UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Potencial dos biflavonóides de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O.Kuntze como antioxidantes e fotoprotetores

Lydia Fumiko Yamaguchi

Tese de Doutoramento apresentado no

Departamento de Bioquímica

Prof. Dr. Paolo Di Mascio

Orientador

SÃO PAULO

26 de novembro de 2004

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Y19p

Yamaguchi, Lydia Fumiko
Potencial dos biflavonóides de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze como antioxidantes e fotoprotetores / Lydia Fumiko Yamaguchi. -- São Paulo, 2004.
1v. (várias paginações)

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Di Mascio, Paolo

1. Espécies reativas de oxigênio no ser vivo : Bioquímica 2. Produtos naturais : Química orgânica I. T. II. Di Mascio, Paolo, orientador.

574.1921 CDD

"Potencial dos biflavonóides de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze como antioxidantes e fotoprotetores"

LYDIA FUMIKO YAMAGUCHI

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovado(a) por:

Prof. Dr. PAOLO DI MASCIO
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. ETELVINO JOSÉ HENRIQUES BECHARA
IQ – USP

Prof. Dr. MAURÍCIO DA SILVA BAPTISTA
IQ – USP

Prof. Dr. LUIS EDUARDO SOARES NETTO
IB – USP

Prof. Dr. NORBERTO PEPORINE LOPES
FCF – USP – Ribeirão Preto

SÃO PAULO
26 de NOVEMBRO 2004

Aos meus pais e família

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Paolo Di Mascio pela orientação e apoio.

À Profa. Dra Marisa Helena Gennari de Medeiros pela colaboração e orientação.

À Profa. Dra. Marta M. G. Teixeira do Departamento de Parasitologia, ICB-USP pela primeira orientação na Iniciação Científica.

À Angélica e Cícero pela grande amizade fraterna.

As amigas do laboratório, Ana Paula Loureiro pela tranquilidade, Daniela pela coragem, Fernanda e Miriam pela persistência, Graziela pela alegria, Janice pela serenidade e a Sayuri pela sabedoria.

Aos antigos e atuais amigos do laboratório da Profa. Marisa e Prof. Paolo: Priscila, Glaucia, Tedra, Cláudia, Osmar, Alexandre, Lívea, Camila, Sabrina, Clécio, Ana Paula Martins e Eduardo.

Aos meus amigos Ivan, Edgar e Mário pela grande amizade e compreensão.

Aos amigos do Laboratório de Produtos Naturais pela amizade, viagens e alegrias.

A todos os funcionários do Instituto de Química.

Aos professores da graduação e pós-graduação que de alguma forma ajudaram na minha formação.

À Raquel e todos que me apoiaram no Bloco 12.

Ao Massuo com carinho, pelas estradas esburacadas, paisagens maravilhosas e momentos inesquecíveis.

Aos meus pais Masakuni e Hiroko e minhas irmãs.

A Todos os amigos que passaram ou que ainda fazem parte da minha vida.

APOIO FINACEIRO

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Pronex/Finep – Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência

Pró – Reitoria de Pesquisa – Universidade de São Paulo

Agradecimento especial à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida.

ÍNDICE

Índice de figuras, tabelas e esquemas i

Abreviações vi

Resumo ix

Abstract xi

1. Introdução 1

1.1 Espécies reativas de oxigênio 2

1.2 Radiação ultravioleta 6

1.3 Antioxidantes 8

1.4 Flavonóides 11

1.5 Biflavonóides 17

1.6 *Araucaria angustifolia* 21

2. Objetivos 22

3. Materiais e Métodos 23

3.1 Reagentes 23

3.2 Equipamentos 23

3.3 Material vegetal 24

3.4 Obtenção e identificação do extrato rico em biflavonóides das folhas de *Araucaria angustifolia* 24

3.4.1 Extrato de folhas de *Araucaria angustifolia* 24

3.4.2 Análise por CLAE do BFF (Fração de Biflavonóides) 25

3.4.3 Análise por CLAE/EM do BFF 26

3.4.4 Permetilação do BFF 26

3.5 Avaliação da atividade antioxidante dos biflavonóides de *Araucaria angustifolia* 26

3.5.1 Utilização da técnica de luminescência no infravermelho resolvida no tempo para a determinação da constante de supressão do $^1O_2$ 26

3.5.2 Tratamento dos DNA plasmidiais pBluescript e PUC 19 com $^1O_2$ 27

3.5.3 Reação de Fenton 28

3.5.4 Extração de DNA plasmidial 28

3.5.4.1 Transformação de bactérias competentes 28

3.5.4.2 Preparação do plasmídio pBluescript e PUC 19 29

3.5.4.3 Gel de agarose 29

3.5.5 Peroxidação em membranas lipossomais induzidas por radiação UV 30

3.5.6 Peroxidação em membranas lipossomais induzidas por reação de Fenton 30

3.5.7 Análise da formação de complexos entre biflavonóides e metais de transição com detecção por espectrometria de massas 31

3.5.8 Análise dos produtos dímero ciclobutânico de pirimidina e aduto de pirimidina (6-4) pirimidona formados em DNA de timo de bezerro, expostos à radiação UV 32

3.5.9 Cultivo de células de mamíferos e incorporação de BFF trapeados em β-ciclodextrina 35

3.5.9.1 Inserção de BFF em β-ciclodextrina 35

3.5.9.2 Incorporação de BFF em células 35

3.5.9.3 Avaliação da viabilidade de células, incorporadas com BFF, pelo ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazoil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) 36

4. Resultados e Discussão 37

4.1 Identificação dos biflavonóides 37

4.2 Permetilação do BFF 40

4.3 Avaliação da atividade antioxidante de BFF 45

4.3.1 Análise da supressão da luminescência de $^1O_2$ utilizando a técnica da luminescência no IV resolvida no tempo 45

4.3.2 Quebras em DNA plasmidiais na presença de $^1O_2$ gerado pela termodecomposição de $NDPO_2$ e proteção por biflavonóides 47

4.3.3 Proteção de quebras em DNA plasmidial induzidas pela reação de Fenton 51

4.3.4 Proteção contra lipoperoxidação induzida por radiação UV 52

4.3.5 Proteção contra lipoperoxidação induzida por reação de Fenton 55

4.4 Análise da formação de complexos entre biflavonóides e metais de transição com detecção por espectrometria de massas 56

4.5 Análise dos produtos dímero ciclobutânico de pirimidina e aduto de pirimidina (6-4) pirimidona formados em DNA de timo de bezerro, expostos à radiação UV 64

4.6 Cultivo de células de mamíferos e incorporação de BFF inseridos em β-ciclodextrina 75

4.6.1 Inserção de BFF em ciclodextrina 75

4.6.2 Incorporação de BFF em células 75

4.6.3 Avaliação da viabilidade de células, incorporadas com BFF, pelo ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazoil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) 77

5. Conclusões e Perspectivas 79

6. Referências Bibliográficas 82

ÍNDICE DE FIGURAS TABELAS E ESQUEMAS

Figura 1.1. Estruturas dos fotoprodutos diméricos de timina induzidos por radiação UV. 8

Figura 1.2. Estruturas de alguns flavonóides mais conhecidos. 13

Figura1.3. Proposta do mecanismo de formação de espécies reativas de oxigênio pela oxidação da quercetina. 16

Figura 1.4. Estrutura geral de biflavonóides do tipo amentoflavona 18

Figura 1.5. *Araucaria angustifolia.* 21

Figura 3.1. Estrutura dos flavonóides quercetina e rutina e Trolox®. 28

Figura 3.2. Esquema de detecção por LC/EM-EM no modo MRM, no qual há seleção de uma fragmentação específica a ser identificada. O dímero ciclobutânico da pirimidina é identificada como m/z 545 e o íon filho como m/z = 447 (Loureiro e col. 2000). 33

Figura 3.3. Esquema da válvula de redirecionamento de fluxo (Loureiro e col., 2000) . 34

Figura 4.1. Espectro de massas obtido através da análise CLAE/EM-EM do BFF. O composto tetra-*O*-metilamentoflavona possui o $[M+H]^+$ = 595, tri-*O*-metilamentoflavona $[M+H]^+$ = 581, ginkgetina $[M+H]^+$ = 567, di-*O*-metialmentoflavona $[M+H]^+$ = 567, mono-*O*-metilamenetoflavona $[M+H]^+$ = 553 e amentoflavona $[M+H]^+$ = 539. 39

Figura 4.2. Espectro de massas obtido através da análise CLAE/EM-EM do BFF. O composto tetra-O-metilamentoflavona possui o [M+H]+ = 595, tri-O-metilamentoflavona [M+H]+ = 581, ginkgetina [M+H]+ = 567, di-O-metialmentoflavona [M+H]+ = 567, mono-O-metilamenetoflavona [M+H]+ = 553 e amentoflavona [M+H]+ = 539. 40

Figura 4.3. Análise por CLAE/EM do produto per-metilado do BFF (hexa-O-metilamentoflavona). (A) Cromatograma com detecção UV, (B) Hexa-O-metilamentoflavona identificado pelo espectro de massas do pico em 13,73 min. 41

Figura 4.4. Espectro de ^1H RMN do composto hexa-O-metilamentoflavona adquirido em um equipamento de 500 MHz, em $CDCl_3$. 42

Figura 4.5. Supressão de $^1O_2$ por BFF, amentoflavona e ginkgetina, A emissão do $^1O_2$ em IV foi obtido pela sensibilização do perinaftenona ($\lambda_{exc.}$ = 355 nm). (A) Gráfico de $k_{obs.}$ vs. concentração dos compostos. (B) Emissão de luz a 1270 nm de $^1O_2$ e supressão por BFF a 1mM. 46

Figura 4.6. Eletroforese horizontal em gel de agarose mostrando a proteção por BFF contra quebras em DNA plasmidiais provocados por $^1O_2$, após 100 min de incubação. **1**, plasmídio pBluescript controle; **2**, plasmídio + $NDPO_2$ 20 mM; **3**, plasmídio + BFF 1 mM; **4**, plasmídio + $NDPO_2$ 20 mM + BFF 5 mM; **5**, plasmídio + $NDPO_2$ 20 mM + BFF 10 mM; **6**, plasmídio + $NDPO_2$ 20 mM + BFF 20 mM; **7**, plasmídio + $NDPO_2$ 20 mM + BFF 50 mM; **8**, plasmídio + $NDPO_2$ 20 mM + BFF 100 mM. Formas CA e SE são circular aberta e superenovelada, respectivamente. 48

Figura 4.7. Inibição da formação da CA por BFF, quercetina, rutina e Trolox® induzido por $^1O_2$ gerado por $NDPO_2$ em DNA plasmidial de pBluescript. 49

Figura 4.8. Proteção por BFF, rutina, quercetina, ginkgetina, amentoflavona e Trolox® (1 a 100 mM) contra formação de CA induzida por $^1O_2$ em plasmídio PUC 19. 50

Figura 4.9. Efeito inibitório de BFF, flavonóides quercetina e rutina, biflavonóides amentoflavona e ginkgetina e Trolox® sobre a formação de CA induzido pela reação de Fenton. A formação de ssb foi monitorado pela formação da forma CA no plasmídio pBluescript DNA. 52

Figura 4.10. Inibição da peroxidação induzida por radiação UV, em lipossomas de fosfatidilcolina, por concentrações crescentes de quercetina, rutina, BFF, a-tocoferol, amentoflavona e ginkgetina. A atividade antioxidante foi determinada pela análise da formação de TBARS. 53

Figura 4.11. Efeito inibitório sobre a lipoperoxidação do BFF, α-tocoferol e adição de ambos. 54

Figura 4.12. Proteção contra lipoperoxidação induzida por reação de Fenton. 55

Figura 4.13. Espectro de massas (IES/EM) da complexação entre quercetina e íons metálicos. **4.13A** Detecção de quercetina (100 μM) na forma protonada $(M+H)^+$ = 303; **4.13B** espectro de massas do complexo entre quercetina e Al^{3+}. 57

Figura 4.14. Espectro de massas da (**A**) rutina e complexado com os metais (**B**) Al^{3+}, (**C**) Cu^{2+} e (**D**) Fe^{3+}. 59

Figura 4.15. Espectro de massas da (**A**) amentoflavona e complexo com os metais (**B**) Al^{3+}, (**C**) Cu^{2+} e (**D**) Fe^{3+}. 60

Figura 4.16. Estrutura tridimensional de equilíbrio calculada com o método semi-empírico AM-1 da amentoflavona (**A**) e do complexo da amentoflavona com o alumínio (2:1) (**B**). 61

Figura 4.17. Espectro de massas da (**A**) Ginkgetina e complexo com os metais (**B**) Al^{3+} e (**C**) Fe^{3+}. 63

Figura 4.18. Configuração da geometria de equilíbrio da ginkgetina neutra. 63

Figura 4.19. Cromatogramas do DNA de timo de bezerro após a irradiação com luz UV (**1**) Identificação das bases do DNA por deteção UV a 260 nm. O pico **A** em 6,4 min corresponde a 2'-desoxicitidina, o **B** em 16,5 min a 2'-desoxiguanosina, o **C** em 19,5 min a timidina, o **D** em 41,5 min a 2'-desoxiadenosina; (**2**) Deteção do 8-oxodGuo em 24,7 min por CLAE/EQ. Condições de análise vide Materiais e Métodos. 65

Figura 4.20. Formação de 8-oxodGuo em DNA de timo de bezerro após a irradiação por 2 horas de radiação UV. Deteção de nível basal, com adição de 100 e 500 mM de BFF e controle com metanol. 66

Figura 4.21. Espectro de massas do CPD formado após a exposição do DNA de timo de bezerro à radiação UV-C. 67

Figura 4.22. Espectro de massas dos dímeros do 6-4PP formado após a exposição do DNA de timo de bezerro à radiação UV-C. 68

Figura 4.23. Espectro de massas do padrão interno citidina e sua fragmentação característica. 69

Figura 4.24. Cromatograma obtido através da detecção por massas dos dímeros de pirimidina: **A**) 6-4PP, transição 545 para 432, **B**) CPD, transição 545 para 432 e o padrão interno **C**) citidina, transição 242 para 109. 70

Figura 4.25. Cromatograma obtido através da detecção por massas dos dímeros de pirimidina: **A**) 6-4PP, transição 545 para 432, **B**) CPD, transição 545 para 432 e o padrão interno **C**) citidina, transição 242 para 109. 71

Figura 4.26. Curva de calibração do CPD obtida através dos dados da integração do cromatograma obtido do espectro de massas no modo MRM. 72

Figura 4.27. Análise da formação de dímero ciclobutânico de pirimidina em DNA de timo de bezerro irradiado por UV-B por 1 hora, e irradiação na presença de BFF e p-metoxicinamato de octila em concentrações crescentes. 73

Figura 4.28. Espectro na região do ultravioleta do BFF extraído das células, após a incubação pelo período determinado. 76

Figura 4.29. Concentração e porcentagem do BFF incorporado nas células após a incubação destas com βCBFF por 5, 18, 24 e 28 horas. 76

Figura 4.30. Avaliação da citotoxicidade do BFF (4,4 mg/ml) e H_2O_2 500 mM, após 24 horas de exposição, em células de mamíferos CV1-P, comparados

com o controle. 78

Tabela 4.1. Identificação e caracterização dos seis biflavonóides majoritários do BFF por CLAE/EM. 37

Tabela 4.2 Deslocamentos químicos no espectro de ^{1}H RMN em $CDCl_3$ do hexa-O-metilamentoflavona 43

Tabela 4.3. Deslocamentos químicos no espectro de ^{13}C RMN em $CDCl_3$ do produto hexa-O-metilamentoflavona 44

Tabela 4.4. Constante supressão total $k_t = (k_q + k_r)$ do $^{1}O_2$ por flavonóides em acetona. 47

Tabela 4.5. Complexos formados entre flavonóides, biflavonóides e íons metálicos, m/z detectado e abundância relativa de cada complexo. 58

Esquema 1: Fluxograma de separação dos biflavonóides de folhas de araucária. 25

Abreviações

δ	Deslocamento químico
τ	Tempo de vida do $^1O_2$
βCBFF	BFF inserido em β-ciclodextrina
$\lambda_{máx.}$	Comprimento de onda de máxima absorção
$^{\bullet}NO$	Óxido nítrico
$^{\bullet}OH$	Radical hidroxila
$^{\bullet}OOH$	Radical hidroperoxila
$^1O_2$	Oxigênio singlete
6-4PP	Aduto de pirimidina (6-4) pirimidona
BFF	Fração de Biflavonóides
CA	Forma circular aberta do DNA plasmidial
$CCl_3^{\bullet}$	Radical triclorometila
CCl_4	Tetracloreto de carbono
$CCl_3O_2^{\bullet}$	Radical triclorometil peroxila
$CDCl_3$	Clorofórmio deuterado
CLAE/EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas
CLAE/EM-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massas em tandem
CLAE/EQ	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector eletroquímico
CPD	Dímeros ciclobutânicos de pirimidina
CuZnSOD	Superóxido dismutase cobre zinco
CV1-P	Fibroblastos renais de macaco verde africano
D.O.	Densidade ótica
dGuo	2'-desoxiguanosina
DME	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EM	Espectrômetro de massas
ES/EM	Espectrometria de massas com ionização por "electrospray"

FC	Fosfatidilcolina
Fpg	Formamidopirimidina DNA *N*-glicosilase
GPX	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HOCl	Ácido hipocloroso
Hz	Hertz
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
IV	Infra-vermelho
J	Constante de acoplamento
k_d	Coeficiente linear
k_t	Coeficiente angular
$L^{\bullet}$	Radical lipídico
LB	Luria-Bertani Medium
LH	Ácido graxo poliinsaturado
$LOO^{\bullet}$	Radical peroxila
LOOH	Hidroperóxido lipídico
m/z	Relação massa carga
MDA	Malonaldeído
MnSOD	Superóxido dismutase manganês
MRM	Monitoramento de reação múltipla
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazoil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídio (forma reduzida)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato (forma reduzida)
$O_2^{\bullet-}$	Radical superóxido
O_3	Ozônio
OMe	Grupo metoxila
$ONOO^-$	Peroxinitrito
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância magnética nuclear
$RO_2^{\bullet}$	Radical peroxila
RONS	Espécies reativas de nitrogênio e de oxigênio

ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotações por minuto
SE	Forma super-enovelada do DNA plasmidiall
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutase
ssb	Quebra de simples fita
TBARS	Substâncias reativas a ácido tiobarbitúrico
TBE	Tris-Borato-EDTA
TLC	Cromatografia de camada delgada

Resumo

A *Araucaria angustifolia* é uma conífera endêmica das regiões sul e sudeste do Brasil sendo considerada uma espécie em extinção devido ao extenso extrativismo madeireiro. Atualmente, existem inúmeros projetos visando o reflorestamento e o uso sustentável deste pinheiro. Em vista destes pontos, o estudo das propriedades dos componentes das folhas com o intuito da utilização destes com fins comerciais tornou-se de extrema importância.

As suas folhas foram submetidas à extração com solventes e foram identificados seis biflavonóides majoritários, dentre estes a amentoflavona e a ginkgetina, que são apontados como agentes contra inflamações e artrites. A fração rica de biflavonóides (BFF) extraída da araucaria foi testada frente a sua atividade em proteger contra danos em biomoléculas provocadas por espécies reativas de oxigênio, capacidade em quelar metais e proteção contra raios UV.

A capacidade do BFF em proteger contra danos provocados por espécies reativas de oxigênio foi comparado com compostos conhecidamente antioxidantes, como o α-tocoferol, Trolox®, quercetina, rutina e com padrões de biflavonóides, a amentoflavona e ginkgetina.

O BFF demonstrou que possui uma constante de supressão do $^1O_2$ (50×10^6 $M^{-1}s^{-1}$), superior ao da quercetina (9×10^6 $M^{-1}s^{-1}$) e foi o mais eficiente na proteção contra quebras de simples fita em DNA plasmidial, provocado por esta espécie reativa. Ainda em relação à proteção de DNA plasmidial o BFF foi capaz de proteger também contra estes danos provocados através da reação de Fenton, apesar de não demonstrar a mesma eficiência da quercetina que mostrou ser um potente protetor destes danos.

O BFF protegeu contra lipoperoxidação em lipossomos de fosfatidilcolina induzida por raios UV e reação de Fenton. Em análises realizadas com espectrometria de massas foi observada a formação de complexos destes biflavonóides com íons metálicos como ferro, cobre e alumínio que possuem um papel importante na formação de radicais livres.

Em relação à capacidade fotoprotetora do BFF, este inibiu a formação de dímeros de pirimidina que são apontados como causadores de câncer de pele induzidos, principalmente por radiação UV-B. Esta ação protetora foi superior àquela conferida ao *p*-metoxicinamato de octila, um conhecido fotoprotetor.

Com o intuito de permitir a solubilização do BFF em soluções aquosas e assim, avaliar a ação do BFF em células, incorporou-se o BFF em ciclodextrina. Essa inclusão favoreceu a incorporação de BFF em células CV1-P na concentração aproximada de 0,4 μg/ml após 24 horas de incubação. Essa concentração incorporada não demonstrou ser tóxica para as células no teste com MTT.

Assim, o BFF tem despertado grande interesse em relação ao seu potencial na utilização nas mais variadas áreas como cosmética, alimentos e fitoterápicos.

Abstract

Araucaria angustifolia is an endemic conifer in southern and southeastern Brazil endangered due the extensive loggings. Nowadays, there are several projects aiming the recovering of forest and the sustainable use of their products.

Its needles contain six major amentoflavone-type biflavonoids, including amentoflavone, ginkgetin and tetra-O-methylamentoflavone, all reported to possess a variety of biological activities such as anti-inflammatory and antiarthritic activities. The organic fraction rich in biflavonoids (BFF) extracted from *Araucaria* was evaluated regarding its activity to protect against damage to biomolecules promoted by reactive oxygen species, its capacity to chelate ion metals and protection it affords against UV radiation.

The ability of the BFF prevent oxidative damages was compared to antioxidants compounds, such as, α-tocopherol, Trolox®, quercetin, rutin and with standards of biflavonoids amentoflavone and ginkgetin.

The BFF showed a higher $^1O_2$ quenching rate (50×10^6 $M^{-1}s^{-1}$) than individual quercetin (9×10^6 $M^{-1}s^{-1}$). Accordingly, BFF was shown to strongly inhibit plasmid DNA single strand break (ssb) induced by $^1O_2$ generated by $NDPO_2$. On the other hand, BFF did not protect plasmid DNA against ssb triggered by the Fenton reaction as effectively as quercetin and rutin.

BFF, quercetin and rutin were able to protect liposomes against peroxidative degradation caused by UV-irradiation. Since there is considerable evidence relating oxygen species with UV phospholipid degradation, the protective effect of quercetin and rutin is likely to result from their well-known scavenging activity against hydroxyl and peroxyl radicals and superoxide anion radicals. Using electrospray ionization mass spectrometry, metal (Fe^{3+}, Cu^{2+} and Al^{3+}) biflavonoids complexes were also detected and characterized.

The sunlight UV region is believed to be largely responsible for the greatest damage to the skin including indution of the pirimidine dimers formation suggested to be implicated in skin cancer. BFF was able to diminish the formation of this photoproduct more efficiently tham octyl methoxycinnamate.

Solubilization of BFF in aqueous solutions was performed using cyclodextrin, which allowed the incorporation of 0,4 μg/ml of biflavonoids in CV1-P cells after 24 hours. In this conditions the BFF was not cytotoxic to CV1-P evaluated by the MTT assay.

Altogether, these properties point BFF as an excellent candidate for successful employment as antioxidant compound in several systems.

1) Introdução

Há mais de 2,5 bilhões de anos, a evolução das cianobactérias, organismos fotossintetizantes, permitiu o aumento da concentração de oxigênio (O_2) na superfície terrestre. Esse evento foi de importância crucial para o desenvolvimento e sobrevivência de microrganismos e plantas em solo firme, que levou à formação de ozônio (O_3) que, junto com o O_2 promoveu a filtração dos raios ultravioletas, muito danosos aos seres vivos (Halliwell e Gutteridge, 1999).

O pico da concentração de oxigênio atmosférico foi estimado em 35%, aproximadamente; posteriormente, caiu a 15% no final do paleozóico e atingiu os níveis atuais (21%) há aproximadamente 150 milhões de anos (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Os primeiros organismos que surgiram na Terra foram anaeróbios e com o aumento da concentração do O_2, muitos deles foram exterminados. Provavelmente, os organismos anaeróbicos atuais são descendentes desses, que por pressão evolutiva foram confinados a regiões com pouca concentração de O_2 ou adquiriam uma vantagem evolutiva com sistemas defensivos antioxidantes para proteção contra toxicidade do O_2 e prosseguiram com o processo evolutivo resultando em organismos aeróbicos. Assim, estes organismos, além de tolerar a presença de O_2, começaram a utilizá-lo para as transformações metabólicas o que possibilitou maior eficiência na extração de energia dos alimentos consumidos, transformando a glicose consumida, em água e dióxido de carbono e energia na forma de ATP por intermédio da oxidação pelo oxigênio (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Apesar dessa importância essencial, a molécula de O_2 possui toxicidade potencial contra as células. Essa característica ambígua deve-se ao fato do oxigênio possuir uma configuração eletrônica com forte tendência a receber um elétron de cada vez, formando, durante as reações, espécies intermediárias que são altamente oxidantes (Halliwell e Gutteridge, 1999). Assim, a evolução dos organismos aeróbios e o desenvolvimento de seres vivos cada vez mais complexos foram assistidos principalmente, pelo aperfeiçoamento de mecanismos protetores contra os efeitos tóxicos de várias entidades como o O_2 e suas espécies reativas, espécies reativas de nitrogênio, radiação UV, dentre outros.

Em 1969, foi demonstrada em células aeróbicas a existência de uma enzima que catalisa especificamente a remoção do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), a superóxido dismutase (SOD) (McCord e Fridovich, 1969). A partir dessa descoberta, os radicais de oxigênio passaram a ser considerados como agentes que provocam danos celulares em muitas condições patofisiológicas, incluindo a injúria causada por reperfusão após um período de isquemia, câncer, a ação de algumas drogas anti-tumorais, inflamação, a doença de Parkinson, catarata, a aterosclerose e o envelhecimento, além dos danos causados por radiação e hiperóxia (Sies, 1986; Halliwell, 1987; Jamieson, 1989).

1.1) Espécies Reativas de Oxigênio

Dentre as espécies reativas de oxigênio estão incluídos os radicais de oxigênio como radicais superóxido, radicais hidroxila ($^{\bullet}OH$) e radicais peroxila ($RO_2^{\bullet}$) e as espécies não radicalares, oxigênio singlete ($^1O_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peroxinitrito ($ONOO^-$), ácido hipocloroso (HOCl) e ozônio (O_3) (Augusto e col., 1995).

A principal fonte endógena de oxidantes nas células é como consequência da respiração aeróbica normal, a mitocôndria consome O_2, reduzindo-a por etapas monoeletrônicas sequenciais para produzir H_2O. Produtos inevitáveis desse processo são os $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e $^{\bullet}OH$. A redução de O_2 a H_2O pela citocromo *c* oxidase mitocondrial envolve a transferência de 4 elétrons sem formação de radicais livres intermediários (Chance e col., 1979). A geração de $O_2^{\bullet-}$ pela mitocôndria ocorre quando os outros componentes da cadeia deixam “vazar” elétrons diretamente para o O_2 ao transferirem-no para o próximo componente da cadeia. Na presença de níveis normais de O_2, cerca de 1 a 2% do O_2 consumido pelas mitocôndrias é reduzido para $O_2^{\bullet-}$ (Kowaltowski e Vercesi, 1999). A ocorrência de $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e um metal de transição levam à produção de $^{\bullet}OH$, uma espécie muito reativa, através da reação de Haber-Weiss (Haber e Weiss, 1932).

Células fagocíticas destroem células infectadas com bactérias ou vírus com um pulso oxidativo de óxido nítrico ($^{\bullet}NO$), $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e OCl^- (hipoclorito). Infecções crônicas por vírus, bactérias ou parasitas resultam em atividades fagocíticas

crônicas e consequente inflamação crônica, que é um fator de risco para o desenvolvimento do câncer (Ames e col., 1993).

Peroxissomos são organelas responsáveis pela degradação de ácidos graxos de cadeia longa e outras moléculas e produzem H_2O_2 como produto, o qual é degradado pela catalase. Evidências sugerem que, sob certas condições, alguns peróxidos escapam da degradação, podendo atingir outros compartimentos das células e aumentando, assim, os danos oxidativos ao DNA (Masters e Holmes, 1977).

As espécies reativas de oxigênio produzidas pelos sistemas de transporte de elétrons do retículo endoplasmático e da membrana nuclear também podem desencadear reações intra-organela e citossólica (Freeman e Crapo, 1982). Essas membranas contêm os citocromos P450 e b5, os quais podem oxidar ácidos graxos poliinsaturados (Capdevila e col., 1981) e xenobióticos (Chignell, 1979; Aust e col., 1972), entre outros substratos, às custas de O_2. As espécies reativas são geradas quando o O_2 é reduzido a $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 ao invés de ser adicionado ao substrato. Os citocromos P450 indutíveis exibem altas taxas de redução de O_2 a $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 (Freeman e Crapo, 1982).

O $^{\bullet}NO$ é um radical livre produzido fisiologicamente por uma classe de enzimas denominada óxido nítrico sintases. Essa espécie não é muito reativa, porém sua interação com o $O_2^{\bullet-}$ gera um potente oxidante, o $ONOO^-$, cuja forma protonada (ONOOH) é uma espécie citotóxica altamente oxidante (Pryor e Squadrito, 1995). A adição de $ONOO^-$ a células ou meios fisiológicos induz vários danos em biomoléculas tais como oxidação de lipídios (Grahan e col., 1993), nitração e desaminação de bases do DNA (Yermilov e col., 1996) e nitração de grupos aromáticos de aminoácidos em proteínas (Beckman e Koppenol, 1996). Pode levar, ainda, à formação de diversas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS), a partir do $ONOO^-$, que podem também causar danos oxidativos (Santos e col., 2000).

A geração de ROS por transferência de energia eletrônica forma oxigênio excitado ao estado singlete, uma espécie altamente eletrofílica oxidante. A fotossensibilização é uma das formas de geração de $^1O_2$, no qual um sensibilizador adequado é irradiado com luz na presença de O_2. Primeiramente, ocorre a excitação eletrônica do sensibilizador ao estado singlete (^{1}sens*) pela energia da luz. Assim por cruzamento intersistema o sensibilizador passa ao estado excitado

triplete (^{3}sens*). A partir dessa etapa, são possíveis dois caminhos para o ^{3}sens*. No mecanismo tipo I, há transferência de elétron ou energia do ^{3}sens* para os componentes do sistema gerando radicais que podem reagir com O_2 resultando em produtos oxidados. No mecanismo do tipo II, ocorre transferência de energia do ^{3}sens* para o O_2, gerando $^1O_2$ (Foote, 1991).

Os sistemas biológicos susceptíveis à fotossensibilização e assim à formação de $^1O_2$ incluem o cloroplasto e células da retina, os quais contêm clorofila e retinal, respectivamente (Halliwell e Gutteridge, 1999; Piette, 1991). Porfirias cutâneas são exemplos de doenças onde há danos provocados por fotossensibilização, no qual um defeito na biossíntese do grupo heme provoca acúmulo de porfirinas na pele, que com a exposição ao sol sofre sensibilização e produção de $^1O_2$ (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Alguns processos de geração química de $^1O_2$ foram desenvolvidos com o intuito de produzir essa espécie em condições propícias para estudos em sistemas biológicos. Uma das principais fontes é a termodecomposição de endoperóxidos que têm sido utilizados como uma fonte limpa, além de ser de fácil manuseio (Saito e col., 1981; Aubry e Cazin, 1988; Di Mascio e Sies, 1989; Martinez e col., 2000).

No organismo existe um delicado equilíbrio entre a geração de espécies reativas e sua supressão que envolve enzimas tais como: a catalase, as quais funcionam como um catalisador da decomposição do H_2O_2; a glutationa peroxidase, que também leva à destruição de peróxidos; e a superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do ânion superóxido. Antioxidantes não enzimáticos como os carotenóides, flavonóides, vitamina E e C também participa de proteção antioxidante. Existem ainda sistemas enzimáticos de reparo para corrigir lesões provocadas por espécies que dominam esse sistema de defesa antioxidante (Halliwell e Gutteridge, 1999). Quando ocorre um desequilíbrio e a geração dessas espécies reativas se sobrepõe às defesas antioxidantes, resulta em um estresse oxidativo (Sies, 1985), que pode levar a lesões em biomoléculas, resultando em peroxidação lipídica, despolimerização de açúcares, inativação de proteínas, oxidação de bases e quebras de fitas do DNA. Esses danos são apontados como fatores que contribuem para o aparecimento de várias doenças e podem promover o envelhecimento (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Entre as biomoléculas susceptíveis a danos pela ação de RONS, o DNA é de particular importância devido ao seu papel fundamental no metabolismo celular e

hereditariedade. Estudos *in vitro* têm demonstrado a ação de RONS nas bases nitrogenadas do DNA, e mostram que essa espécie possui maior reatividade por resíduos de guanina, 2'-desoxiguanosina (dGuo), havendo formação principalmente de 8-oxo-7,8-diidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo) (Floyd e col., 1988; Cadet e col. 1997; Burrows e Muller, 1998). Esta lesão tem um alto potencial mutagênico, uma vez que é capaz de parear com a adenina levando a uma transversão G para T (Shibutani e col., 1991; Costa de Oliveira e col., 1992). Estudos de mutagênese sítio-específica mostraram que 8-oxo-adenina, timina glicol, 5-hidroxiuracila, uracila glicol e 5-hidroxi-desoxicitidina também podem ser formados e representar lesões mutagênicas (Wang e col., 1998; Kreutzer e Essigmann, 1998). As medidas dos níveis basais de danos oxidativos no DNA, evidências a respeito de que bases oxidadas levam ao surgimento de mutações espontâneas e que dietas ricas em antioxidantes são anticarcinogênicas sugerem que danos oxidativos podem contribuir para a carcinogênese (Loft e Poulsen, 1996; Potter e Steinmetz, 1996). O DNA oxidado é reparado por uma série de glicosilases que são específicas para cada base oxidada e por enzimas de reparo por excisão de base não específicas. As enzimas bacterianas envolvidas no reparo da 8-oxodGuo em DNA são a formamidopirimidina –DNA-glicosilase (Fpg) e MutY-glicosilase. A Fpg remove 8-oxodGuo quando pareada com citosina e reconhece diversas lesões em purinas com o anel imidazol aberto (Boiteux e col., 1992). A Mut-Y-glicosilase remove a adenina quando pareada com a 8-oxodGuo (Michaels e col., 1992).

