *Pterocaulon* expressos em microequivalentes de quercetina (EQ) por grama de material vegetal (extrato seco ou planta seca) (média \pm DP).

Espécies	Extrato Bruto		MeOH		CH ₂ Cl ₂		<i>n</i> -Hexano	
	(EQ) _e	(EQ) _p	(EQ) _e	(EQ) _p	(EQ) _e	(EQ) _p	(EQ) _e	(EQ) _p
<i>P. alopecuroides</i>	612 \pm 6,8	68 \pm 0,8	737 \pm 1,5	50 \pm 0,1	309 \pm 16	5,9 \pm 0,3	21 \pm 1	0,20 \pm 0,01
<i>P. balansae</i>	266 \pm 2,1	55 \pm 0,4	276 \pm 2,1	22 \pm 0,2	69 \pm 2	1,2 \pm 0,1	71 \pm 3	0,92 \pm 0,01

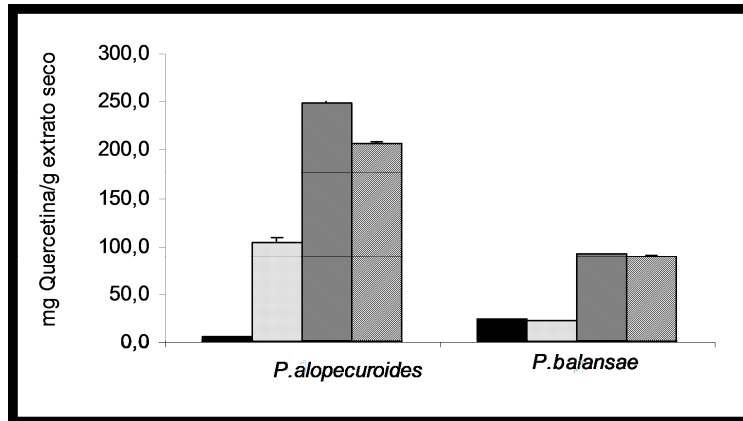


Figura 1: Teor de compostos fenólicos, expresso em miligramas de quercetina por grama de extrato seco (mgQ/g) em extratos e frações de espécies de *Pterocaulon*. Os dados representam a média \pm DP. (■ *n*-hexano; □ diclorometano; ■ metanol; ■ bruto)

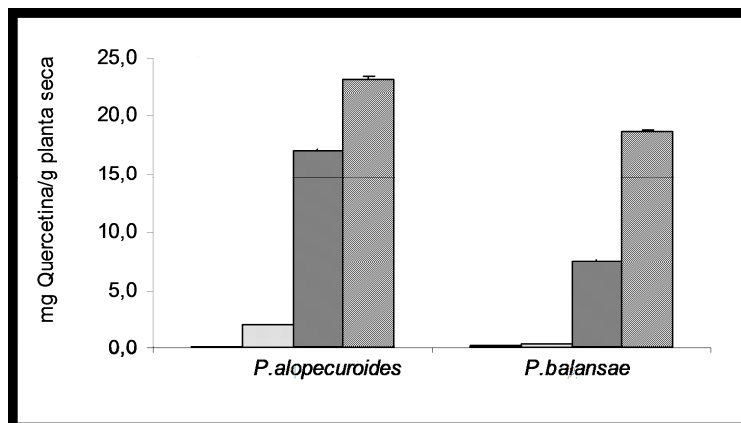
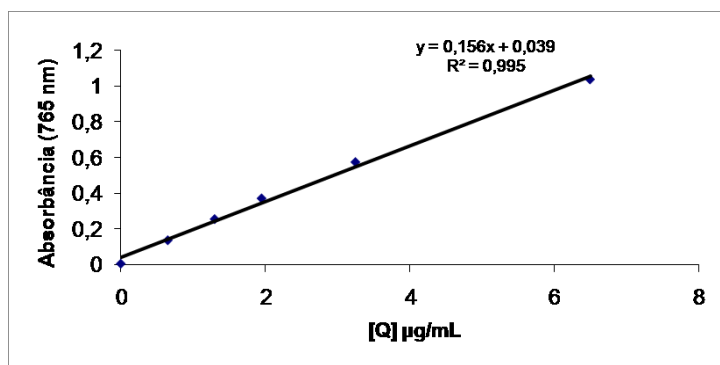


Figura 2: Teor de compostos fenólicos, expresso em miligramas de quercetina por grama de planta seca (mgQ/g) em extratos e frações de espécies de *Pterocaulon*. Os dados representam a média \pm DP. (■ *n*-hexano; □ diclorometano; ■ metanol; ■ bruto)

Tabela 5: Valores de absorvância obtidos para quercetina nas soluções padrão analisadas por espectrofotometria no UV.



Concentração (µg/mL)	Absorvância média (média ± DP) n=3
0	0,0052± 0,0003
0,65	0,1364± 0,0067
1,30	0,2547± 0,0115
1,95	0,3707± 0,0064
3,25	0,5736± 0,0059
6,50	1,0359± 0,0004

Os polifenóis apresentam-se como uma classe de substâncias amplamente distribuída no reino vegetal, podendo estar presentes em altas concentrações em determinados gêneros e espécies (HARBOURNE, 1993). Nas espécies de *Pterocaulon* avaliadas o teor de substâncias fenólicas variou entre 7,07 a 249,44 mg de quercetina por g de extrato seco, sendo estes extremos encontrados dentro de uma mesma espécie, *P. alopecuroides*, para fração *n*-hexano e metanólica, respectivamente. O maior conteúdo de fenólicos na fração metanólica em relação ao extrato bruto pode ser devido à presença de compostos não fenólicos menos polares (tais como terpenóides) que estariam somando massa no extrato bruto metanólico e não estariam presentes na fração metanólica.

De acordo com SINGLETON & ROSSI (1965), vários compostos fenólicos apresentam diferentes respostas no ensaio de Folin-Ciocalteu. A resposta molar desse método é aproximadamente proporcional ao número de grupamentos hidroxila presentes em uma amostra, porém a capacidade redutora destes compostos é aumentada quando duas hidroxilas fenólicas encontram-se em orientação *orto* ou *para* (FRANKEL *et al.*, 1995).

5.3 Avaliação do potencial antioxidante total (TRAP)

O mecanismo da quimioluminescência do luminol é fundamentado pela produção de radicais através da reação desse composto com radicais peroxil oriundos da termólise de ABAP. A capacidade de uma amostra em inibir a quimioluminescência induzida por luminol pode, então, ser relacionada a sua capacidade em capturar os radicais formados (LISSI *et al.*, 1992).

A intensidade da quimioluminescência dos radicais luminol formados foi empregada para monitorar o potencial antioxidante total de extratos brutos metanólicos, frações *n*-hexano, diclorometano e metanol utilizando trolox e quercetina como substâncias de referência.

A adição das frações polares (extrato bruto e fração metanólica) de *P. alopecuroides* e *P. balansae* promoveu uma diminuição na quimioluminescência, por um determinado período (tempo de indução) (figura 3). O tempo de indução, após a adição do extrato bruto e fração metanólica, foi proporcional à concentração destes e, portanto proporcional à quantidade de antioxidantes presentes na amostra. Observa-se que as frações metanólicas possuem maior capacidade de capturar os radicais derivados do luminol quando comparadas aos seus respectivos extratos nas mesmas concentrações.

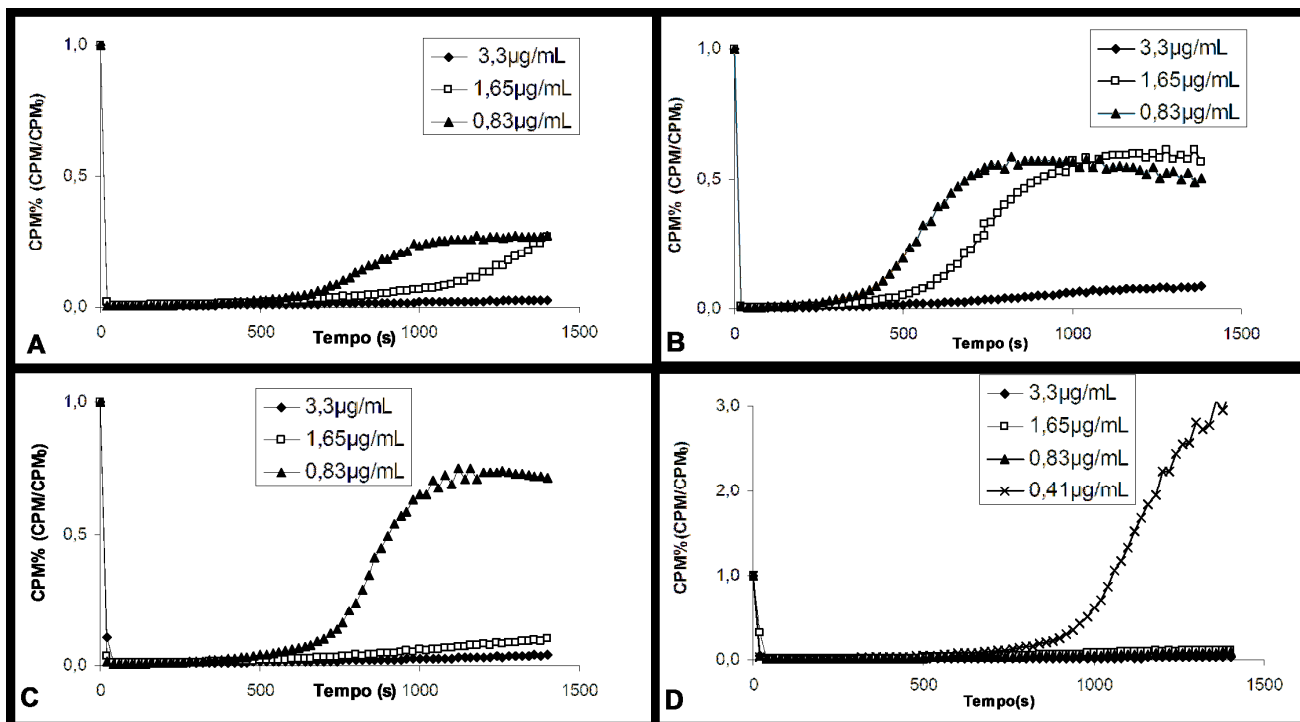


Figura 3 : Intensidade de quimioluminescência (contagens por minuto), medida após a adição de concentrações crescentes dos extratos brutos metanólicos de *Pterocaulon balansae* (A) e *Pterocaulon alopecuroides* (B) e das frações metanólicas de *P. balansae* (C) e *P. alopecuroides* (D).

