

Juliana Bicalho Machado

**Estudo da Ação Antioxidante *in Vitro* dos  
Extratos Alcoólicos das Folhas e das Flores da  
Capuchinha (*Tropaeolum majus* L.)**

**BRASÍLIA  
2008**

Juliana Bicalho Machado

**Estudo da Ação Antioxidante *in Vitro* dos  
Extratos Alcoólicos das Folhas e das Flores da  
Capuchinha (*Tropaeolum majus* L.)**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
à obtenção do grau Mestre em Nutrição  
Humana pela Faculdade de Ciências da Saúde  
da Universidade de Brasília.

**Orientador:** Prof. Dr. Marcelo Hermes-Lima

**Co-orientador:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Natacha Carvalho  
Ferreira Santos

**BRASÍLIA  
2008**

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr. Marcelo Hermes-Lima**  
**(Orientador - IB / UnB)**

**Prof. Dra. Sandra Arruda**  
**(NUT / UnB)**

**Prof. Dr. Marcelo Henrique de Sousa**  
**(FCE / UNB)**

**Prof. Dra. Isa Gomes de Avelar**  
**(IQ / UNB)**

A Deus por permitir a realização deste sonho e por ter me dado sabedoria, saúde e força para realização deste trabalho

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Marlene e José, que durante toda a minha vida estiveram ao meu lado me apoiando e instruindo a seguir o melhor caminho sem querer nada em troca apenas a minha felicidade;

Ao meu noivo Esdras por todo auxílio, carinho e amor dedicados a mim;

Ao professor Marcelo Hermes, pela oportunidade de me abrir as portas para a ciência e por dividir parte de seu vasto conhecimento acadêmico;

A professora Dra. Natacha por toda a sua paciência, disponibilidade e alegria que demonstrou ao guiar este trabalho.

Ao Thiago, Luana, Janini e Roberto, por toda ajuda e pelas várias discussões sobre ciência que muito acrescentaram nesse trabalho;

Aos alunos de IC Daniel, Marcus e Ana Carolina, que me ajudaram na realização de alguns experimentos;

Aos professores da Biofísica, Fernando Fortes, Egle, Sandra e Sônia, pelos anos de ótimo convívio e algumas colaborações;

Ao professor Antônio Alonso, pela sua colaboração nos experimentos de EPR;

A Maura Prates (*Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*) pela sua colaboração nos experimentos de HPLC.

A CAPES, pela concessão da bolsa de pesquisa;

Ao CNPq e ao Milênio-Redoxoma, por terem fomentado os projetos de pesquisa desenvolvidos pelo Grupo de Pesquisa em Radicais Livres (GPRO) do qual eu faço parte.

## SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE ESQUEMAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	03
2.1-Radicais Livres.....	03
2.2-Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) .....	05
2.3-Efeitos Biológicos dos EROs .....	08
2.3.1-Oxidação do DNA, Proteínas e Lipídios.....	08
2.3.2-Doenças relacionadas às EROs .....	11
2.3.2.1-Câncer .....	12
2.3.2.2-Aterosclerose.....	13
2.3.2.3-Doenças neurodegenerativas .....	13
2.3.2.4-Doenças relacionadas ao acúmulo de ferro e de cobre.....	14
2.4 Defesas Antioxidantes .....	15
2.4.1- Defesa antioxidante primária .....	16
2.4.2- Defesa antioxidante auxiliar.....	19
2.4.3- Complexante de Metais.....	20
2.4.4- Sistema de reparo enzimático.....	20
2.5-Tropaeolum majus L. ....	22
3. OBJETIVOS.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1- Materiais .....	26
4.1.1- Planta.....	26
4.1.2.Reagentes.....	26
4.2- Métodos.....	27
4.2.1- Obtenção dos extratos alcoólicos .....	27
4.2.2- Obtenção dos extratos secos.....	27
4.2.3- Ressonância Paramagnética Eletrônica.....	28

4.2.4- Degradação da 2-desoxirribose (2-DR) .....	30
4.2.5- Peroxidação Lipídica.....	32
4.2.6- Degradação Oxidativa do DNA .....	34
4.2.7- Varredura Espectrofotométrica .....	35
4.2.8- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência .....	35
4.2.9- Teste da capacidade antioxidante das frações.....	36
4.2.10- Análise estatística.....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
5.1- Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE).....	38
5.2 - Degradação da 2-desoxirribose (2-DR).....	41
5.3- Peroxidação Lipídica.....	48
5.4- Degradação Oxidativa do DNA .....	54
5.5- Varredura Espectrofotométrica .....	58
5.6 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	63
5.7 - Teste da capacidade antioxidante das frações .....	68
6. CONCLUSÃO.....	72
8.BIBLIOGRAFIA.....	74

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

<b><math>\cdot\text{OH}</math></b>	Radical hidroxil
<b>2-DR</b>	2-desoxi-D-ribose
<b>A</b>	Absorbância
<b>Asc<math>\cdot</math></b>	Radical ascorbil
<b>AscH<math>^-</math></b>	Ácido ascórbico, ascorbato
<b>CAT</b>	Catalase
<b>DMPO</b>	5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido
<b>DMPO-<math>\cdot\text{OH}</math></b>	Radical 2-hidroxi-5,5-dimetil-1-pirrolidiniloxi
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>EPR</b>	Ressonância paramagnética eletrônica
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>G6PDH</b>	Glicose-6-fosfato desidrogenase
<b>GPX</b>	Glutaciona peroxidase
<b>GR</b>	Glutaciona redutase
<b>GSH</b>	Glutaciona reduzida
<b>GSSG</b>	Glutaciona oxidada
<b>HEPES</b>	Ácido n-(2-hidroxietil)piperazina-n'-(2-etenosulfônico)
<b>HOO<math>\cdot</math></b>	Radical hidroperoxil
<b>LO<math>\cdot</math></b>	Radical alcóxil
<b>LOO<math>\cdot</math></b>	Radical peroxil
<b>LOOH</b>	Radical hidroperóxido
<b>MDA</b>	Malonaldeído
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
<b>O<math>_2^{\cdot-}</math></b>	Radical superóxido
<b>PIH</b>	Piridoxal Isonicotinoil Hidrazona
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>TBA</b>	Ácido tiobarbitúrico



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição eletrônica do oxigênio e do radical superóxido.....	03
Figura 2: Representação geral das fases da peroxidação lipídica.....	10
Figura 3: Capuchinha ( <i>Tropaeolum majus</i> L.) .....	22
Figura 4: Estrutura molecular dos polifenóis presentes na capuchinha. (A) Isoquercitina; (B) Ácido Clorogênico; (C) Pelargonidinas .....	24
Figura 5: Ação da Miosina. ....	24
Figura 6: Foto da flor e da folha coletada. ....	26
Figura 7: Espectro do aduto DMPO-•OH.....	28
Figura 8: Formação do Radical Aduto (DMPO-•OH).....	29
Figura 9: Espectro do aduto DMPO-•OH produzido pela reação de Fenton.....	38
Figura 10: (A) Efeito da concentração dos extratos na intensidade do sinal DMPO-OH. (B) Porcentagem de inibição do sinal.....	39
Figura 11: (A) Efeito da concentração do Fe(II) no sinal DMPO-•OH. (B) Porcentagem de inibição do sinal. ....	41
Figura 12: (A) Efeito da concentração dos extratos na degradação da 2-Desoxirribose. (B) Porcentagem de proteção da degradação da 2-Desoxirribose. ....	42
Figura 13: (A) Efeito da concentração Ferro II na degradação da 2-Desoxirribose. (B) Porcentagem de proteção da degradação da 2-Desoxirribose .....	45
Figura 14: (A) Efeito da concentração da 2-DR na degradação da 2-Desoxirribose. (B) Porcentagem de proteção da degradação de 2-DR. ....	47
Figura 15: Efeito do tempo de incubação na peroxidação lipídica.....	50
Figura 16: (A) Efeito da concentração dos extratos na peroxidação lipídica. (B) Porcentagem de proteção peroxidação lipídica .....	51
Figura 17: (A) Efeito da concentração Fe(II) na peroxidação lipídica. (B) Porcentagem de proteção da peroxidação lipídica .....	53
Figura 18: Gel de agarose de pUC 18 DNA mostrando as bandas super-enovelado(SC), circular aberto (OC) e linear (L).....	55

Figura 19: Efeito da concentração dos extratos no dano oxidativo da pUC18.....	56
Figura 20: (A) Efeito da concentração Ferro II no dano oxidativo da pUC18. (B) Porcentagem de proteção do dano oxidativo da pUC18. ....	57
Figura 21: Efeito da concentração de Fe(II) no espectro de absorção do extrato da flor. ....	58
Figura 22: Efeito da concentração de Fe(III) no espectro de absorção do extrato da flor .....	59
Figura 23: Efeito da concentração de Fe(II) no espectro de absorção do extrato da folha.....	59
Figura 24: Efeito da concentração de Fe(III) no espectro de absorção do extrato da folha.....	60
Figura 25: Espectro UV-Vis do (A) padrão de glucotropaeolina e (B) glucotropaeolina isolada das raízes de T majus .....	60
Figura 26: Valores da absorbância em 320 nm e 400 nm variando a concentração de Fe(II) e Fe(III). ....	62
Figura 27: Cromatograma do extrato da flor em 220nm.....	65
Figura 28: Cromatograma do extrato da flor em 270nm .....	65
Figura 29: Cromatograma do extrato da flor em 330nm.....	66
Figura 30: Cromatograma do extrato da folha em 220nm.....	66
Figura 31: Cromatograma do extrato da folha em 270nm.....	67
Figura 32: Cromatograma do extrato da folha em 330nm.....	67
Figura 33: Porcentagem de proteção das frações da flor na degradação da 2-Desoxirribose.....	69
Figura 34: Porcentagem de proteção das frações da folha na degradação da 2-DR.....	70

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Geração do radical superóxido .....	06
Esquema 2: Sistema de defesa antioxidante .....	21
Esquema 3: Adição dos reagentes nos brancos no ensaio da degradação da 2-DR. ....	31
Esquema 4: Adição dos reagentes nos brancos no ensaio da peroxidação lipídica.....	33
Esquema 5: Bandas do DNA plasmidial após o ataque radicalar.....	54

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores I50 para diversos extratos no ensaio da 2-DR.....	44
Tabela 2: Valores I50 para diversos extratos no ensaio da peroxidação lipídica.....	52

## ABSTRACT

Nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) is an ornamental rapid-growing plant native from Mexico and Peru. Its leaves and flowers are used in culinary due to its adorning and tasting qualities, as well as its medicinal effects. The extraction was made by maceration for 15 days of fresh leaves and flowers in ethanol (70%), after that alcoholic extracts were lyophilized. The dried extracts were resuspended in ultra-pure water. The aims of this study were **i)** to evaluate whether or not flowers and leaves extracts demonstrate antioxidant properties in Fenton free radical generation system ( $H_2O_2$  and Fe(II)); **ii)** to investigate its antioxidant mechanism and **iii)** to identify the fractions of flowers and leaves extracts that are responsible for the antioxidant action. EPR results showed that nasturtium alcoholic extracts can decrease the DMPO- $\cdot OH$  signal intensity. We also observed that nasturtium's extracts can protect biomolecules from oxidative degradation caused by hydroxyl radicals. In 2-deoxyribose (2-DR) degradation, rat liver homogenate lipid peroxidation and plasmid DNA damages assays the protection conferred by the extracts were concentration dependent. In addition, increasing concentrations of 2-DR (oxidative marker) had no impact on the antioxidant efficiency of nasturtium extracts what indicates that antioxidant activity of both extracts are related to an iron chelating ability. Also, increasing Fe(II) concentration in the 2-DR, lipid peroxidation and plasmid DNA damage assays decreases the nasturtium extracts antioxidant percent of protection, which corroborates to an iron chelating mechanism of antioxidant activity. UV-Vis spectrums of nasturtium extracts were modified by the addition of Fe(II) or Fe(III). In the leaves spectrum was possible to observe the formation of a complex with Fe(II) and Fe(III) after 30 minutes of incubation. Preliminary studies based on the spectrophotometric ferrozine assay showed that both extracts can reduce Fe(III) to Fe(II). Different fractions of extracts were separated, with different retention time, using HPLC-RP and tested in 2-DR oxidative degradation assay. The most hydrophilic fractions of each extracts have the most effective antioxidant actions. Fractions of leaves extract showed the highest percentiles of 2-DR protection and it can explain why leaves extract was more effective than flower extract in all assays. In conclusion, these results suggest that nasturtium antioxidant properties can be attributed to component(s) capable of chelating metals. Interestingly, leaves extracts showed a more expressive antioxidant activity when compared to flowers extracts. This result is an important nutritional finding because flowers are more used in culinary than leaves.

**Key words:** Nasturtium, antioxidant, iron.

## RESUMO

*Nasturtium* (*Tropaeolum majus* L.) é uma planta ornamental de crescimento rápido nativa do México e Peru. As suas folhas e flores são utilizadas na culinária, como enfeite e devido às qualidades de sabor e pelos seus efeitos medicinais. A extração das folhas e flores frescas foi feita por maceração durante 15 dias em etanol (70%), depois os extratos alcoólicos foram liofilizados. Os extratos secos foram ressuspensos em água ultra-pura. Os objetivos deste estudo foram **i)** avaliar se os extratos das flores e das folhas possuíam ou não propriedades antioxidantes em sistema de geração de radicais livres do tipo Fenton ( $H_2O_2$  e Fe (II)); **ii)** investigar o mecanismo antioxidante e **iii)** identificar as frações dos extratos das folhas e das flores que são responsáveis pela ação antioxidante. Os resultados de EPR demonstraram que ambos extratos alcoólicos diminuíram a intensidade do sinal aduto DMPO- $\cdot OH$ . Também foi observado que os extratos de capuchinha protegeram a degradação de biomoléculas por degradação oxidativa causada pelo radical hidroxil. Nos ensaios de danos à 2-desoxirribose (2-DR), de peroxidação lipídica com homogentato de fígado de rato e de DNA plasmidial, a proteção conferida pelos extratos foi dependente da concentração do extrato. No ensaio com concentrações crescentes de 2-DR (marcador oxidativo) não ocorreu nenhuma alteração na proteção antioxidante dos extratos da capuchinha, indicando que a atividade antioxidante de ambos extratos estão relacionadas à capacidade de quelar ferro. Além disso, o aumento da concentração de Fe (II) nos ensaios da 2-DR, de peroxidação lipídica e de DNA plasmidial diminuiu a porcentagem de proteção antioxidante dos extratos da capuchinha, o que corrobora para um mecanismo antioxidante do tipo quelante de ferro. Foi verificada a diferença entre os espectros UV-Vis dos extratos e após a adição de Fe (II) ou Fe (III). Nos espectros do extrato da folha foi possível observar a formação de um complexo com Fe (II) e Fe (III), após 30 minutos de incubação. Estudos baseados no ensaio espectrofotométrico da ferrozina demonstraram que ambos os extratos podem reduzir Fe (III) a Fe (II). As diferentes frações dos extratos foram separadas, com diferentes tempos de retenção, usando HPLC-RP e a atividade antioxidante dessas frações foram testadas pelo ensaio da 2-DR. As frações mais hidrofílicas de cada extrato apresentaram ação antioxidante mais efetiva. As frações do extrato das folhas apresentaram os maiores percentuais de proteção a 2-DR, isso pode explicar o porquê que em todos os ensaios o extrato das folhas foi mais efetivo que o extrato das flores. Estes resultados sugerem que a atividade antioxidante apresentada pelos extratos da capuchinha possa ser atribuída a componente (s) com capacidade de quelar metais. Curiosamente, o extrato das folhas demonstrou uma atividade antioxidante mais expressiva que o extrato das flores. Este resultado é um importante achado nutricional porque flores são mais utilizadas na culinária do que as folhas.

**Palavras-chave:** Capuchinha, antioxidante, ferro.

## 1. INTRODUÇÃO

Os radicais livres estão relacionados a diversas ações primordiais para o organismo tais como os processos de fagocitose e de regulação intracelular de sinais. Por outro lado, em um processo conhecido como estresse oxidativo, os radicais livres podem causar danos às biomoléculas, como a peroxidação lipídica da membrana celular que pode levar ao envelhecimento celular e desenvolvimento de uma variedade de doenças como por exemplo o câncer e a doença de Alzheimer (Halliwell & Gutteridge 1999; Ardestani & Yazdanparast, 2007).

Estresse oxidativo é definido como o processo no qual ocorre excesso na produção de radicais livres ou a remoção incompleta dessas espécies, ou seja, ocorre um desequilíbrio entre o sistema de geração e o de remoção de radicais livres (Halliwell & Gutteridge, 1999).

No organismo humano são produzidos radicais livres continuamente, porém, possuímos um sistema de defesa natural, composto por antioxidantes endógenos, que diminuem os danos causados pelos radicais livres (Barreira *et al.*, 2008). Entretanto, quando ocorre um desequilíbrio entre a geração e o sistema antioxidante do organismo, essas espécies podem causar danos ao organismo e se torna necessária a suplementação da dieta com antioxidantes exógenos. Desta forma, é de grande importância a busca por novas fontes de antioxidantes exógenos, que podem ser tanto de origem natural como sintética (Barreira *et al.*, 2008).

Atualmente, existe grande interesse em descobrir fontes de antioxidante naturais, principalmente por parte da indústria cosmética e alimentícia. A indústria cosmética busca novas fontes de antioxidantes para combater, entre outros, os sinais do envelhecimento no corpo. Por outro lado, a indústria alimentícia busca novos

antioxidantes que evitem a deterioração dos alimentos com efeitos menos tóxicos ao organismo do que os causados pelos antioxidantes sintéticos usados (Pan *et al.*, 2007).

Outro grande fator que motiva a busca por antioxidantes naturais se deve à relação do estresse oxidativo com a iniciação ou desenvolvimento de diversas doenças (Kukic *et al.*, 2006). Por isso existe um grande interesse em minimizar os danos causados pelo estresse oxidativo. Portanto a ingestão de antioxidantes exógenos, quer na forma isolada ou na forma de alimento, poderia minimizar os danos causados pela ação dos radicais livres.

Com o intuito de descobrir uma nova fonte antioxidante natural, que pode inclusive ser inserida na dieta, esse trabalho se propôs a estudar a atividade antioxidante *in vitro* das flores e folhas da Capuchinha (*Tropaeolum majus* L.), planta comestível encontrada facilmente em todo o território brasileiro.

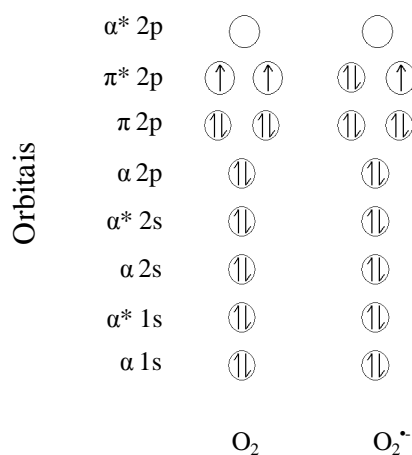


## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1-Radicais Livres

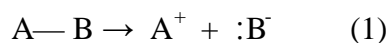
Nas estruturas dos átomos e moléculas, os elétrons usualmente estão associados em pares, sendo que cada par movimenta-se em uma região do espaço definida em volta do núcleo, o orbital atômico. Esses dois elétrons possuem spins opostos, ou seja, um possui spin  $+ \frac{1}{2}$  e o outro spin  $- \frac{1}{2}$  (Halliwell, 2006).

O termo radical livre é dado a qualquer espécie química que contém um ou mais elétrons desemparelhados e que é capaz de existir independentemente, como ilustra a Figura 1 (Halliwell, 2006).



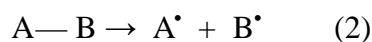
**Figura 1:** Distribuição eletrônica do oxigênio molecular e do radical superóxido.  
Fonte: Augusto, 2006.

Efetivamente todas as ligações químicas são constituídas por dois elétrons e podem ser rompidas de duas formas diferentes. Na primeira, os dois elétrons da ligação ficam presos a um dos fragmentos (1):



Uma vez que os dois fragmentos possuem cargas distintas, esse processo denomina-se heterólise e os fragmentos com cargas são naturalmente denominados íons (Pryor, 1970).

No segundo processo de quebra de ligação, os dois elétrons da ligação separam-se simetricamente (2):

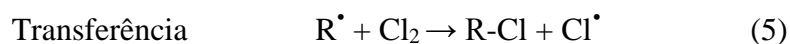
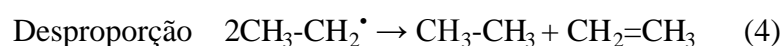
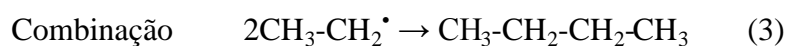


Esse processo denomina-se homólise e os fragmentos são radicais livres (Pryor, 1970).

As reações de quebra homolítica ocorrem devido à cisão térmica, a todo tipo de radiação eletromagnética ou ainda por processos de oxidação e redução (Santos, 1998).

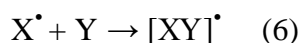
As reações radicalares estão divididas em três fases: i) iniciação, quando se originam os radicais, ii) propagação, em que o número de radicais não se altera, mas o elétron não emparelhado altera de posição e iii) terminação, em que os radicais são destruídos e a cadeia é encerrada (Pryor, 1970).

Os radicais podem sofrer três tipos principais de reações: combinação, desproporção e transferência. As duas primeiras ocorrem entre duas espécies radicalares e acontecem na fase de terminação (3,4). E a última ocorre na fase de propagação, quando um agente de transferência reage com o radical (5) (Pryor, 1970).

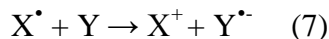


O radical livre pode reagir com uma espécie não radicalar de quatro formas, enumeradas abaixo (Halliwell & Gutteridge, 1999):

1- Adicionando-se a outra molécula, formando um aduto radicalar (6).



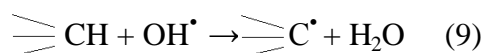
2- Atuando como um agente redutor, doando o elétron (7).



3- Atuando com um agente oxidante, recebendo um elétron. Exemplo: O radical hidroxila oxida uma droga sedativa, a prometazina(8).



4- Abstraindo o hidrogênio, por exemplo, em uma ligação C-H (9).

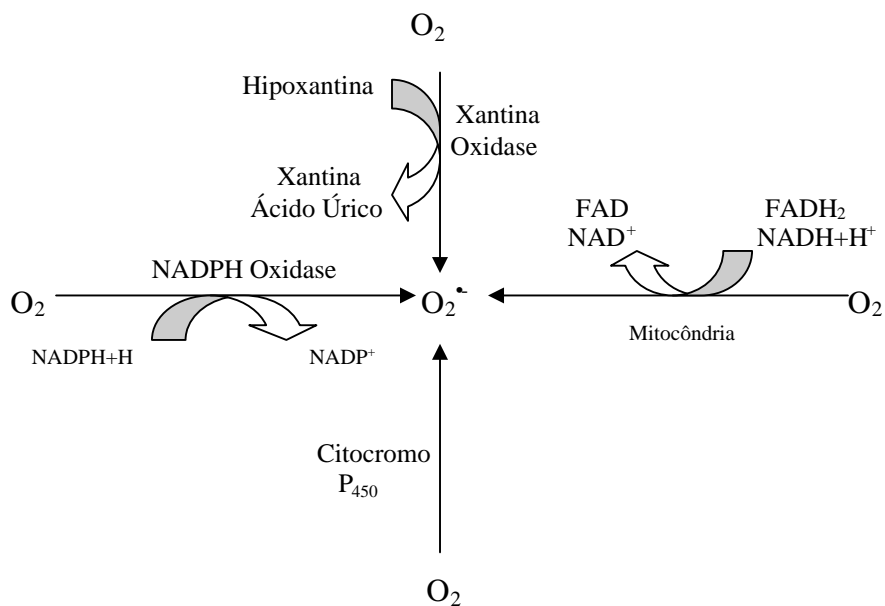


## 2.2-Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Em condições normais, são produzidos no organismo humano radicais livres de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio. Devido à alta reatividade e aos danos causados ao organismo, destacam-se as espécies reativas de oxigênio (EROs). O termo EROs refere-se a espécies que podem ou não apresentar elétrons desemparelhados em seu orbital mais externo, porém podem intermediar a geração de espécies radicalares. As principais espécies reativas de oxigênio são o próprio oxigênio molecular ( $O_2$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e o radical hidroxil ( $^{\bullet}OH$ ) (Halliwell & Gutteridge, 1999).

O oxigênio molecular pode ser considerado um radical livre, visto que sua distribuição eletrônica mais estável é  $^{\bullet}O-O^{\bullet}$ , contendo um elétron desemparelhado em cada oxigênio. A estrutura convencional de Lewis seria  $O=O$  mas análises paramagnéticas mostraram que a molécula de  $O_2$  possui elétrons desemparelhados (Masterton *et al.*, 1990).

O radical superóxido pode ser gerado por diversos processos exemplificados no Esquema 1.



**Esquema 1:** Geração do radical superóxido.

As enzimas NADPH oxidase se encontram principalmente no interior das células fagocíticas e se ativam produzindo EROs como mecanismo de defesa, ameaçadas por patógenos (Fainstein, 2008a). Essas enzimas podem ser encontradas também em células não fagocíticas, sendo que as EROs produzidas regulam a cascata de sinais intracelular (Droge, 2002).

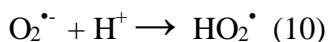
A enzima xantina oxidase participa da degradação das purinas, catalisando a transformação da hipoxantina em xantina e a xantina em ácido úrico. Contudo, nesses dois passos, ocorre a produção de radical superóxido e acredita-se que este está envolvido em danos na reperfusão e, conseqüentemente, com alterações cardíacas (Fainstein, 2008b).

O papel clássico amplamente descrito para o citocromo  $P_{450}$  está relacionado ao metabolismo de xenobióticos, entretanto, também está relacionado à produção de EROs

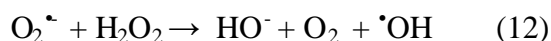
que produzem efeitos tóxicos ligados a patologias; sabe-se que a geração do radical superóxido pelo citocromo P<sub>450</sub> está relacionada à artrite reumatóide (Fainstein, 2008c).

Grande parte do radical superóxido produzido é proveniente da mitocôndria, sendo que essa produção acontece em dois pontos da cadeia transportadora de elétrons, nos complexos I e III (Finkel & Holbrook, 2000). Estima-se que de 0,1 a 0,4% do oxigênio consumido é convertido a radical superóxido cuja reatividade é relativamente baixa se comparada à reatividade do radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ) (Hermes-Lima, 2004a; Andrade Jr, 2004).

