UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

Efeito dos compostos fenólicos do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) na
inflamação aguda e sobre os marcadores de estresse oxidativo de ratos
diabéticos

Ana Mara de Oliveira e Silva

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Jorge Mancini Filho

São Paulo
2012

Ana Mara de Oliveira e Silva

Efeito dos compostos fenólicos do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) na inflamação aguda e sobre os marcadores de estresse oxidativo de ratos diabéticos

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor.

Área: Nutrição Experimental

Orientador: Prof. Dr. Jorge Mancini Filho

São Paulo
2012

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

Silva, Ana Mara de Oliveira e
S586e Efeito dos compostos fenólicos de alecrim (*Rosmarinus officinalis*
L.) na inflamação aguda e sobre os marcadores de estresse oxidativo
de ratos diabéticos / Ana Mara de Oliveira e Silva. -- São Paulo,
2012.
133p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição
Experimental

Orientador : Mancini Filho, Jorge

1. Alimento : Composto fenólico : Ciência dos alimentos
2. Diabetes mellitus : Tratamento 3. Estresse oxidativo I. T. II.
Mancini Filho, Jorge, orientador.

641 CDD

Ana Mara de Oliveira e Silva

Efeito dos compostos fenólicos do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) na
inflamação aguda e sobre os marcadores de estresse oxidativo de ratos
diabéticos

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dr. Jorge Mancini Filho
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de 2012.

À minha MÃE, um exemplo
de pecar por excesso de
zelo, pelo constante incentivo
e seguro alicerce.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Jorge Mancini pela orientação, confiança, incentivo e principalmente pelas oportunidades oferecidas durante a pós-graduação.

Ao Professor Aléxis Vidal Novoa da Universidade de Havana/Cuba pelas valiosas sugestões e contribuições neste trabalho.

Às Professoras Sílvia Berlanga, Elfriede Bacchi e Inês Genovese da FCF/USP pela contribuição nas análises químicas, e aos seus alunos Diogo, Leandro e às alunas Any Elisa, Marcela e Gabriela, respectivamente.

À Professora Dalva Mancini e aos pesquisadores do Instituto Butantã (Rita e Ricardo) pelo conhecimento e treinamento no cultivo de células e análises de PCR.

Ao Professor Francisco Oliveira da UFPI e à sua aluna de mestrado Luciane Lima pela colaboração no ensaio de edema de pata.

À Professora Sandra Farsky FCF/USP pela co-orientação no estudo de atividade anti-inflamatória *in vivo* e aos seus alunos, em especial Isabel Machado e José Roberto, pela dedicada colaboração.

À Professora Susan Percival do Depto. de Ciência dos Alimentos e Nutrição Humana da Universidade da Flórida/EUA pela supervisão no estudo com as células HepG2. À Cheryl Rowe, Joy Stanilka e Rebecca Creazy pela colaboração valiosa durante minha estadia na U. da Flórida.

Ao Professor Jesse F. Gregory do Depto. de Ciência dos Alimentos e Nutrição Humana da Universidade da Flórida/EUA e à sua aluna Barbara DeRatt por terem cedido as células HepG2.

Aos Professores Neuza Hassimotto, Úrsula Marquez e Marcelo Rogero pelas contribuições no Exame de Qualificação.

Aos professores do Programa de Ciência dos Alimentos da FCF/USP pelo ensino.

À Rosângela Pavan, técnica do Laboratório de Lípidos, e a todos os alunos do laboratório (Eliane, Illana, Milessa, Fernanda Jardini, Lucillia, Claudimar, Fernanda Santana, Fernanda Shina e Danilo) pela amizade e convívio diário.

À Illana pela amizade, confiança e parceria nos ensaios durante todo doutorado.

Aos funcionários do Biotério de Produção e Experimentação da FCF/USP pelo apoio e colaboração durante os experimentos *in vivo*.

Aos funcionários da FCF/USP, em especial, os do Depto. de Alimentos e Nutrição Experimental (Mônica, Cleo, Roberta, Lurdinha, Alexandre e Ivanir) e os da secretaria de Pós-graduação (Elaine, Jorge e Edilson) que sempre estiveram presentes.

Ao CNPq pela concessão de bolsa e à Pró-Reitoria de Pós-Graduação pelo suporte financeiro durante estágio na Universidade da Flórida.

A todos os amigos, em especial Liane, Elma, Eliane, Illana e Fernanda Jardini, que de forma otimista e carinhosa contribuíram para a realização deste trabalho.

Às amigas piauienses e de moradia, Liane, Lucillia e Michelle, pela amizade e convivência harmoniosa durante a pós-graduação. À Ana Carolina da UFC/CE pela amizade recentemente construída e pela valiosa ajuda na reta final do doutorado.

Aos funcionários do CRUSP, em especial ao Robson e Joice, que sempre zelaram pelo nosso bem-estar.

Aos meus familiares da cidade de São Paulo, em especial Alice, pelo carinho, apoio e acolhimento. E à sua irmã Nalva, que me acolheu e deu todo apoio necessário durante minha estadia na Flórida/EUA.

À minha família no Piauí, em especial minha mãe, que mesmo distante sempre me deu muita força, incentivo e AMOR. Família pequena, carinhosa e muito unida.

À Liane, uma amiga, irmã... Uma história verdadeira de companheirismo, cumplicidade e amizade que se iniciou desde a graduação há 12 anos.

Ao Paulo pela confiança, paciência e por sempre estar ao meu lado... e por entender a ausência em tantos momentos.

A Deus, em que tudo pode e me fortalece... Agradeço a ELE minha vida, minha família, amigos, oportunidades e conquistas!

SUMÁRIO

Página

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIações

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Revisão bibliográfica	01
1.1.1. Diabetes mellitus (DM)	01
1.1.1.1. Glicação de proteínas e formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs)	02
1.1.1.2. Diabetes mellitus, estresse oxidativo e processo inflamatório	05
1.1.1.3. Modelo de diabetes experimental	11
1.1.1.4. Antioxidantes no diabetes	12
1.1.2. Inflamação aguda	17
1.1.2.1. Cicloxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX)	18
1.1.2.2. Modelos de inflamação aguda	21
1.1.3. Compostos fenólicos	22
1.1.4. Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	25
2. OBJETIVOS	32
2.1. Geral	32
2.2. Específicos	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	33

3.1. Material	33
3.1.1. Amostras	33
3.2. Métodos	33
3.2.1. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos	33
3.2.2. Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	38
3.2.3. Atividade antioxidante <i>in vivo</i>	43
3.2.4. Atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i>	49
3.2.5. Atividade anti-inflamatória <i>in vivo</i>	50
3.2.6. Atividade antioxidante em células HepG2	53
3.2.7. Análise estatística	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1. Identificação e quantificação de compostos fenólicos	57
4.2. Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	63
4.3. Atividade antioxidante <i>in vivo</i>	72
4.4. Atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i>	86
4.5. Atividade anti-inflamatória <i>in vivo</i>	88
4.6. Atividade antioxidante em células HepG2	102
5. CONCLUSÕES	112
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
ANEXOS	133

RESUMO

SILVA, A.M.O. **Efeito dos compostos fenólicos do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) na inflamação aguda e sobre os marcadores de estresse oxidativo de ratos diabéticos.** 2012. 133 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Introdução: As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como o diabetes, apresenta estreita relação com os marcadores do estresse oxidativo e da inflamação. Estes marcadores podem ser modulados pelos compostos bioativos presentes nos alimentos. Os compostos fenólicos presentes no alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) possuem atividades biológicas importantes, como antioxidante, anti-inflamatória, anticarcinogênica, entre outras. Objetivo: Avaliar o efeito dos compostos fenólicos do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) na inflamação aguda e sobre os marcadores de estresse oxidativo de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Métodos: Extrato aquoso (EA) e frações ricas em compostos fenólicos foram obtidos das folhas de alecrim e avaliados quanto à sua composição em fenólicos e capacidades antioxidante e anti-inflamatória *in vitro*. Ratos *Wistar*, machos, foram tratados com EA, fração hidroalcoólica (FHA) ou fração de ácidos fenólicos livres (AFL). O efeito do EA, FHA e AFL foram avaliados em ratos diabéticos. Foi avaliada a atividade anti-inflamatória *in vivo* do EA nos modelos de inflamação aguda: edema de pata e bolsa de ar. O efeito do EA também foi investigado em células de hepatócitos humano (HepG2). Para análise dos resultados utilizou-se a análise de variância (ANOVA, post-hoc Tukey), adotando como nível de significância $p < 0,05$. Resultados: O EA e suas frações apresentaram alto conteúdo em compostos fenólicos, entre eles os flavonoides. Os ácidos rosmarínico e carnósico foram os compostos majoritários das frações de ácidos fenólicos. A composição em compostos fenólicos contribuiu significativamente para a expressiva capacidade antioxidante e inibitória da lipoxigenase *in vitro*. O EA de alecrim alterou positivamente a atividade das enzimas antioxidantes, reduziu as concentrações séricas de TNF- α e IL-6; e aumentou níveis de LTB₄ em animais diabéticos quando comparado ao grupo controle diabético (D-H₂O). A AFL não atenuou os marcadores de estresse oxidativo do diabetes. Na inflamação aguda, o EA reduziu o edema de pata semelhante à indometacina ($p > 0,05$). Houve redução significativa ($p < 0,05$) das concentrações de LTB₄, PGE₂, TNF- α e IL-6 em exsudatos de ratos pré-tratados com EA e submetidos ao estímulo inflamatório com carragenina no modelo de bolsa de ar. Esta redução foi acompanhada pela diminuição no recrutamento de neutrófilos, quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$). Foi observada redução na produção de óxido nítrico em neutrófilos tratados com EA e estimulados com LPS. O EA nas concentrações de 1 a 50 $\mu\text{g/mL}$ manteve a viabilidade de células HepG2 e reduziu a produção de espécies reativas em condições basais e hiperglicêmicas, além de manter os níveis de GSH e aumentar a expressão dos genes HO-1 e SOD-2 em células tratadas com 10 $\mu\text{g/mL}$ de extrato quando comparados ao grupo normoglicêmico ($p < 0,05$). Conclusão: O EA de alecrim apresenta propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, observadas tanto *in vitro* como em animais, podendo apresentar benefício nas DCNT, nas quais o estresse oxidativo e a inflamação atuam de forma significativa, como no diabetes.

Palavras-chave: Alecrim, compostos fenólicos, estresse oxidativo, diabetes, inflamação.

ABSTRACT

SILVA, A.M.O. **Effects of the phenolic compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) on acute inflammation and oxidative stress markers in diabetic rats.** 2012. 133 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Introduction: Non-transmissible chronic diseases, such as diabetes, are strongly associated with oxidative stress and inflammation markers, which are known to be modulated by bioactive compounds found in foods. Polyphenols present in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) display important biological activities, including among others, antioxidant, anti-inflammatory and anticarcinogenic effects. **Objective:** To assess the effects of polyphenols from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) on acute inflammation and oxidative stress markers in rats with streptozotocin-induced diabetes. **Methods:** Aqueous extract and phenolic acid fractions were obtained from rosemary leaves and assayed for their phenolic composition and *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities. The effects of the aqueous extract (EA), the hydroalcoholic fraction (FHA) and the free phenolic fraction (AFL) were assessed in diabetic male Wistar rats. The *in vivo* anti-inflammatory activity of EA was evaluated against two models of acute inflammation: paw edema and air pouch. The effect of EA was also investigated in human hepatocyte cells (HepG2). Results were compared using a one-way Analysis of Variance (ANOVA) and the Tukey post-test at a significance level of $p < 0.05$. **Results:** Polyphenols, mainly flavonoids, occurred in high quantities in EA and its fractions. Rosmarinic and carnosic acids were found chiefly in the phenolic fractions. The rich phenolic composition contributed significantly to the high *in vitro* antioxidant activity and lipoxygenase inhibiting capacity observed. The rosemary aqueous extract (EA) positively affected antioxidant enzyme activities, reduced serum TNF- α and IL-6 concentrations and elevated LTB₄ levels in diabetic rats, compared with those in the diabetic control group (D-H₂O). Treatment with AFL did not attenuate the oxidative stress markers altered by diabetes. In the acute inflammation models, paw edema was reduced by EA as successfully as by indomethacin ($p > 0.05$) and LTB₄, PGE₂, TNF- α and IL-6 concentrations in air pouch exudates in carrageenan-stimulated rats were significantly lowered by treatment with EA ($p < 0.05$). Neutrophil recruitment was also reduced, compared with the control group ($p < 0.05$). Treatment with EA also led to the reduction in nitric oxide production by LPS-stimulated neutrophils. In addition to preserving HepG2 cell viability, EA at concentrations between 1 and 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ was also able to diminish ROS production under basal and hyperglycemic conditions, preserve GSH levels and increase HO-1 e SOD-2 gene expression in cells (extract at 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), compared with the normoglycemic group ($p < 0.05$). **Conclusion:** The aqueous extract of rosemary exhibits antioxidant and anti-inflammatory activity *in vitro* and in animals. This could be of great benefit in the treatment of non-transmissible chronic diseases, such as diabetes, which are strongly associated with oxidative stress and inflammation.

Keywords: Rosemary, phenolic compounds, oxidative stress, diabetes, inflammation

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Estágios da glicação não enzimática das proteínas	03
Figura 2	Produção dos precursores dos produtos de glicação avançada e suas consequências.	04
Figura 3	Geração das espécies reativas de oxigênio e ativação das principais vias que levam ao aumento do estresse oxidativo induzidas pela hiperglicemia.	08
Figura 4	Esquema simplificado do envolvimento da oxidação e glicação na neuropatia periférica e doença vascular do diabetes.	10
Figura 5	Síntese de eicosanóides a partir do ácido araquidônico.	12
Figura 6	Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos.	22
Figura 7	Estrutura básica e os principais tipos de flavonoides.	23
Figura 8	Pontos potenciais da participação dos polifenóis na cascata inflamatória.	25
Figura 9	Folhas de alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.).	26
Figura 10	Principais compostos presentes no alecrim: diterpenos fenólicos, ácidos fenólicos e os flavonoides.	27
Figura 11	Estrutura química dos flavonoides encontrados no alecrim.	29
Figura 12	Fluxograma de obtenção das frações de ácidos fenólicos.	35
Figura 13	Esquema de indução do diabetes e de tratamento.	45
Figura 14	Cromatografia de camada delgada para os flavonoides presentes no extrato aquoso (EA) e suas frações, obtidos das folhas de alecrim.	59
Figura 15	Cromatograma dos padrões utilizados para identificação dos compostos presentes no EA e suas frações.	60
Figura 16	Cromatogramas do extrato aquoso (EA), da fração etanólica (Fr Et) e da fração hidroalcoolica (Fr HA) obtidos das folhas de alecrim.	61
Figura 17	Capacidade redutora do EA e frações.	68

Figura 18	Percentual de Hb-glicada e TBARS de soro.	73
Figura 19	Atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx do tecido cardíaco.	76
Figura 20	Atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx do tecido hepático.	76
Figura 21	Atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx do tecido renal.	77
Figura 22	Percentual de hemoglobina glicada.	81
Figura 23	Concentrações séricas de TBARS.	82
Figura 24	Marcadores de estresse oxidativo: GSH, TBARS, SOD, CAT e GPx do tecido cardíaco.	83
Figura 25	Marcadores de estresse oxidativo: GSH, TBARS, SOD, CAT e GPx do tecido hepático.	83
Figura 26	Marcadores de estresse oxidativo: GSH, TBARS, SOD, CAT e GPx do tecido renal.	84
Figura 27	Efeito do EA de alecrim no modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos.	89
Figura 28	Efeito do EA de alecrim no número de leucócitos totais e polimorfonucleares do exsudato de ratos submetidos ao estímulo com carragenina.	92
Figura 29	Efeito do EA de alecrim nas concentrações de LTB ₄ , PGE ₂ , TNF- α , IL-6 e CINC-1 no exsudato de ratos submetidos ao estímulo com carragenina.	93
Figura 30	Efeito do EA de alecrim na atividade das enzimas antioxidantes SOD e GPx e TBARS no exsudato de ratos submetidos ao estímulo com carragenina.	95
Figura 31	Efeito do EA de alecrim na viabilidade de neutrófilos.	96
Figura 32	Efeito do EA de alecrim na produção de NO por neutrófilos.	97
Figura 33	Concentrações séricas das citocinas TNF- α e IL-6 de ratos controle e diabéticos.	99
Figura 34	Concentrações séricas de LTB ₄ de ratos controle e diabéticos.	101
Figura 35	Efeito da glicose na viabilidade de células HepG2.	103

Figura 36	Efeito da glicose e do EA de alecrim na viabilidade de células HepG2.	105
Figura 37	Efeito do EA de alecrim na formação de espécies reativas em células HepG2.	107
Figura 38	Efeito do EA de alecrim nos níveis de GSH em células HepG2.	109
Figura 39	Efeito do EA de alecrim na expressão gênica da HO-1 e SOD-2 em células HepG2.	110

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Diferenças entre o papel fisiológico e patológico das espécies reativas de oxigênio.	06
Tabela 2	Composição da ração oferecida aos ratos.	44
Tabela 3	Sequências de primers utilizadas no PCR em tempo real.	56
Tabela 4	Fenólicos totais e flavonoides do EA e suas frações obtidos das folhas de alecrim, expressos em equivalentes de catequina.	58
Tabela 5	Quantificação de fenólicos totais, ácido rosmarínico e ácido carnósico nas frações de ácidos fenólicos obtidas das folhas de alecrim.	62
Tabela 6	Valores de IC ₅₀ de frações e EA de alecrim pelo método de varredura do radical DPPH.	65
Tabela 7	Atividade antioxidante pelo método ORAC do extrato aquoso e das frações de ácidos fenólicos de alecrim.	66
Tabela 8	Valores de IC ₅₀ de frações e EA de alecrim pelo método de inibição da oxidação do β -caroteno/ácido linoléico.	70
Tabela 9	Glicemia inicial, final (mg/dL) e ganho de peso (g) de ratos tratados com água (D-H ₂ O), EA de alecrim na concentração de 50 mg/kg de peso corpóreo ou fração FHA (D-FHA25 e D-FHA50) por quatro semanas.	72
Tabela 10	Ganho de peso (g), consumo de ração (g/dia) e ingestão de água (mL/dia) de ratos controle e diabéticos tratados com água (D-H ₂ O), fração de ácidos fenólicos nas concentrações de 10 e 25 mg/kg de peso corpóreo (D-AFL 10 e D-AFL 25) ou ácido caféico na concentração de 25 mg/kg (D-AC 25) por 35 dias.	80
Tabela 11	Glicemia inicial e glicemia final de ratos controle e diabéticos tratados com água (D-H ₂ O), fração de ácidos fenólicos nas concentrações de 10 e 25 mg/kg de peso corpóreo (D-AFL 10 e D-AFL 25) ou ácido caféico na concentração de 25 mg/kg (D-AC 25) por 35 dias.	81

Tabela 12 Inibição *in vitro* da atividade da enzima LOX pelo EA e suas frações.

LISTA DE ABREVIACÕES

AAPH: 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride

ADA: Associação Americana de Diabetes

AFI: Ácidos fenólicos insolúveis

AFL: Ácidos fenólicos livres

AFS: Ácidos fenólicos solúveis

AGEs: Produtos finais de glicação avançada

ARE: Elemento de resposta a antioxidante

AUC: Curva de decaimento de fluorescência

BHA: Butilhidroxianisol

BHT: Butilhidrotolueno

CAT: Catalase

CCD: Cromatografia em camada delgada

COX: Cicloxigenase

DAG: Diacilglicerol

DCCT: *Diabetes Control and Complications Trial*

DCFH-DA: 2',7'-Diclorofluoresceína diacetato

DCNT: Doenças Crônicas Não Transmissíveis

DM: Diabetes *mellitus*

DPPH: Radical 2,2 difenil-1-picril-hidrazil

DTNB: 5,5'-ditiobis - 2,2 ácido nitrobenzóico

DUOX: Dual oxidase

DUOXA

EA: Extrato aquoso

EAG: Equivalentes de ácido gálico

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: Ensaio Imuno-enzimático

EROs: Espécies reativas de oxigênio

FDA: *Food and Drug Administration*

FHA: Fração hidroalcoólica

FLAP: 5-LOX *activating protein*

Fr Aq: Fração aquosa

Fr Et: Fração etanólica

Fr HA: Fração hidroalcoólica

GCL: Glutamato cisteína ligase

GLUT2: Transportador de glicose tipo 2

GPx: Glutathione peroxidase

GR: Glutathione reductase

GSH: Glutathione reduzida

GSSG: Glutathione oxidada

HbA1c: Hemoglobina glicada A1c

HO-1: Hemoxigenase-1

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência
IKB- α : Inibidor citoplasmático da translocação do fator de transcrição NF- κ B
IL-1 β : Interleucina-1 β
IL-6: Interleucina-6
IL-8: Interleucina-8
iNOS: Óxido nítrico sintase induzível
Keap1: *Kelch-like ECH-associated protein 1*
LDL: Lipoproteína de baixa densidade
LOX: Lipoxigenase
LTA4: Leucotrieno A4
LTB4: Leucotrieno B4
MEM: Meio essencial mínimo
MMP-9: Metaloproteinase-9
MTT: *3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide*
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF- κ B: *Nuclear factor kappa B*
NO: Óxido nítrico
NOS: Óxido nítrico sintase
NQOs: Quinona oxidoredutases
Nrf2: *Nuclear factor (erythroid-derived 2) – like2*
O-Glc-Nac: *O-linked [beta]-N-acetylglucosamine*
OMS: Organização Mundial de Saúde
ORAC: *Oxygen radical absorbance capacity assay*
PKC: Proteína quinase C
PMN: Leucócitos polimorfonucleares
RAGE: Receptores dos AGEs
SGLT1: Transportador de glicose dependente de sódio
SOD: Superóxido dismutase
STZ: Estreptozotocina
TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBHQ: *Tertiary butylhydroquinone*
TNF: Fator de necrose tumoral
TNFR1: Receptor do fator de necrose tumoral 1
UDP: *Uridine diphosphate*
UDP-GlcNAc: *Uridine diphosphate N-acetylglucosamine*
VCAM: Moléculas de adesão celular vascular
VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

1. INTRODUÇÃO

1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1. Diabetes *mellitus* (DM)

Diabetes *mellitus* (DM) é um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresenta em comum a hiperglicemia, a qual é resultado de defeitos na ação, secreção da insulina, ou em ambos. A classificação atual do diabetes baseia-se na etiologia, e hoje tanto a Organização Mundial de Saúde (OMS) como a Associação Americana de Diabetes (ADA) incluem quatro classes clínicas: DM tipo 1, DM tipo 2, outros tipos específicos de DM e DM gestacional (SBD, 2009).

O DM é um problema de saúde pública que alcança proporções epidêmicas tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento. Estima-se que sua prevalência irá aumentar drasticamente nas próximas décadas em número e significância (MENDES, 2011). Isto é confirmado pela OMS que em 2004 publicou estimativas para o ano de 2030 correspondendo a 366 milhões de pessoas com diabetes. Hoje os estudos indicam crescimento e mostram que a prevalência mundial entre adultos aumentará 7,7% para o ano 2030, correspondendo a 439 milhões de pessoas com diabetes. Além disso, entre 2010 e 2030 haverá aumento de 20% no número de adultos com diabetes em países desenvolvidos ao passo que em países em desenvolvimento este aumento chegará a 69%. Estas estimativas consideram como fatores determinantes o crescimento e envelhecimento da população e a urbanização associados com mudanças no estilo de vida (SHAW *et al.*, 2010; WILD *et al.*, 2004).

O DM está associado a complicações que comprometem a qualidade de vida e a sobrevida dos indivíduos. Além disso, acarreta elevados custos para o controle metabólico e o tratamento de suas complicações. As consequências, em longo prazo, decorrem de alterações microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia) e macrovasculares (doença cardiovascular, acidente vascular cerebral e doença vascular periférica) que levam à disfunção, dano ou falência de vários órgãos. O risco de desenvolvimento destas complicações depende tanto da duração como da severidade da hiperglicemia (FOWLER, 2011; MELENDEZ-RAMIREZ *et al.*, 2010).

Estudos epidemiológicos e de intervenção confirmam a associação entre a hiperglicemia e o desenvolvimento das complicações tardias do diabetes tanto em pacientes com DM tipo 1 como do tipo 2 e usam a determinação da hemoglobina glicada (HbA1c) para avaliação do controle glicêmico em longo prazo (DCCT, 1993; DCCT, 1995; UKPDS, 1998). O *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) foi um dos primeiros estudos de intervenção que mostrou a eficácia do controle glicêmico rigoroso em reduzir a incidência e a progressão das complicações microvasculares em pacientes com diabetes tipo 1 (DCCT, 1993).

Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes, o tratamento do DM tem como metas a normalização da glicemia de jejum (valor menor que 130 mg/dL), da glicemia pós-prandial (menor que 180 mg/dL) e a redução dos valores de hemoglobina glicada (inferior a 7%). Estes parâmetros necessitam de avaliações periódicas para que o controle se mantenha em longo prazo, com o objetivo de retardar ou evitar o aparecimento das complicações crônicas (MENDES, 2011).

Atualmente, a HbA1c é considerada padrão de referência do controle glicêmico e fator chave na redução do risco das complicações relacionadas com o diabetes, embora, outros fatores como a frequência e a magnitude das variações glicêmicas representem um fator de risco adicional para as complicações diabéticas, independente dos níveis de hemoglobina glicada (NALYSNYK *et al.*, 2010; BROWNLEE; HIRSCH, 2006).

1.1.1.1. Glicação de proteínas e formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs)

A glicação não enzimática de proteínas ou reação de *Maillard* está relacionada à hiperglicemia crônica e ocasiona uma série de alterações fisiológicas importantes no desenvolvimento das complicações crônicas do diabetes (MENDEZ *et al.*, 2010; YAMAGISHI; MATSUI, 2010).