Nas frações apolares observa-se o decaimento da quimioluminescência em concentrações maiores do que as utilizadas na fração e no extrato polares (figura 4). A fração hexânica, mais apolar, apresenta capacidade de capturar os radicais peroxila formados em concentração 10 vezes maior à utilizada nos extratos polares. Comparando-se as frações diclorometânicas das espécies avaliadas, verificou-se que *P. alopecuroides* apresenta maior potencial antioxidante.

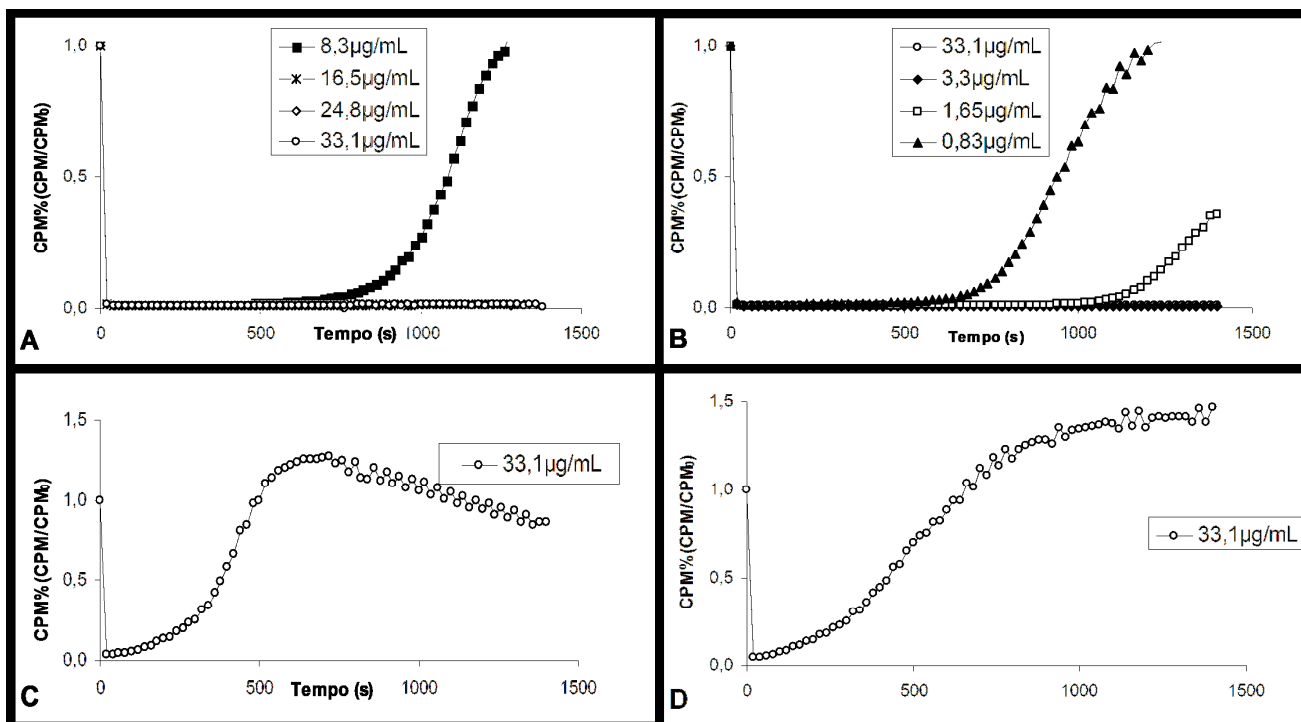


Figura 4: Intensidade de quimioluminescência (contagens por minuto), medida após a adição de concentrações crescentes das frações diclorometânica de *Pterocaulon balansae* (A) e *Pterocaulon alopecuroides* (B) e das frações hexânicas de *P. balansae* (C) e *P. alopecuroides* (D).

Como é possível verificar na figura 5, o decaimento na quimioluminescência após a adição dos extratos e frações das plantas e de quercetina no meio de reação, mostra-se diferente do decaimento obtido empregando trolox. Esse comportamento pode ser resultado da presença de antioxidantes eficientes e não eficientes no extrato, e também devido à presença de hidroxilas mais ou menos reativas na molécula de quercetina (DESMARCHELIER *et al.*, 1997; DESMARCHELIER *et al.*, 1999). Enquanto a velocidade do decaimento inicial está relacionada com a presença de antioxidantes eficientes na amostra, a variação na quimioluminescência medida após um longo período pode estar relacionada ao total de antioxidantes (eficientes e não eficientes) presentes na amostra (DESMARCHELIER *et al.*, 1997).

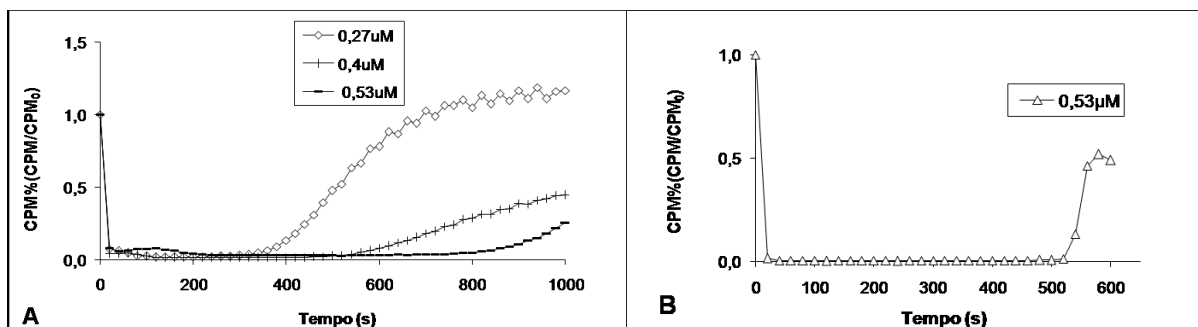


Figura 5: Efeito na intensidade de quimioluminescência (contagens por minuto), após a adição de quercetina nas concentrações de 0,27, 0,4 e 0,53 μM (A), bem como de trolox na concentração de 0,53 μM (B).

Ao comparar a inibição da quimioluminescência no tempo de 1000 segundos (figura 6), observou-se que as maiores concentrações testadas obtiveram porcentagens de inibição próximas a 100%. Verificou-se também que o extrato bruto de *P. balansae* e a fração metanólica de *P. alopecuroides*, em uma de suas menores concentrações testadas (0,83 μg/mL), apresentaram potencial antioxidante maior do que a quercetina em sua maior concentração (0,53 μM).

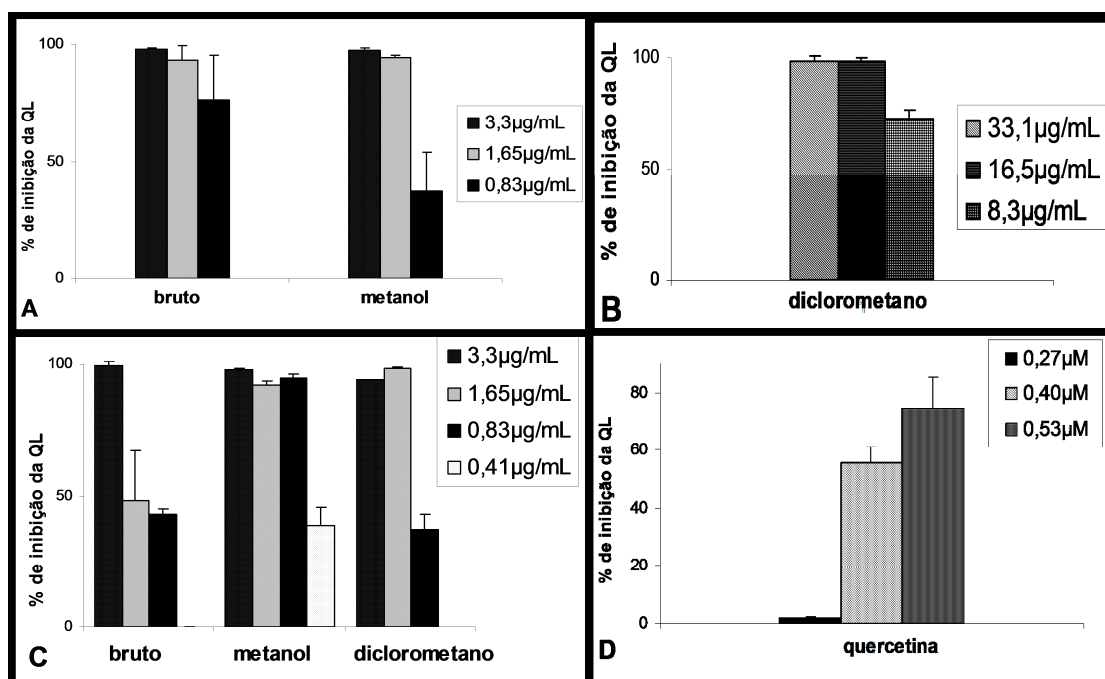


Figura 6: Percentual de inibição da quimioluminescência, no tempo de 1000s após a adição de concentrações crescentes do extrato bruto, fração metanólica (A) e diclorometanólica (B) de *P. balansae*, extrato bruto, fração metanólica e diclorometanólica de *P. alopecuroides* (C), bem como de quercetina (D). Cada barra representa a média ± DP.