O radical superóxido sofre protonação, pois age como base fraca originando assim o radical hidroperóxido (10) que sofre desproporcionamento, formando peróxido de hidrogênio (11). Dessa forma, a maior parte do superóxido produzido *in vivo* converte-se em peróxido de hidrogênio por processos não enzimáticos ou por ação da enzima superóxido dismutase (SOD) (Santos, 1998; Droge, 2001).

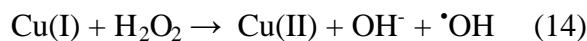


O peróxido de hidrogênio não é um radical livre, porém suas propriedades são importantes, pois possui a capacidade de atravessar membranas biológicas e é requerido na formação de oxidantes mais potentes, por exemplo, o radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ) a partir do radical superóxido (12) (Hermes-Lima, 2004a; Santos, 1998).



O radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ) também pode ser formado pela reação do peróxido de hidrogênio com um metal de transição na sua forma reduzida, como o ferro II (13) e o

cobre I (14) (Fenton, 1893 apud Andrade Jr, 2004; Torres, 2008).



O radical hidroxil possui uma alta reatividade e por isso tem a capacidade de reagir com as biomoléculas próximas, provocando danos em carboidratos, lipídios, DNA e proteínas. Desse modo, o radical hidroxil pode inutilizar a célula e levar a um quadro de apoptose celular, logo esse radical está intimamente relacionado ao envelhecimento e a diversas patologias (Halliwell e Gutteridge, 1999; Hermes-Lima, 2004a).

## **2.3-Efeitos Biológicos dos EROs**

A expressão “estresses oxidativo” é usada pra descrever diversos processos danosos resultantes da falta de equilíbrio entre a formação de espécies oxidativas e o sistema de defesa antioxidante. Um incontrolável aumento da concentração de radicais livres resulta em uma série de reações que pode causar a oxidação de biomoléculas (Turrens, 2003).

O estresse oxidativo pode resultar: 1- da diminuição da atividade antioxidante, devido à má nutrição e a doenças genéticas; 2- da produção excessiva de EROS resultante do efeito de drogas, da poluição, do álcool, de pesticidas, do alto consumo de colesterol, ferro e gorduras insaturadas. (Halliwell, 1996; Santos, 1998).

### **2.3.1-Oxidação do DNA, Proteínas e Lipídios**

As espécies oxidantes atacam tanto as bases nitrogenadas do DNA quanto

também a desoxirribose. A identidade desses oxidantes ainda é matéria de investigação, sendo relatada a ação principalmente do radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ) e do íon peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (Loureiro *et al.*, 2002 ; Barreiros *et al.*, 2006).

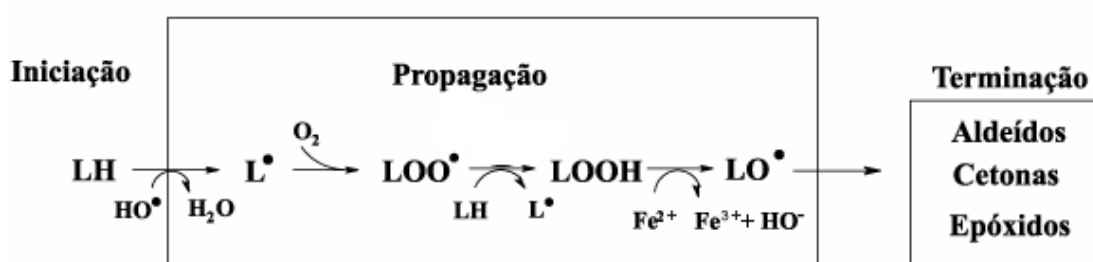
Tanto as EROs quanto as espécies reativas de nitrogênio estão relacionadas com o dano oxidativo do DNA, provocando a quebra da dupla fita de DNA e modificações oxidativas nas bases nitrogenadas; podendo resultar em um processo potencialmente mutagênico e carcinogênico (Hermes-Lima, 2004a; Medeiros, 2008). O radical hidroxil pode se adicionar às bases do DNA ou abstrair átomos de hidrogênio das mesmas ou da desoxirribose, originando diversos produtos como a 8-hidroxi guanina. O peroxinitrito, também responsável pela formação de produtos oxidados do DNA, pode-se difundir intracelularmente e, a partir dele, diferentes espécies reativas de nitrogênio e de oxigênio são formadas, podendo ser as responsáveis pelos danos causados ao DNA (Loureiro *et al.*, 2002 ; Barreiros *et al.*, 2006).

Com relação ao dano causado às proteínas, as EROs podem agir na cadeia lateral da proteína, onde atacam preferencialmente os seguintes aminoácidos: cisteína, histidina, triptofano, metionina e fenilalanina. Esse ataque pode resultar na oxidação de grupos sulfidril (-SH) e clivagem de ligações peptídicas podendo ter como consequência a perda da atividade enzimática, dificuldade no transporte ativo das membranas, citólise e morte celular. Dentre os produtos formados por essa oxidação estão as proteínas carboniladas que possuem o papel de marcadores bioquímicos da oxidação protéica (Barreiros *et al.*, 2006; Hermes-Lima, 2004a; Piña & Piña, 2008).

O ataque radicalar aos lipídios é conhecido como peroxidação lipídica. A membrana é um dos componentes celulares mais atingidos pela ação dos EROs. Esse ataque produz alteração da permeabilidade da membrana e resulta na perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas como as enzimas

hidrolíticas dos lisossomas e formação de produtos citotóxicos, resultando na morte celular (Halliwell & Gutteridge, 1999).

A peroxidação lipídica é desencadeada quando as ligações duplas de ácido graxo poliinsaturado dos lipídios são atacadas pelos radicais livres como o  $\cdot\text{OH}$ , que é uma espécie suficientemente reativa para abstrair um átomo de hidrogênio. Depois de iniciado o processo, ele se torna auto-catalítico. A figura 2 resume as três fases do processo da oxidação dos lipídios (Vladimirov *et al.*, 1980 apud Santos, 1998).



**Figura 2:** Representação geral das fases da peroxidação lipídica.

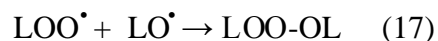
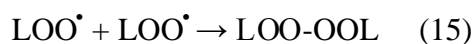
Fonte: Loureiro *et al.*, 2002.

Na fase de iniciação, ocorre a abstração do átomo de hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado ( $\text{LH}$ ). Quando o átomo de hidrogênio é abstraído, ele forma uma molécula com um elétron desemparelhado, levando à formação de um radical lipídico ( $\text{L}\cdot$ ) (Hermes-Lima, 2004a; Loureiro *et al.*, 2002).

Na fase de propagação ocorre adição de uma molécula de  $\text{O}_2$  ao radical lipídico, resultando na formação de um radical peróxido ( $\text{LOO}\cdot$ ) que pode reagir com outro ácido graxo poliinsaturado, originando outro radical lipídico. O radical  $\text{LOO}\cdot$  combina-se com outro átomo de hidrogênio, resultando em um hidróperóxido lipídico ( $\text{LOOH}$ ) que é instável na presença de metais de transição, como o ferro e o cobre, resultando na formação de radicais como alcoxil ( $\text{LO}\cdot$ ) e peróxido ( $\text{LOO}\cdot$ ), capazes de abstrair um átomo de hidrogênio da cadeia de outro ácido graxo poliinsaturado, propagando, dessa maneira, a peroxidação lipídica (Savin & Balmori, 2008; Loureiro *et al.*, 2002).



Na fase de terminação, são formados produtos secundários, mais estáveis que os radicais livres, que iniciaram o processo, e os radicais lipídicos formados durante a propagação (Loureiro *et al*, 2002). O fim da reação de peroxidação ocorre quando acabam os substratos, ou quando há reações de dimerização (15,16), acoplamento (17) ou com a ação de antioxidantes como a vitamina E (Savin & Balmori, 2008; Santos, 1998).



### **2.3.2-Doenças relacionadas as EROs**

A produção excessiva de radicais provavelmente contribui nos danos teciduais em doenças como a artrite reumatóide e a inflamações intestinais como a doença de Crohn e as colites ulcerativas. Além disso, os danos oxidativos possuem uma relação com o aceleração das doenças neurodegenerativas. Existem ainda doenças diretamente relacionadas com a formação de radicais livres, como a doença de Wilson, hemocromatose e  $\beta$ -talassemia. O dano causado pela oxidação lipídica nas paredes dos vasos sanguíneos contribui significativamente para o desenvolvimento de aterosclerose. Outro exemplo é a oxidação do DNA que pode contribuir para o agravamento do câncer (Halliwell, 1996).

### 2.3.2.1-Câncer

Esta doença se caracteriza pela multiplicação e propagação descontrolada no organismo de formas anormais das próprias células corporais. As células cancerosas exibem quatro características que as diferenciam das células normais: possui proliferação descontrolada, desdiferenciação e perda de função, poder de invasão e sofrem metástase (Robbins *et al.*, 2000).

Existem duas principais alterações genéticas que levam ao desenvolvimento do câncer: i) ativação dos proto-oncogenes (genes que regulam a divisão, a apoptose e a diferenciação das células) em oncogenes; ii) inativação dos genes supressores tumorais (genes que têm a capacidade de suprimir alterações malignas) (Robbins *et al.*, 2000; Rang *et al.*, 2004).

Oxidantes como o peróxido de hidrogênio e o radical superóxido podem induzir experimentalmente a ativação do oncogenes e também conduzem à inativação de genes supressores acentuando, dessa forma, a proliferação de células cancerígenas (García *et al.*, 2004).

As vias mais importantes de disseminação de células cancerosas são os vasos sanguíneos e linfáticos. O ataque de radicais livres às células endoteliais resulta em liberação de proteases que posteriormente podem degradar as membranas. Essa ação sobre as membranas está associada à geração de compostos químicos que atraem as células tumorais. Em estudos experimentais, foi observado um aumento do número de células tumorais retidas nas paredes dos vasos depois da ação de EROs (García *et al.*, 2004).

Níveis elevados de produtos resultantes de danos oxidativos ao DNA foram encontrados em tecidos de câncer de mama, pulmão, cólon, cérebro e ovário em relação aos níveis presentes em áreas adjacentes (Loureiro *et al.*, 2002).

### **2.3.2.2-Aterosclerose**

Na aterosclerose ocorre um espessamento das paredes vasculares com estreitamento do diâmetro vascular, podendo induzir uma lesão isquêmica. A aterosclerose começa quando a artéria sofre uma lesão endotelial e os macrófagos migram da corrente sanguínea para a parede da artéria, transformando-se em células que acumulam materiais gordurosos. No decorrer do tempo, esses macrófagos gordurosos acumulam-se e provocam um espessamento em forma de placas no revestimento interno da artéria (Robbins *et al.*, 2000).

Os radicais livres estão envolvidos no desenvolvimento e na progressão da aterosclerose, visto que eles atacam os ácidos graxos insaturados, produzindo a peroxidação em cadeia da membrana das células do endotélio vascular, e também oxidam as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Rodrigues, 2000).

### **2.3.2.3-Doenças neurodegenerativas**

O estresse oxidativo é citado entre os mecanismos responsáveis pela morte neuronal nos distúrbios neurodegenerativos. A formação das espécies reativas de oxigênio é elevada pelo acúmulo de cálcio na mitocôndria, além disso, o cálcio ativa a óxido nítrico sintase, produzindo uma maior quantidade de óxido nítrico (NO) que na presença EROs gera outros radicais como o peroxinitrito (Rang *et al.*, 2004). Esses radicais colaboram para a morte neuronal, pois lesam os lipídios de membrana, DNA e proteínas. Marcadores do estresse oxidativo já foram encontrados em exames pós-morte de cérebros de pacientes com alguma desordem neurodegenerativa (Klein & Ackerman, 2003).

Na doença de Parkinson, o dano cerebral está relacionado ao acúmulo de ferro, aumento na peroxidação lipídica, oxidação de DNA e proteínas carboniladas. Porém o acúmulo de ferro é um evento secundário, pois ocorre em estágios mais avançados da

doença. Já na doença de Alzheimer, a perda da homeostase do cálcio contribui para uma disfunção na mitocôndria, resultando em uma elevação na produção de radicais livres, podendo causar morte neuronal (Hermes-Lima, 2004b).

#### **2.3.2.4-Doenças relacionadas ao acúmulo de ferro e de cobre**

Os metais de transição ferro e cobre são tóxicos ao tecido animal, pois ambos podem catalisar a formação do radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ) e este, por sua vez, desencadeia a peroxidação lipídica, causando danos celulares (Robbins *et al.*, 2000; Andrade Jr, 2004).

A hemocromatose é uma doença em que ocorre um acúmulo excessivo de ferro em todo o organismo, mas principalmente no fígado e no pâncreas. O acúmulo de ferro pode ocorrer devido a uma absorção intestinal excessiva de ferro, (hemocromatose hereditária), ou devido à administração parenteral de ferro (hemocromatose secundária). Os sintomas principais da hemocromatose são hepatomegalia, cirrose hepática, dor abdominal, disfunção cardíaca, alteração na homeostase da glicose, amenorréia na mulher e perda de libido e impotência no homem. A hemocromatose hereditária é um distúrbio recessivo homocigótico, cuja mutação mais comum é a substituição da tirosina pela cisteína na posição 282 (C282) da proteína HFE, que regula expressão do DMT1, transportador de ferro no lúmen intestinal. Essa mutação do HFE leva a uma super-expressão de DMT1 e, conseqüentemente, aumenta a absorção de ferro (Robbins *et al.*, 2000; Allen *et al.*, 2008; Franchini, 2006).

A doença de Wilson é um distúrbio autossômico recessivo, causado por uma deficiência ou ausência de uma ATPase transportadora de cobre, ocorrendo um acúmulo de cobre em órgãos como o fígado, cérebro e olhos. Os sintomas principais são: doença hepática aguda ou crônica, irritabilidade, agressividade, declínio intelectual, alterações

de consciência e uma síndrome semelhante à doença de Parkinson (Robbins *et al.*, 2000; Rodrigues & Dalgalarrodo, 2003).

A  $\beta$ -talassemia consiste na ausência total ou redução na síntese de cadeias de  $\beta$ -globina estruturalmente normais e com síntese normal de cadeia  $\alpha$ . Um dos efeitos negativos é a absorção excessiva de ferro da dieta. Esse fator, somado às repetidas transfusões sanguíneas necessárias ao paciente, resulta em uma sobrecarga de ferro em órgãos como o fígado e o coração (Robbins *et al.*, 2000; Cappellini *et al.*, 2006).

## 2.4- Defesas Antioxidantes

A definição mais relevante biologicamente de antioxidantes é “qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas àquelas de um substrato oxidável, significativamente previne a oxidação deste substrato”, considerando substrato oxidado todo tipo de molécula encontrada *in vivo* (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Os organismos aeróbios, inclusive algumas bactérias anaeróbias, desenvolveram uma série de mecanismos protetores com o intuito de reduzir os danos causados pela toxicidade das EROs. Esses mecanismos compõem o sistema de defesa antioxidante (Hermes-Lima, 2004a; Ginani, 2005).

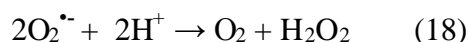
O sistema de defesa antioxidante tem como objetivo inibir ou diminuir os danos causados às células pelos radicais livres. Esse sistema pode ser dividido em quatro classes: i) defesa antioxidante primária, ii) defesa antioxidante auxiliar, iii) complexante de metais e iv) sistema de reparo enzimático (Hermes-Lima, 2004a), conforme ilustra o esquema 2.

### 2.4.1- Defesa antioxidante primária

Esse sistema antioxidante é composto por antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, e reagem diretamente com as EROs (Hermes-Lima, 2004a).

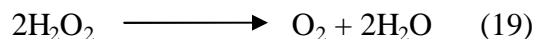
O sistema enzimático é formado por diversas enzimas, destacando-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx) (Hermes-Lima, 2004a).

A enzima SOD protege dos danos causados pelos radicais, catalisando a dismutação do radical superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (18) (Valko *et al.*, 2005; Santos, 1998). Essa transformação ocorre normalmente em pH fisiológico, mas é acelerada pela ação dessa enzima. (Hermes-Lima, 2004a).



A enzima SOD possui duas isoformas: associada ao cobre e ao zinco (CuZn-SOD), com ação principalmente no citosol, e associada ao manganês (Mg-SOD), cujo local de ação é na mitocôndria (Haliwell, 1996; Valko *et al.*, 2007).

Outra enzima importante é a catalase, localizada nos peroxissomas. Ela promove a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, (19) (Valko *et al.*, 2007; Hermes-Lima, 2004a).



A glutathiona peroxidase (GPx) é uma enzima selênio-dependente que catalisa a decomposição de peróxidos (peróxido de hidrogênio), utilizando como substrato a glutathiona reduzida (GSH) que é oxidada à glutathiona oxidada (GSSG) (20) (Hermes-Lima, 2004a).



A defesa não enzimática é constituída pelos antioxidantes de baixo peso molecular (ABPM), que podem ser divididos em endógenos e exógenos. Entre os endógenos destaca-se a glutatona. Entre os exógenos destacam-se a vitamina C, o alfa-tocoferol, os carotenóides e os polifenóis (Hermes-Lima, 2004a). Os compostos antioxidantes exógenos são obtidos a partir da dieta, o que demonstra a importância da nutrição adequada com a defesa antioxidante.

Os antioxidantes de baixo peso molecular podem atuar de três formas: i)- diretamente sobre o radical livre, abstraindo o elétron desemparelhado e doando um átomo de hidrogênio ou se ligando ao radical, formando um radical menos reativo; os antioxidantes desse grupo são chamados de sequestradores (Klein *et al.*, 1981 apud Andrade Jr, 2004); ii)- quelar o metal (Morel *et al.*, 1993 apud Andrade Jr, 2004); iii)- ou podem agir das duas maneiras.

A glutatona, antioxidante hidrofílico, é um tripeptídeo formado por resíduos de glicina, cisteína e glutamato. Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento –SH presente na cisteína. O resíduo da cisteína trabalha como um redutor intracelular, sendo capaz de reagir com um elétron não pareado de um radical livre, formando, dessa forma, um radical GS<sup>•</sup> que, por dimerização, forma glutatona oxidada (GSSG) (Valko *et al.*, 2007).



O ácido ascórbico (vitamina C) é hidrossolúvel, e sua propriedade química mais importante é a capacidade de agir como agente redutor (22). Em pH fisiológico, 99,9% da vitamina C está na forma iônica (AscH) (Valko *et al.*, 2007). O radical formado (Asc<sup>•</sup>) é denominado de radical ascorbil, que é mais estável e, por isso, menos reativo

com as biomoléculas (Hermes-Lima, 2004a).



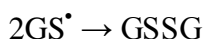
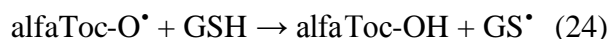
Devido a sua capacidade redutora, o ácido ascórbico pode participar de reações formadoras de radicais livres, através da redução de  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{1+}$ , que são metais que participam da reação de Fenton. Ele também funciona como um antioxidante auxiliar regenerando a vitamina E. (Buettner, 1993 apud Ginani, 2005 ; Siqueira & Arruda, 2008a).

O alfa-tocoferol, constituinte da vitamina E, previne a propagação da peroxidação lipídica, sendo lipossolúvel e presente em altas concentrações na membrana celular (Hermes-Lima, 2004a).

O alfa-tocoferol inibe a peroxidação lipídica pela doação de um hidrogênio ao radical peroxil, formando, dessa forma, o radical tocoferil que possui a capacidade de estabilizar em sua estrutura o elétron desemparelhado (23) (Balmori, 2008).



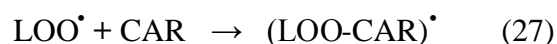
A GSH, anteriormente descrita, age como um antioxidante auxiliar, pois reduz a forma oxidada do alfa-tocoferol, mantendo-o na forma reduzida e funcional (24) (Valko *et al.*, 2007).



Os carotenóides possuem característica lipossolúvel e estão relacionados à interrupção da peroxidação lipídica, estando geralmente ligados a lipoproteínas. (Hermes-Lima, 2004a). Os carotenóides podem reagir de três maneiras com as EROs:



transferir um elétron (25), remover átomo de hidrogênio (26) ou podem se adicionar às EROs (27) (Siqueira & Arruda, 2008b).

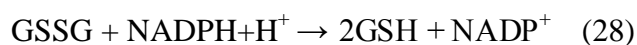


Os polifenóis são produtos provenientes do metabolismo secundário das plantas, sendo abundantes em frutas, verduras, sementes, casca de árvores e bebidas como café, vinho tinto, cerveja e chás. Sabe-se que os polifenóis protegem as células do ataque das EROs, funcionando como seqüestradores de radicais livres. Eles doam rapidamente um hidrogênio para o radical livre, inibindo a oxidação das biomoléculas. Além disso, inibem a atividade da xantina oxidase e aumentam a atividade de enzimas antioxidantes como a SOD (Hermes-Lima, 2004a; Valko, 2007).

#### **2.4.2- Defesa antioxidante auxiliar**

Esse sistema trabalha, dando suporte ao funcionamento das defesas antioxidantes primárias, por exemplo, reciclando ou sintetizando substratos de enzimas antioxidantes (Hermes-Lima, 2004a).

A glutatona redutase (GSH-Rd) reduz a glutatona oxidada (GSSG) à glutatona reduzida (GSH) mantendo os níveis de GSH. Porém esse processo requer o gasto de NADPH (28), sendo que a enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase reduz o  $\text{NAD}^+$  (Hermes-Lima, 2004a).



### **2.4.3- Complexante de Metais**

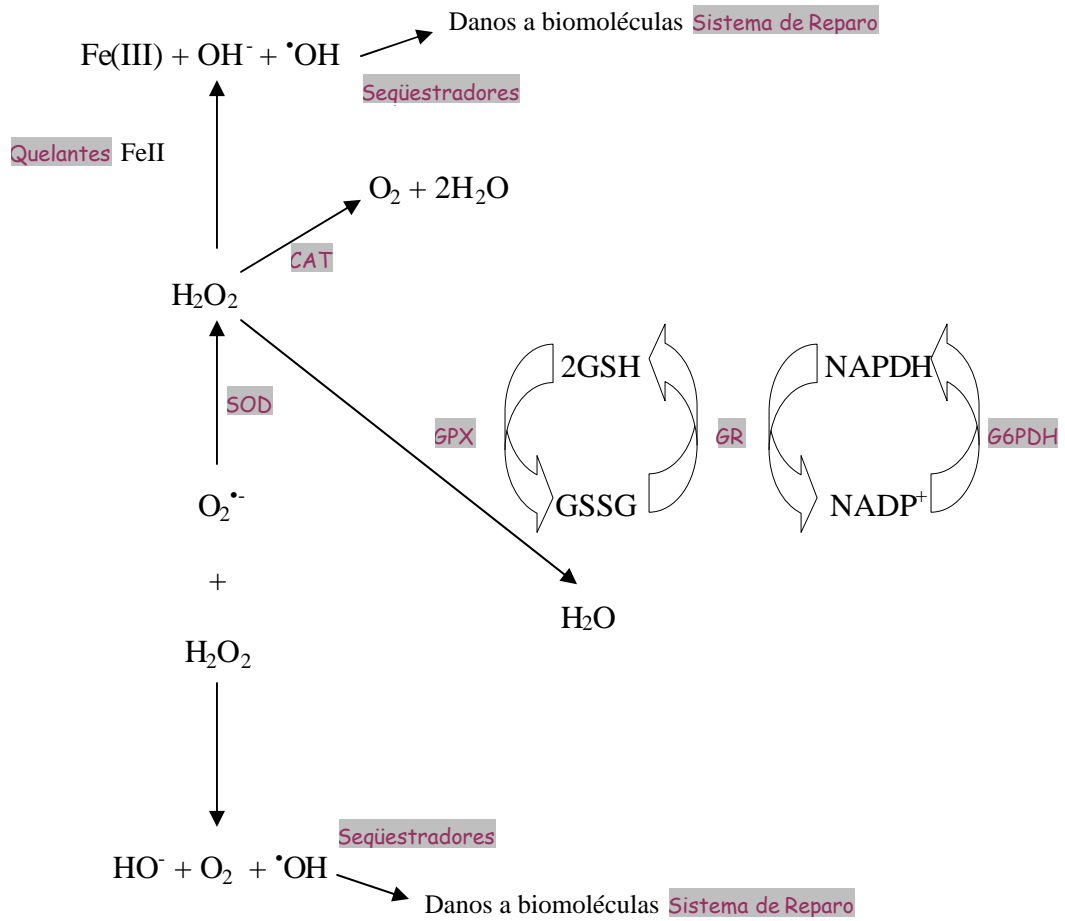
Esse grupo é formado por proteínas ou moléculas de baixo peso molecular, que previnem ou minimizam a participação do ferro e do cobre em reações de geração de radicais livres (Valko *et al.*, 2007).

Entre as proteínas destaca-se a ferritina e a transferrina, que estão envolvidas no metabolismo de ferro, sendo a ceruloplasmina uma proteína envolvida no metabolismo do cobre. Entre os compostos de baixo peso molecular destacam-se o fosfato, o ADP, o ATP e o citrato, que são compostos endógenos. Entre os provenientes da dieta, destacam-se os polifenóis (Halliwell & Gutteridge, 1999; Ginani, 2005).

### **2.4.4- Sistema de reparo enzimático**

Esse sistema é constituído por enzimas capazes de reparar, em parte, os danos, no DNA e nas proteínas, causados pelo ataque de EROs (Hermes-Lima, 2004a).

Quando os radicais livres atacam o DNA, o resultado são alterações estruturais e funcionais. Um dos meios de reparar esse dano é o processo de excisão, no qual as bases modificadas podem ser removidas pela ação das endonucleases ou pela ação das glicosilases. No sistema de reparo de proteínas, apenas dois produtos resultantes do dano oxidativo de aminoácidos podem ser restaurados, o dissulfetos e metionina sulfóxido, que foram formados respectivamente pela oxidação da cisteína e metionina (Ginani, 2005; Hermes-Lima, 2004a ).



**Esquema 2:** Sistema de defesa antioxidante.  
 Fonte: Adaptado de Hermes-Lima, 2004a

### 2.5-*Tropaeolum majus* L.

A planta *Tropaeolum majus* L. é da família Tropaeolaceae, conhecida popularmente como capuchinha, chaguinha, capuchinho, mastruço do Peru, agrião do México, nastúrcio e capuchinha grande (Lorenzi & Matos, 2002).