A reação de *Maillard* é dividida em três estágios: inicial, intermediário e tardio. No estágio inicial, a glicose (ou outros açúcares redutores como frutose, galactose, manose e xilose) reage com grupamentos amino livres de várias moléculas, incluindo proteínas, ácidos nucleicos e lípidos, formando um composto instável denominado base de *Schiff*. Esta molécula sofre um rearranjo produzindo uma cetoamina estável, o produto de Amadori. Como essa reação não requer a

participação de enzimas, as variáveis que regulam os níveis dos produtos glicosilados *in vivo* são: a concentração de glicose e proteína, a meia-vida da proteína e sua reatividade com os grupamentos amino. No estado intermediário, através de reações de oxidação e deidração, os produtos de Amadori são degradados em compostos carbonil (glioal, metilglioal e deoxiglicosona), os quais são muito mais reativos que os açúcares dos quais foram originados, agindo como propagadores de reações com grupamentos amino de várias proteínas, originando de forma irreversível compostos insolúveis, freqüentemente fluorescentes, usualmente chamados produtos finais de glicação avançada (AGEs) (BEM; KUNDE, 2006). Estas reações estão apresentadas na Figura 1.

Figura 1. Estágios da glicação não enzimática das proteínas (BEM; KUNDE, 2006).

Os AGEs podem causar dano tecidual por três mecanismos distintos: ligação a macromoléculas, interação com receptores específicos e acumulação intracelular, onde causam danos especialmente às proteínas de vida longa, como as proteínas do cristalino, proteínas dos eritrócitos, albumina, colágeno, mielina, entre

outras, produzindo efeitos indesejáveis à função celular (GIACCO; BROWLEE, 2010; BROWNLEE, 2001).

Na célula endotelial a modificação de proteínas intracelulares, incluindo principalmente proteínas envolvidas na regulação de transcrição de genes, constitui o primeiro mecanismo decorrente do aumento da glicose circulante (Figura 2). O segundo está associado à capacidade destes precursores se difundirem para fora da célula e modificarem moléculas da matriz extracelular, alterando a sinalização entre a matriz e a célula e, assim, causar disfunção celular. Ao atingir o espaço extracelular, estes precursores podem modificar também proteínas circulantes como a albumina, uma vez modificadas podem se ligar aos receptores dos AGEs (RAGE) e ativá-los. Quando ativados, esses receptores sinalizam uma série de reações que resultam na expressão de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, os quais estão associados com as complicações vasculares (BROWNLEE, 2005).

Figura 2. Produção dos precusores dos produtos de glicação avançada e suas consequências (BROWNLEE, 2001).

1.1.1.2. Diabetes *mellitus*, estresse oxidativo e processo inflamatório

O estresse oxidativo é definido como um distúrbio no balanço oxidante/antioxidante em favor dos oxidantes, levando conseqüentemente ao excesso na concentração de oxidantes com redução dos antioxidantes em sistema biológico, tendo como consequência direta a mudança no estado *redox* do compartimento biológico (seja núcleo, mitocôndria, citosol ou espaço extracelular). Esta nova interpretação voltada para o estado *redox* celular aliada ao número crescente de estudos sobre vias de sinalização *redox*, de intervenção com o uso de antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo, levaram a discussão e ao novo conceito de que o estresse oxidativo é a alteração da sinalização *redox* e do controle destas vias (DRUMMOND *et al.*, 2011; JONES, 2006; SIES, 1985).

As espécies reativas de oxigenio (EROs) apresentam papel importante em muitas funções fisiológicas, incluindo a sinalização celular, expressão gênica e regulação da resposta imune. No entanto, seu papel nos sistemas biológicos é bifásico, pois em altas concentrações levam a muitos efeitos patológicos que culminam com disfunção celular, alterações na expressão gênica e protéica, e na fluidez da membrana, podendo resultar em morte celular (EDEAS, 2011). Estas diferenças são mostradas na tabela a seguir.

Tabela 1: Diferenças entre o papel fisiológico e patológico das espécies reativas de oxigênio (EDEAS, 2011).

Papel fisiológico	Papel patológico
<ul style="list-style-type: none"> Concentrações moderadas de EROs participam dos processos fisiológicos de regulação de funções celulares, incluindo cascatas de sinalização e controle transcricional e pós-transcricional da expressão gênica. 	<ul style="list-style-type: none"> Estresse oxidativo grave induz dano celular, o qual pode levar a apoptose ou necrose.
<ul style="list-style-type: none"> Modificação direta de fatores ou mecanismos indiretos através de mudanças no estado oxidativo ou redutor dentro e fora das células. 	<ul style="list-style-type: none"> Danos a estruturas celulares, incluindo lipídios e membranas, proteínas e DNA.
<ul style="list-style-type: none"> Papel essencial na transdução de sinal, expressão gênica, apoptose e envelhecimento. 	<ul style="list-style-type: none"> Em altas concentrações levam à patogênese do câncer, doença cardiovascular, aterosclerose, hipertensão, injúria por isquemia e reperfusão, diabetes, doenças neurodegenerativas, artrite reumatoide e envelhecimento.

Há diferentes tipos de espécies reativas, as quais incluem os radicais superóxido e hidroxila, o peróxido de hidrogênio, óxido nítrico, hipoclorito e peroxinitrito. Em baixas concentrações, as espécies reativas são necessárias para manter o estado *redox* e a função celular. No entanto, em algumas situações as espécies reativas são produzidas em excesso e podem causar dano ao DNA, proteínas, carboidratos e constituintes lipídicos, e desta forma, comprometer a função celular. Nas células de mamíferos, o complexo NADPH oxidase tem como principal função gerar espécies reativas, e está presente principalmente, na membrana celular das células polimorfonucleares, macrófagos e células endoteliais. Outras enzimas são capazes de transferir elétrons ao oxigênio molecular e produzir ânion superóxido, como a óxido nítrico sintase (NOS), cicloxigenase (COX), lipoxigenase (LOX), citocromo P450 redutases e xantina oxidase (PEREZ-MATUTE *et al.*, 2009; CHENG *et al.*, 2001).

A participação do estresse oxidativo no DM é bastante clara, e hoje já se sabe que existem várias vias de formação de espécies reativas, sejam elas não enzimáticas, enzimáticas e mitocondriais. Como exemplo de formação de espécies reativas por via não enzimática, destaca-se a característica oxidativa da glicose. A

hiperglicemia é uma fonte geradora de espécies reativas, uma vez que a glicose pode sofrer auto-oxidação e gerar radicais hidroxila, além de reagir com proteínas a partir de reações não enzimáticas formando os AGEs e gerando, consequentemente, as espécies reativas durante as várias etapas deste processo (KARASU, 2010). Entre as vias enzimáticas estão principalmente, a NADPH oxidase, xantina oxidase e NOS. O complexo NADPH é o que mais se destaca nesse processo de formação de radicais livres, uma vez que é o principal gerador do ânion superóxido no diabetes.

As NADPH oxidases são uma família de complexos enzimáticos que apresentam em suas estruturas várias subunidades, as quais apresentam a função primária de catalisar a reação de redução do oxigênio molecular para gerar o ânion superóxido e/ou peróxido de hidrogênio em vários compartimentos intra e extracelulares. Por serem expressas em praticamente todas as células de mamíferos, as espécies reativas produzidas pela família das NADPH oxidases apresentam papel crucial em vários processos fisiológicos, incluindo a imunidade inata, a modulação das cascatas de sinalização *redox*, além de atuarem como cofatores na produção de hormônios. São descritas na literatura sete isoformas para este complexo enzimático, o qual compreende as subunidades catalíticas NOX 1-5 e a DUOX 1 e 2, e cinco subunidades regulatórias (p22phox, p40phox, p47phox, DUOXA e NOXA). Estas últimas possuem papel importante na maturação e expressão das subunidades catalíticas; e atuam como organizadores e ativadores citosólicos do complexo enzimático NADPH oxidase (DRUMMOND *et al.*, 2011).

A hiperglicemia persistente, bem como condições de alta exposição de glicose ativa o complexo NADPH oxidase pela fosforilação da subunidade citosólica p47phox com sua subsequente translocação para a membrana, ativando o complexo e aumentando a produção de espécies reativas. A geração do ânion superóxido pela NADPH oxidase também depende da disponibilidade de equivalentes redutores, ou seja, do NADPH gerado na via das pentoses e do transporte de glicose mediado pelo transportador de glicose dependente de sódio – SGLT1 (BALTEAU *et al.*, 2011; EDLUND *et al.*, 2010).

Várias evidências indicam o envolvimento do estresse oxidativo nas complicações do DM que se inicia pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria, ou seja, produção aumentada de ânion superóxido pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. A mitocôndria é dessa forma, uma

fonte potencial de espécies reativas (GIACCO; BROWLEE, 2010; KARASU, 2010; NEWSHOLME *et al.*, 2007).

A produção aumentada de ânion superóxido causa a ativação de cinco vias envolvidas na patogênese das complicações: fluxo da via do polioli, aumento da formação dos AGEs e da expressão de seus receptores, ativação das isoformas da proteína quinase C (PKC) e aumento da via da hexosamina (FOLLI *et al.*, 2011; GIACCO; BROWLEE, 2010; KARASU, 2010; BROWNLEE, 2005). Uma vez ativadas, estas vias contribuem para o aumento do estresse oxidativo e da transcrição de genes pró-inflamatórios (Figura 3).

Figura 3. Geração das espécies reativas de oxigênio e ativação das principais vias que levam ao aumento do estresse oxidativo induzidas pela hiperglicemia (BROWNLEE, 2001).

A via do polioli tem a enzima aldose redutase como a chave para ativação desta via. Essa enzima tem a função de reduzir aldeídos tóxicos a alcoóis inativos nas células. Em altas concentrações de glicose circulante essa enzima converte a glicose em sorbitol, e em seguida este é oxidado à frutose. Nessa reação, a aldose redutase consome NADPH, que é também um cofator essencial para regenerar a

glutathiona, um antioxidante intracelular, e aumenta a susceptibilidade ao estresse oxidativo intracelular (BROWNLEE, 2005).

A via da hexosamina está relacionada com a formação da UDP N-acetil glicosamina (UDP-GlcNAc) a partir da frutose 6-fosfato, intermediário da via glicolítica. Esta glicosamina tem papel importante tanto nas alterações da expressão gênica em células glomerulares, quanto na disfunção de cardiomiócitos em cultura celular, induzidas pela hiperglicemia (BROWNLEE, 2005).

A hiperglicemia aumenta a síntese celular do diacilglicerol (DAG), cofator para ativação das isoformas da PKC. Quando esta proteína é ativada pela hiperglicemia celular, ocorre uma variedade de eventos como: inibição da expressão da enzima óxido nítrico sintase tipo endotelial, aumento na ativação do fator de transcrição NF- κ B, aumento da atividade das enzimas NADPH oxidases e da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), os quais estão associados com aumento no processo de angiogênese e permeabilidade vascular, entre outros. A inibição da PKC previne, portanto, alterações na retina e rins de animais diabéticos que têm associação com as alterações micro e macrovasculares (BROWNLEE, 2005).

O fator nuclear NF- κ B desenvolve papel importante em várias vias de transdução de sinal envolvendo doenças crônicas, como o diabetes. Esta ativação está relacionada com morte celular, tanto promovendo quanto inibindo apoptose, dependendo da condição e do tipo celular. A expressão de genes como a ciclooxigenase (COX-2), metaloproteinase-9 (MMP-9), óxido nítrico sintase induzível (iNOS), fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-8 (IL-8), eotaxina, moléculas de adesão de superfície celular e proteínas anti-apoptóticas são reguladas pelo fator de transcrição NF- κ B (BENGMARK, 2006). As propriedades antiproliferativas e anti-inflamatórias são, portanto, mediadas por supressão da ativação do fator de transcrição NF- κ B ou por inibição da expressão de genes regulados por este fator.

O fator de transcrição NF- κ B encontra-se no seu estado inativo ligado ao IKB- α (inibidor citoplasmático da translocação do fator de transcrição NF- κ B). A ativação da IKK via proteína quinase C, promove a fosforilação do inibidor do fator de transcrição NF- κ B (IKB- α), o que favorece a poliubiquitinação e a subsequente degradação do IKB- α no proteassoma 26S, que está localizado no citosol. Subsequentemente, ocorre a liberação e a translocação do fator de transcrição NF- κ B do citosol para o núcleo (fator de transcrição ubíquo, uma vez que regula a

transcrição de diversos genes envolvidos nas respostas imune e inflamatória), o qual promove a transcrição de genes que codificam para proteínas envolvidas na resposta inflamatória. Assim, compostos que possam interferir na ativação deste fator de transcrição podem fazer parte das estratégias de tratamento nas doenças inflamatórias (CHECKER *et al.*, 2012; BASTOS; ROGERO; ARÊAS, 2009).

No diabetes, inúmeros fatores fisiológicos e bioquímicos levam a disfunção endotelial e inflamação vascular (Figura 4). A disfunção endotelial é causada pela exposição crônica ao estresse oxidativo e modificação da lipoproteína de baixa densidade (colesterol LDL), entre outros processos que promovem menor disponibilidade de óxido nítrico (NO), pelo desacoplamento da enzima óxido nítrico sintase endotelial e/ou formação de peroxinitrito, e inflamação crônica. A inflamação vascular aumentada, incluindo expressão da interleucina-6 (IL-6) e moléculas de adesão celular vascular (VCAM), também contribui com a redução da concentração do fator de relaxamento endotelial (NO). A hiperglicemia persistente no diabetes compromete a função endotelial ligada à formação dos AGEs. Em contrapartida, a inibição da síntese destes produtos previne a depleção de NO (HARTGE *et al.*, 2007).

Figura 4. Esquema simplificado do envolvimento da oxidação e glicação na neuropatia periférica e doença vascular do diabetes (DICKINSON *et al.*, 2002).

1.1.1.3. Modelo de diabetes experimental

Os modelos experimentais de diabetes em animais são induzidos principalmente por aloxana e estreptozotocina (STZ). Ambas as substâncias são análogas citotóxicas da glicose com mecanismo de ação seletivo para as células β pancreáticas, acumulando-se nestas células via transportador de glicose 2 (GLUT2) (PISAREV *et al.*, 2009; LENZEN, 2008).

A aloxana apresenta dois efeitos distintos: i) inibe seletivamente a secreção de insulina induzida pela glicose através da inibição da enzima glicoquinase, a qual funciona como um sensor para entrada de glicose na célula β , e uma vez inibida, leva à redução da oxidação da glicose e formação de ATP; ii) outro efeito é mediado pela formação de espécies reativas. Na presença de tióis intracelulares, como a glutatona, a aloxana gera espécies reativas em uma reação *redox*, formando seu produto de redução, o ácido dialúrico. Este, por meio de reação de auto-oxidação, gera radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e por último, radicais hidroxilas, reação que é catalizada pelo ferro. Como as células β são caracterizadas por conter reduzidas concentrações de antioxidantes celulares, o acúmulo destes radicais hidroxilas leva a morte destas células (LENZEN, 2008).

A STZ, produzida pelo *Streptomyces achromogenes*, é um antibiótico comumente utilizado no diabetes experimental, identificado no século passado, no período de 1950, e aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de câncer metastático de células das ilhotas pancreáticas, reduzindo os sintomas, especialmente a hipoglicemia, devido à secreção excessiva de insulina pelos insulinomas (BRENTJENS; SALTZ, 2001). Por ser uma glicosamina pertencente à classe das nitrosuréias, é tóxica à célula por causar dano ao DNA e apresentar similaridade com a glicose e, além disso, pode ser transportada para a célula pelo GLUT2. Isso explica sua toxicidade específica às células β pancreáticas (LENZEN, 2008).

A citotoxicidade da STZ está relacionada com a sua capacidade de promover a alquilação do DNA, levando a processos celulares que resultam em morte celular. A STZ também é capaz de gerar espécies reativas e assim provocar dano ao DNA. Recentemente, foi proposto um novo mecanismo de toxicidade, o qual se dá pela inibição da enzima O-GlcNAcase, que junto com a O-Glc-NAc

transferase é responsável pela modificação pós-transcricional da molécula O-GlcNAc intracelular, com isso há acúmulo de proteínas acetiladas e aumento do estresse oxidativo levando a apoptose celular (HE *et al.*, 2009).

Outro mecanismo pela qual a STZ destrói as células β do pâncreas é pela depleção intracelular de NAD nas células das ilhotas pancreáticas e pela capacidade de metilar o DNA. A metilação de proteínas contribui para os defeitos funcionais das células β após exposição à STZ (LENZEN, 2008).

O modelo de diabetes experimental induzido por STZ é um modelo interessante de diabetes tipo 1 e permite investigar vários eventos e mecanismos de ação de substâncias envolvendo o estresse oxidativo, a inflamação crônica, e consequentemente, as complicações crônicas, como retinopatia, nefropatia, neuropatia e complicações macrovasculares. Este modelo é bem caracterizado nos animais, pois se observa claramente a tríade do diabetes: poliúria, polifagia e polidipsia, além da perda de peso.

1.1.1.4. Antioxidantes no diabetes

A exposição aos radicais livres propiciou ao organismo desenvolver mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo induzido por espécies reativas, sejam eles, preventivos, reparadores e de defesas antioxidantes (VALKO *et al.*, 2007). Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias enzimáticas ou não enzimáticas capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis (MORAIS *et al.*, 2009; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

Para neutralizar o dano oxidativo, as células têm um sistema de defesa antioxidante, tanto enzimático como não enzimático, consistindo de componentes endógenos e exógenos que atuam juntos neutralizando as espécies reativas e assim, protegendo as células. Estes componentes são denominados de antioxidantes. É considerado um antioxidante ideal aquele que possui a capacidade de atuar no meio lipofílico, como nos espaços da membrana, bem como em domínios aquosos e que possam eliminar as EROs prontamente à níveis fisiológicos relevantes. Estes antioxidantes podem estar disponíveis de forma endógena ou podem ser obtidos exogenamente através da dieta (MATHEW; TIWARI; JATAWA, 2011).

Os componentes que podem oferecer proteção antioxidante aos compartimentos celulares são:

- Proteínas ligadoras de metais: proteínas formadas por uma cadeia de resíduos de aminoácidos que possuem a habilidade de se ligarem aos metais, formando um complexo. A albumina, que se liga ao cobre, a ferritina e a mioglobina, que se liga ao ferro, são exemplos dessas proteínas (MATHEW; TIWARI; JATAWA, 2011).
- Os antioxidantes não enzimáticos em sua maioria são exógenos e devem ser obtidos pela dieta. Os principais desta classe podem ser divididos em: vitaminas lipossolúveis (vitamina A e E), vitaminas hidrossolúveis (vitamina C, B1, B2, B6 and B12), carotenoides, glutathione, α -ácido lipóico, coenzima Q10, minerais (zinco, cobre, selênio e manganês), ácido úrico e os compostos fenólicos derivados de plantas, destacando-se os bioflavonoides que oferecem atividade anti-inflamatória e anti-envelhecimento (MATOUGH *et al.*, 2012; MORAIS *et al.*, 2009; VALKO *et al.*, 2007).
- Enzimas antioxidantes tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR) necessitam de alguns micronutrientes como cofatores. Estas enzimas compõem o sistema de detoxificação das espécies reativas, principalmente de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas células, prevenindo a oxidação (AFONSO, 2010; HALLIWELL, 1994).

Superóxido Dismutase (SOD)

A SOD faz parte de uma família de metaloenzimas presente em todas as células eucarióticas. Sua participação na redução do estresse oxidativo está relacionada com a capacidade de catalisar a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular como produtos finais de dismutação. Em humanos existem três formas enzimáticas da SOD: a SOD 1 e a SOD 3 contêm em seu centro catalítico moléculas de cobre-zinco (Cu-Zn-SOD), e a SOD 2 contém manganês (Mn-SOD). As isoformas cobre-zinco estão presentes no citoplasma, núcleo e plasma. Por outro lado, a isoforma manganês SOD é primariamente localizada na mitocôndria (LIMÓN-PACHECO; GONSEBATT, 2009; LAGUERRE;

LECOMTE; VILLENEUVE, 2007; WASSMANN *et al.*, 2004). A reação na qual a SOD participa está apresentada a seguir.

Catalase (CAT)

A catalase é uma enzima que contém ferro no seu centro catalítico, e tem como principal função promover a decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio (O_2), protegendo as células do estresse oxidativo, uma vez que o peróxido de hidrogênio reage diretamente com resíduos tióis das proteínas *redox*-sensíveis ou modifica a razão da glutathiona reduzida para glutathiona oxidada (GSH/GSSG). A catalase é encontrada principalmente em organelas subcelulares tais como os peroxissomos. Já as mitocôndrias e o retículo endoplasmático contêm reduzida concentração de catalase. Assim, o H_2O_2 intracelular para ser eliminado deve se difundir para os peroxissomos (ANDERSON *et al.*, 2009; LIMÓN-PACHECO; GONSEBATT, 2009; LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007).

Glutathiona Peroxidase (GPx)

A glutathiona peroxidase é uma enzima selenodependente que contém quatro átomos de selênio na forma de selenocisteína, localizados no sítio ativo da enzima. Esta enzima possui a capacidade de detoxificar o peróxido de hidrogênio, os hidroperóxidos lipídicos e o peroxinitrito. Em particular, a GPx acelera a oxidação da glutathiona (GSH) pelo peróxido de hidrogênio, que é então reduzido a água, além de converter a GSH em glutathiona oxidada (GSSG) (WASSMANN *et al.*, 2004). A família das enzimas GPx possui várias isoformas e estão presentes no citoplasma em concentrações milimolar e também presentes na matrix mitocondrial. A maioria dos tecidos animais contém ambas as atividades CAT e GPx (LIMÓN-PACHECO;

GONSEBATT, 2009; LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Glutathione Redutase (GR)

A GR é uma enzima envolvida no metabolismo da glutathione, um importante antioxidante intracelular. Esta enzima é responsável pela manutenção dos níveis de glutathione, pois catalisa a redução da glutathione oxidada (GSSG) para sua forma reduzida (GSH), na presença de NADPH (SENTURK; KUFREVIOGLU; CIFTCI, 2009).

Estas enzimas atuam em colaboração direta nos sistemas *in vivo*. A atividade da SOD que dismuta o ânion superóxido, leva a formação de peróxido de hidrogênio, que é então detoxificado pela ação tanto da catalase quanto da GPx, ou ambas, dependendo do compartimento celular. A GPx na reação de decomposição do H_2O_2 consome GSH que é então convertido a GSSG (forma oxidada) e por último, a enzima GR regenera a forma oxidada e mantém os níveis de GSH.

No diabetes, o comportamento das enzimas antioxidantes frente ao estresse oxidativo ainda é bem controverso. Muitos estudos têm observado que a atividade das enzimas antioxidantes pode estar elevada, reduzida ou não se altera, e depende, ainda, do tecido avaliado. O DM está relacionado com aumento na formação das espécies reativas e alteração do potencial antioxidante, que leva a redução na atividade das enzimas SOD, CAT, GPx e GR, além de alterar o metabolismo da glutathione, um tampão antioxidante importante para a célula (GANDHI; IGNACIMUTHU; PAULRAJ, 2011; MENG *et al.*, 2011; SHANMUGAM *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2011).

Estudos têm mostrado que as espécies reativas, como o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, podem diminuir a atividade

dessas enzimas. A atividade reduzida da SOD em ratos diabéticos pode ser resultante da inativação do peróxido de hidrogênio ou pela glicação enzimática, onde o resíduo de lisina no sítio ativo da SOD pode se alterar pela reação de glicosilação não enzimática na presença de hiperglicemia e reduzir a atividade da enzima (MARIN *et al.*, 2011; BAGRI *et al.*, 2009).

A diminuição na atividade da CAT e GPx pode ser tanto por inativação pelo radical superóxido como por glicação. A CAT está envolvida na detoxificação de altas concentrações de peróxido de hidrogênio, enquanto que a GPx é sensível a baixas concentrações do substrato (MENG *et al.*, 2011; RAJASEKARAN *et al.*, 2005).

A depleção no mecanismo de defesa antioxidante no diabetes, com alterações na atividade das enzimas antioxidantes e nos parâmetros de estresse oxidativo contribuem para o número cada vez maior de estudos sobre o efeito de substâncias com propriedades antioxidantes, uma vez que as defesas antioxidantes endógenas não são suficientes para manter os níveis normais de espécies reativas no diabetes. Nesse contexto, os estudos com os compostos fenólicos ganham cada vez mais importância (SHANMUGAM *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2011).

Estudos publicados pelos autores Yeh e Yen (2006^{a,b}) e Yeh, Ching e Yen (2009) sustentam a hipótese de que os compostos fenólicos, especialmente os ácidos fenólicos: gentísico, gálico, ferúlico e *p*-cumárico, induzem a atividade e a expressão das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) e das enzimas de fase II, as fenol sulfotransferases em fígado de ratos, desenvolvendo papel importante contra os efeitos adversos relacionados com mutagenicidade e dano oxidativo.

Aumento na atividade das enzimas tanto no diabetes como em outras doenças crônicas, nas quais há o envolvimento do estresse oxidativo, pode estar relacionado ao mecanismo de adaptação celular associado ao fator de transcrição Nrf2.

Em condições fisiológicas, a atividade transcricional do Nrf2 é inibida pela proteína repressora Keap1 localizada no citoplasma das células. A proteína Keap1 contém resíduos de cisteína, os quais desempenham papel crítico na manutenção do fator de transcrição Nrf2 no citoplasma. Entretanto, aumento na produção das espécies reativas de oxigênio promove a dissociação desse complexo no citoplasma e o fator de transcrição Nrf2 é translocado para o núcleo. No núcleo, o fator de transcrição Nrf2 se liga ao elemento de resposta a antioxidante (ARE) na região

promotora dos genes que codificam enzimas antioxidantes e de fase II. A ativação do Nrf2-ARE induz a transcrição dos genes envolvidos no metabolismo da glutathione, como glutamato cisteína ligase (subunidade catalítica e regulatória), glutathione S-transferase, superóxido dismutase, tioredoxina redutase, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH):quinona oxidoreduases (NQOs) e hemoxigenases (HO-1). Uma vez restabelecido o balanço *redox* celular, o fator de transcrição Nrf2 é dissociado do núcleo pelo Keap1 e subsequentemente translocado para o citoplasma, onde é direcionado para o sistema ubiquitina proteassomo, e então degradado (CHENG; SLOW; MANN, 2011; NEGI *et al.*, 2011; JOHNSON *et al.*, 2008).