Os resultados obtidos no TRAP coincidem com os obtidos no doseamento de compostos fenólicos, ou seja, as amostras com maior potencial antioxidante total apresentam conteúdo maior de compostos fenólicos. Essa relação é demonstrada para outros extratos ricos em polifenóis, sugerindo que os compostos fenólicos poderiam ser os responsáveis pela atividade antioxidante desses extratos (BANERJEE & DASGUPTA, 2005; SHAN *et al.*, 2005; ZAINOL *et al.*, 2003) .

Devido ao perfil observado para o decaimento na quimioluminescência, após a adição das amostras avaliadas, é possível concluir que o potencial antioxidante dos extratos e frações das espécies de *Pterocaulon* deve-se à presença de antioxidantes de alta e de baixa reatividades, característico de misturas complexas.

5.4 Avaliação da capacidade de reação com 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH[•])

O modelo para avaliação da atividade antioxidante utilizando DPPH[•] é baseado na capacidade do radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil em reagir com substâncias doadoras de H ($\text{DPPH}^{\bullet} + [\text{AH}]_n \rightarrow \text{DPPH-H} + [\text{A}^{\bullet}]_n$), incluindo compostos fenólicos, sendo um método amplamente utilizado (SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 1998; MENSOR *et al.*, 2001).

O novo radical formado (A[•]) pode seguir a interação radical-radical para gerar moléculas estáveis, através da colisão de radicais com a abstração de um átomo de um radical para outro ($\text{DPPH}^{\bullet} + \text{A}^{\bullet} \rightarrow \text{DPPH}^{\bullet}\text{-A}$; $\text{A}^{\bullet} + \text{A}^{\bullet} \rightarrow \text{A-A}$), embora essas reações secundárias sejam dificultadas. O consumo de DPPH[•] é, portanto, um índice para estimar a capacidade antioxidante na captura de radicais livres presentes no meio. No ensaio espectrofotométrico, a absorvância em $\lambda = 517$ nm diminui como um resultado de uma alteração na

coloração violeta característica para amarelo, uma vez que o radical é capturado por antioxidantes presentes na amostra através da doação de um átomo de H para formar a molécula estável DPPH-H (ESPÍN *et al.*, 2000).

Neste trabalho, preliminarmente foi realizado um ensaio bioautográfico por CCD com as amostras testadas, para avaliação de sua capacidade de reação com o radical DPPH[•]. As amostras utilizadas para essa análise foram obtidas através do fracionamento do material vegetal com solventes em polaridade crescente (*n*-hexano, diclorometano e metanol), realizado para avaliar a natureza das substâncias responsáveis pela atividade antioxidante. Após nebulização do cromatograma com uma solução de DPPH[•], compostos com capacidade antiradical apareceram como bandas amarelas. Através da análise verificou-se a presença de compostos antioxidantes em todas as frações de *Pterocaulon*. Nas frações *n*-hexano e diclorometano observou-se bandas com fraca atividade antioxidante.

Posteriormente, foram realizadas cinéticas do consumo do radical DPPH[•] para extratos e frações de espécies de *Pterocaulon* uma vez que foi verificada a capacidade de reação com o radical DPPH[•], através da bioautografia.

Nas figuras 7 e 8 estão representadas as curvas de decaimento, obtidas durante o consumo do radical DPPH[•] ao agregar diferentes concentrações do extrato bruto metanólico e das frações metanólicas, diclorometânicas e *n*-hexânicas das espécies de *Pterocaulon* em análise. O consumo de radicais DPPH[•] pelas amostras avaliadas resultou em um padrão similar nas curvas de decaimento da absorvância do radical versus tempo, onde nos primeiros segundos observou-se um rápido decaimento da absorvância, sendo posteriormente verificado que esta manteve-se estável. O comportamento cinético de extratos vegetais é caracterizado por uma cinética rápida, na qual nos primeiros segundos atinge-se praticamente o máximo de consumo do DPPH[•], permanecendo uma quantidade do radical remanescente ao longo do tempo total de observação (SOUSA *et al.*, 2007). O perfil cinético do consumo de

radicais DPPH[•] mostrou-se dependente da concentração de amostra adicionada no meio de reação.

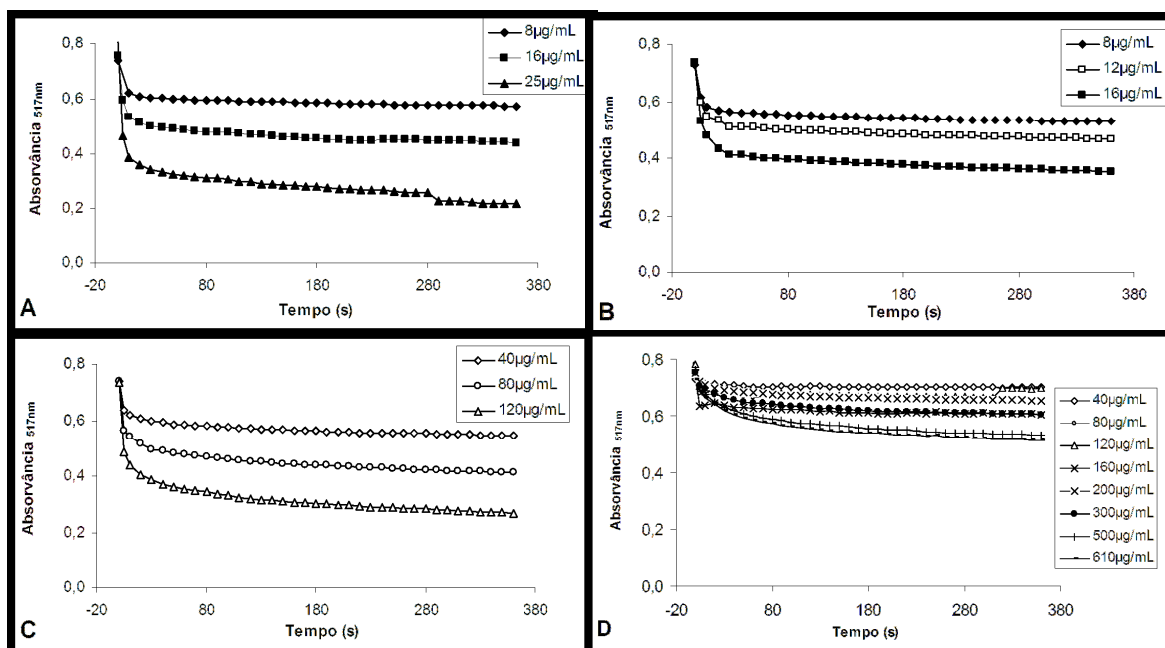


Figura 7: Consumo do radical DPPH[•] (60 µM), monitorado pela diminuição de absorvância a $\lambda=517$ nm, ao agregar diferentes concentrações do extrato bruto metanólico (A) e das frações metanólica (B), diclorometânica (C) e *n*-hexânicas (D) de *P. balansae*.

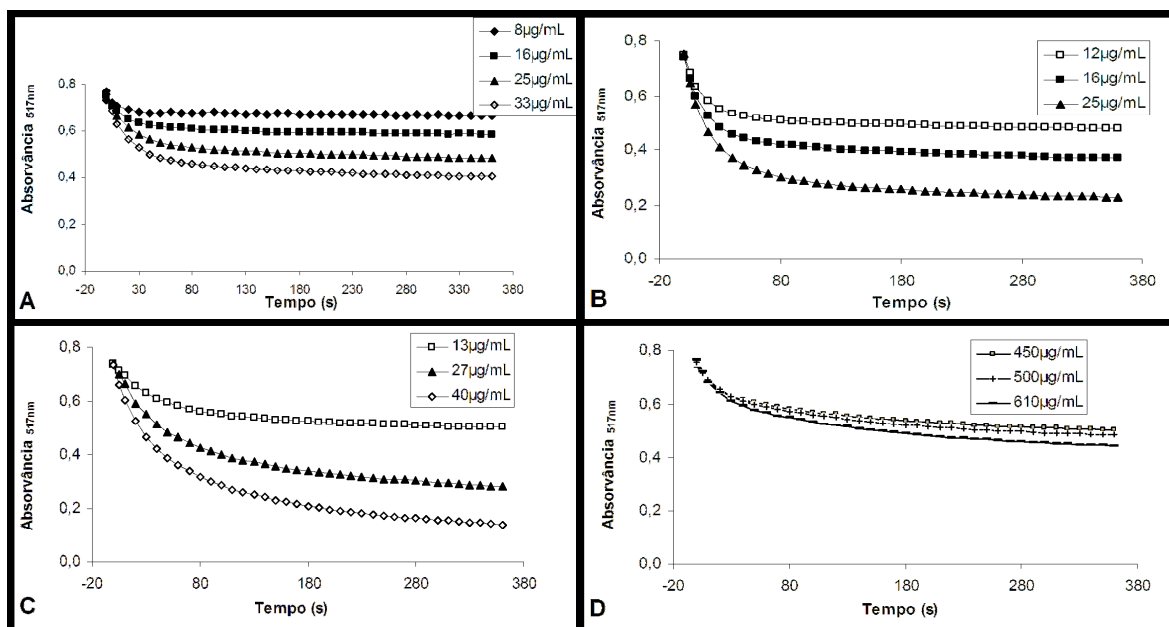


Figura 8: Consumo do radical DPPH[•] (60 µM), monitorado pela diminuição de absorvância a $\lambda=517$ nm, ao agregar diferentes concentrações do extrato bruto metanólico (A) e das frações metanólica (B), diclorometânica (C) e *n*-hexânicas (D) de *P. alopecuroides*.

Foram obtidas leituras em diferentes concentrações de amostra para as misturas complexas. As medidas foram realizadas em triplicatas objetivando-se encontrar concentrações que promovessem um decaimento da absorvância do DPPH• próximo aos 50%, ou que pudesse ser utilizada para medidas de comparação entre os diferentes extratos.