Atualmente, está bem estabelecido que a peroxidação lipídica é uma das reações que se iniciam como consequência da formação de RONS nas células e tecidos, em virtude de que os ácidos graxos poliinsaturados encontram-se em abundância nas células (Cerutti, 1985; Porter, 1986). Após iniciado, o processo se torna autocatalítico, levando à formação de hidroperóxidos e produtos secundários. A iniciação ocorre com a abstração de um átomo de hidrogênio de um ácido graxo polinsaturado (LH), levando à formação de um radical lipídico ($L^{\bullet}$). Esse é estabilizado por ressonância e adquire a estrutura canônica de dieno conjugado ao reagir com O_2. A adição, extremamente rápida, de uma molécula de oxigênio ao radical lipídico leva à formação do radical peroxila ($LOO^{\bullet}$). Esse é capaz de reagir com outro ácido graxo polinsaturado, iniciando um novo ciclo de oxidação que leva à formação de hidroperóxido lipídico (LOOH) e outro radical lipídico ($L^{\bullet}$). A fase de propagação compreende o início de uma nova cadeia de oxidação pelo radical

peroxila ($LOO^{\bullet}$) e a decomposição dos hidroperóxidos lipídicos em outros radicais intermediários. A decomposição dos hidroperóxidos lipídicos pode, além de gerar radicais que propagam a peroxidação lipídica, formar produtos não radicalares. Esses produtos secundários, como aldeídos, cetonas, epóxidos dentre outros são mais estáveis que os radicais livres que iniciaram o processo e os radicais lipídicos formados durante a fase de propagação, consequentemente, podem atingir pontos distantes do local em que se formaram (Vaca e col., 1988). Os aldeídos α e β insaturados e mais variantes estruturais além de malonaldeído que são agentes alquilantes com capacidade de se ligarem covalentemente a grupos nucleofílicos presentes em DNA, peptídios e proteínas, provocando alterações nas funções destas moléculas, e por isso estão associadas a inúmeras doenças (Brambilla e col., 1986; Witz, 1989; Hidalgo e Zamora, 2000).

1.2) Radiação Ultravioleta

A exposição aguda e crônica à radiação solar tem sido relacionada com uma série de danos na pele, como a fototoxicidade, fotoalergia, agravamento das doenças dérmicas pré-existentes, fotodermatoses, bem como imunossupressão, fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese (Fuchs, 1998).

No Brasil, o câncer mais freqüente é o de pele, correspondendo a cerca de 25% de todos os tumores diagnosticados em todas as regiões geográficas. Esse é mundialmente o tipo de câncer com o maior crescimento em incidência. A radiação ultravioleta natural, proveniente do sol, é o seu maior agente etiológico. De acordo com o comprimento de onda, os raios ultravioletas (raios UV) são classificados em raios UV-A (320-400nm), UV-B (280-320nm) e UV-C (100 a 280 nm). Os raios UV-B são carcinogênicos, não penetram muito profundamente na pele, mas a sua ocorrência tem aumentado muito, progressivamente à destruição da camada de ozônio, o que tem permitido, inclusive, que raios UV-C alcancem mais a atmosfera terrestre, sendo esses muito mais carcinogênicos. Uma pequena diminuição nos níveis de O_3 causa um grande aumento nos efeitos biológicos causados pela radiação de UV (Madronich, 1992). A cada 1 % de redução do O_3 constatou-se um aumento de 1,3 a 1,8 % da radiação UV-B que atinge a biosfera (Bjorn e col., 1999). Por sua vez, os raios UV-A independem daquela camada e penetram

profundamente na pele, sendo os principais causadores do envelhecimento precoce podendo causar câncer de pele em indivíduos que se expõem a eles em horários de alta incidência, continuamente e ao longo de muitos anos.

Uma das hipóteses da gênese de patologias dermatológicas devido à exposição solar é a formação de radicais livres, espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (RONS) e mobilização de metais de transição (Fuchs, 1999; Black, 1987). O mecanismo envolvido na geração de modificações oxidativas no DNA ainda está por ser determinado, particularmente, no que diz respeito aos cromóforos específicos e às espécies reativas envolvidas (Cadet e col., 1997). Os UV-B são consideradas as mais mutagênicos e induzem a formação de dímeros de timidina, estas lesões são resultado da absorção direta de fótons pelas bases do DNA. São dímeros ciclobutânicos da pirimidina (CPDs), aduto de pirimidina (6-4) pirimidona (6-4PPs) e isômero de valência de Dewar (**Figura 1.1**) (Carty e col., 1996; Lawrence e col., 1993; Douki e col., 2000A; Douki e col., 2000B). Os CPDs e 6-4PPs formam, aproximadamente na proporção de 75 e 25 %, o isômero de valência de Dewar é formado pela fotoisomerização do 6-4PPs por comprimentos de onda superiores a 290 nm. Estas lesões causam distorções na dupla-hélice do DNA. O reparo desses danos em DNA em humanos ocorre por excisão de nucleotídios (Sinha e col., 2002).

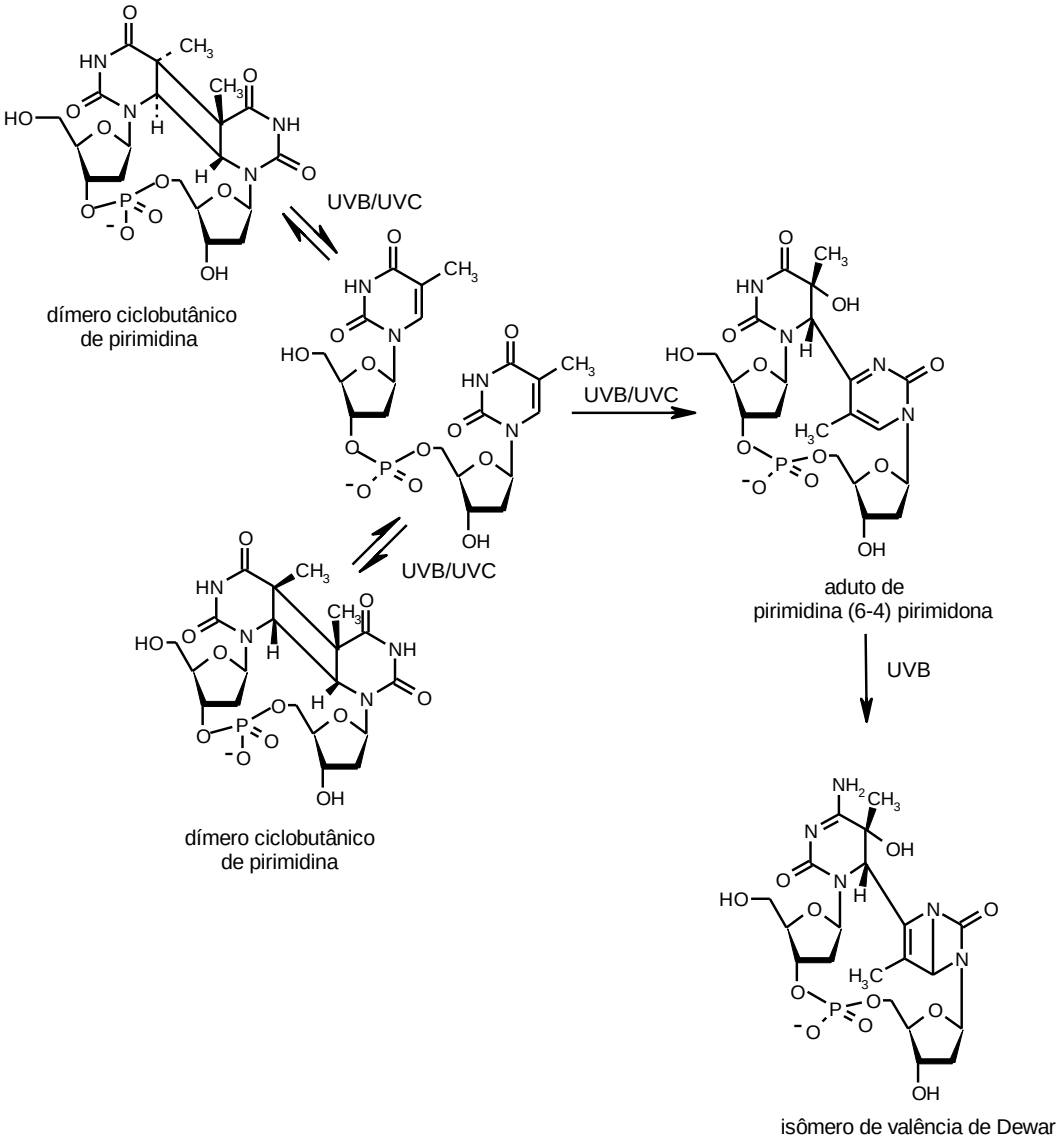


Figura 1.1. Estruturas dos fotoprodutos diméricos de timina induzidos por radiação UV.

1.3) Antioxidantes

O equilíbrio entre a formação de espécies pró-oxidantes e antioxidantes é mantido principalmente pela diversidade do arsenal de defesa que as células dispõem, agentes que cataliticamente removem radicais livres e outras espécies reativas, como as enzimas superóxido dismutase, catalase e peroxidase; proteínas como a transferrina e a ceruloplasmina que minimizam a disponibilidade de agentes pró-oxidantes como os íons ferro, cobre o grupo heme; proteínas que protegem contra danos diversos como as proteínas de choque térmico; e compostos de baixo peso molecular que suprimem as espécies reativas como a glutationa e

componentes derivados da dieta como o α-tocoferol, ácido ascórbico, carotenóides e flavonóides.

A superóxido dismutase SOD, tem a função de catalisar a remoção de $O_2^{\bullet -}$ dismutando-a em H_2O_2. A CuZnSOD está presente no citossol de todas as células eucarióticas, o Zn auxilia na estabilização da enzima, o Cu participa da reação de dismutação e a MnSOD está presente nas mitocôndrias e possui o Mn no sítio ativo (McCord e Fridovich, 1969).

A maioria das células aeróbicas contém catalase, distribuída por todos os órgãos dos mamíferos. Esta enzima possui o papel de catalisar a decomposição do H_2O_2, oriundo da dismutação do $O_2^{\bullet -}$ e de várias oxidases, a O_2 no estado fundamental (Reid e col., 1981).

Outra enzima que remove o H_2O_2 são as peroxidases, que o utilizam para oxidar outro substrato. A glutationa peroxidase (GPX) remove o H_2O_2 utilizando a glutationa (GSH) como substrato (Chance e col., 1979).

Proteínas como a transferrina e a ceruloplasmina auxiliam na defesa antioxidante, impedindo que íons de metais circulem livremente esses íons podem ser catalisadores de reações de autoxidação, conversão de H_2O_2 a $^{\bullet}OH$ e decomposição de peróxidos lipídicos em radicais peroxilas e alcoxilas (Yang e col., 1996).

Existem evidências consideráveis a partir de estudos químicos, biológicos e epidemiológicos do papel dos componentes antioxidantes provenientes da dieta (α-tocoferol, ácido ascórbico, carotenóides e flavonóides) na manutenção da saúde e proteção contra várias doenças (Rice-Evans, 1994). Block e col. (1992), revisaram 172 estudos epidemiológicos que relatam com consistência a relação entre incidência de câncer e o consumo adequado de frutas e vegetais. Da população estudada, 25 % com baixo consumo de frutas e vegetais tiveram o dobro de incidência de câncer quando comparada com outros 25 % de alto consumo.

A vitamina E foi descoberta em 1922 como um “fator” que era essencial na dieta para a reprodução normal dos ratos. Posteriormente, foi descoberto que a vitamina E é essencial na dieta para todos os outros animais (Dierenfeld, 1989). O termo vitamina E é um termo nutricional, o qual compreende uma mistura composta por tocoferóis e tocotrienóis. Os tocoferóis e tocotrienóis atuam como potentes inibidores da cadeia de reações na lipoperoxidação, pois sequestram radicais peroxila muito rapidamente, evitando que esses radicais possam reagir com ácidos

graxos adjacentes ou com membranas protéicas. A constante de reação para a reação:

$$\alpha\text{-TocH} + LO_2^{\bullet} \longrightarrow \alpha\text{-Toc}^{\bullet} + LO_2H$$

é de aproximadamente, 10^6 $M^{-1}s^{-1}$, a ordem de magnitude mais de 4 vezes maior comparada àquela da reação de $LO_2^{\bullet}$ com lipídios (~10^2 $M^{-1}s^{-1}$). O radical α-Toc$^{\bullet}$ pode também reagir com outros radicais $LO_2^{\bullet}$ para formar produtos não radicalares:

$$LO_2^{\bullet} + \alpha\text{-Toc}^{\bullet} \longrightarrow \alpha\text{-TocOOL}$$

Durante a ação como antioxidante, o α-tocoferol é convertido para a forma radicalar. A sinergia entre o α-tocoferol e o ácido ascórbico permite a redução do radical α-tocoferila para α-tocoferol, o qual foi descrito em células em cultura e lipoproteínas (Burton e col., 1990).

Em 1928 o ácido ascórbico foi inicialmente isolado de glândulas adrenais, couve e laranja por Szent-Gyorgyi. Plantas e animais podem sintetizar ascorbato a partir da glicose, porém humanos, outros primatas, porcos da índia e morcegos frutívoros não possuem a enzima requerida para o último passo, e assim necessitam obter ascorbato da dieta. O ascorbato possui a função de cofator para pelo menos 8 enzimas, dentre elas, prolina hidroxilase e lisina hidroxilase, envolvidas na biossíntese do colágeno. Assim, a deficiência de ascorbato em humanos pode causar escorbuto.

O ascorbato tem mostrado uma multiplicidade de propriedades antioxidantes, protegendo várias biomoléculas contra danos provocados por espécies reativas (Ghosh e col., 1996). No entanto, alguns estudos *in vitro* também indicam a atividade pró-oxidante, o ascorbato age como redutor do ferro, assim, uma mistura de íons cobre ou ferro com ácido ascórbico pode causar danos em lipídios e proteínas *in vitro* (Halliwell e Gutteridge, 1990).

Carotenóides são pigmentos orgânicos lipofílicos biossintetizados por plantas e alguns microrganismos (Stah e Sies, 1996; Stahl e Sies, 2002). Estudos demonstram que populações com dietas ricas em carotenóides apresentam menor incidência de problemas cardíacos tendo sido observado uma relação inversa entre a taxa de carotenóides e a presença de certos tipos de câncer como do pulmão e do trato intestinal (Ames, 1983; Methews-Roth, 1985). Estudando as atividades antioxidantes desses carotenóides relata-se a propriedade de suprimir o $^1O_2$ (Foote e col., 1970; Krinsky, 1991; Di Mascio e col., 1989B; Di Mascio e col., 1992,

Yamaguchi e col., 1999) e a habilidade de sequestrar radicais hidroxila (Foote e Denny, 1968; Burton e Ingold, 1984).

Ervas e especiarias têm sido utilizadas há muitos anos na preservação de alimentos. Extratos de salvia, alecrim, pimenta, estragão, gengibre, tomilho e orégano são inibidores de lipoperoxidação, ação promovida, principalmente, pela grande quantidade de fenólicos que contêm, como o ácido carnosínico e ácido rosmárico em alecrim, desidrozingerona em gengibre e amidas fenólicas em pimenta do reino (Porter, 1993).

Estudos epidemiológicos têm mostrado evidências de que os polifenóis possuem atividade antioxidantes *in vivo,* como o "Zutphen elderly study" que indicou a relação inversa entre a morte por doenças coronarianas e o consumo de flavonóides, oriundas de chás, frutas e vegetais (Hertog e col., 1993). O excessivo consumo de ácidos graxos saturados na dieta tem sido relacionado com altos índices de doenças coronarianas e arteriosclerose, mas em algumas regiões da França relata-se o fenômeno do "paradoxo francês", ou seja, apesar da dieta muito calórica a incidência de doenças relacionadas ao coração é baixa. Esse fato é atribuído ao consumo regular de vinho tinto que contém níveis elevados de fenólicos, inclusive flavonóides que podem atuar diminuindo as reações de lipoperoxidação e assim diminuir a formação de trombos que poderiam causar danos às artérias (Frankel e col., 1993).

Os polifenólicos de chá verde têm despertado interesse devido a sua propriedade em agir contra danos induzidos por UV (Sies e Stahl, 2004). Estudos em animais mostram evidências de que polifenólicos de chá, quando ingeridos ou aplicados topicamente amenizam as reações adversas da exposição à radiação, como eritemas e peroxidação lipídica (Kim e col., 2001)

1.4) Flavonóides

A origem das primeiras plantas foi em torno de 470 x 10^6 de anos atrás. A evolução de plantas terrestres foi possível pela formação da camada de ozônio, que agiu como um filtro contra a radiação UV-C e parcialmente a UV-B. Atualmente, é bem aceito que o desenvolvimento da biossíntese de fenólicos, parcialmente induzidos pela radiação UVB, foi de extrema importância para conquista de solo

firme pelas plantas (Stafford, 1991). Em plantas, a radiação UV-B pode causar vários danos, principalmente, a formação de dímeros de pirimidina, formação de espécies reativas (Hollósy, 2002), peroxidação de membranas (Takeuchi, e col. 1996), danos ao sistema fotossintético (Cen e Bornman, 1990), rompimento da membrana tilacóide (Kramer, e col., 1991) e redução da quantidade de clorofila pela redução de expressão genética (Cen e Bornman, 1990). As plantas desenvolveram diversos sistemas de defesa para a proteção contra esses danos. Podem ser citados o espalhamento e reflexão da radiação pelas estruturas cuticulares e epidermais como suberina, cutina e pêlos epidermais (Karabourniotis, e col., 1993), fotoliases que promovem a monomerização de dímeros (Stapleton, 1992), reparo por excisão de base e ainda sequestro das espécies reativas por enzimas e antioxidantes (Takeuchi e col., 1996), além da ação dos fotoprotetores como os flavonóides e outros pigmentos (Caldwell, 1979).

Flavonóides são substâncias de ampla ocorrência no reino vegetal que colorem frutos, folhas, flores, caules e raízes abrangendo a região do azul ao amarelo (**Figura 1.2**). Somente as plantas possuem o arsenal biossintético para produção dos flavonóides; a exceção seria o *Echinophora lamellosa*, uma espécie de coral marinho e os fungos, *Aspergillus candidus* (Bird e Marshall, 1965) e *Phallus impudicus* (Bohm, 1975). Assim, os flavonóides são encontrados em briófitas, pteridófitas, gimnospermas e angiospermas (Markham, 1988). Os flavonóides podem ser divididos em várias classes,: antocianinas, flavonas, flavonols, flavanonas, diidroflavonols, chalconas, auronas, flavononas, flavanas, protoantocianidinas, isoflavonóides e biflavonoides (**Figura 1.2**). Além de que vários flavonóides possuem diferentes padrões de hidroxilação, metoxilação, metilação e glicosilações. Assim, mais de 4000 foram reportados (Iwashina, 2000). Os flavonóides possuem como principais funções biológicas em plantas a capacidade de filtrar os raios ultravioletas sendo o espectro de absorção na região do UV em, aproximadamente, 330 e 270 nm. Estudos revelam que mutantes de *Arabidopsis* que são deficientes em flavonóides mostraram um aumento da sensibilidade para os efeitos danosos da radiação UV (Li e col., 1993). Os diversos flavonóides também possuem atividade antioxidante (Olsson, 1998), agem como atratores de animais polinizadores, (Harnborne, 1980), são importantes compostos de defesa contra patógenos e predadores herbívoros, além de atuarem também na sinalização (Philips, 1994).

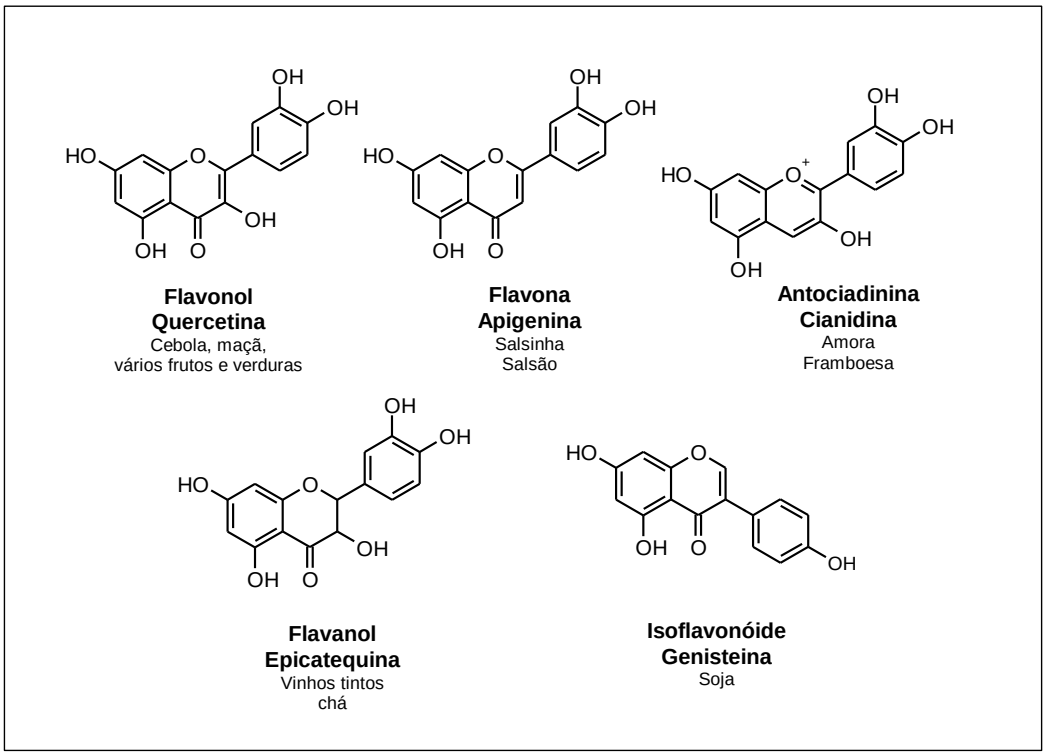


Figura 1.2. Estruturas de alguns flavonóides mais conhecidos.

Os flavonóides têm atraído grande interesse devido às suas funções biológicas e aplicações farmacológicas. São constituintes importantes da dieta humana, sendo encontrados principalmente em frutas e vegetais. Pode-se consumir ,em média, até 1 g por dia. Vinho tinto, chás, café e cerveja também são fontes abundantes de flavonóides (Di Carlo e col., 1999).

Durante séculos, preparações contendo flavonóides foram utilizadas, para o tratamento de várias doenças, tanto por leigos como por médicos (Wollenweber, 1988; Middleton, 1984; Havsteen, 1983). Alguns fármacos constituídos de extratos vegetais contendo flavonóides, como o Daflon e o Pycnogenol, já são comercializados como antinflamatórios e, também para o tratamento de insuficiência venosa crônica (Lerond, 1994; Packer e col., 1999). Atualmente, têm-se descrito um número cada vez maior de atividades biológicas destas moléculas, incluindo atividade anticarcinogênica, antinflamatória, antibacteriana, antiviral, miméticos de estrógenos e estimulante do sistema imunológico (Rice-Evans, 1994). Podem também proteger hepatócitos contra danos causados por tetracloreto de carbono (Añón e col., 1992).

São considerados, sobretudo, como antioxidantes, sendo apontados como supressores de vários RONS como $O_2^{\bullet-}$ (El-Sukkary e col., 1981), $^{\bullet}OH$ (Husain e

col., 1987), $RO_2^{\bullet}$ (Torel e col., 1988) e de $^1O_2$ (Tournaire e col., 1993; Devasagayan e col., 1995), agindo também como inibidores da peroxidação lipídica. Os flavonóides agem como doadores de hidrogênio e podem reagir com radicais numa reação de término, a qual quebra o ciclo de formação de novos radicais. O radical fenólico formado é muito mais estável que a espécie inicial, minimizando as reações deletérias. Esses radicais são capazes de difundir-se no meio, e posteriormente, serem reduzidos por redutores intracelulares como a glutationa (Stoyanovosky, 1996) ou ascorbato (Yamasaki,1998), ou acoplar-se com outro radical produzindo um produto inativo.

Estudos mais específicos sugeriram que os flavonóides possuem a propriedade de proteger hepatócitos contra danos causados por CCl_4, esse é ativado pelo sistema NADPH-citocromo P450 no retículo endoplasmático do fígado, formando o radical triclorometila ($CCl_3^{\bullet}$). Em condições aeróbicas há formação de uma espécie mais reativa, o radical triclorometil peroxila ($CCl_3O_2^{\bullet}$) que pode reagir com lipídios e proteínas causando necrose, os flavonóides podem impedir esse processo atuando no estágio de iniciação interferindo na ativação metabólica ou "sequestrando" os radicais derivados do CCl_4 (Añón e col., 1992; Cholbi e col., 1991).

Tournaire e col. determinaram a constante de supressão física contra $^1O_2$ (k_q), e a constante de reação química (k_r) de treze flavonóides. A constante de supressão física foi determinada utilizando-se a técnica de emissão de $^1O_2$ resolvida no tempo. Essa constante é, principalmente, dependente da presença de grupo catecol no anel B, e grupos hidroxílicos no anel C. O flavonóide com a maior constante de supressão foi a catequina ($5{,}8 \times 10^6$), uma flavana com um catecol no anel B e hidroxila no anel C.

Um outro mecanismo antioxidante, não muito estudado, resulta da interação entre os compostos fenólicos e íons metálicos levando a formação de complexos que poderiam diminuir a geração de espécies reativas catalisadas por metais (Mira e col., 2002).

Kostyuk e col. estudaram a capacidade dos flavonóides, associados com metais, de proteger injúrias celulares provocadas por asbestos. Nesse trabalho foi concluído que flavonóides complexados com metais protegiam com maior eficiência hemácias contra injúrias provocadas por asbestos, comparados com a atividade dos

flavonóides sozinhos. Sugere-se que isto se deve à facilidade desses complexos ser absorvidos pelas fibras do asbestos (Kostyuk e col., 2001).

Apesar do grande número de estudos apresentando as atividades benéficas dos flavonóides, muitos pesquisadores têm demonstrado em seus trabalhos os efeitos mutagênicos, genotóxicos e pró-oxidantes desses compostos (Metodieva e col., 1990; Nakanishi e col.; 2001). Foi demonstrado que a quercetina pode sofrer oxidação com a formação de *o*-semiquinona e *o*-quinona. Estas espécies uma vez produzidas podem favorecer a formação de radical superóxido e peróxido de hidrogênio que podem ser a causa dos efeitos pró-oxidativos (**Figura 1.3**). Em condições em que o pH está básico, os grupamentos hidroxilas do anel B podem estar desprotonados (**Equação 1**, **Figura 1.3**). Esses podem sofrer auto-oxidação com a produção concomitante de ânion superóxido e semiquinonas (**Equação 2, Figura 1.3**). Normalmente, a reação da molécula desprotonada com o oxigênio é lenta, mas esta pode ser catalisada por íons de metais presentes no meio reacional. A semi-quinona formada pode reagir novamente com oxigênio e formar a quinona (**Equação 4, Figura 1.3**). O ânion superóxido formado pode propagar a oxidação de flavonóides (**Equações 3** e **5**).

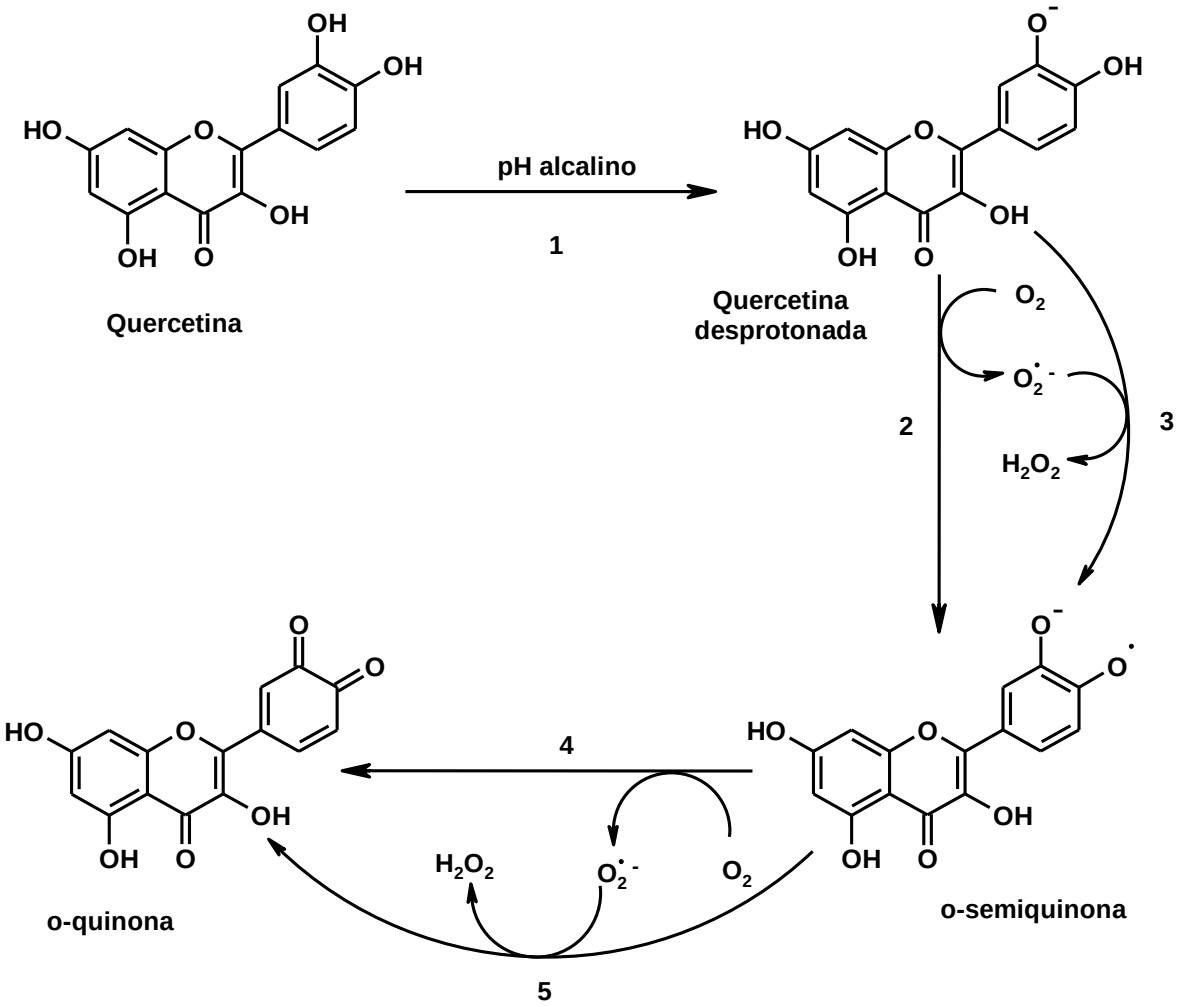


Figura1.3. Proposta do mecanismo de formação de espécies reativas de oxigênio pela oxidação da quercetina (Nakanishi, 2001).

Duarte Silva e col. (2000) analisaram a capacidade e a relação estrutura atividade genotóxica de alguns flavonóides, como a quercetina, miricetina, fisetina entre outros, através dos ensaios de indução de revertentes em *Salmonella typhimurium* TA98 e a indução de aberrações cromossômicas em células V79. Foi sugerido que flavonóides que possuem grupamento hidroxila nas posições 3 do anel C e na posição 7 do anel A e, no anel B um catecol ou um pirrogalol são genotóxicos para células eucarióticas. Essa hipótese pode ser explicada pela formação de quinonas, semiquinonas e ânion superóxido e peróxido de hidrogênio que são comprovadamente genotóxicas para células de mamíferos.

Apesar desse grande número de dados ainda não se chegou a um veredicto em relação à atividade pró- ou antioxidante desses compostos. Pode-se sugerir que alguns fatores influem para a atividade destas moléculas, como por exemplo, a estrutura destas moléculas, ou seja, como foi relatado acima as variações

hidroxiladas dos anéis foram relacionados com a sua atividade. Por outro lado, é necessário ter em mente que o pH do meio influi na protonação da molécula podendo conduzir esta para a auto-oxidação em pH alcalino como aquele existente no intestino delgado, e também a compartimentalização e interação com biomoléculas nas células desses compostos de acordo com a sua polaridade seria um fator a ser considerado para avaliar a ação dos mesmos.

A absorção dos flavonóides pelo trato digestivo sempre foi controversa. Acreditava-se que os flavonóides glicosilados eram pouco ou nada absorvidos e que eram hidrolisados para agliconas por enzimas bacterianas no intestino (Bokkenheuser e col., 1987). Em 1995 Hollman e col. baseado em evidências propôs que glicosídios de flavonóides poderiam ser absorvidos intactos no intestino delgado, utilizando o transportador de glicose dependente de Na^+. Nesse ensaio foram testadas quantidades de cebola, que é constituído de quercetina e quercetina glicosilada, de uma refeição normal (Hollman, 1995). Em estudos com ratos foi demonstrado que a quercetina pode interagir com a albumina no sangue e assim, a quercertina é dissociada e eliminada lentamente do organismo. Esse período longo favorece a interação com biomoléculas como proteínas, lipídios e DNA (Manach e col., 1995). Apesar desses dados a absorção e o metabolismo de inúmeros flavonóides que compõem a dieta ainda são indefinidos, sendo que, esforços têm sido empenhados para o esclarecimento desses fatos (Walle, 2004).

1.5) Biflavonóides

Os biflavonóides são dímeros de flavonóides formados através de reações radicalares, sendo que os primeiros a terem suas estruturas elucidadas foram a isoginkgetina e a ginkgetina, inicialmente, definidos como dímeros de apigenina (Harborne, 1967). Desde então, uma grande gama dessas moléculas tem sido identificados e, apesar disto, a ocorrência, a função destas moléculas nas plantas e o exato mecanismo da biossíntese desses dímeros ainda não foram elucidados.

A formação dos biflavonóides aparenta ser um fato que teria ocorrido no início da evolução das plantas vasculares. O grande acúmulo de biflavonóides em algumas espécies e a ampla distribuição em vários tecidos (folhas, casca, raízes, pólen, frutos e sementes) tem sido uma questão em discussão (Harborne, 1988). Em folhas, geralmente, são associados com a proteção contra radiação UV, que foi

de extrema importância, durante a colonização da terra firme no Siluriano, contra a predação de insetos e invasão de fungos (Lowry, 1980). A amentoflavona isolada de *Juniperus communis* demonstrou uma potente atividade antifúngica, inibindo o crescimento em concentração de 1 μg/mL quando testada com cepas de *Aspergillus fumigatus*, *Botrytis cinerea* e especialmente de *Trichoderma glaucum* (Lamer-Zarawska, 1980).

Os biflavonóides isolados de diversas plantas apresentam diferentes padrões estruturais, podendo haver diferentes tipos de ligação entre os monômeros de flavonóides. O estudo dessa grande gama de compostos identificou uma série de atividades biológicas para esse grupo de substâncias. Biflavonóides presentes em plantas do gênero *Ouratea* possuem a capacidade de inibir a produção pelo *Aspergillus flavus* de aflatoxinas, substâncias consideradas tóxicas, carcinogênicas, mutagênicas, e teratogênicas (Gonçales e col., 2001). Esses compostos possuem também a capacidade de inibir a DNA topoisomerase (Grynberg col., 2002), enzima que modula o estado topológico do DNA e está intimamente ligada ao tratamento de câncer por ser alvo de várias drogas (Middleton e Kandaswami, 1993). Biflavonóides em geral podem ainda inibir a liberação de histaminas (Amellal, e col., 1985), promover a adesão de plaquetas (Beretz, e col.; 1986), bloquear os efeitos inflamatórios de hepatotoxinas (Iwu, 1985) e ter atividade anti-HIV (Lin e col., 1997).