1.1.2. Inflamação aguda

A inflamação é uma reação complexa envolvendo componentes celulares e moleculares. É uma resposta inespecífica a uma agressão específica. O agente responsável pela agressão pode ser de natureza química, física ou biológica (ZHOU *et al.*, 2007). A inflamação é essencial para a manutenção da saúde dos indivíduos, pois é a maneira pela qual o organismo reage contra agentes potencialmente danosos como bactérias, vírus e outros patógenos; e apresenta como principais componentes: vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, ativação, adesão e transmigração celular (MEOTTI, 2006).

A resposta inflamatória é caracterizada por quatro sinais cardinais: dor, rubor, calor e tumor. Esses efeitos são estabelecidos por eicosanóides clássicos, como as prostaglandinas e leucotrienos, que exercem importantes funções como mediadores locais e exercem expansivas ações em resposta de interesse na inflamação (LIMA, A. B., 2008).

Os mediadores da inflamação, portanto, são substâncias formadas e liberadas, concomitante ou sequencialmente, no local da lesão. A origem destes mediadores pode ser plasmática (fatores do complemento e bradicinina) ou celular (histamina, serotonina, prostaglandinas, fator ativador plaquetário, leucotrienos, citocinas, entre outros). Os mediadores estão envolvidos na gênese e manutenção dos eventos característicos da reação inflamatória e se ligam a receptores específicos nas células-alvos, podendo, inclusive, estimular a liberação de outros mediadores (ZHOU *et al.*, 2007).

Dentre outras ações, as citocinas pró-inflamatórias induzem a expressão de genes que codificam as enzimas envolvidas no processo inflamatório, como a cicloxigenase (COX) e a lipoxigenase (LOX) (MEOTTI, 2006).

1.1.2.1. Cicloxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX)

A COX e a LOX são enzimas envolvidas na síntese de eicosanóides do ácido araquidônico (Figura 5). A oxigenação enzimática do ácido araquidônico ocorre preferencialmente nos carbonos 5, 12 ou 15, sendo catalizados pelas enzimas 5, 12 ou 15 lipoxidases formando seus respectivos hidroperóxidos. Estes hidroperóxidos podem ser metabolizados a leucotrienos, lipoxinas e hepoxinas. Outro caminho metabólico é a transformação do ácido araquidônico em prostaglandinas catalizadas, desta vez, pela endoperóxido sintase. Esta enzima é biofuncional e geralmente, na reação da COX, inserem-se duas moléculas de oxigênio dentro da molécula do ácido araquidônico para formar a prostaglandina G₂ (PGG₂). Assim, o oxigênio molecular é requisitado como substrato em ambas as enzimas da oxigenação do ácido araquidônico, a LOX e a COX (MOREIRA, 2003).

Figura 5. Síntese de eicosanóides a partir do ácido araquidônico.

A enzima 5-lipoxigenase (5-LOX) é uma enzima limitante na produção de leucotrienos a partir da cascata do ácido araquidônico. Os leucotrienos fazem parte

de uma classe de eicosanóides que exercem efeitos pró-inflamatórios. Eles promovem o acúmulo de leucócitos para o sítio de inflamação por interagirem com seus receptores e assim, estão envolvidos em uma variedade de condições inflamatórias. Na via de metabolização do ácido araquidônico, a enzima 5-lipoxigenase catalisa a conversão do ácido araquidônico ao ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico, e subsequentemente, a formação de um leucotrieno intermediário, o leucotrieno A₄ (LTA₄), com a participação da enzima FLAP (5-LOX *activating protein*), enzima responsável pela ativação da 5-LOX. O LTA₄ é em seguida metabolizado a leucotrieno B₄ (LTB₄) ou a leucotrienos cisteinil. A 5-LOX é expressa em neutrófilos, monócitos, macrófagos e células dendríticas. Os LTB₄ são potentes mediadores inflamatórios, e substâncias que inibem esta enzima são consideradas, portanto, alvos terapêuticos (CHARO; TAUB, 2011; KNODLER *et al.*, 2008).

A inibição da biossíntese de leucotrienos tem sido estudada como estratégia de novas terapias para as doenças inflamatórias. Muitos compostos que inibem a LOX têm sido identificados. Estes compostos podem ser agrupados em quatro classes principais: inibidor *redox*, quelante de ferro, inibidor competitivo ou inibidor da enzima FLAP. As LOX são enzimas sensíveis aos antioxidantes, uma vez que estes compostos inibem a formação de hidroperóxido lipídico por atuarem na eliminação dos radicais lipídicos formados durante a peroxidação enzimática. Isto pode limitar a disponibilidade de substrato necessário para o ciclo catalítico das lipoxigenases (RACKOVA *et al.*, 2007; YOUNG, 1999).

Um avanço importante na terapêutica anti-inflamatória foi a descoberta de duas isoformas da COX (também denominadas prostaglandinas sintetases): COX 1 e COX 2. A COX 1 apresenta 17 aminoácidos na porção aminoterminal, enquanto que a COX2 apresenta 18 aminoácidos na porção carboxi-terminal. Embora tenham estruturas proteicas semelhantes, essas enzimas são codificadas por genes diferentes. A COX 1 e a COX 2 têm aproximadamente 60% de homologia genética, e seus genes estão localizados nos cromossomos 9 e 1, respectivamente. As COX 1 e 2 possuem pequenas diferenças, no entanto, lhes confere funções distintas (BENGMARK, 2006).

A COX 1 está presente em quase todos os tecidos (vasos sanguíneos, plaquetas, estômago, intestino, rins) e é, por isso, denominada de enzima constitutiva. A produção de prostaglandinas por essa enzima resulta em efeitos

fisiológicos, como proteção gástrica, agregação plaquetária, homeostase vascular e manutenção do fluxo sanguíneo renal. Em contraste, a COX 2 está presente nos locais de inflamação, sendo, por isso, denominada de enzima indutiva. Sendo, portanto, expressa primariamente em células envolvidas no processo inflamatório, como macrófagos, monócitos e sinoviócitos. Entretanto, sabe-se que essa enzima também se encontra em outros tecidos e órgãos, como rins, cérebro, ovário, útero, cartilagem, ossos e endotélio vascular (HILÁRIO; TERRERI; LEN, 2006).

A COX 2 é induzida pelas citocinas IL-1, IL-2 e fator de necrose tumoral (TNF- α) e por outros mediadores presentes nos sítios de inflamação (como fatores de crescimento e endotoxinas). Provavelmente, também é expressa no sistema nervoso central, e tem papel na mediação central da dor e da febre. Por outro lado, a expressão da COX 2 pode ser inibida por glicocorticóides, IL-4, IL-10 e IL-14. Mais recentemente, foi descrita uma terceira COX, chamada COX 3 (HILÁRIO; TERRERI; LEN, 2006).

Outra enzima que desempenha papel fundamental na inflamação é a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que também é ativada pelo fator de transcrição NF- κ B e atua em sinergismo com a COX-2, liberando o óxido nítrico (NO) e exacerbando a resposta inflamatória (BENGMARK, 2006).

A formação de prostaglandina pela COX é um dos fatores responsáveis pela sensação de dor. Além deste metabólito do ácido araquidônico, outros mediadores inflamatórios como a histamina, serotonina, cininas, citocinas, neuropeptídeos, aminoácidos excitatórios, prótons, neurotrofinas, ATP, NO, opióides, entre outros (GRIFFIS; COMPTON; DOERING, 2006; MacMAHON; CAFFERTY; MARCHAND, 2005) oriundos do sangue ou de células do tecido lesado, células adjacentes ou de células inflamatórias contribuem para a transmissão da nocicepção, bem como, para a inflamação e processo de recuperação (MEOTTI, 2006).

A grande preocupação na busca dos mecanismos que envolvem a inflamação é devido ao seu envolvimento nas doenças crônicas, incluindo diabetes, câncer, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e reumáticas (GARCIA, 2005; MacMAHON; CAFFERTY; MARCHAND, 2005).

1.1.2.2. Modelos de inflamação aguda

Os modelos clássicos para investigar o efeito anti-inflamatório de compostos incluem, entre outros, o modelo de edema de pata e de bolsa de ar (*air pouch*) induzidos por carragenina.

O edema de pata induzido por carragenina é um modelo amplamente utilizado de inflamação aguda para avaliação da atividade anti-inflamatória de diferentes compostos. No edema de pata, a injeção de carragenina leva a uma resposta inflamatória bifásica, e estas fases podem ser caracterizadas em precoce e tardia. A fase precoce observada ao redor de 1 h após a injeção de carragenina está relacionada com a liberação de histamina, serotonina, bradicinina, e em menor concentração, há liberação de prostaglandinas. Enquanto que a fase tardia (após 2 h) é atribuída à infiltração de leucócitos polimorfonucleares (PMN) e a continuação da liberação de prostaglandinas. A liberação de leucócitos polimorfonucleares é estimulada por espécies reativas de oxigênio (EROs) e radicais livres, óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF- α e interleucina-1 β (IL-1 β), ambos também estão envolvidos na fase tardia da inflamação induzida por carragenina (CHOUHAN; SINGH, 2011; DUSSOSSOY *et al.*, 2011; SADEGHI *et al.*, 2011).

A bolsa de ar subcutânea é um modelo *in vivo* utilizado para estudar a inflamação aguda e crônica. Descrito pela primeira vez em 1953 por Selye, a bolsa de ar é formada pela injeção subcutânea de ar estéril na área intra-escapular da parte de trás do rato. O tecido da bolsa é composto por linhagens de células que consistem inicialmente de macrófagos e fibroblastos, semelhantes à cavidade sinovial. O modelo de bolsa de ar permite quantificar a resposta inflamatória a partir da avaliação do volume e composição do exsudato, pois nesta pode ser injetada uma variedade de substâncias irritantes para produzir a inflamação (DUARTE; VASKO; FEHRENBACHER, 2012).

A injeção de carragenina na bolsa de ar produz reação inflamatória não imunológica, caracterizada pela produção acentuada de mediadores inflamatórios, incluindo prostaglandinas, leucotrienos e citocinas, bem como influxo significativo de leucócitos, principalmente neutrófilos. Estes parâmetros podem ser quantificados e utilizados para determinar o grau de inflamação, a resolução da inflamação ou a atividade anti-inflamatória de drogas, bem como o estresse oxidativo envolvido na inflamação (DUARTE; VASKO; FEHRENBACHER, 2012; JAIN; PARMAR, 2011).

1.1.3. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são compostos fitoquímicos que estruturalmente possuem um anel aromático com uma ou mais hidroxila e, frequentemente, apresentam propriedades antioxidantes. Na natureza, os compostos fenólicos estão sob forma livre ou ligados a açúcares e proteínas, compondo dois grandes grupos: o primeiro constituído pelos ácidos fenólicos e flavonoides, e o segundo pelas cumarinas (SOARES, 2002). Os compostos fenólicos são derivados de uma via de biossíntese comum, incorporando precursores tanto da via do ácido chiquímico quanto da via do acetato-malonato (VATTEM; SHETTY, 2005).

Os ácidos fenólicos são algumas das substâncias que constituem o grupo dos compostos fenólicos. Caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes tanto para os alimentos como para o organismo. Os ácidos fenólicos são divididos em dois grupos. O primeiro é composto pelos ácidos hidroxibenzóicos, os quais possuem sete átomos de carbono (C6-C1) e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza; suas fórmulas gerais e denominações estão representadas na Figura 6. O segundo grupo de ácidos fenólicos é formado pelos ácidos hidroxicinâmicos que possuem nove átomos de carbono (C6-C3), sendo sete os mais comumente encontrados no reino vegetal (Figura 6) (FERNANDES, 2010; SOARES, 2002).

Figura 6. Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos.

Os flavonoides possuem uma estrutura básica formada por C6-C3-C6, sendo os compostos mais diversificados do reino vegetal. Neste grupo encontram-se as antocianidinas, flavonas, flavonóis, flavanóis e isoflavonas, dependendo do lugar, número e combinação dos grupamentos participantes da molécula. Os principais tipos de flavonoides estão apresentados na Figura 7 (SOARES, 2002).

Figura 7. Estrutura básica e os principais tipos de flavonoides.

Inúmeros compostos fenólicos são encontrados em vegetais, principalmente ervas, especiarias e frutas. As algas também são fontes importantes destes compostos e vem sendo bastante estudadas (NOVOA *et al.*, 2011; VIDAL *et al.*, 2009; VIDAL *et al.*, 2006). Essas substâncias influenciam a qualidade e a estabilidade de alimentos por agirem como *flavours*, corantes e antioxidantes (FERNANDES, 2010).

Os compostos fenólicos exibem grande diversidade de efeitos biológicos e podem ser divididos em duas categorias. A primeira está associada com a relação estrutura-atividade, devido à presença do anel fenólico e hidroxilas, atuando como antioxidantes efetivos no sequestro de radicais livres e na inibição da oxidação em cascata e, dessa forma, inibindo reações oxidativas desses radicais com moléculas

biológicas, como: lipídios, carboidratos, proteínas e DNA (VATTEM; SHETTY, 2005). O segundo e mais significativo mecanismo de ação é em consequência de sua capacidade em modular a fisiologia celular, tanto em níveis moleculares quanto bioquímicos/fisiológicos. Devido a sua estrutura ser similar a inúmeras moléculas biológicas sinalizadoras e efetoras, é que os compostos fenólicos são capazes de participar nos processos de repressão/indução da expressão gênica ou na ativação/desativação de proteínas, enzimas e fatores de transcrição de vias metabólicas (YEH; CHING; YEN, 2009; YEH e YEN, 2006^{a,b}).

Alguns desses mecanismos de sinalização celular foram demonstrados por Soobrattee *et al.* (2005), os quais incluem a regulação de enzimas antioxidantes desintoxicantes de fase II, supressão de enzimas pró-inflamatórias (COX-2 e iNOS) e, por fim, ativação e/ou aumento na atividade e/ou expressão das enzimas antioxidantes: SOD, CAT, GPx (BATISTA-GONZALEZ *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2011; MANCINI-FILHO *et al.*, 2009), bem como modulando resposta de genes envolvidos no ciclo celular e na carcinogênese.

Estudos *in vitro* e em animais sugerem que os flavonoides modulam importantes mecanismos celulares e moleculares relacionados com a carcinogênese, um processo com múltiplas etapas envolvendo a transformação, sobrevivência, invasão, angiogênese e metastase de células tumorais (CLERE *et al.*, 2011).

Pesquisas vêm sendo direcionadas para avaliar o efeito dos compostos fenólicos na resposta inflamatória. Um dos efeitos verificados neste processo é sustentado pelo trabalho desenvolvido no Laboratório de Lípidos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da FCF/USP que verificou a inibição significativa da LOX e COX *in vitro* por extratos ricos em compostos fenólicos extraídos das especiarias mostarda, canela e erva doce (MOREIRA, 2003). A Figura 8 mostra os pontos potenciais (—) dos polifenóis na cascata inflamatória. Os polifenóis podem atuar inibindo as enzimas ciclooxigenases (COX) e lipoxigenase (LOX), bem como a via de sinalização do fator de transcrição NF-κB pelo TNF-α que envolve a participação das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (BASTOS; ROGERO; AREAS, 2009; SANTANGELO *et al.*, 2007).

Figura 8. Pontos potenciais da participação dos polifenóis na cascata inflamatória. Legenda: IκB, inibidor κB; Ub, ubiquitina; IKK, IκB-quinase; ERK, quinases relacionadas com sinalização extracelular; JNK, quinases c-Jun amino-terminais; p38 (ou p38-MAPK), proteína quinase ativadora de mitógeno; MEK (ou MKK), quinase MAPK; MAPKKK, quinase quinase MAPK; IL-8, interleucina-8; IFNγ, interferon-γ; TNF-α, fator de necrose tumoral-α; IL-1β, interleucina-1β; IL-6, interleucina-6; iNOS, óxido nítrico sintase induzível; LOX, lipoxigenase; COX, cicloxigenase; AA, ácido araquidônico; PLA2, fosfolipase A2.

1.1.4. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)

Os condimentos são mundialmente utilizados para aumentar e/ou acrescentar sabor ao alimento, e, secundariamente, com finalidade de conservação, devido às suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes. Os condimentos, por exemplo, da família Lamiaceae, têm sido extensivamente estudados devido ao caráter antioxidante de seus compostos fenólicos, porém apenas o alecrim tem sido mais amplamente utilizado em produtos alimentícios (MORAIS *et al.*, 2009).

As especiarias podem ser adicionadas a alimentos em duas formas: como temperos ou como isolados a partir de seus extratos. O procedimento de extração é determinado pelos tipos de compostos antioxidantes a ser extraído. A seleção de um procedimento de extração adequado pode aumentar a concentração de compostos

antioxidantes no material extraído. Para os compostos fenólicos e outros antioxidantes em espécies vegetais três principais técnicas de extração podem ser usadas: extração por solventes, extração em fase sólida ou extração supercrítica. Além disso, a extração também pode ser realizada em um aparelho de *Soxhlet*, combinando assim as técnicas de percolação e imersão. Várias técnicas de extração são descritas utilizando solventes com diferentes polaridades, tais como éter de petróleo, tolueno, acetona, etanol, metanol, acetato de etila e água (SUHAJ, 2006).

A espécie *Rosmarinus officinalis* L., conhecida popularmente como alecrim, é originária da Região Mediterrânea e cultivada em quase todos os países de clima temperado de Portugal à Austrália. Suas folhas são lineares e de aroma forte e muito agradável (Figura 9) (LORENZI; MATOS, 2006). Pertence à família Labiatae e nos últimos anos tem sido bastante utilizado na indústria de alimentos e muito apreciado por suas propriedades aromáticas, antioxidante, conservante e antimicrobiana (TRINDADE *et al.*, 2009; AFONSO *et al.*, 2008; AFONSO; SANT'ANA, 2008; ALMELA *et al.*, 2006). Nos dias atuais, tem sido atribuído ao alecrim propriedades antimutagênica, antiviral, antibacteriana, anti-inflamatória, antidiabética e hipolipemiante (PESHEV *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2011; AFONSO, 2010).

Figura 9. Folhas de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.).

A composição química do alecrim é constituída por óleo essencial (10 a 25 ml/kg de folha desidratada), cujos constituintes principais são o alcanfor, 1-8 cineol, α -pineno, borneol e canfeno em proporções variáveis dependendo da origem

e do estado vegetativo. Os compostos fenólicos se encontram representados por flavonoides e por ácidos fenólicos, sobretudo derivados do ácido caféico: ácidos clorogênico e rosmarínico, além do ácido ferúlico. O alecrim caracteriza-se também pela presença de diterpenos tricíclicos. O ácido carnósico é o diterpeno majoritário presente nas folhas de alecrim e em menor quantidade aparece o carnosol, ácido 12-metoxicarnósico, 7-metoxirosmanol, 7-metoxi-epirosmanol e o rosmanol (RICHEIMER *et al.*, 1996). Os triterpenos, como o ácido ursólico e oleanólico também estão presentes. Além das substâncias citadas acima, foram encontradas outras as quais se apresentam em quantidades relativamente menores, mas não menos importantes, são elas: os taninos, as saponinas e os alcaloides (Figura 10) (BRUNETON, 2001; HARAGUCHI *et al.*, 1995).

Figura 10. Principais compostos presentes no alecrim: diterpenos fenólicos, ácidos fenólicos e os flavonoides.

Muitos estudos têm apontado a variabilidade do alecrim em termos de composição, rendimento e atividades antimicrobiana e antioxidante. Estas variações foram em sua maioria correlacionada com fatores intrínsecos (genética, idade da planta e subespécies) ou fatores extrínsecos, tais como condições climáticas e de

cultivo (origem geográfica) ou os métodos de identificação e quantificação (MEZIANE-ASSAMI *et al.*, 2012; ZAOUALI *et al.*, 2010; CELIKTAS *et al.*, 2007).

O teor de compostos fenólicos varia dependendo das condições do ambiente, como água e altas temperaturas, as quais podem reduzir a fixação do CO₂ no solo. Sob essas condições, o conteúdo de antioxidantes no vegetal aumenta oferecendo proteção contra a oxidação causada pelo oxigênio *singlet* e radicais peróxil e superóxido. Isto mostra a participação dos fatores extrínsecos na variabilidade do conteúdo de compostos fenólicos (ALMELA *et al.*, 2006).

Para avaliar a influência destes fatores, Luis, Pérez e González (2007) submeteram o alecrim a duas diferentes dosagens de radiação UV-B (5,4 e 31 kJ m⁻² d⁻¹) por duas semanas e avaliaram as concentrações dos ácidos vanílico, caféico, rosmarínico e carnósico, além das concentrações de naringinina, hispidulina, cirsimaritina e carnosol. A radiação UV-B aumentou significativamente as concentrações dos ácidos rosmarínico e carnósico, e de outros componentes tais como naringinina e carnosol. No entanto, este aumento não foi suficiente para aumentar a atividade de varredura do radical DPPH quando comparados ao controle, plantas que receberam apenas 0.001 kJ m⁻² d⁻¹ de radiação.

Outro exemplo das condições de cultivo influenciando no conteúdo de compostos fenólicos do alecrim foi investigado por Tounekti *et al.* (2011). Eles avaliaram o efeito do uso dos sais KCl, CaCl₂, MgCl₂, e FeCl₃ associado ao NaCl na composição de monoterpenos, diterpenos fenólicos e óleo essencial no alecrim. A adição de NaCl com concentrações reduzidas de K⁺, Ca²⁺, e Mg²⁺ alterou significativamente os metabólitos secundários do alecrim. O CaCl₂ promoveu o aumento de ácido carnósico, enquanto que o KCl reduziu as concentrações de carnosol. A aplicação de sais e as interações iônicas no cultivo do alecrim devem ser cuidadosamente consideradas.

Muitas ervas e especiarias utilizadas como ingredientes ou temperos são excelentes fontes de compostos fenólicos e foram reportadas por mostrar elevada atividade antioxidante (SILVA *et al.*, 2011; AFONSO, 2010).

De acordo com Pérez-Fons *et al.* (2006), a natureza lipofílica dos diterpenos derivados do alecrim permite sua ação antioxidante em membranas biológicas, impedindo a difusão de espécies reativas pela mesma. A atividade antioxidante pelo sistema lipídico Rancimat do principal diterpeno do alecrim, o ácido

carnósico, é comparado aos antioxidantes sintéticos BHT, BHA e TBHQ (RICHEIMER *et al.*, 1996).

A atividade antioxidante e o uso dos extratos de alecrim não podem ser atribuídos somente aos ácidos fenólicos e diterpenos fenólicos, mas também aos flavonoides, aumentando desta forma, as propriedades terapêuticas dessa especiaria. No entanto, poucos estudos têm sido realizados com o objetivo de identificar e quantificar a presença de flavonoides na espécie *Rosmarinus officinalis* (PROESTOS *et al.*, 2005; DEL BANO *et al.*, 2004). Dentre os flavonoides identificados estão: eriocitrina, luteolina 3'-O- β -D-glucoronide, hesperidina, diosmina, isoscutelareína 7-O-glicosídeo, hispidulina 7-O-glucosídeo e genkwanina, que estão apresentados a seguir (Figura 11). Já foram identificados os flavonoides naringinina, apigenina e cirsimaritina (LUIS; PÉREZ; GONZÁLEZ, 2007).

Figura 11. Estrutura química dos flavonoides encontrados no alecrim. Legenda: eriocitrina (1), luteolina 3'-O- β -D-glucoronídeo (2), hesperidina (3), diosmina (4), isoscutelareína 7-O-glicosídeo (5), hispidulina 7-O-glucosídeo (6) e genkwanina (7). Rh: ramnose e Gl: glicose.

Recentemente, em pesquisas desenvolvidas no Laboratório de Lípidos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da FCF/USP, foi verificado que os extratos aquoso e alcoólico, bem como as frações de ácidos fenólicos de alecrim apresentam capacidade antioxidante significativa no sistema β -caroteno/ácido linoléico, varredura do radical DPPH e capacidade de absorbância do radical oxigênio (SILVA *et al.*, 2011; AFONSO, 2010; SILVA, 2008).

A presença significativa desses compostos também em outras especiarias levou o mesmo grupo a avaliar a atividade antioxidante de uma mistura de mostarda, canela e erva-doce sobre o metabolismo dos ácidos graxos das séries $\omega 3$ e $\omega 6$; sugerindo, portanto, a partir dos resultados obtidos, efeito antioxidante das substâncias fenólicas identificadas na mistura das especiarias (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004).

Sotelo-Félix *et al.* (2002), estudando o efeito do extrato de alecrim administrado na concentração de 200 mg/kg de peso corpóreo, por via intragástrica, correspondente a 6,04 mg/kg de carnosol, em ratos, durante cinco dias, observaram efeito hepatoprotetor contra a lesão aguda provocada por tetracloreto de carbono. Nesse modelo experimental de estresse, o alecrim atuou como antioxidante, eliminando os radicais triclorometilperoxil formados pela metabolização hepática do agente químico agressor, e aumentou a atividade do sistema de desintoxicação dependente da glutathione S-transferase (GST).

Considerando seu elevado conteúdo de fenólicos, o extrato aquoso de alecrim também apresentou efeito hepatoprotetor na toxicidade induzida por azatioprine em ratos, reduzindo as concentrações de malonaldeído provocado pelo estresse e diminuindo o efeito inibitório do azatioprine sobre a atividade das enzimas: SOD, CAT e GPx (AMIN; HAMZA, 2005).

Os compostos fenólicos presentes no alecrim podem aumentar a atividade de enzimas antioxidantes, bem como atuarem sobre o metabolismo do colesterol, atenuando os efeitos das DCNT. Recentemente foi verificado o efeito do extrato aquoso de alecrim na concentração de 50 mg/kg administrado por 30 dias em ratos diabéticos induzidos por STZ. O EA aumentou a atividade das enzimas antioxidantes (SOD e CAT) no fígado e reduziu o percentual de hemoglobina glicada (SILVA *et al.*, 2011). Além disso, o extrato aquoso também foi capaz de reduzir os níveis de colesterol total no sangue de ratos hipercolesterolêmicos (AFONSO, 2010).