A quantidade de DPPH• removida do meio, acompanhada pela diminuição na absorvância da solução do radical, é proporcional à atividade *scavenger* da amostra, sendo possível, portanto, assumir que o consumo de DPPH• é equivalente à capacidade antioxidante pelas substâncias presentes na amostra (ESPÍN *et al.*, 2000). O percentual de consumo do radical DPPH• foi calculado de acordo com a equação 2:

$$(2) \text{ Consumo } 50s = \text{Abs}_0 - \text{Abs}_{50s} / \text{Coeficiente de absorção molar do radical}$$

Onde, Abs_0 é a absorvância do controle a $t=0s$, Abs_{50s} é a absorvância após 50s de reação e o coeficiente de absorção molar do DPPH•_{517nm} é 11500 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

O consumo 50 s foi comparado entre os diferentes extratos de uma mesma planta (figuras 9 e 10).

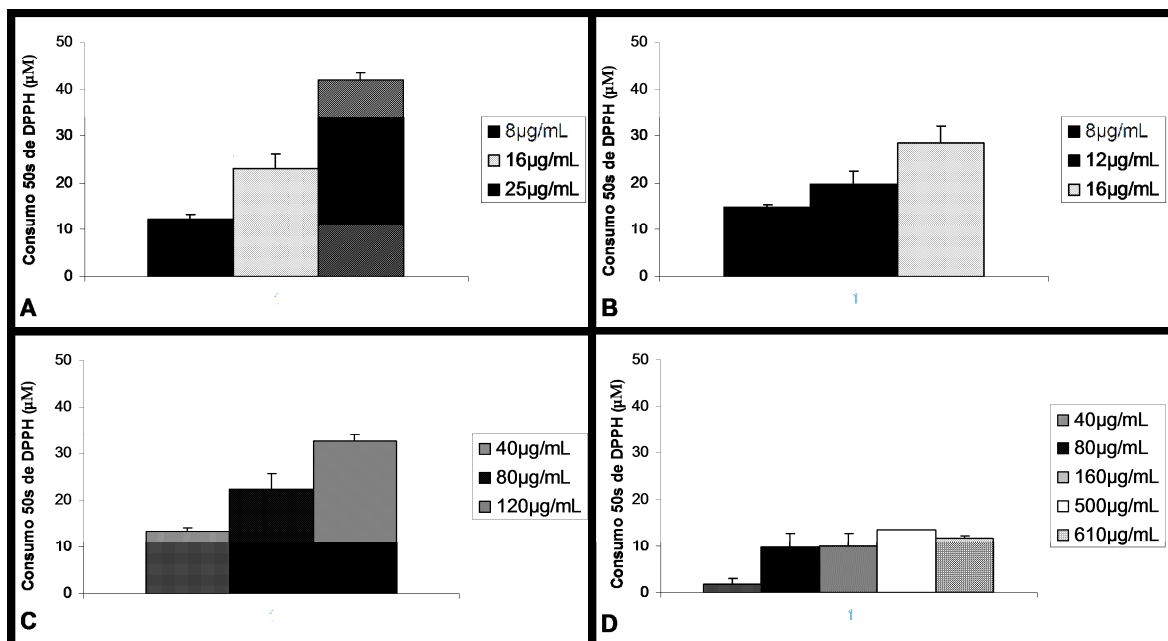


Figura 9: Comparação entre consumo do radical DPPH• (consumo aos 50 s) para extrato bruto (A), fração metanólica (B), fração diclorometanólica (C) e *n*-hexânica (D) de *P. balansae*. Cada barra representa a média \pm DP.

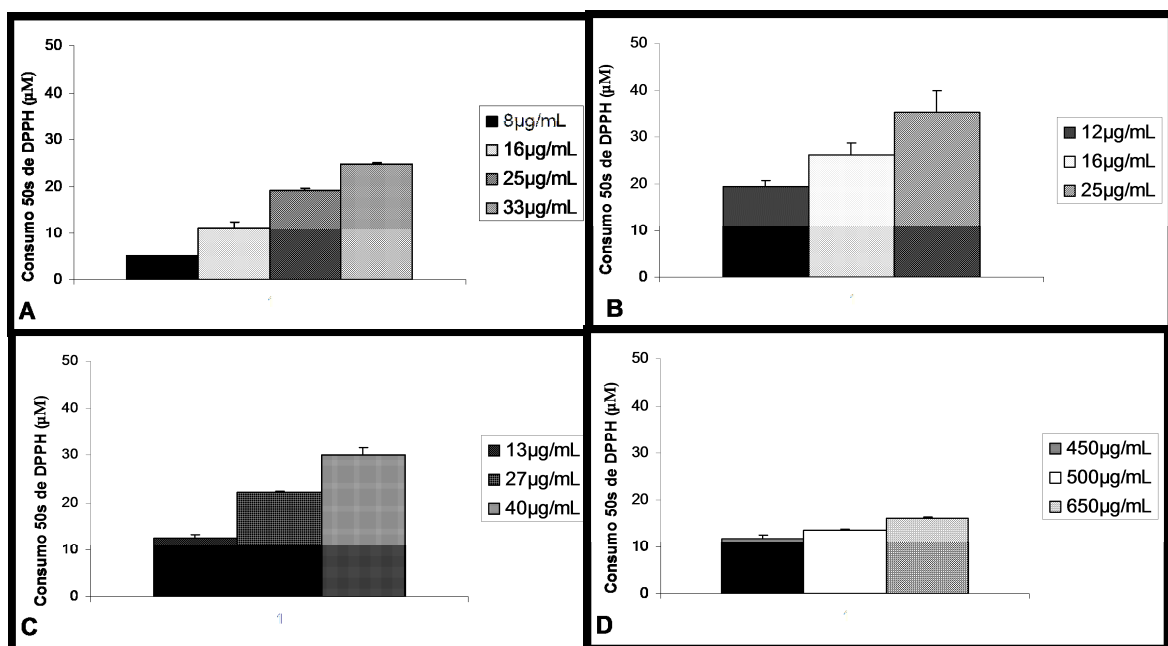


Figura 10: Comparação entre consumo do radical DPPH• (consumo aos 50 s) para extrato bruto (A), fração metanólica (B), fração diclorometanólica (C) e *n*-hexânica (D) de *P. alopecuroides*. Cada barra representa a média \pm DP.

Como é possível verificar, os resultados obtidos demonstram que os extratos e frações apresentaram atividade antioxidante em maior ou menor proporção, medida em termos de consumo do radical DPPH[•]. O consumo do radical mostrou-se proporcional à concentração de amostra utilizada.

Para *P. balansae* e *P. alopecuroides* a maior atividade antioxidante, medida através da capacidade de reação com o radical DPPH[•] foi verificada para a fração metanólica. Baseado no mecanismo de redução da molécula de DPPH[•] e no conhecimento prévio da constituição química desta fração, que apresenta elevado conteúdo de fenólicos totais, é possível inferir que a ação antioxidante da fração metanólica deve-se, ao menos em parte, à presença de substâncias com grupamentos hidroxila disponíveis, tais como os flavonóides (MENSOR *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2005).

De maneira geral, os resultados das amostras obtidas com solvente polar (extrato bruto e fração metanólica) apresentaram um consumo de radical substancialmente maior nos primeiros 50 s de reação, o que indica que com esse solvente são extraídas substâncias de alta reatividade com o radical DPPH[•]. Dentre estas, a fração metanólica apresentou a maior proporção de antioxidantes de alta reatividade, evidenciado pelo maior consumo do radical DPPH[•] nos primeiros 50 s de reação.

A fração *n*-hexânica demonstrou a menor atividade em neutralizar radicais DPPH[•] em ambas as espécies testadas, cujas concentrações necessárias para a obtenção de uma atividade antioxidante mínima foi consideravelmente maior do que as demais.

5.5 Estudo de neuroproteção e hepatoproteção

5.5.1 Medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)

A lipoperoxidação (LPO) é uma reação em cadeia que ocorre nas membranas celulares podendo levar ao acúmulo de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) que resultam em radicais capazes de propagar esta reação. Os produtos finais da decomposição dos LOOH são vários, dentre estes o malondialdeído (MDA) (HALLIWELL, 2001). A LPO é usualmente utilizada como marcador de lipídeos teciduais mediados por espécies reativas (CHEESEMAN *et al.*, 1993) e o MDA formado pode ser utilizado para quantificar este dano através da reação com ácido tiobarbitúrico (TBA) formando um complexo colorido.

O radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) é a principal espécie reativa responsável pela iniciação da LPO. Esta espécie reativa é produzida *in vivo* através da Reação de Fenton na qual o cátion Fe^{2+} reage com o peróxido de hidrogênio formando o $\cdot\text{OH}$. O ascorbato (ASC) auxilia na formação do radical através da redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} . Porém, quando não combinado ao ferro, a forma semi-deidroascorbato do ASC age como antioxidante reduzindo superóxidos e oxigênio singlete (HALLIWELL, 2006). A adição de ascorbato em homogeneizados de cérebro e fígado tem como propósito oferecer defesas antioxidantes enquanto que a adição da mistura $\text{Fe}^{2+}/\text{ASC}$ favorece a formação de EROs e conseqüentemente a LPO.

A fim de avaliar a eficácia dos extratos brutos e das frações metanólicas das espécies *P.balansae* e *P.alopecuroides* sobre a inibição do estresse oxidativo *ex vivo*, a peroxidação lipídica LPO foi avaliada pela co-exposição dos sobrenadantes de cérebro e fígado a mistura de Fe^{++} (25 μM)/ASC (250 μM) e concentrações crescentes (25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) das frações e extratos dissolvidos em tampão fosfato de potássio 62,5 mM; pH 7,4. A LPO foi avaliada através da medida das substâncias reativas ao TBA. ASC 500 μM foi utilizado

como antioxidante padrão. Os resultados foram expressos como porcentagem do controle.

Os resultados (Figuras 11 e 12) mostram que a exposição dos sobrenadantes com a mistura Fe⁺⁺/ASC promoveu um aumento significativo (p< 0,05) no conteúdo de MDA nos homogeneizados de cérebro e fígado quando comparado ao controle. A LPO induzida por Fe⁺⁺/ASC em ambos casos foi significativamente prevenida na presença dos extratos brutos de *P.alopecuroides* e *P.balansae* em suas concentrações mais elevadas (figura 11) e na presença da fração metanólica de ambas as espécies (figura 12) em todas as concentrações testadas.