A capuchinha é uma herbácea aromática e com sabor semelhante ao do agrião, com ramos rasteiros, carnosos, retorcidos, de 1 a 2 metros de comprimento. Suas folhas, peltadas, longo-pecioladas, com nervuras principais saindo do ponto de inserção, com 5 a 9 centímetros de diâmetro. Suas flores solitárias são grandes e vivamente coloridas, podendo ser vermelhas, alaranjadas, brancas ou amarelas (Figura 3). Essa planta multiplica-se por sementes (Lorenzi & Matos, 2002).



**Figura 3:** Capuchinha (*Tropaeolum majus* L.)

A capuchinha é nativa das regiões montanhosas do México e do Peru (Lorenzi & Matos, 2002). Mas por causa da sua rusticidade e capacidade de adaptação a climas variados, espalhou-se rapidamente pelo mundo (Sangalli *et al.*, 2004). No Brasil, devido os seus fins ornamentais e medicinais, a capuchinha é bastante cultivada nas regiões sul e sudeste (Lorenzi & Matos, 2002).

A planta inteira tem sabor picante, e suas flores e folhas comestíveis são usadas principalmente em saladas, além de destacar-se pela múltiplas atividades medicinais (Nizzu & Rodrigues-Amaya, 2005; Santo *et al.*, 2007). Entre as atividades medicinais destacam-se: antimicrobiana, antimicótica, antiviral, antitumoral, antiespasmótica, expectorante, estimulante do bulbo capilar. É usada principalmente em infecções urinária, respiratória e oftalmológica (Sangalli *et al.*, 2004; Nizzu & Rodrigues-Amaya, 2005; Santo *et al.*, 2007; Zanetti *et al.*, 2004).

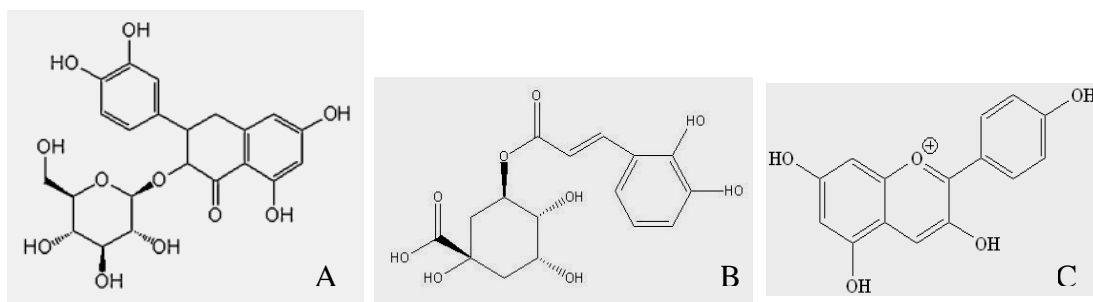
Importantes compostos já foram isolados da capuchinha: óleos essenciais, enzima mirosina, açúcares (glicose e frutose), pigmentos, resinas, pectinas, vitamina C, e sais minerais. Verificou-se a presença dos grupos químicos: cardioativos, antracenosídeos e saponinas (Sangalli *et al.*, 2004)

A flor é rica em luteína, sendo que a flor amarela apresenta uma quantidade maior que a flor laranja. Seu uso é relacionado com a prevenção de doenças graves da visão, como a degeneração macular e a catarata, principal causa de cegueira entre pessoas com mais de 55 anos. As folhas contêm uma quantidade menor de luteína quando comparadas com as flores, porém possuem uma quantidade bem maior de  $\beta$ -caroteno (Nizzu & Rodrigues-Amaya, 2005).

A semente é rica em ácido erúico, conhecido como óleo de Lorenzo, que é utilizado no tratamento da adrenomiopatia, alteração genética que resulta em uma degeneração progressiva do sistema nervoso e que afeta principalmente crianças entre 5-10 anos (Zanetti *et al.*, 2004; Santo *et al.*, 2007).

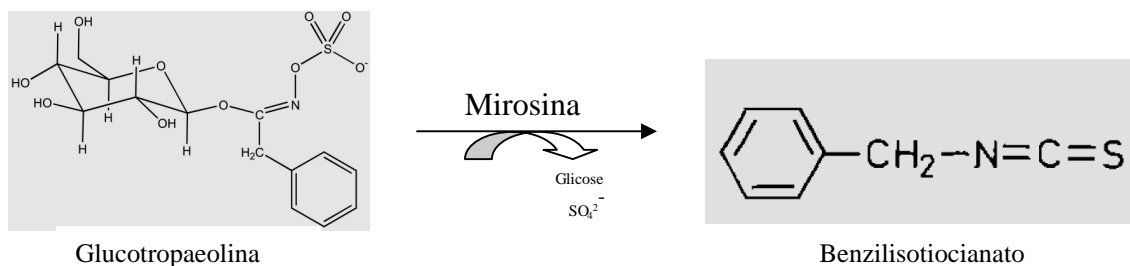
Sabe-se que o extrato alcoólico das folhas e flores da capuchinha é constituído por compostos fenólicos, sendo principalmente flavonóides. Um deles é isorquercitina encontrada na folha. O ácido clorogênico é encontrado nas folhas e flores e a

pelargonidinas estão presente apenas nas flores (Figura 4) (Santo *et al.*, 2007).



**Figura 4:** Estrutura molecular dos polifenóis presentes na capuchinha. (A) Isoquercitina; (B) Ácido Clorogênico; (C) Pelargonidinas

Outro composto que está relacionado à atividade antimicrobiana, antiviral e antitumoral produzida pelos extratos dessa planta é o benzilisotiocianato (Zanetti *et al.*, 2004; Santo *et al.*, 2007; Pintão *et al.*, 1995). Esse composto é produto da hidrólise enzimática da glucotropaeolina, um produto do metabolismo secundário da planta (Aucagne *et al.*, 1999). A glucotropaeolina é um composto aromático característico da Capuchinha, e está relacionado ao sistema de defesa da planta. A enzima responsável por essa hidrólise é a mirosina. Em uma célula intacta, essa enzima encontra-se em compartimentos separados da glucotropaeolina, porém, após a ruptura do tecido, ocorre uma rápida degradação desse produto natural, resultando na formação do benzilisotiocianato (Figura 5) (Wielanek & Urbanek, 1999; Kleinwachter & Selmar, 2004).



**Figura 5:** Ação da Mirosina.  
Fonte: Kleinwachter & Selmar, 2004.

### 3. OBJETIVOS

A literatura relata diversas atividades biológicas dos extratos da Capuchinha, esse trabalho, porém tem como objetivos gerais: analisar se os extratos possuem uma atividade antioxidante, investigar por qual mecanismo de ação essa atividade acontece e identificar a fração presente do extrato alcoólico responsável por essa atividade.

Os objetivos específicos; i) avaliar o efeito antioxidante dos extratos em sistemas de geração radicalar mediados por reagentes de Fenton por meio da: hidroxilação do 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO), degradação oxidativa da desoxirribose (2-DR), oxidação de lipídios e oxidação do DNA e, ii) avaliar o efeito da adição de Fe(II) e Fe(III) no espectro de absorção dos extratos, iii) separar as frações presentes nos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência e iv) testar a atividade antioxidante das frações usando para isso o ensaio da degradação da 2-DR.

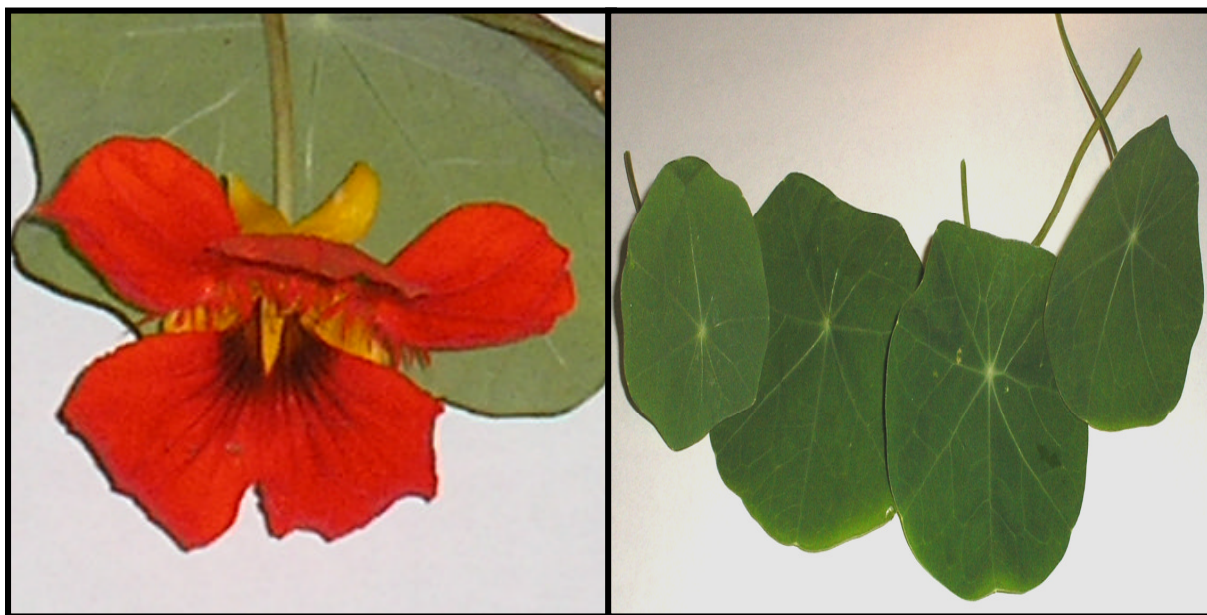
## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1- Materiais

#### 4.1.1- Planta

A planta foi obtida no Jardim Botânico de Brasília e foi analisada pela própria instituição e pelo herbário da UnB que atestaram tratar-se de um exemplar da espécie *Tropaeolum majus* L. Vários exemplares da planta foram utilizados neste estudo.

Para cada preparação dos extratos, foram utilizados 40g de folhas de diversos diâmetros, variando de 4 a 8 centímetros e 40g de flores solitárias que apresentavam coloração laranja (Figura 6).



**Figura 6:** Foto da flor e da folha coletada.

#### 4.1.2.Reagentes

Foram utilizados reagentes de qualidade analítica adquiridos da *Sigma Chemical Co.*, *Vetec* e *Merck Inc.* sendo estes: acetonitrila, ácido bórico, ácido clorídrico, ácido fosfórico, ácido trifluoracético (TFA), ácido tiobarbitúrico (TBA),



agarose, álcool etílico, azul de bromofenol, brometo de etídeo, glicerol, hidróxido de sódio, butil hidroxi tolueno (BHT), citrato de sódio, cloreto férrico (FeIII), cloreto de potássio, 5,5 dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), peróxido de hidrogênio, sulfato ferroso amoniacal (FeII), tampão hepes (ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N-2-etanosulfônico), 2-desoxirribose (2-DR), tampão tris-base.

Todas as soluções, com exceção do Fe(III) e TBA, foram preparadas apenas em água ultra-pura (obtida em sistema de purificação Milli-Q da Waters), sendo que a solução de sulfato ferroso amoniacal foi preparada diariamente. A solução de Fe(III) era preparada em HCl ( $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) diariamente, já a solução de TBA era preparada em NaOH ( $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) a cada dois dias.

## **4.2- Métodos**

### **4.2.1- Obtenção dos extratos alcoólicos**

Os extratos alcoólicos foram obtidos a partir das flores ou folhas frescas da planta, pela técnica de maceração, protegido da luz, por um período de 15 dias em etanol 70% (Simões *et al.*, 2004; Sertié *et al.*, 2005). O macerado foi filtrado em lã de vidro.

### **4.2.2- Obtenção dos extratos secos**

Os extratos hidroalcoólicos (70%) obtidos foram diluídos em água ultra-pura para 10% e depois foram congelados em nitrogênio líquido e liofilizados. O extrato seco teve sua massa determinada, e foi então dividido em alíquotas e armazenado em

geladeira a uma temperatura de 4°C.

O extrato seco era ressuspensão em água ultra pura em uma concentração estoque de 1 mg/mL. Depois os extratos eram homogêneos no agitador e centrifugados por 5 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante era utilizado nos experimentos e essa solução era preparada diariamente.

#### 4.2.3- Ressonância Paramagnética Eletrônica

A ressonância paramagnética eletrônica (do inglês Electron Paramagnetic Resonance – EPR) foi desenvolvida por Zavoisky no ano de 1945. Diferente das outras técnicas, que serão apresentadas, a técnica de EPR detecta diretamente os radicais livres formados. Essa técnica mapeia a distribuição do elétron desemparelhado em uma molécula. Uma amostra com elétron(s) desemparelhado(s) ao ser submetida a um campo magnético externo interage com este provocando uma separação em dois níveis energéticos, um com menor energia (elétrons orientados a favor do campo magnético) e outro com maior energia (elétrons orientados contra o campo magnético). No aparelho, a amostra foi colocada em um ímã e irradiada com uma fonte de microondas que forneceu energia suficiente para a ressonância. Essa energia é igual à diferença de energia entre os dois níveis energéticos, sendo que a absorbância dessa energia foi medida, fornecendo um espectro de EPR característico do radical (Figura 7) (Augusto, 2006).

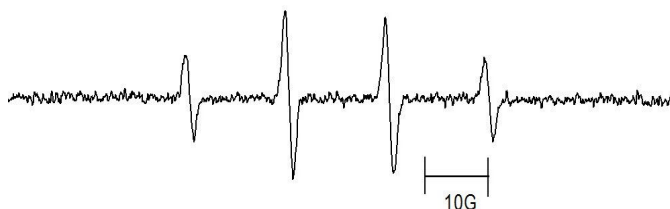
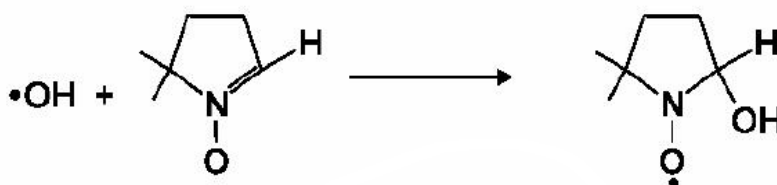


Figura 7: Espectro do aduto DMPO-OH

Um dos problemas encontrados para detectar o sinal do radical hidroxil, é que

sua estabilidade é de menos de  $1 \times 10^{-9}$  segundos. Por isso utilizamos um captador de spin (“spin trap”) o DMPO, que reage com o radical produzindo um radical aduto mais estável (radical 2-hidroxi-5,5-dimetil-1-pirrolidiniloxi) que se acumula e atinge concentrações detectáveis no aparelho de EPR (Figura 8) (Augusto, 2006).



**Figura 8:** Formação do Radical Aduto (DMPO- $\dot{\text{O}}\text{H}$ )  
Fonte: Gomes, 2005

A formação do radical hidroxil ocorreu na presença de reagentes de Fenton (Fe(II) e  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). O meio reacional era composto de tampão HEPES ( $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) pH 7,2, DMPO ( $20 \text{ mmol.L}^{-1}$ ), extrato (folha ou flor),  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Em seguida foi iniciada a reação com a adição de Fe (II). A leitura de cada espectro foi padronizada da seguinte forma: foi iniciada 3 minutos após o início da reação de Fenton, sendo que o espectro final corresponde a soma leitura de três “varreduras” (Hermes-Lima *et al.*, 1999).

As medidas de EPR foram realizadas em um espectrômetro *Bruker ESP 300* em colaboração com o Prof Antonio Alonso do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás (IF-UFG). Foi realizado em temperatura ambiente ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e nas seguintes condições de uso do equipamento: frequência das microondas de 9,81 GHz, modulação de frequência de 100 kHz, potência de 0,2 mW, amplitude da modulação de 1,011 G e ganho de  $1 \times 10^5$ .

Os valores dos sinais de EPR foram obtidos por meio da altura da primeira linha do sinal de ressonância do aduto DMPO- $\dot{\text{O}}\text{H}$ . Essa altura foi calculada em unidades arbitrárias com o auxílio dos programas Bruker WIN-45 EPR versão 2.11 e Origin 7.0. A

altura do ruído foi subtraída da altura da primeira linha do controle positivo e ensaio teste.

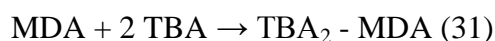
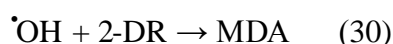
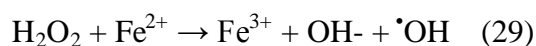
Para todos os testes de EPR, degradação oxidativa da 2-DR, peroxidação lipídica e degradação do DNA plasmidial, o controle positivo corresponde ao ensaio com adição de reagentes de Fenton na ausência de extrato, e o ensaio teste corresponde ao ensaio com adição de reagentes de Fenton na presença dos extratos.

A porcentagem da proteção dos extratos foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ proteção} = \left[ 1 - \frac{(\text{Ensaio teste})}{(\text{Controle positivo})} \right] \times 100$$

#### 4.2.4- Degradação da 2-desoxirribose (2-DR)

O método utilizado em todos os testes da degradação da 2-DR e de peroxidação lipídica foi criado por Halliwell & Gutteridge e se chama Método de TBARS (Método das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico). Nesse método, o Fe(II) reage com o peróxido de hidrogênio formando o radical hidroxil pela reação de Fenton (29). O radical hidroxil reage com a 2-DR produzindo malonaldeído (30). O MDA reage com 2 moléculas de ácido tiobarbitúrico produzindo um cromóforo (31) que pode ser quantitativamente detectado por espectrofotometria a 532 nm (Halliwell & Gutteridge, 1981).



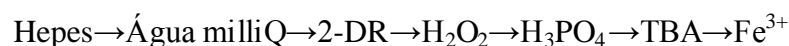
O meio reacional era composto de tampão Hepes (10 mmol.L<sup>-1</sup>) pH 7,2, extrato (folha ou flor) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μmol.L<sup>-1</sup>) com volume final de 0,5 mL. A reação foi iniciada com a adição de Fe(II) e o meio reacional foi incubado por um período de 10

minutos em temperatura ambiente ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) sendo então finalizada pela adição de 0,5 mL de ácido fosfórico 4% (v/v) seguido por 0,5 mL de TBA 1% (m/v). A mistura foi aquecida a  $98^\circ\text{C}$  em banho-maria por 15 min e após retornar a temperatura ambiente, foi feita a quantificação espectrofotométrica do aduto MDA-TBA<sub>2</sub> em 532nm no espectrofotômetro Hitachi U-2001 (Ginani, 2005).

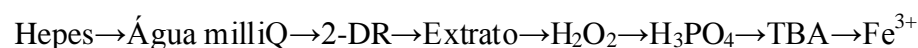
Neste experimento foram feitos dois brancos, o branco do controle positivo e o branco do ensaio teste (Esquema 3). Esse segundo branco foi feito com o intuito de evitar a interferência da coloração da solução dos extratos na leitura. Esses dois brancos foram feitos com a adição de Fe(III) após a adição de TBA. Sendo que a concentração de Fe(III) adicionada foi a mesma concentração de Fe(II) utilizada nos respectivos ensaios. Isso foi feito, pois descobriu-se recentemente que o Fe(III), formado após a oxidação do Fe(II) na reação de Fenton, está relacionado à degradação não radicalar da 2-DR durante o processo de fervura das amostras (Genaro-Mattos *et al.*, 2007). O Esquema 3 representa a ordem de adição dos reagentes nos brancos.

**Esquema 3:** Adição dos reagentes nos brancos no ensaio da degradação da 2-DR.

Branco do controle positivo:



Branco do ensaio teste:



Os resultados apresentados são médias de 6 ensaios realizados em duplicatas de 3 dias diferentes. Os valores de  $I_{50}$  (índice de inibição de 50% dos danos) foram calculados com o auxílio do software *Kinetics* para sistema operacional DOS.

A porcentagem de proteção dos extratos foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ proteção} = \left[ 1 - \frac{(\text{Ensaio teste} - \text{Branco do ensaio teste})}{(\text{Controle positivo} - \text{Branco do controle positivo})} \right] \times 100$$

#### 4.2.5- Peroxidação Lipídica

Neste experimento a peroxidação foi feita com um homogenato de fígado de rato. Os ratos do tipo Wistar foram obtidos no biotério do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília, eles foram levados ao laboratório e mantidos por 48 horas em gaiolas com água e ração padrão à vontade. O sacrifício foi feito por deslocamento cervical e o fígado foi coletado e congelado imediatamente em nitrogênio líquido. Depois de congelado, o fígado era partido em várias alíquotas em nitrogênio líquido, com o auxílio do gral e pistilo, e depois pesado e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

O fígado de rato foi macerado em homogeneizador de vidro, imerso em gelo com uma solução de tampão de homogenato, composto por tampão Hepes ( $100 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) e KCl ( $125 \text{ mmol.L}^{-1}$ ). Sendo que a relação tecido:tampão de homogenato foi de 1:5 (m/v). Depois o homogenato foi centrifugado ( $4.000 \text{ rpm}$  durante  $15 \text{ min}$ ) e o sobrenadante foi coletado para a realização do experimento.

O meio reacional, de volume total de  $0,2 \text{ mL}$ , era composto de tampão Hepes ( $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) pH 7,2, KCl ( $125 \text{ mmol.L}^{-1}$ ), BHT ( $100 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), extrato (folha ou flor), citrato ( $50 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $100 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e homogenato 5% (v/v). A reação foi iniciada com a adição de Fe(II) por um período (0 a 180 minutos ou 60 minutos) em temperatura ambiente ( $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) sendo então finalizada pela adição de  $0,10 \text{ mL}$  de ácido fosfórico 7% (v/v) seguido por  $0,20 \text{ mL}$  de TBA 1% (m/v). A mistura foi aquecida a  $98^{\circ}\text{C}$  em banho-maria por  $15 \text{ min}$ , depois foi adicionado  $0,50 \text{ mL}$  de água ultra pura, para preencher o volume da cubeta. Após retornar a temperatura ambiente,

foi feita a quantificação espectrofotométrica do aduto MDA-TBA<sub>2</sub> em 532 e 600 nm no espectrofotômetro Analítica serie 6 (Gondar, 2005; Hermes-Lima *et al.*, 1995).

Neste experimento foram feitos dois brancos, o branco do controle positivo e o branco do ensaio teste. Esses dois brancos foram feitos sem a adição de Fe(II). O Esquema 4 representa a ordem de adição dos reagentes nos brancos:

**Esquema 4:** Adição dos reagentes nos brancos no ensaio da peroxidação lipídica.

Branco do controle positivo:

Hepes → Água milliQ → KCl → Citrato de Na → H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → Homogenato  
H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> → TBA

Branco do ensaio teste:

Hepes → Água milliQ → KCl → BHT / Extrato → Citrato de  
Na → H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → Homogenato H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> → TBA

Com o objetivo de diminuir a interferência do homogenato, a absorbância em 600 nm foi subtraída da de 532 nm, e o controle foi subtraído do seu respectivo experimento (Hermes-Lima *et al.*, 1995). Os resultados apresentados são médias de 6 ensaios realizados em triplicata em dois dias diferentes. Os valores de I<sub>50</sub> (índice de inibição de 50% dos danos) foram calculados com o auxílio do software *Kinetics*.

A porcentagem de proteção dos extratos foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ proteção} = \left[ 1 - \frac{(\text{Ensaio teste} - \text{Branco do ensaio teste})}{(\text{Controle positivo} - \text{Branco do controle positivo})} \right] \times 100$$

#### 4.2.6- Degradação Oxidativa do DNA

Esta metodologia é baseada no ataque do radical hidroxil à molécula de DNA na sua forma super enovelada (“super-coiled”, do inglês), sendo produzidas, após o ataque, as formas circular-aberto (open-circular) e linear (Hermes-Lima *et al.*, 1998).

Foram utilizadas células de *Escherichia coli* que foram transformadas com plasmídeo pUC-18 e deixou-se por uma noite a cultura crescer em meio de cultivo. O DNA foi então purificado com o auxílio de um kit de Midi-Prep (Quiagen).

O meio reacional, de volume total de 0,30 mL, era composto de tampão Hepes (10 mmol.L<sup>-1</sup>) pH 7,2, extrato (folha ou flor), DNA (10 ng/μL) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (40 μmol.L<sup>-1</sup>). Em seguida foi iniciada a reação com a adição de Fe(II) por um período de 10 minutos em temperatura ambiente (25 ± 1°C). Depois disso, foi retirada uma alíquota de 20 μL sendo interrompida a reação com a adição de 2 μL de tampão de amostra de DNA (azul de bromofenol 0,25% (p/v), glicerol 50% (v/v), TEB 10X 50% (v/v) (TEB 10X - tris-base 0,89 mol.L<sup>-1</sup> M, ácido bórico 0,89 mol.L<sup>-1</sup> e EDTA 0,08 mol.L<sup>-1</sup>)) (Hermes Lima *et al.*, 1998, Avelar *et al.*, 2004).

O gel de agarose contendo 0,4g de agarose solubilizada em 50 mL de tampão TEB 1X e 1 μL de brometo de etídeo 10mg/mL, preparado foi colocado em uma cuba e imerso em TEB 1X sendo então aplicada a alíquota de 20 μL em cada poço. Depois a cuba foi fechada e submetida a uma corrente de 70 mA e diferença de potencial de 60 mV por um período de 50 minutos. O gel foi levado ao laboratório de Biologia Molecular da UnB onde foi visualizado e fotografado em um transluminador de UV (Andrade Jr, 2004; Azevedo *et al.*, 2003).

A quantificação dos diferentes estados de enovelamento DNA plasmidial foi determinada pela intensidade da luz emitida pelo brometo de etídeo. Com o auxílio do programa *PhotoCaptMw versão 10.01 para Windows*, esses valores foram convertidos



em percentual de DNAsc.

A porcentagem de proteção dos extratos foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ proteção} = \left[ \frac{1 - (\% \text{DNAsc}_{(\text{ensaio teste})} - \% \text{DNAsc}_{(\text{in natura})})}{(\% \text{DNAsc}_{(\text{controle positivo})} - \% \text{DNAsc}_{(\text{in natura})})} \right] \times 100$$

#### 4.2.7- Varredura Espectrofotométrica

Essa varredura foi feita com o objetivo de identificar possíveis complexos do extrato com o Fe(II) e Fe(III). Esse experimento foi feito no espectrofotômetro Hitachi U-2001, com cubetas de quartzo e varredura de 200 nm a 700nm, a uma velocidade de 1200 nm/min, com intervalo de impressão de 20 nm (Santos, 1998).

O aparelho foi zerado com água ultra-pura e a reação foi iniciada pela adição de Fe(II) ou Fe(III) (em diversas concentrações) em meio contendo tampão Hepes (10 mM) e extrato (0,20 mg/mL). A leitura foi feita 10 min após o início da reação. Foram feitos 3 experimentos, em dias diferentes e com soluções diferentes, para confirmar o resultado.

#### 4.2.8- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês High performance liquid chromatography –HPLC) foi utilizada com objetivo de separar as frações presentes nos extratos da capuchinha.