Os biflavonóides extraídos de araucária foram caracterizados como dímeros ligados na posição C3' e C8", que compreendem o grupo das amentoflavonas (Fonseca e col., 2000; Ilyas e col., 1994) (**Figura 1.4**).

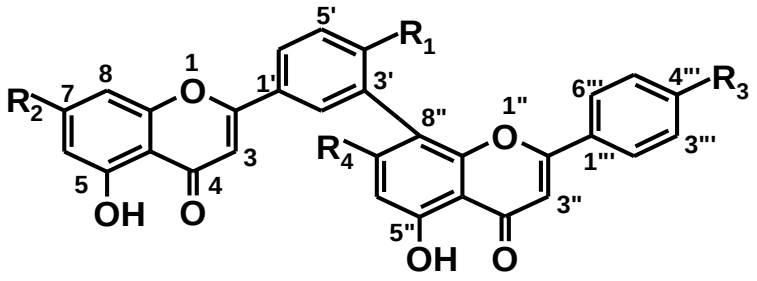


Figura 1.4. Estrutura geral de biflavonóide do tipo amentoflavona.

Biflavonóides do tipo amentoflavona foram extensivamente estudados como antinflamatórios, sendo que vários mecanismos de ação foram identificados. Esses compostos podem agir como inibidores diretos de enzimas que estão envolvidas na biossíntese de prostaglandinas como as ciclooxigenases 1 e 2 (Bucar e col., 1998)

e fosfolipases, fosfodiesterases e lipoxigenases (Lee e col., 1996; Kim e col., 1998; Saponara e col., 1998). Estudos demonstraram que ratos com artrite, ao receberem injeções intraperitoniais de ginkgetina, um biflavonóide extraída da *Ginkgo biloba*, reduziram em até 84 % as inflamações causadas pela injúria, com doses de 20 mg/Kg/dia, por 16 dias. Acredita-se que esse fato deve-se à capacidade desta droga em inibir a fosfolipase A2 e inibir a proliferação de linfócitos, também, há hipóteses de que essas moléculas ajam como antioxidantes, suprimindo as espécies reativas ou quelando metais (Kim e col., 1999)

Podem ainda inibir a expressão da ciclooxigenase 2, agindo também sobre inflamações cutâneas e doenças pulmonares que estão relacionados com a presença desta enzima (Kwak e col., 2002; Banerjee e col., 2002).

A atividade antinflamatória ainda pode ser explicada pela capacidade desses biflavonóides em inibir a óxido nítrico sintetase indutível (iNOS), impedindo assim a produção de $^{\bullet}$NO (Cheon e col., 2000).

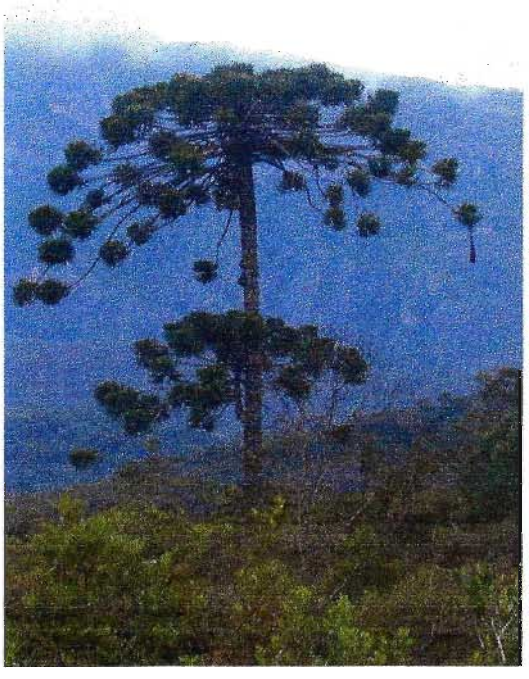
Estudos também demonstraram a atividade antiviral destes compostos, agindo contra vírus que atacam o sistema respiratório, vírus da herpes e HIV (Lin e col., 1999), além da atividade antifúngica (Krauze-Baranowska e col., 1999).

A fonte mais conhecida da biflavonóides é a *Ginkgo biloba*, uma planta utilizada na medicina tradicional chinesa. Desde o século XVI é relatado o seu uso como remédio contra as mais variadas doenças. Nos dias atuais, extratos padronizados são utilizados para o tratamento de desordens na circulação periferal e cerebral (Van Beek e col., 1998). Estudos também têm demonstrado que extratos de *Ginkgo biloba* possuem atividade antienvelhecimento. Esses extratos incubados com ácido ascórbico e fibroblastos mostraram um grande aumento na síntese do colágeno e fibronectina extracelular comparando-se com controles tratados somente com ácido ascórbico. Assim a utilização na área da cosmética tem representado um grande aumento no emprego destas substâncias (Chiu e Kimball, 2003). Apesar desses estudos, pouco foi elucidado sobre a atividade dos biflavonóides em relação à atividade antioxidante e/ou pró-oxidante sobre as espécies reativas e a interação dos biflavonóides com as biomoléculas.

1.6) Araucaria angustifolia

Até hoje foram identificadas cerca de 50 espécies de árvores da família Araucariaceae, distribuídas em três gêneros: *Araucaria*, *Agathis* e *Wollemia*. Todas as espécies do gênero *Araucaria* encontram-se no hemisfério sul e evoluíram na Era Mesozóica, durante os Períodos Jurássico e Cretáceo, há aproximadamente 250 milhões de anos. Apenas duas vivem na América do Sul, a *Araucaria araucana* (Mol.) C. Koch, encontrada no Chile e a *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, também conhecida como pinheiro-do-paraná ou pinheiro-brasileiro, é encontrada no Brasil, na Argentina e numa área muito pequena no Paraguai. Até o início do século XX, a araucaria dominava as paisagens do sul do Brasil, onde cobria boa parte do Planalto Meridional. A Floresta de Araucárias cobria 40 % da superfície no Paraná, em Santa Catarina ocupou 30 % e no Rio Grande do Sul atingiu 25 % do território. No Sudeste brasileiro, a Floresta chegou a ocupar 3 % do Estado de São Paulo, 1 % da área do Rio de Janeiro e também 1 % em Minas Gerais (Karas, 1993).

A paisagem majestosa desenhada pela natureza foi alterada de forma radical com o processo de colonização. Decisões políticas de ocupar território, expansão da fronteira agrícola, criação de gado e, principalmente, a exploração madeireira, de forma predatória e sem qualquer planejamento foram as causas da destruição de mais de 90 % desse bioma, em um pouco mais de meio século. A derrubada de imensas porções da Floresta de Araucárias também provocou a erosão e empobrecimento do solo e alterações climáticas. Atualmente, restam 8 a 10 % de florestas já exploradas e apenas 1 a 2 % de cobertura original, ou seja, é uma espécie em extinção, o qual requer, com muita urgência, um plano de manejo sustentável e preservação (Koch e Corrêa, 2002).



2) Objetivos

Os biflavonóides, especialmente os de *Ginkgo biloba*, têm despertado grande interesse devido a suas atividades farmacológicas diversas. Apesar disso faltam dados que elucidem a real contribuição dessas substâncias ao organismo. Levando em consideração que a *Araucaria angustifolia* é uma espécie em extinção, e uma fonte de biflavonóides de origem brasileira, a possibilidade de torná-la uma provedora de matéria-prima para novos produtos necessita de uma maior compreensão em relação à atividade biológica e interação com biomoléculas.

Assim os principais objetivos foram:

1) Extração de uma fração rica em biflavonóides de folhas de *Araucaria angustifolia* e identificação e caracterização dos componentes por per-metilação dos biflavonóides e análises por cromatografia líquida de alta performance acoplada a um espectrômetro de massas;
2) Determinar a constante de supressão do $^1O_2$ por biflavonóides;
3) Avaliar a capacidade antioxidante dos biflavonóides de *Araucaria angustifolia*. Para tal, foram utilizados os modelos de quebras de simples fita de DNA plasmidial, promovidos por $^1O_2$ e reação de Fenton. Ensaios de lipoperoxidação de membranas lipossomais, provocados por radiação UV e reação de Fenton, também foram realizados. Foi avaliada também a capacidade dos biflavonóides em quelar metais de transição;
4) Avaliar a capacidade fotoprotetora dos biflavonóides, analisando-se a inibição da formação de dímeros de pirimidina por radiação UV;
5) Analisar a interação de biflavonóides com células, para tal, propor um modelo de trapeamento de biflavonóides com ciclodextrina com o intuito de estudar interações em sistemas aquosos;
6) Avaliar a citotoxicidade da fração rica em biflavonóides.

3) Materiais e Métodos

3.1) Reagentes

Os reagentes utilizados foram de alto grau de pureza. Metanol (MeOH), etanol, butanol, acetona, ácido fórmico e $CDCl_3$ foram fornecidos pela Merck (Darmstadt, Alemanha). Gel de agarose, ampicilina, quercetina, rutina, Trolox®, α-tocoferol, $CaCl_2$, $NaHCO_3$, KCl, NaCl, desferoxamina, Na_2PO_4, $FeSO_4$, $FeCl_3$, $CuCl_2$, $AlCl_3$, fosfatidilcolina (FC), SDS, EDTA, DNA de timo de bezerro, fosfatase alcalina, nuclease, fosfodiesterase I e II, Tris, ácido succínico, ácido tiobarbitúrico (TBA), tripsina, ficoll, azul de bromofenol, meios LB, SOC e Dulbecco foram fornecidos pela Sigma (CA, EUA). Perinaftenona foi fornecido pela Acros (NJ, EUA), o peróxido de hidrogênio foi cordialmente fornecido pela Peróxidos do Brasil (Paraná, Brasil). Os padrões de biflavonóides, ginkgetina, amentoflavona e 7-*O*-metilamentoflavona, extraídos de *Ginkgo biloba* foram cordialmente fornecidos pela Indena Chemicals (Milão, Itália). O padrão de dímero ciclobutânico de pirimidina (CPD) foi gentilmente fornecido pelo Dr. Thierry Douki, CEA, Grenoble, França. A β-ciclodextrina foi cordialmente cedida pela Chemyunion Química, Ltda. O endoperóxido dipropionato dissódico de 3,3'-(1,4-naftilideno) ($NDPO_2$) foi sintetizado no laboratório (Martinez e col., 2000).

3.2) Equipamentos

As análises em cromatografia de alta eficiência (CLAE) foram obtidos em sistemas da Shimadzu (Kyoto, Japão) que consistiu de duas bombas analíticas modelo 10Avp, conectadas a um detector de arraste de diodos modelo SPD-M10Avp, controlados por um módulo de comunicação SCL-10Avp e tratadas pelo programa de computador Class-VP.

As medidas de fluorescência foram feitas em um espectrofluorímetro Spex modelo 1681 (Spex Industries, Edison, NJ). Os espectros de absorbância foram adquiridos em um espectrofotômetro Hitachi U3000 (Tokyo, Japão).

Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro Quattro II (Micromass, Manchester, UK).

Os espectros de ^{1}H RMN (500 MHz), ^{13}C RMN (125 MHz) foram obtidos num espectrômetro da Bruker DRX 500. As amostras foram dissolvidas em $CDCl_3$.

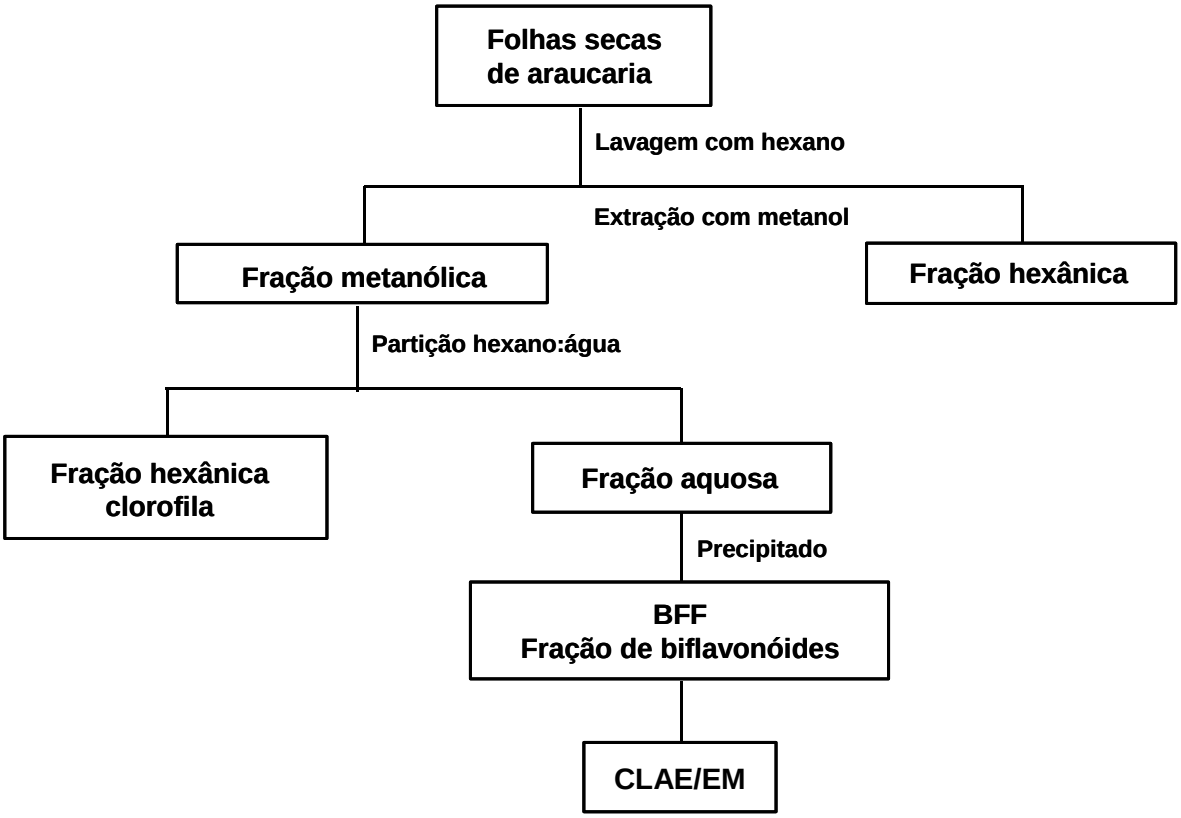
3.3) Material Vegetal

O estudo foi feito com folhas de *Araucaria angustifolia* colhidas, no mês de março, de um espécimen cultivado no Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

3.4) Obtenção e identificação do extrato rico em biflavonóides das folhas de Araucaria angustifolia

3.4.1) Extrato de folhas de Araucaria angustifolia

As folhas (500 g) foram secas e moídas, lavadas com hexano e posteriormente extraídas 3 x com 3 L de metanol. A fração metanólica foi concentrada por rotaevaporação e particionada com água e hexano (3x). Na fase aquosa houve a precipitação da fração rica em biflavonóides (**Esquema 1**). Após centrifugação a 10000 rpm por 30 minutos, obteve-se uma fração sólida amarelada (BFF) que foi seca sob vácuo e o sobrenadante foi submetido ao mesmo tratamento para a recuperação dos biflavonóides. Esta BFF foi submetida à análise por CLAE/EM (cromatografia líquida de alta performance acoplado a um espectrômetro de massas) para identificação de seus componentes.



Esquema 1: Fluxograma de separação dos biflavonóides de folhas de araucária.

3.4.2) Análise por CLAE do BFF (Fração de Biflavonóides)

A análise por CLAE foi obtida utilizando-se uma coluna analítica Synergi (Phenomenex®, 25 cm x 4,6 mm, 5 µm). A fase móvel utilizada foi metanol e água (1 % de ácido fórmico) com um fluxo de 1 mL/min, foi eluída com o gradiente, no qual, de 0 a 25 min, a porcentagem de metanol passa de 60 a 90 %, em seguida, de 25 a 35 min, de 90 a 100 % mantida até 40 min, em 45 min volta à condição inicial. O detector foi por arraste de diodos monitorado nos comprimentos de onda de 270 e 330 nm (Shimadzu SPD-M10A VP). O programa de computador Shimadzu Class VP foi empregado para o tratamento dos dados.

As amostras foram analisadas por CLAE dissolvendo-as em MeOH. Antes da injeção no sistema as amostras foram filtradas com filtros para seringa de teflon (3mm, 20 micron) (Corning, NY).

3.4.3) Análise por CLAE/EM do BFF

As análises por espectrômetro de massas foram desenvolvidas num equipamento CLAE/EM/EM (Quattro II, Micromass, Manchester/UK). O sistema utilizado consistia de duas bombas analíticas, detector UV (Shimadzu, modelo 10 AV *vp*), coluna analítica Supelcosil LC 18, 15 cm x 4,6 mm, 5 µm. O fluxo foi de 1 mL/min com acoplamento de um redutor de fluxo na saída do sistema CLAE antes da entrada ao espectrômetro de massas. A fase móvel utilizada foi Metanol:Água (0,2 % de ácido fórmico) (1:1) e o gradiente utilizado foi conforme o descrito no item **3.4.2**. Os dados foram processados pelo programa Masslynx (Micromass) versão 3.2.

3.4.4) Permetilação de BFF

Uma alíquota de 10 mg de BFF, suspensa em CH_2Cl_2/acetona foi metilada por 16 horas com iodometano (0,025 mM) na presença de K_2CO_3 sob atmosfera de nitrogênio. Após esse procedimento, o produto foi analisado por CLAE utilizando-se uma coluna analítica Superlcosil LC 18, 15 cm x 4,6 mm, 5 µm, e um detector por arraste de diodos (Shimadzu SPD-M 10A VP) monitorado a 270 e 330 nm. A fase móvel metanol e água a 1 mL/min com o gradiente descrito no item **3.4.2**. Os dados obtidos foram manipulados pelo programa de computador Shimadzu Class VP.

3.5) Avaliação da atividade antioxidante dos biflavonóides de Araucaria angustifolia

3.5.1) Utilização da técnica de luminescência no infravermelho resolvida no tempo para a determinação da constante de supressão do $^1O_2$

Para a determinação da constante de supressão do $^1O_2$ por quercetina, amentoflavona, ginkgetina e BFF, o $^1O_2$ foi gerado por foto-excitação de um sensibilizador (perinaftenona) a 355 nm, utilizando-se um laser (Nd:YAG). A emissão monomol no infravermelho próximo foi detectada utilizando-se uma fotomultiplicadora (R 5509 PMT, Hamamatsu Photoniks KK, Japão) resfriada a –80

°C através de um sistema refrigerador com nitrogênio gasoso e líquido, conectado a um monocromador (M 300, Edinburgh Analytical Instruments, UK), capaz de adquirir espectros no IV. Várias concentrações (0,1 a 1 mM) de quercetina, amentoflavona, ginkgetina e BFF dissolvidos em acetona foram adicionados ao sensibilizador (0,2 D.O.) antes da excitação. A determinação precisa do tempo de vida e da constante de supressão foi feita utilizando-se a equação de Stern-Volmer (**Equação 3.1** a **3.4**) (Wilkinson, 1993).

$$\tau/\tau_0 = 1 + (k_q + k_r)k_d^{-1}\,[Q] \quad \text{(Eq. 3.1)}$$

$$\tau/\tau_0 = 1 + k_t\tau_0\,[Q] \quad \text{(Eq. 3.2)}$$

$$1/\tau = 1/\tau_0 + k_t\,[Q] \quad \text{(Eq. 3.3)}$$

$$k_{obs} = k_d + k_t\,[Q] \quad \text{(Eq. 3.4)}$$

Nos quais k_q e k_r são as constantes de supressão física e química do $^1O_2$ pelo supressor Q, respectivamente, τ é a meia vida do $^1O_2$ na ausência (τ_0) ou na presença (τ) do supressor e k_d é a constante de decaimento do $^1O_2$ (Wilkinson, 1993).

3.5.2)Tratamento dos DNA plasmídiais pBluescript e PUC 19 com $^1O_2$

Um micrograma do DNA plasmidial foi incubado em tampão fosfato (50 mM, pH 7,4) com 20 mM de $NDPO_2$ (endoperóxido dipropionato dissódico de 3,3'-(1,4-naftilideno) a 37 °C por 100 minutos. Os biflavonóides foram avaliados quanto à sua capacidade de proteção contra quebra de simples fita do plasmídio utilizando-se as concentrações 1, 5, 10, 20, 50 e 100 μM dissolvidas em tampão fosfato (50 mM, pH 7,4) com 25 % de metanol.

Para fins de comparação foram realizadas preparações de Trolox®, quercetina, rutina (**Figura 3.1**), amentoflavona (**1**) e ginkgetina (**4**) (**Tabela 4.1**) em tampão fosfato com 25 % metanol em concentrações de (1 ~ 100 μM) foram também ensaiadas.

A extensão das quebras em DNA foi analisada pela quantidade da forma circular aberta (CA), resultante da quebra de simples fita, produzida a partir da forma super enovelada (SE) utilizando-se eletroforese em géis de agarose 0,8 % coradas com brometo de etídio e visualizadas por luz UV. A quantificação foi feita com um densitômetro Image Master (Pharmacia Biotech, CA, USA).

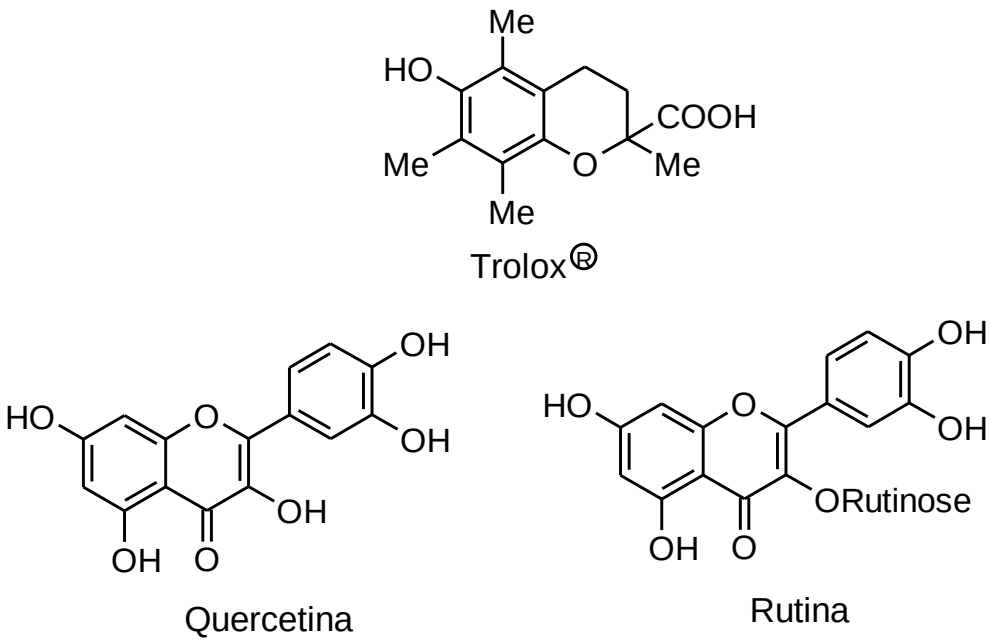


Figura 3.1. Estrutura dos flavonóides quercetina e rutina e Trolox®.

3.5.3) Reação de Fenton

Os sais de Fe^{2+} foram usados para induzir danos aos DNA plasmidiais, através da reação de Fenton na presença de H_2O_2. Um micrograma de plasmídio pBluescript foi incubado com 50 μM de Fe^{2+} recém preparado e 50 μM de H_2O_2 por 15 minutos a 37 °C. Imediatamente após a incubação, as amostras foram analisadas por eletroforese utilizando géis com 0,8 % de agarose.

BFF, quercetina, rutina, Trolox®, amentoflavona e ginkgetina (1~100 μM) foram adicionados à solução de plasmídio antes da adição de Fe^{2+} e H_2O_2.

3.5.4) Extração de DNA plasmidial

3.5.4.1) Transformação de bactérias competentes

Bactérias *E. coli*, cepa HB101, competentes, provenientes de estoque em glicerol a -80°C, foram distribuídas em alíquotas de 50 μL. A cada alíquota foram adicionados 5 ng de DNA plasmidial pBluescript (1 ng/μL) incubando-se as bactérias durante 30 min a 4°C. A seguir as bactérias foram submetidas a um choque térmico a 42 °C por exatamente 2 min, e transferidas imediatamente para o

gelo. Após 5 min, foram adicionados 450 μL de meio SOC a cada alíquota, incubando-as a 37°C durante 1 h sob agitação constante de 200 rpm (Hanahan, 1983).

Em seguida, as bactérias (200 μL) foram plaqueadas em placas de Petri com meio LB contendo 15 g/L de ágar e 100 μg/mL de ampicilina e incubadas pernoite a 37 °C.

3.5.4.2) Preparação do plasmídio pBluescript e PUC 19

Os plasmídios foram obtidos cultivando-se as colônias de bactérias transformadas no item 3.5.4.1 em meio LB com 100 μg/mL de ampicilina e incubadas pernoite a 37 °C (Hannahan, 1993). Os plasmídios foram purificados utilizando-se o Clontech Maxi Prep Kit (Clontech, CA, EUA). A preparação continha 90 % da forma superenovelada (SE) e 10 % da forma circular aberta (CA).

3.5.4.3) Gel de agarose

A separação de diferentes conformações de DNA plasmidial, forma enovelada (SE) que é a nativa e a forma circular aberta (CA), resultante da quebra de simples fita, foi feita por géis horizontais de agarose 0,8% em tampão TBE. À agarose líquida foi adicionado brometo de etídio (substância que intercala entre as bases do DNA e fluoresce quando excitada na faixa de luz UV), desta forma as bandas de DNA podem ser visualizadas.

Foram aplicados aos poços do gel aproximadamente 15μL (150 ng de DNA plasmidial) das amostras misturadas com 5μL de uma solução de 0,25% de azul de bromofenol com 30% de ficoll tipo 400 .

A cuba foi conectada a uma fonte de tensão (modelo EC 500 proveniente da Aparatus Corporation) sob uma corrente de 30 mA por cerca de 3 horas.

Foram obtidas as fotos e feitas as integrações num aparelho Image Master VDS (Pharmacia, EUA).

3.5.5) Peroxidação em membranas lipossomais induzidas por radiação UV

O efeito protetor do BFF, rutina, quercetina, α-tocoferol, amentoflavona, ginkgetina, e BFF em combinação com α-tocoferol contra a peroxidação, provocada por radiação UV-C (254 nm), foi avaliada em lipossomos de fosfatidilcolina (FC), preparados utilizando-se 2,5 mg de FC dissolvidos em etanol. Os compostos antioxidantes (5, 10, 50, 100 e 200 μM), foram adicionados à FC e secos sob fluxo de nitrogênio. No caso da combinação de BFF com α-tocoferol, foram adicionados 5, 10, 50, 100 e 200 μM de cada dos compostos, à FC, dissolvidos em metanol. Essa mistura foi dissolvida em etanol (4 μL) e 5 μL de 25 mM de Tris-HCl, pH 7,4 e foi aquecida a 60 °C por 2 minutos. A suspensão de lipossomos foi formada pela adição de 25 mM de Tris-HCl, pH 7,4 para um volume final de 100 μL e sonicado por 1 minuto.

Essa suspensão foi exposta à radiação UV (lâmpada germicidal, 254 nm) por 1 hora. A amostra estava posicionada a 10 cm da lâmpada. A reação de lipoperoxidação foi terminada com a adição de 10 μL de 35 % $HClO_4$. Para a análise da quantidade de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) as amostras foram aquecidas com 200 μL do reagente TBA (HCl 0,25 M, 0,375 % de ácido tiobarbitúrico e 2mM de desferoxamina) a 100 °C por 15 minutos. O TBARS foi extraído com 400 μL de butanol e analisado por espectrofotômetro de fluorescência ($\lambda_{exc.}$= 515 e $\lambda_{emiss.}$ = 550 nm) (Hitachi F-2000, Japão).

3.5.6) Peroxidação em membranas lipossomais induzidas pela reação de Fenton

Os lipossomos utilizados foram desenvolvidas conforme o item **3.5.5**

Os antioxidantes foram adicionados à FC antes destes serem transformados em lipossomos. Após essa fase, foram adicionados 100 μM de Fe^{3+}/EDTA e 1mM de ácido ascórbico, que agiram como indutores da lipoperoxidação. As amostras foram incubadas em banho-maria a 37 ^{o}C por 30 minutos. Após este período foi retirado 1 mL de cada amostra, adicionados a 2 mL do reagente TBA (HCl 0,25 M, 0,375 % de ácido tiobarbitúrico e 2mM desfeoxamina) e aquecidos a 100 ^{o}C por 15

minutos. A fluorescência das amostras foi analisada por um aparelho Spex Fluorlog 1681 ($\lambda_{exc.}$= 515 e $\lambda_{emiss.}$ = 550 nm).

3.5.7) Análise da formação de complexos entre biflavonóides e metais de transição com detecção por espectrometria de massas

Os biflavonóides ginkgetina e amentoflavona, e os flavonóides rutina e quercetina foram dissolvidos em MeOH na concentração de 100 μM. As soluções de metais (Fe^{3+}, Cu^{2+} e Al^{3+}) foram preparadas no momento do experimento. Cem micromolar da solução de metais em H_2O foram adicionada à solução de biflavonóides, e após 30 min foram analisados no espectrômetro de massas.

O espectro de massas foi adquirido em modo “electrospray” positivo em um equipamento Quattro II triplo quadrupolo (Micromass, Manchester, UK). O fluxo da fase móvel MeOH:H_2O (1:1) foi monitorado em 20 μL/min através de uma bomba analítica Shimadzu 10AD. A temperatura da fonte estava em 100 ^{o}C e a voltagem de cone variou de 30 a 70 V. Os potenciais do capilar e do eletrodo HV foram ajustados para 3,0 e 0,69 kV, respectivamente. O fluxo do gás de nitrogênio para secagem e nebulização estava em 250 e 30 L/h, respectivamente. Dois microlitros da amostra foram injetados no sistema e o espectro obtido foi analisado pelo programa MassLynx 3.2.

3.5.8) Análise dos produtos: dímero ciclobutânico de pirimidina e aduto de pirimidina (6-4) pirimidona formados em DNA de timo de bezerro, expostos à radiação UV

Os produtos formados após a irradiação de DNA de timo de bezerro com radiação UV foram analisados partindo-se uma solução aquosa contendo 250 μg de DNA de timo de bezerro. Inicialmente, o DNA foi exposto à radiação UV-C com comprimento de onda em 254 nm. Foi preparada uma solução aquosa e a amostra foi irradiada por 2 horas, com a lâmpada a 10 cm de distância. As amostras de BFF diluídas em metanol foram adicionadas à solução de DNA antes da irradiação. Para irradiação com UV-B (Philips 40W/TL 12RS), com comprimento de onda a 320 nm, a amostra de DNA foi aplicada sobre uma superfície plana e seca sob fluxo de nitrogênio. Com o intuito de analisar a capacidade protetora do BFF, 0,5, 1 e 2 mg desta amostra em metanol foram adicionados ao filme de DNA obtido para formar um filme por cima do DNA. Este filme foi exposto à radiação UV por 1 hora com energia de 1,12 x 10^{-4} W/cm^2.s. (radiômetro IL 1700 Research radiometer, International light, MA, EUA).

As amostras foram hidrolisadas utilizando-se 10 unidades de nuclease P1 e 0,004 unidades de fosfodiesterase I em 10 μL de tampão (ácido succínico 200 mM, $CaCl_2$ 100 mM, pH 6) e incubadas a 37 ^oC por 2 horas. Após este período, foram adicionados 10 μL de tampão Tris 500 mM, 1 mM de EDTA pH 8,0 e 0,003 unidades de fosfodiesterase II e 5 unidades de fosfatase alcalina e incubados a 37 ^oC por 5 horas. A amostra resultante foi centrifugada (5000 g por 10 min) e posteriormente analisada por CLAE/EM-EM. A detecção dos dímeros de pirimidina foi efetuada utilizando-se o sistema CLAE/EM-EM em sequência com ionização por “electrospray” no modo MRM (“multiple reaction monitoring”). O íon pseudo-molecular desejado foi selecionado pelo primeiro quadrupolo e então fragmentado num segundo quadrupolo que estava submetido a uma pressão baixa de argônio (célula de colisão). Um terceiro quadrupolo foi ajustado para detectar somente os íon filho majoritário do composto de interesse (**Figura 3.2**).

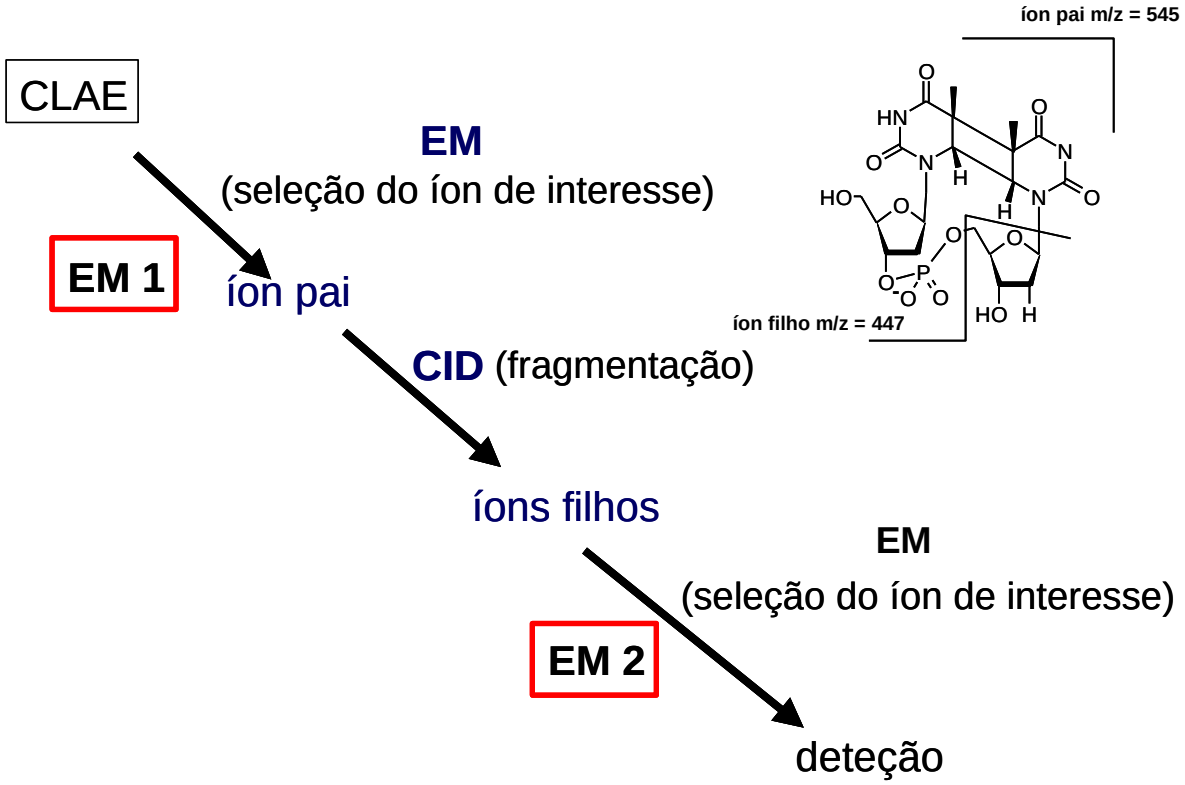


Figura 3.2. Esquema de detecção por LC/EM-EM no modo MRM, no qual há seleção de uma fragmentação específica a ser identificada. O dímero ciclobutânico da pirimidina é identificada como m/z 545 e o íon filho como m/z = 447 (Loureiro e col., 2002).