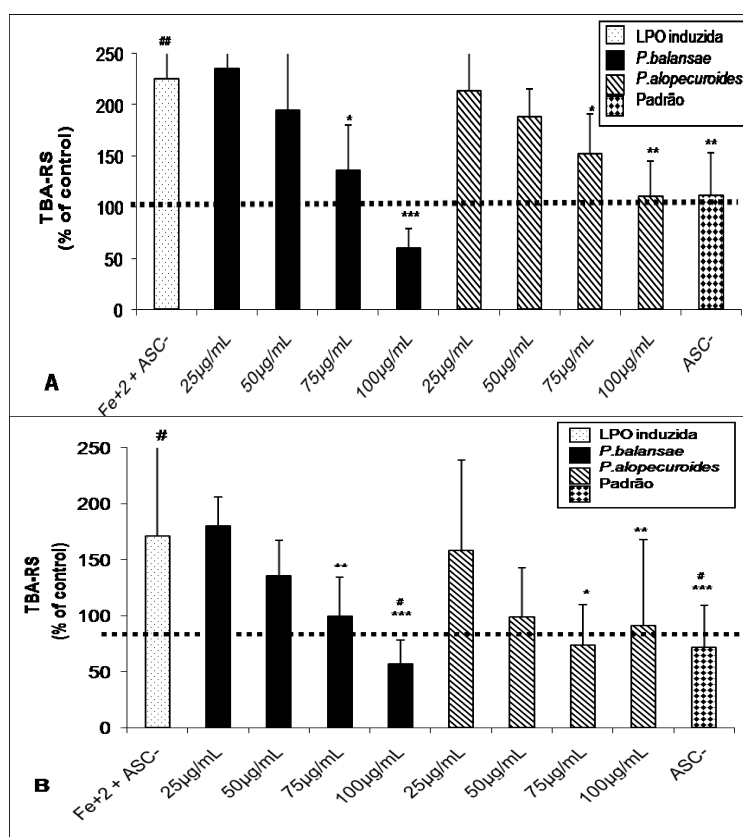


Figura 11: Efeito do extrato bruto metanólico das espécies *P.balansae* e *P.alopecuroides* frente à medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em sobrenadante de cérebro (A) e fígado (B) de ratos. Resultados expressos como porcentagem do controle. Cada barra representa a média ± DP de quatro experimentos independentes (animais) em duplicata. *p< 0,05; **p<0,01; ***p<0,001, comparado a Fe⁺⁺/ASC, #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001, comparado ao controle (ANOVA seguida do teste de Duncan). Valor do controle: 572,03 nmol TBA-RS / mg proteína em A e 0,108 nmol TBA-RS / mg proteína em B.

Verificou-se também uma diminuição significativa da LPO espontânea em cérebro na presença da fração metanólica de *P.balansae* nas concentrações de 75 µg/ml e 100 µg/ml e de *P.alopecuroides* nas concentrações de 50 µg/ml, 75 µg/ml e 100 µg/ml. Ainda, a diminuição da medida do TBA-RS em cérebro e fígado foi inversamente proporcional ao aumento da concentração de extrato bruto de *P.a* e de *P.b*.

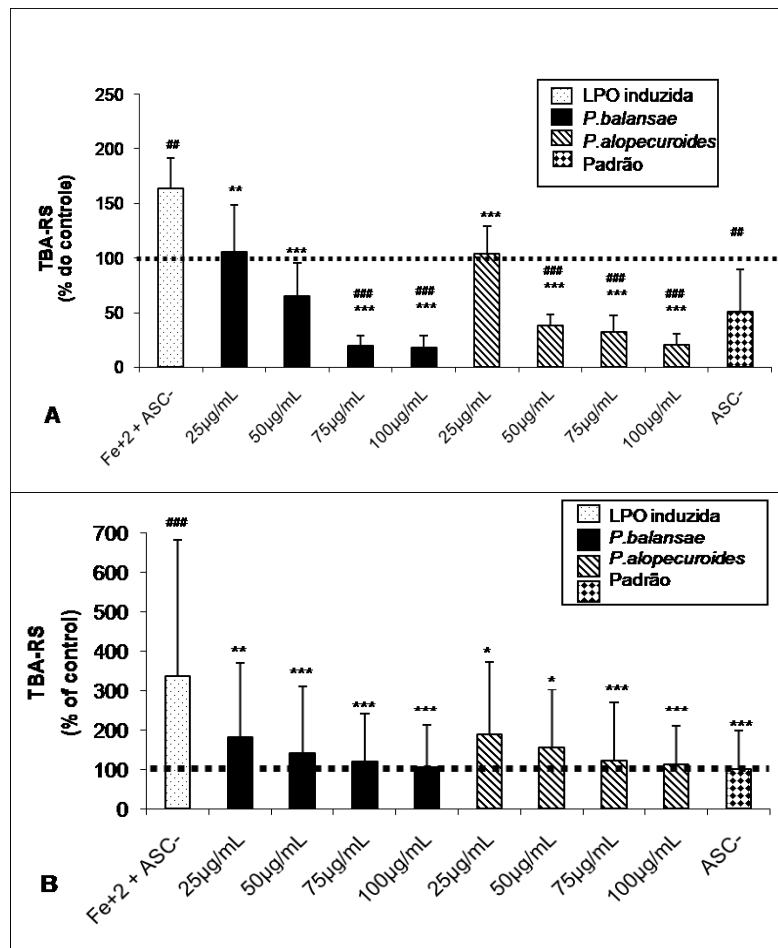


Figura 12: Efeito da fração metanólica das espécies *P.balansae* e *P.alopecuroides* frente à medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em sobrenadante de cérebro (A) e fígado (B) de ratos. Resultados expressos como percentual do controle. Cada barra representa a média \pm DP de quatro experimentos independentes (animais) em duplicata. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, comparado a LPO induzida, # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$, comparado ao controle (ANOVA seguida do teste de Duncan). Valor do controle: 1333,29 nmol TBA-RS / mg proteína em A e 0,076 nmol TBA-RS / mg proteína em B.

O cérebro é particularmente vulnerável às reações de oxidação devido às altas concentrações de substrato para peroxidação lipídica; à utilização de uma porcentagem muito alta de oxigênio em relação a outros tecidos; à presença de ferro e cobre que catalisam a formação de ER; e baixa concentração de defesas antioxidantes (HALLIWELL, 2001; CUI *et al.*, 2004). Além disso, as espécies reativas parecem estar envolvidas na fisiopatologia de numerosas doenças de progressão crônica, incluindo àquelas que afetam o SNC. Entre estas, destacam-se a doença de Parkinson, doença de Alzheimer, doença de Huntington, acidentes vasculares cerebrais, convulsões, distúrbios acompanhados de desmielinização, demência, síndrome de Down, choque e edema cerebral (DRÖGE, 2005; ROBERTSON & HARMON, 2006).

Po outro lado, nas células hepáticas, a peroxidação lipídica é facilmente iniciada, especialmente em regiões onde o citocromo P450 está implicado. Neste tecido, a oxigenação das substâncias lipofílicas através da via do citocromo P450 é a fonte principal do estresse oxidativo e normalmente associada com peroxidação lipídica intensa (O'BRIEN *et al.*, 1975).

A avaliação da inibição da peroxidação lipídica pelo ensaio TBA-RS *ex vivo* (figuras 11 e 12) mostrou que as amostras testadas, extrato bruto e fração metanólica de ambas espécies, protegeram os tecidos da peroxidação LPO, sendo que esta proteção foi semelhante, ao controle positivo ACS. Apesar de não haver estudos semelhantes com espécies do gênero *Pterocaulon*, outros estudos prévios descrevem que os polifenóis conferem proteção contra dano oxidativo de lipídeos (DZIEDZIC & HUDSON, 1984; DESMARCHELIER, *et al.*, 1999; POLYDORO *et al.*, 2004).

A susceptibilidade desses tecidos ao estresse oxidativo bem como as conseqüências fisiológicas deste dano mostram a importância dos resultados obtidos. Os extratos e frações de *P. alopecuroides* e *P. balansae* inibem, numa relação concentração-dependente, a LPO espontânea e a induzida por Fe⁺⁺/ASC em sobrenadante de cérebro e fígado de ratos, demonstrando uma capacidade antioxidante de ambas espécies

5.5.2 Conteúdo de tióis não protéicos (NPSH)

A determinação do conteúdo de tióis não protéicos (NPSH), baseada no método previamente descrito por ELLMAN (1959), quantifica os grupamentos tióis livres não protéicos presentes na amostra servindo como um importante indicador de dano oxidativo. A molécula com grupo tiólico de baixo peso molecular mais abundante nas células é a glutathiona (GSH) (HULTBERG *et al*, 1997). A GSH é um tripeptídeo utilizado como substrato pela família de enzimas glutathiona peroxidase (GPx) que removem peróxidos orgânicos e inorgânicos acoplando a redução deles à formação do peróxido reduzido correspondente e glutathiona oxidada (GSSG). A resultante é reduzida novamente a GSH pela enzima glutathiona redutase (GR) (BROWNE & ARMSTRONG, 1998; ERCAL *et al*, 2002).

Além da sua função como cofator para a família GPx, a glutathiona está envolvida em muitos outros processos metabólicos, incluindo o metabolismo do ASC, comunicação entre células e prevenção da oxidação de grupos –SH de proteínas. Ainda, a GSH pode quelar íons cobre e diminuir a habilidade deste catalizador para gerar radicais livres. A maior parte da GSH livre intracelular *in vivo* está na forma reduzida (GSH). Contudo, uma parte pode ser encontrada como dissulfetos mistos com outros compostos que contêm grupos –SH. Os grupos tióis (-SH) nas proteínas são freqüentemente essenciais para a sua estabilidade e/ou função. Além disso, os grupos tióis de proteínas (proteína –SH) podem reagir com GSSG e formar dissulfetos mistos, processo denominado S-tiologiação de proteínas. Durante o estresse oxidativo, os níveis de GSH declinam e os de GSSG aumentam (BROWNE & ARMSTRONG, 1998).