Nos processos de separação das frações dos extratos foi utilizado o equipamento de cromatografia, Shimadzu (SPD 10 AVP), com detector UV/visível, e os

comprimentos de ondas monitorados foram 220, 270 e 330 nm. Foram usadas uma pré-coluna e uma coluna semi-preparativa C<sub>18</sub> do tipo fase-reversa da Vydac modelo 218TP510. Ela consiste em grupos alifáticos octadecil ligados à superfície de partículas de sílica com 5µm e poros de 300Å de diâmetro. As dimensões da coluna eram de 250 mm de comprimento e 10mm de diâmetro interno.

Na fase móvel foram utilizadas soluções de água ultra pura com TFA 0,1% (v/v) e acetonitrila com TFA 0,1% (v/v). A cromatografia foi de fase reversa e com gradiente de 5% a 95% de acetonitrila, em um tempo total de 80 minutos e fluxo de 2,5 mL/min.

O extrato alcoólico seco era resuspendido em água ultra pura com TFA 0,1% (v/v), centrifugado e o sobrenadante era injetado no HPLC em alíquotas de 0,5 mL. As frações foram separadas pelos diferentes tempos de retenção e foram coletadas e imediatamente congeladas e liofilizadas para posterior análise.

#### **4.2.9- Teste da capacidade antioxidante das frações**

O objetivo deste teste foi identificar qual ou quais frações, dentre aquelas coletadas no experimento de cromatografia, são responsáveis pela atividade antioxidante atribuída aos extratos.

Para realizar esse teste todas as frações liofilizadas foram solubilizadas em um mesmo volume de água ultra pura, e foi testada a atividade antioxidante de cada fração, usando-se para isso o teste da degradação da 2-DR.

No meio reacional a concentração de cada fração correspondia a 1,75 mg/mL do extrato total.

#### **4.2.10- Análise estatística**

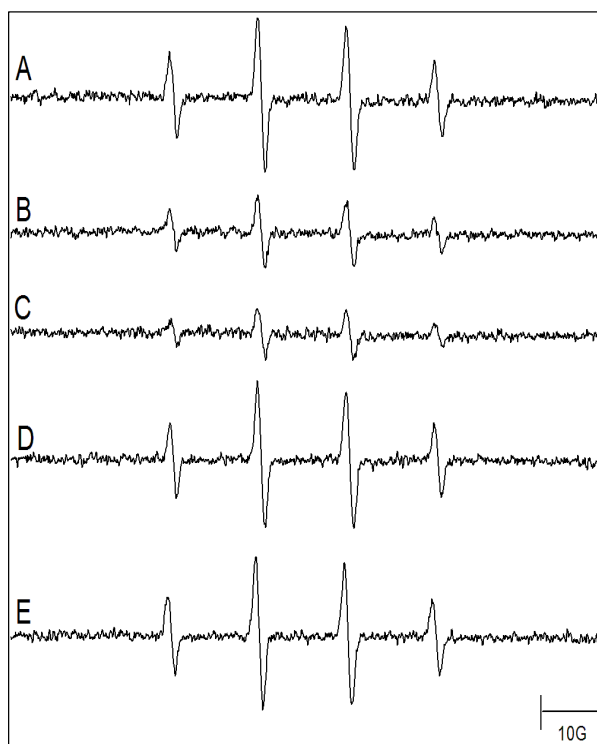
A análise estatística de todos os resultados foi feita pelo teste ANOVA/SNK. No qual foi analisada a diferença estatística entre os diferentes pontos. Nos gráficos foram marcados apenas os pontos mais representativos que não foram estatisticamente diferentes entre si.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1- Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

Com o objetivo de testar uma possível atividade antioxidante dos extratos foram realizados estudos de ressonância paramagnética eletrônica para observar o aparecimento de radicais hidroxil medindo a intensidade do aduto DMPO- $\dot{\text{O}}\text{H}$ . Nessa metodologia os extratos poderiam estar agindo de três formas: i) quelando o ferro(II) e indisponibilizando esse metal para formação de radical hidroxil, ii) sequestrando o radical hidroxil formado pela reação de Fenton e iii) decompondo o aduto radicalar DMPO- $\dot{\text{O}}\text{H}$ .

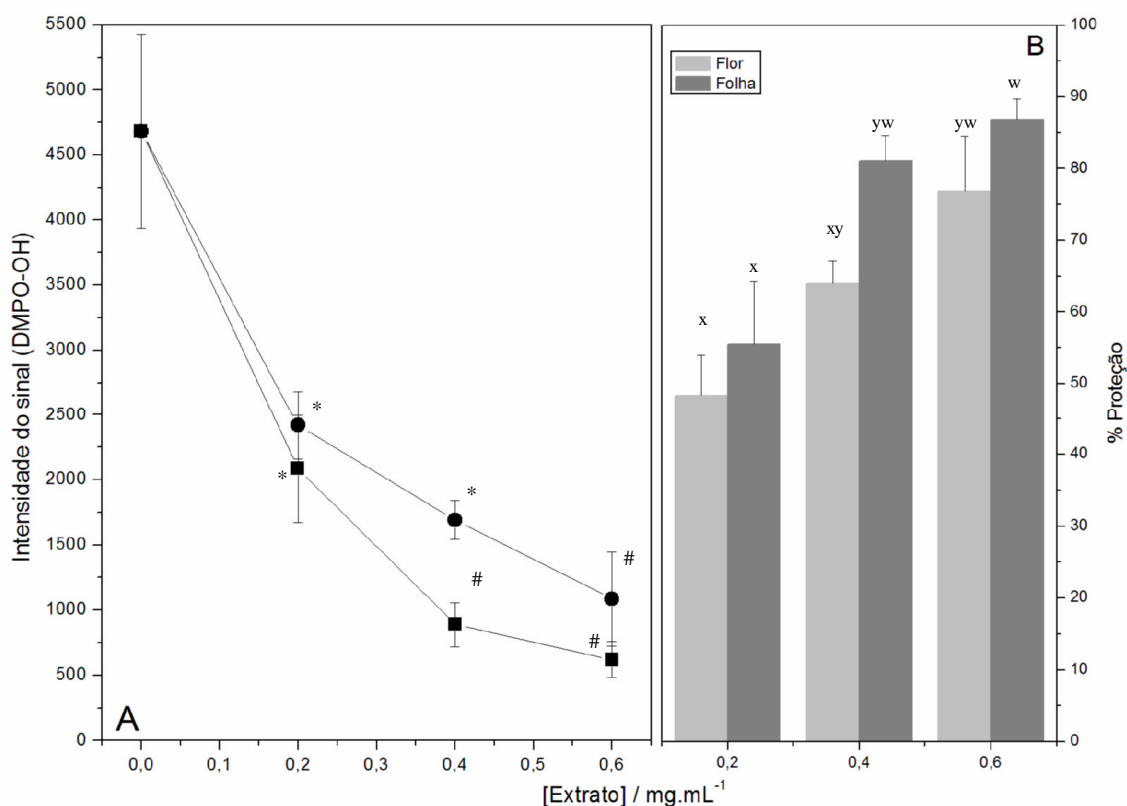
Na da Figura 9 observa-se no espectro (A) o sinal de EPR do aduto DMPO- $\dot{\text{O}}\text{H}$ , formado pela reação de Fenton contendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e  $\text{Fe}^{2+}$  ( $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) na ausência do extrato (controle positivo).



**Figura 9:** Espectro do aduto DMPO-OH produzido pela reação de Fenton. Condições Experimentais: Tampão Hepes  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ ; DMPO  $20 \text{ mmol.L}^{-1}$ ; Extrato das folhas ou flores  $0,400 \text{ mg/mL}$ ;  $\text{H}_2\text{O}_2$   $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ;  $\text{Fe}^{2+}$   $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . A- Fenton, B- Extrato da flor+Fenton, C- Extrato da folha+Fenton, D e E- Extrato da flor e da folha adicionado 10 segundos após os reagentes de fenton respectivamente.

No segundo e terceiro espectros (B e C) nota-se o sinal obtido a partir da reação de Fenton na presença dos extratos da flor e da folha, respectivamente. Observa-se que a presença dos extratos promove a redução da intensidade do sinal de DMPO- $\dot{\text{O}}\text{H}$ , indicando atividade antioxidante, porém, o mecanismo dessa atividade não é claro, podendo o extrato da capuchinha atuar de duas maneiras, como quelante de Fe(II) ou como sequestrador do radical hidroxil formado. Nos dois últimos espectros (D e E), os extratos foram adicionados 10 segundos após a adição do Fe(II), resultando em um sinal semelhante ao controle positivo (A). Isso demonstra que os extratos não catalisam a decomposição do aduto DMPO- $\dot{\text{O}}\text{H}$ , mas inibem sua formação.

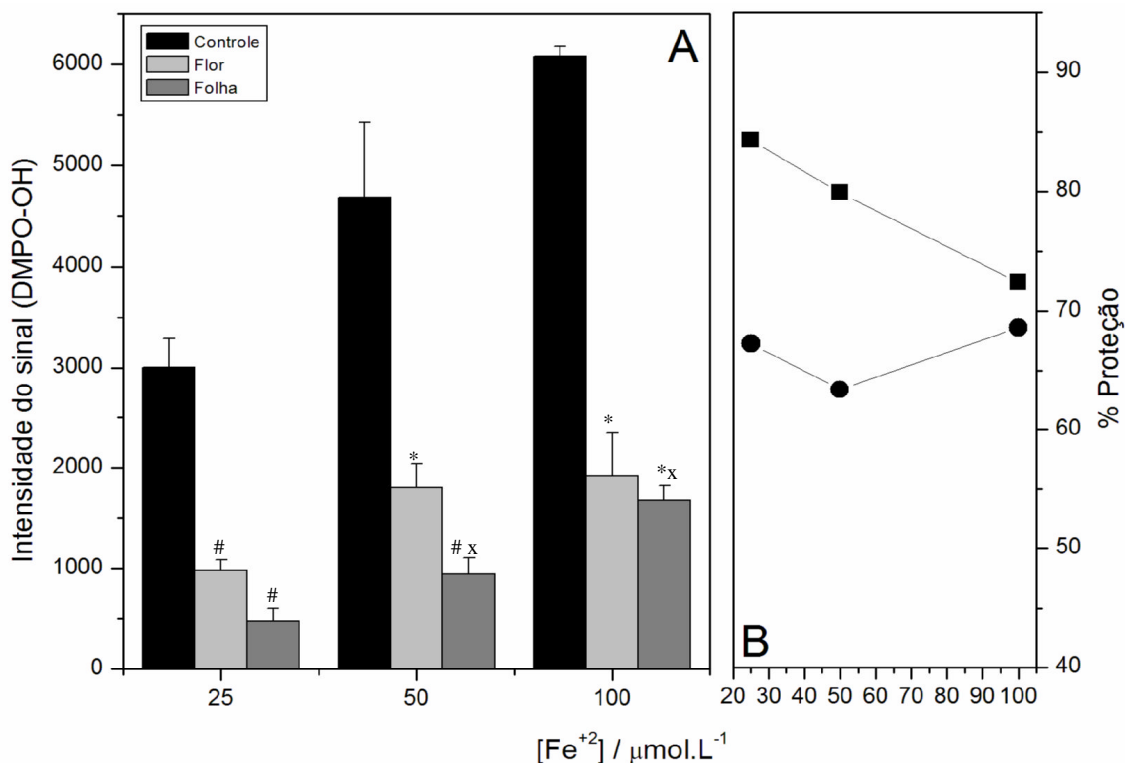
Na Figura 10 pode-se notar que a presença de concentrações crescente do extrato promove a redução gradual da intensidade do sinal. O  $I_{50}$  do extrato da folha foi de  $0,188 \pm 0,034$  mg/mL e da flor foi  $0,261 \pm 0,091$  mg/mL.



**Figura 10:** (A) Efeito da concentração dos extratos na intensidade do sinal DMPO-OH. (B) Porcentagem de inibição do sinal. (■) Extrato da folha (●) Extrato flor. Condições Experimentais: Tampão HEPES 10 mmol.L<sup>-1</sup>; DMPO 20 mmol.L<sup>-1</sup>; Extrato das folhas ou flores 0-0,600 mg/mL; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 μmol.L<sup>-1</sup>; Fe<sup>2+</sup> 50 μmol.L<sup>-1</sup>; Os valores acima representam média ± desvio padrão (n=3). Os pontos marcados com os mesmos símbolos não são significativamente diferentes entre si (p>0,05 ANOVA/SNK).

Cetkovic e colaboradores (2004) mostraram em seu estudo a atividade antioxidante do extrato de calêndula (cujas flores amarela e laranja são utilizadas em chás e cremes) por meio da técnica de EPR. Neste trabalho foi analisada a atividade do extrato aquoso de dois tipos de calêndula, a selvagem (*Calendula arvensis* L) e a cultivada (*Calendula officinalis* L). O estudo mostrou que em uma concentração de 0,45 mg/mL, a proteção do extrato da calêndula cultivada foi em torno de 90%, enquanto que a proteção da calêndula selvagem foi de aproximadamente 20% (Cetkovic *et al.*, 2004). Por outro lado, com concentrações de 0,40 mg/mL de extrato de capuchinha, as proteções foram 64% e 81% para flores e folhas, respectivamente.

Na Figura 11, nota-se que a intensidade do sinal de EPR é diretamente proporcional à concentração de ferro, ocorrendo uma pequena queda no percentual de proteção do extrato da folha e a manutenção deste percentual exercida pelo extrato da flor. Porém, não ocorreu a estabilização no sinal no controle positivo (ausência de antioxidantes) e por isso não foi possível dizer por qual mecanismo os extratos agiram, se foi quelando o metal ou seqüestrando o radical hidroxil. Acredita-se que com concentrações de Fe(II) maiores que  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$  o controle positivo poderia ter atingido o máximo de dano, porém não foi possível realizar devido à falta do reagente DMPO. Antioxidantes com comportamento quelante apresentam diminuição acentuada do percentual de proteção com o aumento da concentração de Fe(II). Exemplo disso é o quelante PIH (Piridoxal Isonicotinoil Hidrazona) cuja proteção antioxidante decaiu de 70% para 55% com o aumento da concentração do metal (Hermes-Lima *et al.*, 2000).



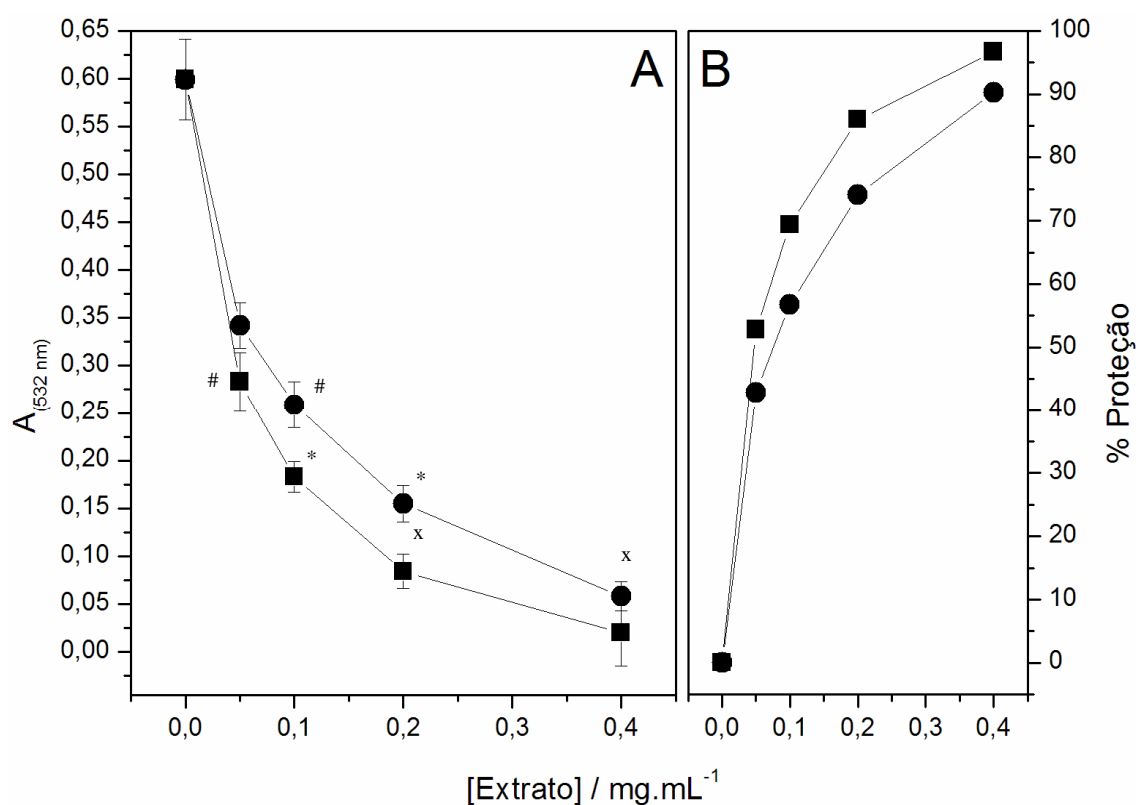
**Figura 11:** Efeito da concentração do Fe(II) no sinal DMPO-OH. (▲) Controle positivo (■) Extrato da folha (●) Extrato flor. Condições Experimentais: Tampão HEPES 10 mmol.L<sup>-1</sup>; DMPO 20 mmol.L<sup>-1</sup>; Extrato das folhas ou flores 0,400 mg/mL; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 μmol.L<sup>-1</sup>; Fe<sup>2+</sup> 0-100 μmol.L<sup>-1</sup>; Os valores acima representam média ± desvio padrão (n=3). Os valores acima representam média ± desvio padrão (n=3). Os pontos marcados com os mesmos símbolos não são significativamente diferentes entre si (p>0,05 ANOVA/SNK).

Após a confirmação da atividade antioxidante dos extratos, o próximo passo foi testar a capacidade desses extratos em proteger diversas biomoléculas do ataque radicalar e determinar o mecanismo desta atividade. Com essa finalidade foram feitos os ensaios da degradação oxidativa da 2-desoxirribose (2-DR), peroxidação lipídica e dano ao DNA.

## 5.2 - Degradação da 2-desoxirribose (2-DR)

Utilizando o método da degradação da 2-DR, foi realizado inicialmente um teste variando a concentração dos extratos. A partir desse ensaio foi possível calcular o valor de I<sub>50</sub>.

Observa-se na Figura 12 que o dano oxidativo à 2-DR é inversamente proporcional à concentração de ambos os extratos, ou seja, os extratos foram capazes de proteger a 2-DR contra o ataque radicalar de maneira dose-dependente. Entretanto a proteção conferida pelo extrato da folha foi maior que a do extrato da flor, sendo que o  $I_{50}$  da folha foi igual a  $0,041 \pm 0,022$  mg/mL e o da flor foi de  $0,072 \pm 0,011$  mg/mL. Porém, esse ensaio não deixa ainda claro se a proteção observada foi devido à atividade antioxidante do tipo quelante de Fe(II) ou pela capacidade dos componentes dos extratos em sequestrar radicais livres.



**Figura 12:** (A) Efeito da concentração dos extratos na degradação da 2-Desoxirribose. (B) Porcentagem de proteção da degradação da 2-Desoxirribose. (■) Extrato da folha (●) Extrato flor. Condições Experimentais: Tampão HEPES 10 mmol.L<sup>-1</sup>; 2-DR 5 mmol.L<sup>-1</sup>; Extrato das folhas ou flores 0-0,400 mg/mL; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 μmol.L<sup>-1</sup>; Fe<sup>2+</sup> 50 μmol.L<sup>-1</sup>; Fe<sup>3+</sup> 50 μmol.L<sup>-1</sup>. Os valores acima representam média ± desvio padrão (n=6). Os pontos marcados com os mesmos símbolos não são significativamente diferentes entre si (p>0,05 ANOVA/SNK).

É importante notar que a proteção resultante da ação do extrato da folha é igual à proteção conferida pelo extrato da flor quando em concentração duas vezes maior; é como se a folha tivesse o dobro da quantidade do(s) componente(s) responsáveis pela



proteção à 2-DR. Nota-se que o extrato da folha com concentração de 0,100 mg/mL atinge os mesmos percentuais de proteção que o extrato da flor só atinge com 0,200 mg/mL (Figura 12B), e esse fato acontece em todas as outras concentrações dos extratos. Isso pode ser observado também no ensaio de hidroxilação de DMPO (EPR).

Comparando com a literatura, foram encontrados alguns estudos que testam a atividade antioxidante de extratos de plantas em condições semelhantes às do presente trabalho. Um deles testa a atividade antioxidante do extrato hidro-etanólico das partes aéreas de *Achillea santolina L.* (família Compositae), uma planta que é usada tradicionalmente no Iraque devido a sua atividade anti-diabética e antiinflamatória (Ardestani & Yazdanparast, 2007). No estudo em questão, foi realizado o ensaio da degradação da 2-DR (2,8 mmol.L<sup>-1</sup>) com sistema gerador de radicais livres formado por Fe(III) (100 µmol.L<sup>-1</sup>), ascorbato (100 µmol.L<sup>-1</sup>) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µmol.L<sup>-1</sup>). O valor de I<sub>50</sub> foi igual a 0,519 mg/mL (vide Tabela 1), porém o extrato foi preparado a partir da planta seca (pó) diferentemente dos extratos da capuchinha. Nossos extratos foram obtidos a partir da planta fresca.

Outro trabalho testou a atividade antioxidante de sete espécies da família Lamiaceae, que são utilizadas na culinária como condimento e também na medicina pelas suas propriedades antioxidante, antiinflamatória, antiviral, antifúngica e antibacteriana. Este ensaio, da degradação da 2-DR (2,8 mmol.L<sup>-1</sup>), foi mediado por Fe(III) (100 µmol.L<sup>-1</sup>), ascorbato (100 µmol.L<sup>-1</sup>) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µmol.L<sup>-1</sup>). O I<sub>50</sub> dos extratos aquosos das partes aéreas das espécies tomilho preto (*Thymbra spicata L.*), satureja (*Satureja cuneifolia Ten.*), orégano espanhol (*Coridothymus capitatus L.*), manjerona (*Majorana hortensis Moench*), orégano sírio (*Origanum syriacum L.*), toka orégano (*Origanum minutiflorum O*) e orégano turco (*Origanum onites L.*) foram aproximadamente iguais a 0,27; 0,17; 0,21; 0,19; 0,20; 0,21 e 0,30 mg/mL,

respectivamente, valores estes bem maiores que os da capuchinha (Tabela 1) (Dorman *et al.*, 2004).

Dourado e colaboradores (2007) testaram a atividade antioxidante de frutos do cerrado contra o dano oxidativo da 2-DR ( $5 \text{ mmol.L}^{-1}$ ), mediado por Fe(II) ( $50 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $100 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). O problema para comparar os valores de  $I_{50}$  entre os estudos se deve à forma diferente de preparação dos extratos, pois na preparação de Dourado e colaboradores as polpas das frutas foram liofilizadas e o material seco foi então homogeneizado, procedimento diferente do adotado no estudo da capuchinha. Comparando os resultados obtidos no estudo citado com os da capuchinha observou-se que os valores de  $I_{50}$  dos extratos da capuchinha foram bem menores que as seguintes frutas: lobeira, jatobá, macaúba, ingá e cagaita. Os valores de  $I_{50}$  da amêndoa de baru crua e torrada foram, respectivamente  $0,073 \pm 0,003$  e  $0,093 \pm 0,004 \text{ mg/mL}$ , muito próximos dos valores de  $I_{50}$  do extrato da flor da capuchinha (Tabela 1).

**Tabela 1:** Valores  $I_{50}$  para diversos extratos no ensaio da 2-DR

Extratos	$I_{50}$ mg/mL	Extratos	$I_{50}$ mg/mL
Folha (Capuchinha)	0,041	Tomilho preto <sup>2</sup>	0,27
Flor (Capuchinha)	0,072	Tomilho preto <sup>2</sup>	0,30
Amêndoa de baru crua <sup>3</sup>	0,073	Jatobá <sup>3</sup>	0,42
Amêndoa de baru torrada <sup>3</sup>	0,093	Partes aéreas da <i>Achillea santolina</i> L. <sup>1</sup>	0,519
Satureja <sup>2</sup>	0,17	Macaúba <sup>3</sup>	0,58
Manjerona <sup>2</sup>	0,19	Lobeira <sup>3</sup>	1,46
Toka orégano <sup>2</sup>	0,20	Cagaita <sup>3</sup>	4,62
Orégano espanhol <sup>2</sup>	0,21	Ingá <sup>3</sup>	11,95
Orégano turco <sup>2</sup>	0,21		

1-Ardestani & Yazdanparast, 2007

2-Dorman *et al.*, 2004

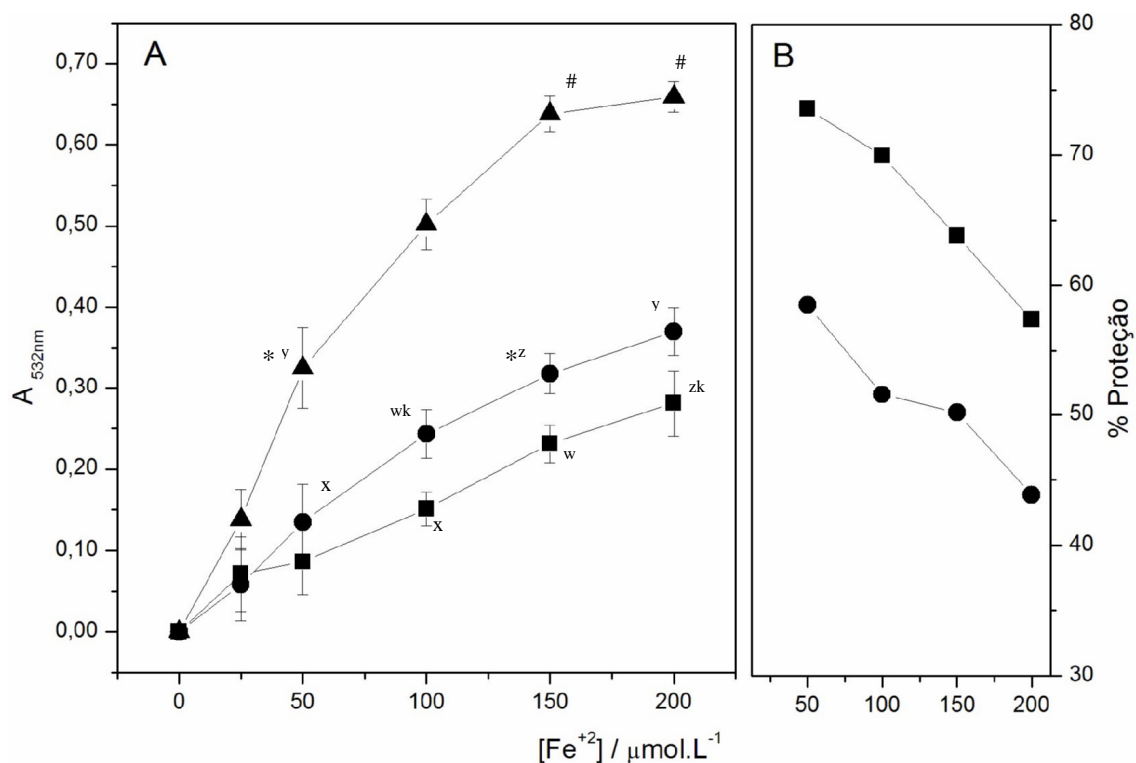
3-Dourado *et al.*, 2007

Comparando os valores de  $I_{50}$  apresentados na tabela 1 pode-se notar que os extratos da capuchinha apresentaram atividade antioxidante mais potente que os outros extratos mostrados na tabela, isso fica bem claro, pois os valores de  $I_{50}$  para os extratos da capuchinha foram menores quando comparados aos valores dos outros extratos.