O sistema constituía-se de duas bombas analíticas Shimadzu 10 Avp acoplado a um detetor UV ajustado para 260 nm, uma válvula automática para redirecionamento do fluxo FCV 12-AH, e uma terceira bomba analítica Shimadzu 10 AD. Utilizou-se uma coluna Synergi 250 x 4, 6 mm, 5 μ com fase móvel, formiato de amônio 5 mM e metanol com o fluxo de 200 μL, no seguinte gradiente, de 0 a 8 min, a concentração de metanol foi de 0 a 2 %, em 30 min atingiu 40 % e permaneceu até 35 min e em 40 min voltou à condição inicial.

Utilizando-se a válvula de redirecionamento de fluxo (**Figura 3.3**), no momento em que a análise é iniciada (posição 1), o fluxo derivado do cromatógrafo é descartado e somente o fluxo da terceira bomba é dirigido para o espectrômetro, com MeOH:H_2O (1:1) como fase móvel (50 μL/min). Em um determinado tempo de análise a válvula é acionada (posição 0) e o fluxo derivado do cromatógrafo é redirecionado para o espectrômetro de massas e o fluxo da terceira bomba descartada. Este procedimento permite uma maior sensibilidade na análise por massas, pois somente a fração de interesse é enviada para o espectrômetro, o que

evita a supressão do sinal por impurezas na amostra o que pode causar variações na análise (Loureiro e col., 2002).

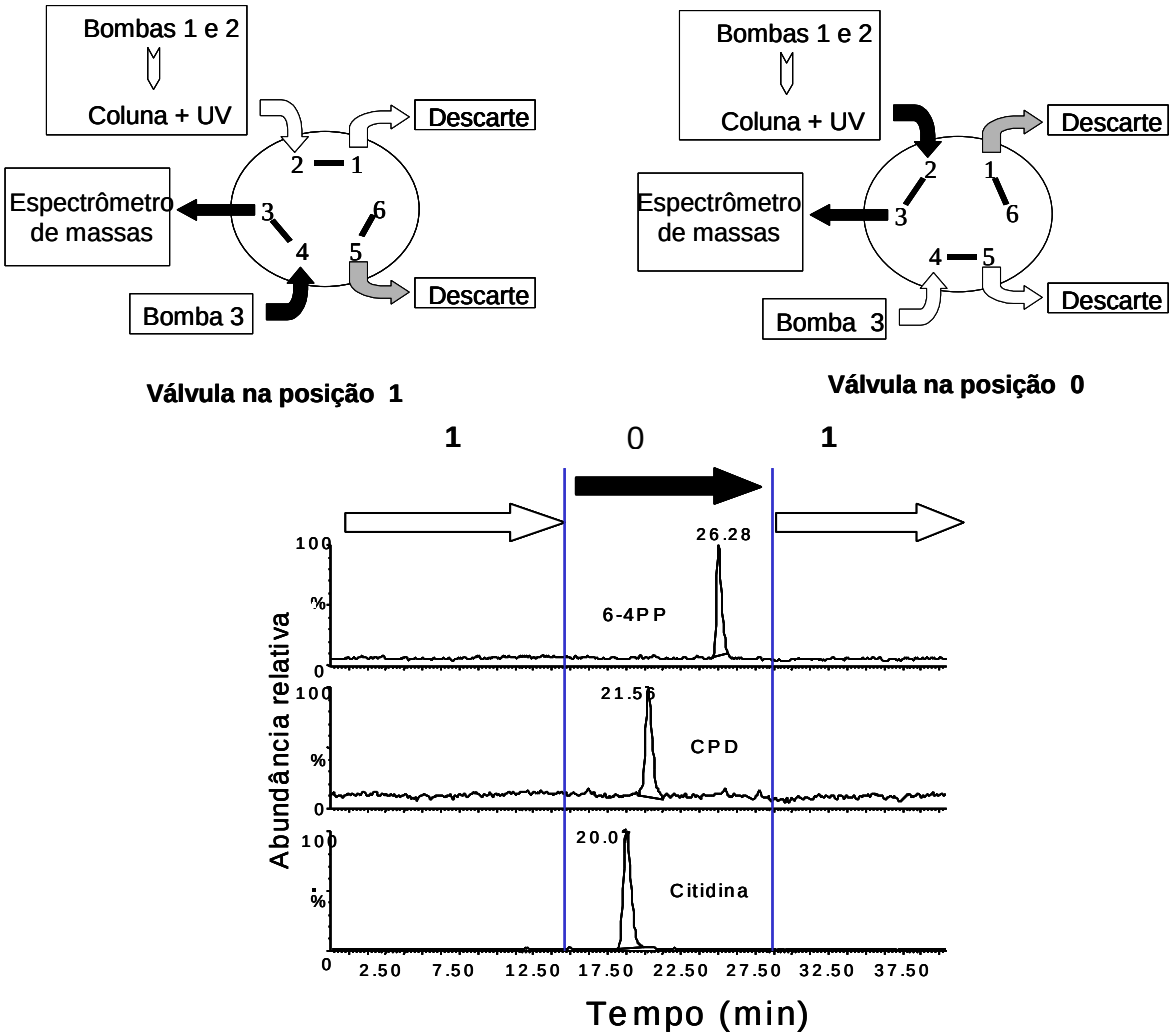


Figura 3.3. Esquema da válvula de redirecionamento de fluxo, (Lourreiro e col., 2002).

A análise por EM-EM foi realizada em modo “electrospray” negativo com voltagem de cone 60 V. O potencial da célula de colisão foi programado em 10 V. Os potenciais do capilar e do eletrodo HV estavam ajustados a 3,5 e 0,69 kV. O gás nitrogênio de nebulização e secagem foi de 250 e 30 L/h. As massas moleculares dos dímeros ciclobutânicos de (CPD) e pirimidina (6-4) pirimidona (6-4PP) são iguais (545 Da), assim a diferenciação de cada um deles foi feita conforme as diferentes formas de fragmentação. Foram monitoradas as transições 545 $\rightarrow$ 447 para CPD e 545 $\rightarrow$ 430 para 6-4PP. Utilizou-se ainda um padrão interno (citidina) para quantificação, o qual, foi monitorado a transição 242 $\rightarrow$ 109 (Douki e col., 2000B).

3.5.9) Cultivo de células de mamíferos e incorporação de BFF trapeados em β-ciclodextrina

As células de fibroblasto CV1-P foram cultivados em meio Eagle modificado por Dulbecco (DME), suplementado com $NaHCO_3$ (1,2 g/L), 100 µg/mL de penicilina, 94 mg/mL de sulfato de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (SFB). O meio de cultura sem SFB foi esterilizado por filtração através de membrana de 0,22 µm para frascos estéreis. Após este procedimento, SFB estéril foi adicionado a alíquotas do meio estéril. As culturas são incubadas em atmosfera úmida com 5% de CO_2, a 37 ^oC, no escuro. As células crescem aderidas à superfície de garrafas plásticas ou placas de cultura e foram subcultivadas em períodos de 3 a 4 dias. Para o subcultivo, após a retirada do meio, a cultura foi lavada com PBS (NaCl 137 mM, KCl 1,68 mM, Na_2HPO_4 1,47 mM, pH 7,0, autoclavado) (2x) e incubadas por 2 min com 5 mL de tripsina para as células se desprenderem. As células foram homogeneizadas, quantificadas em hemocitômetro e distribuídas para novas garrafas ou placas com meio.

3.5.9.1) Inserção de BFF em β-ciclodextrina

A 100 mg de β-ciclodextrina dissolvida em 30 mL de água foram adicionados aos poucos 2 mL de BFF (5 mg/mL em acetona) sob agitação. Esta solução ficou sob agitação por 60 horas a temperatura ambiente. Após esse período, o sobrenadante foi seco e o precipitado foi ressuspenso em 15 mL de água, e então filtrado com membrana 0,45 µm para a retirada do BFF não incorporado. Essa solução foi medida por espectrofotômetro para obter a concentração de BFF incorporada com ciclodextrina. Após a determinação da concentração de BFF, o complexo β-ciclodextrina/BFF (βCBFF) foi adicionado ao meio de cultura celular, filtrado com um filtro estéril 0,45 µm.

3.5.9.2) Incorporação de BFF em células

As células foram cultivadas em placas de 5 cm até a sua total confluência. Em seguida, o meio foi retirado e a camada celular foi lavada 2 x com PBS e assim

suplementadas com meio, sem soro, contendo 100 μM de BFF inseridos em ciclodextrina. Estas foram incubadas por um período de 5 a 28 horas. Para cada tempo de incubação foram utilizadas 3 placas. Após este período, as células foram lavadas 3 x com solução PBS e descoladas da placa com a adição de tripsina. Em seguida foram transferidas para tubos de ensaio e congeladas para que no descongelamento fossem lisadas. Após o descongelamento, as células foram sonicadas por 2 min e foram acrescidas com 2 mL de acetonitrila para a precipitação de proteínas. Essa mistura foi submetida à extração com éter etílico (4 mL) por 3 vezes. A fase etílica foi evaporada e o precipitado ressuspenso em metanol (200 μL) e analisado por espectrofotometria $\lambda_{máx.}$ 330 nm para a quantificação de BFF incorporada nas células.

3.5.9.3) Avaliação da viabilidade de células, incorporadas com BFF, pelo ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazoil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT)

A viabilidade celular foi avaliada utilizando-se o método do MTT, no qual, a célula viva é reconhecida pela manutenção da capacidade redutora da mitocôndria, ou seja, a mitocôndria intacta reduz o MTT a azul de formazana, que absorve a 595 nm.

Foram utilizadas placas de 24 poços semeadas com 5 x 10^5 células/poço e incubadas por 12 horas a 37 ^oC em meio de cultura celular suplementada com SFB. Após esse período, o meio de cultura foi retirado e suplementado com meio sem soro e 100 μM de βCBFF e incubado por 24 horas. Após o período de incubação o meio foi retirado, adicionado novamente meio sem soro e 1 mg/mL de MTT dissolvido em PBS. As células, assim, ficaram em repouso por 2 horas a 37 ^oC. Decorrido este tempo, as células foram tratadas com solução de lise (10 % de SDS em dimetilformamida:água 1:1, pH 4,8) e incubadas por 16 horas. Desse modo, a amostra final foi analisada por espectrofotometria a 595 nm (Hansen, 1989).

4. Resultados e Discussão

4.1) Identificação dos biflavonóides

O extrato alcoólico das folhas de *Araucaria angustifolia* forneceu, após a partição com hexano:água, um precipitado amarelado na fração aquosa que, facilmente, foi separada por centrifugação. Esse precipitado foi denominado de BFF (Fração de Biflavonóides). Em seguida, esse BFF foi analisado por CLAE/EM o qual identificou seis biflavonóides majoritários (**Tabela 4.1, Figura 4.1**). A determinação das ligações interflavonoídicas 3'-8", do tipo amentoflavona, foi feita através dos dados de CLAE/EM e RMN de ^{1}H e ^{13}C do produto per-metilado do BFF.

Tabela 4.1. Identificação e caracterização dos seis biflavonóides majoritários do BFF por CLAE/EM.

Compostos	Tempo de Retenção (min)	Íons Moleculares $[M+H]^+$	Estruturas
1	22	539	R1=R2=R3=R4=OH amentoflavona
2	26	553	mono-*O*-metilamentoflavona
3	30	567	di-*O*-metilamentoflavona
4	33	567	R1=R2=OH; R3=R4=OMe ginkgetina
5	36	581	tri-*O*-metilamentoflavona
6	41	595	R1=R2=R3=R4=OMe tetra-*O*-metilamentoflavona

A co-injeção com padrões autênticos de biflavonóides extraídos de *Ginkgo biloba* possibilitou a identificação e caracterização da amentoflavona (**1**, 2,4% de abundância relativa no BFF) e ginkgetina (**4**, 27,1%) eluídas a 22 e 33 min, respectivamente. Os compostos mono-*O*-metilamentoflavona (**2**, 11,4%), di-*O*-metilamentoflavona (**3**, 26,3%), tri-*O*-metilamentoflavona (**5**, 14,5%) e tetra-*O*-metilamentoflavona (**6**, 16,4%) foram identificados por CLAE/EM (**Figuras 4.1** e **4.2**). O composto 7-*O*-metilamentoflavona não foi encontrado no BFF. A estimativa da molaridade foi baseada na quantidade relativa dos biflavonóides em maior proporção, ginkgetina e di-*O*-metilamentoflavona, além de que o ε (λ = 330 nm) em acetona do BFF (ε = 22130) determinado foi semelhante ao da ginkgetina (ε = 22378) nas mesmas condições.

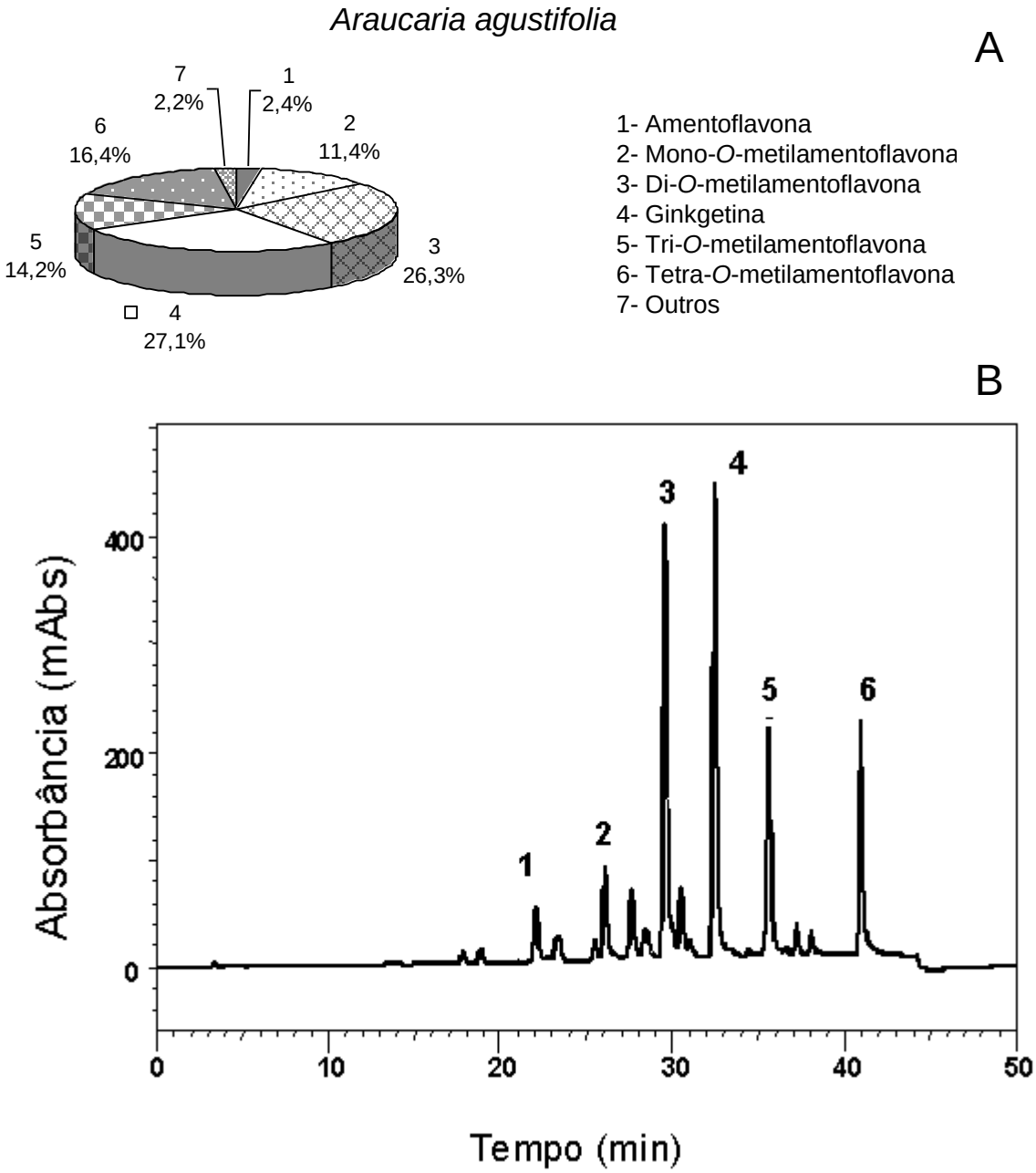


Figura 4.1. (A) Composição centesimal de biflavonóides em folhas de A. angustifolia. **(B)** Perfil cromatográfico do BFF obtido de folhas de *A. angustifólia*. Compostos (**1**) amentoflavona, (**2**) mono-*O*-metilamentoflavona, (**3**) di-*O*-metilamentoflavona, (**4**) ginkgetina, (**5**) tri-*O*-metilamentoflavona e (**6**) tetra-*O*-metilamentoflavona.

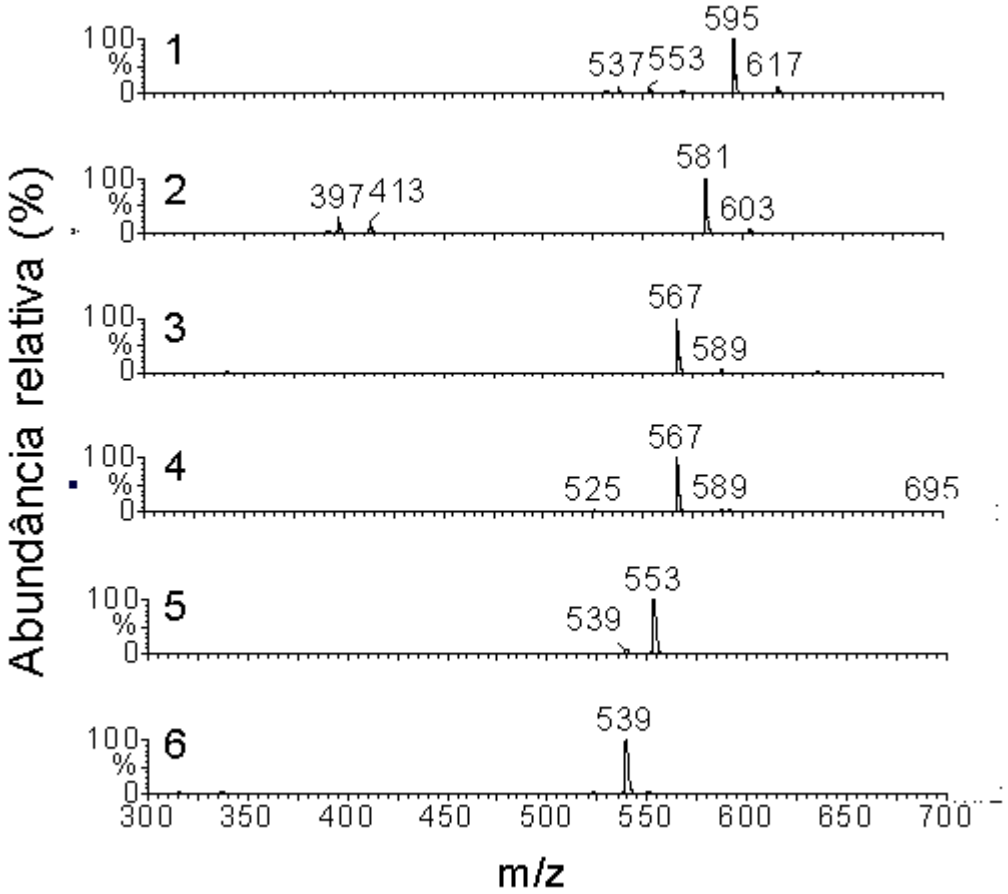


Figura 4.2. Espectro de massas obtido através da análise CLAE/EM-EM do BFF. O composto tetra-*O*-metilamentoflavona possui o $[M+H]^+$ = 595, tri-*O*-metilamentoflavona $[M+H]^+$ = 581, ginkgetina $[M+H]^+$ = 567, di-*O*-metialmentoflavona $[M+H]^+$ = 567, mono-*O*-metilamenetoflavona $[M+H]^+$ = 553 e amentoflavona $[M+H]^+$ = 539.

4.2) Permetilação do BFF

Considerando-se que os biflavonóides possuem várias ligações entre os monômeros de flavonóides, o BFF foi submetido à permetilação com o intuito de avaliar a presença de outros tipos de biflavonóides. O principal produto da permetilação foi identificado como hexa-*O*-metilamentoflavona, baseado na detecção do íon molecular $[M+H]^+$ em 623 por CLAE/EM (**Figura 4.3**) e nos dados de ^1H e ^{13}C RMN (**Figura 4.4**). Os dados obtidos por RMN de ^1H indicam a presença de somente dois sinais meta-acoplados em 6,29 e 6,43 (2d, J = 2,0 Hz), os quais foram atribuídos como H-6 e H-8, respectivamente. Tendo em vista que não foi observado um dubleto semelhante para H-6” e H-8”, a ligação interflavonoídica foi definida como sendo no

carbono C8”. Os sistemas acoplados H-2’”/H-6’” – H3”’/H-5”’ apresentam-se como dois dubletos distintos em δ 7,33 (d, J = 8,9 Hz) e em δ 6,72 (d, J = 8,9 Hz), respectivamente. A ausência de sistemas acoplados semelhantes, associados à presença de dois singletos [δ 6,62 (H-3, s) e 6,56 (H-3”, s)] correspondentes aos H-3 e H-3” excluiu a possibilidade de qualquer ligação entre os flavonóides entre as posições C-3”, C-2”’, C-3”’, C-5”’ ou C-6’” com C-3’ (**Tabelas 4.2** e **4.3**). De acordo com esses resultados, o composto per-metilado foi determinado como um biflavonóide com ligações entre os carbonos 3’ e 8”, ou seja, do tipo amentoflavona como foi relatado anteriormente (Fonseca e col., 2000).

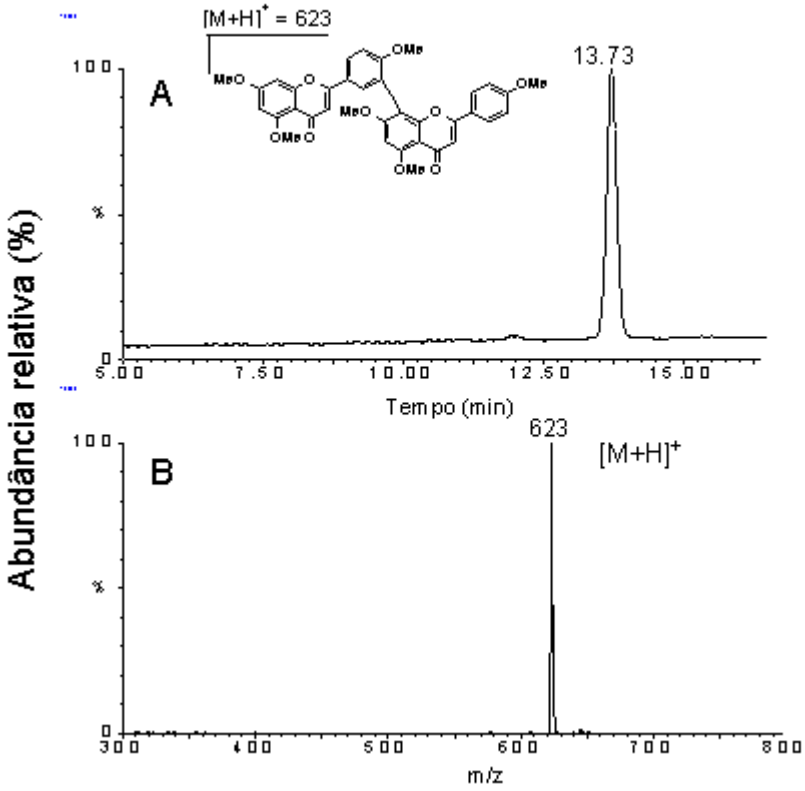


Figura 4.3. Análise por CLAE/EM do produto per-metilado do BFF (hexa-*O*-metilamentoflavona). (A) Cromatograma com detecção UV, (B) Hexa-*O*-metilamentoflavona identificado pelo espectro de massas do pico em 13,73 min.

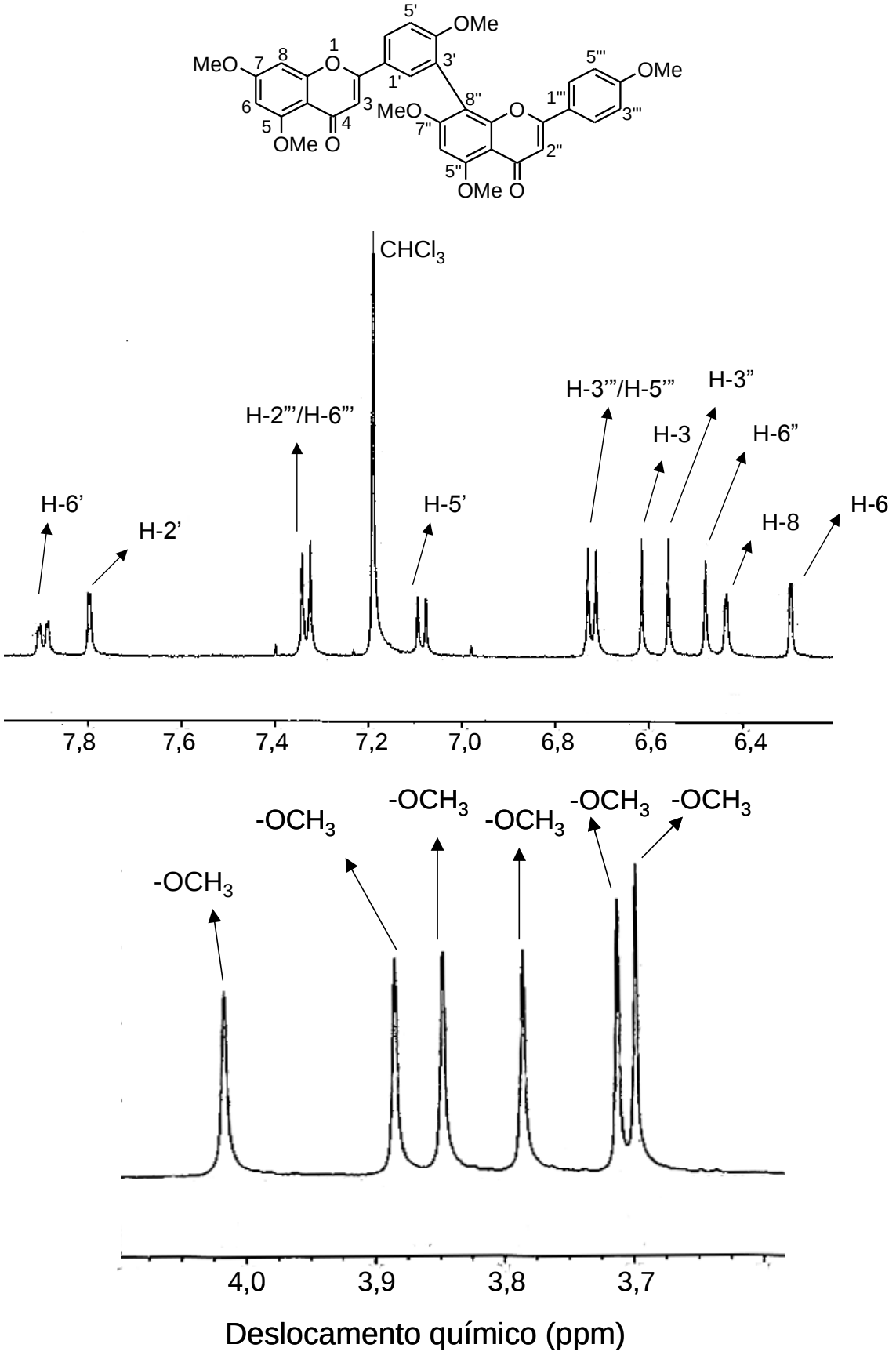


Figura 4.4. Espectro de ^{1}H RMN do composto hexa-*O*-metilamentoflavona adquirido em um equipamento de 500 MHz, em $CDCl_3$.

Tabela 4.2 Deslocamentos químicos no espectro de ^{1}H RMN em $CDCl_3$ do hexa-*O*-metilamentoflavona

Prótons	δ (ppm)		J (Hz)
H-3	6,62	s	
H-6	6,29	d	2,0
H-8	6,43	d	2,0
H-2’	7,79	d	2,0
H-5’	7,08	d	8,7
H-6’	7,89	dd	8,7, 2,0
H-3”	6,56	s	
H-6”	6,48	s	
H-2”’/H-6”’	7,33	d	8,9
H-3”’/H-5”’	6,72	d	8,9
OMe	3,70/3,71/3,79/ 3,85/3,89/4,02		

Tabela 4.3. Deslocamentos químicos no espectro de ^{13}C RMN em $CDCl_3$ do produto hexa-*O*-metilamentoflavona

Carbonos	δ (ppm)
C-3/C-3”	105,7/106,9
C-6	91,8
C-8	90,8
C-10/C-10”	105,7/105,9
C-1’	122,7
C-2’/C-6’	129,5/129,6
C-3’	122,7
C-5’	110,1
C-6”	95,2
C-8”	106,9
C-1”’	121,3
C-2”’/C-6”’	126,6
C-3”’/C5”’	113,3
C-2/C-5/C-7/C-9/ C-4’/C-2”/C-5”/C-7”/ C-9”/C-4”	155,2/158,9/159,1/159, 5/159,7/159,9/160,0/16 0,9/ 161,0/162,9
C-4/C-4”	176,6/177,0

O número de biflavonóides descobertos nos últimos anos não é muito extenso, mas por outro lado, diferentes características estruturais estão sendo identificadas. Inicialmente, era proposto que esses compostos estavam presentes em plantas primitivas, hoje se sabe que estão amplamente distribuídos desde musgos a gimnospermas, e esporadicamente em angiospermas (Harborne, 1988).

A *Ginkgo biloba* L. foi a primeira planta na qual foi feita a extração de biflavonóides, a ginkgetina foi o primeiro a ser isolado por Furukawa em 1929 (Furukawa, 1929) e identificado posteriormente por Nakazawa (Nakazawa, 1941). Vários métodos de separação de biflavonóides estão descritos na literatura (Lobstein-Guth, 1988; Briançon-Scheid, 1982), mas muitos desses passam por várias etapas de purificação e cromatografias em coluna para obtenção do composto puro. Isso se

deve principalmente, ao caráter fenólico e ao tamanho grande da molécula além da variedade e do grande número de isômeros que existem em uma única planta. Esse foi um dos problemas enfrentados na separação dos biflavonóides de *Araucaria angustifolia*, na qual isômeros de posições não possibilitaram o isolamento de todos os biflavonóides presentes. Assim, o método de CLAE/EM foi desenvolvido para a caracterização parcial dos componentes e demonstrou ser uma metodologia muito conveniente para tal finalidade. Foi utilizada uma coluna Synergi C13 (Phenomenex®) recomendada para substâncias moderadamente polares, a qual possibilitou a separação dos biflavonóides de BFF com alta resolução e reprodutibilidade. Em conjunto, a permetilação do BFF foi imprescindível para identificação do biflavonóides do BFF como do tipo amentoflavona, considerando-se que em muitas espécies de *Araucaria* encontram-se diversos tipos de biflavonóides (Ilyas e col., 1978)

A identificação de biflavonóides em *Araucaria angustifolia* foi inicialmente realizada por Ilyas em 1994, o qual identificou a presença de 6 biflavonóides dos tipos amentoflavona, agatisflavona (ligação inter-flavonoídica entre os carbonos C6/C8") e cupressuflavona (C5/C8") utilizando o método de TLC com padrões previamente caracterizados (Ilyas e Ilyas, 1994). Posteriormente, Fonseca e col., identificaram em plântulas 3 biflavonóides do tipo amentoflavona (Fonseca e col, 2000). Assim, a combinação entre dados do CLAE/EM e caracterização do composto per-metilado possibilitou a confirmação da presença de biflavonóides do tipo amentoflavona em *Araucaria angustifolia*, considerando-se que o método de TLC não é uma das técnicas com grande acuidade na identificação de compostos.

4.3) Avaliação da atividade antioxidante de BFF

4.3.1) Análise da supressão da luminescência de $^1O_2$ utilizando a técnica de luminescência no IV resolvida no tempo

A detecção física do $^1O_2$ é baseada na emissão de luz monomol ou dimol. A determinação da constante de supressão de $^1O_2$ pode ser avaliada pela determinação da supressão da fotoemissão monomol a 1270 nm detectados por uma fotomultiplicadora.

A constante de supressão total do $^1O_2$ ($k_t = k_q + k_r$) é a soma das constantes físicas k_q e químicas k_r. O valor de τ ,tempo de vida do $^1O_2$ no determinado solvente,

foi determinado na ausência e na presença de diferentes concentrações dos supressores (**Figura 4.5**), a partir do ajuste exponencial simples. O valor de k_t é o coeficiente angular e o k_d coeficiente linear do gráfico Stern-Volmer (**Tabela 4.4** e **Figura 4.5**).

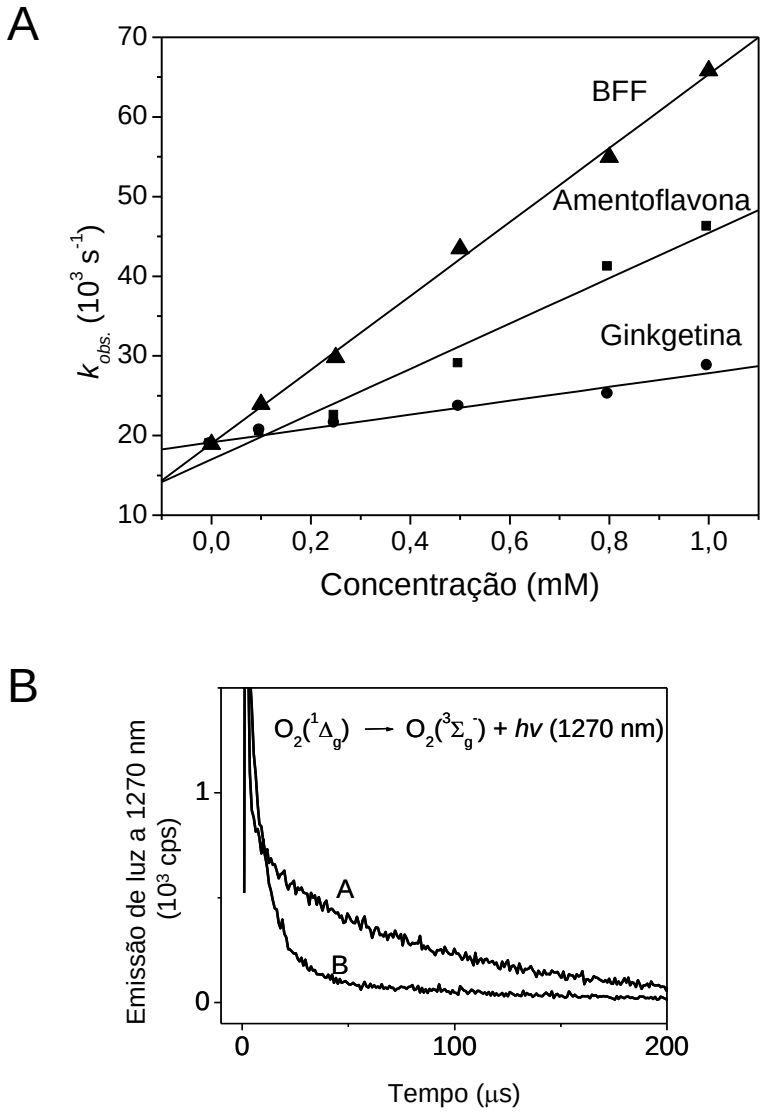


Figura 4.5.: Supressão de $^1O_2$ por BFF, amentoflavona e ginkgetina, A emissão do $^1O_2$ em IV foi obtida pela sensibilização da perinaftenona ($\lambda_{exc.}$ = 355 nm). (**A**) Gráfico de $k_{obs.}$ vs. concentração dos compostos. (**B**) Emissão de luz a 1270 nm de $^1O_2$ e supressão por BFF a 1mM.