Estes estudos serviram de suporte para investigar a seguinte hipótese: se o alecrim é uma fonte potencial de compostos fenólicos com propriedades biológicas relatadas na literatura, e atribuídas principalmente à capacidade antioxidante, seus compostos fenólicos poderão atuar não somente na inflamação aguda, como também nos marcadores de estresse oxidativo e de inflamação em ratos diabéticos, e assim apresentar importância significativa nas complicações crônicas do diabetes, as quais estão envolvidas com os processos inflamatórios e de estresse oxidativo.

Dentro desta perspectiva equacionamos esta hipótese desenvolvendo os objetivos elencados a seguir.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

- Avaliar o efeito dos compostos fenólicos do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) na inflamação aguda e sobre os marcadores de estresse oxidativo de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina

2.2 Específicos:

- Caracterizar, identificar e quantificar os principais grupos de substâncias presentes no alecrim;
- Avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* por mecanismos diferentes: atividade antiradical (DPPH e ORAC), capacidade redutora e inibição da cascata de lipoperoxidação (sistema β -caroteno/ácido linoléico);
- Analisar o efeito da fração de ácidos fenólicos livres (AFL), do extrato aquoso (EA) e da sua fração hidroalcoólica (FHA) sobre os marcadores de estresse oxidativo de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina;
- Avaliar a capacidade de inibição *in vitro* da enzima lipoxigenase (LOX) pelos compostos fenólicos do alecrim;
- Investigar o efeito anti-inflamatório do extrato aquoso do alecrim em modelos de inflamação aguda *in vivo*;
- Analisar o efeito do extrato aquoso (EA) e da sua fração hidroalcoólica (FHA) sobre citocinas inflamatórias de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina;
- Avaliar o efeito antioxidante do EA em cultura de hepatócito humanos (células HepG2) e investigar o possível mecanismo de ação antioxidante.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Amostras

As folhas desidratadas de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) foram adquiridas em estabelecimento comercial da cidade de São Paulo/SP. As folhas foram trituradas em moinho analítico (modelo IKA A11 basic, Wilmington, USA), passadas por tamis 32 *mesh* e mantidas em freezer a -20 °C até posteriores análises. As folhas de alecrim trituradas foram usadas para a obtenção do extrato aquoso e extração das frações de ácidos fenólicos.

3.2. Métodos

3.2.1. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos

- **Obtenção do extrato aquoso e das suas frações**

Para obtenção do extrato aquoso (EA) foram adicionados 100 mL de água destilada a 20 g de folhas de alecrim trituradas. A solução foi homogeneizada com auxílio de agitador magnético por 1 hora a temperatura ambiente (23 °C). A solução obtida foi centrifugada a 15.000 rpm por 10 minutos a 4 °C em centrífuga *Sorvall Instruments* (modelo RC5S, São Paulo, BRA), utilizando rotor SS34. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em filtro qualitativo e liofilizado.

Para obtenção das frações do extrato aquoso foram adicionados 100 mL de etanol absoluto a 10 g de extrato aquoso liofilizado. A solução foi homogeneizada com auxílio de agitador magnético por 30 minutos a temperatura ambiente (23 °C) e em seguida, foi filtrada em filtro qualitativo. O material filtrado foi evaporado e ressuspenso em 10 mL de etanol, denominado de fração etanólica (Fr Et). O resíduo no papel de filtro foi novamente extraído com 100 mL de uma solução hidroalcoólica 50% (etanol absoluto/água), passando pelo mesmo procedimento de extração citado anteriormente, obtendo-se a fração hidroalcoólica (Fr HA ou FHA), e o volume foi

ajustado com água para 40 mL. Foi considerada fração aquosa (Fr Aq) o resíduo final, sendo o volume ajustado com água para 40 mL.

- **Obtenção das frações de ácidos fenólicos presentes no alecrim**

Os ácidos fenólicos do alecrim foram obtidos de acordo com a metodologia de Krygier *et al.* (1982) que permitiu separar as frações de ácidos fenólicos livres, assim como os esterificados solúveis e insolúveis. Para obtenção da fração livre, 1 g de folhas de alecrim previamente desengordurado foi extraído 6 vezes em Ultra-Turrax (modelo DI 25 basic, IKA[®], Staufen, Alemanha) por 1 minuto com 20 mL de tetraidrofurano (THF), à temperatura ambiente, e protegido da luz (Figura 12). Os sobrenadantes obtidos foram combinados, desidratados com sulfato de sódio anidro e o solvente foi evaporado em evaporador rotativo (B525, Micronal, São Paulo, Brasil) a 30°C. O concentrado foi ressuspense em 5 mL de metanol e transferido para frasco âmbar. Esta fração foi denominada de fração rica em ácidos fenólicos livres (AFL).

O resíduo restante foi novamente extraído 6 vezes em Ultra-Turrax com uma solução de metanol:acetona:água (6:6:7), à temperatura ambiente; e os sobrenadantes foram filtrados e evaporados em evaporador rotativo sob vácuo a 30 °C até a fase aquosa. A suspensão aquosa e o resíduo foram hidrolisados com volume igual e 20 mL de NaOH 4 N, respectivamente, por 4 h sob fluxo de nitrogênio, à temperatura ambiente, e protegidos da luz. Posteriormente, o pH das soluções foi ajustado com HCl 6 N para pH 2,0. Após a acidificação, os sobrenadantes foram extraídos 5 vezes com hexano com a finalidade de remover ácidos graxos livres e outros contaminantes. Os ácidos fenólicos liberados da fração solúvel (fase aquosa) e insolúvel (resíduo) foram, então, re-extraídos separadamente 6 vezes com éter etílico:acetato de etila:THF (1:1:1). Ao final de cada extração, os sobrenadantes foram combinados, filtrados e desidratados com sulfato de sódio anidro, evaporados em evaporador rotativo sob vácuo a 30 °C e, em seguida, ressuspensos em 5 mL de metanol, as quais foram denominadas de frações ricas em ácidos fenólicos solúveis (AFS) e insolúveis (AFI).

Todas as frações permaneceram em *freezer* (-20 °C) até posteriores análises.

Figura 12. Fluxograma de obtenção das frações de ácidos fenólicos. Legenda: (AFL) ácidos fenólicos livres, (AFS) ácidos fenólicos solúveis, (AFI) ácidos fenólicos insolúveis, (THF) tetraidrofurano, (EE) éter etílico e (AE) acetato de etila.

A metodologia de extração das frações de ácidos fenólicos permitiu extrair grande quantidade de ácidos fenólicos que estavam presentes tanto na forma livre como ligados a glicosídeos, sendo liberados após procedimento de hidrólise alcalina, conforme procedimento de obtenção das frações AFS e AFI (Figura 12).

- **Determinação dos fenólicos totais**

A quantificação dos compostos fenólicos totais no extrato aquoso (EA) e nas frações foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Swain e Hills (1959) com algumas modificações.

O método é fundamentado na reação de oxidação-redução entre os compostos fenólicos e o reagente de *Folin-Ciocalteu*, resultando na formação do complexo de cor azul que absorve radiação a 720 nm. A desvantagem deste método é que pode superestimar o conteúdo em fenólicos totais, já que várias substâncias

como, o dióxido de enxofre, ácido ascórbico ou açúcares redutores, podem interferir na medição.

Foram tomados 0,5 mL da solução teste, adicionados 8 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente de *Folin-Ciocalteu*. Após 3 minutos, adicionou-se 1mL de solução saturada de carbonato de sódio (Na_2CO_3). As misturas foram mantidas em repouso, ao abrigo da luz, por uma hora em temperatura ambiente e então, a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro Genesys (modelo Spectronic 20, Rochester, USA) a 720 nm.

Os resultados para o extrato aquoso (EA) e suas frações (Fr Et, Fr HA e Fr Aq) foram expressos em equivalentes de catequina, determinados por uma curva (7,25 a 145 μg), enquanto que os resultados para as frações de ácidos fenólicos (AFL, AFS e AFI) foram expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG), determinados por uma curva padrão (2,5 a 100 μg).

- **Determinação dos flavonoides totais**

Os flavonoides totais presentes no EA e suas frações foram determinados pelo método de Jia, Tang e Wu (1999), com algumas modificações, usando o método do tricloreto de alumínio (AlCl_3), onde foi medido espectrofotometricamente o produto rosa avermelhado a 510 nm.

Uma alíquota (0,5 mL) da solução teste foi misturada com água destilada (2 mL) e, posteriormente, com solução de NaNO_2 (5%, 0,15 mL). Após 6 minutos, adicionou-se a solução de AlCl_3 (10%, 0,15 mL) e foi mantido em repouso por mais 6 minutos. Adicionou-se a solução de NaOH (4%, 2 mL) e água destilada (0,2 mL) até completar o volume final de 5 mL. Em seguida, a solução foi mantida em repouso durante 15 minutos. A intensidade da cor rosa foi medida a 510 nm. (+) Catequina foi utilizada para calcular a curva padrão (7,25 a 145 μg) e os resultados foram expressos em equivalentes de (+)-catequina.

- **Identificação dos compostos fenólicos do EA e das suas frações**

Para a análise dos componentes presentes no EA e nas suas frações, utilizou-se equipamento Shimadzu® com bombas LC-20A, loop de 20 μL , detector PDA (*Photodiode Array*), fluxo de 1 mL/min e coluna Shimadzu® C18 Shim-pack VP-

ODS de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm. Inicialmente foi feita uma corrida em gradiente de 65 min, 0 - 5 min: 5% B e 5 - 65 min: 100% B (acetonitrila grau HPLC Tedia®) em água Milli-Q® com ácido trifluoroacético (Merck®) a 0,1%, para avaliar a polaridade dos principais compostos. Em seguida, foram adicionadas concentrações conhecidas dos padrões comerciais: ácido gálico, protocatequico, caféico, *p*-cumárico, ferúlico, rosmarínico e carnósico (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA). Os picos encontrados nas amostras foram identificados comparando os tempos de retenção dos padrões injetados separadamente.

- **Perfil cromatográfico dos compostos fenólicos por CCD**

Foi realizada cromatografia em camada delgada para delineamento do perfil cromatográfico e indicação dos flavonoides presentes no extrato aquoso (EA) e nas frações obtidas a partir dele (Fr Et, Fr HA e Fr Aq).

Pela detecção em UV a 365 nm, os flavonoides, dependendo da sua estrutura, apresentam fluorescência amarelo escuro, verde ou azul, que são intensificados e alterados pelo uso de reagentes. Extratos e frações contendo flavonoides freqüentemente contêm ácidos carboxílicos fenólicos (ácidos caféico e clorogênico) e cumarinas, que formam zonas de fluorescência azul (WAGNER; BLADT, 1996).

As melhores resoluções foram obtidas com o sistema a seguir:

Flavonoides

Tamanho das placas de vidro: 20 x 20 cm

Suporte: Sílica Gel 60 (Merck)

Saturação da cuba: total

Percurso: distância - 12 cm

Sentido - ascendente

Fase móvel: Acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético glacial e água (100:11:11:26).

Reveladores: difenilboriloxietilamina a 1% em metanol (NP)

Visualização: UV a 365 nm.

- **Identificação e quantificação dos ácidos carnósico e rosmarínico nas frações de ácidos fenólicos livres, solúveis e insolúveis**

Os ácidos carnósico e rosmarínico foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), empregando-se a metodologia descrita por Almela *et al.* (2006), com algumas modificações. Para tanto, um sistema de gradiente binário constituído de 0,2% de ácido metafosfórico (solvente A – padrão analítico – Carlo Erba, Rodano, ITA) e acetonitrila (solvente B – padrão cromatográfico – Merck, São Paulo, BRA) foi utilizado para eluição, sendo 0 minuto 80% de A, 10 minutos 80% de A, 20 minutos 60% de A, 30 minutos 0% de A e 40 minutos 0% de A. O espectro dos picos foi analisado tanto em 230 nm quanto 330 nm para identificação dos ácidos carnósico e rosmarínico, respectivamente. Os picos encontrados nas amostras foram identificados comparando os tempos de retenção dos padrões injetados separadamente. Em seguida, foram adicionadas concentrações conhecidas dos respectivos padrões comerciais (Sigma Aldrich, C0609 e 536954, Saint Louis, USA) às amostras para confirmação dos picos analisados. As análises foram feitas a temperatura ambiente em coluna analítica de fase reversa Luna C18 (Phenomenex, Torrance, USA), nas dimensões 250 x 4,3 x 10 µm, com fluxo de 1mL/minuto em sistema constituído de duas bombas Constametric SP (modelos 3500 e 3200, Fremont, USA), injetor Rheodyne (modelo 7125, Cotati, USA), com *loop* de 20 µL e detector LabAlliance (modelo 525, State College, USA).

3.2.2. Atividade antioxidante *in vitro*

Várias abordagens são usadas para testar os antioxidantes em alimentos e sistemas biológicos. Alguns consistem de oxidação de um substrato lipídico e outros são realizados na presença de radicais. No primeiro caso é investigado o mecanismo pelo qual o antioxidante inibe a oxidação do sistema, enquanto outros métodos avaliam a capacidade do antioxidante em interceptar os radicais livres. Isto justifica o emprego de várias metodologias a fim de medir diferentes características do antioxidante (ERKAN; AYRANCI; AYRANCI, 2008; LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007).

Foram aplicados quatro ensaios para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato aquoso e das frações. As análises foram realizadas em triplicata e expressas em µg de peso seco de extrato ou fração.

- **Atividade antioxidante em sistema de varredura do radical 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH[•])**

A atividade antioxidante do extrato aquoso e das frações foi avaliada pelo ensaio do radical DPPH[•] segundo Blois (1958) e Brand-Willians, Cuvelier e Brest (1995), que tem como princípio a redução do radical DPPH[•].

O radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) é um radical estável, que está disponível comercialmente e tem cor roxa. O DPPH, que absorve a 517 nm é, em parte, neutralizado pelos compostos antioxidantes, resultando na diminuição da absorbância do sistema reacional ao referido comprimento de onda. Quando uma solução de DPPH (X) é misturada com uma substância que pode ceder um átomo de hidrogénio (AH), ocorre a seguinte reação que explica a perda da cor (FERNANDES, 2010; GUIMARÃES *et al.*, 2010; LUE *et al.*, 2010).

Uma alíquota de 0,5 mL de amostra, em diferentes concentrações, foi adicionada a 1,5 mL de solução metanólica de DPPH[•] a 6×10^{-5} mol/L. As determinações foram acompanhadas de um controle sem antioxidante, contendo 0,5 mL de metanol. A redução do radical DPPH[•] foi medida a 517 nm em espectrofotômetro Genesys (modelo Spectronic 20, Rochester, USA) logo após 30 minutos de repouso. O decréscimo nos valores de densidade ótica das amostras foi correlacionado com o do controle e estabelecido o percentual de varredura do radical DPPH[•], expressa pela equação:

$$\% \text{ de varredura} = 100 - [(Abs_{amostra} \times 100) / Abs_{controle}]$$

Os resultados foram expressos em IC₅₀, que corresponde à quantidade de amostra necessária para neutralizar 50% da solução de DPPH.

- **Atividade antioxidante pelo método ORAC**

As amostras foram avaliadas pelo método ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity assay*) que determina por fluorescência o potencial antioxidante de um composto. Este método consiste na análise da atividade antioxidante de uma amostra ou padrão na presença da fluoresceína e de um gerador de radical livre – o AAPH [*2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride*]. A capacidade antioxidante da amostra é medida a partir da intensidade da fluoresceína que na presença de compostos antioxidantes, tem sua fluorescência mantida (CAO; ALESSIO; CULTER, 1993). O ensaio do ORAC utiliza um radical peroxil derivado do AAPH, que mimetiza o radical peroxil lipídico envolvido na reação em cadeia da peroxidação lipídica *in vivo*. Este ensaio monitora a inibição da oxidação induzida pelo radical peroxil do probe fluorescente, a fluoresceína, pelos antioxidantes (TSAI *et al.*, 2012).

Este método baseia-se na capacidade de varredura de radicais livres e, portanto, vem sendo bastante utilizado nos estudos de atividade antioxidante, inclusive para ervas e especiarias. Este ensaio é considerado o método de escolha para assegurar a capacidade antioxidante de compostos presentes nos alimentos. O ORAC é também amplamente usado para avaliar a capacidade antioxidante do plasma após consumo de alimentos vegetais (NINFALI *et al.*, 2009; PRIOR *et al.*, 2007).

Para a realização do ensaio foi adicionado em cada poço da placa (Fisher Scientific, Hanover Park, IL) 25 µL de padrão (Trolox® 100 µM) ou amostra, em concentrações diferentes, e 150 µL de fluoresceína 40 nM, incubados a 37°C, por 30 minutos. Em seguida, colocou-se 25 µL de AAPH (153 mM) nos poços controles, que continha apenas tampão fosfato 75 mM pH 7,0; no padrão e nas amostras. Após a adição do AAPH, foi agitado por 10 segundos e realizada a leitura a cada 1 minuto, por 1 hora em um Leitor de Placas (Multi - Detection microplate reader Synergy – BIOTEK), excitação em 493 nm (filtro 485/20) e emissão em 515 nm (filtro 528/20).

O valor final foi calculado através da equação de regressão entre a concentração de Trolox® e a área sob a curva de decaimento de fluorescência (AUC), cujo resultado foi expresso em mmols de equivalentes de Trolox®/g da amostra. A interpretação dos resultados foi feita conforme a intensidade da

fluorescência, ou seja, quanto maior foi o tempo de decaimento da fluoresceína pela presença da amostra, maior foi a capacidade antioxidante da mesma.

- **Capacidade redutora**

A capacidade redutora das amostras foi avaliada de acordo com Oyaizu *et al.* (1986) com pequenas modificações.

Neste ensaio, foi medida a transformação do Fe^{3+} a Fe^{2+} . Os antioxidantes presentes causam a redução do Fe^{3+} /complexo ferricianeto ($\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) à forma ferrosa (Fe^{2+}) (GUIMARÃES *et al.*, 2010). Assim, em função da capacidade redutora das amostras, a coloração amarela da solução sofre alteração entre os tons de verde ou azul, o que pode ser medido espectrofotometricamente a 720 nm.

Este ensaio compara a capacidade dos antioxidantes baseada na habilidade de reduzir o íon férrico através da doação de um elétron, resultando na formação do íon ferroso. Este método indica como o antioxidante doa elétrons para as espécies reativas, e assim, promovem o término das reações em cadeia (LUE *et al.*, 2010).

Diferentes concentrações de amostras (0,2 mL) foram misturadas com 0,5 mL de tampão fosfato de sódio (0,2 M pH 6,6) e 0,5 mL de ferricianeto de potássio (1% w/v). A mistura foi incubada por 20 minutos a 50 °C. As amostras foram resfriadas e 0,5 mL de ácido tricloroacético (10% w/v) foram adicionados. A mistura foi agitada e centrifugada a 3.000 rpm por 10 minutos. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante, 0,1 mL de cloreto férrico (0,1% w/v) e 0,5 mL de água destilada foram misturados e incubados por 30 minutos em temperatura ambiente. A absorbância foi medida a 720 nm no espectrofotômetro Genesys (modelo Spectronic 20, Rochester, USA). O aumento na absorbância foi considerado como aumento da capacidade redutora. Os resultados foram expressos como equivalentes de ácido ascórbico, onde 10 µg de ácido ascórbico apresentou absorbância igual a 0,591.

- **Atividade antioxidante em sistema β -caroteno/ácido linoléico**

A análise foi realizada de acordo com o método descrito por Miller (1971) e adaptado por Moreira e Mancini-Filho (2004). Os produtos de degradação oxidativa do ácido linoléico, por diferentes indutores (oxigênio, luz e calor), foram medidos indiretamente pela taxa de destruição oxidativa do β -caroteno, determinada por espectrometria a 470 nm. A queda na leitura da densidade ótica das amostras foi correlacionada com o controle (sem antioxidante), considerado como 100% de oxidação.

O β -caroteno sofre descoloração rápida na ausência de um antioxidante, uma vez que o radical formado a partir do ácido linoléico ataca a molécula do β -caroteno, que perde as ligações duplas e, conseqüentemente, perde sua cor alaranjada característica. O β -caroteno é extremamente sensível à oxidação mediada por radicais livres. Os antioxidantes podem doar átomos de hidrogênio para eliminar os radicais e impedir a descoloração de carotenóides (FERNANDES, 2010).

Para o preparo do meio emulsionado, adicionou-se 0,02 mL de solução β -caroteno (20 mg/mL, diluído em clorofórmio), 0,04 mL de ácido linoléico, 530 mg de emulsificador (*Tween* 40) e 1 mL de clorofórmio. Posteriormente, o clorofórmio foi totalmente evaporado com nitrogênio gasoso. Por fim, foram acrescentados 100 mL de água destilada previamente saturada com oxigênio durante 30 minutos. O meio de reação apresentou-se límpido com absorbância entre 0,6 e 0,7 em 470 nm.

Alíquotas de 5 mL do meio de reação foram transferidas para tubos espectrofotométricos contendo as amostras em diferentes concentrações. Todas as determinações foram acompanhadas de um controle sem antioxidante. Os valores da densidade ótica foram obtidos no tempo zero e 120 minutos depois, enquanto as amostras foram mantidas em banho-maria a 50°C, em espectrofotômetro Genesys (modelo Spectronic 20, Rochester, USA). Os resultados foram expressos em percentual de proteção da oxidação.

O decaimento da densidade ótica do controle ($\text{Abs}_{\text{inicial}} - \text{Abs}_{\text{final}}$) foi considerado como 100 % de oxidação. A partir desta relação, o decréscimo na

leitura da absorbância das amostras foi correlacionado com o controle, estabelecendo desta forma, o percentual de proteção da oxidação das amostras pela equação:

$$\% \text{ de proteção da oxidação} = 100 - [(Abs_{\text{amostra}} \times 100) / Abs_{\text{controle}}]$$

Os resultados para cada amostra foram expressos em IC₅₀.

3.2.3. Atividade antioxidante *in vivo*

As análises foram realizadas utilizando ratos (*Rattus norvegicus*) machos da linhagem *Wistar*, com um mês e 15 dias de vida, pesando entre 220 e 240g, provenientes do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química/USP. O estudo utilizando animais de laboratório foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP, Protocolo CEUA/FCF/307.

Os animais foram mantidos durante todo experimento em gaiolas contendo dois animais em cada, temperatura média de 22 ± 2 °C, umidade relativa de 55 %, ciclos alternados 12h claro/12h escuro (luz acesa as 7:00 h) e trocas de ar de 15-20 trocas/hora, com acesso livre à água e à ração comercial Nuvilab CR-1.

Os animais foram alimentados com ração peletizada e irradiada fornecida pela empresa Nuvilab. A composição da ração está apresentada na tabela a seguir (Tabela 2).

Tabela 2. Composição da ração oferecida aos ratos.

Composição	%
Umidade (máx)	12,50
Proteína bruta (mín)	22,00
Extrato etéreo (mín)	5,00
Matéria mineral (máx)	10,00
Matéria fibrosa (máx)	8,00
Cálcio (máx)	1,40
Fósforo (mín)	0,80

Composição básica do produto: milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, gordura vegetal, premix vitamínico mineral e aminoácidos. Vitaminas: A, D, B1, B12, B2, B6, E, K, niacina, biotina, ácido fólico, ácido pantotênico e colina. Minerais: cobre, cobalto, ferro, iodo, manganês, selênio e zinco. Aminoácidos: lisina e metionina. Indicação: alimento irradiado para camundongos e ratos de laboratório.

- **Avaliação da atividade antioxidante *in vivo*: efeito do EA e FHA de alecrim em ratos diabéticos**

Indução do diabetes

Os ratos foram submetidos ao jejum por 16 h recebendo água *ad libitum*, após período de adaptação de uma semana. O diabetes foi induzido pela injeção de estreptozotocina (STZ - Sigma, 40mg/kg de peso corpóreo, por via endovenosa), dissolvida em tampão citrato 0,01M, pH 4,5. Os animais controle receberam o mesmo volume de tampão citrato e após 30 minutos da administração da STZ foi oferecida ração a todos os grupos. A glicemia foi avaliada após 72 h e o sangue foi coletado na veia da cauda, sendo a glicemia determinada com o uso de glicosímetro Accu-Check Go (Roche Diagnostics GmbH, D-68298 Mannheim, Germany). Os animais que apresentaram glicemia de jejum igual ou superior a 250 mg/dL e $\leq$ a 400 mg/dL foram considerados diabéticos e participaram do estudo. O esquema de indução do diabetes está apresentado na Figura 13.

Figura 13. Esquema de indução do diabetes e de tratamento.

Foram realizados dois ensaios com animais diabéticos. No primeiro foi investigado o efeito do EA e FHA.

Os animais foram distribuídos em cinco grupos (n = 06):

Controle: animais saudáveis recebendo água diariamente por gavagem.

D-H₂O: animais diabéticos recebendo água diariamente por gavagem.

D-EA 50: animais diabéticos recebendo extrato aquoso de alecrim (EA) na concentração de 50 mg/kg de peso corpóreo diariamente por gavagem.

D-FHA 25: animais diabéticos recebendo fração hidroalcoólica (FHA) na concentração de 25 mg/kg de peso corpóreo diariamente por gavagem.

D-FHA 50: animais diabéticos recebendo fração hidroalcoólica (FHA) na concentração de 50 mg/kg de peso corpóreo diariamente por gavagem.

Após o tratamento diário com água, EA ou FHA, por via intragástrica (gavagem) no período da tarde entre 13-15 horas, durante quatro semanas, os animais passaram por jejum de oito horas, foram anestesiados com injeção intraperitonal de uma mistura de ketamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) no volume igual a 0,5 mL/100 g de peso corpóreo e em seguida, foram eutanaziados.

Foi coletado o sangue para a determinação da hemoglobina glicada (coluna de troca iônica - Kit LABTEST[®]) e o soro (centrifugação a 3.500 rpm, 4 °C por 15 minutos) para determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Em seguida, o coração, fígado e os rins foram perfundidos com solução NaCl 0,9% e coletados para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx); e proteínas.

Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada pelo método de Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979) com algumas modificações: em tubos foram adicionados 200 µL de soro, 350 µL de ácido acético 20% (pH 3,5) e 600 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA - 0,5%, dissolvido em ácido acético). Os tubos foram incubados em banho termostatzado durante 1 hora a 85 °C. Em seguida, foram resfriados em banho de gelo, adicionados 50 µL de SDS 8,1% e centrifugado a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C e a absorbância foi medida a 532 nm. Uma curva de tetraepoxipropano (TEP – 0,5 a 8 nmol) foi feita e os resultados foram expressos em nmol de TBARS/mL de soro.

Preparo dos homogenatos do coração, fígado e rins

Os tecidos foram homogeneizados em homogeneizador tipo Potter-Elvehjem, em banho de gelo, com um volume de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0 igual a: duas vezes, três vezes e quatro vezes o valor absoluto da massa do coração, fígado e rins, respectivamente. O homogenato foi centrifugado a 3.500 rpm por 20 minutos a 4 °C. Uma alíquota de 1 mL foi novamente centrifugada a 11.000 rpm por 15 minutos a 4 °C, e o novo sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade das enzimas CAT, SOD e GPx.

Determinação da atividade das enzimas antioxidantes

Catalase (CAT)

A CAT propicia a oxidação do peróxido de hidrogênio a H₂O e O₂. A metodologia empregada foi descrita por Beutler (1975), quantificando a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima, mediante o decréscimo da densidade óptica a 230 nm (coeficiente de extensão molar 0,0071nM⁻¹cm⁻¹) a 37 °C. O meio de reação foi composto por H₂O₂ 10 mM (10 µL de peridrol 30 % em 10 mL de H₂O nanopura) e tampão Tris HCl 1M EDTA 5 mM pH 8,0. Para a reação, foram utilizados 20 µL do homogenato e 980 µL do meio. As amostras foram incubadas a

37 °C e realizadas leituras das absorvâncias a cada minuto durante 6 min. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

Uma unidade (U) da catalase correspondeu à atividade da enzima que permitiu a hidrólise de 1 μmol de H_2O_2 por minuto a 37 °C em pH 8,0.

Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD citoplasmática foi avaliada de acordo com a metodologia de McCord e Fridovich (1969), que verifica a produção de ânion superóxido produzido pela xantina oxidase na presença da xantina. O ânion superóxido produzido reduziu o citocromo c e esta redução foi medida pelo aumento da densidade óptica a 550 nm a 25 °C. O volume de xantina oxidase utilizado na reação foi determinado como branco, na ausência da SOD; obtendo-se, desta, uma variação na absorvância, a 500 nm, entre 0,0250 e 0,0300/min. O meio de reação foi composto por citocromo c 100 μM , xantina 500 μM , EDTA 1 mM e KCN 200 μM em tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 7,8. A 1 mL do meio, em cubeta de quartzo, foram adicionados xantina oxidase (volume encontrado no branco) e 15 μL do homogenato. A determinação foi feita em duplicata e os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

Considerou-se uma unidade (U), a atividade da enzima que promoveu 50 % de inibição da reação da xantina a 25 °C em pH 7,8.

Glutathione Peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi determinada pela metodologia padronizada por Sies (1979). Este método fundamenta-se na medição do decaimento da densidade óptica, a 340 nm, promovido pela oxidação do NADPH a 30 °C (coeficiente de extinção molar igual a $6,22 \text{ nM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) durante a redução da glutathione oxidada (GSSG) catalisada pela enzimas glutathione redutase. O meio de reação contém glutathione 1 mM, GR 0,1 U/mL, NADPH 20 mM, EDTA 5 mM pH 7,0 e tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0. Inicialmente, tomou-se 1 mL deste meio, acrescentando-se 10 μL de cada amostra e 10 μL de peróxido de terc-butila 0,5 mM, incubando esta solução a 30 °C. As leituras foram realizadas a cada minuto no período de 6 min. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

Uma unidade (U) da enzima foi definida como atividade da enzima que oxidou 1 μmol de NADPH por minuto a 30 °C em pH 7,0.

Quantificação de proteínas dos homogenatos dos tecidos

A determinação do conteúdo de proteínas presente nos homogenatos dos tecidos foi realizada segundo o método de Bradford (1985), utilizando reagente da Bio Rad. Foi feita uma curva com solução padrão de albumina bovina (0,8 a 20 μg).

- **Avaliação da atividade antioxidante *in vivo*: efeito da AFL e ácido caféico em ratos diabéticos**

No segundo ensaio com os animais diabéticos, os animais foram distribuídos em cinco grupos (n = 06):

Controle: animais saudáveis recebendo água diariamente por gavagem.

D-H₂O: animais diabéticos recebendo água diariamente por gavagem.

D-AFL 10: animais diabéticos recebendo fração de ácidos fenólicos livres (AFL) na concentração de 10 mg/kg de peso corpóreo diariamente por gavagem.

D-AFL 25: animais diabéticos recebendo fração de ácidos fenólicos livres (AFL) na concentração de 25 mg/kg de peso corpóreo diariamente por gavagem.

D-AC 25: animais diabéticos recebendo ácido caféico (AC) na concentração de 25 mg/kg de peso corpóreo diariamente por gavagem.

Após tratamento diário com água, AFL ou ácido caféico, por via intragástrica (gavagem) no período da tarde entre 13-15 horas, durante 35 dias, os animais passaram por jejum de oito horas, foram anestesiados com injeção intraperitonal da mistura de ketamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) no volume igual a 0,5 mL/100 g de peso corpóreo e em seguida, foram eutanaziados.

Foi coletado o sangue para a determinação da hemoglobina glicada (coluna de troca iônica - Kit LABTEST®) e o soro (centrifugação a 3.500 rpm, 4°C por 15 minutos). Em seguida, o coração, fígado e os rins foram perfundidos com solução NaCl 0,9% e coletados para a determinação da glutathiona reduzida (GSH), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), proteínas e para a atividade

das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx).

A determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), enzimas antioxidantes e proteínas foi realizada de acordo com protocolo citado anteriormente.

Determinação da glutathione reduzida (GSH)

O ensaio foi feito segundo protocolo descrito por Tietze (1969). O mesmo fundamenta-se na reação da glutathione reduzida (GSH) presente nos homogenatos com a substância 5,5'-ditiobis - 2,2 ácido nitrobenzóico (DTNB) para produzir um composto colorido que absorve espectrofotometricamente a 412 nm. Os homogenatos foram ressuspensos numa solução de EDTA (10^{-3} M) em TCA 5%. Posteriormente foi centrifugado a 17000 x g por 15 min a 2 °C e o sobrenadante foi coletado.

Foi colocado no tubo de ensaio 1375 µL de tampão fosfato pH 8,0 e 100 µL do sobrenadante contendo GSH. Em seguida, adicionou-se 25 µL de DTNB (10 mM) dissolvido em acetona. Os tubos foram agitados durante 15 segundos e a absorbância foi medida a 412 nm em espectrofotômetro Genesys (modelo Spectronic 20, Rochester, USA). A concentração de GSH foi quantificada utilizando uma curva padrão de GSH (50 a 800 µM).

3.2.4. Atividade anti-inflamatória *in vitro*

- **Efeito sobre a atividade da enzima LOX**

O ensaio foi realizado de acordo com Kontogiorgis e Hadjipavlou-Litina (2003). O meio de reação foi constituído de 200 µL da amostra teste, 200 µL de linoleato sódico (0,5 mM) e 400 µL da solução da enzima LOX ($1/3 \times 10^{-4}$, p/v, diluída em salina). Após incubação em temperatura ambiente (25 °C) por 3 minutos, a conversão do linoleato sódico a ácido 13-hidroperoxilinoléico foi mensurada a 234 nm no espectrofotômetro UV/VIS (Cary 50 Bio, Varian). Os resultados foram expressos em IC₅₀, a partir de uma curva construída com os valores de percentual de inibição da LOX.

3.2.5. Atividade anti-inflamatória *in vivo*

- **Efeito do extrato aquoso de alecrim no modelo de edema de pata**

Para a avaliação da atividade anti-inflamatória no modelo de edema de pata foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar* saudáveis, pesando entre 180 e 200 g (ratos adultos jovens) que passaram por período de adaptação de uma semana antes do ensaio.

O efeito anti-edematogênico foi avaliado através do teste de edema de pata induzido por carragenina (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) diluída em tampão PBS na pata traseira direita de ratos. A indometacina, potente inibidor não seletivo de COX-2, foi utilizada como anti-inflamatório padrão.

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos (n= 06):

Controle: animais saudáveis recebendo água por gavagem.

EA 200: animais saudáveis recebendo extrato aquoso (EA) de alecrim na concentração de 200 mg/kg de peso corpóreo por gavagem.

Indo 10: animais saudáveis recebendo indometacina na concentração de 10 mg/kg de peso corpóreo por gavagem.

O veículo (água), o extrato aquoso de alecrim e indometacina foram administrados por via intragástrica uma hora antes da injeção intraplantar de carragenina (1 % - 100 μ L). O volume da pata foi medido imediatamente após a administração da carragenina (tempo zero) e também 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas pós-carragenina. A medida da pata foi realizada com o auxílio de um micrômetro externo digital (capacidade 0 - 25mm, exatidão $\pm$ 0,001mm) (Digimess, São Paulo, BRA) (YESILADA; KUPELI, 2007).

- **Efeito do extrato aquoso de alecrim no modelo da bolsa de ar**

Para a avaliação da atividade anti-inflamatória no modelo de bolsa de ar foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar* saudáveis, pesando entre 220 e 240 g (ratos adultos) que passaram por período de adaptação de uma semana antes

do ensaio.

A bolsa de ar foi realizada na superfície dorsal dos ratos, utilizando o modelo modificado de Edwards, Sedgwick e Willoughby (1981). Os animais foram anestesiados com ketamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) por via intraperitoneal, e o dorso dos animais foi depilado com depilador elétrico. Com auxílio de filtro 0,22 μ m, 10 mL de ar ambiente foram esterilizados e injetados no dorso do animal por via subcutânea. Após 7 dias, foi realizado o reforço da injeção de 10 mL de ar estéril. No décimo dia após a primeira injeção de ar, extrato aquoso (EA) de alecrim nas concentrações de 100, 200 e 400 mg/kg, indometacina (30 mg/kg) ou veículo (água) foram administrados por via intragástrica. Após 1 h do tratamento, 2 mL da solução de carragenina a 1% (Sigma Aldrich) foi injetada no interior da bolsa de ar. Após 4 h, os animais foram anestesiados com ketamina/xilazina nas condições anteriores, e a cavidade da bolsa de ar foi lavada com 2 mL de solução de tampão fosfato salina (PBS; NaCl 125mM, KCl 5mM, Na₂HPO₄ 8mM, NaH₂PO₄ 2mM).

O exsudato foi coletado e centrifugado a 600 x *g*, 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a determinação de TBARS e da atividade das enzimas antioxidantes SOD e GPx, e proteínas totais, de acordo com as metodologias citadas anteriormente.

O *pellet* contendo as células do exsudato foi ressuspenso em 1 mL de PBS para a contagem do número total e diferencial de leucócitos. O número total de células foi quantificado com auxílio da câmara de Neubauer, após diluição de 1:100 no Líquido de Türk. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaço, os quais foram fixados em lâminas, corados com solução corante de May-Grunwald-Giemsa (Sigma Aldrich) modificada (ROSENFELD, 1947).

Os animais foram distribuídos da seguinte forma (n = 06):

Controle: animais que receberam água por gavagem e 2 mL de PBS na bolha.

Carragenina: animais que receberam água por gavagem e 2 mL de carragenina 1% na bolha.

Indo 30: animais que receberam indometacina (30 mg/kg de peso corpóreo) por gavagem e 2 mL de carragenina 1% na bolha.

EA 100: animais que receberam EA de alecrim (100 mg/kg de peso corpóreo) por gavagem e 2 mL de carragenina 1% na bolha.

EA 200: animais que receberam EA de alecrim (200 mg/kg de peso corpóreo) por gavagem e 2 mL de carragenina 1% na bolha.

EA 400: animais que receberam EA de alecrim (400 mg/kg de peso corpóreo) por gavagem e 2 mL de carragenina 1% na bolha.

Os mediadores LTB₄, PGE₂, TNF- α , IL-6 e CINC-1 foram quantificados no exsudato utilizando kits de Ensaio Imuno-enzimático (ELISA) de acordo com as especificações do fabricante. Os resultados foram expressos em pg/mL ou ng/mL.

- **Efeito do extrato aquoso na viabilidade de neutrófilos e na produção de NO**

Isolamento de neutrófilos

Os neutrófilos foram obtidos da cavidade peritoneal de ratos *Wistar* machos, 4 horas após a injeção local de glicogênio de ostra a 1% (Sigma Aldrich). Após este período, os animais foram anestesiados com ketamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e as células foram coletadas por lavagem da cavidade peritoneal com 10 mL de PBS estéril. O número de células viáveis foi avaliado em câmara de Neubauer usando microscópio óptico (Nikon, Japão).

Viabilidade celular

Neutrófilos na quantidade de 1×10^6 células foram incubados com EA de alecrim nas concentrações 1, 10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ na presença ou ausência de LPS (5 $\mu\text{g/mL}$) por 18 h a 37°C , 5% CO_2 . 10 μL da suspensão de neutrófilos de cada poço foram misturados com 10 μL de 0,4% de solução de trypan blue. 10 μL desta suspensão foram colocados em câmara de Neubauer para calcular a porcentagem de células viáveis.

Produção de óxido nítrico (NO)

Neutrófilos (1×10^6) foram incubados com EA de alecrim nas concentrações 1, 10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ na presença ou ausência de LPS (5 $\mu\text{g/mL}$) por 18h a 37°C , 5% CO_2 . Após este período foi coletado o sobrenadante para determinação de NO_2^- . 100 μL do sobrenadante foram incubados por 10 minutos com 100 μL de reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de α -naftiletilenodiamina em ácido fosfórico 5%). A absorbância foi determinada em 550 nm usando leitor de microplacas (SpectraMax190, Molecular Devices). Os resultados foram expressos em μM de NO_2^- .

- **Efeito do EA e FHA nas citocinas inflamatórias de ratos diabéticos**

Após as quatro semanas de tratamento, como detalhado anteriormente no ensaio para avaliar o efeito antioxidante *in vivo* do EA e FHA, foi coletado o sangue destes animais. O soro foi obtido para determinação das citocinas inflamatórias $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 e LTB4. As citocinas foram quantificadas utilizando kits de Ensaio Imuno-enzimático (ELISA) de acordo com as especificações do fabricante. Os resultados foram expressos em pg/mL .

3.2.6. Atividade antioxidante em células HepG2

Para investigar o mecanismo antioxidante associado ao fator de transcrição Nrf2, foram feitos ensaios com a linhagem de hepatócitos humano no

Departamento de Ciência dos Alimentos e Nutrição Humana da Universidade da Flórida, Gainesville/FL/EUA.

As células HepG2 (ATCC: HB-8065TM) foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Jesse F. Gregory do Departamento de Ciência dos Alimentos e Nutrição Humana, da Universidade da Flórida/EUA e cultivadas em meio essencial mínimo (MEM), contendo antibiótico (penicilina e estreptomicina), antimicótico (anfotericina B), L-glutamina, aminoácidos não essenciais, piruvato e 10% de soro fetal bovino. As células foram cultivadas em garrafas de 25 cm² e mantidas em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37°C. Para todos os ensaios realizados, as células foram plaqueadas 24 horas antes do tratamento para permitir a aderência nas placas. No dia seguinte, o meio foi descartado e um novo meio sem soro fetal bovino foi colocado.

- **Ensaio de viabilidade celular**

O teste colorimétrico com MTT [3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] foi usado para determinar a viabilidade das células HepG2. No primeiro momento, as células foram colocadas em placas de 96 poços em diferentes condições: número de células (4x10³, 8x10³ ou 16x10³/poço) e quantidade de glicose (5.5, 25, 50, 75 e 100 mM). No segundo momento, as células foram plaqueadas na quantidade de 16x10³/poço em diferentes concentrações de glicose e de extrato aquoso (EA) de alecrim (1, 10, 50 e 100 µg/mL). As células foram submetidas à incubação por 24 e 48 horas. Após período de incubação, 10 µL de solução de MTT dissolvido em PBS na concentração de 5 mg/mL foram adicionados e as células foram incubadas por 4 horas a 37°C. Em seguida, foi adicionado 100 µL de isopropanol ácido (HCl 0,04N em isopropanol 1:300) e as placas foram agitadas para facilitar a solubilização dos cristais de formazan. A densidade ótica foi determinada a 540 nm. Os resultados foram expressos em % de células viáveis em relação ao controle, que indicava 100% de viabilidade (CARMICHAEL *et al*, 1985).

- **Medida das espécies reativas de oxigênio intracelulares (EROs)**

A medida das EROs intracelulares foi feita usando um probe fluorescente, DCFH-DA (2',7'-Diclorofluoresceína diacetato) (WANG; JOSEPH, 1999). As células

HepG2 foram cultivadas em placas de 96 poços (16×10^6 células/poço) em diferentes concentrações de glicose (5.5, 25, 50 e 100 mM) e de extrato aquoso (EA) de alecrim (1, 10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$). As células foram submetidas à incubação por 48 e 72 horas. Depois do período de incubação, o meio foi descartado e as células foram gentilmente lavadas duas vezes com PBS. Então, foram adicionados 100 μL do probe DCFH-DA (40 μM) dissolvido em PBS e após 30 minutos de incubação, a intensidade da fluorescência foi medida na excitação de 480 nm e emissão 530 nm. Os resultados foram expressos em RFU (unidade de fluorescência relativa).

- **Determinação de glutathiona (GSH)**

As células HepG2 na quantidade de $1,5 \times 10^6$ foram cultivadas em placas de 100 mm e tratadas por 72 horas. Os grupos foram distribuídos da seguinte forma:

NG: células submetidas a condições basais (normoglicêmicas - 5,5 mM de glicose).

HG: células submetidas a condições hiperglicêmicas (50 mM de glicose).

NG + EA 10: células submetidas a condições basais (normoglicêmicas - 5,5 mM de glicose) na presença de 10 $\mu\text{g/mL}$ de EA de alecrim.

HG + EA 10: células submetidas a condições hiperglicêmicas (50 mM de glicose) na presença de 10 $\mu\text{g/mL}$ de EA de alecrim.

Após tratamento, as células foram lavadas duas vezes com PBS, coletadas por tripsinização e tratadas com ácido tricloroacético (10%) gelado para extrair a GSH celular. A suspensão de células foi centrifugada a $13000 \times g$ por 5 minutos a 4°C para remover proteínas desnaturadas. GSH foi determinada pelo método Tietze (1969) utilizando a solução de DTNB. Os níveis de GSH das amostras foram quantificados a partir da equação da reta obtida da curva padrão com quantidades conhecidas de GSH. Os resultados foram expressos em μM de GSH.

- **Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR em tempo real**

Para a análise de PCR em tempo real dos genes HO-1 (hemoxigenase-1) e SOD-2 (superóxido dismutase-2), as células HepG2 foram cultivadas nas mesmas condições de tratamento e incubação do ensaio de determinação de GSH.

O RNA total foi extraído usando o reagente RNAzol[®] RT (Molecular Research Center, Inc) de acordo com o protocolo do fabricante. A concentração de RNA foi medida usando o espectrofotômetro NanoDrop-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA). As reações de transcriptase reversa para obtenção do cDNA e amplificação (PCR) foram feitas usando kit comercial da Applied Biosystems, High Capacity cDNA Reverse Transcription e Power SYBR Green PCR Master Mix, respectivamente (Foster City, CA, EUA). Os primers foram obtidos da Eurofins MWG Operon (Huntsville, Alabama, EUA). As sequências estão demonstradas na tabela a seguir:

Tabela 3. Sequências de primers utilizadas no PCR em tempo real.

Genes	Forward	Reverse
HO-1	GCCCTTCAGCATCCTCAGTTC	GGTTTGAGACAGCTGCCACAT
SOD-2	TGGTGGTCATATCAATCATAGCATT	GCAACTCCCCTTTGGGTTCT
RPL13A	TGAGTGAAAGGGAGCCAGAAG	CAGATGCCCCACTCACAAGA

A expressão da HO-1 e SOD-2 foi apresentada como número de cópias relativa normalizada contra a média de expressão do mRNA do *housekeeping gene*, RPL13A (proteína ribossomal L13A) e demonstrada como média $\pm$ desvio padrão.

3.2.7. Análise estatística

Para o tratamento estatístico dos dados foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida do teste Tukey, usando-se o *software* Prism 3.0 (GraphPad). Os dados foram expressos como média e desvio padrão, adotando nível de significância de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação e quantificação de compostos fenólicos

O alecrim é reconhecido como fonte potencial de compostos fenólicos, destacando três grandes grupos: os ácidos fenólicos, os flavonoides e os diterpenos fenólicos. Representantes destes grupos foram identificados no extrato aquoso (EA) e suas frações: fração etanólica (Fr Et), fração hidroalcoólica (Fr HA), fração aquosa (Fr Aq), e nas frações de ácidos fenólicos livres (AFL), ácidos fenólicos solúveis (AFS) e ácidos fenólicos insolúveis (AFI), obtidos a partir das folhas de alecrim.

A análise dos compostos fenólicos e flavonoides totais foi realizada no extrato aquoso (EA) e suas frações (Fr Et, Fr HA e Fr Aq) (Tabela 4). O extrato aquoso obtido a partir da mistura de 20g de folha seca de alecrim com 100 mL de água apresentou rendimento de 3,47%. A quantidade de fenólicos totais para o EA foi de 186 mg/g de extrato seco (Tabela 4) que corresponde a 3,23g/100g de folha seca de alecrim.

Na Tabela 4 estão apresentadas em equivalentes de catequina, as quantidades de fenólicos e flavonoides totais do EA e suas frações. A Fr Et apresentou $326 \pm 5,1$ mg/g de fenólicos totais, sendo esta a maior concentração encontrada quando comparada a Fr HA ($131 \pm 0,1$ mg/g) e Fr Aq ($180 \pm 0,3$ mg/g).

Pela técnica de fracionamento e partindo de 10 g de EA liofilizado, o rendimento total das frações foi de: Fr Et (0,069 g), Fr HA (5,14 g) e Fr Aq (0,69 g), os resultados demonstram que a Fr HA apresentou maior rendimento, uma vez que o fracionamento partiu de um extrato aquoso, e por isso a maior parte das substâncias se concentraram na mistura hidroalcoólica (Tabela 4).

A partir da quantidade de fenólicos totais, identificou-se que 52 mg/g do EA, 163 mg/g da Fr Et, 114 mg/g da Fr HA e 91mg/g da Fr Aq corresponderam aos flavonoides presentes no alecrim. A Fr HA embora não tenha sido a fração que apresentou maior quantidade de compostos fenólicos (mg/g de fração), esta é composta por 87 % de flavonoides.

Tabela 4. Fenólicos totais e flavonoides do EA e suas frações obtidos das folhas de alecrim, expressos em equivalentes de catequina.

EA e frações	Fenólicos totais	Flavonoides totais
	mg/g de extrato ou fração	mg/g de extrato ou fração
EA	186 ± 0,1 ^a	52 ± 0,1 ^a
Fr Et	326 ± 5,1 ^b	163 ± 0,1 ^b
Fr HA	131 ± 0,1 ^c	114 ± 0,3 ^c
Fr Aq	180 ± 0,3 ^a	91 ± 0,1 ^d

Legenda: (EA) extrato aquoso, (Fr Et) fração etanólica, (Fr HA) fração hidroalcoólica e (Fr Aq) fração aquosa. Os resultados representam média e desvio padrão. Letras diferem entre si estatisticamente com $p < 0,05$.

O tipo de extração relaciona-se tanto com o rendimento em fenólicos totais quanto a atividade antioxidante. No estudo de Herrero *et al.* (2010) o extrato aquoso de alecrim teve rendimento similar à extração líquida pressurizada com o mesmo solvente, variando apenas a temperatura (50 a 200 °C). A quantidade encontrada de fenólicos para o extrato aquoso de alecrim foi de 157 a 183 mg/g de extrato em função do aumento da temperatura. Estes valores foram superiores aos obtidos com a extração com etanol e até mesmo com a extração supercrítica com CO₂.

Dorman *et al.* (2003) compararam o conteúdo de fenólicos totais em extratos aquosos de quatro ervas pertencente à família Lamiaceae e obtiveram os seguintes resultados expressos em mg de equivalentes de ácido gálico/g de extrato: orégano (149), alecrim (185), sálvia (166) e tomilho (95,6).

Resultados similares para compostos fenólicos totais do EA de alecrim também foram encontrados por Chen, Lin e Hsieh (2007). No EA, o valor obtido para fenólicos totais foi de 185 ± 4,99 mg/g, no entanto, o rendimento de flavonoides foi superior, quando comparado ao presente estudo. Os autores encontraram 141 ± 2,85 mg/g de flavonoides, os quais representaram 76% dos fenólicos totais.

O valor de fenólicos totais (3,23g/100g de folha seca de alecrim), apresentado na Tabela 4, foi superior aos valores encontrados no extrato aquoso de outras especiarias, como o orégano (0,86 g/100g), sálvia (0,58 g/100g) e manjerição (0,52 g/100g) (CIOROI, 2009).

Quantidades reduzidas de fenólicos e flavonoides totais foram encontradas por Tsai, Tsai e Ho (2007) em extrato aquoso (98,7 ± 5,9 e 128 ± 0,8 mg/g) e etanólico de alecrim (58,1 ± 0,9 e 60,7 ± 1,1 mg/g) para fenólicos e

flavonoides, respectivamente. O extrato aquoso destacou-se por conter maiores concentrações destes compostos.

Khanum *et al.* (2011) avaliaram a capacidade antioxidante de extratos aquosos e etanólicos de três especiarias, entre elas, o orégano. Eles constataram que o extrato aquoso de orégano se destacou entre os demais por apresentar maior conteúdo de fenólicos e flavonoides totais, além de alta capacidade redutora e atividade antirradical.

Os flavonoides do EA de alecrim e das suas frações também foram avaliados por cromatografia de camada delgada. A Figura 14 ilustra os flavonoides presentes no EA e suas frações, mostrando também por esta técnica a concentração destes compostos na Fr Et.