O ensaio seguinte avaliou o efeito da concentração de Fe(II) no meio de reação sobre a atividade antioxidante dos extratos da capuchinha. Este ensaio é de suma

importância para o esclarecimento do mecanismo antioxidante dos extratos. Neste ensaio a concentração do extrato é mantida constante e varia-se a concentração do metal para então calcular-se o percentual de proteção. Os antioxidantes com propriedades quelantes apresentam, neste tipo de experimento, uma diminuição progressiva na proteção, a partir do ponto em que se chega ao limite estequiométrico entre o antioxidante e o metal (Ginani, 2005).

Na Figura 13, observa-se que mesmo aumentando a concentração de Fe(II) no meio reacional (até  $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) contendo os extratos da capuchinha, a capacidade antioxidante ainda está presente. Este fato pode ser observado principalmente no teste com o extrato da folha, pois este apresentou uma proteção maior que aquela conferida pelo extrato da flor em concentrações mais altas de Fe(II).



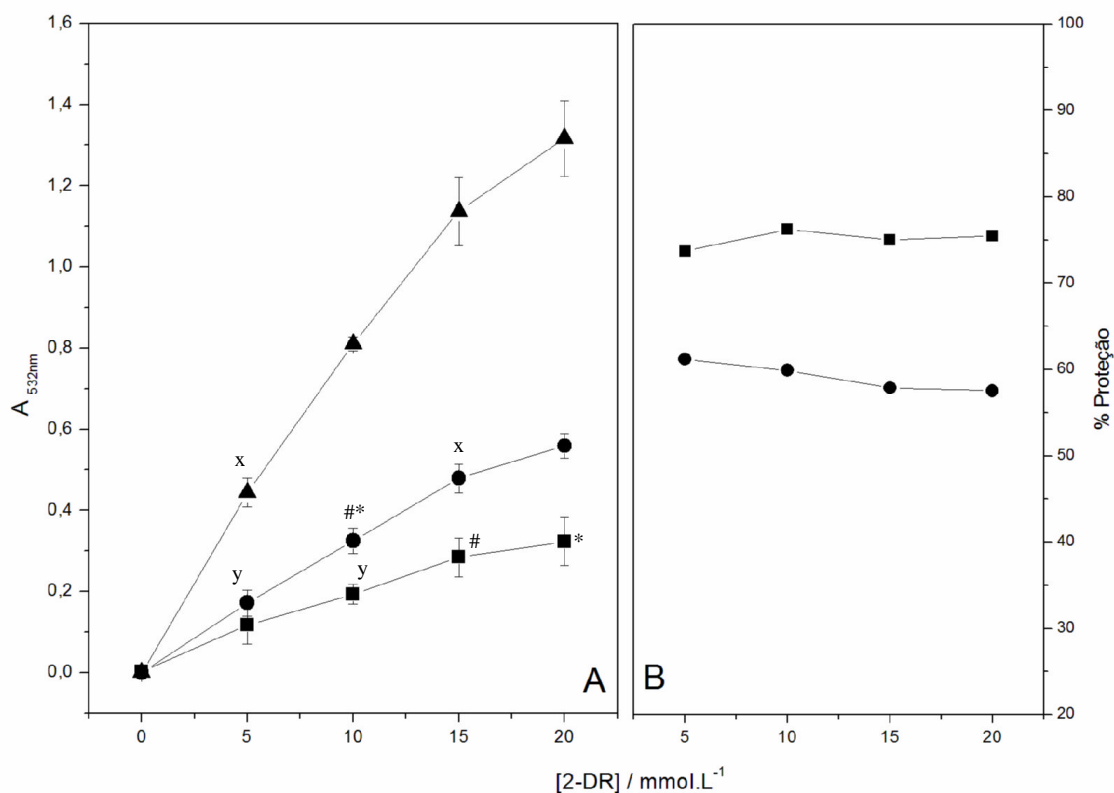
**Figura 13:** (A) Efeito da concentração Ferro II na degradação da 2-Desoxirribose. (B) Porcentagem de proteção da degradação da 2-Desoxirribose. (▲) Controle positivo, (■) Extrato da folha (●) Extrato flor. Condições Experimentais: Tampão Hepes  $10\text{mmol.L}^{-1}$ ; 2-DR  $5 \text{mmol.L}^{-1}$ ; Extrato das folhas ou flores  $0,200 \text{mg/mL}$ ;  $\text{H}_2\text{O}_2$   $100\mu\text{mol.L}^{-1}$ ;  $\text{Fe}^{2+}$   $0-200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ;  $\text{Fe}^{3+}$   $0-200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Os valores acima representam média  $\pm$  desvio padrão ( $n=6$ ). Os pontos marcados com os mesmos símbolos não são significativamente diferentes entre si ( $p>0,05$  ANOVA/SNK).

Porém, observa-se uma queda significativa na proteção quando a concentração de Fe(II) foi aumentada (Figura 13). Isso sugere que a atividade antioxidante dos extratos também é dependente da concentração do metal no meio, o que caracteriza uma atividade antioxidante com propriedade quelante. Esta dependência entre a proteção antioxidante e a concentração do metal já havia sido observada com a folha da capuchinha no ensaio de EPR (Figura 11).

Um quelante que apresenta perfil semelhante ao da capuchinha é o polifenol ácido tânico. Concentrações crescentes Fe(II) no meio reacional resultam em uma diminuição de 60% para 40% da ação antioxidante do ácido tânico (Andrade Jr *et al*, 2006). Esse resultado demonstra que o potencial antioxidante do ácido tânico é dependente da concentração do metal no meio e sugere que o ácido tânico diminuiu a geração da forma livre do radical hidroxil, formado via reação de Fenton (que atacaria a 2-DR).

É importante notar que ambos extratos da capuchinha possuem um perfil semelhante na proteção contra a oxidação da 2-DR, sendo que o extrato da folha apresenta proteção maior que a flor.

A atividade antioxidante dos extratos da capuchinha também foi analisada no ensaio com variação da 2-DR (Figura 14). Neste ensaio mantiveram-se as concentrações dos extratos e de Fe(II) constantes e variou-se a concentração da molécula alvo, a 2-DR. Espera-se que antioxidantes com comportamento quelante, não apresentem grandes variações no percentual de proteção, pois o quelante diminui a formação da forma livre do radical hidroxil (Andrade Jr. *et al.*, 2006). Antioxidantes com atividade seqüestradora de radicais livres apresentam redução da proteção quando se aumenta a concentração da molécula alvo. Pois neste caso, o antioxidante e a 2-DR (molécula alvo) competem na reação pelo o radical hidroxil (Andrade Jr. *et al.*, 2005).



**Figura 14:** (A) Efeito da concentração da 2-DR na degradação da 2-Desoxirribose. (B) Porcentagem de proteção da degradação de 2-DR. (▲) Controle positivo, (■) Extrato da folha (●) Extrato flor. Condições Experimentais: Tampão HEPES 10 mmol.L<sup>-1</sup>; 2-DR 0-20 mmol.L<sup>-1</sup>; Extrato das folhas ou flores 0,200 mg/mL; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 μmol.L<sup>-1</sup>; Fe<sup>2+</sup> 50 μmol.L<sup>-1</sup>; Fe<sup>3+</sup> 50 μmol.L<sup>-1</sup>. Os valores acima representam média ± desvio padrão (n=6). Os pontos marcados com os mesmos símbolos não são significativamente diferentes entre si (p>0,05 ANOVA/SNK).

O resultado apresentado na Figura 14 demonstra um aumento na degradação da 2-DR proporcional ao aumento da concentração deste açúcar no meio reacional. Porém, adição de 0,200 mg/mL dos extratos da flor ou da folha da capuchinha inibe de forma constante (em torno de 60% para o extrato da flor e 75% para o extrato da folha) o dano à 2-DR independentemente da concentração de 2-DR. O resultado mostra um nítido comportamento de um antioxidante do tipo quelante.

Um estudo desenvolvido em nosso laboratório avaliou a atividade antioxidante da polpa do caqui Rama Forte (*Diospyros kaki*). O percentual de proteção do extrato de caqui diminuiu de 57% para 35% quando se aumenta a concentração de 2-DR de 5 μmol.L<sup>-1</sup> para 20 μmol.L<sup>-1</sup>. Esse resultado sugere que os componentes presentes no

extrato do caqui age como seqüestradores de radicais livres e não com antioxidantes do tipo quelantes. (Dalvi, 2008).

### 5.3- Peroxidação Lipídica

Na peroxidação lipídica ocorre oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular, o que gera vários produtos. Dentre os quais se destaca o MDA que é usado como marcador do dano oxidativo (Hermes-Lima, 2004a).

Na Figura 15 se observa o curso temporal da peroxidação lipídica, com variação do tempo de 0 a 180 minutos, que corresponde ao período após a adição de Fe(II) no sistema que contém H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e homogenato de fígado de rato. Esse experimento permite visualizar e determinar em qual fase da peroxidação lipídica o antioxidante age.

Ao analisar o controle positivo (reagentes de Fenton, sem adição de extrato) da Figura 15 é possível visualizar as três fases da peroxidação lipídica. A fase de iniciação, conhecida como fase lag, é observada nos primeiros 10 minutos de reação. A fase de propagação, ou fase log, é observada no período de 10-40 minutos, na qual ocorre um aumento acentuado da produção de TBARS. Na fase de terminação ocorre a diminuição da velocidade de produção de TBARS e ocorre após os 40 minutos de reação.

O curso temporal foi realizado com um antioxidante clássico, o BHT. O BHT atua como um seqüestrador de radicais livres em membrana lipídica, ou seja, possui a atividade denominada de *chain breaking*. Uma molécula *chain breaking* atua doando um hidrogênio para o radical lipoperoxil (LOO<sup>•</sup>), que é responsável pela propagação da peroxidação), e formando o hidrolipoperóxido (LOOH), o que retarda o início da propagação do dano. Desta forma o início da fase de propagação só ocorre quando todo antioxidante com capacidade *chain breaking* for consumido (Hermes-Lima, 2004a). A

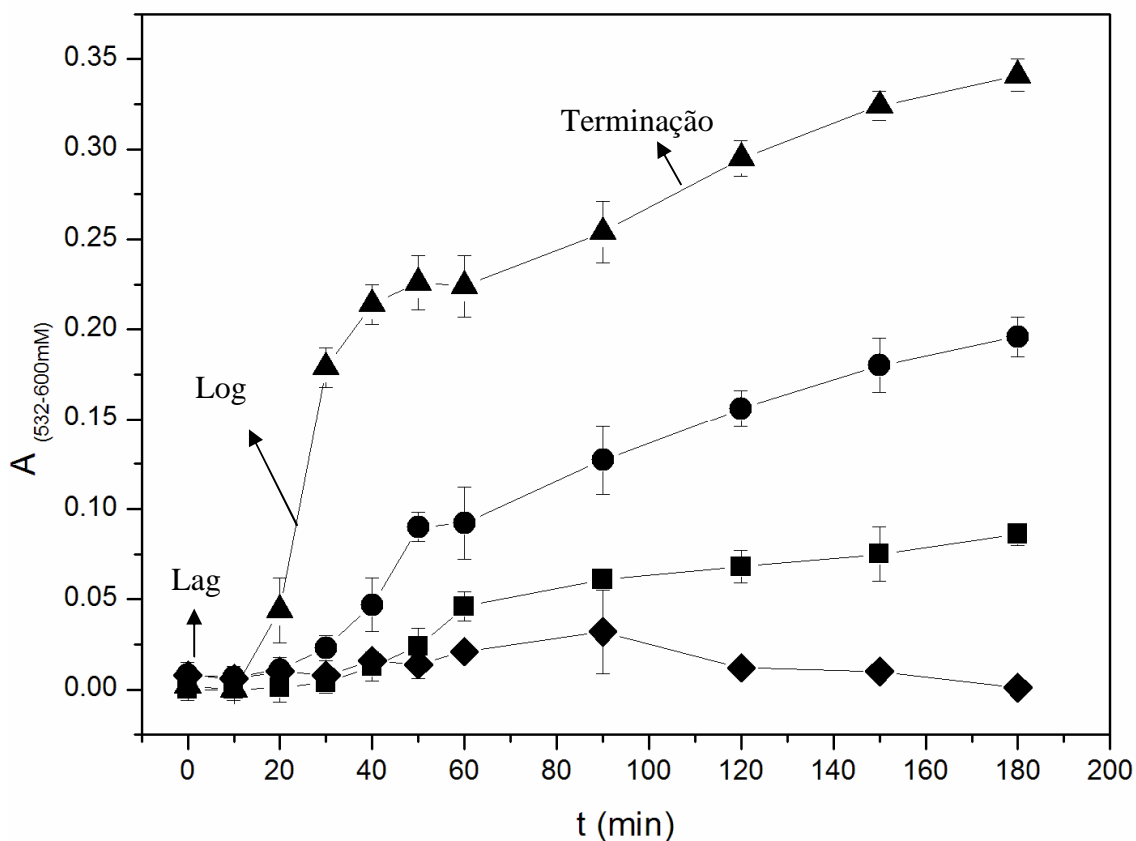
utilização do BHT nesse ensaio da peroxidação lipídica serve como controle do método, comprovando que o dano aos lipídios do homogenato é resultante do ataque de radicais livres.

Os resultados mostrados na Figura 15 sugerem que a inibição da peroxidação atribuída aos extratos resulta de uma atividade do tipo quelante e também sequestradora de radicais livres. A atividade sequestradora pode ser explicada pela expansão na fase lag, atrasando o início da fase de propagação da peroxidação (vide **Nota de rodapé 1**). A atividade quelante pode ser observada em ambos os extratos pela diminuição da velocidade de reação da fase log. Sabe-se que o Fe(II) possui papel relevante na fase de propagação (vide pág 12 da revisão bibliográfica). A formação de um complexo com esse metal pode levar à diminuição da velocidade de reação do metal com o hidroperóxido (LOOH) e, conseqüentemente a menor produção de radical alcóxil (LO<sup>•</sup>) e peróxil (LOO<sup>•</sup>).

---

#### **Nota de rodapé 1**

A velocidade da peroxidação lipídica em homogenato de fígado de rato observada na fase log do controle positivo foi  $5,5 \times 10^{-3}$  Abs/min, a do extrato da flor foi  $1,8 \times 10^{-3}$  Abs/min e do extrato da folha foi de  $0,7 \times 10^{-3}$  Abs/min. Os extratos da flor e da folha da capuchinha diminuíram a velocidade da fase log do controle positivo em 67% e 87%, respectivamente.

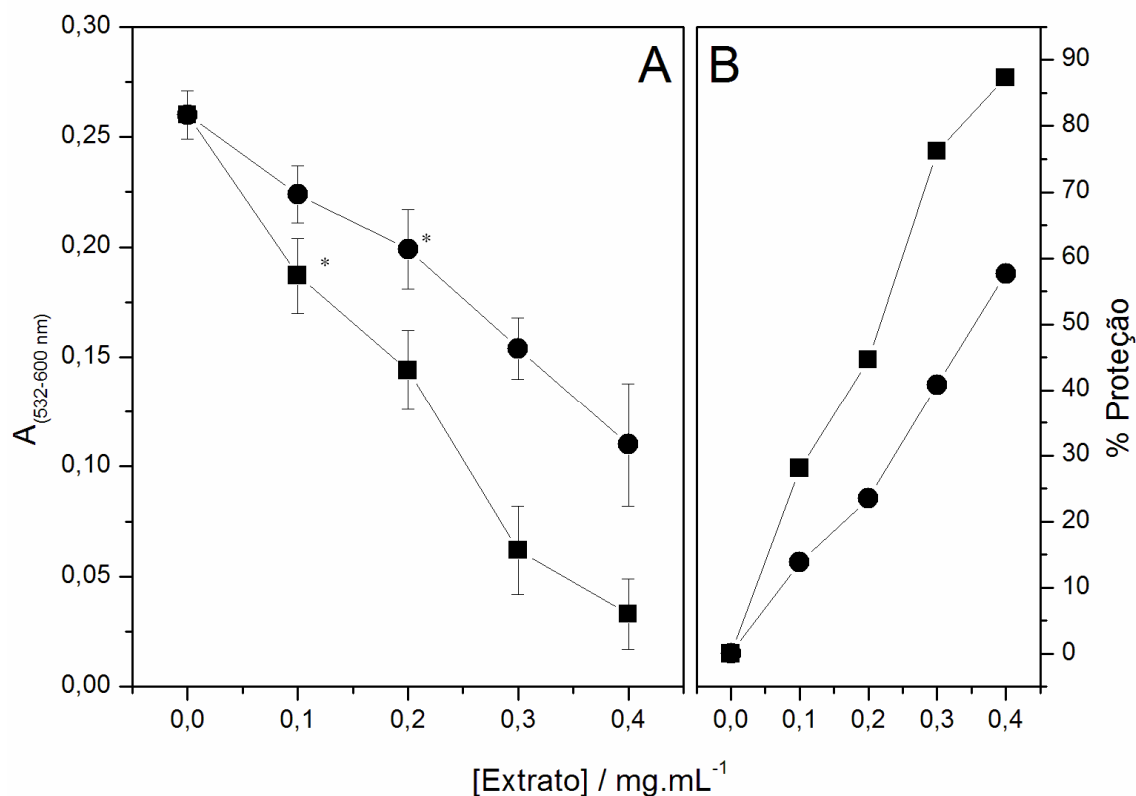


**Figura 15:** Efeito do tempo de incubação na peroxidação lipídica. (▲) Controle positivo, (■) Extrato da folha (●) Extrato flor (◆) BHT. Condições Experimentais: Tampão Hepes 10 mmol.L<sup>-1</sup> Homogenato 5%(v/v); Extrato das folhas ou das flores 0,300 mg/mL; BHT 100 μmol.L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 μmol.L<sup>-1</sup>, Fe<sup>2+</sup> 50 μmol.L<sup>-1</sup>; KCl 125 mmol.L<sup>-1</sup>; Citrato de Sódio 50 μmol.L<sup>-1</sup>. Os valores acima representam média ± desvio padrão (n=6).

No teste ilustrado pela Figura 16, com período fixo de 60 minutos, variou-se a concentração dos extratos com o objetivo de calcular os valores de I<sub>50</sub>. A concentração necessária para inibir em 50% da peroxidação lipídica foi igual a 0,320±0,061 e 0,159±0,044 mg/mL, respectivamente, para os extratos de flores e folhas da capuchinha. Da mesma forma que foi observada na Figura 15 o ensaio da variação da concentração dos extratos da capuchinha indica que a folha apresenta potencial antioxidante maior que o extrato da flor. Os valores de I<sub>50</sub> na peroxidação lipídica foram substancialmente maiores que os valores encontrados no dano a 2-DR para os dois extratos (vide Tabela 1). Isso pode ter ocorrido em função do extrato seco ter sido ressuspensão em água, assim, os compostos polares solubilizados em meio aquoso têm capacidade maior de proteger em um meio totalmente aquoso, como o ensaio da 2-DR, do que em meio reacional com porções



apolares, sistema usado no ensaio da peroxidação lipídica em homogenato de fígado de rato.



**Figura 16:** (A) Efeito da concentração dos extratos na peroxidação lipídica. (B) Porcentagem de proteção peroxidação lipídica. (■) Extrato da folha (●) Extrato flor. Condições Experimentais: Tampão HEPES 10 mmol.L<sup>-1</sup>; Homogenato 5%(v/v); Extrato das folhas ou flores 0,050 to 0,400 mg/mL; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 μmol.L<sup>-1</sup>; Fe<sup>2+</sup> 50 μmol.L<sup>-1</sup>; KCl 125 mmol.L<sup>-1</sup>; Citrato de Sódio 50 μmol.L<sup>-1</sup>. Os valores acima representam média ± desvio padrão (n=6). Os pontos marcados com os mesmos símbolos não são significativamente diferentes entre si (p>0,05 ANOVA/SNK).

A atividade antioxidante das partes aéreas da *Achillea santolina* L. (família Compositae) também foi estudada pelo ensaio da peroxidação lipídica. Neste trabalho o extrato foi preparado de maneira muito semelhante daquela usada com os extratos da capuchinha, pois a extração foi em etanol 70% e posteriormente o extrato foi liofilizado e ressuspenso em água. O valor de I<sub>50</sub> encontrado para *Achillea santolina* L ficou em torno de 0,5 mg/mL, valor superior aos encontrados para os extratos da capuchinha (vide Tabela 2) (Ardestani & Yazdanparast, 2007). Ou seja, os extratos da capuchinha apresentam atividade antioxidante mais potente que os extratos da *Achillea santolina* L.

O ensaio da peroxidação lipídica também foi utilizado para testar a ação

antioxidante da hortelã peluda (*Mentha spicata* L.), cujas folhas são usadas na culinária indiana. Neste trabalho o extrato foi preparado a partir das folhas secas e a extração foi realizada com butanol e metanol, que são solventes menos polares do que a água. Em seguida o extrato foi seco em evaporador rotatório e ressuspenso em água. No ensaio da peroxidação lipídica, com uma concentração de extrato de 0,250 e 0,500 mg/mL a proteção atingida foi de 42,5% e 63%, respectivamente (Kumar & Chanttopadhyay, 2007). Quando comparamos esse resultado da hortelã peluda com as proteções dos extratos da capuchinha, notamos que o extrato da folha da hortelã teve capacidade antioxidante menor que o extrato da folha da capuchinha.

**Tabela 2:** Valores  $I_{50}$  para diversos extratos no ensaio da peroxidação lipídica

Extratos	$I_{50}$ mg/mL
Flor da castanheira ( <i>Castanea sativa</i> ) <sup>4</sup>	0,009
Folha da castanheira ( <i>Castanea sativa</i> ) <sup>4</sup>	0,031
Calendula selvagem ( <i>Calendula arvensis</i> L) <sup>3</sup>	0,075
Folha (Capuchinha)	0,159
Calêndula cultivada ( <i>Calendula officinalis</i> L) <sup>3</sup>	0,15 > $I_{50}$ < 0,30
Flor (Capuchinha)	0,320
Folhas da hortelã peluda ( <i>Mentha spicata</i> L) <sup>2</sup>	0,250 > $I_{50}$ < 0,500
Partes aéreas da <i>Achillea santolina</i> L. <sup>1</sup>	0,5

1- Ardestani & Yazdanparast, 2007

2- Kumar & Chanttopadhyay, 2007

3- Cetkovic *et al.*, 2008

4- Barreira *et al.*, 2008

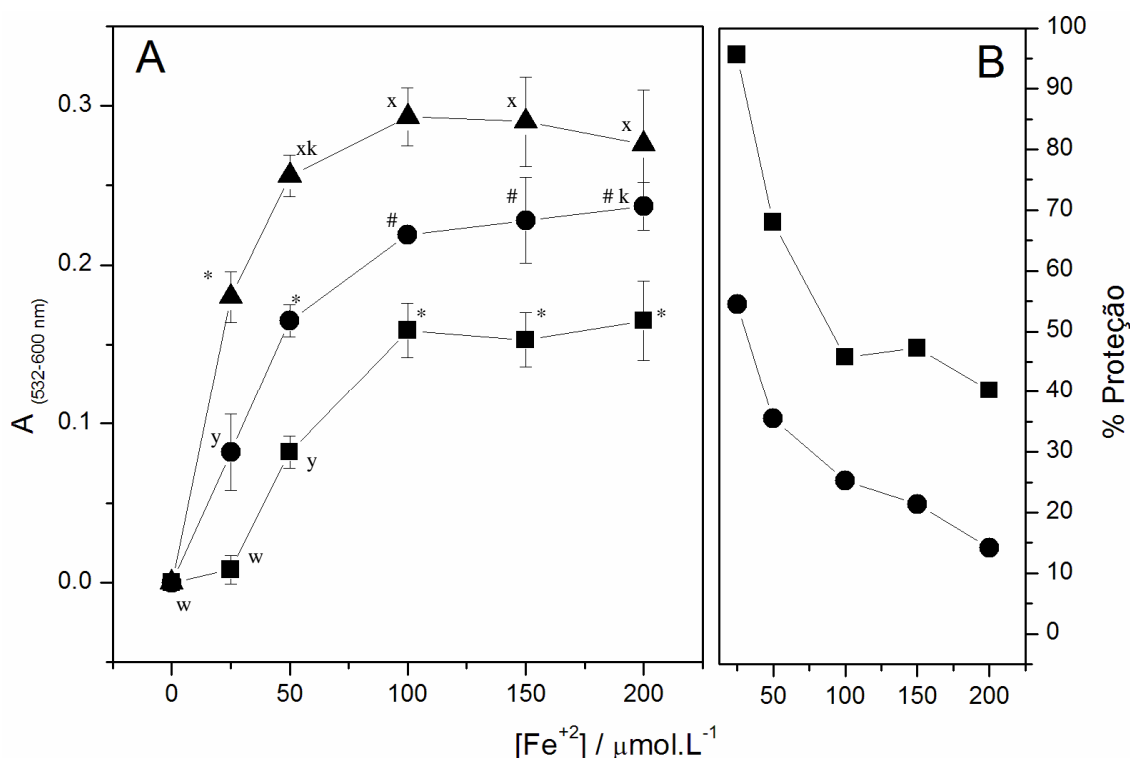
Observando a tabela 2, observa-se que diferente do ensaio da degradação da 2-DR, na peroxidação lipídica os valores de  $I_{50}$  dos extratos da capuchinha foram maiores que valores apresentados para outros extratos, isso indica que a capacidade dos extratos da flor e da folha em proteger o dano aos lipídios foi menor que capacidade antioxidante conferida por outros extratos relatados pela literatura.