Tabela 4.4: Constante supressão total $k_t = (k_q + k_r)$ do $^1O_2$ por flavonóides em acetona.

Composto	τ ($^1O_2$) (μs)	k_t (10^6 M^{-1} s^{-1})
Quercetina	53,5	9
Ginkgetina	53,2	9
Amentoflavona	53,2	30
BFF	52,9	50

O τ obtido em acetona foi de ~ 53 μs, de acordo com o valor reportado na literatura (Monroe, 1985).

Os flavonóides são compostos amplamente conhecidos e estudados com maior intensidade. A constante de supressão do $^1O_2$ foi determinada para 13 flavonóides, junto com a sua relação estrutura atividade (Tournaire e col., 1993). Foi demonstrado que a presença de grupos catecóis no anel B, é um dos fatores associados com a capacidade de suprimir fisicamente o $^1O_2$ como na catequina e na quercetina que possuem constantes na ordem de 5 a 1 x 10^6, enquanto que nos outros flavonóides sem este grupamento estão na ordem de 10^5.

A constante de supressão física dos biflavonóides ainda não tinha sido determinada. Os biflavonóides do BFF não possuem grupamentos catecóis, apesar disso a amentoflavona, obteve a maior constante de supressão física, e 3 vezes maior que o da ginkgetina (**Tabela 4.4**). Assim a presença de grupos hidroxila parece ser, no caso dos biflavonóides, o principal fator que influencia na supressão física do $^1O_2$.

4.3.2) Quebras em DNA plasmidiais na presença de $^1O_2$ gerado pela termodecomposição de $NDPO_2$ e proteção por biflavonóides.

Os danos em DNA plasmidial (pBluescript e PUC 19) foram avaliados, utilizando-se eletroforese em géis de agarose, quantificando-se a indução de quebras em simples fita de DNA, os quais resultam na forma circular aberta (CA) e a diminuição da forma intacta superenovelada (SE). A concentração estacionária de $^1O_2$ formada pela termodecomposição de 20 mM de $NDPO_2$ está na ordem de 10^{-12} M (Di Mascio e col., 1989A) o qual aumenta, significativamente, a formação de quebras

de fita simples em DNA plasmidial pBluescript, de 8% (**Linha 1, Figura 4.6**) da forma CA no controle para 25 % na amostra tratada (**Linha 2, Figura 4.6**). A formação destas quebras em função do tempo indica que o processo requer duas moléculas de $^1O_2$ (Di Mascio e col. 1989A). Esses dados sugerem que essas quebras necessitam da oxidação do 8-oxo-dGuo formada inicialmente pela oxidação da dGuo no DNA. Foi também demonstrada que a 8-oxodGuo não é um sítio álcali-lábil (Burrows e Muller, 1998).

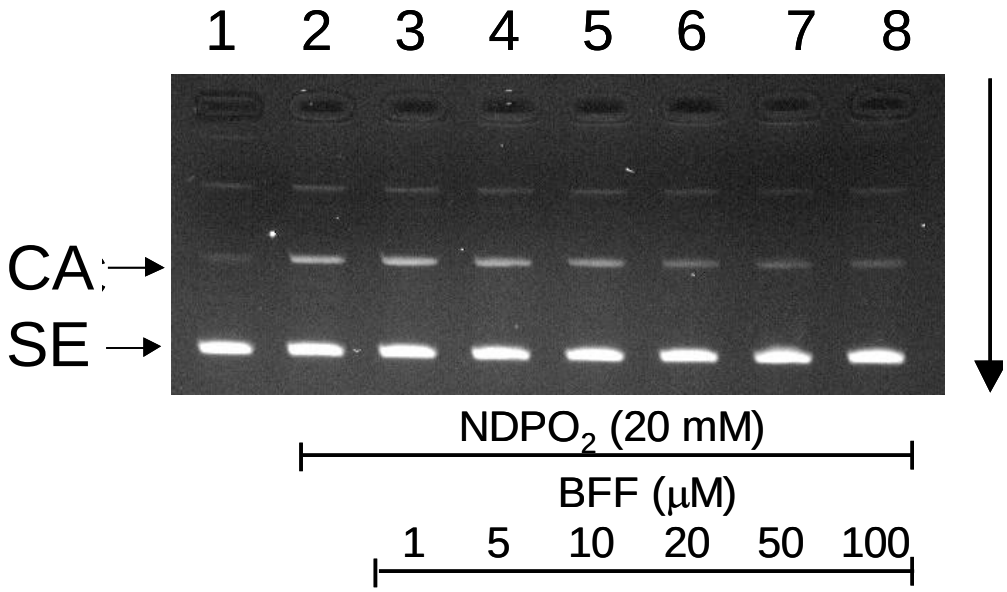


Figura 4.6. Eletroforese horizontal em gel de agarose mostrando a proteção por BFF contra quebras em DNA plasmidiais provocados por $^1O_2$, após 100 min de incubação. 1, plasmídio pBluescript controle; 2, plasmídio + $NDPO_2$ 20 mM; 3, plasmídio + BFF 1 μM; 4, plasmídio + $NDPO_2$ 20 mM + BFF 5 μM; 5, plasmídio + $NDPO_2$ 20 mM + BFF 10 μM; 6, plasmídio + $NDPO_2$ 20 mM + BFF 20 μM; 7, plasmídio + $NDPO_2$ 20 mM + BFF 50 μM; 8, plasmídio + $NDPO_2$ 20 mM + BFF 100 μM. Formas CA e SE são circular aberta e superenovelada, respectivamente.

A **Figura 4.6** mostra a eletroforese em gel de agarose do plasmídio pBluescript tratado com $NDPO_2$ e diferentes concentrações de BFF. A formação de CA na presença de $^1O_2$ e sua inibição na presença de várias concentrações de BFF, quercetina, rutina, amentoflavona, ginkgetina e Trolox® são apresentadas nas **Figuras 4.7** e **4.8**, utilizando-se plasmídios pBluescript e PUC 19, respectivamente. Todos os compostos examinados inibiram a formação de CA. O BFF foi o mais eficiente na proteção contra a formação dessas quebras. A inibição proporcionada com 20 μM de BFF foi de 70 % e em segundo a rutina proporcionou uma proteção de

58 % na mesma concentração. No caso da quercetina, a proteção de 25 % foi menos da metade daquelas observadas para BFF e rutina (**Figura 4.7**).

Trolox®, um derivado hidrossolúvel do α-tocoferol considerado como um potente supressor de lipoperoxidação, apresentou-se muito menos eficiente comparado com os outros compostos, 20 μM of Trolox® protegeu 24 % contra formação da forma CA (**Figura 4.7**).

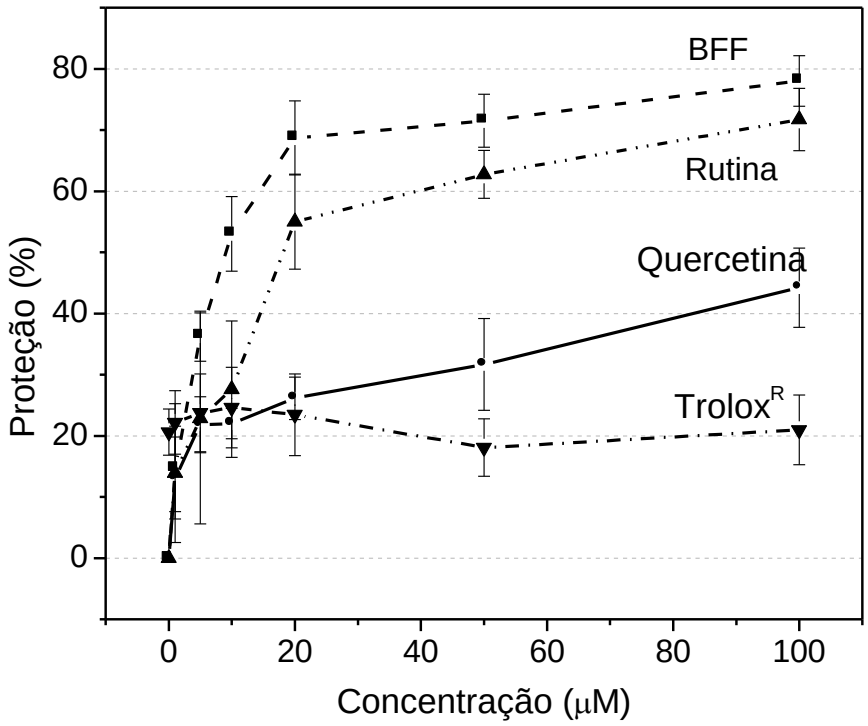


Figura 4.7. Inibição da formação da CA por BFF, quercetina, rutina e Trolox® induzido por $^1O_2$ gerado por $NDPO_2$ em DNA plasmidial de pBluescript.

A curva dose-resposta do plasmídio PUC exposto a $NDPO_2$ e a diferentes concentrações de BFF, quercetina, rutina, Trolox®, amentoflavona e ginkgetina é apresentada na **Figura 4.8**. A sequência da porcentagem de proteção foi a mesma obtida com o ensaio utilizando-se o plasmídio pBluescript. O BFF protegeu 65 %, seguido pela rutina (38 %) com 50 μM. (**Figura 4.8**).

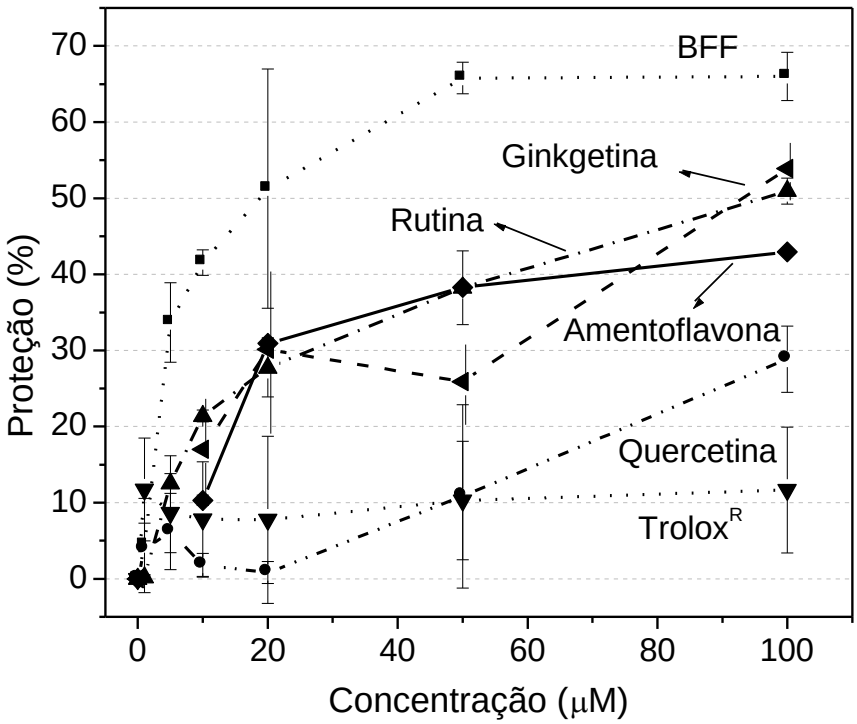


Figura 4.8. Proteção por BFF, rutina, quercetina, ginkgetina, amentoflavona e Trolox® (1 a 100 μM) contra formação de CA induzida por $^1O_2$ em plasmídio PUC 19.

Os mecanismos pelos quais esses flavonóides protegem o material genético contra $^1O_2$ podem envolver a supressão física ou química. A supressão química é baseada na reação química do $^1O_2$ com um substrato apropriado resultando num produto.

Os flavonols como a quercetina podem reagir com o $^1O_2$ levando a um rompimento do anel C pela cicloadição [2+2] do $^1O_2$ com a ligação dupla do anel C. Essa reação é favorecida pela presença da hidroxila na posição 3 do anel C, levando a formação do intermediário 1,2-dioxetano. Devido a instabilidade do dioxetano a temperatura ambiente, este se decompõe para formar um éster dois grupos carbonílicos, levando a formação de um ácido carboxílico após a perda de um CO (Tournaire e col. 1993). No caso das flavonas (BFF, amentoflavona e ginkgetina), o mesmo mecanismo poderia estar envolvido mas com menor facilidade que a quercetina por não possuírem a hidroxila na posição 3. Assim, a potencialidade do

BFF em proteger contra a quebra de DNA provocado por $^1O_2$ pode ser explicada pela supressão física ou também pela maior interação deste com as fitas do DNA.

O $^1O_2$ pode ser suprimido fisicamente por dois mecanismos: transferência de elétrons e/ou transferência de energia (Foote, 1979). Sugere-se que carotenóides (ex. β-caroteno, licopeno) (Foote e col., 1970; Anderson e Krinsky, 1973; Di Mascio e col., 1992; Di Mascio e col., 1989B; Yamaguchi e col., 1999) e complexos de níquel (Rabek, 1985) suprimem o $^1O_2$ pela transferência de energia dispersa na forma de calor. Fenóis, sulfetos e azidas podem suprimir $^1O_2$ pelo mecanismo de transferência de carga (Khan e col., 1992, Yamaguchi, 1985).

4.3.3) Proteção de quebras em DNA plasmidial induzidas pela reação de Fenton

A geração de $^{\bullet}OH$ foi através da redução de H_2O_2 pelo Fe^{2+}. Este radical muito reativo tem a capacidade de reagir com compostos orgânicos ao redor. Dessa forma, o $^{\bullet}OH$ pode rapidamente, reagir com o solvente levando à formação de radicais secundários que podem provocar danos ao DNA plasmidial (Lai e col., 1979).

O efeito do BFF, flavonóides (quercetina e rutina), biflavonóides (amentoflavona e ginkgetina) e Trolox® na quebra em DNA plasmidial mediada por radical hidroxila foi sumarizado na **Figura 4.9**

A quercetina apresentou capacidade antioxidante superior nessas condições, utilizando-se 1 μM houve a proteção de 75 % contra a formação de CA. A rutina também foi bastante eficiente nesse sistema com 75 % de proteção com 5 μM (**Figura 4.9**). Ambos possuem atividades antioxidantes superiores ao do Trolox®. BFF possui atividade de 72 % com 100 μM.

Os flavonóides possuem a habilidade de agir como antioxidantes pelo “sequestro” de espécies reativas de oxigênio resultando na formação de radicais fenoxilas que são menos reativos (Cotelle e col., 1996, Hanasaki e col., 1994).

A quercetina foi o mais eficiente na proteção contra estes danos. Esse fato deve-se às propriedades estruturais desse composto, como a presença do grupamento catecol que confere uma maior estabilidade ao radical formado e participa na deslocalização do elétron, a presença da dupla ligação entre os carbonos C2 e C3 em conjugação com a carbonila no C4, responsável pela deslocalização do elétron do anel B e o grupo C3-OH, que confere um maior potencial antioxidante

(Rice-Evans, 1994). A rutina, um derivado glicosilado na posição C3 da quercetina, também apresentou um alto potencial antioxidante, o que demonstra que a presença do grupo catecol tem maior influência na atividade. Os biflavonóides amentoflavona e ginkgetina não apresentaram uma proteção considerável, uma vez que não possuem o grupamento catecol, apesar da amentoflavona possuir 4 hidroxilas substituintes.

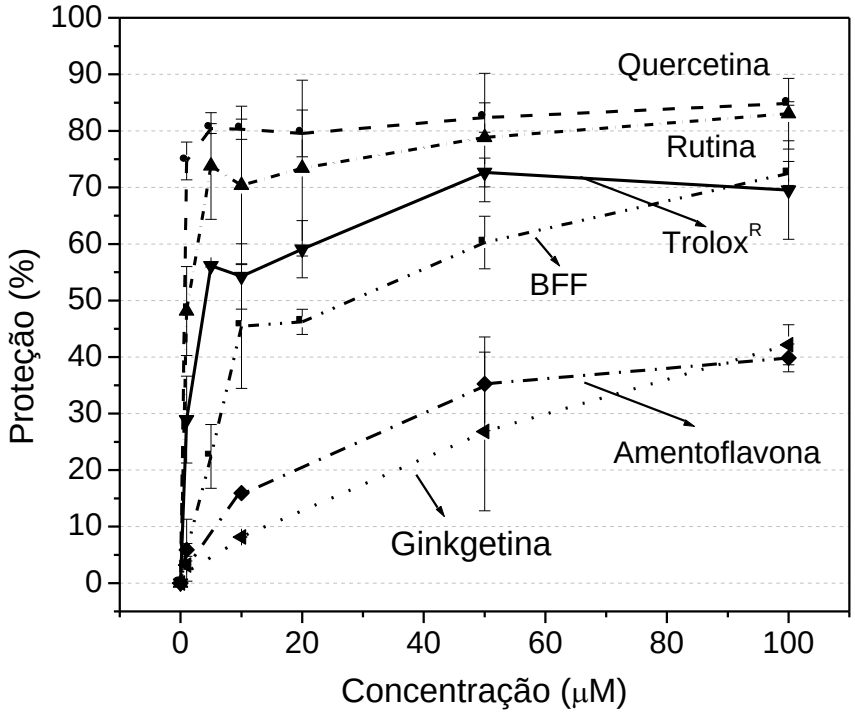


Figura 4.9. Efeito inibitório de BFF, flavonóides quercetina e rutina, biflavonóides amentoflavona e ginkgetina e Trolox® sobre a formação de CA induzido pela reação de Fenton. A formação de ssb foi monitorada pela formação da forma CA no plasmídio pBluescript DNA.

4.3.4) Proteção contra lipoperoxidação induzida por radiação UV

A exposição de lipossomos de FC à radiação UV por 1 hora provocou um aumento significativo na produção de TBARS. Os compostos testados neste estudo foram eficientes na proteção de lipossomos numa forma dose-dependente.

Quercetina foi o protetor mais eficiente, seguido pela rutina e α-tocoferol (**Figura 4.10**). Dentre os biflavonóides a amentoflavona mostrou maior eficiência (90 % de proteção), comparada ao BFF e ginkgetina (60 % com 100 μM). Esse efeito deve-se principalmente à presença, em maior quantidade, de grupos hidroxila na amentoflavona que pode agir como doadores de hidrogênio.

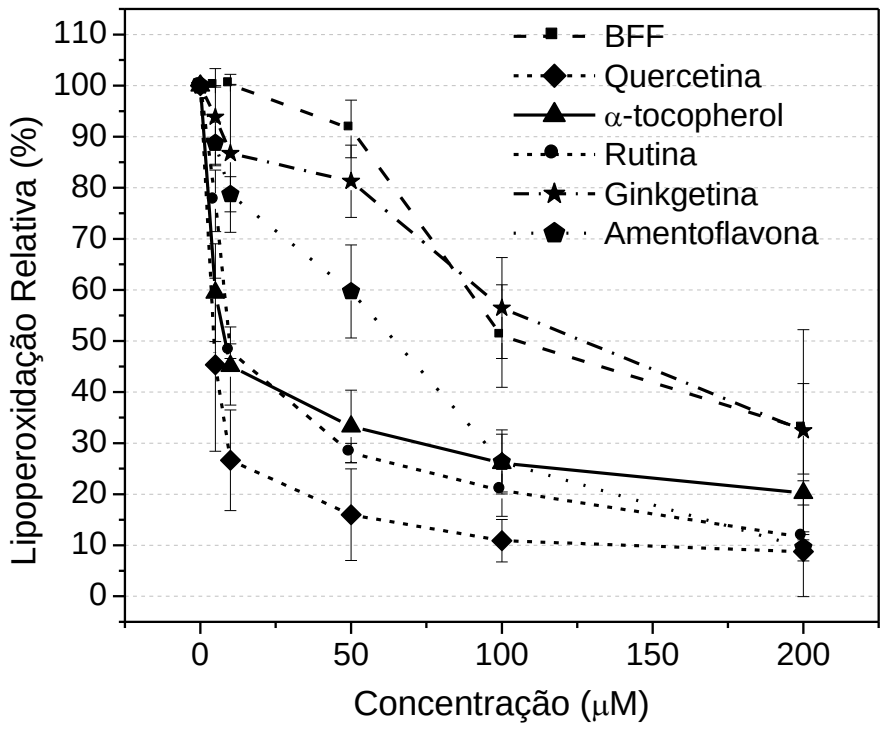


Figura 4.10. Inibição da peroxidação induzida por radiação UV, em lipossomas de fosfatidilcolina, por concentrações crescentes de quercetina, rutina, BFF, α-tocoferol, amentoflavona e ginkgetina. A atividade antioxidante foi determinada pela análise da formação de TBARS.

Existem várias evidências da relação entre a formação de RONS com degradação de fosfolipídos por radiação UV (Taira e col., 1992). Assim, os melhores resultados apresentados pelos flavonóides na proteção contra danos provocados por UV em fosfolipídios era de se esperar, considerando que a quercetina e rutina são sequestradores conhecidos de $^{\bullet}OH$, $ROO^{\bullet}$.

Em estudos de atividade antioxidante dos flavonóides sugere-se que um dos possíveis mecanismos de ação desses compostos seria a capacidade de reciclagem de outros antioxidantes (Filipe e col., 2001), como ocorre no caso de ácido ascórbico e α-tocoferol, no qual, o radical α-tocoferila é reduzido de volta a α-tocoferol pelo ácido ascórbico (Burton e col., 1990). Para tal análise realizamos um ensaio, onde, foi analisada a capacidade do BFF e α-tocoferol em conjunto proteger contra a lipoperoxidação induzida por radiação UV. O efeito do α-tocoferol e BFF, adicionados em conjunto ou individualmente, sobre esse sistema, está representado na **Figura 4.11**. A combinação de ambos diminuiu consideravelmente a lipoperoxidação, aproximando-se a 80 % de proteção com 20 μM e chegou a inibir praticamente 100 % com 400 μM dos compostos em conjunto. Esta inibição é maior que o efeito de cada composto individualmente, mas não possibilitou a distinção entre efeito aditivo e sinérgico, pois está representada em porcentagem de lipoperoxidação. Sendo assim, impossibilita a comparação em números exatos.

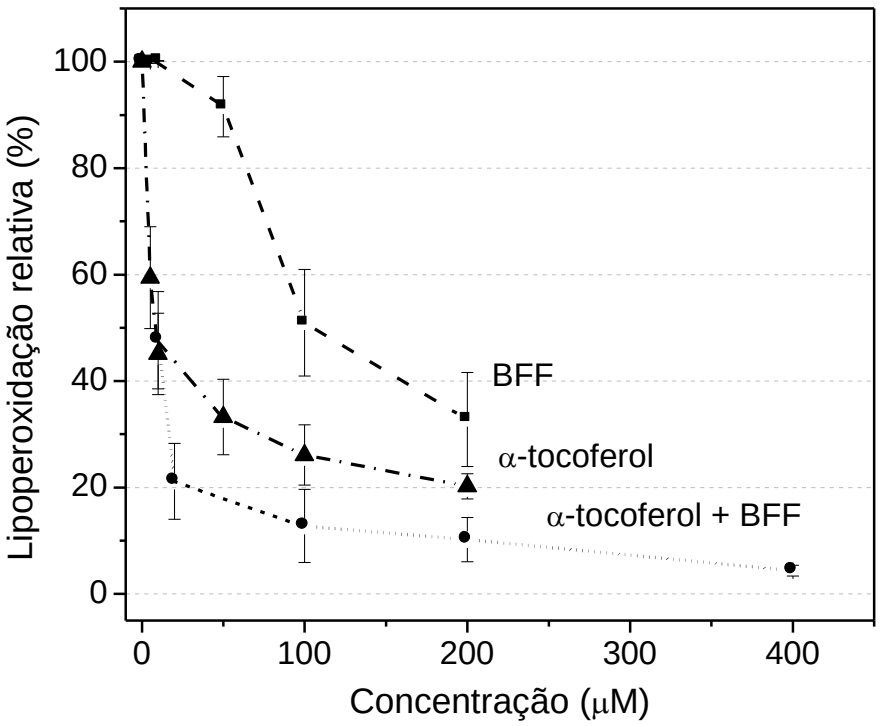


Figura 4.11. Efeito inibitório sobre a lipoperoxidação do BFF, α-tocoferol e adição de ambos.

4.3.5) Proteção contra lipoperoxidação induzida pela reação de Fenton

No ensaio de proteção contra lipoperoxidação de liposomas induzidas por Fenton, todos os compostos testados protegeram contra este dano de uma forma dose-dependente. O α-tocoferol mostrou ser o mais eficiente neste tipo de danos como já foi demonstrado em vários estudos. A amentoflavona e o BFF, praticamente, não tiveram diferença na eficiência (**Figura 4.12**). Além dos mecanismos propostos aqui em relação à habilidade em inibir a lipoperoxidação, os flavonóides seriam capazes de alterar a cinética da peroxidação através da modificação no empacotamento dos lipídios e na diminuição da fluidez das membranas. Essas modificações podem diminuir a difusão das espécies reativas, diminuir a exposição dos lipídios aos danos e restringir a lipoperoxidação (Arora, 2000). Considerando-se que os biflavonóides são de tamanho maior, provavelmente, a inserção na membrana não seja tão facilitada, mas de qualquer forma os efeitos dessa interação não foram elucidados.

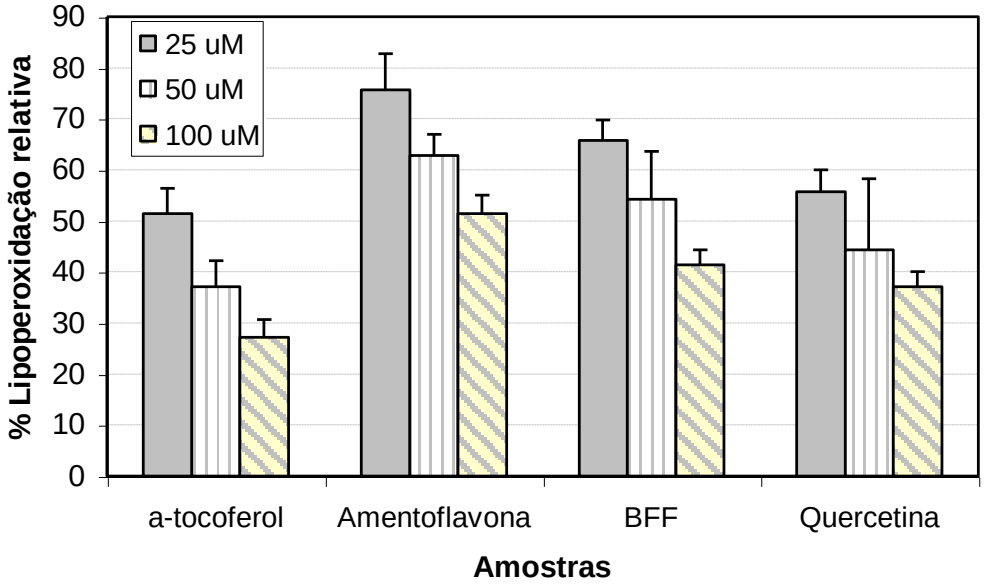


Figura 4.12. Proteção contra lipoperoxidação induzida por reação de Fenton.

4.4) Análise da formação de complexos entre biflavonóides e metais de transição com detecção por espectrometria de massas.

A interação de flavonóides e biflavonóides com íons metálicos (Cu^{2+}, Fe^{3+} e Al^{3+}), analisados por IES/EM (espectrometria de massas com ionização por "electrospray"), indicam que os complexos formados possuem uma estequiometria bastante variável entre eles (**Tabela 4.5**). Os íons moleculares de cada composto foram detectados na forma protonada, ou seja $[M+H]^+$, cujo M seria a representação do flavonóide ou biflavonóide neutro **Figuras 4.13A, 4.15A, 4.17A, 4.19A**).

A quercetina em particular apresentou vários complexos com estequiometrias diferentes com o alumínio 1:1, 1:2 e 2:3. Estes complexos foram detectados em m/z 329, 630 e 955 correspondendo aos íons $[Al+(M-H)]^+$, $[Al+M+(M-H)]^+$ e $[2Al+3M-5H]^+$, respectivamente (**Figura 4.13B**). Essas formações provavelmente deve-se ao fato do alumínio ser um átomo de massa pequena que facilitaria a sua inserção, também pela estrutura da quercetina que possibilita vários locais de complexação com o metal, como o grupo catecol no anel B, entre as posições 4-oxo e 3-hidroxi ou entre 4-oxo e 5-hidroxi (Fernandez e col., 2002). Não houveram detecção de complexos de quercetina com ferro e cobre, neste caso, provavelmente, as condições de análise não devem ter sido ideais para detecção destas espécies, pois, em outros estudos foram detectados complexos entre quercetina e estes metais nas proporções de 1:1 e 1:2 (Mira e col., 2002; Fernandez e col., 2002).

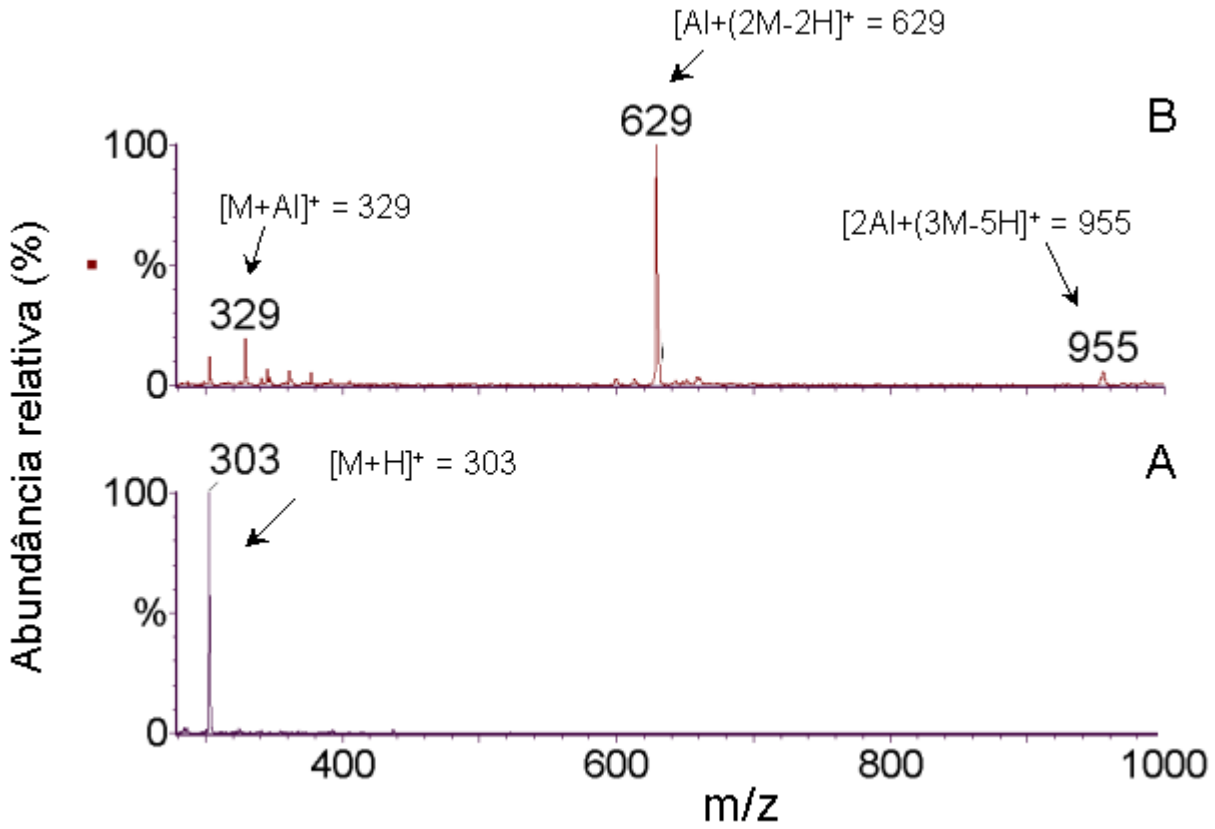


Figura 4.13. Espectro de massas (IES/EM) da complexação entre quercetina e íons metálicos. **4.13A** Detecção de quercetina (100 μM) na forma protonada $(M+H)^+$ = 303; **4.13B** espectro de massas do complexo entre quercetina e Al^{3+}.

Resultados e Discussão

Tabela 4.5: Complexos formados entre flavonóides, biflavonóides e íons metálicos, m/z detectado e abundância relativa de cada complexo.