Investigando o conteúdo de NPSH no sobrenadante de fígado (figura 13) foi possível observar que o extrato bruto e a fração metanólica de *P.a.* e *P.b.* não alteraram significativamente esta medida quando comparado à amostra contendo Fe⁺⁺/ASC. Já na figura 14 verifica-se que na concentração de 100 µg/mL do extrato bruto de *P.b.* e nas maiores concentrações de fração

metanólica de ambas as espécies, houve uma proteção significativa da oxidação espontânea do NPSH no tecido cerebral quando comparado à amostra contendo Fe⁺⁺/ ASC.

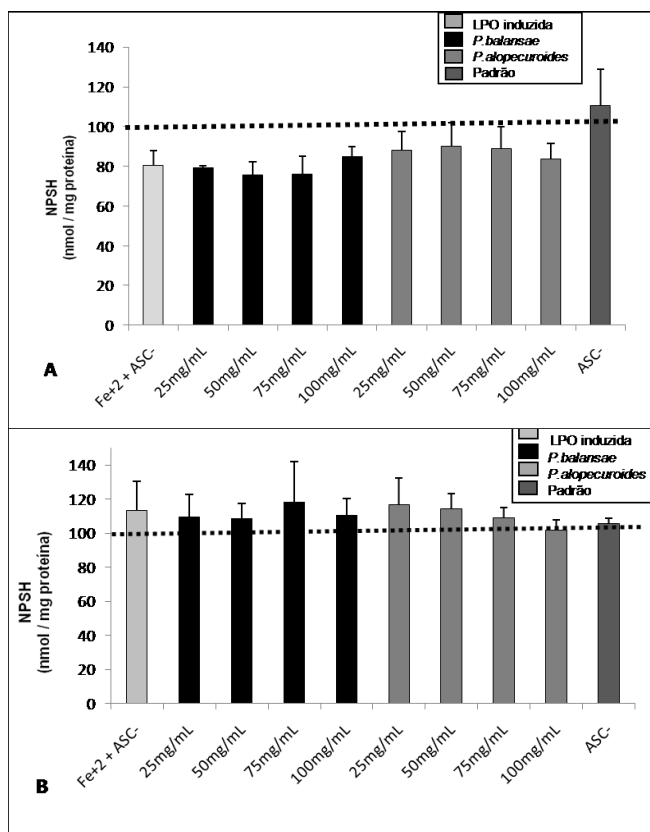


Figura 13: Efeito do extrato bruto metanólico (A) e da fração metanólica (B) das espécies *P.balansae* e *P.alopecuroides* no conteúdo dos grupos tióis não protéicos (NPSH) em sobrenadante de fígado de ratos. Resultados expressos como percentual do controle. Cada barra representa a média \pm DP de quatro experimentos independentes (animais) em duplicata. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, comparado a LPO induzida, # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$, comparado ao controle (ANOVA seguida do teste de Duncan). Valor do controle: 12,30 nmol NPSH / mg proteína em A e 10,70 nmol NPSH / mg proteína em B.

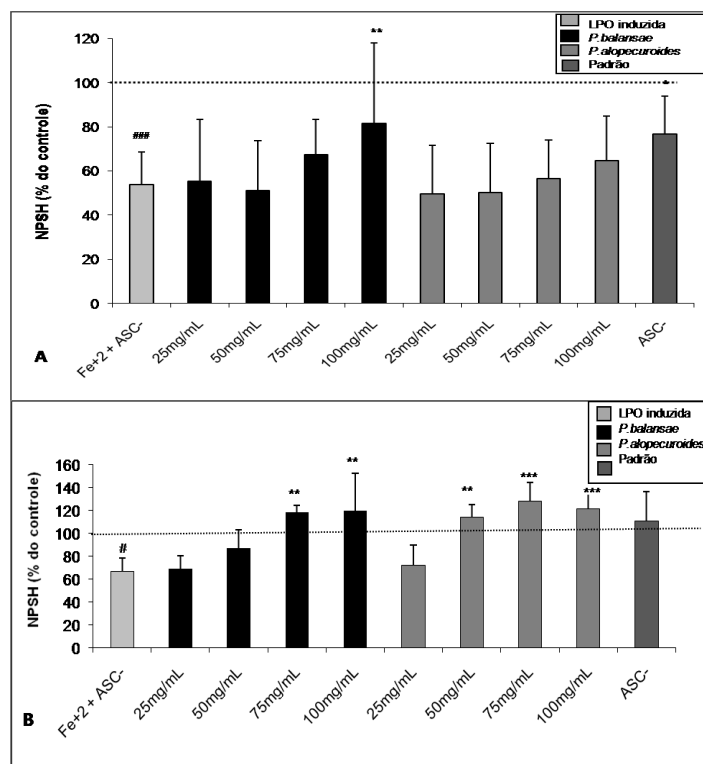


Figura 14: Efeito do extrato bruto metanólico (A) e da fração metanólica (B) das espécies *P.balansae* e *P.alopecuroides* no conteúdo de grupos tióis não protéicos (NPSH) em sobrenadante de cérebro de ratos. Resultados expressos como percentual do controle. Cada barra representa a média \pm DP de quatro experimentos independentes (animais) em duplicata. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, comparado a LPO induzida, # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$, comparado ao controle (ANOVA seguida do teste de Duncan). Valor do controle: 14,60 nmol NPSH / mg proteína em A e 20,20 nmol NPSH / mg proteína em B.

A inibição da oxidação espontânea do conteúdo de NPSH no tecido cerebral deve-se provavelmente à capacidade neuroprotetora do extrato e da fração metanólica de *P.a* e *P.b.* através da atividade *scavenger* de espécies reativas. Pois, segundo Browne & Armstrong (1998), a inibição da oxidação do NPSH pode estar relacionado à diminuição da formação de radicais livres. Por outro lado, quando GSH está diminuída, as células ficam com baixo poder antioxidante e mais propensas ao dano oxidativo causado por espécies reativas. Isso é especialmente relevante para células mais vulneráveis ao dano oxidativo, como as células cerebrais (Bains & Shaw, 1997; Ercal *et al*, 2002).

Comparando os resultados obtidos na medida do TBA-RS em tecido cerebral com os dados referentes à concentração de tióis de baixo peso

molecular nesse mesmo tecido, é possível constatar a existência de uma relação inversamente proporcional entre esses dois parâmetros. Diversos estudos têm demonstrado que o conteúdo de NPSH estaria relacionada com a utilização dos grupos tióis como *scavenger* de produtos da peroxidação lipídica, tais como peróxidos e aldeídos, e, portanto o dano oxidativo causado pela lipoperoxidação causaria uma diminuição no conteúdo total de grupos –SH livres (Lie *et al.*, 1994; HULTBERG *et al.*, 1997; JURCZUK *et al.*, 2006). Portanto, a maior concentração de NPSH e conseqüentemente das defesas antioxidantes, nas maiores concentrações dos extratos e frações de P.a. e P.b. em cérebro de ratos, pode estar relacionado com a diminuição da peroxidação lipídica, tanto espontânea quanto induzida por Fe⁺⁺/ASC.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no estudo descrito permitem concluir:

- Considerando o fracionamento do processo de extração, a fração metanólica apresentou o maior rendimento em ambas espécies, sendo a fração metanólica de *P. balansae* a que obteve maior rendimento.
- Os maiores teores de fenólicos totais foram evidenciados para as frações metanólicas, especialmente a fração de *P. alopecuroides*. As frações *n*-hexânicas obtiveram as menores concentrações destes compostos.
- No ensaio de TRAP, a fração metanólica da espécie *P. alopecuroides* apresentou a maior capacidade de capturar os radicais peroxila formados. Em uma das menores concentrações testadas, essa fração (0,83 µg/mL), apresentou potencial antioxidante maior do que a quercetina na concentração 0,53 µM.

- A presença de compostos antioxidantes foi evidenciada nos extratos e frações de ambas as espécies quando avaliadas através da capacidade de reação com o radical DPPH[•], no ensaio bioautográfico por CCD. Nas frações *n*-hexânica e diclorometânica detectou-se a menor capacidade de reação com DPPH[•].
- Considerando os extratos avaliados no ensaio espectrofotométrico as frações metanólicas apresentaram a maior atividade antioxidante, determinada através da capacidade de reação com o radical DPPH[•]. A menor atividade foi verificada para as frações *n*-hexânicas.
- Os extratos e frações de *P. alopecuroides* e *P. balansae* inibem, numa relação concentração-dependente, a LPO espontânea e a induzida por Fe⁺⁺/ASC em sobrenadante de cérebro de ratos, demonstrando uma capacidade antioxidante de ambas as espécies através da inibição da cadeia de lipoperoxidação.
- A avaliação da inibição da peroxidação lipídica pelo ensaio TBA-RS *ex vivo* em fígado de ratos mostrou que o extrato bruto e a fração metanólica de ambas espécies, protegeram o tecido da LPO induzida.
- Na concentração de 100 µg/mL do extrato bruto de *P.b.* e nas maiores concentrações de fração metanólica de ambas as espécies, houve aumento significativo do conteúdo de NPSH no tecido cerebral quando comparado à amostra contendo Fe⁺⁺/ASC. Esse aumento deve-se provavelmente à capacidade neuroprotetora do extrato e da fração metanólica de *P.a* e *P.b.* através da atividade *scavenger* de radicais livres.
- Investigando o conteúdo de tióis totais no homogeneizado de fígado foi possível observar que o extrato bruto e a fração metanólica de *P.a.* e *P.b.* não alteraram significativamente a concentração de NPSH quando comparado à amostra contendo Fe⁺⁺/ASC, indicando que estas

preparações, principalmente previnem a LPO, evitando dessa forma o consumo de compostos redutores como o NPSH.

7. REFERÊNCIAS

ALARCÓN, R.; FLORES, R.C.; OCAMPOS, S.; LUCATTI, A.; GALLEGUILLO, L.F.; TONN, C.; SOSA, V. Flavonoids from *Pterocaulon alopecuroides* with Antibacterial Activity. **Planta Medica**. v.74, n.12, p. 1463-1467, 2008.