O último ensaio utilizando a metodologia de peroxidação lipídica foi o da variação da concentração de Fe(II) em 60 minutos de reação (Figura 17). Neste experimento nota-se novamente uma queda significativa na proteção conferida pelos extratos da capuchinha,

à medida que se aumenta a concentração de Fe(II) no meio, o que sugere novamente uma propriedade quelante.

Analisando o controle positivo nota-se que a partir de  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de Fe(II) ocorre a estabilização dos danos lipídicos. Enquanto nos ensaios com o extrato da flor ou da folha a estabilização só ocorre a partir de  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de Fe(II), ou seja, há a necessidade de se dobrar a concentração de ferro para que seja atingido o dano máximo quando os extratos da capuchinha estão presentes no meio.

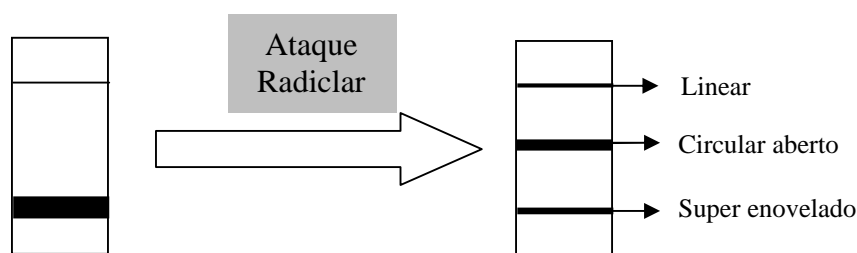
Pode-se observar na Figura 17 que a proteção atribuída ao extrato da folha novamente é maior que a proteção do extrato da flor, sendo que ambos os extratos mantêm perfil semelhante de queda do percentual de proteção com o aumento da concentração de Fe(II).



**Figura 17:** (A) Efeito da concentração Fe(II) na peroxidação lipídica. (B) Porcentagem de proteção da peroxidação lipídica. (▲) Controle positivo, (■) Extrato da folha (●) Extrato flor. Condições Experimentais: Tampão HEPES  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ ; Homogenato 5%(v/v); Extrato das folhas ou flores  $0.300 \text{ mg/mL}$ ;  $\text{H}_2\text{O}_2$   $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ;  $\text{Fe}^{2+}$   $0\text{-}200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ;  $\text{KCl}$   $125 \text{ mmol.L}^{-1}$ ; Citrato de Sódio  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Os valores acima representam média  $\pm$  desvio padrão ( $n=6$ ). Os pontos marcados com os mesmos símbolos não são significativamente diferentes entre si ( $p>0,05$  ANOVA/SNK).

## 5.4- Degradação Oxidativa do DNA

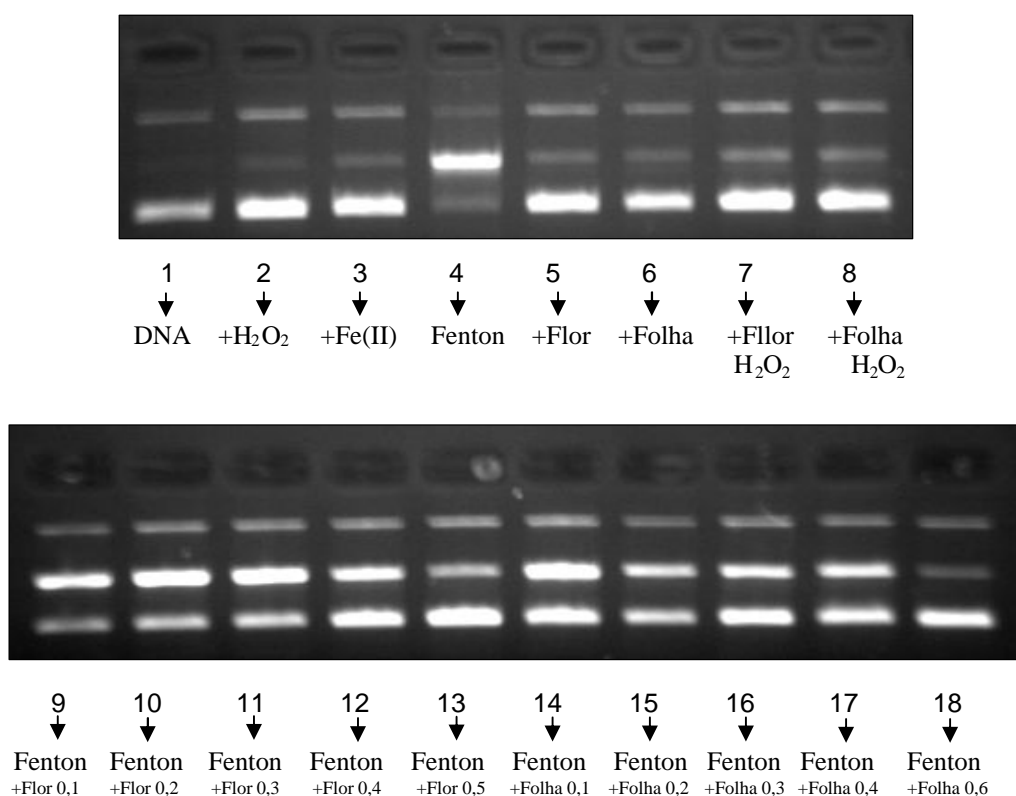
Neste ensaio foi testada a capacidade dos extratos em proteger o DNA plasmidial contra os danos oxidativos mediados por Fe(II) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O gel com DNA plasmidial que não sofreu o ataque radicalar apresenta duas bandas distintas, a superior que está na forma linear e a banda inferior que é o DNA super enovelado (DNAsc). Este DNA in natura apresenta 80% sob a forma super enovelada (poço 1 das Figuras 18 e 19). O ataque radicalar faz com que a forma super enovelada seja convertida em circular-aberta (banda do meio) e linear (Esquema 5). Esse fenômeno é usado como indicador de danos oxidativo ao DNA plasmidial (Hermes-Lima *et al*, 1998).



**Esquema 5:** Bandas do DNA plasmidial após o ataque radicalar.

A Figura 18 representa a foto do gel de agarose contendo 18 poços, cada poço referente a uma condição experimental específica. O primeiro poço corresponde ao controle negativo, contendo DNA com tampão. Os poços 2, 3, 5, 6, 7 e 8 são controles que foram realizados com várias combinações dos reagentes. Esses controles foram realizados com o intuito de verificar se a presença de Fe(II), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e extrato, isoladamente, ou a combinação peróxido e extrato poderia ou não causar qualquer efeito sobre a integridade do DNAsc. Observa-se que as porcentagens do DNAsc desses controles não foram estatisticamente diferentes do controle negativo, ou seja, a adição

de Fe(II), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e extrato, isolados, ou adição de peróxido e extrato não tiveram qualquer efeito sobre o DNAsc. Nos poços restantes realizou-se o ensaio com reagentes de Fenton na presença de diferentes concentrações de extratos.

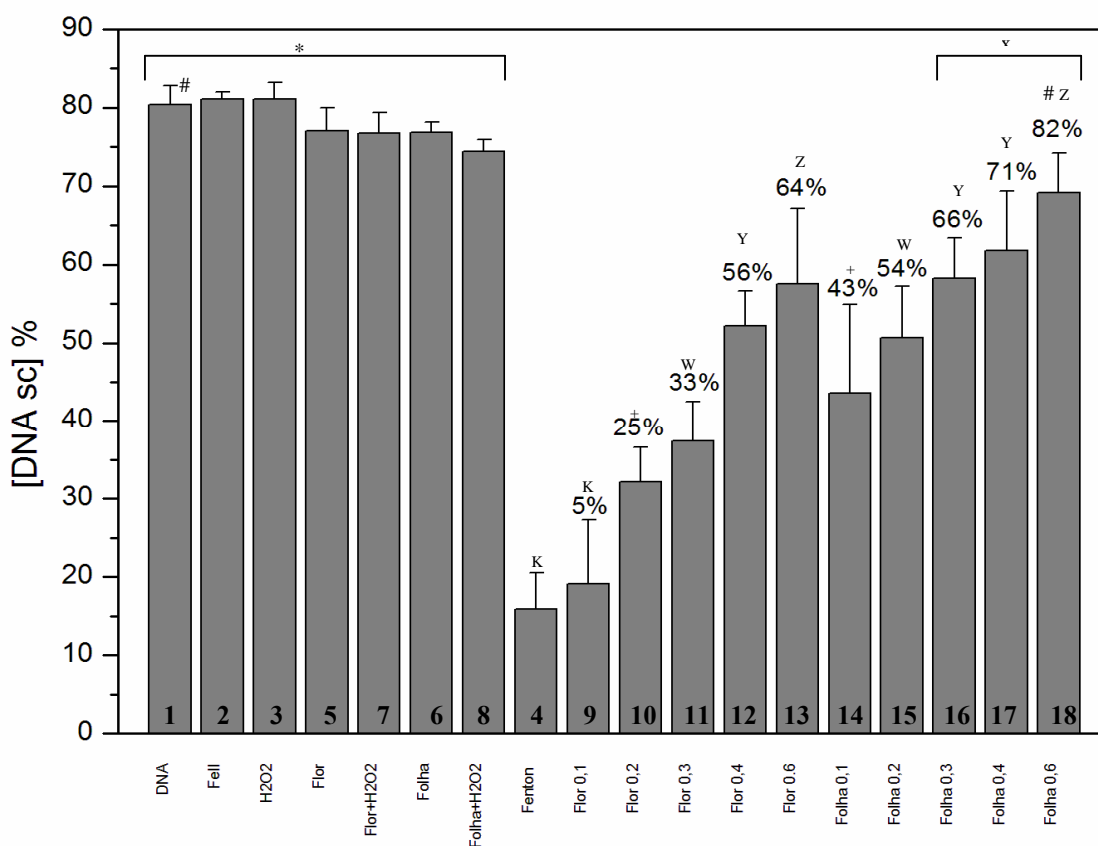


**Figura 18:** Gel de agarose de pUC 18 DNA mostrando as bandas super-enovelado(SC), circular aberto (OC) e linear (L). Condições Experimentais: Tampão Hepes 13 mmol.L<sup>-1</sup>; DNA 10 µg/µL; Extrato das flores ou das folhas 0 to 0,60 mg/mL; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40µmol.L<sup>-1</sup>; Fe<sup>2+</sup> 20 µmol.L<sup>-1</sup>. Representação dos poços colunas contendo DNA em meio tamponado com: (1) apenas Hepes, (2) +H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (3) +FeII, (4) + Reagentes de Fenton (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e FeII), (5) +Flor 0,6 mg/mL, (6) +Folha (0,6 mg/mL), (7) +Flor (0,6 mg/mL)+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (8) +Folha (0,6 mg/mL)+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (9) Fenton+Flor (0,1 mg/mL), (10) + Reagentes de Fenton+Flor (0,2 mg/mL), (11) + Reagentes de Fenton+Flor (0,3 mg/mL), (12) + Reagentes de Fenton+Flor (0,4 mg/mL), (13) + Reagentes de Fenton+Flor (0,6 mg/mL), (14) + Reagentes de Fenton+Folha (0,1 mg/mL), (15) + Reagentes de Fenton+Folha (0,2 mg/mL), (16) + Reagentes de Fenton+Folha (0,3 mg/mL), (17) + Reagentes de Fenton+Folha 0,4 mg/mL, (18) + Reagentes de Fenton+Folha (0,6 mg/mL).

Na Figura 18 nota-se que quanto maior a concentração dos extratos menor é a intensidade emitida pela banda do meio (DNA circular aberto) e maior é intensidade emitida pela banda inferior (DNAsc). Isso demonstra que a presença dos extratos evitou a degradação do DNAsc.

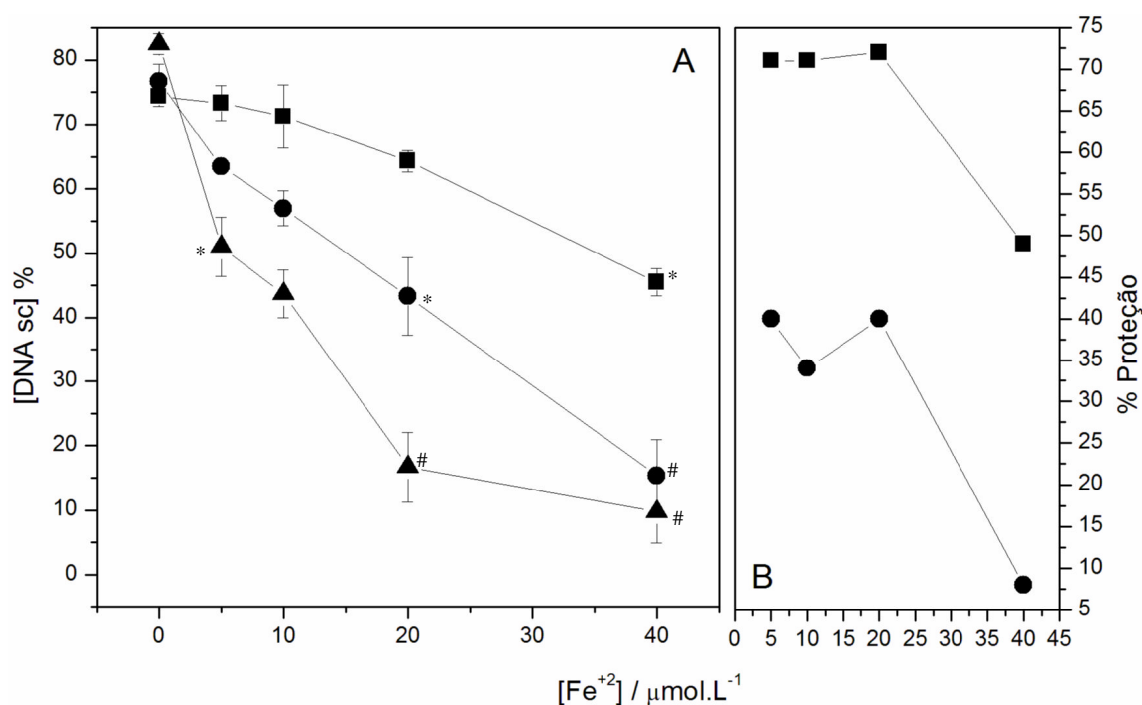
A Figura 19 ilustra o efeito da concentração dos extratos em relação à porcentagem de DNAsc. Pela figura pode-se perceber que os valores de  $I_{50}$  foram aproximadamente 0,20 e 0,40 mg/mL, respectivamente para os extratos da folha e flor.

A ação antioxidante do extrato aquoso das folhas de *Eucommia ulmoides* Oliv, planta usada em chás no Japão, foi testada no ensaio da degradação oxidativa de DNA plasmidial. Esse dano foi mediado também pela reação de Fenton e o resultado demonstra que 10 mg/mL deste extrato causa aproximadamente 50% de proteção (Hsieh & Yen, 2000). A atividade protetora da *Eucommia ulmoides* Oliv foi menor quando comparada aos extratos da capuchinha.



**Figura 19:** Efeito da concentração dos extratos no dano oxidativo da pUC18. Condições Experimentais: Tampão HEPES  $13 \text{ mmol.L}^{-1}$ ; DNA  $10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; Extrato das flores ou das folhas 0 - 0,600 mg/mL;  $\text{H}_2\text{O}_2$   $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ;  $\text{Fe}^{2+}$   $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Os valores acima de cada barra representam os percentuais de proteção e os números na base da barras representam o número do poço apresentado na figura 18. Os valores acima representam média  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ). Os pontos marcados com os mesmos símbolos não são significativamente diferentes entre si ( $p>0,05$  ANOVA/SNK).

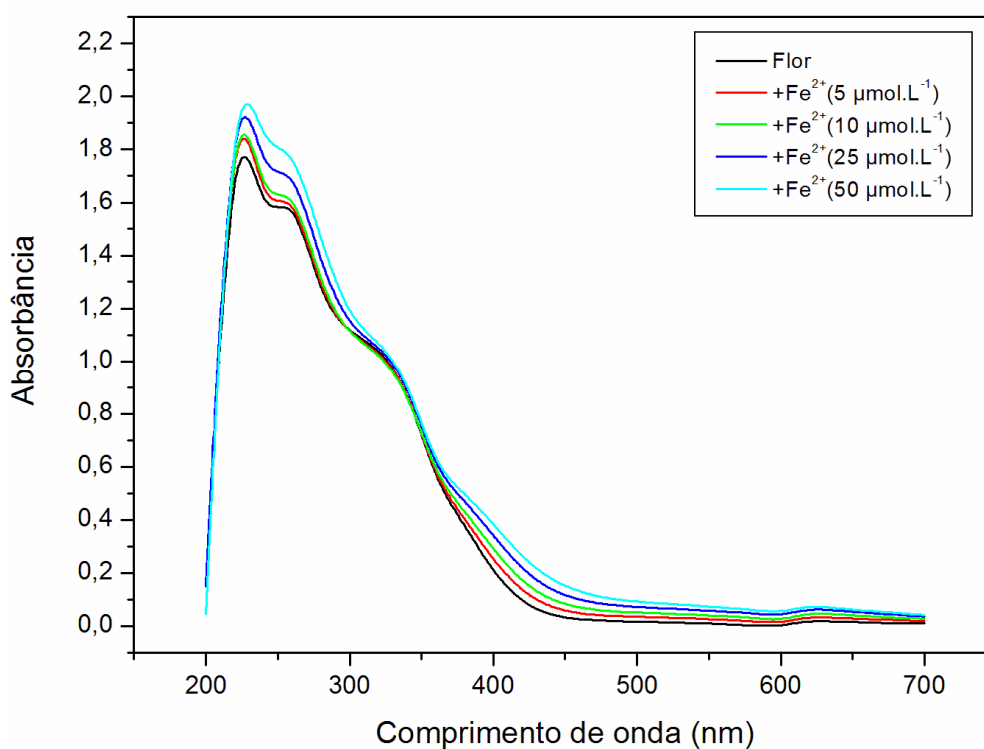
Na Figura 20 observa-se o efeito da variação da concentração do Fe(II) sobre o dano oxidativo ao DNA plasmidial. Nota-se que ambos os extratos mantêm o nível de proteção constante até a concentração do metal atingir  $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Quando a concentração do metal ultrapassa esse limite ocorre a queda acentuada na ação antioxidante dos extratos. Novamente o percentual de proteção dos extratos demonstrou uma relação de dependência com a concentração de Fe(II). Este resultado permite inferir que os extratos contêm compostos com atividade antioxidante do tipo quelante.



**Figura 20:** (A) Efeito da concentração Ferro II no dano oxidativo da pUC18. (B) Porcentagem de proteção do dano oxidativo da pUC18. (▲) Controle positivo, (■) Extrato da folha (●) Extrato flor. Condições Experimentais: Tampão Hepes  $13 \text{ mmol.L}^{-1}$ ; DNA  $10 \text{ mg/mL}$ ; Extrato das flores ou das folhas  $0.300 \text{ mg/mL}$ ;  $\text{H}_2\text{O}_2$   $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ;  $\text{Fe}^{2+}$   $0-40 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Os valores acima representam média  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ). Os pontos marcados com os mesmos símbolos não são significativamente diferentes entre si ( $p>0,05$  ANOVA/SNK).

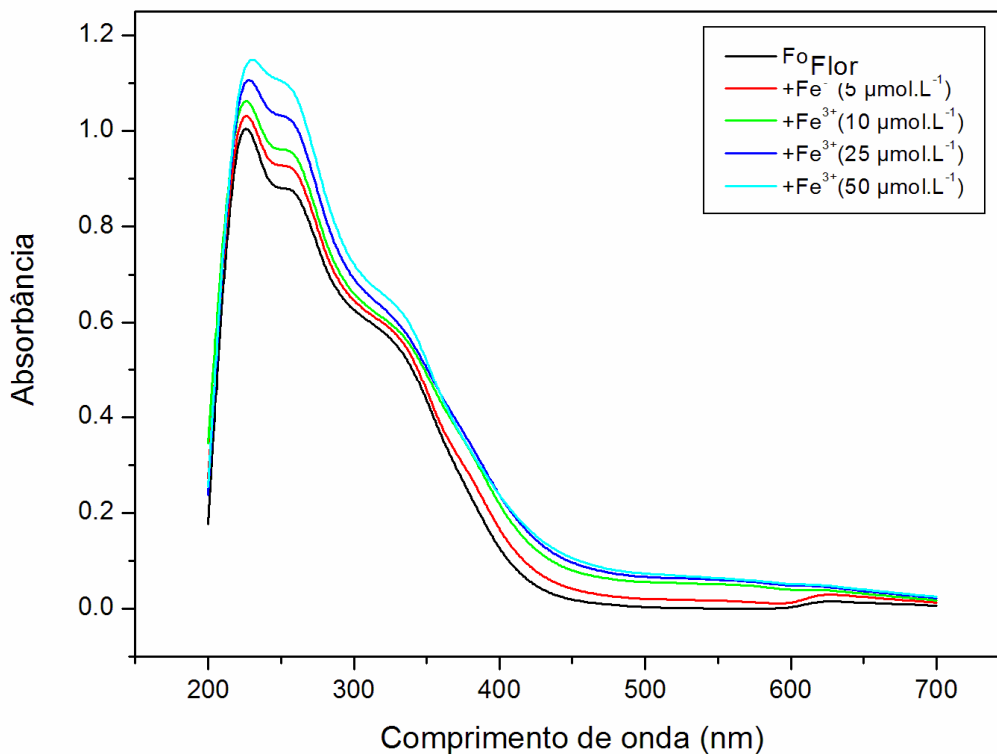
## 5.5- Varredura Espectrofotométrica

Um dos objetivos desse ensaio era observar em quais comprimentos de ondas os compostos presentes nos extratos absorvem a luz incidente. As Figuras 21 a 24 mostram os perfis de absorbância dos extratos com a adição de concentrações crescentes de Fe(II) e Fe(III). As leituras foram realizadas após 30 minutos de incubação.

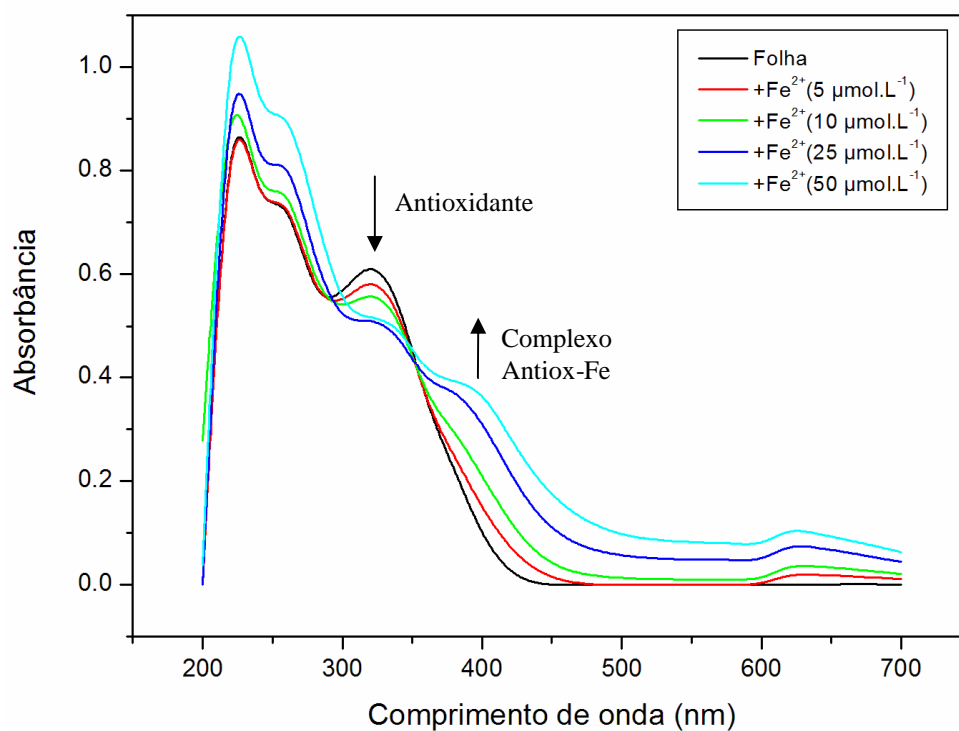


**Figura 21:** Efeito da concentração de Fe(II) no espectro de absorção do extrato da flor. Condições Experimentais: Tampão Heps 10 mmol.L<sup>-1</sup>; Extrato da flor 0,200 mg/mL; Fe<sup>2+</sup> 0-50 µmol.L<sup>-1</sup> e tempo de incubação igual a 30 minutos. Figura representativa de 3 determinações..

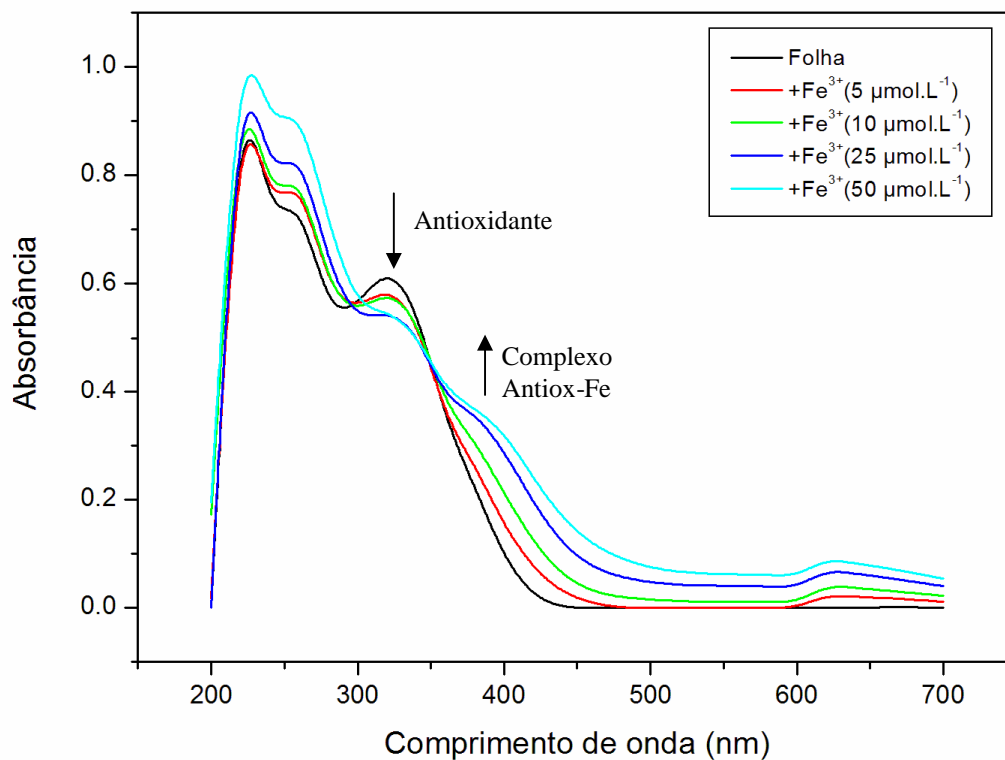




**Figura 22:** Efeito da concentração de Fe(III) no espectro de absorção do extrato da flor. Condições Experimentais: Tampão Hepes  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ ; Extrato da flor  $0,200 \text{ mg/mL}$ ;  $\text{Fe}^{2+}$   $0\text{-}50 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$  e tempo de incubação igual a 30 minutos. Figura representativa de 3 determinações.