Compostos (m/z)	**Solução ácida (m/z, %)**	**Al^{3+} (m/z, %)**	**Cu^{2+} (m/z, %)**	**Fe^{3+} (m/z, %)**
Quercetina	$(M+H)^+$(303, 100)	$[Al+M]^+$ (329, 20) $[Al+(2M-2H)]^+$ (629, 100) $[2Al+(3M-5H)]^+$ (955, 7)	ND	ND
Rutina	$(M\text{-rutinose-}H)^+$ (303, 100) $(M+H)^+$ (611, 5)	$[Al+M+(M-H)]^+$ (1246, 10)	$[Cu+M]^+$ (673, 12)	[Fe+M+(M-rutinose-H)] (967, 4) [Fe+2M] (1276, 4)
Amentoflavona	$(M+H)^+$ (539, 100)	$[Al+(M-2H)]^+$ (563, 100) $[Al+(2M-2H)]^+$ (1101, 9)	$[Cu+(M-H)]^+$ (600, 12)	$[Fe+(M-2H)]^+$ (592, 18) $[Fe+(2M-2H)]^+$ (1130, 15)
Ginkgetina	$(M+H)^+$ (567, 100)	$[Al+(M-2H)]^+$ (591, 100) $[Al+(2M-3H)^+$ (1156, 7	ND	$[Fe+(M-2H)]^+$ (620, 70) $[Fe+(2M-H)]^+$ (1187, 12)

ND = não detectado

A **Figura 4.14** apresenta o espectro de massas dos complexos formados entre os íons metálicos e rutina. A rutina apresenta um pico majoritário em m/z 303, que corresponde à perda da rutinose (**Figura 4.14A**) e também $[M+H]^+$ 611. Os complexos entre rutina e Al^{3+}, foram identificados, somente, na proporção 1:2. Com Cu^{2+} 1:1 e Fe^{3+} 1:2 (**Figura 4.14).**

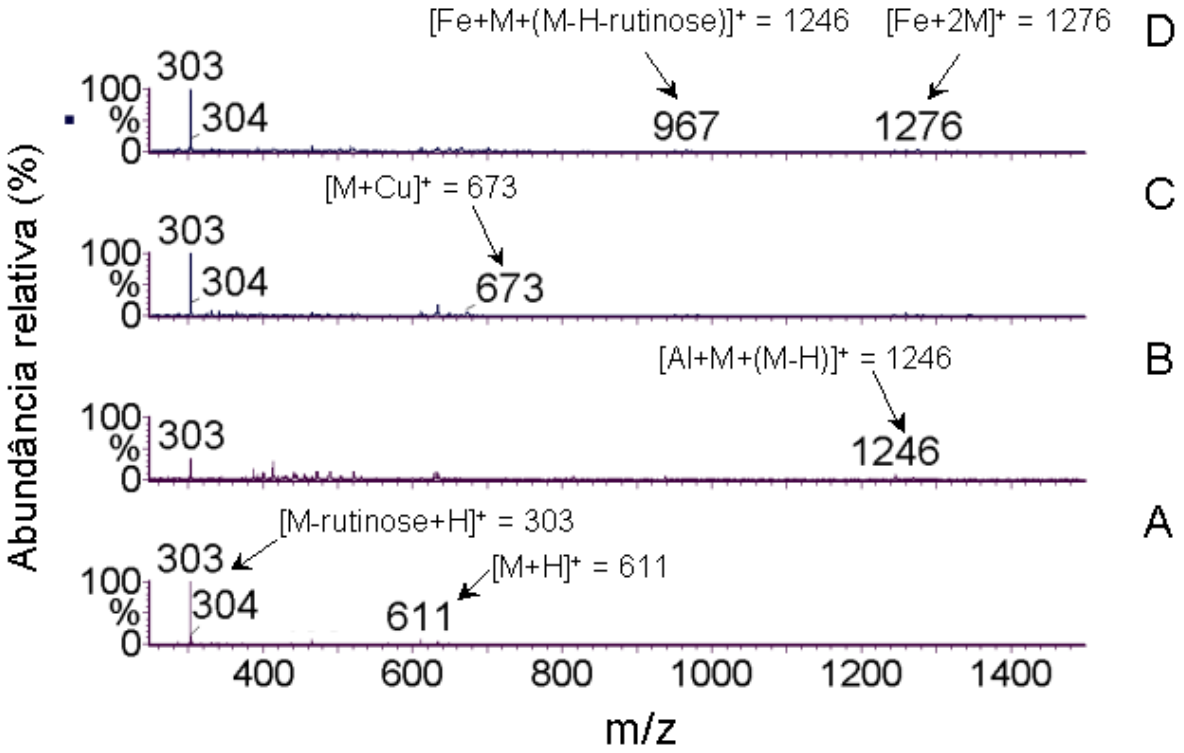


Figura 4.14 Espectro de massas da (**A**) rutina e complexado com os metais (**B**) Al^{3+}, (**C**) Cu^{2+} e (**D**) Fe^{3+}.

Os espectros de massas dos biflavonóides apresentaram íons moleculares $(M+H)^+$ com 100 % de intensidade (**Figuras 4.15A** e **4.17A**). Nos complexos com metais, observou-se somente a formação de íons com proporções de 1:1 e 1:2 (metais:biflavonóides) (**Figuras 4.15** e **4.17**). Não foi observada a formação de complexo de ginkgetina com cobre. Esse fato, talvez se deva à configuração tridimensional dos biflavonóides que provavelmente desfavorece a inserção de mais íons metálicos.

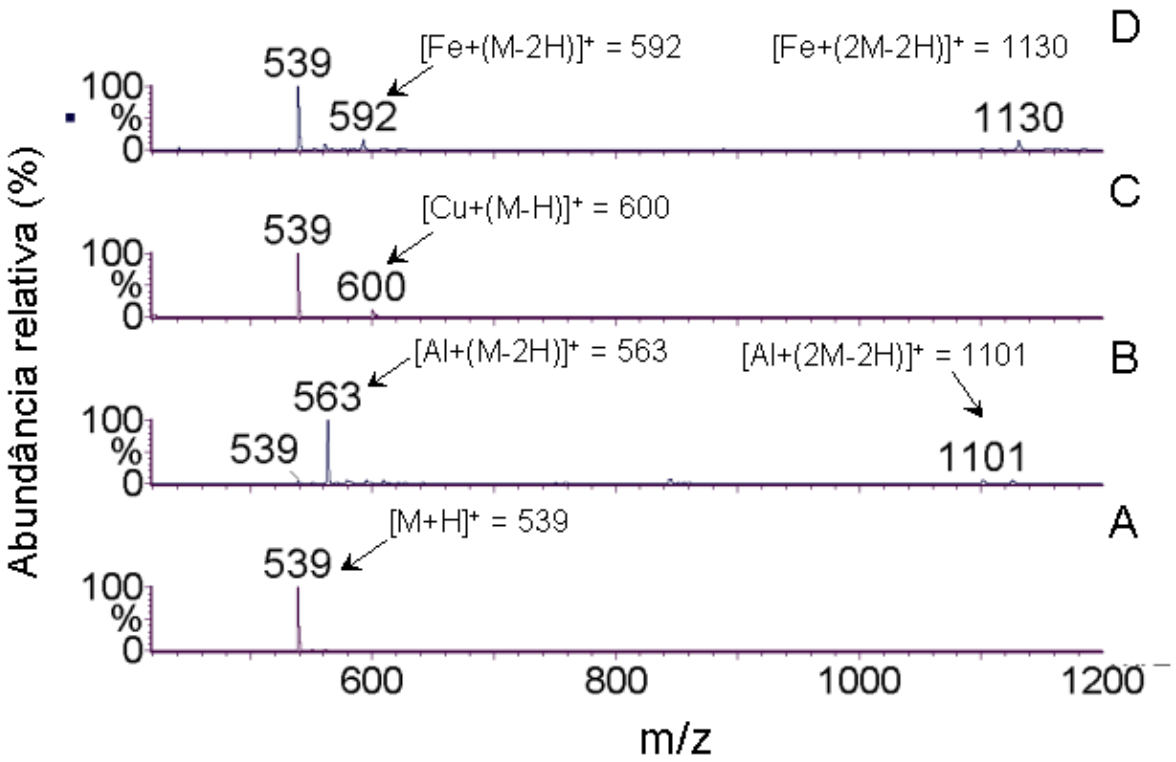
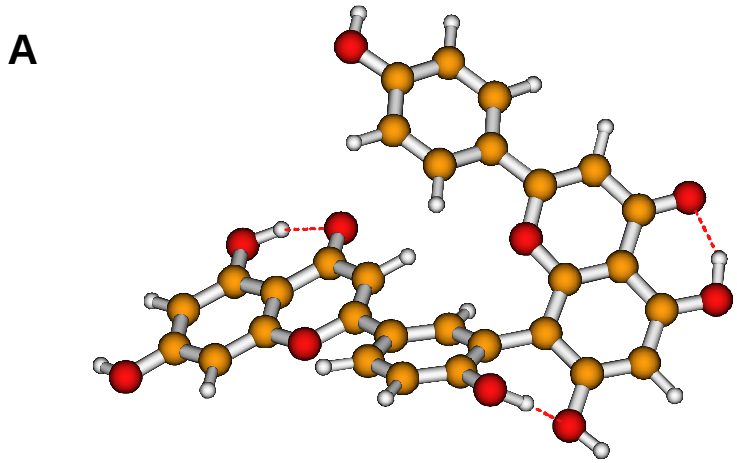


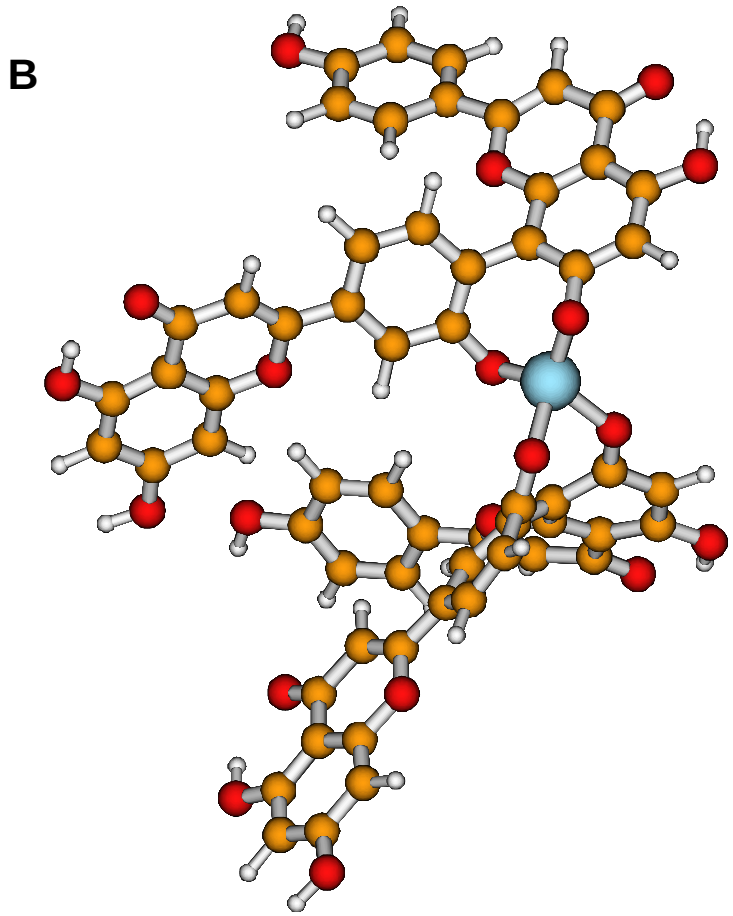
Figura 4.15 Espectro de massas da (**A**) amentoflavona e complexo com os metais (**B**) Al^{3+}, (**C**) Cu^{2+} e (**D**) Fe^{3+}.

A geometria de equilíbrio da amentoflavona neutra e do complexo com amentoflavona e alumínio na proporção 2:1 foram calculadas com o programa semi-empírico AM1 (**Figuras 4.16ª e 4.16B**)

A geometria de equilíbrio da ginkgetina, obtida da mesma forma que o da amentoflavona, está demonstrada na figura **4.18.**



Amentoflavona



$[Al+M+(M-2H)]^+ = 1100$

Figura 4.16 Estrutura tridimensional de equilíbrio calculada com o método semi-empírico AM-1 da amentoflavona (**A**) e do complexo da amentoflavona com o alumínio (2:1) (**B**).

Geralmente, os íons ferro estão complexados com proteínas, em determinadas situações esses íons podem ser liberados como em casos que ocorre uma diminuição do pH como consequência de danos à proteína provocados por peróxidos e derivados (Baker e Gebick, 1986), ou durante a fagocitose. No processo inflamatório e na isquemia/reperfusão também podem ocorrer diminuições no pH *in situ*. Os íons cobre estão fortemente ligados a ceruloplasmina, uma proteína plasmática, mas uma pequena quantidade pode estar ligada à albumina e aminoácidos como a histidina (Marx e Chevion, 1985). Esses íons metálicos que não estão sequestrados de forma adequada podem agir como catalisadores de reações de formação de espécies reativas. No organismo humano existem vários compostos que podem sofrer auto-oxidação, como o NADH, NADPH, tióis, adrenalina, dentre outros. Todos estes compostos são capazes de reduzir O_2 a $O_2^{\bullet -}$, mas a velocidade de reação é muito

lenta. Por outro lado, metais de transição podem catalisar essas oxidações, misturas de tióis, catecolaminas com íons de ferro ou cobre podem causar danos às biomoléculas intermediadas por radicais livres (Halliwell e Gutteridge, 1992). Assim, esses quelantes de metais podem impedir a formação de espécies reativas. Por outro lado, existem estudos que relatam a capacidade desses quelatos em promover a formação de espécies reativas. A constante de reação de Fe^{2+} com H_2O_2 é baixa (< 100 $M^{-1}s^{-1}$) mas é muito afetada pelo ligante, por exemplo, a constante de reação do Fe^{2+}-ATP com H_2O_2 a pH 7,2 e 25 °C foi determinada como 6,6 x 10^3 $M^{-1}s^{-1}$. Assim, somente a capacidade de um composto em quelar metais não indica que esse complexo não catalise a formação de espécies reativas (McCord e Day, 1978). Dessa forma, um quelante de metais somente consegue inibir a formação de espécies reativas se alterar o potencial de redução para desfavorecer a reação com H_2O_2 ou promover a oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} que é muito menos reativo com o H_2O_2 (Halliwell e Gutteridge, 1999). Considerando esses fatos não foi possível afirmar que os complexos de metais com biflavonóides podem impedir a formação de espécies reativas. Porém, é a primeira vez que dados de espectrometria de massas fornecem evidências diretas de que os biflavonóides possuem a capacidade de quelar metais e podem até agir como coadjuvantes na ação antioxidante dos biflavonóides. Esses biflavonóides também foram capazes de quelar íons alumínio que podem ser adquiridos pela dieta, principalmente por chás. O excesso desses íons está relacionado com algumas injúrias, como por exemplo, a doença de Alzheimer (Deng, 1997). Assim, essa habilidade de formar complexos com metais pode ser benéfica para a redução de várias doenças.

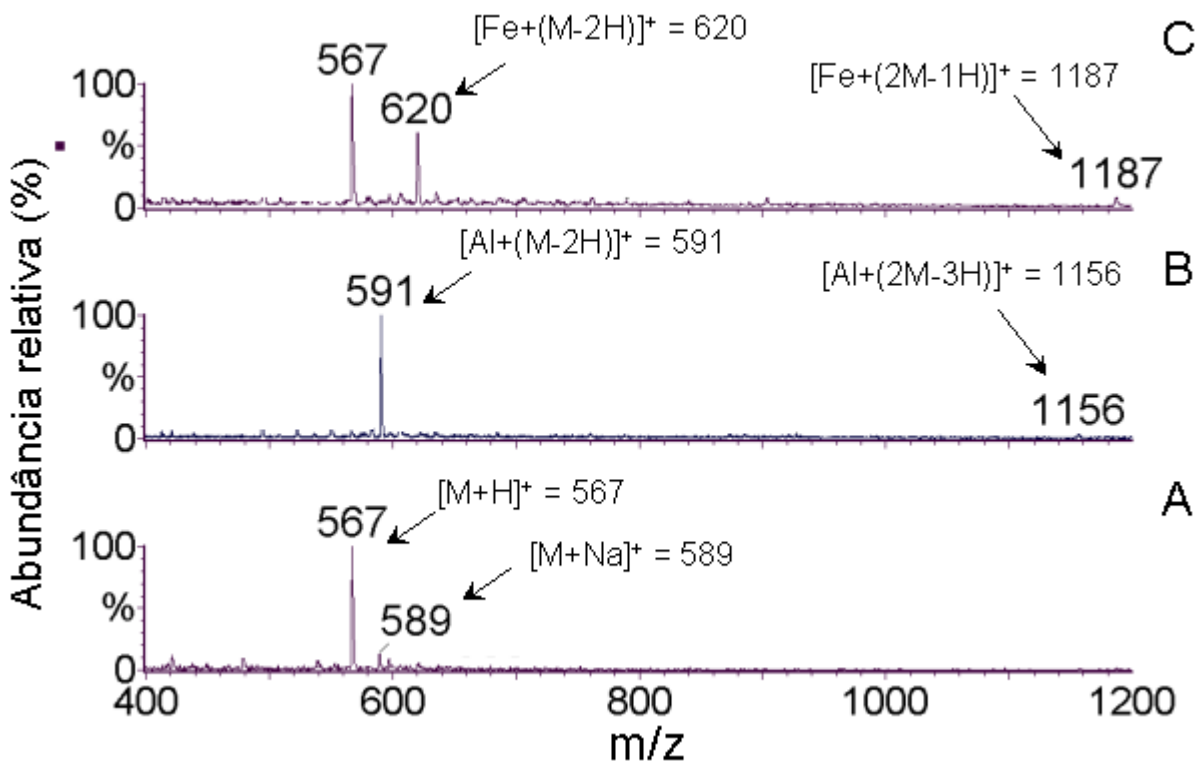


Figura 4.17 Espectro de massas da (**A**) Ginkgetina e complexo com os metais (**B**) Al^{3+} e (**C**) Fe^{3+}.

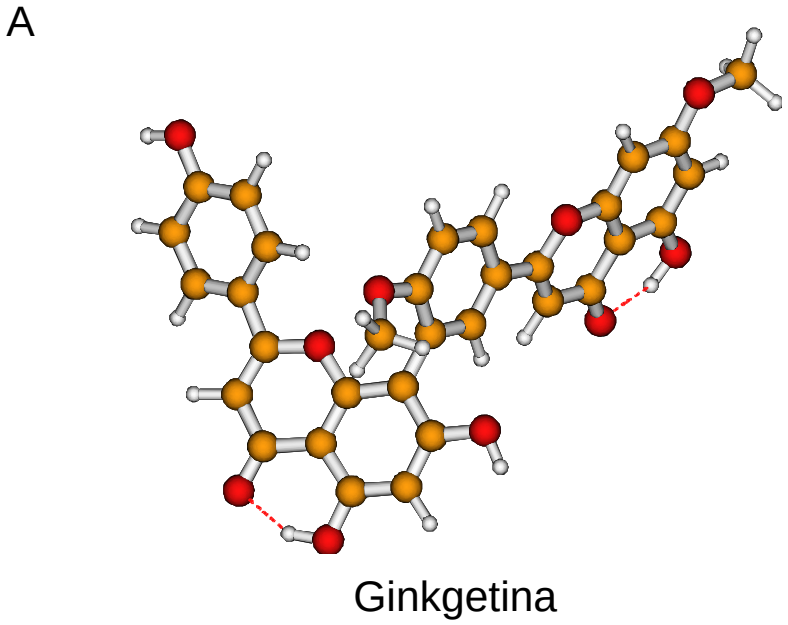


Figura 4.18 Configuração da geometria de equilíbrio da ginkgetina neutra.

4.5) Análise de 8-oxodGuo, dímero ciclobutânico de timidina e aduto de (6-4) prmidona formados em DNA de timo de bezerro expostos à radiação UV

As amostras de DNA de timo de bezerro foram irradiadas com radiação UV-C e UV-B. No caso do UV-C foram analisadas por CLAE/EQ para detecção de 8-oxodGuo (**Figura 4.19 4.20** e por espectrometria de massas para detecção de dímeros de pirimidina (**Figuras 4.21**. No caso da irradiação UV-B foi feita somente a análise dos dímeros de pirimidina.

A formação de 8-oxodGuo após a irradiação por 2 horas foi de 3,7 x 10^3 8-oxodGuo/10^6 dGuo, uma quantidade muito superior que o esperado, comparando-se com o nível basal que se situa em torno de 50 8-oxodGuo/10^6 dGuo. Ao adicionar 100 e 500 μM de BFF, houve uma redução de formação de 8-oxodGuo em 90 e 91 % (0,387 e 0,337 x 10^3 8-oxodGuo/10^6 dGuo), respectivamente (**Figura 4.20**. A formação de 8-oxodGuo induzida por radiação UV-C pode ser explicada pela fotooxidação do tipo I, no qual a radiação pode provocar a oxidação por um elétron, a guanina por possuir o menor potencial de ionização é o alvo preferencial comparado com outros alvos. Essa reação leva a um radical catiônico da guanina, a hidratação deste leva à formação de um radical reduzido 8-oxo-7,8-diidroguanila, o qual na presença de O_2 forma 8-oxodGuo (Cadet, 1997). No controle efetuado com adição somente de metanol a formação de 8-oxodGuo foi muito maior. Isso deve ter ocorrido devido à formação de radicais metila derivados do metanol, assim, os valores de proteção promovida por BFF devem estar subestimados, pois além dos danos provocados pela radiação deve-se levar em conta a formação de bases oxidadas formadas a partir de outras espécies reativas.

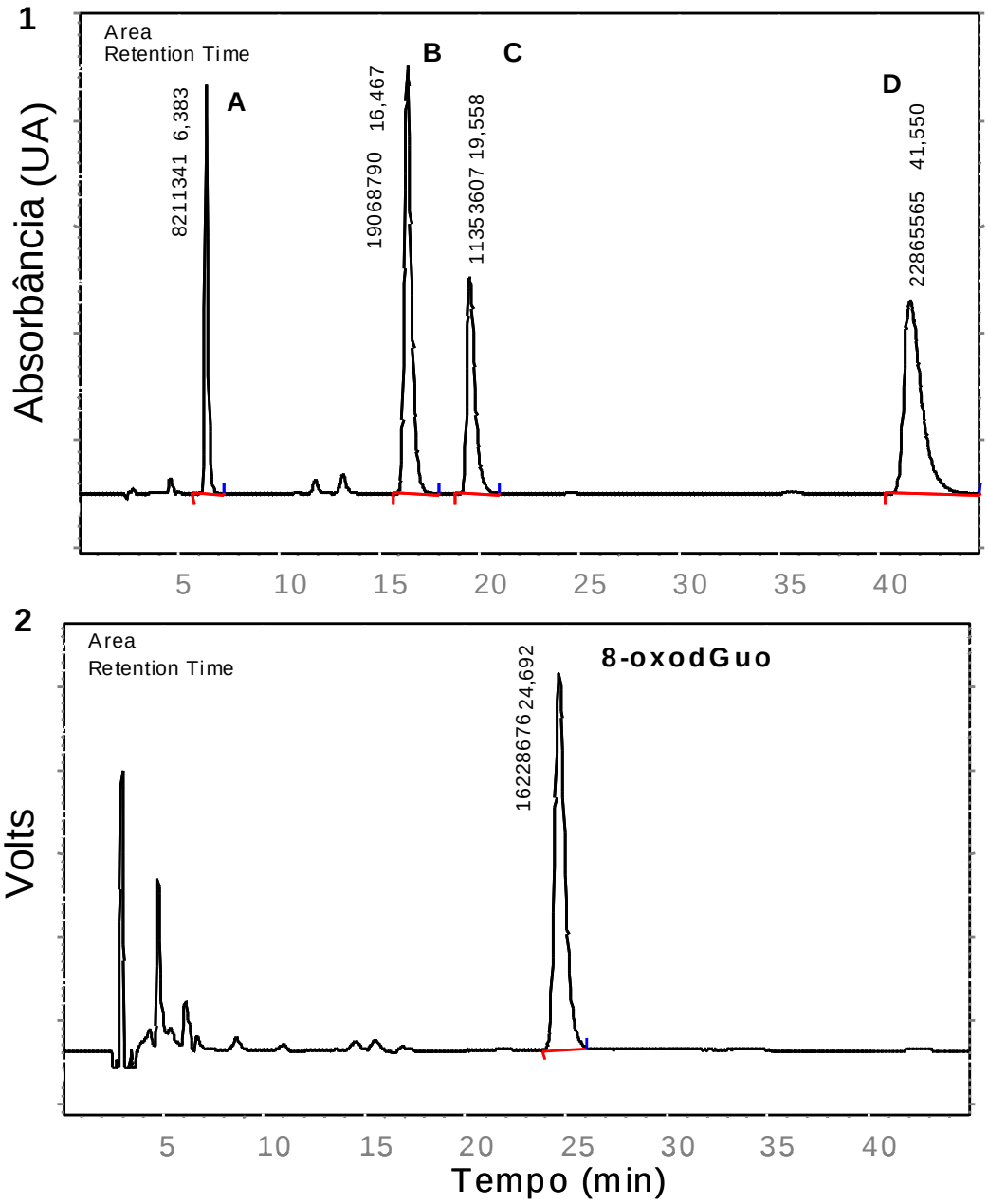


Figura 4.19 Cromatogramas do DNA de timo de bezerro após a irradiação com luz UV (**1**) Identificação das bases do DNA por deteção UV a 260 nm. O pico **A** em 6,4 min corresponde a 2'-desoxicitidina, o **B** em 16,5 min a 2'-desoxiguanosina, o **C** em 19,5 min a timidina, o **D** em 41,5 min a 2'-desoxiadenosina; (**2**) Detecção do 8-oxodGuo em 24,7 min por CLAE/EQ. Condições de análise vide Materiais e Métodos.

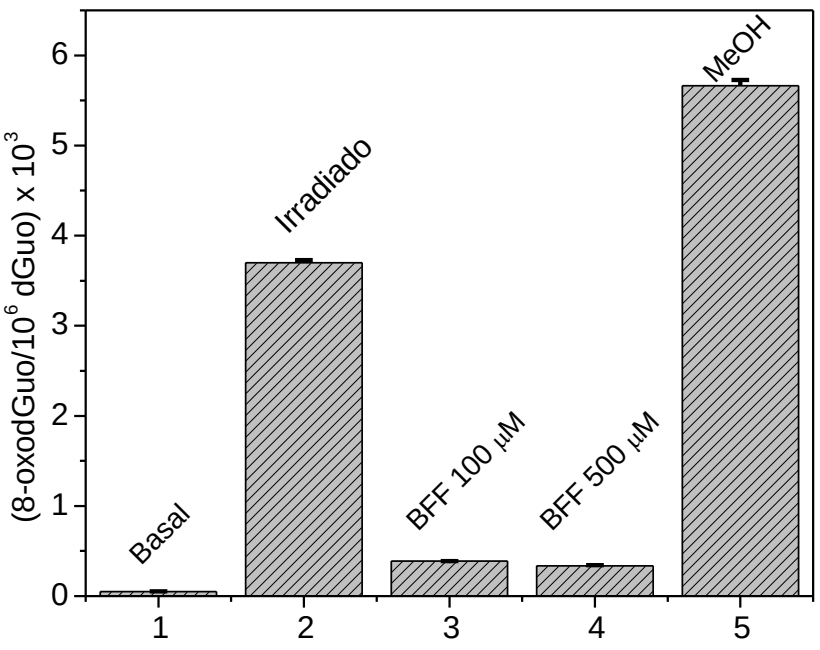


Figura 4.20 Formação de 8-oxodGuo em DNA de timo de bezerro após a irradiação por 2 horas de radiação UV. Deteção de nível basal, com adição de 100 e 500 μM de BFF e controle com metanol.

As lesões em DNA, promovidas por UV, consideradas mais mutagênicas são dímeros ciclobutânicos de pirimidina (CPDs), aduto de pirimidina (6-4) pirimidona (6-4PP) e isômero de valência de Dewar (**Figura 1.2**).

No caso da irradiação com UV-C (254nm) observou-se a formação dos dois dímeros o CPD e o 6-4PP. A **Figura 4.21**mostra a detecção no espectrômetro de massas do CPD e sua fragmentação; a **Figura 4.22** a de 6-4PP o espectro e a fragmentação da citidina são mostrados na **Figura 4.23.**

Observa-se que a fragmentação do CPD ocorre inicialmente com a quebra da ligação N-glicosídica seguida da perda da desoxirribose que gera um fragmento de m/z 447, o qual foi detectado (**Figura 4.21**).

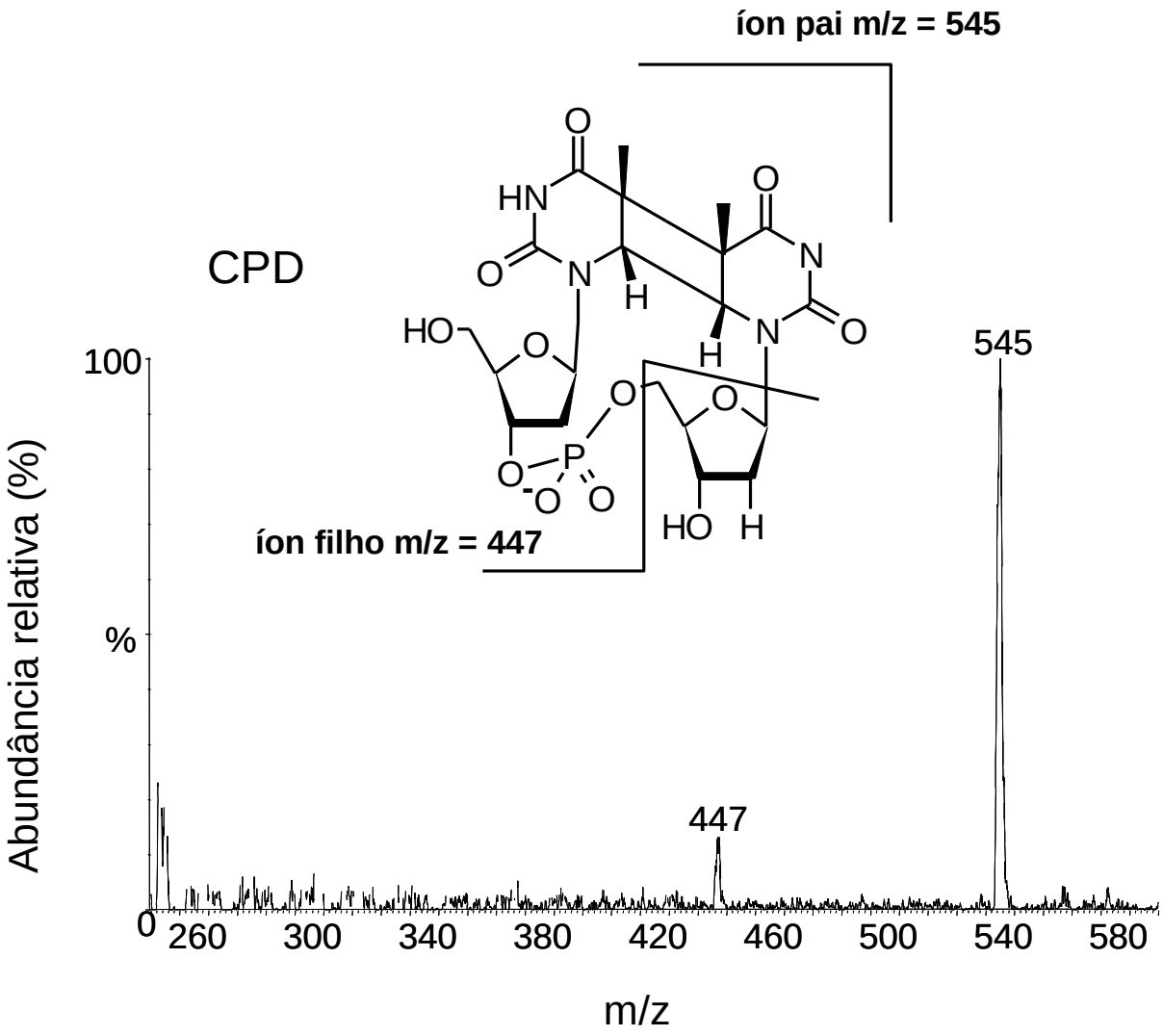


Figura 4.21. Espectro de massas do CPD formado após a exposição do DNA de timo de bezerro à radiação UV-C.

Para a detecção do 6-4PP, inicialmente, ocorre um rearranjo com a adição do grupo 5-OH para o anel pirimidona abrindo-a, e posterior fragmentação com a perda de 113 e deteção de m/z 432 (**Figura 4.22**). Na **Figura 4.22**, observa-se um outro pico em m/z 530, o qual pode ser explicado pela perda de um CH_3. Tal fato pode ter acontecido devido à utilização de uma voltagem de cone alta (60 V), o que favoreceria essa fragmentação.

A identificação da citidina foi feita a partir da deteção do íon molecular em m/z 249 e sua fragmentação em 109, que se caracteriza pela perda da pentose (**Figura 4.23**).

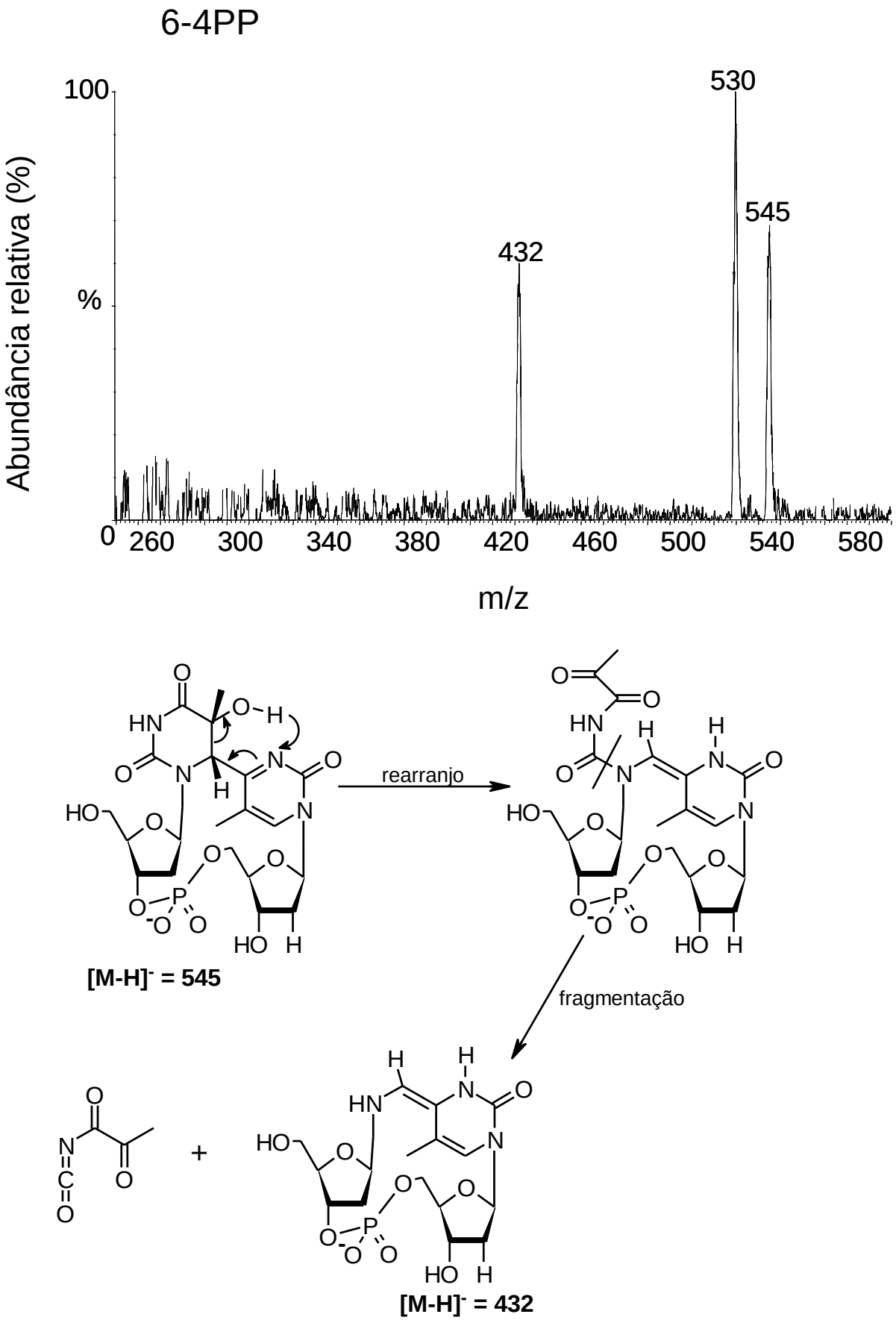


Figura 4.22. Espectro de massas dos dímeros do 6-4PP formado após a exposição do DNA de timo de bezerro à radiação UV-C.