Figura 14. Cromatografia de camada delgada para os flavonoides presentes no extrato aquoso (EA) e suas frações, obtidos das folhas de alecrim. Legenda: (1) Extrato aquoso, (2) Fração etanólica (3) Fração hidroalcoólica (4) Fração aquosa (5) Catequina (6) Rutina e (7) Ácido caféico.

Considerando a importância dos flavonoides em processos metabólicos, a presença destes vem sendo estudada em extratos de alecrim. No extrato metanólico foram encontrados os flavonoides luteolina *O*-glicosídeo (0,83 mg/g de extrato) e apigenina *O*-glicosídeo (0,50 mg/g de extrato) (HOSSAIN *et al.*, 2011). A presença dos flavonoides luteolina e apigenina foi confirmada no extrato metanol:água de alecrim. A luteolina foi encontrada em maior concentração (6,16 mg/g de extrato) e a apigenina na concentração de 0,44 mg/g (WOJDYLO; OSZMIASKI; CZEMERY, 2007).

Recentemente, Alezandro *et al.* (2011) também confirmaram a presença desses flavonoides no extrato metanol:água (70:30) de alecrim, na forma de agliconas. A quantidade de apigenina variou de 19,4 a 231 mg/100g de folha e a luteolina de 6,74 a 39,1 mg/100g de folha.

Os principais componentes do EA e das suas frações também foram identificados por HPLC (Figura 16) a partir do tempo de retenção dos padrões (Figura 15). O EA destacou-se pela presença dos ácidos ferúlico e rosmarínico, que estão presentes também nas frações Fr Et e Fr HA. Os ácidos caféico e *p*-cumárico foram identificados na Fr Et.

O ácido rosmarínico constituiu o principal componente do extrato aquoso de alecrim como pode ser visualizado na Figura 16 e confirmado por Tai *et al.* (2012). De forma semelhante, Ozturk *et al.* (2011) observaram que o ácido rosmarínico foi o principal composto encontrado no extrato metanólico das espécies *Salvia sclarea* L. (56,3 mg/g de extrato), *Salvia verticillata* L. (119,6 mg/g de extrato) e alecrim (114 mg/g de extrato).

No entanto, outros estudos encontraram que aproximadamente 5% do peso seco das folhas de alecrim foi composto pelos diterpenos fenólicos: ácido carnósico e carnosol, sendo que 90% da atividade antioxidante do alecrim é atribuída a estes dois compostos (AFONSO, 2010, ALMELA *et al.*, 2006).

Figura 15. Cromatograma dos padrões utilizados para identificação dos compostos presentes no EA e suas frações. Legenda: (1) Ácido gálico, (2) Ácido protocatequico, (3) Ácido caféico, (4) Ácido *p*-cumárico, (5) Ácido ferúlico, (6) Ácido rosmarínico e (7) Ácido carnósico.

Figura 16. Cromatogramas do extrato aquoso (EA), da fração etanólica (Fr Et) e da fração hidroalcoólica (Fr HA) obtidos das folhas de alecrim. Legenda: (3) Ácido caféico, (4) Ácido *p*-cumárico, (5) Ácido ferúlico e (6) Ácido rosmarínico.

Os ácidos rosmarínico e carnósico fazem do alecrim uma especiaria com potencial antioxidante interessante, e foram identificados e quantificados nas frações de ácidos fenólicos. Os resultados destes compostos estão apresentados na Tabela 5, e foram expressos em equivalentes de ácido gálico, obtendo-se uma curva padrão a qual possibilitou a determinação da equação da reta $y = 0,0099x + 0,0069$ com expressivo coeficiente de correlação ($R^2 = 0,9978$).

Tabela 5. Quantificação de fenólicos totais, ácido rosmarínico e ácido carnósico nas frações de ácidos fenólicos obtidas das folhas de alecrim.

Frações	Fenólicos totais (mg EAG/g de amostra)	µg/mg de fração	
		Rosmarínico	Carnósico
AFL	$11,12 \pm 0,46^a$	$87,21 \pm 0,60^a$	$64,21 \pm 1,44^a$
AFS	$8,94 \pm 0,30^b$	$71,98 \pm 0,16^b$	$6,07 \pm 0,50^b$
AFI	$6,95 \pm 0,20^c$	$27,65 \pm 0,43^c$	$4,33 \pm 0,19^b$

Legenda: (EAG) equivalentes de ácido gálico, (AFL) ácidos fenólicos livres, (AFS) ácidos fenólicos solúveis e (AFI) ácidos fenólicos insolúveis. Os resultados representam média e desvio padrão. Letras diferem entre si estatisticamente com $p < 0,05$.

O método de obtenção das frações de ácidos fenólicos utilizando THF permitiu a obtenção das frações a partir de 1g de folha de alecrim seca triturada. Esta extração garantiu alto rendimento em compostos fenólicos totais (2,7g/100 g de folha seca). No entanto, maior quantidade de compostos (3,23g/100g de folha seca) foi extraída com água (EA).

Os ácidos rosmarínico e carnósico também foram quantificados nas frações de ácidos fenólicos a partir das equações: $y = 30,999x + 16,583$ ($R^2 = 0,9997$) para o ácido rosmarínico e $y = 12,634x + 5,6406$ ($R^2 = 0,9998$) para o ácido carnósico. A fração AFL destacou-se entre as demais por apresentar maior conteúdo dos ácidos rosmarínico e carnósico. A ordem decrescente para a quantidade de ácido rosmarínico foi: AFL>AFS>AFI. Para o ácido carnósico, as frações AFS e AFI apresentaram menor quantidade deste composto (6,07 e 4,33 µg/mg de fração, respectivamente), ao contrário da AFL (64,21 µg/mg de fração) (Tabela 5).

As frações apresentaram expressiva quantidade de compostos fenólicos, sendo em ordem decrescente: AFL>AFS>AFI, como relatado também por Afonso (2010), que avaliando conteúdo de fenólicos totais nas frações de alecrim, obteve os

seguintes valores para AFL ($8,59 \pm 0,31 \mu\text{g/mg}$ de fração), AFS ($5,38 \pm 0,10 \mu\text{g/mg}$ de fração) e AFI ($3,42 \pm 0,04 \mu\text{g/mg}$ de fração).

Nas três frações houve predomínio do ácido rosmarínico, que juntamente com o ácido carnósico e o carnosol, representaram os principais componentes do alecrim, como apresentado na Tabela 5.

A fração AFS se destacou entre as demais por conter quantidade expressiva de ácido caféico ($51,20 \mu\text{g/mg}$ da fração), que foi quantificado a partir da equação da reta $y = 78,131x + 63,049$ ($R^2 = 0,9996$).

A maioria dos estudos identificou o ácido carnósico como o principal composto presente no alecrim. Diferentemente dos resultados encontrados neste estudo, no qual o ácido rosmarínico foi o composto predominante (Tabela 5). No entanto, é sabido que há grande variabilidade na distribuição desses compostos em função dos fatores intrínsecos e extrínsecos. Meziane-Assami *et al.* (2012) investigaram a presença dos ácidos rosmarínico, carnósico, e do carnosol em 16 amostras distintas de alecrim. Destas, 14 apresentaram valores superiores para o ácido rosmarínico quando comparadas ao teor de ácido carnósico. Houve diferenças também na quantidade desses compostos; o ácido rosmarínico variou de 0,27 a 2,49 g/100g de folha seca, o ácido carnósico de 0,01 a 1,77 g/100g de folha seca e carnosol de 0,17 a 0,94 g/100g de folha seca.

4.2. Atividade antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante de extratos e frações pode ser determinada por vários métodos em diferentes sistemas: lipídico e aquoso. No entanto, as metodologias mais utilizadas estão normalmente relacionadas com os mecanismos antioxidantes que os compostos podem apresentar (SILVA, 2008; GIADA; MANCINI-FILHO, 2004). Os compostos antioxidantes podem atuar como antirradicais, como compostos redutores, quelantes de metais ou inibindo a cascata de lipoperoxidação.

A seguir estão apresentados os resultados para atividade antioxidante do extrato aquoso e frações, obtidos das folhas de alecrim, avaliados nos sistemas: DPPH, ORAC, capacidade redutora e co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico.

- **Método de varredura do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH)**

Atividade seqüestradora de radicais livres é um meio muitas vezes usado para comparar a capacidade antioxidante de diferentes compostos. Através deste método foi avaliada a capacidade do EA de alecrim e suas frações em doar um elétron ou hidrogênio para o radical DPPH, promovendo mudança de cor.

Neste ensaio, a capacidade do EA e das frações em seqüestrar o radical DPPH foi baseada nos valores de IC_{50} e estão apresentados na Tabela 6. Os valores de IC_{50} obtidos correspondem à concentração do extrato aquoso ou das frações (μg de peso seco do EA ou das frações) que reduz a absorbância da solução de DPPH pela metade do seu valor inicial. Valores de IC_{50} foram calculados utilizando a equação da reta obtida a partir de uma curva preparada com os percentuais de varredura do radical DPPH para o EA e cada fração.

Foram observadas diferenças entre os valores de IC_{50} e em ordem crescente de eficiência destacou-se: Fr Aq < Fr Et < EA < Fr HA < AFS < AFL. Não foi possível calcular o valor de IC_{50} para a AFI, uma vez que os percentuais de varredura das concentrações avaliadas (0,625 a 80 μg da fração) variaram de 2,24 a 48,66%, não atingindo, portanto, 50% de varredura do DPPH.

No ensaio de varredura do radical DPPH, a fração de ácidos fenólicos livres (AFL) apresentou maior atividade antioxidante comparada às demais amostras ($IC_{50}=9,70$) e ao valor encontrado por Afonso (2010) para o antioxidante sintético BHT ($IC_{50}=7,53$). Isto pode ser atribuído ao alto conteúdo de compostos fenólicos (Tabela 5). A correlação entre atividade antioxidante e conteúdo de compostos fenólicos tem sido demonstrada e o solvente utilizado na extração pode ser importante nesta atividade (ERKAN; AYRANCI; AYRANCI, 2008).

Tabela 6. Valores de IC₅₀ de frações e EA de alecrim pelo método de varredura do radical DPPH.

Frações e EA	IC ₅₀ (µg)
Extrato aquoso (EA)	13,08
Fração etanólica (Fr Et)	15,27
Fração hidroalcoólica (Fr HA)	11,05
Fração aquosa (Fr Aq)	17,09
Ácidos fenólicos livres (AFL)	9,70
Ácidos fenólicos solúveis (AFS)	10,50
Ácidos fenólicos insolúveis (AFI)	-

Os resultados representam valores de IC₅₀. Quanto menor IC₅₀ maior atividade antioxidante.

Afonso (2010) obteve valores de IC₅₀ similares como descritos a seguir. Para o EA de alecrim extraído em condições distintas de temperatura (20; 23 e 60°C), os valores de IC₅₀ variaram de 6,40 a 4,13 µg de extrato seco, indicando que quanto maior a temperatura, maior era o conteúdo de fenólicos e mais eficiente era o extrato aquoso (menor valor de IC₅₀). A AFL apresentou valor de IC₅₀ igual a 8,03 e AFS 8,17. Diferentemente, valor de IC₅₀ para AFI foi obtido e correspondeu a 10,35 µg. A atividade expressiva das frações polares de alecrim foi relacionada com a concentração dos ácidos rosmarínico e carnósico, como observado neste estudo (Tabela 5).

Pérez, Calderón e Croci (2007) também observaram variação no valor de IC₅₀ em função do solvente. Para os extratos de alecrim, o IC₅₀ foi significativamente menor para o metanol (4,63 mg/mL) do que para o etanol e água, cujos valores foram 6,90 e 11,5 mg/mL, respectivamente.

Almela *et al.* (2006) obtiveram resultados semelhantes com amostra fresca de alecrim, cujos extratos apresentaram valores de IC₅₀ próximos ao BHT. Valor de IC₅₀ de 7,46 µg para EA de alecrim foi atribuído à presença dos ácidos rosmarínico e carnósico (MATA *et al.*, 2007). O grande número de grupos hidroxilas doadores de elétrons presentes no ácido rosmarínico quando comparado ao BHT e a estabilização do seu radical formado explica sua alta capacidade de varredura do radical DPPH (KOLEVA *et al.*, 2002).

Manjerição e louro são especiarias que se destacam entre as demais por conterem compostos com alta capacidade antioxidante no método DPPH.

Extratos aquosos de manjeriço e louro apresentaram valores de IC₅₀ iguais a 9,8 µg, próximo ao obtido para o EA de alecrim (13,08 µg) no presente estudo. Maior IC₅₀ foi obtido para o EA de salsa (600 µg) (HINNEBURG; DORMAN; HILTUNEN, 2006).

Resultados da literatura reforçam a importância dos componentes fenólicos do alecrim como compostos antioxidantes neste método, doando elétron ou hidrogênio para o radical DPPH (BUBONJA-SONJE; GIACOMETTI; ABRAM, 2011; ZEGURA *et al.*, 2011; ERKAN; AYRANCI; AYRANCI, 2008; YOO *et al.*, 2008; ALMELA *et al.*, 2006; MORENO *et al.*, 2006).

- **Capacidade de absorbância do radical oxigênio - ORAC**

O EA e as frações de ácidos fenólicos foram avaliados através do método ORAC (Tabela 7). O alecrim apresentou altos valores de proteção que variou de $2,56 \pm 0,21$ para o extrato aquoso a $8,23 \pm 0,26$ mmol equivalentes de Trolox®/ g de peso seco, para a fração AFI. Os resultados de capacidade antioxidante obtidos para as frações AFS e AFI apresentaram-se superiores aos obtidos para o padrão Trolox, que é de 4,0 mmol nessas condições de ensaio. Interessantemente, a fração AFI teve o maior efeito antioxidante no ensaio ORAC. A ordem de eficiência foi AFI>AFS>AFL>EA.

Tabela 7. Atividade antioxidante pelo método ORAC do extrato aquoso e das frações de ácidos fenólicos de alecrim.

Frações de ácidos fenólicos e EA	mmol/g de peso seco
Extato aquoso (EA)	$2,56 \pm 0,21^a$
Ácidos fenólicos livres (AFL)	$2,68 \pm 0,14^a$
Ácidos fenólicos solúveis (AFS)	$4,15 \pm 0,17^b$
Ácidos fenólicos insolúveis (AFI)	$8,23 \pm 0,26^c$

Os resultados representam média e desvio padrão (n=3) e foram expressos em mmol equivalentes de Trolox®/g de peso seco do material. Letras diferem entre si estatisticamente com p<0,05.

O resultado de ORAC obtido para o EA foi similar ao obtido por TSAI *et al.* (2008) para o extrato metanólico de alecrim ($2,80 \pm 0,06$ mmol/g). A capacidade antioxidante dos componentes do alecrim no método ORAC também foi demonstrada em outras condições (extração com acetona/ácido perclórico 5% -

80:20). Assim como o alecrim, as especiarias sálvia, tomilho, manjerona, entre outras, tiveram valores de ORAC obtidos em mmol/100 g de folha fresca e destacaram-se entre as demais. Para a sálvia o valor ORAC obtido foi 32 mmol/100 g de folha fresca, tomilho (27,42 mmol/100 g), manjerona (27,30 mmol/100 g) e alecrim (29,03 mmol/100 g) (NINFALI *et al.*, 2005).

Capacidade antioxidante pelo método ORAC foi avaliada para outras ervas e especiarias. Valores de ORAC foram determinados para os extratos acetônico (50%) e extratos metanólicos (80%) de pimenta preta, noz moscada, canela e orégano. O extrato acetônico de canela apresentou o maior valor ORAC de 1,26 mmol equivalente de Trolox/g, seguido pelo orégano (1,23 mmol/g). Em contraste, o extrato metanólico de noz-moscada teve o maior valor (1,19 mmol/g) entre todos os extratos metanólicos, seguido pela canela (1,07 mmol/g) (SU *et al.*, 2007). Todos os extratos testados exibiram valor de ORAC inferiores aos valores obtidos para o EA e para as frações de ácidos fenólicos do alecrim (Tabela 7). Os dados sugerem uma possível influência do tipo de solvente utilizado durante a extração na capacidade antioxidante pelo método ORAC.

Valores elevados de ORAC (mmol/g de extrato seco) também foram encontrados em extratos aquosos (EA) da casca das espécies *Cinnamomum zeylanicum* (8,51) e *Pinus maritima* (6,51), EA da madeira da espécie *Myrocarpus fastigiatus* (5,42), EA da folha de *Ilex paraguariensis* (5,09) e no EA da semente de *Trigonella foenum graecum* (4,11) (DUDONNE *et al.*, 2009). Frações de ácidos fenólicos solúveis (AFS) da polpa e semente de romã também apresentaram valores ORAC elevados; 11,76 e 12,20 mmol/g de peso seco, respectivamente (JARDINI, 2010).

O ORAC é considerado por muitos pesquisadores o método preferível para avaliar atividade antioxidante devido sua relevância biológica na investigação da eficácia antioxidante *in vivo*. Assim, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) em 2007 lançou dados de ORAC para muitos alimentos, entre eles frutas, nozes, vegetais e especiarias. Entre as especiarias, valores mais elevados para a fração hidrofílica foram encontrados para a canela (2,64 mmol/g), orégano (1,83 mmol/g) e cravo (1,53 mmol/g). Valor de ORAC para alecrim não foi investigado (Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, 2007).

- **Capacidade redutora**

A Figura 17 apresenta a eficiência do EA e frações, obtidos das folhas de alecrim, em reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} .

Figura 17. Capacidade redutora do EA e frações. (EA) extrato aquoso, (Fr Et) fração etanólica, (Fr HA) fração hidroalcoólica, (Fr Aq) fração aquosa, (AFL) fração de ácidos fenólicos livres, (AFS) fração de ácidos fenólicos solúveis, (AFI) fração de ácidos fenólicos insolúveis. Aumento da absorbância (720 nm) indica atividade redutora. Os resultados foram expressos em média e em equivalentes de ácido ascórbico (n=3).

Neste ensaio, o EA e as frações apresentaram o mesmo desempenho, ou seja, todas as amostras apresentaram a capacidade de atuarem como redutores. A capacidade redutora aumenta à medida que aumenta a concentração do extrato ou fração. No entanto, quando comparados ao ácido ascórbico, as frações ganharam destaque na seguinte ordem decrescente: AFI>AFL>AFS>Fr HA>Fr

Aq>EA>Fr Et. O desempenho do EA e das frações neste ensaio foi associado à presença de compostos redutores.

Resultados semelhantes foram obtidos para o extrato aquoso e fração de ácidos fenólicos livres de algas do gênero *Halimeda*, cujo valor de equivalente de ácido ascórbico foi maior para a fração AFL quando comparada ao extrato aquoso (SILVA *et al.*, 2012; BATISTA-GONZALEZ *et al.*, 2012).

Esta atividade antioxidante baseia-se na quebra da cadeia de radicais livres por doar um átomo de hidrogênio. Além disso, os compostos redutores impedem a formação de peróxido por reagirem com certos precursores de peróxido (JAYAPRAKASHA; SINGH; SAKARIAH, 2001).

Resultados similares foram obtidos para os extratos etanólico, metanólico e aquoso de folhas de alecrim avaliados por esse mesmo método. Os autores observaram que a capacidade redutora aumentava com concentrações entre 5 e 15 mg de extrato e dentro desta faixa, a capacidade redutora foi afetada pelo solvente utilizado na ordem: metanol > etanol > água (PÉREZ; CALDERÓN; CROCI, 2007); diferentemente de Sultana, Anwar e Przybylski (2007) que não observaram diferenças entre o tipo de solvente quando avaliaram extratos etanólicos, metanólicos e acetônicos. Todos os extratos na maior concentração testada (10 mg/mL) apresentaram valores de absorbância elevados que variaram de 1,34 a 1,87 sem diferenças estatísticas.

Chen, Lin e Hsieh (2007) avaliaram a capacidade redutora de extratos aquosos de quatro espécies (*Psidium guajava* L., *Camellia sinensis*, *Toona sinensis* Roem. e *Rosmarinus officinalis* L.) pelo método de ferrocianeto de potássio. A capacidade redutora das espécies foi na ordem de *Psidium guajava* L. > *Rosmarinus officinalis* L. > *Camellia sinensis* > *Toona sinensis* Roem. Eles avaliaram três concentrações (10, 50 e 100 µg/mL) e o alecrim na concentração de 50 µg/mL atingiu absorbância igual a 0,5. Os mesmos resultados foram observados para o EA neste trabalho (40 µg = 0,461).

Amarowicz *et al.* (2004) avaliaram a capacidade redutora de extratos etanólicos das espécies *Equisetum* spp., *Arctostaphylos uva-ursi*, *Echinacea angustifolia*, *Polygala senega* e *Glycyrrhiza lepidota* no mesmo modelo avaliado neste estudo, em função da concentração e do aumento da absorbância. A presença de substâncias redutoras nos extratos promoveu a redução do complexo Fe³⁺/ferricianeto para a forma ferrosa. A capacidade redutora do extrato da espécie

Arctostaphylos uva-ursi foi superior à capacidade dos demais extratos investigados. A absorbância a 700nm variou de 0,5 na menor concentração (200 µg) a 2,25 na concentração de 1000 µg.

Os resultados apresentados reforçam a acentuada atividade antioxidante do extrato aquoso e frações associada à característica redutora.

- **Co-oxidação do β -Caroteno/ácido linoléico**

Pelos resultados pôde-se identificar que tanto o EA como as frações agiram como antioxidantes, inibindo a oxidação em cadeia (Figura 8). No entanto, a proteção dada pelas frações de ácidos fenólicos foi mais eficiente do que os resultados obtidos para o EA e suas frações. Isto pode ser mostrado pelos valores de IC₅₀ obtidos para as frações de ácidos fenólicos que foram menores quando comparados aos resultados encontrados para o EA e suas frações. É exatamente isso que caracteriza um antioxidante: substâncias que, quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, retardam ou inibem significativamente a oxidação daquele substrato (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

Tabela 8. Valores de IC₅₀ de frações e EA de alecrim pelo método de inibição da oxidação do β -caroteno/ácido linoléico.

Frações e EA	IC ₅₀ (µg)
Extrato aquoso (EA)	472,19
Fração etanólica (Fr Et)	381,78
Fração hidroalcoólica (Fr HA)	494,27
Fração aquosa (Fr Aq)	550,93
Ácidos fenólicos livres (AFL)	7,43
Ácidos fenólicos solúveis (AFS)	48,02
Ácidos fenólicos insolúveis (AFI)	11,90

Os resultados representam valores de IC₅₀. Quanto menor IC₅₀ maior atividade antioxidante.

Nos últimos anos, muitas investigações têm sido voltadas para o interesse potencial de moléculas antioxidantes, e em particular para os compostos fenólicos destinados a não impedir apenas os efeitos deletérios das espécies reativas em sistemas biológicos, mas também para inibir a deterioração das gorduras e outros

constituintes dos gêneros alimentícios (MEZIANE-ASSAMI *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2011; AFONSO, 2010; ROZMAN; JERSÈK, 2009). Neste sentido, ganham destaque os compostos antioxidantes que podem neutralizar os radicais formados no sistema e inibir a descoloração do β -caroteno (GUIMARÃES *et al.*, 2010). Na ausência de antioxidantes, a absorbância diminui rapidamente, enquanto que na presença de um antioxidante, a cor amarela do meio de reação é mantida, como foi observado nas amostras de alecrim.

Resultados semelhantes foram reportados por Afonso (2010) ao avaliar o efeito do EA e das frações de ácidos fenólicos do alecrim no sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico. Extratos aquosos de alecrim obtidos em diferentes temperaturas (20, 23 e 60 °C) apresentaram percentuais de inibição da oxidação que variaram de 69,70 a 75,42% na concentração de 1000 μ g, enquanto que a mesma proteção (62,29 a 78,16%) foi oferecida pelas frações de ácidos fenólicos na concentração 10 vezes menor (100 μ g).

A alta eficiência das frações de ácidos fenólicos pode ser atribuída ao alto conteúdo de compostos fenólicos e por se tratarem de frações purificadas, onde estes compostos estão mais concentrados. Estudos que avaliaram a eficiência destas frações comparadas a dos extratos no sistema de co-oxidação do β -cartoteno/ácido linoléico verificaram o mesmo comportamento. Oliveira (2010) constatou que as frações AFL, AFS e AFI obtidas da polpa do pequi eram mais eficientes em inibir a oxidação do β -cartoteno do que os extratos etanólicos e aquosos. Isto também foi comprovado não apenas em frações da polpa como também nas frações da amêndoa do pequi (LIMA, A., 2008).

Jardini (2010) obteve valores de percentual de inibição da oxidação na concentração de 2 μ g/mL igual a 53,92% para a fração AFL, AFS (74,10%) e AFI (87,51%) obtidas da semente de romã. Valores inferiores de proteção foram observados para o extrato aquoso da polpa (68,24%) e EA da semente (59,13%) na mesma concentração avaliada para as frações. Assim como as frações da romã, as frações de ácidos fenólicos obtidas de diferentes clones de caju também apresentaram valores de proteção da inibição da oxidação mais elevada do que os extratos aquosos (ANDRADE-WARTHA, 2007). Os resultados demonstram a eficiência da técnica de obtenção das frações de ácidos fenólicos em extrair e concentrar os compostos com expressiva atividade antioxidante quando comparado aos extratos brutos.

A capacidade antioxidante do alecrim pode ser atribuída à presença de diferentes constituintes. Extratos e frações apresentam potencial uso como antioxidantes naturais em alimentos em substituição aos aditivos sintéticos (TRINDADE *et al.*, 2009; AFONSO *et al.*, 2008).

Os estudos de identificação dos compostos fenólicos e atividade antioxidante do alecrim deram subsídios para o uso seguro e eficaz de extratos e frações do alecrim nas indústrias alimentícias e permitiram a aprovação do uso dos seus componentes principais, o ácido rosmarínico, carnósico e carnosol, como aditivos pela Autoridade de Segurança de Alimentos Européia (Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavorings, Processing Aids and Materials in Contact with Food, 2008).