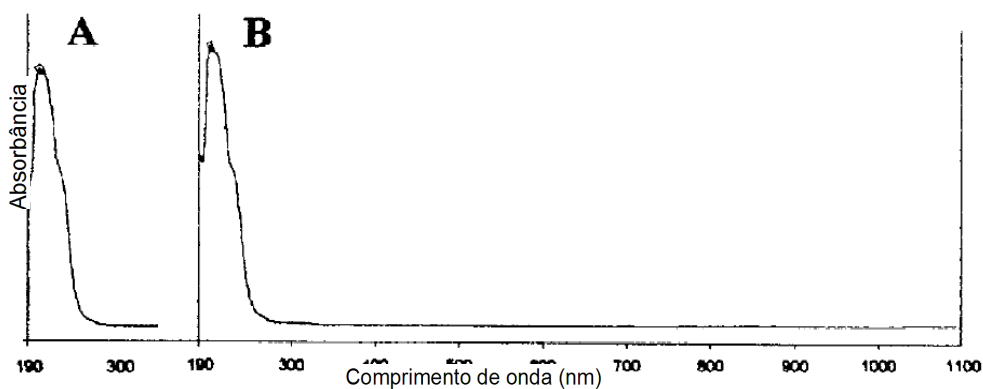


**Figura 23:** Efeito da concentração de Fe(II) no espectro de absorção do extrato da folha. Condições Experimentais: Tampão Hepes  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ ; Extrato da folha  $0,200 \text{ mg/mL}$ ;  $\text{Fe}^{2+}$   $0\text{-}50 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$  e tempo de incubação igual a 30 minutos. Figura representativa de 3 determinações.



**Figura 24:** Efeito da concentração de Fe(III) no espectro de absorção do extrato da folha. Condições Experimentais: Tampão Hepes  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ ; Extrato da folha  $0,200 \text{ mg/mL}$ ;  $\text{Fe}^{3+}$   $0\text{-}50 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$  e tempo de incubação igual a 30 minutos. Figura representativa de 3 determinações.

Os picos de absorção de ambos extratos foram detectados em 220, 270 e 330 nm. É importante ressaltar que padrão de glucotropaeolina, composto proveniente do metabolismo secundário da capuchinha também possui absorção em 220nm (Figura 25) (Wielanek & Urbanek, 1999).

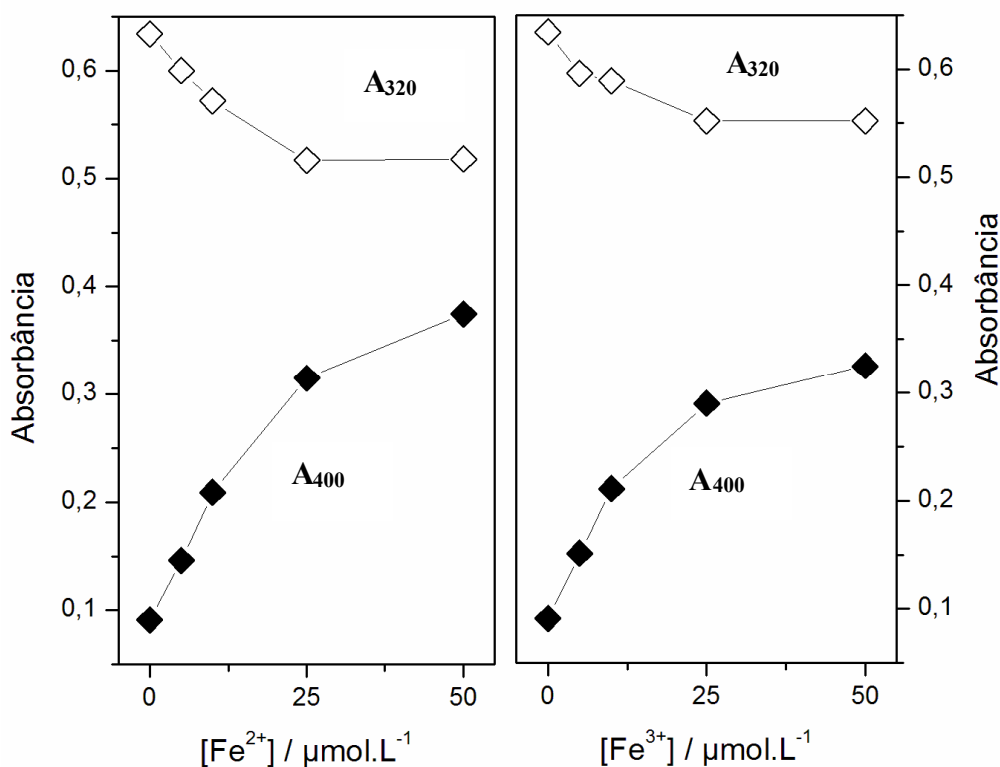


**Figura 25:** Espectro UV-Vis do (A) padrão de glucotropaeolina e (B) glucotropaeolina isolada das raízes de *T. majus*. Figura adaptada de Wielanek & Urbanek, 1999.

Os resultados anteriores utilizando as metodologias de degradação da 2-DR, DNA e peroxidação lipídica, indicaram que os extratos possuem capacidade de quelar metais. Por isso testou-se a capacidade de complexação dos componentes dos extratos com o Fe(II) e Fe(III) após 30 minutos de incubação.

Nos espectros da flor (Figuras 21 e 22) com concentrações crescentes de Fe(II) ou Fe(III), as alterações espectrais notadas devem-se apenas ao acréscimo de absorvância provocado pela presença do metal. Nesses dois espectros não foi possível observar, com clareza, evidências da formação de complexos com íons ferro.

Nos espectros da folha (Figuras 23 e 24) com concentrações crescentes de Fe(II) ou Fe(III), as alterações espectrais notadas até o comprimento de onda de 300 nm devem-se ao acréscimo na absorvância provocado pela presença do metal. Porém, pode-se observar claramente a formação do complexo entre o(s) componente(s) do extrato da folha e o ferro nos comprimentos de onda mais elevados. Verifica-se uma queda da absorvância em 320 nm, o aparecimento de um ponto isobéstico em 350 nm e o aumento da absorvância em 400 nm com formação de um ombro. Esse decréscimo da absorvância em 320 nm e o acréscimo em 400 nm pode ser observado na Figura 26. Esses resultados indicam fortemente a formação de complexo(s) com íons ferro, porém não podemos descartar que a formação do ponto isobéstico seja devido a oxidação e/ou redução de componentes do extrato.



**Figura 26:** Valores da absorbância em 320 nm e 400 nm variando a concentração de Fe(II) e Fe(III). Condições Experimentais: Tampão HEPES 10 mmol.L<sup>-1</sup>; Extrato da folha 0,200 mg/mL; Fe<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup> 0-50 µmol.L<sup>-1</sup> e tempo de incubação igual a 30 minutos. Figura representativa de 3 determinações.

Observa-se que o perfil do espectro do extrato da folha na presença de Fe(II) é semelhante ao perfil deste extrato com o Fe(III). Sendo assim, não se sabe qual complexo foi formado, composto(s)-Fe(II) ou composto(s)-Fe(III). Esse fato levanta duas hipóteses, a primeira é que os extratos podem oxidar Fe(II) a Fe(III), diminuindo a disponibilidade do metal para reação de Fenton e produção do radical hidroxil (vide **Nota de rodapé 2**). A segunda hipótese é que os extratos reduzem Fe(III) e formam complexos com o Fe(II) diminuindo a produção da forma livre do radical hidroxil que pode causar danos a biomoléculas (vide Andrade Jr. *et al.*, 2006).

---

### Nota de rodapé 2

Acredita-se que o quelante PIH possua a capacidade de acelerar a oxidação do Fe(II) a Fe(III), diminuindo a participação do Fe(II) na produção do radical hidroxil via reação de Fenton (Hermes-Lima *et al.*, 1999).

Realizou-se ainda um ensaio espectrofotométrico preliminar com ferrozina, que é um ligante específico de íon ferroso e não possui a capacidade de reduzir o Fe(III). Nesse ensaio a adição de Fe(III) ( $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) ao meio reacional contendo os extratos (flor ou folha) levou à formação do complexo roxo Fe(II)-Ferrozina da cor roxa. Esse ensaio, realizado como descrito por Ginani (2005), indica que os extratos da flor e da folha possuem capacidade de reduzir o Fe(III) a Fe(II).

Sangalli e colaboradores (2004) relatam que o ácido ascórbico está presente na capuchinha. O ácido ascórbico é um redutor clássico de Fe(III) a Fe(II), logo, não é possível determinar se essa redução foi realizada por algum quelante com atividade redutora ou pelo próprio ácido ascórbico.

Essa capacidade de reduzir o Fe(III) a Fe(II) ocorre com outros compostos com atividade quelante como os polifenóis ácido elágico, ácido tânico e ácido clorogênico (Ginani, 2005; Lopes *et al.*, 1999; Yoshino & Murakami, 1998). Sabe-se que o ácido clorogênico está presente em extratos alcoólicos das folhas e flores da capuchinha e talvez essa atividade quelante possa ser atribuída à presença de polifenóis nos extratos (Santo *et al.*, 2007).

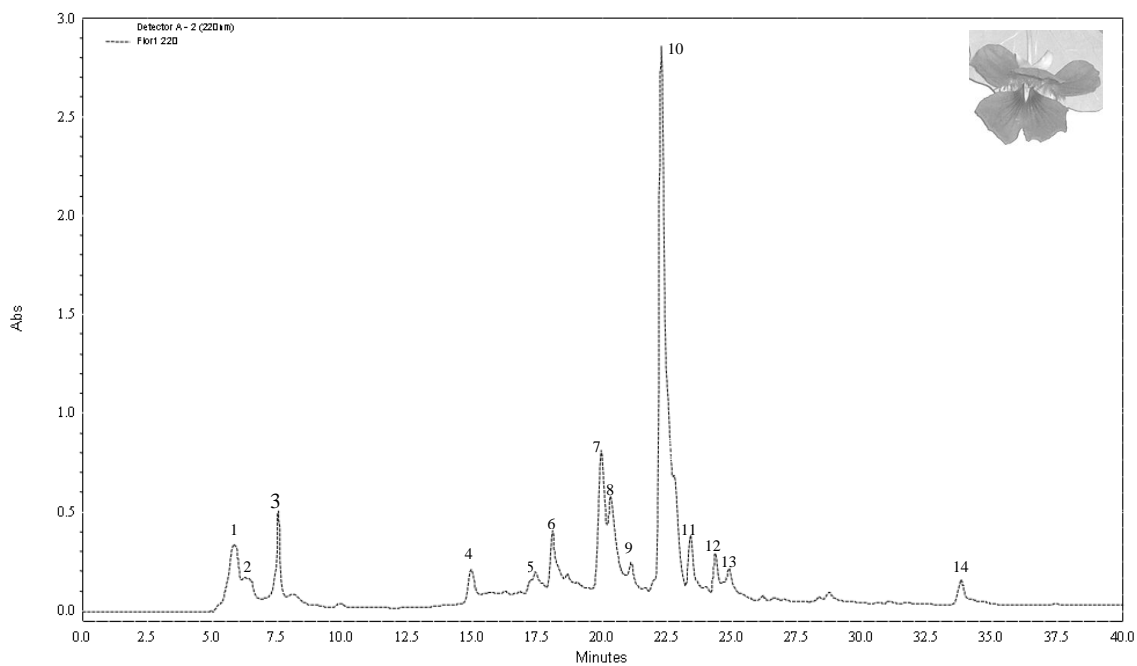
## 5.6 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

O ensaio de cromatografia líquida de alta eficiência foi realizado com o intuito de separar as frações que constituem os extratos da folha e da flor. A separação das frações presentes nos extratos foi realizada com detecção nos comprimentos de ondas 220, 270 e 330nm. Esses comprimentos correspondem aos picos de absorção observados nos espectros dos extratos.

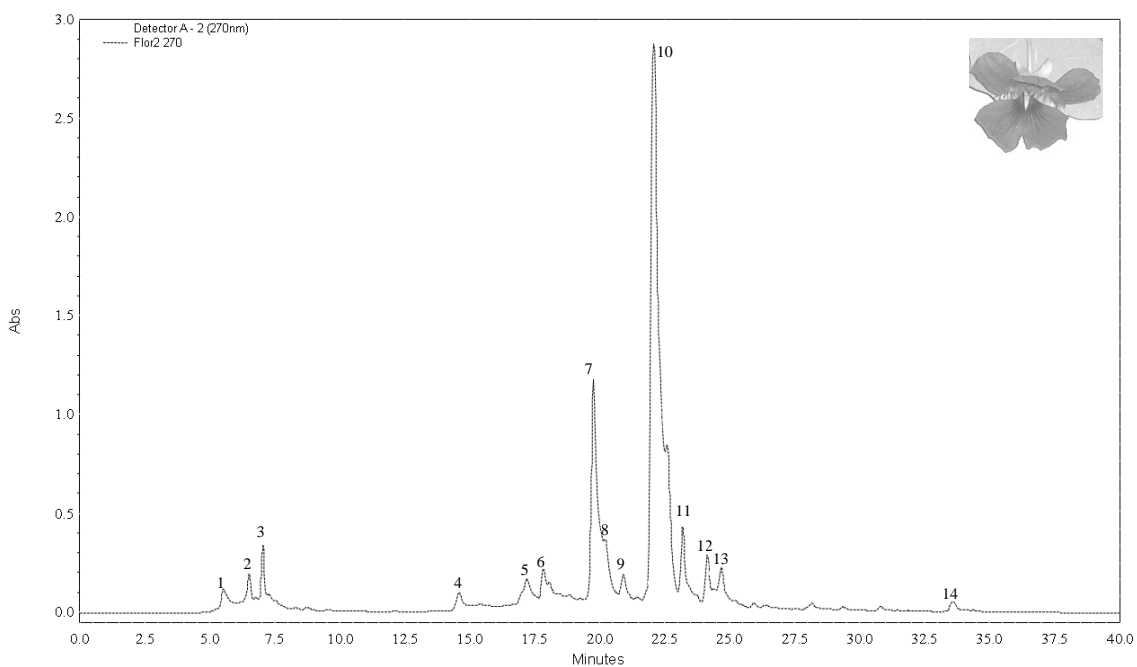
A cromatografia foi feita com gradiente do eluente variando de 5% a 95% de acetonitrila em um período de 80 minutos, porém, após aproximadamente 36 minutos

de corrida, não houve o aparecimento de mais nenhum pico. Por essa razão nas figuras dos cromatogramas o tempo de retenção só aparece até 40 minutos.

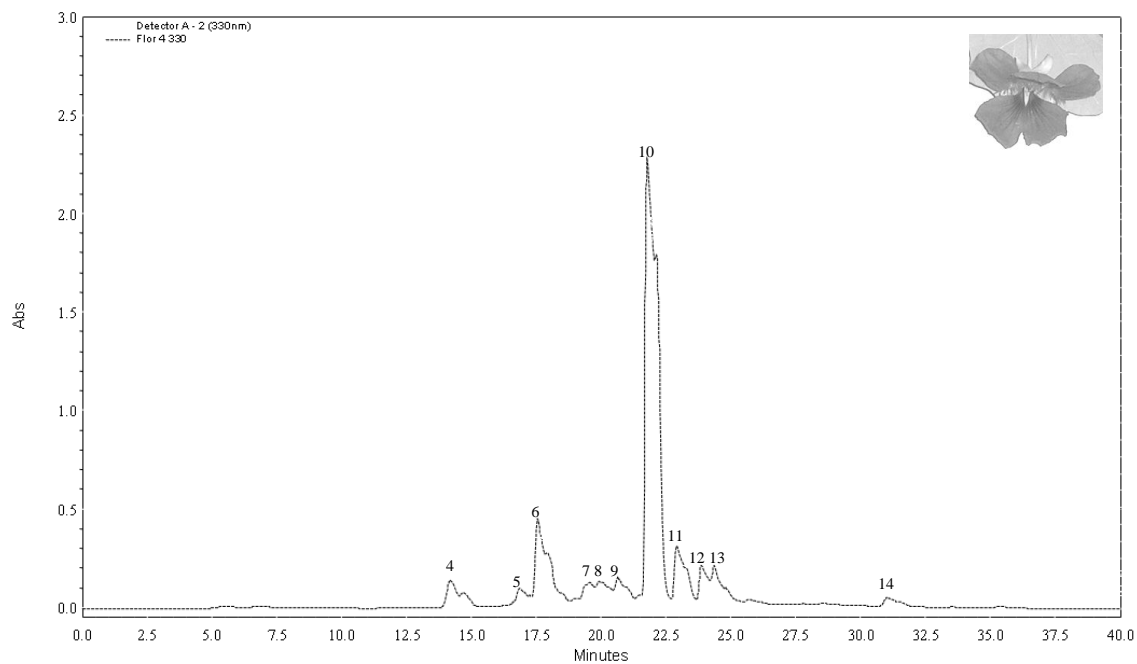
Nas Figuras 27 a 32 estão ilustrados os cromatogramas do extrato da flor e do extrato da folha em diferentes comprimentos de onda. Foi observado em ambos os extratos que, em uma corrida cromatográfica simultânea com detecção nos comprimentos de ondas 220 nm e 270 nm, as linhas praticamente se sobrepõem. Já no comprimento de 330 nm, observa-se que não houve aparecimento de novos picos mas que os primeiros picos eluídos nos cromatogramas monitorados a 220 e 270 nm não foram observados, o que indica que todos compostos existentes nos extratos absorvem a radiação a 220 e 270 nm, mas as frações mais hidrofílicas não absorvem radiação UV na região de 330 nm. Nos cromatogramas foram indicadas as frações por números e letras, sendo que do extrato da flor foram separadas 14 frações (1-14) e no extrato da folha foram separadas 18 frações (A-R). As frações mais abundantes no extrato da flor foram as de número 7 e 10 com tempos de retenção de respectivamente 20,0 e 22,5 minutos. Já no extrato da folha, as frações mais abundantes foram as de letra G, M e N com tempo de retenção iguais a 18,5; 23,5 e 24,5 minutos respectivamente.



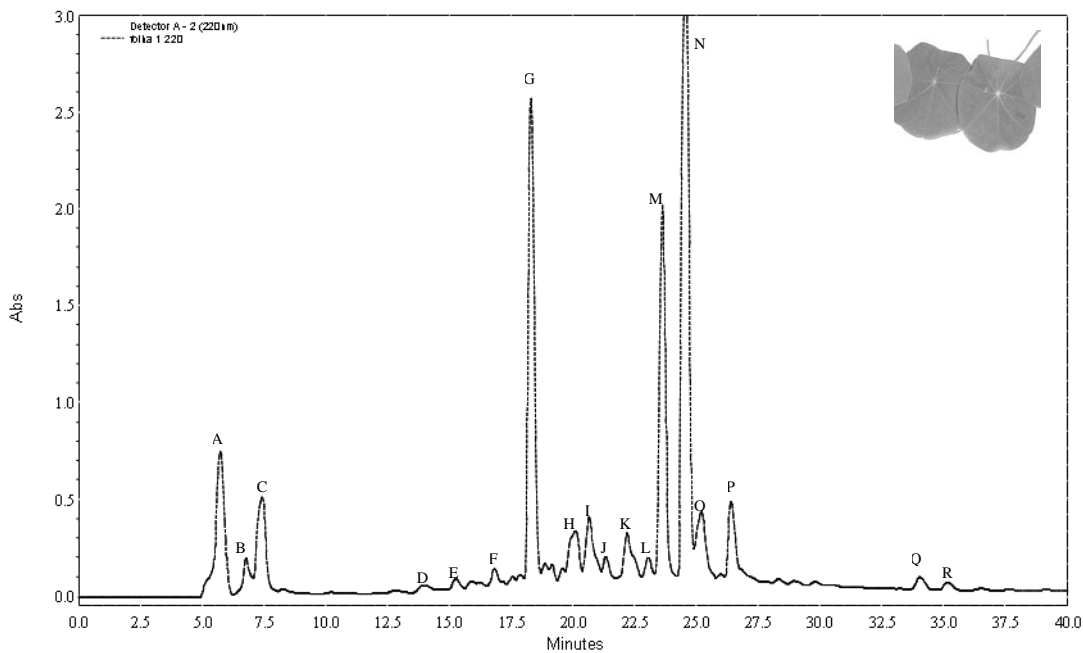
**Figura 27:** Cromatograma do extrato da flor em 220nm. Condições experimentais: gradiente de 5% de acetonitrila até 95%, em um tempo total de 80 minutos e fluxo de 2.5 mL/min.



**Figura 28:** Cromatograma do extrato da flor em 270nm. Condições experimentais: gradiente de 5% de acetonitrila até 95%, em um tempo total de 80 minutos e fluxo de 2.5 mL/min.

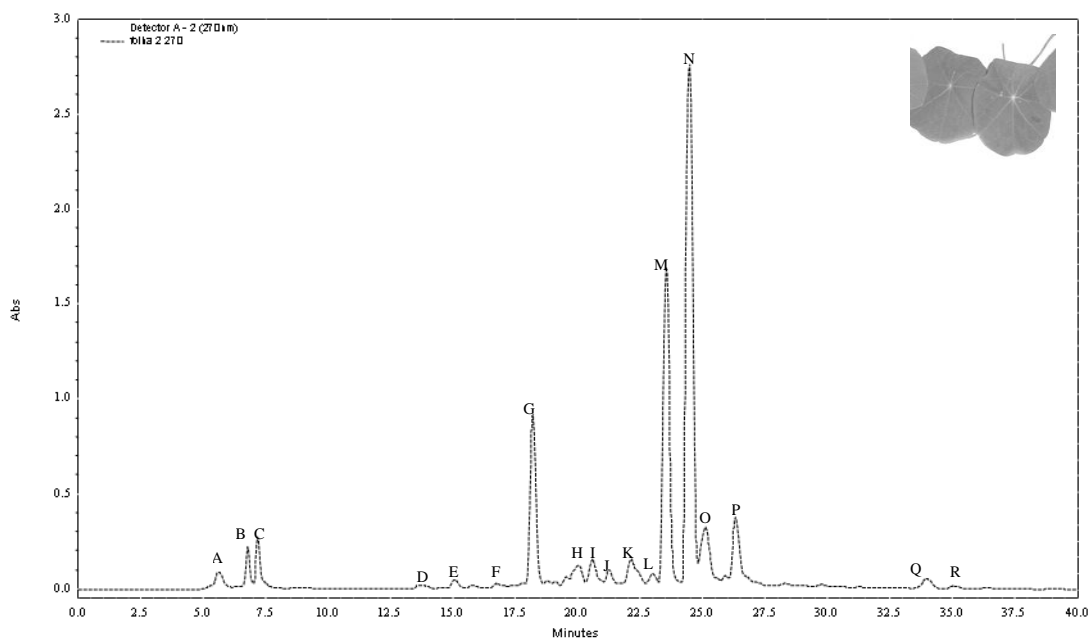


**Figura 29:** Cromatograma do extrato da flor em 330nm. Condições experimentais: gradiente de 5% de acetonitrila até 95%, em um tempo total de 80 minutos e fluxo de 2.5 mL/min.

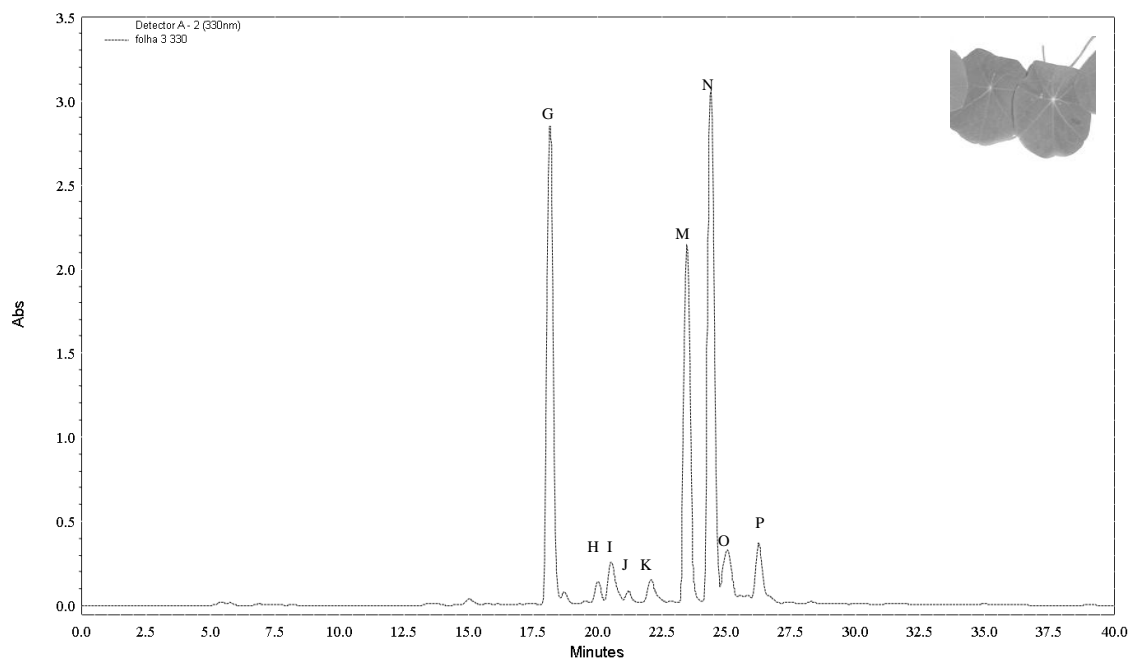


**Figura 30:** Cromatograma do extrato da folha em 220nm. Condições experimentais: gradiente de 5% de acetonitrila até 95%, em um tempo total de 80 minutos e fluxo de 2.5 mL/min.





**Figura 31** Cromatograma do extrato da folha em 270nm. Condições experimentais: gradiente de 5% de acetonitrila até 95%, em um tempo total de 80 minutos e fluxo de 2.5 mL/min.