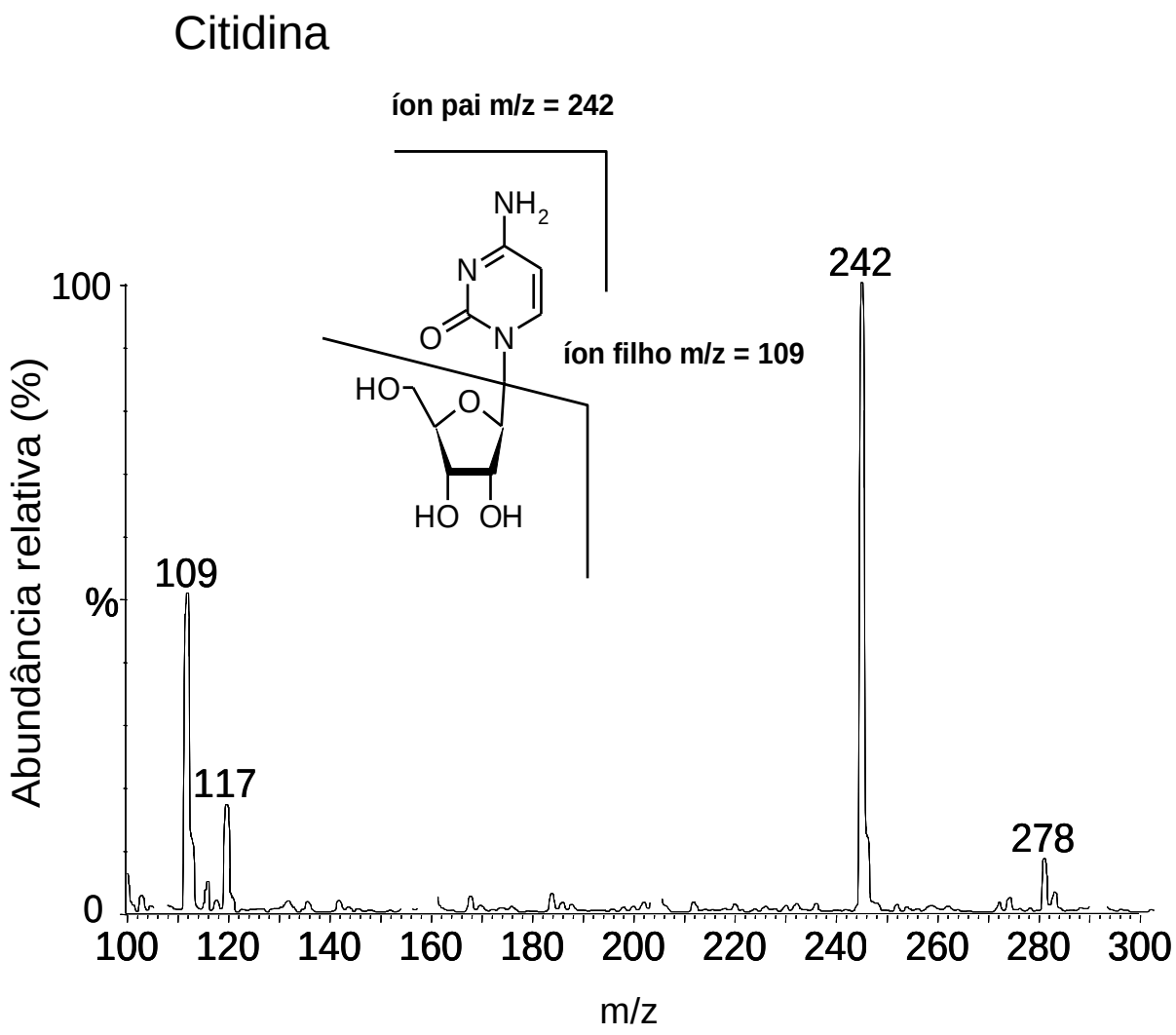


Figura 4.23. Espectro de massas do padrão interno citidina e sua fragmentação característica.

A **Figura 4.24** mostra o cromatograma obtido por detecção no espectrômetro de massas no modo MRM. A **Figura 4.24A** representa a transição 545 → 432 do 6-4PP, **Figura 4.24B** a transição 545 → 447 do CPD e a **Figura 4.24C** a transição 242 → 109 da citidina.

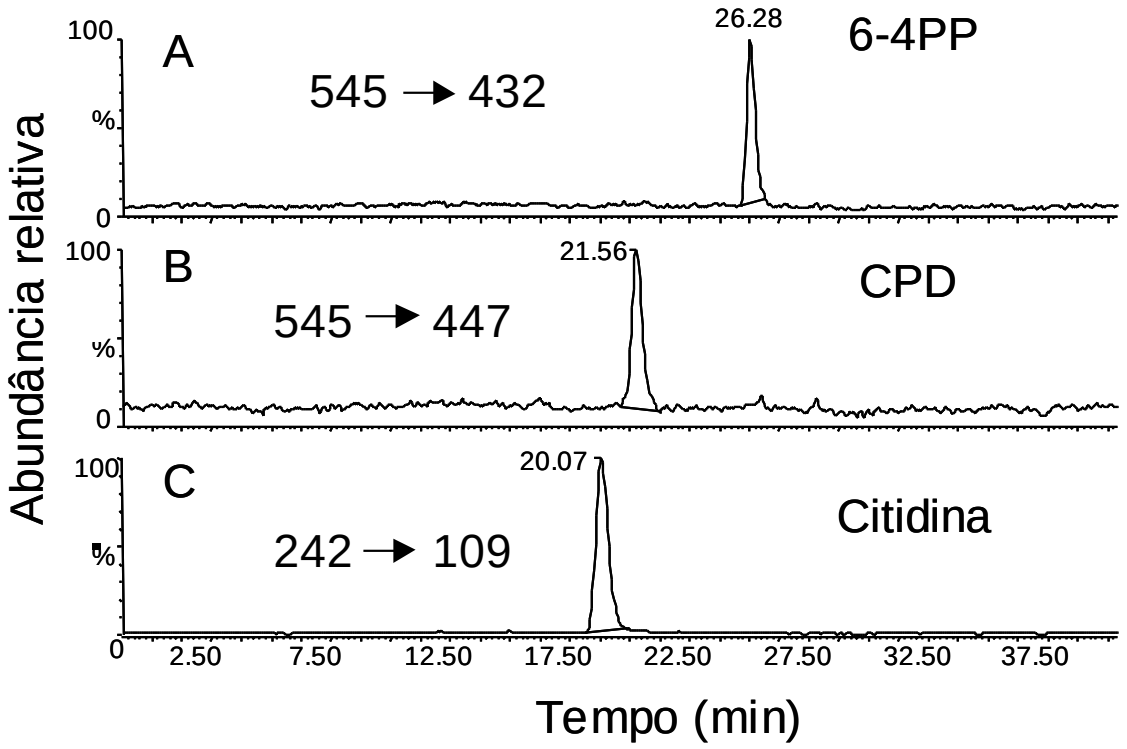


Figura 4.24. Cromatograma obtido através da detecção por massas dos dímeros de pirimidina: **A)** 6-4PP, transição 545 para 432, **B)** CPD, transição 545 para 432 e o padrão interno **C)** citidina, transição 242 para 109.

No DNA irradiado com UV-B, houve somente a formação do CPD, como é mostrado na **Figura 4.25**. Esse fato deve-se provavelmente, ao comprimento de onda da irradiação que não deve favorecer a formação do 6-4PP.

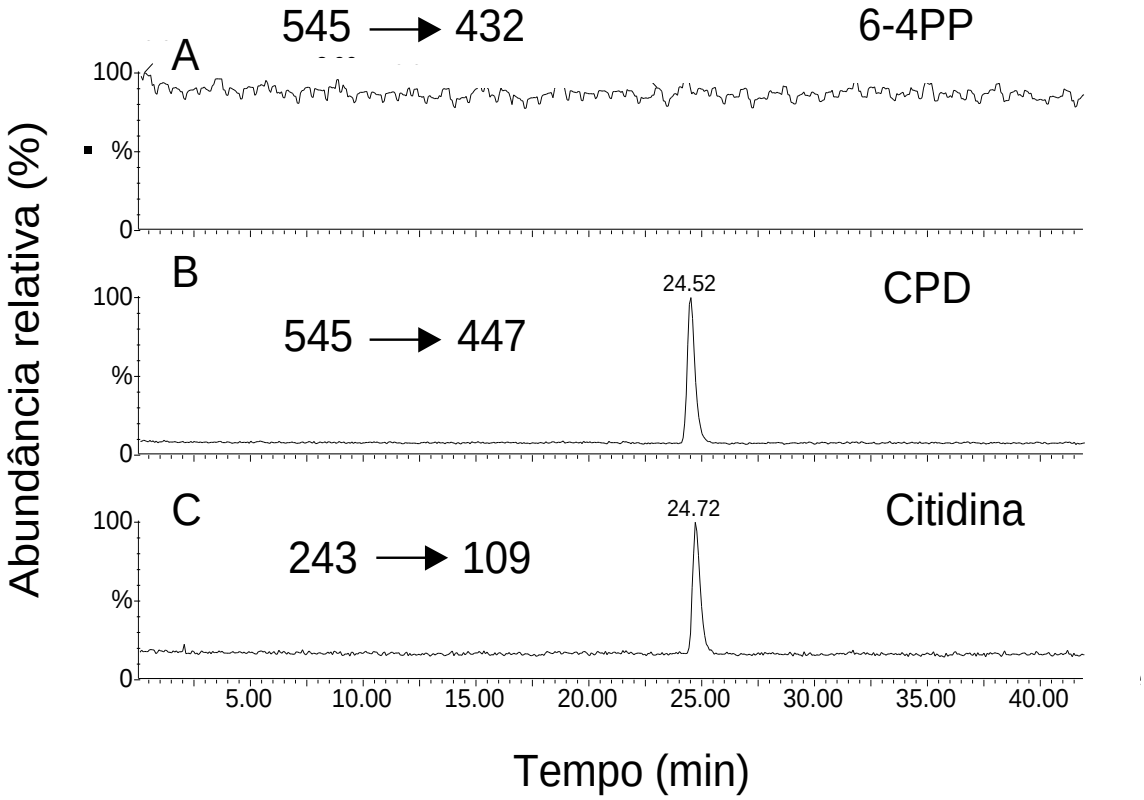


Figura 4.25. Cromatograma obtido através da detecção por massas dos dímeros de pirimidina: **A)** 6-4PP, transição 545 para 432, **B)** CPD, transição 545 para 432 e o padrão interno **C)** citidina, transição 242 para 109.

A análise da proteção promovida por BFF na formação de dímeros de pirimidina foi avaliada quantificando-se a formação de CPD. Utilizaram-se padrões de CPD e um padrão interno, a citidina para a construção da curva padrão (**Figura 4.26**).

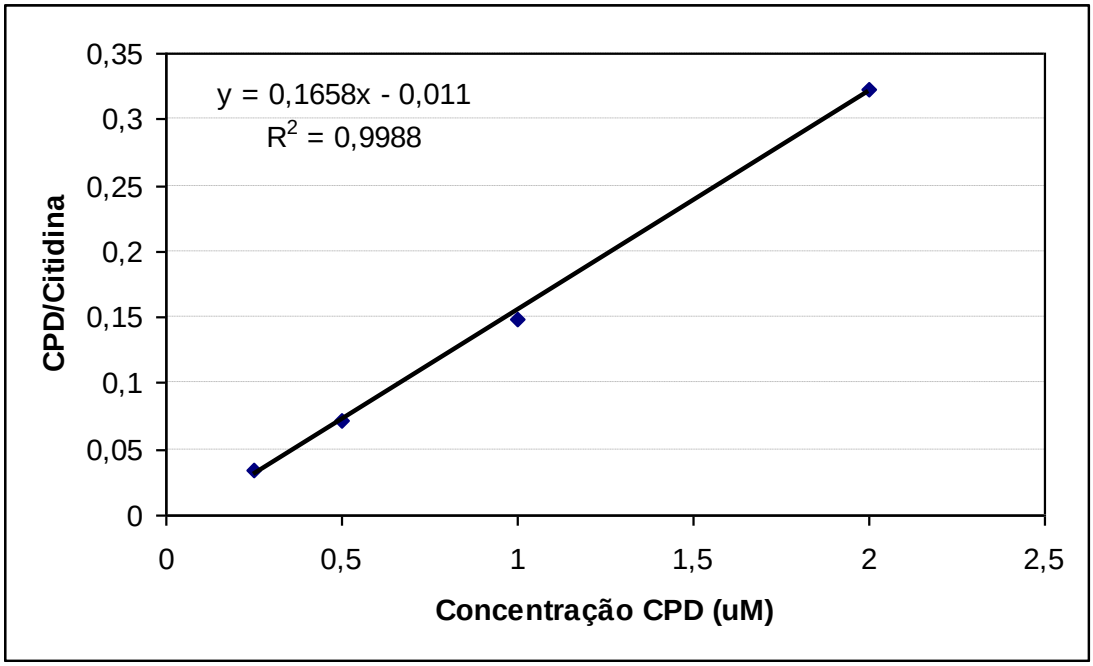


Figura 4.26. Curva de calibração do CPD obtida através dos dados da integração do cromatograma obtido do espectro de massas no modo MRM.

Foi observado que o BFF não protegeu contra a formação de CPD provocado por UV-C. Houve uma grande variância nas quantidades obtidas do CPD e não foi possível chegar a um consenso nos resultados. Essa variação pode ser devida ao método de exposição à radiação do DNA, hidrólise das amostras, presença de algum interferente ou comprimento de onda que não é a máxima de absorção do BFF.

Os comprimentos de onda máximos que o BFF absorve são em 270 e 330 nm, assim foi utilizada uma lâmpada da região do UV-B, mais especificamente a 320 nm para realizar as irradiações. O método de irradiação também foi modificado, o qual foi formado um filme de BFF por cima do DNA.

O *p*-metoxicinamato de etilexila, um fotoprotetor comercial, usualmente conhecido como Parsol MCX ou MOX, foi utilizado para comparar a capacidade de proteção contra formação de dímeros de pirimidina por radiação UVB. Observou-se que o BFF nesse caso protegeu significativamente se comparado ao parsol MCX.

Partindo-se de 0,15 μM de CPD no controle sem protetor, passou a 0,08 μM de CPD com 1 mg de BFF, ou seja, diminuiu em quase metade, muito superior ao Parsol MCX que com a mesma quantidade protegeu somente 20 % (**Figura 4.27**).

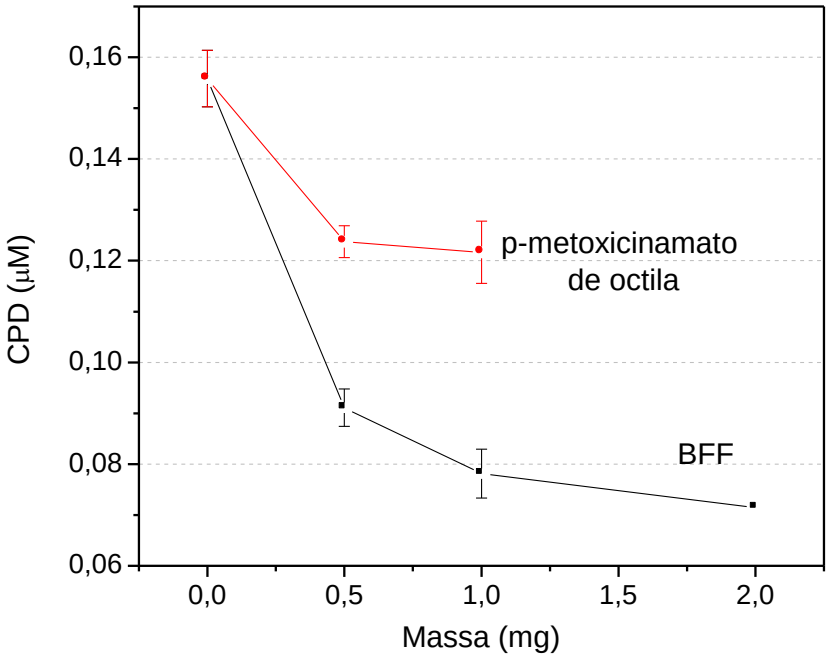


Figura 4.27. Análise da formação de dímero ciclobutânico de pirimidina em DNA de timo de bezerro irradiado por UV-B por 1 hora, e irradiação na presença de BFF e p-metoxicinamato de octila em concentrações crescentes.

A radiação UV é o componente mais genotóxico e danoso do espectro de radiação solar. Isto se deve ao fato de as bases do DNA absorverem diretamente os fótons incidentes da radiação UV-B, principalmente, por pirimidinas. Recentemente, foi demonstrado que as purinas podem também ser alvo da radiação UV-B, mas em menor grau. Os raios UV-A também são citotóxicos e genotóxicos, mas em menor extensão que os raios UV-B. O DNA não é um cromóforo para a região do UV-A exceto na região de 360 nm. Possivelmente, os fótons da região do UV-A são absorvidos por fotossensibilizadores endógenos ainda não identificados que podem provocar danos ao DNA através de reações fotooxidativas (Ravanat e col., 2001). O papel nocivo destas lesões tem sido comprovado pela observação de mutações em células irradiadas (Sage e col., 1996) e pelo aparecimento de tumores de pele (Nakazawa, 1994). Além disso, estudos *in vivo* e *in vitro* envolvendo oligonucleotídios sintéticos contendo dímeros de pirimidina demonstraram alto potencial mutagênico (Jiang e Taylor, 1993).

A utilização de CLAE/EM-EM representou um aumento significativo da sensibilidade na detecção de dímeros de pirimidina, além de permitir a detecção direta de CPDs e 6-4PP numa mesma análise. Apesar de possuírem a mesma massa

molecular, a fragmentação no espectrômetro de massas é específica para cada um e a eluição no CLAE é em tempos diferentes para cada um dos dímeros.

O método envolve a digestão do DNA com exonucleases e fosfatase alcalina que leva a liberação dos fotoprodutos como dinucleosídios monofosfato, e as bases não modificadas são liberadas como nucleosídios (Douki e col., 1997). A mistura reacional é então separada por CLAE e detectada por um espectrômetro de massas no modo MRM, no qual mesmo que as moléculas sejam isômeros, é possível detectar os diferentes padrões de fragmentação, aumentando assim a sua sensibilidade. Além disso, é utilizado o modo negativo, o que significa uma grande vantagem considerando-se que há uma grande diminuição do ruído e formação de “clusters” provindos da fase móvel.

O principal método utilizado era a detecção imunológica que envolve o uso de anticorpos mono e policlonais contra os fotoprodutos (Sage e col., 1996). Mas constatou-se que a falta de calibração do imunoensaio pode prejudicar a realização de medidas quantitativas com precisão (Perdiz e col., 2000). Outra limitação do imunoensaio seria a impossibilidade de detectar os dímeros de pirimidina individualmente (Ravanat e col, 2001). Uma segunda metodologia bioquímica envolve o uso de enzimas de reparo que são capazes de clivar o DNA no sítio onde ocorreu o dano. Em seguida, essa quebra na fita é quantificada (Seawell, e col., 1980). Esse ensaio também possui as mesmas limitações pois, somente a quantidade global dos fotoprodutos é quantificada.

O desenvolvimento do método de análise dos fotoprodutos do DNA por CLAE/MS-MS permitiu a detecção simultânea dos dímeros de pirimidina, 6-4 PP e isômeros de valência de Dewar e a quantificação individual de cada um dos dímeros além do aumento considerável da sensibilidade. Assim, a técnica aqui utilizada apresentou ser altamente vantajosa em relação aos métodos convencionais, possibilitando a detecção e a quantificação de fotoprodutos do DNA de forma rápida, sensível e com alta reprodutibilidade.

4.6) Cultivo de células de mamíferos e incorporação de BFF inseridos em β-ciclodextrina.

4.6.1) Inserção de BFF em β-ciclodextrina

A descoberta das ciclodextrinas iniciou-se com as primeiras observações feitas por Viliers em 1891, o qual isolou uma sustância denominada de celulosina, a partir da digestão de amido de batata com *Bacillus amylobacter*, que estaria contaminada com *Bacillus macerans*. Após 2 décadas em 1911, Schardinger conseguiu o isolamento do *Bacillus macerans* e demonstrou que partindo do amido poderia obter as dextrinas. No final de 1960 os métodos de obtenção de ciclodextrina em escala laboratorial, sua estrutura e propriedades de inclusão e formação de complexos estavam elucidados (Uekama, 2004). Ciclodextrina são oligossacarídios cíclicos de α-D-glicopiranoses que possuem uma cavidade central hidrofóbica e superfície externa hidrofílica. A cavidade hidrofóbica é capaz de trapear uma grande variedade de moléculas com as quais formam compostos de inclusão. Esses complexos possuem a vantagem de aumentar a solubilidade, velocidade de dissolução e a permeabilidade através da membrana (Ficarra, e col. 2002). Além disso, há um aumento da estabilidade contra O_2 e luz (Mielcorek, 1997). Devido à natureza lipofílica dos biflavonóides e conseqüente baixa solubilidade em sistemas aquosos, estudos utilizando modelos fisiológicos eram limitados devido a dificuldade em biodisponibilizar estes compostos em meios aquosos.

A inclusão de BFF em ciclodextrina promoveu o aumento de solubilização do BFF em solução aquosa permitindo a utilização deste para ensaios com culturas celulares. Partindo-se de uma solução de 6,7 mg/mL de BFF, obteve-se uma incorporação em ciclodextrina de 3 %, ou seja, 0,2 mg/mL de BFF.

4.6.2) Incorporação de BFF em células

Partindo-se do βCBFF obtido, suplementou-se o meio celular, sem soro, com 100 μM de BFF, por 5, 18, 24 e 28 horas. Após a extração, a concentração incorporada foi determinada por espectrofotometria (**Figura 4.28**) e sua porcentagem

de incorporação determinada (**Figura 4.29**). A concentração do BFF em células aumentou com o tempo atingindo o máximo em 24 horas.

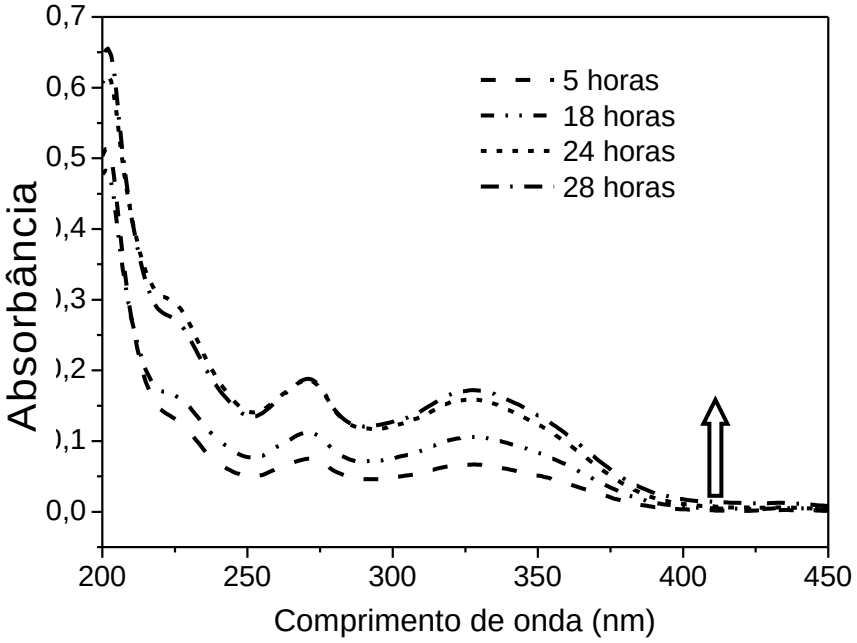


Figura 4.28. Espectro na região do ultravioleta do BFF extraído das células, após a incubação pelo período determinado.

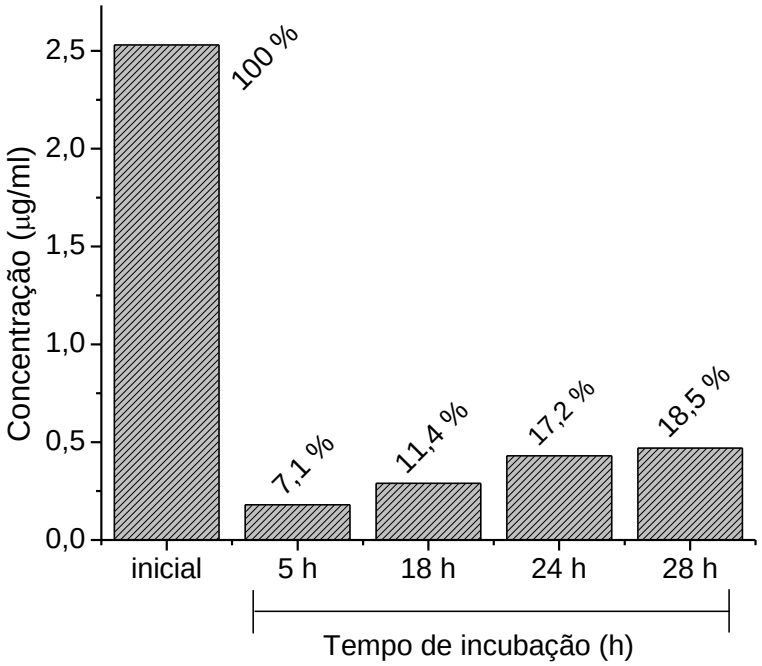


Figura 4.29. Concentração e porcentagem do BFF incorporado nas células após a incubação destas com βCBFF por 5, 18, 24 e 28 horas.

A ciclodextrina em si não possui a capacidade de permear a membrana celular, devido ao seu tamanho e à sua característica hidrofílica externa, assim o BFF é liberado na membrana celular e absorvido devido a característica hidrofóbica deste.

Essa metodologia utilizando complexos de BFF em ciclodextrina permitiu a incorporação do BFF em células, o que era de extrema dificuldade utilizando-se métodos convencionais como solubilização em DMSO, ou agentes emulsificantes como Tween e polipropileno, que em concentrações acima de 2 % eram tóxicas para as células (Stivala e col., 1996).

4.6.3) Avaliação da viabilidade de células, incorporadas com BFF, pelo ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazoil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT)

A ação tóxica de várias substâncias químicas sobre células pode ser mediada por danos causados às biomoléculas, assim a funcionalidade das organelas seria um parâmetro útil para a avaliação da toxicidade de diversos compostos. Sendo assim, no ensaio com MTT a atividade mitocondrial foi avaliada pela capacidade da enzima succinato desidrogenase em reduzir o MTT a formazana em células intactas (Mossman, 1983).

Após 24 horas de incubação o BFF, na concentração de 0,44 μg/mL não apresentou toxicidade às células CV1-P, ao contrário de H_2O_2 que com 500 μM diminuiu a sobrevida das células em mais de 50 % (**Figura 4.30**).

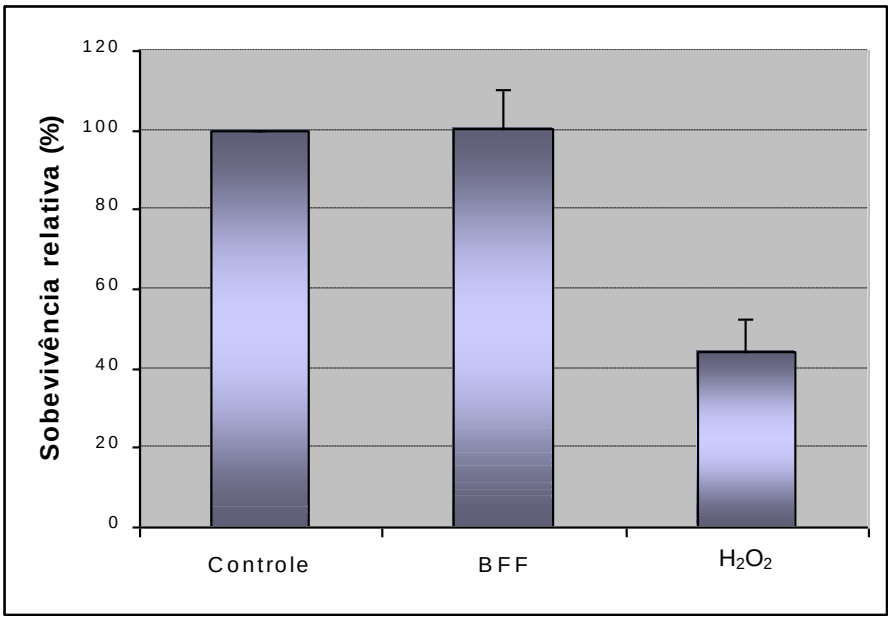


Figura 4.30. Avaliação da citotoxicidade do BFF (4,4 μg/mL) e H_2O_2 500 μM, após 24 horas de exposição, em células de mamíferos CV1-P, comparados com o controle.

Flavonóides não são considerados diretamente citotóxicos para as células, como no caso da quercetina exposta a células Vero que não apresentou citotoxicidade (Jagadeeswaran e col., 2000). Mas por outro lado, flavonóides estão sendo extensivamente estudados em relação à sua toxicidade para células tumorais, o que se deve principalmente à inibição da topoisomerase (Markovits e col., 1989), interrompendo o ciclo celular (Lepley, e col., 1996) e acúmulo da proteína de supressão de tumor p53 (Plaumann, e col. 1996). Entre os estudos que foram realizados visando descrever a citotoxicidade dos biflavonóides, constou-se que a amentoflavona, 4'7"-di-*O*-metilamentoflavona e bilobetina não possuíam toxicidade contra células normais e células tumorais (Lin, e col.; 2000). A ginkgetina, por outro lado inibiu o crescimento de adenocarcinomas ovarianos, mas foi inócua à células HeLa e HepG2, linhagens de células tumorais humanas e para HEK, uma linhagem de células normais humanas Isso indica que existe uma certa seletividade na toxicidade deste biflavonóide (Sun e col., 1997).

5) Conclusões e Perspectivas

Formulações baseadas em extratos de plantas têm sido utilizadas desde os primórdios da história humana. A elucidação dos componentes ativos dos extratos vegetais bem como o mecanismo de sua ação sobre o organismo têm sido os grandes desafios da farmacologia e bioquímica. No mundo atual, o estilo de vida, incluindo a dieta, muitas vezes tem agravado os riscos de contrair doenças. Esses fatos têm contribuído para o aumento do interesse em fitoterápicos, bem como, têm provocado o aumento na procura de alimentos que possam ser coadjuvantes na redução de riscos em contrair doenças (Singh, e col. 2003).

O potencial da diversidade da flora brasileira para o desenvolvimento de novos produtos nos diversos segmentos é imenso. A grande variedade de substâncias fornece produtos que podem ser utilizados como medicamentos, aromas, pigmentos, inseticidas, antioxidantes alimentares, cosméticos e muitos outros. Apesar desta demanda crescente por substâncias novas muito pouco se conhece e vem sendo aproveitado desse arsenal. Com esse cenário atual, o estudo de substâncias derivadas de plantas nacionais tornou-se de extrema importância (Kato, 2001).

A *Araucaria angustifolia* é uma conífera endêmica das regiões sul e sudeste brasileira, considerada atualmente em extinção devido, principalmente, ao extenso extrativismo madeireiro. Os biflavonóides das folhas desta espécie foram extraídos com relativa facilidade sem muitas etapas. A fração rica em biflavonóides foi analisada por CLAE/MS e submetida à per-metilação, possibilitando a separação e a identificação de seis biflavonóides derivados do tipo amentoflavona, com diferentes graus de metilações, sendo que, três deles foram identificados como gingketina, amentoflavona e tetra-*O*-metilamentoflavona.

Os BFF e a amentoflavona apresentaram uma alta constante de supressão do $^1O_2$, comparada àquela determinada para quercetina. A amentoflavona, ginkgetina e BFF foram capazes de inibir a formação de quebras de simples fita em DNA plasmidial, com destaque para o BFF, que foi o que apresentou a melhor proteção.

Por outro lado, o BFF e os biflavonóides não foram muito eficazes na proteção do DNA plasmidial contra formação de quebras de DNA plasmidial provocados pela reação de Fenton comparado com quercetina e rutina, que são conhecidos antioxidantes, fato que se deve principalmente à presença do grupo catecol ausente nos biflavonóides. Resultados semelhantes foram obtidos no ensaio de proteção contra peroxidação de lipossomos induzidas por radiação UV. Considerando-se que existem evidências consideráveis de que espécies reativas de oxigênio estão relacionadas com a degradação de fosfolipídios intermediadas por radiação UV, o efeito protetor observado por quercetina e rutina, provavelmente, deve-se à capacidade bem conhecida desses em sequestrar radicais hidroxilas e peroxila e ânions radical superóxido.

Os biflavonóides analisados indicaram que foram capazes de quelar metais de transição (Fe^{3+}, Al^{3+} e Cu^{2+}) através de análises feitas por espectrometria de massas. Estes dados não indicam que esses complexos são capazes de inibir as reações de formações de ROS mediadas por íons metálicos, pois, não foi possível determinar se o complexo mantinha a capacidade redox.

Em relação à capacidade fotoprotetora avaliada pela inibição da formação de dímeros de pirimidina, o BFF apresentou a maior proteção comparada com o *p*-metoxicinamato de octila.

A inclusão do BFF em ciclodextrina foi realizada com sucesso e permitiu a incorporação do BFF em células. Este feito possibilitou a observação de que o BFF não é citotóxico às células CVP-1.

Assim, foi possível concluir que os biflavonóides de *Araucaria angustifolia* foram capazes de inibir danos às biomoléculas estudadas, além de possuírem uma constante de supressão alta contra o $^1O_2$, e serem capazes de quelar metais. São fotoprotetores e não são citotóxicos sob as condições ensaiadas.

A partir desses dados foi elaborado uma patente intitulada “Processos de obtenção de fração de biflavonóides de folhas de *Araucaria angustifolia*, atividades fotoprotetora e antioxidante e seu uso em nutracêuticos que foi protocolada sob o número 006218 no Instituto Nacional de Pesquisas Industriais (INPI)”.

O desmatamento da mata de araucárias levou ao aniquilamento de valiosas reservas de araucária, imbuia, cedro, ipê-amarelo, canjerana, canelas e diversas outras espécies, além de diminuir drasticamente o bioma existente na região. Alterou as condições climáticas, provocou erosões e empobrecimento do solo.

Pesquisas mostram que as principais ameaças aos remanescentes florestais são as mesmas: extração da madeira, queimadas, plantio de espécies exóticas, pressão urbana e ocupação de terras desordenadas.

Diante deste cenário é impossível apelar somente à preservação ambiental. É necessário criar uma cadeia produtiva, envolvendo benefícios a todas as camadas da sociedade. Assim, a possibilidade de tornar a *Araucaria angustifolia* uma fonte de matéria-prima renovável e de alto valor agregado para utilização em produtos como cosméticos, nutracêuticos e fitoterápicos, e assim promover o reflorestamento e crescimento de comunidades seria uma grande oportunidade de desenvolvimento aliado à idéia de conservação e de extrema urgência.

"A floresta leva em si um sabor milenar.
Não são quaisquer vinte ou trinta anos que a fazem.
Justamente o caráter milenar é um dos mais típicos
traços da floresta: não pertence a nenhuma geração,
mas pretende servir a muitas"

Ralph João George Hertel
Botânico

Amellal, M.; Bronner, C.; Briançon-Scheid, F.; Haag, M.; Anton, R.; Landry, Y. (1985) Inhibition of mast-cell histamine-release by flavonoids and biflavonoids. *Plant. Med.* 51, 16-20.

Ames, B. N. (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens – oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* 221, 1256-1264.

Anón, M. T.; Ubeda, A.; Alcaraz, M. J. N (1992) Protective effects of phenolic compounds on CCl_4 induced toxicity in isolated rat hepatocytes. *Z. Naturforsch.* 47, 275-279.