AMIC, D.; DAVIDOVIC-AMIC, D.; BESLO, D.; TRINAJSTIC, N. Structure radical scavenging activity relationships of flavonoids. **Croatica Chemica Acta**, v. 76, n. 1, p. 55-61, 2003.

AVANCINI, C.A.M., 2002. **Saneamento aplicado em saúde e produção animal: etnografia, triagem da atividade antibacteriana de plantas nativas do sul do Brasil** Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

BALUNAS, M.J.; KINGHORN A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v.78, p.431-441, 2005.

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

BARROSO, G.M. **Sistemáticas de Angiospermas no Brasil**. Viçosa: UFV- Imprensa Universitária, 1986. v.3, 326p.

BASUALDO, I. *et al.* Plantas medicinales comercializadas em los mercados de Asunción y Gran Asunción (Parte I). *Rojasiana*. v.6, n.1, p. 95-144, 2004.

BOHLMANN, F. Thiophene acetylenes and flavanols from *Pterocaulon virgatum*. **Phytochemistry**, v.20, p. 825-827, 1981.

BRADFORD, M. M.; **Anal. Biochem.** 1976, 72, 248.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BREMER, K. **Asteraceae: Cladistics and Classification**. Portland: Timber Press, 1994, 752 p. il.

BROWNE, W.D.; Armstrong, B. Reduced glutathione and glutathione disulfide. **Meth.Molec.Biol.**v.108, p.347-352, 1998.

BURDA, S.; OLESZEK, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.6, n. 49, p. 2774–2779, 2001.

CABRERA, A.L.; RAGONESE, A.M. **Revisión del Género Pterocaulon (Compositae)**. Darwiniana. T. 21, n. 2-4, p. 185-257, 1978.

CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, v.74, p. 2157-2184, 2004.

CASSINA, A.; RADI, R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.328, n.2, p. 309- 316, 1996.

CHAICHI, M.J.; KARAMI, A.R.; SHOCKRAVI, A.; SHAMSIPUR, M. Chemiluminescence characteristics of coumarin derivatives as blue fluorescers in peroxyoxalate–hydrogen peroxide system. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 59, n.6, p. 1145-1150, 2003.

CHEESEMAN, K. H.; SLATER, T. F. An introduction to free radical biochemistry. **British Medical Bulletins**, v. 49, p. 481-493, 1993.

CONFORTI, F.; STATTI, G. A.; TUNDIS, R.; MENICHINI, F.; HOUGHTON, P. Antioxidant activity of methanolic extract of *Hypericum triquetrifolium* Turra aerial part. **Fitoterapia**, v. 73, p. 479-483, 2002.

COOK, NC.; SAMMAN, S. Flavonoids- Chemistry, metabolism, cardioprotective, effects, and dietary sources. **Nutricional Biochemistry**. V.7, p.66-76, 1996.

CUI, K.; LUO, X.; XU, K.; VEN MURTHY, M.R. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants, **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v.28, p.771-799, 2004.

DEBENEDETTI, S.L.; NADINIC, E.L.; GOMEZ, M.A.; COUSSIO, J.D. Polyphenols isolated from *Pterocaulon purpurascens*, 1.6-hidroxyflavanoids. **Journal of Natural Products**. v. 50. p. 512-513, 1987.

DEBENEDETTI, S.L.; NADINIC, E.L.; COUSSIO, J.D.; KIMPE, N.; FENEAU-Dupont, J.; DECLERCQ, J.P. Purpureanol, a highly oxygenated coumarin from *Pterocaulon purpurascens*. **Phytochemistry**, v.30, p. 2757-2758, 1991.

DEBENEDETTI, S.L.; NADINIC, E.L.; GOMEZ, M.A.; COUSSIO, J.D.; KIMPE, N.; BOEYKENS, M. . Purpurasol, a highly oxygenated coumarin from *Pterocaulon purpurascens*. **Phytochemistry**, v.31, p. 3284-3285, 1992.

DEBENEDETTI, S.L.; NADINIC, E.L.; GOMEZ, M.A.; COUSSIO, J.D.; KIMPEB, N.; BOEYKENS, M. Purpurasolol. A highly oxygenated coumarin from *Pterocaulon purpurascens*. **Phytochemistry**, v. 42, p. 563-564, 1996.

DEBENEDETTI, S.L.; KIMPEB, N.; BOEYKENS, M.; COUSSIO, J.D.; KESTELEYN, B. Structural revision of four coumarins from *Pterocaulon* species. **Phytochemistry**, v. 45, p. 1515-1517, 1997.

DEBENEDETTI, S.L.; NADINIC, E.L.; COUSSIO, J.D.; KIMPEB, N.; BOEYKENS, M. Two 6,7-deoxygenated coumarins from *Pterocaulon virgatum*. **Phytochemistry**, v. 48, p. 707-710, 1998.

DEBENEDETTI, S.L.; TEHRANIB, K.A.; PUYVELDEB, L.V.; KIMPEB, N. Isopurpurasol, a coumarin from *Pterocaulon virgatum*. **Phytochemistry**, v.51, p. 701-703, 1999.

DEEPA, N.; KAUR, C.; GEORGE, B.; SINGH, B.; KAPOOR, H.C. Antioxidant constituents in some sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes during maturity. **Food Science and Technology**, v.40, p.121-129, 2007.

DESMARCHELIER, C.; REPETTO, M.; COUSSIO, J.; LLESUY, S.; CICCIA, G. Total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of medicinal plants used in Southwest Amazonia (Bolivia and Peru). **International Journal of Pharmacognosy**, v. 35, p. 288-296, 1997.

DESMARCHELIER, C.; LISBOA ROMANO, R.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the 'Caatinga' region in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 69-77, 1999.

DESMARCHELIER, C.; CICCIA, G.; COUSSIO, J. Recent advances in the search for antioxidant activity in South American plants. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 22, p. 343-367, 2000.

DRÖGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiology Review**, v. 82, p. 47-95, 2001.

DRÖGE, W. Oxidative stress and ageing: is ageing a cysteine deficiency syndrome. **Philosophical Transactions**, v.360, p. 2355-2372, 2005.

DZIEDZIC, S.Z.; HUDSON, B.J.F. Phenolic acids and related compounds as antioxidants for edible oils. **Food Chemistry**, v.14, p.45-51, 1984.

ELLMAN, G. L. Tissue sulphhydryl groups. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 82, p. 70-77, 1959.

ERCAL, N.; AYKIN-BURNS, N.; GURER-ORHAN; McDONALD, J.D. Oxidative Stress in a phenylketonuria animal model. **Free Radical Biology Medicine**, v.32, p.906-911, 2002.

ESPÍN, J. C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H. J. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetables oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 648-656, 2000.

ESTERBAUER, H., CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v.186, p.407-421, 1990.

EVELSON, P.; TRAVACIO, M.; REPETTO, M.; ESCOBAR, J.; LLESUY, S.; LISSI, E. A. Evaluation of total reactive antioxidant potential (trap) of tissue homogenates and their cytosols. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 388, p. 261-266, 2001.

FRANKEL, E. N.; WATERHOUSE, A. L.; TEISSEDE, P. L. Principal phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 890-894, 1995.

FYLAKTAKIDOU, K.C.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.J.; LITINAS, K.E.; NICOLAIDES, D.N., Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities. **Current Pharmaceutical Design**, v.10, n.30, p. 3813–3833, 2004.

HALLIWELL, B. Drug antioxidant effects. **Drugs**, v.42, p.569 - 605, 1991.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. (EDS.). **FREE RADICALS IN BIOLOGY AND MEDICINE**. OXFORD UNIVERSITY PRESS: OXFORD, 2001.888P.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal of Neurochemistry**, v. 97, p.1634- 1658, 2006b.

HALLIWELL, B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology is a Fundamental Theme of Aerobic Life. **Plant Physiology**, v.141, p. 312-322, 2006a.

HAMBURGER,M.; HOSTETTMAN, K. Bioactivity in plants: The link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v.30, n.12, p. 386-3874, 1991.

HARBORNE, J. B.New naturally occurring plant polyphenols. In: **Polyphenolic phenomena**. Paris: Scalbert, INRA, 1993.

HEEMANN, A.C.W.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M. D. Revisão do gênero *Pterocaulon* - Aspectos fitoquímicos e Atividades Biológicas. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 53-60, 2004.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO ,A.R.; BOBILYA ,D.J., Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure–activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n.10, p. 572–584, 2002.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Absorption, metabolism, and health effects of dietary flavonoids in man. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 51, p. 305-310, 1997.

HULTBERG, B.; ANDERSSON,A.; ISAKSSON, A. Copper ions differ from other thiol reactive metal ions in their effects on the concentration and redox status of thiols in HeLa cell cultures. **Toxicology**, v. 117, p. 89- 97, 1997.

IVANOVA, D.; GEROVA, D.; CHERVENKOV, T.; YANKOVA, T. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 145-150, 2005.

JONE, W.P.; CHIN, Y.W.; KINGHORN, A.D. The Role of Pharmacognosy in Modern Medicine and Pharmacy. **Current Drug Target**, v.7, n.3, p.247-264, 2006

JUDD, W.S. ; CAMPBELL, C.S; KELLOG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. **Plant Systematics: a phylogenetic approach**. Massachusetts: Sinauer Associater Inc., 1999, 464p.

JURCZUK, M.; MONIUSZKO-JAKONIUK,J.; Brz´OSKA, M.M. Involvement of some low-molecular thiols in the peroxidative mechanisms of lead and ethanol action on rat liver and kidney. **Toxicology**, v. 219, p. 11–21, 2006.

KABEYA, L.M.; MARCHI, A.A.; KANASHIRO, A.; LOPES, N.P.; SILVA, C.H.T.P.; PUPO M.T.; VALIM, Y.M.L. Inhibition of horseradish peroxidase catalytic activity by new 3-phenylcoumarin derivatives: Synthesis and structure–activity relationships. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.15, n. 3, p.1516-1524, 2007.

KATALINIC, V.; MILOS, M.; KULISIC, T.; JUKIC, M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. **Food Chemistry**, v.94, p.550-557, 2006.