4.3. Atividade antioxidante *in vivo*

- **Efeito da administração do EA e da fração FHA em ratos diabéticos.**

A injeção intravenosa de STZ produziu sinais de diabetes tipo I, como o ganho de peso reduzido e significativa hiperglicemia quando comparados ao grupo controle. A administração de EA ou FHA por quatro semanas não preveniu o ganho de peso reduzido, mas o tratamento com FHA na menor concentração (25 mg/kg) reduziu as concentrações séricas de glicose (Tabela 9).

Tabela 9. Glicemia inicial, final (mg/dL) e ganho de peso (g) de ratos tratados com água (D-H₂O), EA de alecrim na concentração de 50 mg/kg de peso corpóreo ou fração FHA (D-FHA25 e D-FHA50) por quatro semanas.

Grupos	Glicemia inicial (mg/dL)	Glicemia final (mg/dL)	Ganho de peso (g)
Controle	102,00 ± 7,35 ^a	135,35 ± 19,61 ^a	76,59 ± 7,55 ^a
D-H ₂ O	327,00 ± 20,00 ^b	339,01 ± 14,31 ^b	30,06 ± 6,32 ^b
D-EA 50	308,75 ± 27,94 ^b	339,61 ± 10,63 ^b	30,28 ± 5,23 ^b
D-FHA 25	303,17 ± 16,76 ^b	260,03 ± 38,90 ^c	31,69 ± 8,51 ^b
D-FHA 50	306,00 ± 17,93 ^b	324,72 ± 27,29 ^b	39,30 ± 7,58 ^b

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Letras na mesma coluna diferem entre si estatisticamente com $p < 0,05$.

Neste estudo a FHA apresentou efeito hipoglicemiante. Este efeito atribuído aos compostos do alecrim foi reportado em coelhos diabéticos induzidos por aloxana e tratados com extrato etanólico de alecrim nas concentrações de 100 e 200 mg/kg. A redução na glicemia foi acompanhada pelo aumento significativo nas concentrações séricas de insulina (BAKIREL *et al.*, 2008).

Efeito hipoglicemiante também foi observado para o extrato metanólico da casca da espécie *Aegle marmelos* L. nas concentrações de 200 e 400 mg/kg. O tratamento com o extrato metanólico por 30 dias aumentou significativamente as concentrações de insulina. O aumento da insulina foi atribuído ao efeito regenerativo do extrato nas células β de ratos diabéticos confirmado pela avaliação histológica e imunohistoquímica do pâncreas (GANDHI *et al.*, 2012).

A injeção intravenosa de STZ também produziu efeitos tanto no percentual de hemoglobina glicada (Hb-glicada) como nas concentrações de TBARS. Ratos diabéticos exibiram alto percentual de Hb-glicada e concentrações elevadas de TBARS no soro quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$). O tratamento com FHA na concentração de 25 mg/kg reduziu o percentual de Hb-glicada e os níveis de TBARS ($p < 0,05$). O tratamento com EA e FHA, na concentração de 50 mg/kg, parece influenciar no percentual de Hb-glicada e TBARS, mas não foi significativamente diferente (Figura 18).

Figura 18. Percentual de Hb-glicada e TBARS de soro. Ratos controle e diabéticos foram tratados com água (D-H₂O), EA de alecrim na concentração de 50 mg/kg de peso corpóreo ou fração FHA (D-FHA25 e D-FHA50) por quatro semanas. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Letras diferem entre si estatisticamente com $p < 0,05$.

A hemoglobina glicada é utilizada como ferramenta de diagnóstico na avaliação do controle glicêmico em pacientes diabéticos e mostra correlação com os riscos de desenvolvimento e progressão das complicações crônicas do diabetes (GRUPO INTERDISCIPLINAR DE PADRONIZAÇÃO DA HEMOGLOBINA GLICOSILADA – A1c, 2004). No diabetes, tanto a hemoglobina glicada quanto os níveis de TBARS, servem como marcadores de estresse oxidativo (SILVA *et al.*, 2011).

A patogênese das complicações diabéticas apresenta correlação com a formação de espécies reativas de oxigênio produzidas pelos processos de glicação e peroxidação. Como apresentado na Figura 18 pode-se visualizar que os compostos presentes no alecrim apresentaram capacidade antioxidante e atenuaram o estresse oxidativo em animais diabéticos por reduzir o percentual de hemoglobina glicada e atenuar a peroxidação lipídica, e estes efeitos foram observados melhor com a FHA na concentração de 25 mg/kg.

Extratos vegetais são conhecidos por inibir a glicação da hemoglobina em animais diabéticos. Esta propriedade é importante, uma vez que a redução de 10% no percentual de Hb-glicada determina redução de 35% do risco para retinopatia, 25-44% para nefropatia e 30% para neuropatia (RAMACHANDRAN; RAJASEKARAN; MANISENTHILKUMAR, 2012).

Ramachandran, Rajasekaran e Manisenthilkumar (2012) verificaram redução no percentual de Hb-glicada de ratos diabéticos quando administraram o EA de *Terminalia paniculata* nas concentrações de 100 e 200 mg/kg por 28 dias.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, a atividade antiglicação de extratos de alecrim pode ser atribuída à composição química e ser intimamente relacionada com a atividade antioxidante (WU *et al.*, 2011). O alecrim contém alto teor de compostos fenólicos e em particular, o ácido rosmarínico, composto predominante no EA e nas frações. Ácido rosmarínico (100 mg/kg) administrado em camundongos submetidos a uma dieta rica em frutose, modelo de resistência insulínica, reduziu o percentual de Hb-glicada de 2,30 para 1,28%, os níveis de frutamina (1,30 para 0,84 mmol) e AGEs (65,20 para 43,40 unidades arbitrárias) quando comparado ao grupo controle (dieta somente). O ácido rosmarínico protegeu os animais por reduzir a glicação proteica e a formação de proteínas modificadas (VANITHADEVI; ANURADHA, 2008). A atividade antiglicação

do alecrim é comparável a várias ervas aromáticas e especiarias, como o orégano, sálvia, pimenta preta, canela, entre outras (DEARLOVE, 2007).

A contribuição do alecrim na redução da glicação protéica está associada à presença dos flavonoides, uma vez que estes compostos também apresentam capacidade antiglicação. Wu *et al.* (2009) avaliaram extratos da espécie *Psidium guajava* L. ricos em flavonoides e seus compostos isolados, entre eles os flavonoides catequina e quercetina, nos processos de glicação de proteínas. Os compostos fenólicos, especialmente, os flavonoides, foram determinantes nas propriedades antiglicação investigadas em chás, inclusive na espécie *Camellia sinensis* (DEETAE *et al.*, 2012).

A redução das concentrações séricas de TBARS pela FHA é um efeito protetor do alecrim em animais diabéticos. A redução de TBARS também foi observada no estudo utilizando a epilocatequina, no qual o tratamento de ratos diabéticos com epilocatequina (25 mg/kg) por oito semanas atenuou o aumento de MDA no tecido hepático (ROGHANI; BALUCHNEJADMOJARAD, 2010).

O diabetes foi bem caracterizado não só pela hiperglicemia, mas também pela baixa capacidade antioxidante. A atividade das enzimas antioxidantes foi alterada no diabetes. No tecido cardíaco, a STZ aumentou a atividade da enzima CAT em todos os grupos diabéticos em relação ao controle ($p < 0,05$). Não foi observada alteração na atividade da SOD e GPx (Figura 19).

A STZ no tecido hepático promoveu redução na atividade das enzimas SOD, CAT e GPx. O tratamento com EA (50 mg/kg) preservou a atividade destas enzimas como no controle ($p > 0,05$). A FHA nas duas concentrações promoveu aumento apenas da atividade da enzima SOD (Figura 20).

No tecido renal, a STZ diminui a atividade da SOD e CAT, e aumentou a atividade da GPx ($p < 0,05$). O tratamento com EA (50 mg/kg) e FHA (25 mg/kg) preservou a atividade da SOD como observado no controle ($p > 0,05$), enquanto que a FHA (50 mg/kg) estimulou significativamente a atividade da SOD. A atividade da CAT foi estimulada pelo EA. A GPx teve sua atividade normalizada pelo EA e FHA semelhante ao controle (Figura 21).

Figura 19. Atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx do tecido cardíaco. Ratos controle e diabéticos foram tratados com água (D-H₂O), EA de alecrim na concentração de 50 mg/kg de peso corpóreo ou fração FHA (D-FHA25 e D-FHA50) por quatro semanas. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Letras diferem entre si estatisticamente com $p < 0,05$.

Figura 20. Atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx do tecido hepático. Ratos controle e diabéticos foram tratados com água (D-H₂O), EA de alecrim na concentração de 50 mg/kg de peso corpóreo ou fração FHA (D-FHA25 e D-FHA50) por quatro semanas. Os resultados são expressos como média e desvio padrão. Letras diferem entre si estatisticamente com $p < 0,05$.

Figura 21. Atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx do tecido renal. Ratos controle e diabéticos foram tratados com água (D-H₂O), EA de alecrim na concentração de 50 mg/kg de peso corpóreo ou fração FHA (D-FHA25 e D-FHA50) por quatro semanas. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Letras diferem entre si estatisticamente com $p < 0,05$.

O estresse oxidativo tem sido relatado em várias complicações diabéticas, mostrando a associação do aumento na produção das espécies reativas de oxigênio e atividade antioxidante insuficiente no diabetes (SHANMUGAM *et al.*, 2011). Neste sentido, o efeito do EA e FHA de alecrim na atividade das enzimas antioxidantes do coração, fígado e rim de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina foi investigado, e os resultados obtidos mostraram o efeito protetor dos compostos presentes tanto no EA como na FHA em aumentar a proteção antioxidante e evitar assim o dano a estes tecidos.

Enzimas como a SOD, CAT e GPx são essenciais para o sistema de defesa intracelular contra as espécies reativas. Superóxido e H₂O₂ gerados durante a redução do oxigênio molecular ou por outras reações redox são removidos pelas enzimas SOD e CAT, respectivamente, formando produtos menos tóxicos. A diminuição na atividade da CAT leva ao acúmulo de H₂O₂, mas dependendo do compartimento celular o H₂O₂ pode ser degradado pela atividade compensatória da GPx. Redução da atividade das enzimas antioxidantes pode ser consequência da hiperglicemia, uma vez que estas proteínas podem ser glicadas ou oxidativamente

modificadas após exposição a altas concentrações de glicose (SHANMUGAM *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2011; VANITHADEVI; ANURADHA, 2008). Anteriormente, Pigeolet *et al.* (1990) reportaram a inativação parcial da atividade dessas enzimas pelas espécies reativas: radical hidroxila e peróxido de hidrogênio.

A atividade reduzida das enzimas SOD e CAT pode ser atribuída à redução na expressão protéica em condições diabéticas, como observado no tecido hepático de animais diabéticos (SINDHU *et al.*, 2004). Esses achados justificam a atividade reduzida da SOD e CAT encontrada nos tecidos hepático e renal de ratos diabéticos (Figuras 20 e 21).

No entanto, aumento na atividade destas enzimas em ratos diabéticos pode ser observado com dietas e extratos vegetais ricos em compostos fenólicos. Dieta suplementada com 1 e 2% de gengibre por 30 dias resultou em atividade hipoglicêmica e aumento dose-dependente da atividade das enzimas SOD, CAT, GPx e GR em ratos diabéticos (SHANMUGAM *et al.*, 2011).

Assim como o EA de alecrim, o extrato aquoso da espécie *Pterocarpus santalinus* L. na concentração de 250 mg/kg reduziu Hb-glicada de 5,7 a 2,9% quando associado à vitamina E em ratos diabéticos. A redução da Hb-glicada foi acompanhada pela melhora das defesas antioxidantes, caracterizada pelo aumento na atividade das enzimas CAT e GPx de eritrócitos e consequentemente, redução das concentrações de TBARS (HALIM; MISRA, 2011).

O tratamento com extrato de chá verde (1,5% peso/volume) melhorou de forma expressiva o estado antioxidante do tecido hepático de ratos diabéticos, isto foi demonstrado pela manutenção da atividade da SOD, CAT, GPx e GSH semelhante ao grupo controle saudável (ABOLFATHI *et al.*, 2012).

Resultados similares foram obtidos por Bakirel *et al.* (2008), quando avaliaram o efeito do extrato etanólico de alecrim em coelhos diabéticos induzidos por aloxana e verificaram que o tratamento com a dose de 200 mg/kg inibiu a peroxidação lipídica e aumentou a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT no soro de animais diabéticos.

Estes achados foram observados por Silva *et al.* (2011) em ratos diabéticos tratados com EA de alecrim na dose de 50 mg/kg. Os marcadores de estresse oxidativo foram atenuados nos tecidos hepático e cerebral, no entanto, não foi observado efeito dose-dependente nas concentrações de 25 e 100 mg/kg.

Mais recentemente Khalil *et al.* (2012) confirmaram a proteção do EA de alecrim no diabetes. Ratos diabéticos tratados com 200 mg/kg de EA de alecrim tiveram redução significativa das concentrações de glicose e dos marcadores de estresse oxidativo no soro, incluindo TBARS e óxido nítrico, além de aumento dos antioxidantes enzimáticos como a glutathione transferase (GST), CAT, GPx, e dos antioxidantes não enzimáticos (vitamina C e GSH).

A influência do EA e FHA na atividade das enzimas antioxidantes dos tecidos hepático e renal sugere que o tratamento com EA e FHA de alecrim manteve as defesas contra o excesso das EROs e exerceu efeito terapêutico no diabetes experimental, diminuindo o estresse oxidativo e, provavelmente, o dano hepático e renal. Os mecanismos envolvidos não são conhecidos, mas acreditamos que os compostos presentes no EA e FHA: i) diminuem a produção das espécies reativas, por atuarem diretamente sobre os efeitos da hiperglicemia; ii) atuem como antioxidantes diretos, eliminando as espécies reativas e assim, diminuindo a oxidação protéica e mantendo consequentemente a atividade das enzimas antioxidantes; iii) estão associados a mecanismos transcricionais que envolvem o fator de transcrição Nrf2 estimulando a transcrição de genes envolvidos na defesa antioxidante.

- **Efeito da administração da fração de ácidos fenólicos livres (AFL) e do ácido caféico em ratos diabéticos.**

O ácido caféico foi escolhido como padrão de ácido fenólico, uma vez que foi identificada sua presença no alecrim e por estar associado ao aumento do estado antioxidante em ratos diabéticos (OKUTAN *et al.*, 2005). Associada a esta informação, a fração AFL contém elevado conteúdo dos ácidos rosmarínico e carnósico, e fenólicos totais quando comparadas às demais, AFS e AFI (Tabela 5). O ácido rosmarínico é imediatamente metabolizado e um dos seus metabólitos é o ácido caféico. Portanto, alguns dos efeitos do ácido rosmarínico são atribuídos ao ácido caféico (GAMARO *et al.*, 2011). Estas informações justificam a escolha da AFL e do ácido caféico neste ensaio.

Os ratos diabéticos induzidos com STZ (40mg/kg, via endovenosa) expostos à doença por 35 dias apresentaram quadro típico de diabetes *mellitus* tipo I. A destruição parcial das células β pancreáticas pela STZ mimetizou o estado

diabético dependente de insulina, que foi caracterizado por ganho de peso reduzido, aumento no consumo de ração (polifagia) e aumento na ingestão de água (polidipsia) (Tabela 10).

O tratamento com a fração AFL ou ácido caféico não foi capaz de aumentar o ganho de peso, reduzir o consumo de ração e ingestão de água dos animais quando comparados ao grupo diabético controle.

Tabela 10. Ganho de peso (g), consumo de ração (g/dia) e ingestão de água (mL/dia) de ratos controle e diabéticos tratados com água (D-H₂O), fração de ácidos fenólicos nas concentrações de 10 e 25 mg/kg de peso corpóreo (D-AFL 10 e D-AFL 25) ou ácido caféico na concentração de 25 mg/kg (D-AC 25) por 35 dias.

Grupos	Ganho de peso (g)	Consumo de ração (g/dia)	Ingestão de água (mL/dia)
Controle	112,46 ± 6,87 ^a	30,99 ± 2,83 ^a	43,36 ± 5,96 ^a
D-H ₂ O	70,05 ± 7,36 ^b	44,70 ± 4,33 ^b	160,03 ± 19,16 ^b
D-AFL 10	81,06 ± 20,79 ^b	44,08 ± 5,72 ^b	151,68 ± 49,78 ^b
D-AFL 25	71,39 ± 12,97 ^b	45,17 ± 3,70 ^b	159,47 ± 13,09 ^b
D-AC 25	69,01 ± 4,96 ^b	43,10 ± 8,48 ^b	157,24 ± 56,56 ^b

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Letras na mesma coluna diferem entre si estatisticamente com $p < 0,05$.

A hiperglicemia crônica e persistente foi observada em todos os grupos diabéticos como apresentado na Tabela 11, indicando concentrações aumentadas de glicemia no início do tratamento. Estes valores não foram reduzidos com a administração da fração AFL e ácido caféico, indicando que a AFL e o ácido caféico não apresentam propriedades hipoglicemiantes nestas condições.

Tabela 11. Glicemia inicial e glicemia final de ratos controle e diabéticos tratados com água (D-H₂O), fração de ácidos fenólicos nas concentrações de 10 e 25 mg/kg de peso corpóreo (D-AFL 10 e D-AFL 25) ou ácido caféico na concentração de 25 mg/kg (D-AC 25) por 35 dias.

Grupos	Glicemia inicial (mg/dL)	Glicemia final (mg/dL)
Controle	115,83 ± 7,25 ^a	97,83 ± 8,18 ^a
D-H ₂ O	335,00 ± 26,94 ^b	344,50 ± 24,75 ^b
D-AFL 10	338,00 ± 121,33 ^b	427,00 ± 25,16 ^c
D-AFL 25	332,33 ± 65,14 ^b	399,50 ± 62,93 ^{bc}
D-AC 25	337,00 ± 88,66 ^b	367,25 ± 66,11 ^{bc}

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Letras na mesma coluna diferem entre si estatisticamente com $p < 0,05$.

Percentuais elevados de hemoglobina glicada foram observados nos grupos diabéticos ($p < 0,05$) (Figura 22), embora nenhuma alteração tenha sido observada nas concentrações de TBARS séricas quando comparados ao grupo controle (Figura 23).

Figura 22. Percentual de hemoglobina glicada. Ratos controle e diabéticos foram tratados com água (D-H₂O), fração de ácidos fenólicos nas concentrações de 10 e 25 mg/kg de peso corpóreo (D-AFL 10 e D-AFL 25) ou ácido caféico na concentração de 25 mg/kg (D-AC 25) por 35 dias. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Letras diferem entre si estatisticamente com $p < 0,05$.

Figura 23. Concentrações séricas de TBARS. Ratos controle e diabéticos foram tratados com água (D-H₂O), fração de ácidos fenólicos nas concentrações de 10 e 25 mg/kg de peso corpóreo (D-AFL 10 e D-AFL 25) ou ácido caféico na concentração de 25 mg/kg (D-AC 25) por 35 dias. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Letras diferem entre si estatisticamente com $p < 0,05$.

Na figura 24 encontram-se os resultados para a determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH), TBARS e avaliação da atividade das enzimas SOD, CAT e GPx no tecido cardíaco. Foram observados valores elevados nas concentrações de GSH e TBARS, e na atividade da enzima CAT no grupo diabético ($p < 0,05$). No entanto, a atividade da SOD e GPx foi reduzida significativamente ($p < 0,05$). O tratamento com a fração de ácidos fenólicos livres (AFL) na maior concentração aumentou a atividade da SOD e GPx, mas este aumento não foi acompanhado pela redução dos níveis de TBARS, diferentemente do ácido caféico que reduziu TBARS no tecido cardíaco e aumentou atividade das três enzimas quando comparado ao grupo diabético água (D-H₂O).

A Figura 25 apresenta os marcadores de estresse oxidativo no tecido hepático. Houve aumento significativo da GSH e redução da atividade da SOD nos animais diabéticos. A AFL não alterou estes marcadores, ao contrário do ácido caféico que reduziu níveis de GSH e aumentou a atividade das enzimas SOD e GPx quando comparado ao controle saudável e ao diabético ($p < 0,05$).

No que se refere aos marcadores de estresse oxidativo do tecido renal, observou-se aumento nas concentrações de GSH e na atividade das enzimas SOD e GPx, e redução da CAT. Não foram observadas diferenças na atividade da GPx entre os grupos diabéticos. A fração AFL nas duas concentrações aumentou a atividade da SOD e CAT quando comparadas ao grupo diabético. O ácido caféico

parece reduzir TBARS e esta redução pode estar associada com o aumento da SOD e CAT (Figura 26).

Figura 24. Marcadores de estresse oxidativo: GSH, TBARS, SOD, CAT e GPx do tecido cardíaco. Ratos controle e diabéticos foram tratados com água (D-H₂O), fração de ácidos fenólicos nas concentrações de 10 e 25 mg/kg de peso corpóreo (D-AFL 10 e D-AFL 25) ou ácido caféico na concentração de 25 mg/kg (D-AC 25) por 35 dias. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Letras diferem entre si estatisticamente com $p < 0,05$.

Figura 25. Marcadores de estresse oxidativo: GSH, TBARS, SOD, CAT e GPx do tecido hepático. Ratos controle e diabéticos foram tratados com água (D-H₂O), fração de ácidos fenólicos nas concentrações de 10 e 25 mg/kg de peso corpóreo (D-AFL 10 e D-AFL 25) ou ácido caféico na concentração de 25 mg/kg (D-AC 25) por 35 dias. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Letras diferem entre si estatisticamente com $p < 0,05$.

Figura 26. Marcadores de estresse oxidativo: GSH, TBARS, SOD, CAT e GPx do tecido renal. Ratos controle e diabéticos foram tratados com água (D-H₂O), fração de ácidos fenólicos nas concentrações de 10 e 25 mg/kg de peso corpóreo (D-AFL 10 e D-AFL 25) ou ácido caféico na concentração de 25 mg/kg (D-AC 25) por 35 dias. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Letras diferem entre si estatisticamente com $p < 0,05$.

Ao contrário dos resultados obtidos por Vanithadevi e Anuradha (2008) com o ácido rosmarínico, efeito protetor não foi observado para a fração de ácidos fenólicos livres (AFL) que contém expressiva quantidade deste composto fenólico. O ácido rosmarínico quando administrado na dose de 100 mg/kg por via intragástrica a camudongos submetidos a dieta rica em frutose, atenuou a glicação de proteínas, as alterações nos parâmetros metabólicos, a inativação do sistema glicoxalase e a depleção dos antioxidantes não enzimáticos (GSH, vitaminas E e C), além de aumentar a atividade das enzimas antioxidantes no tecido hepático.

Os resultados obtidos para a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e GR são muitas vezes controversos. Em modelos experimentais, incluindo o diabetes induzido por STZ e a hipercolesterolemia, a atividade dessas enzimas encontrou-se aumentada ou diminuída (LEI; VATAMANIUK, 2011; SILVA *et al.*, 2011; AFONSO, 2010).

Neste ensaio, o diabetes foi associado com aumento significativo de GSH nos três tecidos avaliados; por redução da atividade da SOD no coração e fígado e aumento no rim. A CAT foi aumentada no coração e reduzida no rim e a GPx reduzida no coração e aumentada no rim. O tratamento com AFL não foi acompanhado por redução da Hb-glicada, níveis de TBARS e GSH.

Aumento significativo nos níveis de GSH e na atividade das enzimas antioxidantes observado nos tecidos avaliados pode estar associado ao mecanismo de defesa celular ligado ao fator de transcrição Nrf2 que é ativado pelas espécies reativas e leva ao aumento na transcrição dos genes GCL, SOD, CAT e GPx como forma de atenuar os efeitos deletérios causados pelas EROs (JOHNSON *et al.*, 2008). As concentrações aumentadas de GSH também podem indicar aumento na atividade da glutathiona redutase, convertendo GSSG em GSH (ZHU *et al.*, 2012). Enquanto que a atividade reduzida das enzimas pode representar inativação parcial pelos radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio (SHANMUGAM *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2011; VANITHADEVI; ANURADHA, 2008; PIGEOLET *et al.*, 1990).

Diferenças significativas foram encontradas com o ácido caféico. Em ratos diabéticos tratados com ácido caféico notou-se proteção do tecido cardíaco observada pela redução de TBARS e atividade aumentada das três enzimas. Okutan *et al.* (2005) ao avaliarem tecido cardíaco de ratos diabéticos tratados com 10 µmol/kg de ácido caféico por via intraperitoneal durante oito semanas observaram redução de TBARS e normalização na atividade das enzimas SOD e CAT semelhante ao grupo controle. No que se refere às concentrações de TBARS e comportamento das enzimas antioxidantes, proteção semelhante foi observada no tecido hepático (YILMAZ *et al.*, 2004) e cerebral. No cérebro, a proteção antioxidante foi acompanhada pela redução na expressão das citocinas inflamatórias TNF-α e IFN-γ e da enzima iNOS (CELIK; ERDOGAN, 2008).

O ácido caféico quando oferecido pela dieta na concentração de 0,02% por cinco semanas a camundongos C57BL/KsJ-*db/db*, modelo de diabetes tipo 2, foi capaz de reduzir o percentual de hemoglobina glicada de 13,48 a 11,11%, aumentar a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx tanto no eritrócito quanto no tecido hepático, além de reduzir TBARS e H₂O₂. O aumento da atividade das enzimas foi acompanhado pelo aumento da expressão gênica no tecido hepático no fígado (JUNG *et al.*, 2006).

Os resultados obtidos neste estudo reforçam a atividade antioxidante do ácido caféico em animais diabéticos, e corroboram com os dados encontrados na literatura, ficando evidente a capacidade dos ácidos fenólicos em modular atividade e/ou expressão das enzimas antioxidantes, sendo estes importantes no estresse oxidativo (YEH; CHING; YEN, 2009; YEH; YEN, 2006^a).

4.4. Atividade anti-inflamatória *in vitro*

- Inibição da enzima lipoxigenase (LOX)

Para avaliar a capacidade anti-inflamatória *in vitro* dos compostos presentes no EA e suas frações, foi realizado o ensaio de inibição da atividade da enzima lipoxigenase (LOX).