Arora, A.; Byrem, T. M.; Nair, M. G.; Strasburg, G. M. (2000) Modulation on liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 374, 102-109.

Aubry, J. M.; Cazin, B. (1988) Chemical sources of singlet oxygen. Quantitative generation of singlet oxygen from hydrogen peroxide disproportionation catalyzed by molibdate ions. *Inorg. Chem.* 27, 2013-2014.

Augusto, O.; Hix, S.; Morais, M. S.; Vasquez-Vivar, J. (1995) Free radical reactions: formation of adducts with biomolecules and their biological significance. *Ciência e Cultura* 47, 280-287.

Aust, S. D.; Roerig, D. L.; Pederson, T. C. (1972) Evidence for superoxide generation by NADPH-cytochrome c reductase of rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47, 1133-1137.

Baker, M. S.; Gebick, J. M. (1986) The effect of pH on yields of hydroxyl radicals produced from superoxide by potential biological ion chelators. *Arch. Biochem. Biophys.* 246, 581-588.

Banerjee, T.; Valacchi, G.; Ziboh, V. A.; van der Vliet, A. (2002) Inhibition of TNF alpha-induced cyclooxygenase-2 expression by amentoflavone through suppression of NF-kappa B activation in A549 cells. *Molec. Cell. Biochem.* 238, 105-110.

Beckman, J. S.; Koppenol, W. H. (1996) $NO^{\bullet}$, $O_2^{\bullet -}$ and $ONOO^-$: the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol.* 271, C1424-C1437.

Bird, A. E.; Marshall, A. C. (1969) Structure of chloroflavonin. *J. Chem. Soc.* 2418-2420.

Beretz, A.; Briançon-Sheid, F.; Stierle, A.; Corre, G.; Anton, R.; Cazenave, J. P. (1986) Inhibition of human-platelet cyclic-AMP phosphodiesterase and of

platelet-aggregation by a hemisynthetic flavonoid, amentoflavone hexaacetate. *Biochem. Pharmacol.* 35, 257-262.

Black, H. S. Potential involvement of free radical reactions in ultraviolet light mediated cutaneous damage. (1987) *Photochem. Photobiol*. 46, 213-221.

Block, G.; Patterson, B.; Subar, A. (1992) Fruit, vegetables and cancer prevention – a review of the epidemiologic evidence. *Nutr. Cancer Int. J.* 18, 1-29.

Bohm, B. A. (1975) Chalcones, aurones and dihydrochalcones. In: The Flavonoids, Harborne, J. B., Mabry, T. J.; Mabry, H. (Eds.). Chapman and Hall Press, London, pp. 442-504.

Boiteux, S.; Gajewski, E.; Laval, J.; Dizdaroglu, M. (1992) Substrate specificity of the *Escherichia coli* Fpg protein (formamidopyrimidine-DNA glycosylase): excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. *Biochemistry* 31, 106-110.

Bokkenheuser, V. D.; Shackleton, C. H. L.; Winter, J. (1987) Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal *Bacteroids* from humans. *Biochem. J.* 130, 1161-1162.

Brambilla, G.; Sciaba, L.; Faggin, P.; Maura, A.; Marinari, U. M.; Ferro, M.; Esterbauer, H. (1986) Citotoxicity, DNA fragmentation and sister-chromatid exchange in chinese hamster ovary cells exposed to the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal and homologous aldehydes. *Mut. Res.* 171, 169-176.

Briançon-Scheid, F.; Guth, A.; Anton, R. (1982) High performance liquid-chromatography of biflavones from *Ginkgo biloba* L. *J. Chrom.* 245, 261-267.

Bucar, F.; Jackak, S. M.; Noreen, Y.; Karting, T.; Perera, P.; Bohlin, L.; Shubert-Zsilavecz, M. (1998) Amentoflavone from Biophytum sensitivum and its effect on cox-1/cox-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis. *Planta Medica* 64, 373-374.

Burrows, C. J.; Muller, J. G. (1998) Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission. *Chem. Rev.* 98, 1109- 1151.

Burton, G. W.; Ingold, K. U. (1984) Beta-carotene – an unusual type of lipid antioxidant. *Science* 224, 569-573.

Burton, G. W.; Wronska, U.; Stone, L.; Foster, D. O.; Ingold, K. U. (1990) Biokinetics of dietary RRR-alpha-tocopherol in the male guinea-pig at 3 dietary levels of vitamin-C and 2 levels of vitamin-E – evidence that vitamin C does not spare vitamin-E *in vivo*. *Lipids* 4, 199-210.

Cadet, J.; Berger, M.; Douki, T.; Morin, B.; Raoul. S.; Ravanat, J-L.; Spinelli, S. (1997) Effects of UV and visible radiation on DNA-final base damage. *Biol. Chem*. 378, 1275-1286.

Caldwell, M. M. (1979) Plant life and ultraviolet radiation: some perspective in the history of the earth's UV climate. *BioScience* 29, 520-525.

Capdevila, J.; Parkhill, L.; Chacos, N.; Okita, R.; Masters, B. S. S.; Estabrook, R. W. (1981) The oxidative metabolism of arachidonic acid by purified cytochromes P450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101, 1357-1363.

Carty, M. P.; Lawrence, C. W.; Dixon, K. (1996) Complete replication of plasmid DNA containing a single UV-induced lesion in human cell extracts. *J. Biol. Chem*. 271, 9637-9647.

Cen, Y. P.; Bornman, J. F. (1990) The response of bean plants to UV-B radiation under different irradiances of background visible light. *J. Exp. Bot.* 232, 1489-1495.

Cerutti, P. A. (1985) Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 227, 375-381.

Chance, B.; Sies, H.; Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59, 527-605.

Cheon, B. S.; Kim, Y. H.; Son, K. S.; Chang, H. W.; Kang, S. S.; Kim, H. P. (2000) Effects of prenylated flavonoids and biflavonoids on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production from the mouse macrophage cell lin RAW 264.7. *Planta Medica* 66, 596-600.

Chignell, C. F. (1979) Spin labeling in pharmacology. In: Spin Labeling, Berliner, L. J. (Ed.) v2, Academic press, New York, pp 223.

Chiu, A.; Kimball, A. B. (2003) Topical vitamins, minerals and botanical ingredients as modulators of environmental and chronological skin damage. *British J. Dermatol.* 149, 681-691.

Cholbi, M. R.; Paya, M.; Alcaraz, M. J. (1991) Inhibitory effects of phenolic-compounds on CCl_4-induced microsomal lipid-peroxidation. *Experientia* 47, 195-199.

Costa de Oliveira, R. L.; Ribeiro, D. T.; Nigro, R. G.; Di Mascio, P.; Menck, C. F. M. (1992) Singlet oxygen induced mutation spectrum in mammalian cells, *Nucleic Acids Res.* 20, 4319-4323.

Cotelle, N.; Bernier, J. L.; Catteau, J. P.; Pommery, J.; Wallet, J. C.; Gaydou, E. M. (1996) Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 35-43.

Deng, W.; Fang, X.; Wu, J. (1997) Flavonoids function as antioxidants: by scavenging reactive oxygen species or by chelating iron? *Radiat. Phys. Chem*. 50, 271-276.

Devasagayam, T. P. A.; Subramaniam, M.; Singh, B. B.; Ramanathan, R.; Das, N. P. (1995) Protection of plasmid pBR322 DNA by flavonoids against single-strand breaks induced by singlet molecular oxygen. *J. Photochem. Photobiol*. B 30, 97-103.

Di Carlo, G.; Mascolo, N.; Izzo, A. A.; Capasso, F. (1999) Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Science* 65, 337-353.

Di Mascio, P.; Sundquist, A.; Devasagayam, T. A.; Sies, H. (1992) Assay of lycopene and other carotenoids as singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys*. 274, 532-538.

Di Mascio, P.; Sies, H. (1989) Quantification of singlet oxygen generated by thermolysis of 3,3'-(1,4-Naphthylidene)dipropionate. Monomol and dimol photoemission and the effects of 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 2909

Di Mascio, P.; Wefers, H.; Do-Thi, H-P.; Lafleur, M. V. M.; Sies, H. (1989A) Singlet molecular oxygen causes loss of biological activity in plasmid and bacteriophage DNA and induces single-strand breaks. *Biochim. Biophys. Acta* 1007, 151-157.

Di Mascio, P.; Kaiser, S.; Sies, H. (1989B) Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys.* 274, 532-538.

Dierenfeld, E. S. (1989) Vitamin E deficiency in zoo reptiles, birds and ungulates. *J. Zoo Wildlife Med.* 20, 3-11.

Douki, T.; Court, M.; Cadet, J. (2000A) Electrospray-mass spectrometry characterization and measurement of far-UV-induced thymine photoproducts. *J. Photochem Photobiol.* B. 54, 145-154.

Douki, T.; Court, M.; Sauvaigo, S.; Odin, F.; Cadet, J. (2000B) Formation of the main UV-induced thymine dimeric lesions within isolated and celular DNA as measured by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J.Biol.Chem*. 275, 11678-11685.

Douki, T.; Zalizniak, T.; Cadet, J. (1997) Far UV-induced dimeric photoproducts in short oligonucleotides: sequence effects. *Photochem. Photobiol.* 66, 171-179.

Duarte Silva, I.; Gaspar, J.; Gomes da Costa, G.; Rodrigues, A. S.; Laires, A.; Rueff, J. (2000) Chemical features of flavonols affecting their genotoxicity. Potential implication in their use as therapeutical agents. *Chem. Biolog. Interact*. 124, 29-51.

El-Sukkary, M. M. A.; Speier, G. (1981) Oxygenation of 3-hydroxyflavones by superoxide anion. *J. Chem. Soc. Chem. Commun*. 745-745.

Fernandez, M. T.; Mira, M. L.; Florêncio, M. H.; Jennings, K. R. (2002) Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study. *J. Inorg. Biochem.* 92, 105-111.

Ficarra, R.; Tommasini, S.; Raneri, D.; Calabrò, M. L.; Di Bella, M. R.; Rustichelli, C.; Gamberini, M. C.; Ficarra, P. (2002) Study of flavonoids/beta-cyclodextrins inclusion complexes by NMR, FT-IR, DSC, X-ray investigation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29, 1005-1014.

Filipe, P.; Lança, V.; Silva, J. N.; Moliere, P; Santus, R.; Fernandes, A. (2001) Flavonoids and urate antioxidant interplay in plasma oxidative stress. *Mol. Cell. Biochem.* 221, 79-87.

Floyd. R. A.; West, M. S.; Eneff, K. l.; Hogsett, W. E.;Tingey, D. T. (1988) Hydroxyl free radical mediated formation of 8-hydroxiguanine in isolated DNA. *Arch. Biochem. Biophy.* 262, 266-272.

Fonseca, F. N., Ferreira, A. J. S.; Sartorelli, P.; Lopes, N.P.; Floh, E. I. S., Handro, W.; Kato, M. J. (2000) Phenylpropanoids derivatives and biflavones at different stages of differentiation and development of *Araucaria angustifolia*. *Phytochemistry* 55, 575-580.

Foote, C. S. (1991) Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem. Photobiol.* 54, 659-659.

Foote, C. S. (1979) Quenching of singlet oxygen. In: Singlet Oxygen, Wasserman, H. H.; Murray, R. W. (Eds.). Academic Press, New York, pp 139-171.

Foote, C. S.; Chang, Y. C.; Denny, R. W. (1970) Chemistry of singlet oxygen. 10. Carotenoid quenching parallels biological protection. *J. Am. Chem. Soc.* 92, 5218-5218.

Foote, C. S.; Denny, R. W. (1968) Chemistry of singlet oxygen 7. Quenching by beta-carotene *J. Am. Chem. Soc*. 90, 6233-6235.

Frankel, E. N.; Kanner, J.; German, J. B.; Parks, E.; Kinsela, J. E. (1993) Inhibition of oxidation of human low-density-lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 341, 454-457.

Freeman, B. A.; Crapo, J. D. (1982) Biology of disease – free radical and tissue injury. *Lab. Invest.* 17, 412-426.

Fucks, J; Packan, L. (1991) Photooxidative stress in the skin. In: Oxidative Stress: Oxidants and antioxidants. Sies, H. (Ed.). Academic Press, London, pp 559-583.

Fuchs, J. (1998) Potential and limitations of the natural antioxidants RRR-alpha-tocopherol, L-ascorbic acid and b-carotene in cutaneous photoprotection. *Free Radic. Biol. Med.* 25, 848-873.

Furukawa, S.; (1929) *Abs. Bull Inst. Phys. Chem. Res.* 2, 5.

Ghosh, M. K.; Chattopadhyay, D. J.; Chatterjee, I. B. (1996) Vitamin C prevents oxidative damage. *Free Rad. Res.* 25, 173-179.

Gonçalez, E.; Felicio, J. D.; Pinto, M. M. (2001) Biflavonoids inhibit the production of aflatoxin by *Aspergillus flavus Brazilian J. Med. Biol. Res.* 34, 1453-1456.

Grahan, A.; Hogg, N.; Kalyanaraman, B.; Oleary, V.; Darleyusmar, V.; Moncada, S (1993) Peroxynitrite modification of LDL leads to recognition by the macrophage scavenger receptor. *FEBS Lett.* 330, 181-185.

Grynberg, N. F.; Carvalho, M. G.; Velandia, J. R.; Oliveira, M. C.; Moreira, I. C.; Braz-Filho, R.; Echevarria, A. (2002) DNA topoisomerase inhibitors: biflavonoids from O*uratea* species. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 35, 819-822.

Haber, F.; Weiss, J. (1932) Uber die katalyse des hydroperoxyds. *Naturwiss.* 51, 948-950.

Halliwell B.; Gutteridge J. M. C., (1999) Free Rad. Biol. Med., 3th ed., Oxford Press, Oxford.

Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. (1992) Biologically relevant metal ion-dependent $^{\bullet}$OH generation. An update. *FEBS Lett*. 307, 108-112.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ion in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186B,1-83.

Halliwell, B. (1987) Oxidants and human disease – some new concept. *FASEB J.*1, 358-364.

Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of E. coli with plasmids. *J. Mol. Biol*. 166, 557-580.

Hanasaki, Y.; Ogawa, S.; Fukui, S. (1994) The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* 16, 845-850.

Hansen, M. B.; Nielsen, S. E.; Berg, K. (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* 119, 203-210.

Harborne, J. B. (1988) The flavonoids: Advances in research since 1980. Chapman and Hall Press, London.

Harborne, J. B. (1967), Comparative Biochemistry of the Flavonoids, Academic Press, London.

Harborne, J. B. (1980) Plant phenolics. In: Encyclopedia of Plant Physiology, vol 8, Secondary Plant Products. Bell E. A. and Charlwood B. V. (Eds). Springer Press, Berlin, pp 329-402.

Hertog, M. G. L.; Feskens, E. J. M.; Hollman, P. C. H.; Katan, M. B.; Kromhout, D. (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet* 342, 1007-1011.

Hidalgo, F. J.; Zamorra, R. (2000) Modification of bovine serum albumin structure following reaction with 4,5(*E*)-epoxy-2(*E*)-heptenal. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 501-508.

Hollman, P. C. H.; de Vries, J. H. M.; van Leeuwen, S. D.; Mengelers, M. J. B.; Katan, M. B. (1995) Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in health ileostomy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 1276-1282.

Hollósy, F. (2002) Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron* 33, 179-197.

Husain, S. R.; Cillard, J.; Cillard, P. (1987) Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry* 28, 2489-2491.

Ilyas, M.; Ilyas, N., (1994) Biflavones from the leaves of *Araucaria angustifolia* and a survey on biflavonoids of *Araucaria* Genus. *Ghana J. Chem.* 1, 441-444.

Ilyas, N.; Ilyas, M. Rahman, W.; Okigawa, M.; Kawano, N. (1978) Biflavones from the leaves of *Araucaria excelsa*. *Phytochemistry* 17, 987-990.

Iwashina, T. (2000) The structure and distribution of the flavonoids in plants. *J. Plant Res.* 113, 287-299.

Iwu, M. M. (1985) Antihepatoxic constituents of Garcinia-Kola seeds. *Experientia* 4, 699-700.

Jagadeeswaran, R.; Thirunavukkarasu, C.; Gunasekaran, P.; Ramamurty, N.; Sakthisekaran, D. (2000) In vitro studies on the selective cytotoxic effect of crocetin and quercetin. *Fitoterapia* 71, 395-399.

Jamieson, D. (1989) Oxygen toxicity and reactive oxygen metabolites in mammals. *Free Radic. Biol. Med.* 7, 87-108.

Jiang, N.; Taylor, J-S. (1993) In vivo evidence that UV-induced C-T mutations at dipyrimidine sites could result from the replicative bypass of *cys-syn* cyclobutane dimers or their deamination products. *Biochemistry* 32, 472-481.

Karabourniotis, G.; Kyparissis, A.; Manetas, Y. (1993) Leaf hair of *Olea europaea* protect underlying tissue against ultraviolet–B radiation damage. *Environ. Entomol.* 25, 135-142.

Karas, C. (1993) Pinheiro do Paraná: haverá sobrevida? *Ciência Hoje* São Paulo, v. 16.

Kato, M. J. (2001) Global phytochemistry: the Brasilian approach. *Phytochemistry* 57, 621-623.

Khan, A. U.; Di Mascio, P.; Medeiros, M. H. G.; Wilson, T. (1992) Spermine and spermidine protection of plasmid DNA against single-strand breaks induced by singlet oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89,11428-11430.

Kim, H. K.; Son, K. H.; Chang, H. W.; Kang, S. S.; Kim, H. P. (1999) Inhibition of rat adjuvant-induced arthritis by ginkgetin, a biflavone from *Ginkgo biloba* leaves. Planta Medica 65, 465-467.

Kim, H. P.; Mani, I.; Iversen, L.; Ziboh, V. A. (1998) Effects of naturally-occurring flavonoids and biflavonoids on epidermal cyclooxygenase and lipoxygenase from guinea-pigs. *Prostaglan. Leucotr. Essent. Fatty Acids* 58, 17-24.

Kim, J.; Hwang, J. S.; Cho, Y. K.; Han, Y.; Jeon, Y. J.; Yang, K. H. (2001) Protective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on UVA and UVB-induced skin damage. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 14, 11-19.

Koch, Z.; Corrêa, M. C. (2002) Araucaria. A floresta do Brasil Meridional. Olhar Brasileiro Press, Curitiba.

Kostyuk, V. A.; Potapovich, A. I.; Vladykoovskaya, E. N.; Korkina, L. G.; Afanasev, I. B. A. (2001) Influence of metal ions on flavonoid protection against asbestos-induced cell injury. *Arch. Biochem. Biophys.* 385, 129-137.

Kowaltowski, A. J.; Vercesi, A. E. (1999) Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 463-471.

Kramer, G. F.; Norman, H. A.; Krizek, D. T.; Mirecki, R. M. (1991) Influence of UV-B radiation on polyamines, lipid peroxidation and membrane lipids in cucumber. *Phytochemistry* 30, 2101-2108.

Krauze-Baranowska, M.; Cisowski, W.; Wiwart, M.; Madziar, B. (1999) Antifungal biflavones from Cupressocyparis leylandii. *Planta Medica* 65, 572-573.

Kreutzer, D. A.; Essigmann, J. M. (1998) Oxidized, deaminated cytosines are sources of C-T transitions *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 95, 3578-3582.

Krinsky, N. I. (1991) Effects of carotenoids in cellular and animal systems. *Am. J. Clin. Nutr.* 53, 2385-2465.

Kuwak, W. J.; Han, C. K.; Son, K. H.; Chang, H. W.; Kang, K. K.; Park, B. K.; Kim, H. P. (2002) Effects of ginkgetin from *Ginkgo biloba* leaves on cyclooxygenases and in vivo skin inflammation. *Planta Medica* 68, 316-321.

Lai, C.; Piette, L. H. (1979) Further evidence for OH radical production in Fenton reagent. *Tetrahedron Lett*. 9, 775-778.

LamerZarawska, E. (1980) Phytochemical studies on flavonoids and other compounds of Juniper fruits (*Juniperus-cummunis* L) *Pol. J. Chem.* 4, 213-219.

Lawrence, C. W.; Gibbs, P. E. M.; Borden, A.; Horsfall, M. J.; Kilbey, B. J. (1993) Mutagenesis induced by single UV photoproducts in E. coli and yeast. *Mut. Res.* 299, 157-163.

Lee, H. S.; Oh, W. K.; Kim, B. Y.; Ahn, S. C.; Kang, D. O.; Shin, D. I.; Kim, J.; Mheen, T.-I.; Ahn, J. S. (1996) Inhibition of phospholipase Cg1 activity by amentoflavone isolated from *Selaginella tamariscina*. *Planta Medica* 62, 293-296.

Lepley, D. M.; Li, B.; Birt, D. F.; Pelling, J. C. (1996) The chemopreventive flavonoid apigenin induces G2/M arrest in keratinocytes. *Carcinogenesis* 17, 2367-2375.

Lerond, L. (1994) Action of Daflon 500 mg on the principal inflammatory mediators. *Phlebology* 9 suppl 1, 34-39.

Li, J.; Ou-Lee, T. M.; Raba, R.; Amundson, R. G.; Last, R. L. (1993) *Arabidopsis* flavonoid mutant are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell* 5, 171-179.

Lin, L-C.; Kuo, Y-C.; Chou, C-J. (2000) Cytotoxic biflavonoids from *Selaginella delicatula. J. Nat. Prod.*63, 627-630.

Lin, Y-M.; Anderson, H.; Flavin, M. T.; Pai, Y-H. S. (1997) In vitro anti-HIV activity of biflavonoids isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*. *J. Nat. Prod.* 60, 884-888.

Lobstein-Guth, A.; Briançon-Scheid, F.; Victoire, C.; Haag-Berrurier, M.; Anton, R. (1988) Isolation of amentoflavone from *Ginkgo biloba*. *Planta Medica* 6, 555-556.

Loft, S.; Poulsen, H. (1996) Cancer risk and oxidative DNA damage in men. *J. Mol. Med.* 74, 297-312.

Loureiro, A. P. M.; Marques, S. A.; Garcia, C. C.M.; Mascio, P. D.; Medeiros, M. H. G. (2002) Development of an on line liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay to quantitatively determine 1,*N*2-etheno-2'-deoxyguanosine in DNA. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 1302-1308.

Lowry, B.; Lee, D.; Hebaut, C. (1980) The origin of land plants: a new look at an old problem. *Taxon* 29, 183-197.

Madronich, S. (1992) Implications of recent total atmospheric ozone measurement for biologically-active ultraviolet-radiation reaching the earths surface. *Geophys. Res. Letters* 19, 37-40.

Malins, D. C.; Polissar, N. L.; Gunselman, S. J. (1996) Progression of human breast cancers to the metastatic state is linked to $^{\bullet}$OH-induced DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 93, 2557-2563.

Manach, C.; Morand, C.; Texier, O.; Favier, M. L.; Agullo, G.; Demigne, C.; Regerat, F.; Remesy, C. (1995) Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J. Nutr*. 125, 1911-1922.

Markhan, K. R. 1988 Distribution of flavonoids in the lower plants and its evolutionary significance. In: The flavonoids. Advances in research since 1980. Harborne, J. B. (Ed.). Chapman and Hall Press, London, pp. 427-468.

Markovits, J.; Linassier, C.; Fosse, P.; Couprie, J.; Pierre, J.; Jacqueminsablon, A.; Saucier, J. M.; Lepecq, J. B.; Larsen, A. K. (1989) Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. C*ancer Res.* 49, 5111-5117.

Martinez, G. R.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P. (2000) Utilização de endoperóxidos de derivados de naftaleno como fontes químicas de oxigênio singlete em sistemas biológicos. *Quim. Nova*. 23, 686-689.

Marx, G.; Chevion, M. (1985) Site-specific modification of albumin by free radicals. *Biochem. J.* 236, 397-400.

Masters, C.; Holmes, R. (1977) Peroxisomes: new aspects of cell physiology and biochemistry. *Physiol. Rev.* 57, 816-882.

McCord, J. M.; Day Jr., E. D. (1978) Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron EDTA complex. *FEBS Lett.* 86, 139-142.

McCord. J. M.; Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.

Methews-Roth, M. M. (1985) Carotenoids and cancer prevention – Experimental and epidemiological studies. *Pure Appl. Chem*. 57, 717-722.

Metodieva, D.; Jaiswal, A. K.; Cenas, N.; Dickancaite, E.; Segura-Aguilar, J. (1990) Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 107-116.

Michaels, M. L.; Tchou, J.; Grollman, A. P.; Miller, J. H. (1992) A repair system for 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanine. *Biochemistry* 31, 10964-10968.

Middleton, E. Jr.; Kandswami, C. (1994) The impact of plant flavonoids on mammaliam biology: Implication for immunity, inflamation and cancer. In: The Flavonoids. Advances in Research since 1986. Harborne, J. B. (Ed.). Chapman and Hall Press, Cambridge, pp. 619-652.

Mielcorek, J. (1997) Photochemical stability of the inclusion complexes formed by modified 1,4-dihydropyridine derivatives with beta-cyclodextrin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15, 681-686.

Mira, L.; Fernandez. M. T.; Santos, M.; Rocha, R.; Florêncio, M. H.; Jennings, K. R. (2002) Interactions of flavonoids with iron and cooper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Rad. Res.* 36, 1199-1208.

Monroe, B.M., (1985) Singlet oxygen in solution: lifetimes and reaction rate constants. In: Singlet O_2, Frimer, A. A. (Ed.), Vol. 1. CRC Press, Boca Raton, pp. 177-224.

Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and citotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

Nakanishi, I.; Fukuhara, K.; Ohkubo, K.; Shimada, T.; Kansui, H.; Kurihara, M.; Urano, S.; Fukuzumi, S.; Miyata, N. (2001) Superoxide anion generation via electron-transfer oxidation of catechin dianion by molecular oxygen in aprotic medium. *Chem. Letter* 1152-1153.

Nakazawa, H.; English, D.; Randell, P. L.; Nakazawa, K.; Martel, N.; Armstrong, B. K.; Yamazaki, H. (1994) UV and skin cancer: specific p53 gene mutation in normal skin as a biologically relevant exposure measurement. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 91, 360-364.

Nakazawa, K. (1941) *Pharm. Soc. Japan* 61, 174.

Olsson, L. C.; Veit, M.; Weissenbock, G.; Bornman, J. F. (19980 Differential flavonoid response to enhanced UV-B radiation in *Brassica napus*. *Phytochemistry* 49, 1021-1028.

Packer, L.; Rimbach, G.; Virgilli, F. (1999) Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (Pinus maritima) bark, pycnogenol. *Free Radic. Biol. Med*. 27, 704-724.

Perdiz, D.; Grof, P.; Mezzina, M.; Nikaido, O.; Moustacchi, E.; Sage, E. (2000) Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 275, 26732-26742.

Philips, D. A.; Dakora, F. D.; Sande E.; Joseph, C. M.; Zon, J. (1994) Synthesis, release and transmission of alfalfa signals to rhizobial symbionts. *Plant soil* 161, 69-80.

Piette, J. (1991) Biological consequences associated with DNA oxidation mediated by $^1O_2$. *J. Photochem. Photobiol.* B: Biol.11, 241-260.

Plaumann, B.; Fritsche, M.; Rimpler, H.; Brandner, G.; Hess, R. D. (1996) Flavonoids activate wild-type p53. *Oncogene* 13, 1605-1614.

Plaumann, B.; Fritsche, M; Rimpler, H; Brandner, G; Hess, R. D. (1996) Flavonoids activate wild-type p53. *Oncogene* 13, 1605-1614.

Porter, N. A. (1986) Mechanism for the autoxidation of polyunsaturated lipids. *Acc. Chem. Res.* 19, 262-268.

Porter, W. L. (1993) Paradoxical behaviour of antioxidants in food and biological systems. *Tox. Ind. Health* 9, 93-122.

Potter, J. D.; Steinmetz, K. (1996) Vegetables, fruit and phytoestrogens as prventive agents. In IARC Scientific Publications139, 61-90.

Pryor, W. A.; Squadrito, G. L. (1995) The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of NO with $O_2^{\bullet -}$. *Am. J. Physiol.* 268, L699-L722.

Rabek, J. F. (1985) $^1O_2$ oxidation of polymers and their stabilization In: Singlet $^1O_2$. Vol 4, Frimer A. A. (Ed.). CRC Press, Boca Raton, pp. 1-90.

Ravanat, J-L.; Di Mascio, P.; Martinez, G. R.; Medeiros, M. H. G.; Cadet, J. (2001) Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. *J. Biol. Chem*. 276, 6056-40604.

Ravanat, J-L; Douki, T.; Cadet, J. (2001) Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J. Photochem. Photobiol.* B. 63, 88-102.

Reid, T. J. III, Murthy, M. R.; Sicignano, A.; Tanaka, N.; Musick, W. D.; Rossman, M. G. (1981) Structure and heme environment of beef liver catalase at 2.5 angstrom resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 4767-4771.

Rice-Evans, C. Plant polyphenols: free radical scavengers or chain-breaking antioxidants? (1994) In: Biochemical Society Symposium no 61 Rice-Evans, C.; Halliwell, B.; Lunt, G. G. (Eds.). Portland Press, pp. 103-116.

Sage, E.; Lamolet, B.; Brulay, E.; Moustacchi, E.; Chateauneuf, A.; Drobetsky, E. A. (1996) Mutagenic specificity of solar UV light in nucleotide excision repair-deficient rodent cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 93, 176-180.

Saito, I.; Matsuura, T.; Inoue, K. (1981) Formation of superoxide ion from singlet oxygen. On the use of a water soluble singlet oxygen source. *J. Am. Chem. Soc.* 103, 188-190.

Santos, C. X. C.; Bonini, M. G.; Augusto, O. (2000) Role of the carbonate radical anion in tyrosine nitration and hydroxylation by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* 377, 146-152.

Saponara, R.; Bosisio, E. (1998) Inhibition of cAMP-phosphodiesterase by biflavones of Ginkgo biloba in rat adipose tissue. *J. Nat. Prod*. 61, 1386-1387.

Seawell, P. C.; Smith, C. A.; Ganesan, A. K. (1980) Den V gene of bacteriophage T4 determines a DNA glycosilase specific for pyrimidine dimers in DNA. *J. Virol.* 35, 790-796.

Shibutani, S.; Takeshita, M.; Grollman, A. P. (1991) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damage base 8-oxodG. *Nature* 349, 431-434.

Shibutani, S.; Takeshita, M.; Grollman, A. P. (1991) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodGuo. *Nature* 349, 431-434.

Sies, H. (1986) Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie* 25, 1058-1071.

Sies, H. (1985) Oxidative stress, Academic Press, London.

Sies, H.; Stahl, W. (2004) Nutritional protection against skin damage from sunlight. *Annu. Rev. Nutr.* 24, 173-200.

Singh, B.; Bhat, T. K.; Singh, B. (2003) Potential therapeutic applications of some antinutritional plant secondary metabolites. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5579-5597.

Sinha, R. P.; Hader, D. P. (2002) UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem. Photobiol. Sci.* 1, 225-236.

Stafford, H. A. (1991) Flavonoid evolution: an enzymatic approach. *Plant Phisiol.* 96, 680-685.

Stahl, W.; Sies, H. (1996) Lycopene: A biologically important carotenoid for humans? *Arch. Biochem. Biophys.* 336, 1-9.

Stahl, W.; Sies, H. (2002) Carotenoids and protection against solar UV radiation. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 15:291-296.

Stapleton, A. E. (1992) Ultraviolet radiation and plants: burning questions. *Plant Cell* 4, 1353-1358.

Stivala, L. A.; Savio, M.; Cazzaline, O.; Pizzala, L.; Rehak, L.; Bianchi, L.; Vannini, V.; Prosperi, E. (1996) Effect of beta-carotene on cell cycle progression of human fibroblasts. *Carcinogenesis* 17, 2395-2401.

Stoyanovsky, D. A.; Goldman, R.; Jonnalagadda, S. S.; Day, B. W.; Claycamp, H. G.; Kagan, V. E. (1996) Detection and characterization of the electron paramagnetic resonance-silent glutathionil-5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide adduct derived from redox cycling of phenoxyl radical in model systems and HL-60 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 330, 3-11.

Sun, C-M.; Syu, W-Jr.; Huang, Y-T.; Chen, C-C.; Ou, J-C. (1997) Selective cytotoxicity of ginkgetin from *Selaginella moellendorffii.* 60, 382-384.

Taira, J.; Mimura, K.; Yoneya, T.; Hagil, A.; Murakami, A.; Makino, K. (1992) Hydroxyl radical formation by UV-irradiated epidermal-cells. *J. Biochem*. 111, 693-695.

Takeuchi, Y.; Kubo, H.; Kasahara, H.; Sakai, T. (1996) Adaptive alteration in the activities of scavengers of active oxygen in cucumber cotyledons, irradiated with UV-B. *J. Plant Physiol.* 147, 589-592.

Torel, J.; Cillard, J.; Cillard, P. (1988) Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxyl radical. *Phytochemistry* 25, 383-385.

Tournaire, C.; Croux, S.; Maurette, M-T.; Beck, I.; Hocquaux; Oliveros, E.; Braun, A. M. (1993) Antioxidant activity of flavonoids: efficiency of singlet oxygen ($^1\Delta_g$) quenching. *J. Photochem. Photobiol*. B 19, 205-215.

Uekama, K. (2004) Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation. *Chem. Pharm. Bull.* 52, 900-915.

Vaca, C. E.; Wilhelm, J.; Harms-Ringdahl, M. (1988) Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. *Mut. Res.* 195, 137-149.

Van Beek, T. A.; Bombardelli, E.; Morazzoni, P.; Peterlongo, F. (1998) *Ginkgo biloba* L. *Fitoterapia* 3, 195.

Walle, T. (2004) Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 829-837.

Wang, D.; Kreutzer, D. A.; Essigmann, J. M. (1998) Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Mut. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 400, 99-115.

Wilkinson, F.; Helman, W. P.; Ross, A. B. (1993) Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. *J Phys. Chem. Ref. Data* 22,113-262.

Wollenweber, E. (1988) Occurrence of flavonoids aglicones in medicinal plants. *Prog. Clin. Biol. Res*. 280, 45-55.

Yamaguchi, K. (1985) Theoretical calculations of singlet oxygen reactions. In: Singlet Oxygen. Vol.3, Frimer, A. A., (Ed.). CRC Press, Boca Raton, pp. 119-251.

Yamaguchi, L. F.; Martinez, G. R.; Catalani, L. H.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P. (1999) Lycopene entrapped in human albumin protects 2'-deoxyguanosine against singlet oxygen damage. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 49,12S-20S.

Yamasaki, H.; Grace, S. C. (1998) EPR detection of phytophenoxy radicals stabilized by zinc ions: evidence for the redox coupling of plant phenolics with ascorbate in the H_2O_2-peroxidase system. *FEBS Lett* 422, 377-389.

Yang, M. H.; Schaich, K. M (1996) Factors affecting DNA damage caused by lipid hydroperoxides and aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 225-236.

Yermilov, V.; Yoshie, Y.; Rubio, J.; Ohshima, H. (1996) Effects of CO_2/HCO_3^- on induction of DNA single-strand breaks and formation of 8-nitroguanine, 8-oxoguanine and base-propenal mediated by $ONOO^-$. *FEBS Lett.* 399,67-70.