LATINI A, BORBA ROSA R, SCUSSIATO K, LLESUY S, BELLÓ-KLEIN A, WAJNER M. 3-Hydroxyglutaric acid induces oxidative stress and decreases the antioxidant defenses in cerebral cortex of young rats. **Brain Research**, v. 29, p. 367-373, 2002.

LI, W.; KAGAN, H.M.; CHOU, I.N. Alterations in cytoskeletal organization and homeostasis of cellular thiols in cadmium-resistant cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.126, p.114-123, 1994.

LIMA, L. F. P. **O gênero *Pterocaulon* Ell. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul: aspectos taxonômicos, palinológicos e fitoquímicos.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006. 1v., 150p.

LISSI, E.; PASCUAL, C.; DEL CASTILLO, M.; Luminol luminescence induced by 2,2%-azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. **Free Radical Research Communications**, v. 17, p. 299-311, 1992.

LIU, Z.Q.; YU, W.; LI, Z. LIU. Antioxidative and prooxidative effects of coumarin derivatives on free radical initiated and photosensitized peroxidation of human low-density lipoprotein. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.103, n. 1-2, p. 125-135, 1999.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil- terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas.** 3ª ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2000.

MAES, D.; SYNGEL, K.V.; DEBENEDETTI, S.; KIMPEB, N. Synthesis of purpurasol, a highly oxygenated coumarin from *Pterocaulon purpurascens*. **Tetrahedron**, v.62, p. 4426–4429, 2006a.

MAES, D.; DEBENEDETTI, S.; KIMPEB, N. New coumarins from *Pterocaulon virgatum* (L.) DC. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.34, p. 165-169, 2006b.

MAGALHÃES, A.; MAGALHÃES, E.G.; LEITÃO FILHO, H.F.; FRIGHETTO, T.S.; BARROS, S.G. Coumarins from *Pterocaulon balansae* and *Planatum*. **Phytochemistry**, v.28, p. 1497-1499, 1981.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p.727-747, 2004

MARTÍNEZ-CROVETTO, R. Estudios Etnobotánicos. I. Nombres de plantas y su utilidad según los índios Tobas del este del Chaco. **Bonplandia**. T.I, n. 4, p.274-333, 1964.

MARTÍNEZ-CROVETTO, R. Estudios Etnobotánicos. II. Nombres de plantas y su utilidad según los índios Vilelas del Chaco. **Bonplandia**. T.II, n. 1, p.1-23, 1965.

MARTINO, V.S.; DEBENEDETTI, S.L.; COUSSIO, J.D. Caffeoylquinic acids from *Pterocaulon virgatum* and *Pluchea sagittalis*. **Phytochemistry**. V. 18, p. 2052, 1979.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; DOS SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P.R.; VAN BEEK, T.A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v.85, p.231-237, 2004.

NG, T.B.; LIU, F.; WANG, Z.T. Antioxidative activity of natural products from plants. **Life Sciences**, v.66, n. 8, p. 709-723, 2000.

PALACIOS, P.S.; ROJO, A.A.; COUSSIO, J.D.; DE KIMPE, N.; DEBENEDETTI, S.L. 6,7-Dioxygenated and 5,6,7-Trioxxygenated Coumarins from *Pterocaulon polystachium*. **Planta Medica**, v. 65, n.3, p. 294-295, 1999.

PAREJO, I.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J.; ROSAS-ROMERO, A.; SAAVEDRA, G.; MURCIA, M.A.; JIMÉNEZ, A.M.; CODINA, C. Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. **Life Sciences**, v.73, p. 1667-1681, 2003.

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

POLYDORO, M.; DE SOUZA, K.C.; ANDRADES, M.E.; DA SILVA, E.G.; BONATTO, F.; HEYDRICH, J.; DAL-PIZZOL, F.; SCHAPOVAL, E.E.S.; BASSANI, V.L.; MOREIRA, J.C.F. Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of achyrocline satureioides extracts. **Life Science**, v.74, p.2815-2826, 2004.

PRUSKI, J. ; SANCHO, G. Asteraceae. In: Smith, N.; Mori, S.A.; Henderson.; Stevenson, D.W.; Heald, S.V. **Flowering Plants of the neotropics**. New Jersey: Princeton University Press. 2004.

RA, H.G.,; PARMAR, V.S.,; JAIN, S.C.,; GOEL, S.,; HIMANSHU, P.,; MALHOTRA, S.,; SINGH, A.,; OLSEN C.E.,; WENGEL J. Mechanism of Biochemical Action of Substituted 4-Methylbenzopyran-2-ones. Part I: Dioxygenated 4-Methyl Coumarins as Superb Antioxidant and Radical Scavenging. **Agents Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 6, p. 833-839, 1998.

RAMBO, B. **A fisionomia do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Selbach, 456p., 1956.

RAMBO, B. Análise geográfica das Compostas Sulbrasileiras. **Anais Botânicos do Herbário Barbosa Rodrigues**. Itajaí, v.4, p. 87-160, 1952.

REI WU, C.; HUANG, M.Y.; LIN, Y.T.; JU, H.Y.; CHING H. Antioxidant properties of Cortex Fraxini and its simple coumarins. **Food Chemistry**, Article in Press, Corrected Proof, 2007.

RIBEIRO, C.V.C.; KAPLAN M.A.C. Tendências evolutivas de famílias produtoras de cumarinas em angiospermas. **Química Nova**, v.25, n. 4, p. 533-538, 2002.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v.20, p. 933-956, 1996.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v.2, n. 4, p. 152-159, 1997.

ROBERTSON, R.P.; HARMON, J.S. Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: A case of double jeopardy for the pancreatic islet β cell. **Free Radical Biology & Medicine**, v.41, p. 177- 184, 2006.

RÓDIO, C.; VIANNA, D.R.; KOWALSKI, K.P.; PANATIERI, L.F.; von POSER, G.; ROTT, M. In vitro evaluation of the amebicidal activity of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae) against trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. **Parasitology Research**, v.104, p. 191–194, 2008.

SEELIGER, U. Coastal Foredunes of Southern Brazil: physiography, habits, and vegetation. In: Seeliger, U. **Coastal plant communities of Latin American**. San Diego: Academic Press. 1992. p. 367-381.

SEMPLE, S.; NOBBS, S.M.; PYKE, S.M.; REYNOLDS, R.L.P. Antiviral flavonoid from *Pterocaulon sphacelatum*, an australian aboriginal medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, p. 283-288, 1999.

SÁNCHEZ-MORENO, LARRAURI J. A., SAURA-CALIXTO F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, p. 270-276, 1998.

SHAN, B.; CAI, Y.Z.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.7749-7759, 2005.

SILVA, B. A.; FERRERES, F.; MALVA, J. O.; DIAS, A. C. P. Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. **Food Chemistry**, v. 90, n. 1-2, p. 157-167, 2005.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SKERGET, M.; KOTNIK, P.; HADOLIN, M.; RIZNER-HRAS, A.; SIMONIC, M.; KNEZ, Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, v.89, n.2, p. 191-198, 2005.

SOBRATTEE, M. A.; NEERGHEEN, V. S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O. I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutation Research**, v. 579, p. 200-213, 2005.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA, G. M.; AVRES, M. C. C. ; COSTA, C.L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S. ; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, n.2, p.351-355, 2007.

STEIN, A.C.; SORTINO, M.; AVANCINI, C.; ZACCHINO, S.; POSER, G. Ethnoveterinary medicine in the search for antimicrobial agents: Antifungal activity of some species of *Pterocaulon* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.99, p. 211–214, 2005.

TORRES, R.; FAINI, F.; MODAK, B.; URBINA, F.; LABBÉ, C.; GUERRERO, J. Antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudate of *Haplopappus multifolius*. **Phytochemistry**, v.67, n. 10, p. 984-987, 2006.

TRIVEDI N, Rawal UM. Hepatoprotective and toxicological evaluation of *Andrographis paniculata* on severe liver damage. **Indian Journal of Pharmacology**. 2000;32:288–293.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VENDRUSCOLO, G.S. et al. Estudo Etnobotânico do uso dos recursos vegetais em São João do Polêsine-RS, no período de outubro de 1999 a junho de 2001 – II – etnotaxonomia: critérios taxonômicos e classificação folk. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.7. n.2, p.44-72, 2005.

VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. **Drug Development Today**, v.3, n.5, p.232-238, 1998.

VILEGAS, W; BORALLE, N.; CABRERA, A.; BERNARDI, A.C.; POZETTI, G.L.; ARANTES, S.F. Coumarins and a flavonoide from *Pterocaulon alopecuroides*. **Phytochemistry**, v. 38, p. 1017-1019, 1995.

ZAINOL, M.K.; HAMID, A.; YUSOF, S.; MUSE, R. Antioxidative activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of *Centella asiatica*. (L.) Urban. **Food Chemistry**, v.81, p.575-581, 2003.

ZHANG H.Y.; WANG L.F.. Theoretical elucidation of structure–activity relationship for coumarins to scavenge peroxy radical. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 673, n. 1-3, p.199-202, 2004.

ZHENG,W.; WANG,S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.5165-5170, 2001.

ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides. Em: Simões, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. UFSC, 1999.

ANEXOS

ANEXO 1

Aprovação dos protocolos experimentais pelo Comitê de Ética da UFSC

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo

PP00122

Título

Efeito dos metabólitos acumulados na acidemia isovalérica sobre parâmetros do metabolismo energético e do estresse oxidativo em cérebro de rato

Data de Entrada

21/05/2007

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

04/07/2007

Considerações

Ofício nº 092/CEUA/PRPe/2007

Do: Presidente da Comissão de ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Alexandra Susana Latini, Departamento de Bioquímica - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade o Presidente da CEUA deliberou o seguinte:

-APROVADO, por 2 (dois) anos, para a utilização de 832 Ratos (*Rattus norvegicus*).

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi

Presidente-interino/CEUA/PRPe/UFSC

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 09/10/2009

Data 09/07/2007

Parecer(es):



**Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE**

[Abrir Solicitação](#)

[Criar Relatório](#)