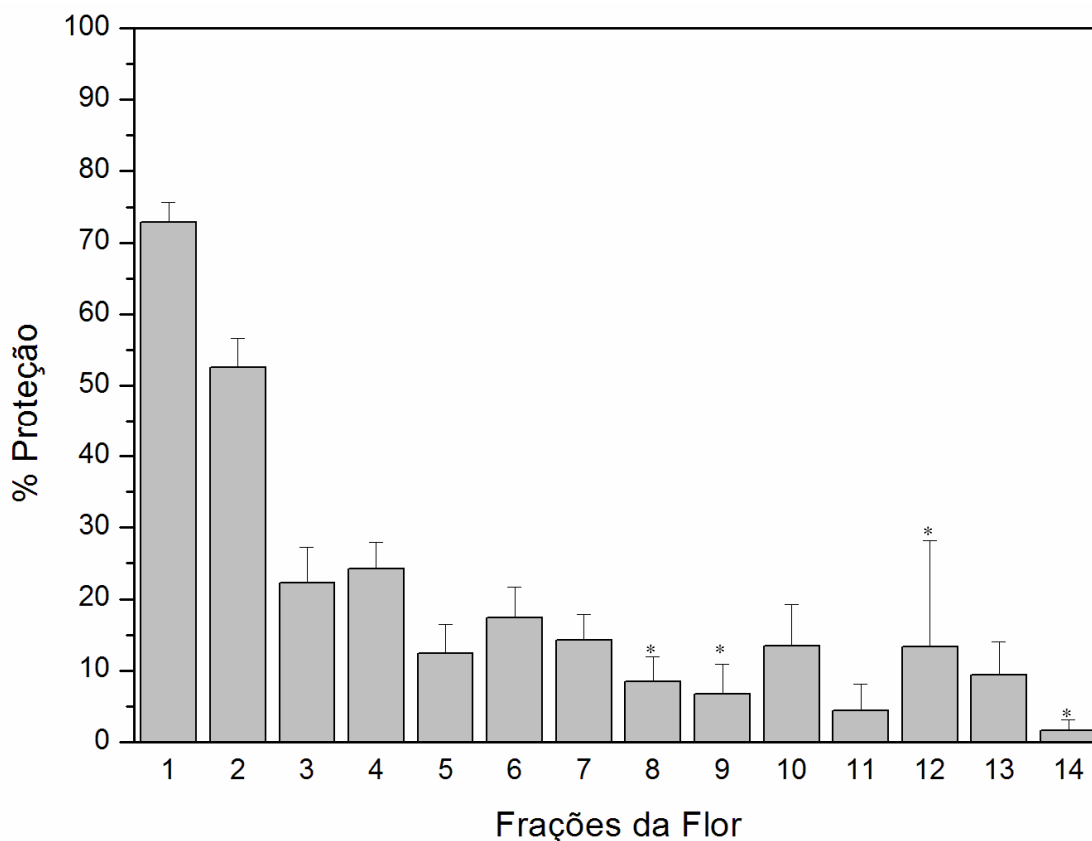


**Figura 32:** Cromatograma do extrato da folha em 330nm. Condições experimentais: gradiente de 5% de acetonitrila até 95%, em um tempo total de 80 minutos e fluxo de 2.5 mL/min.

## 5.7 - Teste da capacidade antioxidante das frações

Com o intuito de identificar a fração ou frações responsáveis pela atividade antioxidante do seu respectivo extrato, cada fração foi testada no ensaio da degradação da 2-DR em concentrações fixas de 2-DR, íons ferro e peróxido de hidrogênio. Nas Figuras 33 e 34, estão ilustradas as proteções contra a degradação da 2-DR observadas para cada fração dos extratos.

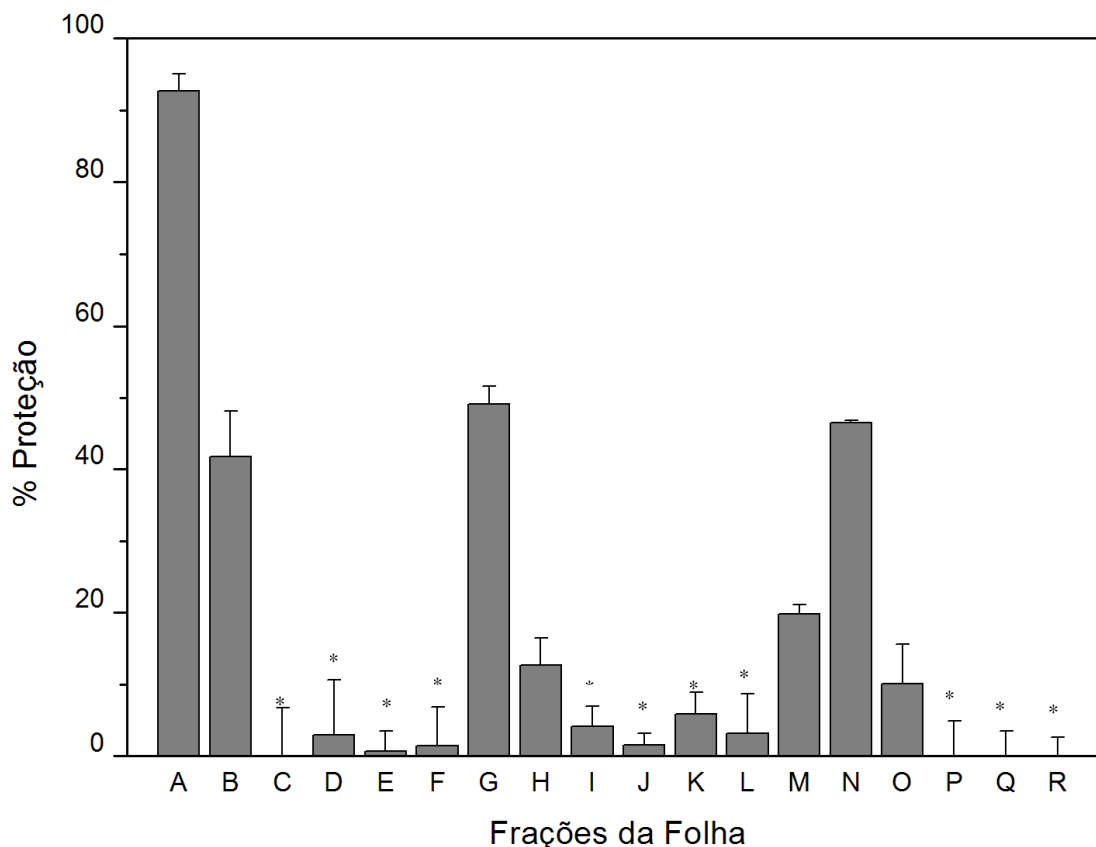
Considerando que a técnica cromatográfica utilizada foi de fase-reversa, as primeiras frações que foram eluídas da coluna possuem característica mais polar do que as últimas. Observando a Figura 33, que indica as porcentagens de proteção observadas nas frações provenientes do extrato flor, percebe-se que as frações que conferiram maior proteção à 2-DR foram as primeiras (frações 1,2,3 e 4). Estas frações foram coletadas com concentração de acetonitrila entre 5 e 15%. As outras frações do extrato da flor apresentaram ação antioxidante bem menor quando comparadas com as quatro primeiras frações, sendo que as frações 8, 9, 12 e 14 sequer apresentam diferença significativa do controle positivo.



**Figura 33:** Porcentagem de proteção das frações da flor na degradação da 2-Desoxirribose. Condições Experimentais: Tampão Hepes 10 mmol.L<sup>-1</sup>; 2-DR 5 mmol.L<sup>-1</sup>; Frações corresponde a 1.750 mg/mL do extrato da flor; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 μmol.L<sup>-1</sup>; Fe<sup>2+</sup> 50 μmol.L<sup>-1</sup>; Fe<sup>3+</sup> 50 μmol.L<sup>-1</sup>. Os valores acima representam média (n=5). As barras marcadas com asterisco (\*) não são significativamente diferentes do controle positivo (p>0,05 ANOVA/SNK).

A Figura 34 mostra a proteção antioxidante resultante das frações das folhas. Percebe-se que as frações que conferiram maior proteção à 2-DR foram as de letra A, B, G, M e N. As frações A e B foram eluídas entre 5-10% de acetonitrila, o que denota forte característica hidrofílica e apresentaram respectivamente 94% e 40% de proteção à 2-DR. A fração G eluída com 25% de acetonitrila e as frações M e N, eluídas entre 30 e 35% de acetonitrila, são mais lipofílicas e apresentaram grau de proteção de respectivamente 50%, 20% e 52% contra o dano à 2-DR. Observa-se que as frações responsáveis pela ação antioxidante do extrato da folha possuem desde uma característica muito polar, frações A e B (como as frações 1 e 2 da flor; Figura 33), até

uma característica mais apolar, como as frações G,M e N da folha. Esse fato pode ser um dos motivos pelos quais o extrato da folha conferiu maior proteção antioxidante do que o extrato da flor no ensaio da peroxidação lipídica que ocorre em um meio contendo membranas, e consequentemente com porções apolares (Figura 16).



**Figura 34:** Porcentagem de proteção das frações da folha na degradação da 2-DR. Condições Experimentais: Tampão Heps 10 mmol.L<sup>-1</sup>; 2-DR 5 mmol.L<sup>-1</sup>; Frações corresponde a 1.750 mg/mL do extrato da folha; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 μmol.L<sup>-1</sup>; Fe<sup>2+</sup> 50 μmol.L<sup>-1</sup>; Fe<sup>3+</sup> 50 μmol.L<sup>-1</sup>. Os valores acima representam média (n=5). As barras marcadas com asterisco (\*) não são significativamente diferentes do controle positivo (p>0,05 ANOVA/SNK).

Observa-se nas Figuras 33 e 34 que as frações que apresentaram uma maior ação antioxidante foram as primeiras (1 e A). Nota-se nos cromatogramas da flor e da folha (Figuras 27 e 30) que as frações parecem ser as mesmas em ambos extratos; a diferença pode ser notada apenas nas intensidade dos picos. Ou seja, no extrato da folha a concentração dos componentes que compõe essa fração foi possivelmente superior que no extrato da flor. Este fato e a presença de mais frações no extrato da folha com

atividade antioxidante explicariam o motivo do extrato da folha ter apresentado uma maior proteção que o extrato da flor nos testes realizados.

## 6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível alcançar todos os objetivos propostos, e conclui-se que ambos extratos, da flor e da folha da capuchinha, possuem atividade antioxidante. Esse fato foi comprovado pela diminuição na formação do aduto DMPO- $\cdot$ OH e também pela diminuição no dano oxidativo à 2-DR, aos lipídios e ao DNA plasmidial, mediados pela reação de Fenton. Comparando os valores de  $I_{50}$  dos extratos da capuchinha com os valores de outros extratos conclui-se que essa atividade antioxidante atribuída aos extratos da capuchinha foi bastante satisfatória quando comparamos os valores de  $I_{50}$  da capuchinha com os valores de outros extratos.

Foi possível obter fortes indícios sobre o mecanismo pelo qual os extratos agem. Em vários ensaios observou-se a existência de uma dependência inversa entre a porcentagem de proteção dos extratos e a concentração do metal. Ou seja, os extratos apresentaram um comportamento quelante. Porém, apenas com o extrato da folha foi possível inferir sobre a formação de um complexo extrato-Fe no experimento de varredura espectrofotométrica.

Foi observado que ambos extratos possuem a capacidade de reduzir o Fe(III) a Fe(II), porém, não se sabe se essa redução foi realizada pelo mesmo componente que complexaria o metal, como por exemplo o ácido clorogênico, ou se ocorre pela ação redutora de outros compostos presentes nos extratos, como a vitamina C.

O comportamento quelante que foi atribuído aos extratos da capuchinha não descarta a possibilidade da presença de compostos com capacidade de seqüestrar radicais livres, visto que se trabalhou com extratos constituídos por no mínimo 14 diferentes substâncias cada um.

Foi possível separar e identificar as frações responsáveis pela ação antioxidante

dos extratos. Pode-se concluir que o extrato da folha apresenta atividade antioxidante maior que o extrato da flor, devido a uma concentração maior dos componentes antioxidantes e também devido à presença de mais compostos antioxidantes no extrato da folha que na flor.

A descoberta de que o extrato da folha possui uma atividade antioxidante maior que o extrato da flor, é um dado importante, pois na cultura brasileira as flores são mais consumidas do que as folhas.

Experimentos complementares devem ser feitos visando determinar quais os componentes presentes nas frações são os responsáveis pela ação antioxidante e deve-se realizar testes com cobaias para se determinar se o efeito antioxidante observado nesta dissertação é também observado *in vivo*.

## 8.BIBLIOGRAFIA

Allen, KJ *et al.* **Iron-Overload–Related Disease in *HFE* Hereditary Hemochromatosis.** *The New England Journal of Medicine.* 358: 221-230, 2008.

Andrade Jr., RG. **Mecanismo de ação antioxidante e pré-oxidante do polifenol ácido tânico na presença de íons cobre.** Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, 2004.

Andrade Jr.,RG; Dalvi, LT; Silva Jr., JMC; Lopes, GKB; Alonso, A; Hernes-Lima, M. **The antioxidant effect of tannic acid on the in vitro copper-mediated formation of free radicals.** *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 437: 1-9, 2005.

Andrade Jr, R.G.; Ginani, J.S.; Lopes, G.K.B.; Dutra, F.; Alonso, A.; Hermes-Lima, M. **Tannic acid inhibits in vitro iron-dependent free radical formation.** *Biochimie* 88: 1287–1296, 2006.

Ardestani, A; Yazdanparast,R. **Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts.** *Food Chemistry.* 104: 21–29, 2007.

Aucagne,V; Gueyrard,D; Tatibouet, A; Cottaz,S; Driguez, H; Lafosse,M; Rollin,P. **The frist synthesis of C-glucotropaeolin.** *Tetrahedron Letters.* 40: 7319-7321, 1999.

Augusto, O. **Radicais Livres: Bons, Maus e Naturais.** Oficina de Textos, 2006, 120p

Avellar, IGJ; Magalhães, MMM; Silva, AB; Souza, LL; Leitão, AC; Hermes-Lima, M. **Reevaluating the role of 1,10-phenanthroline in oxidative reactions involving ferrous íons and DNA damage.** *Biochem. Biophys. Acta.* 1675: 46-53, 2004

Azevedo, MO; Felipe, MSS; Brígido, MM. **Técnicas básicas em Biologia Molecular.** 1 ed. Brasília: Editora UNB,2003,211.

Balmori,YS. **Potencial Antioxidante de los  $\alpha$ -tocoferoles.** In: Fainstein M, K. *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas.* México: Manual moderno, 2008. Cap. 19: 291-301.



Barreira, JCM; Ferreira, ICFR; Oliveira, MBPP; Pereira, JA. **Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower.** *Food Chemistry*. 107: 1106–1113, 2008.

Barreiros, ALBS; David, JM ; David, JP. **Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo.** *Revista Química Nova*. 29: 113-123, 2006.

Buettner, GR. **The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation,  $\alpha$ -tocopherol, and ascorbate.** *Arch. Biochem. Biophys.* 300, 535-543, 1993.

Cappellini, MD; Cohen, A; Piga, A, *et al.* **A phase 3 study of deferasirox (ICL670), a once-daily oral iron chelator, in patients with  $\beta$ -thalassemia.** *Clinical Trials and Observations*. 107: 3455-3462, 2006.

Cetkovic,GS; Djilas,SM; Canadanovic-Brunet, JM; Tumbas,VT. **Antioxidant properties of marigold extracts.** *Food Research International*. 37: 643–650, 2004.

Dalvi, LT. **Mecanismos de ação de antioxidantes de origem vegetal: estudo do polifenol ácido elágico e do extrato de caqui (*Diospyros kaki*)**  
Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília, Brasília ,2005.

Droge, W. **Free radicals in the physiological control of cell function.** *American Physiological Society*. 82: 47-95, 2002.

Dorman,HJD; Bachmayer,O; Kosar,M; Hiltunen,R. **Antioxidant Properties of Aqueous Extracts from Selected Lamiaceae Species Grown in Turkey.** *J. Agric. Food Chem.* 52: 762-770, 2004

Dourado, L.P.S. ; Marin, A.M.F. ; SIQUEIRA, Egle Machado de Almeida ; ARRUDA, S. F. . **Potencial Antioxidante de Frutos do Cerrado in vitro.** In: Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos,, 2007, Campinas. Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos. Campinas : UNICAMP, 2007. v. 1.

Fainstein, MK. **NADPH Oxidasa.** In: Fainstein M, K. *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas.* México: Manual moderno, 2008a,Cap. 5, 73-83.

Fainstein, MK. **Xantina oxidoreductasa.** In: Fainstein M, K. *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas.* México: Manual moderno, 2008b,Cap. 6, 85-93.

Fainstein, MK. **Sistemas microsomales de monooxigenasas, citocromo P<sub>450</sub>**. In: Fainstein M, K. *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas*. México: Manual moderno, 2008c, Cap. 4, 61-71.

Fenton, HJH. **The oxidation of tartaric acid in the presence of iron**. *J. Chem. Soc. Proc.* 9: 113, 1893.

Finkel,T; Holbrook,NJ. **Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing**. *Nature*. 408:239-247,2000.

Franchini, M. **Hereditary Iron Overload: Update on Pathophysiology,Diagnosis, and Treatment**. *American Journal of Hematology*. 81:202–209, 2006.

García, ZEA; Izquierdo, ME; Expósito,MI. **Papel de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis y terapia antioxidante**. *Revista Cubana Investigación Biomédica*. 22: 51-57, 2004.

Genaro-Mattos, TC. ; Dalvi, LT ; GINANI, JS; Oliveira, RG; Hermes-Lima, M. **Reevaluation of the 2-Deoxyribose assay for the study of metal-mediated free-radical formation**. In: XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2007, Salvador. XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2007.

Ginani, JS. **Estudo da ação antioxidante *in vitro* do polifenol ácido elágico** Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília, Brasília ,2005.

Gomes, CS. **Estudos da oxidação de íons ferro e estanho na produção de radicais livres: efeitos de antioxidantes**. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília, 2005.

Gondar T.R. **Íon cobalto e estresse oxidativo *in vitro***. 2005. Dissertação de Mestrado em Nutrição Humana, Universidade de Brasília, Brasil.

Halliwell, B. **Mechanisms involved in the generation of free radicals**. *Path Biol.* 44: 6-13, 1996.

Halliwell, B. **Reactive Species and Antioxidant. Redox Biology Is a Fundamental theme of aerobic life**. *Plant Physiology*, 141: 312-322, 2006.

Halliwell, B;Gutteridge, J.M.C. **Thiobarbituric acid-reactivity following iron-dependent free-radical damage to amino acids and carbohydrates.** *FEBS Letters*, 128 (2): 343-346, 1981.

Halliwell, B;Gutteridge, JMC. **Free radicals in biology and medicine.** 3.ed. Londres: Oxford Press, 1999. 897p.

Hermes-Lima, M. **Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals.** In: Storey, BK. *Functional Metabolism: Regulation and adaptation.* Nova Iorque: John Wiley & Sons, 2004a, Cap. 12, 319-368.

Hermes-Lima, M. **Oxidative Stress and Medical Sciences.** . In: Storey, BK. *Functional Metabolism: Regulation and adaptation.* Nova Iorque: John Wiley & Sons, 2004b, Cap. 13, 369-382.

Hermes-Lima M, Nagy E, Ponka P e Schulman HM. **The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) protects plasmid pUC-18 DNA against ·OH-mediated strand breaks.** *Free Radic. Biol. Med.* 25: 875-880, 1998.

Hermes-Lima M, Santos NCF, Yan J, Schulman HM, Ponka P. **EPR spin trapping and 2-deoxyribose degradation studies of the effect of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) on ·OH formation by the Fenton reaction.** *Biochem. Biophys. Acta.* 1426: 475-482, 1999.

Hermes-Lima, M; Ponka, P; Schulman, HM. **The iron chelator pyridoxal isocotinoyl hidrazone (PIH) and its analogues prevent damage to 2-deoxyribose mediated by ferric iron plus ascorbato.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1523: 154-160, 2000.

Hernes-Lima M, Willmore WG and Storey KB. **Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts base don Fe(III) xylene orange complex formation.** *Free Radic. Biol. Med.* 19: 271-280, 1995.

Hsieh,CH;Yen,GC. **A antioxidant actions of du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) toward oxidative damage in biomolecules.** *Life Scwms.* 66: 1387-1400, 2000.

Klein, JA ; Ackerman,SL. **Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeration.** *The Journal of Clinical Investigation.* 111: 785-793, 2003.

- Klein, SM, Cohen, G e Cederbaum, AI. **Production of formaldehyde during metabolism of dimethyl sulfoxide by hydroxyl radical generating systems.** *Biochemistry.* 20: 6006-6012, 1981.
- Kleinwacher, M; Selmar, D. **A novel approach for reliable activity determination of ascorbic acid depending myrosinases.** *J. Biochemistry. Biophys. Methods.* 59: 253-265, 2004.
- Kukic,J; Petrovic,S; Niketic,M. **Antioxidant Activity of Four Endemic *Stachys* Taxa.** *Biol. Pharm. Bull.* 29: 725—729, 2006.
- Kumar,A; Chanttopadhyay,S. **DNA damage protecting activity and antioxidant potential of pudina extract.** *Food Chemistry.* 100:1377–1384, 2007.
- Lopes GKB, Schulman HS and Hermes-Lima M, **Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1472: 142-152, 1999.
- Lorenzi, H. & Matos, FJA. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas.**1 ed. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da flora LTDA, 2002. 113p.
- Loureiro, APM; Di Mascio,P; Medeiros, MHG. **Formação de adutos exocíclicos com base em DNA: Implicações em mutagênese e carcinogênese.** *Revista Química Nova.* 25: 777-793, 2002
- Masterton,WL; Slowinski, EJ; Stanitski, CL.**Princípios de Química.** 6 ed. Rio de Janeiro: Editora JC,1990. 681p.
- Medeiros,MHG. **Daño al DNA.** In: Fainstein M, K. *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas.* México: Manual moderno, 2008, Cap. 8, 119-134.
- Morel, I; Lescoat, G; Cogrel, P; Sergent, O; Padeloup, N; Brissot, P; Cillard, P; Cillard, J. **Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocytes cultures.** *Biochem. Pharmacol.* 45: 13-19, 1993.
- Nizzu,PY; Rodriguez-Amaya,AB. **Flowers and Leaves of *Tropaeolum majus* L. as rich sources of lutein.** *Journal of Food Science.* 70. 605-609, 2005.

Pan,Y; Zhu,J, Wang,H. **Antioxidant activity of ethanolic extract of Cortex fraxini and use in peanut oil.** *Food Chemistry*. 103: 913–918, 2007.

Piña, MZ; Piña,E. **Daño a proteínas. Aplicaciones médicas.** In: Fainstein M, K. *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas.* México: Manual moderno, 2008, Cap. 8, 97-118.

Pintão,AM; Pais,MSS; Coley,H; Kelland,LR; Judson,IR. **In Vitro and In Vivo antitumor activity of benzyl Isothiocyanate: a natural product from *Tropaeolum majus*.** *Plant Méd.* 61, 233-236, 1995.

Pryor, W.A. **Introdução ao Estudo dos Radicais Livres.** 1.ed. São Paulo: Edgard Blucher LTDA,1970. 129p.

Rang,H.P; Ritter, JM; Dale, MM, *et al*, *Farmacologia.* 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier,2004. 904p.

Robbins, SL; Kumar, V; Cotran, RS. **Patologia Estrutural e Funcional.**6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,2000.1251p.

Rodrigues, CMV. **Papel de lãs especies reactivas Del oxigeno em la arterioesclerosis.** *Iatreia*. 13:185-189, 2000.

Rodrigues, C.T & Dalgalarrodo, P. **Alterações neuropsiquiátricas na doença de Wilson e uso da eletroconvulsoterapia.** *Arquivo Neuropsiquiatria*. 61: 876-880, 2003.

Sangalli, A; Viera, MC; Zárate, NAH. **Resíduo Orgânico e Nitrogênio na Produção de Biomassa da Capuchinha (*Tropaeolum majus* L.).** *Revista Ciência Agrotec*.28:831-839,2004.

Santos, NCF. **Quantificação da ação antioxidante do Piridoxal Isonicotinoil Hidrazona (PIH) contra o estresse oxidativo induzido por íons ferro.** Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, 1998.

Santo,APE; Martins,ISS; Tomy,SC; Ferro,VO. **Efeito anticoagulante *in vitro* do extrato hidroetanólico da folhas e flores éduladas de *Tropaeolum majus* L. (*Tropaeolaceae*) sobre o plasma humano.** *Latin American Journal of Pharmacy*. 26: 732-736, 2007.

Savin,TZ; Balmori,YS. **Dano a lípidos.** In: Fainstein M, K. *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas.* México: Manual moderno, 2008. Cap. 9: 135-146.

Sertié, JAA; Woisky, RG; Wiezel,G; Rodrigues;M. **Pharmacological assay of Cordia verbenacea V: oral and topical anti-inflammatory activity, analgesic effect and fetus toxicity of a crude leaf extract.** *Phytomedicine* 12: 338–344, 2005.

Simões, CMO; Schenkel, EP; Gosmann, G, *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5.ed. Porto Alegre / Florianópolis: UFSC, 2004,1102p.

Siqueira, EMA; Arruda,SF. **Potencial antioxidante del ácido ascórbico.** In: Fainstein M, K. *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas.* México: Manual moderno, 2008a. Cap. 18: 279-289.

Sirqueira, EMA; Arruda,SF. **Potencial antioxidante del los carotenoides.** In: Fainstein M, K. *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas.* México: Manual moderno, 2008b. Cap. 17: 269-278

Torres, WH. **El dióxígeno y sus espécies reactivas.** In: Fainstein M, K. *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas.* México: Manual moderno, 2008, Cap. 2, 25-46.

Turrens, JF. **Mitochondrial formation of reactive oxygen species.** *Jornal physiol.* 552: 335-344, 2003

Valko,M; Leibfritz,D; Moncol,J; Cronin,MTD; Mazur,M; Telser,J. **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 39: 44-84, 2007.

Vladimirov, YA; Olenev,VI; Suslova,TB; Cheremisina, ZP. **Lipid Peroxidation in Mitochondrial Membrane.** *Ad. Lipid Res.* 17:173-249,1980.

Wielanek,M; Urbanek,H. **Glucotropaeolin and myrosinase production in hairy root cultures of *Tropaeolum majus*.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 57: 39–45, 1999.

Zanetti,GD; Manfron,MP; Hoelzel,SCS. **Análise morfo-anatômica de *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae).** *Iheringia, Série Botânica,* 59: 173-178, 2004.

Yoshino, M ; Muramaki, K. **Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization.** *Anal. Biochem.* 257: 40-44, 1998.