O valor de IC₅₀ foi calculado a partir de uma curva de resposta em função da concentração de cada amostra. Para o extrato aquoso, Fr HA e Fr Aq foram feitas curvas de resposta nas concentrações que variaram de 6,25 a 100 µg de peso seco. Para a fração etanólica (Fr Et), a curva resposta foi feita de 0,625 a 10 µg de peso seco desta fração.

O valor de IC₅₀ corresponde à quantidade necessária de cada amostra para inibir 50% da atividade da lipoxigenase. Os resultados estão apresentados na Tabela 12. Tanto o EA como suas frações inibiram a atividade da LOX *in vitro*, os valores variaram de 14,23 a 81,79%. Para os valores de IC₅₀ determinados, a Fr Et mostrou ser o mais potente inibidor da LOX *in vitro* (IC₅₀=3,73 µg), seguida pela Fr HA (24,14 µg), EA (78,66 µg) e Fr Aq (86,66 µg).

Tabela 12. Inibição *in vitro* da atividade da enzima LOX pelo EA e suas frações.

Extrato e frações	IC ₅₀ (µg de peso seco)
EA	78,66
Fr Et	3,73
Fr HA	24,14
Fr Aq	86,66

Os resultados representam valores de IC₅₀.

Os extratos hexânico, metanólico e acetônico de alecrim apresentaram acentuados efeitos inibitórios na atividade da LOX (CHEN; SHI; HO, 1992), como observados neste estudo.

O mecanismo pelo qual os compostos presentes no EA e suas frações inibiram a atividade da LOX pode ser explicado pela capacidade de atuarem como inibidores *redox* da enzima (YOUNG, 1999). Este mecanismo está relacionado com a quantidade de compostos fenólicos que justifica o maior desempenho observado

pela Fr Et, uma vez que esta fração destacou-se entre as demais por conter maior quantidade de fenólicos e flavonoides totais por mg de fração.

A presença de flavonoides explica a atividade inibitória do EA e suas frações, pois tem sido sugerida uma modificação covalente irreversível da LOX pelos flavonoides durante a formação do radical peroxil. Os flavonoides são co-oxidados a semi-quinona ou quinona, que por sua vez podem se ligar aos grupos sulfidril ou amino da enzima LOX causando sua inibição (BANERJEE, 2006). É possível que mecanismo semelhante tenha ocorrido pelos flavonoides do alecrim, no entanto, trata-se mais de uma inibição por interação física do que propriamente biológica.

Os compostos fenólicos podem bloquear o metabolismo do ácido araquidônico por inibir a atividade da LOX, e podem servir como *scavenger* das EROs que são produzidas durante o metabolismo do ácido araquidônico (AKULA; ODHAV, 2008).

Trouillas e colaboradores (2003) investigaram a capacidade do extrato aquoso de 16 espécies em inibir a atividade da LOX *in vitro*. Eles verificaram que o alecrim estava entre as três espécies com maior atividade inibitória da LOX e, portanto, apresentaram os menores valores de IC₅₀ quando comparadas as demais. Os valores de IC₅₀ obtidos para os extratos aquosos foram 0,46; 0,52 e 0,65 mg/mL para a *Filipendula ulmaria*, *Alchemilla vulgaris* e *Rosmarinus officinalis*, respectivamente. Este desempenho foi acompanhado pela maior capacidade *scavenger* dos radicais hidroxila, superóxido e DPPH.

Associação entre quantidade de compostos fenólicos e capacidade de inibir a atividade da LOX também foi relatada por Charami *et al.* (2008) ao avaliarem extratos e compostos isolados da espécie *Sideritis perfoliata* do gênero Lamiaceae, o mesmo do qual o alecrim faz parte.

Correlação entre as atividades antioxidante (varredura do radical DPPH) e anti-inflamatória com o conteúdo de fenólicos totais foi observada em 18 espécies de plantas. Extratos metanólicos com maior atividade antioxidante e conteúdo de fenólicos totais apresentaram maior capacidade de inibir a LOX quando comparados aos extratos aquosos. Valores de IC₅₀ para extratos metanólicos variaram de 21,8 a 81,4 µg/mL para as espécies *Bidens pilosa* e *Emex aistralis*, respectivamente. O menor valor de IC₅₀ foi observado para a rutina (7,3 µg/mL) demonstrando sua maior eficiência (AKULA; ODHAV, 2008).

Os resultados obtidos com a capacidade do EA e suas frações em inibir a atividade da enzima LOX, envolvida no metabolismo do ácido araquidônico e formação de mediadores inflamatórios, deram subsídios para explorar essa atividade *in vivo*.

4.5. Atividade anti-inflamatória *in vivo*

- **Efeito do EA no modelo de edema de pata induzido por carragenina**

Os efeitos inibitórios do EA de alecrim e indometacina no edema de pata induzido por carragenina estão apresentados na Figura 27. No grupo controle, a carragenina causou edema localizado a partir da primeira hora após a injeção de carragenina, e este edema aumentou progressivamente até a terceira hora. Quando o EA e indometacina foram administrados observou-se inibição significativa do edema nos mesmos tempos avaliados.

O EA de alecrim na concentração de 200 mg/kg apresentou atividade comparável a do padrão indometacina na maioria dos tempos avaliados, correspondentes a 2^a, 4^a, 5^a e 6^a hora, diferindo estatisticamente da indometacina apenas na primeira e terceira hora.

Figura 27. Efeito do EA de alecrim no modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos. EA de alecrim (200 mg/kg), indometacina (10 mg/kg) ou veículo (água – controle) foram administrados uma hora antes da injeção de carragenina e os ratos foram avaliados nos tempos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas após injeção de carragenina. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão. Letras diferem entre os grupos no mesmo tempo estatisticamente com $p < 0,05$.

Recentemente, vem aumentando o interesse de produtos derivados de plantas, por estas serem historicamente fonte de obtenção de agentes terapêuticos. A seleção natural e competição entre as espécies levaram à síntese de metabólitos secundários, e muitos são utilizados como drogas com atividades biológicas. Neste sentido, justificam-se estudos que buscam novos extratos ou compostos isolados com propriedades farmacológicas (GAMARO *et al.*, 2011).

No presente estudo, foi comprovado que o EA de alecrim exibe efeito anti-inflamatório expressivo no edema de pata induzido por carragenina. A capacidade anti-inflamatória do EA foi avaliada no curso da inflamação (1^a, 2^a, 3^a, 4^a, 5^a e 6^a hora após estímulo com carragenina), demonstrando que este é efetivo na redução do edema da pata nas duas fases da inflamação, comparável ao anti-inflamatório utilizado, indometacina.

O edema de pata induzido por carragenina é um modelo bem definido de inflamação aguda em que uma variedade de mediadores inflamatórios participa deste evento. Já está bem caracterizado que a infiltração de leucócitos polimorfonucleares (PMN), liberação de prostaglandinas, citocinas e óxido nítrico,

além da formação de espécies reativas, estão envolvidas na patogênese da inflamação e infecções (KATHIRAVAN; SHWETHA, 2012; LOGANAYAKI; SIDDHURAJU; MANIAN, 2012; SADEGHI *et al.*, 2011).

O modelo de edema de pata apresenta comportamento bifásico. Isto foi verificado durante a avaliação da medida da pata no curso da inflamação (Figura 27). Como observado no gráfico, há liberação das substâncias serotonina, bradicinina e aminas vasoativas nas primeiras horas, enquanto que a terceira hora é marcada pelo pico de liberação de mediadores inflamatórios, no qual os neutrófilos e prostaglandinas atuam de forma significativa. Neste sentido, substâncias que atuam inibindo o recrutamento de neutrófilos ou a atividade da COX-2 podem ter papel importante na inflamação (DUSSOSSOY *et al.*, 2011; CHOUHAN; SINGH, 2011).

Os resultados deste estudo são similares aos obtidos com o extrato etanólico de alecrim nas concentrações de 250 e 500 mg/kg no edema de pata induzido por bradicinina, que podem estar associados com a redução na produção de óxido nítrico e melhora do estado antioxidante (KATHIRAVAN; SHWETHA, 2012).

A atividade anti-inflamatória do alecrim pode ser atribuída, em parte, à presença de compostos fenólicos e flavonoides. Mengoni *et al.* (2011) avaliaram os efeitos de extratos e compostos purificados de folhas frescas de alecrim e reportaram o efeito dos componentes principais, o ácido carnósico e carnosol, na redução da expressão gênica da IL-1 β e TNF- α , e na inibição seletiva da COX-2 no modelo de edema de orelha induzido por PMA (4 α -forbol 12-miristato 13-acetato). Foi demonstrado que tanto os compostos isolados quanto o extrato etanólico inibiram significativamente (dose-dependente) a produção de óxido nítrico em células RAW 264.7.

Os ácidos rosmarínico e cafeíco, presentes no alecrim, também podem contribuir com a capacidade anti-inflamatória. Em ratos pré-tratados com os ácidos rosmarínico e cafeíco nas concentrações de 5 e 10 mg/kg e submetidos ao modelo de pleurisia induzida por carragenina, observou-se redução no número de leucócitos que migraram para a cavidade pleural. As propriedades anti-inflamatórias do ácido rosmarínico foram atribuídas à inibição da atividade da lipoxigenase e ciclooxigenase, e da expressão de citocinas inflamatórias. O ácido cafeíco apresentou atividade anti-inflamatória devido sua capacidade antioxidante e por inibir a 5-lipoxigenase (5-LOX) e a proteína quinase C (PKC) (GAMARO *et al.*, 2011).

A atividade anti-inflamatória do alecrim também foi investigada por Melo *et al.* (2011). A administração do óleo essencial de alecrim reduziu o número de leucócitos que rolou, aderiu e migrou no ensaio de microscopia intravital após a injeção de carragenina, além de ter inibido significativamente a quimiotaxia de leucócitos pelo ensaio da caseína, comprovando o efeito do óleo essencial na inibição da migração leucocitária *in vivo* e *in vitro*.

Com base nos resultados apresentados, as propriedades anti-inflamatórias do extrato aquoso de alecrim podem estar relacionadas com a inibição da síntese dos metabólitos do ácido araquidônico, da migração celular e com a capacidade antioxidante do extrato, uma vez que as EROs tem efetiva participação na inflamação.

Para investigar os principais mecanismos envolvidos na atividade anti-inflamatória do EA, avaliamos a atividade anti-inflamatória pelo modelo de bolsa de ar.

- **Efeito do EA no modelo da bolsa de ar**

A atividade anti-inflamatória do EA de alecrim e os seus possíveis mecanismos foram investigados no modelo de bolsa de ar em ratos submetidos ao estímulo com carragenina. Aumento significativo foi observado no número de leucócitos no local da inflamação. As células presentes no exsudato de bolsas não estimuladas são, predominantemente, os neutrófilos. Nestas bolsas podem ser colhidas entre 1×10^6 e 5×10^6 de células (Figura 28).

A infiltração celular significativa ocorre em resposta à injeção de carragenina. Este exsudato tem sido bem caracterizado e consiste principalmente de células polimorfonucleares (87%) durante as primeiras 24 horas com aumento gradual em células mononucleares (25 %) até as 48 horas (DUARTE; VASKO; FEHRENBACHER, 2012)

O número de leucócitos recrutados da circulação periférica é indicado principalmente pelo aumento do número de neutrófilos após a indução da inflamação. O EA reduziu significativamente a migração de células para a bolsa, quando comparado ao grupo carragenina, seus efeitos foram similares à indometacina.

A indometacina (30 mg/kg), na mesma dose utilizada neste estudo, reduziu aproximadamente 80% do número de leucócitos totais no exsudato (JAIN; PARMAR, 2011).

Figura 28. Efeito do EA de alecrim no número de leucócitos totais e polimorfonucleares do exsudato de ratos submetidos ao estímulo com carragenina. Os animais foram pré tratados com veículo (água), indometacina (30 mg/kg) ou EA de alecrim em três concentrações (100, 200 e 400 mg/kg de peso, via intragástrica), e uma hora depois submetidos ao estímulo com injeção de carragenina 1%. O exsudato foi coletado 4 horas da carragenina. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão. Letras diferem entre si estatisticamente com $p < 0,05$.

Metabólitos secundários de plantas são conhecidos por interferir direta ou indiretamente nos mecanismos envolvidos na inflamação, como nos mediadores inflamatórios (metabólitos do ácido araquidônico, peptídeos e citocinas), na produção e/ou ação dos segundos mensageiros (cGMP, cAMP, várias proteínas quinases, cálcio, entre outros), na ativação de fatores de transcrição (NF- κ B), e na expressão de genes próinflamatórios (iNOS, COX-2, IL-1 β e TNF- α), neuropeptídeos e proteases (CALIXTO; OTUKI; SANTOS, 2003).

A carragenina induziu a produção dos mediadores próinflamatórios, tais como prostaglandinas, leucotrienos e citocinas. Aumento destes mediadores é geralmente observado após uma hora do estímulo com a carragenina e o pico de liberação pode ser observado momentos depois, dependendo do mediador estudado. Neste estudo, a inflamação foi acompanhada pelo aumento das concentrações de LTB₄, PGE₂, TNF- α , IL-6 e CINC-1. Em resposta ao tratamento com indometacina, diminuição significativa foi observada nas concentrações de PGE₂, TNF- α e IL-6. O tratamento com EA de alecrim foi capaz de reduzir as

concentrações de LTB₄, PGE₂, TNF- α e IL-6. Os melhores efeitos foram obtidos para a maior dose (400 mg/kg). Os resultados estão apresentados na Figura 29.

Figura 29. Efeito do EA de alecrim nas concentrações de LTB₄, PGE₂, TNF- α , IL-6 e CINC-1 no exsudato de ratos submetidos ao estímulo com carragenina. Os animais foram pré-tratados com veículo (água), indometacina (30 mg/kg) ou EA de alecrim em três concentrações (100, 200 e 400 mg/kg de peso, via intragástrica), e uma hora depois submetidos ao estímulo com injeção de carragenina 1%. O exsudato foi coletado 4 horas depois da carragenina. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão. Letras diferem entre si estatisticamente com $p < 0,05$.

Compostos isolados e extratos de plantas exibiram atividade anti-inflamatória por elevar os níveis de IL-10 (citocina anti-inflamatória), reduzir produção de TNF- α e IL-6, ou reduzir a expressão da COX-2 e iNOS (MUELLER; HOBIGER; JUNGBAUER, 2010).

A PGE2 é sintetizada em quantidades substanciais nos locais de inflamação, onde atua como um potente vasodilatador e provoca aumento da permeabilidade vascular e edema em sinergismo com outros mediadores. O LTB4 é quimiotático para neutrófilos e é importante na infiltração característica destas células na resposta inflamatória aguda. A PGE2 aumenta a atividade quimiotática de LTB4 (HE; DAI, 2011).

A redução significativa nas concentrações de LTB4 e PGE2 pelo EA de alecrim mostrou seu efeito inibitório sobre a via inflamatória mediada pelos metabólitos do ácido araquidônico, possivelmente por reduzir a atividade da lipoxigenase e ciclooxigenase, respectivamente. Os resultados obtidos por Park (2011) *in vitro* ao estudar o efeito do ácido rosmarínico, em concentrações micromolares (0,05 e 0,1), na redução da atividade da enzima COX-2 dão suporte à essa afirmação.

Extrato aquoso da casca da espécie *Terminalia paniculata* quando administrado nas concentrações de 100, 200 e 400 mg/kg de peso corpóreo, mostrou atividade anti-inflamatória significativa por reduzir o volume do edema de pata induzido por carragenina, e na concentração de 400 mg/kg também reduziu a migração leucocitária ($50,92 \pm 5,71\%$) e atividade da mieloperoxidase ($49,31 \pm 5,24\%$) em exsudato da bolsa de ar (TALWAR *et al.*, 2011).

Ram *et al.* (2012) encontraram resultados similares aos do presente estudo, ao avaliarem o efeito do extrato aquoso de *Ajmodadi Churna* nas concentrações de 200 e 400 mg/kg sobre a migração de células polimorfonucleares na inflamação induzida por carragenina.

O TNF- α promove e amplifica a inflamação através da liberação de fatores quimiotáticos, como a CINC-1, molécula quimiotática que promove a migração de neutrófilos e eosinófilos. Um dos mecanismos para o efeito anti-inflamatório das proantocianidinas é a redução das concentrações de CINC-1, a qual diminui a migração de células inflamatórias no exsudato (GARBACKI *et al.*, 2004). A redução no recrutamento de neutrófilos pelo EA de alecrim não foi mediada pela inibição da CINC-1 (Figura 29).

In vitro, o extrato de alecrim obtido com DMSO na concentração de 0,5 mg/mL reduziu a concentração de IL-6 (92 ± 6 %) e de TNF- α (110 ± 24 %), e a expressão de COX-2 (113 ± 13 %) e iNOS (25 ± 7 %) no modelo de macrófagos estimulados com LPS (MUELLER; HOBIGER; JUNGBAUER, 2010).

As EROs desenvolvem papel importante na modulação da resposta inflamatória e consequentemente, na injúria celular e tecidual. Para avaliar a participação das EROs na resposta inflamatória, foi realizada a determinação de TBARS e atividade das enzimas antioxidantes SOD e GPx no exsudato. Os resultados apresentados na Figura 30 mostram aumento do estresse oxidativo caracterizado pela inibição das enzimas antioxidantes pelas EROs. O tratamento com indometacina aumentou a atividade da SOD e GPx, enquanto que o EA nas maiores concentrações (200 e 400 mg/kg) aumentou apenas a atividade da SOD. No entanto, este aumento foi suficiente para manter os níveis de peroxidação lipídica semelhantes à indometacina e ao controle.

Figura 30. Efeito do EA de alecrim na atividade das enzimas antioxidantes SOD e GPx e TBARS no exsudato de ratos submetidos ao estímulo com carragenina. Os animais foram pré-tratados com veículo (água), indometacina (30 mg/kg) ou EA de alecrim em três concentrações (100, 200 e 400 mg/kg de peso, via intragástrica), e uma hora depois submetidos ao estímulo com carragenina 1%. O exsudato foi coletado 4 horas depois da carragenina. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão. Letras diferem entre si estatisticamente com $p < 0,05$.

Trabalhos que avaliaram os marcadores de estresse oxidativo, como a atividade das enzimas antioxidantes e lipoperoxidação em exsudatos ou no tecido inflamado, seja o tecido da bolsa (no modelo de bolsa de ar) ou da pata (no modelo de edema de pata), são escassos.

Jain e Parmar (2011) observaram aumento na atividade da SOD em exsudato de ratos pré-tratados com indometacina (30 mg/kg, via subcutânea) e os flavonoides hesperidina (50 mg/kg, via subcutânea) e naringinina (30 mg/kg, via subcutânea). Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Liao *et al.* (2012) ao estudarem os constituintes da espécie *Cinnamomum cassia*. Um dos compostos desta espécie (aldeído cinâmico) reduziu o edema de pata em todas as concentrações estudadas, e nas de 2,5 e 5 mg/kg aumentou a atividade das enzimas CAT, SOD e GPx no tecido da pata.

Para excluir possíveis efeitos citotóxicos foi realizado o ensaio de viabilidade em neutrófilos obtidos da cavidade peritoneal de ratos. Não houve alteração na viabilidade de neutrófilos quando incubados com EA de alecrim nas concentrações de 1, 10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ em condições basais ou estimuladas com LPS. O percentual de células viáveis foi o mesmo para todas as concentrações de EA quando comparadas ao controle (Figura 31). Portanto, a inibição no recrutamento de neutrófilos pelo EA não foi por efeitos citotóxicos nestas células.

Figura 31. Efeito do EA de alecrim na viabilidade de neutrófilos. Os neutrófilos foram obtidos da cavidade peritoneal de ratos, quatro horas após a injeção local de glicogênio de ostra a 1% e incubados com EA de alecrim nas concentrações de 1, 10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ na presença ou ausência de LPS (5 $\mu\text{g/mL}$) por 18h. % de células viáveis foi avaliado com solução de *trypan blue* em câmara de Neubauer. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em média e desvio padrão.

A inflamação é iniciada por processos complexos desencadeados por agentes químicos ou patogênicos, como o lipossacarídeo (LPS), que é uma endotoxina. LPS pode ativar diretamente neutrófilos/macrófagos, que desencadeiam a produção de mediadores inflamatórios, como o NO e TNF- α (LIAO *et al.*, 2012). O NO tem sido implicado em diferentes condições patológicas. Quantidades excessivas de NO e PGE2 estão envolvidas no agravamento das doenças inflamatórias crônicas.

O estímulo de neutrófilos/macrófagos por LPS fornece um bom modelo para *screening* de atividade anti-inflamatória de drogas, compostos isolados e extratos vegetais, além de avaliar os inibidores das vias de sinalização que conduzem para a indução de enzimas e citocinas pró-inflamatórias.

A atividade inibitória do EA de alecrim na produção de NO *in vitro* foi avaliada em neutrófilos ativados por LPS. A estimulação com LPS levou ao aumento acentuado na produção de NO medido a partir dos níveis de nitrito (NO_2^-). Esta produção foi significativamente inibida pelo EA de alecrim. O EA inibiu a produção de NO em concentrações reduzidas (1 a 100 $\mu\text{g/mL}$), sugerindo que a atividade anti-inflamatória do EA também pode ser atribuída à sua capacidade de inibir a via envolvida na síntese de NO (Figura 32).

Figura 32. Efeito do EA de alecrim na produção de NO por neutrófilos. Os neutrófilos foram obtidos da cavidade peritoneal de ratos, quatro horas após a injeção local de glicogênio de ostra a 1% e incubados com EA de alecrim nas concentrações de 1, 10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ na presença ou ausência de LPS (5 $\mu\text{g/mL}$) por 18h. NO_2^- foi determinado no sobrenadante da cultura e os resultados foram expressos em μM de NO_2^- . Os resultados foram expressos em média e desvio padrão. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle com LPS.

A inibição na produção de NO pelos compostos presentes no alecrim também foi investigada por Tsai et al. (2007). Eles avaliaram o efeito de extratos metanólicos de várias especiarias, entre elas o tomilho, pimenta da Jamaica, manjerona, manjerição, orégano, canela e alecrim na produção de NO em macrófagos (células RAW 264.7) ativados por LPS e obtiveram os seguintes valores de IC₅₀ representados pelo percentual de extrato metanólico disponível na cultura (0,27 %, 0,26 %, 0,24 %, 0,16 %, 0,11 %, 0,06 % e 0,03 %, respectivamente). O extrato metanólico de alecrim (0,03 %) foi o mais eficiente em inibir a produção de NO, sem alterar a viabilidade dos macrófagos, como observado pelo EA de alecrim neste estudo (Figura 31).

Assim como o EA de alecrim, o ligustilide, o principal composto bioativo da espécie *Angelica sinensis*, inibiu a produção de NO em concentrações muito baixas (5 a 250 µM) em macrófagos estimulados com LPS. Esta redução foi acompanhada pela diminuição na síntese de PGE₂, TNF-α e EROs (SU et al., 2011).

A inibição na produção de NO em macrófagos é reduzida também pelas chalconas, precursoras na via biossintética dos flavonoides. Estes efeitos foram mediados pela inibição da iNOS e aumento na expressão da enzima hemoxigenase -1 (HO-1) (ABUARQOUB et al., 2006). O xantohumol, uma chalcona isolada da espécie *Humulus lupulus* L., reduziu os mediadores inflamatórios NO, IL-1β e TNF-α em células de microglia (BV2) através da sinalização do fator de transcrição Nrf2 e aumento da expressão da HO-1 (LEE et al., 2011).

O mecanismo pelo qual o EA de alecrim reduziu NO pode ser mediado pela redução na expressão da iNOS, COX-2 e do complexo NF-κB/p65, já observados por Kuo et al. (2011). Eles avaliaram o efeito do extrato obtido por extração supercrítica em diferentes concentrações na inibição da expressão desses genes e atribuíram a atividade anti-inflamatória ao ácido carnósico que estava presente no extrato e que foi avaliado isoladamente em cultura de macrófagos estimulados por LPS.

Os resultados sugerem que o EA de alecrim, assim como o extrato metanólico e o obtido por extração supercrítica, modula mecanismos presentes na inflamação por inibir a via do ácido araquidônico, reduzindo LTB₄ e PGE₂, a ativação do fator de transcrição NFκB, reduzindo TNF-α e IL-6, e a produção de NO pela iNOS. Os efeitos na redução do recrutamento de neutrófilos não foram

associados com inibição da CINC-1. Estudos de quimioxia de neutrófilos são necessários para investigar melhor o possível mecanismo envolvido na redução do recrutamento de neutrófilos para o sítio de inflamação.

Comprovando os efeitos do EA nos marcadores da inflamação aguda, os possíveis efeitos no modelo de inflamação crônica foram avaliados.

- **Atividade anti-inflamatória em ratos diabéticos**

Com o objetivo de avaliar o efeito do extrato aquoso (EA) e da fração hidroalcoólica (FHA) em ratos diabéticos, foram determinadas as concentrações séricas das citocinas TNF- α e IL-6.

Aumento significativo nas concentrações de citocinas próinflamatórias, TNF- α e IL-6, foi observado em ratos diabéticos induzidos por STZ, estes dados são consistentes com outros estudos (KHAN *et al.*, 2012; SHARMA *et al.*, 2011; KIRANA; SRINIVASAN, 2010). O tratamento com EA e FHA reduziu significativamente estas concentrações ($p < 0,05$), como apresentado na Figura 33.

Figura 33. Concentrações séricas das citocinas TNF- α e IL-6 de ratos controle e diabéticos. Ratos controle e diabéticos foram tratados com água (D-H₂O), EA (50 mg/kg) ou FHA (25 e 50 mg/kg) por 4 semanas. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Letras diferem entre si estatisticamente com $p < 0,05$.

TNF- α é predominantemente produzido em macrófagos, no entanto, pode ter inúmeros efeitos sistêmicos como diminuir a expressão do receptor de insulina e do transportador GLUT-4 em concentrações mais elevadas. Assim como o TNF- α ,

níveis circulantes de IL-6 também estão aumentados nos estados de resistência à insulina, como a obesidade, e no diabetes tipo 1 e 2. O TNF- α e IL-6 desempenham funções importantes na resistência à insulina e no processo de inflamação vascular através das suas ações múltiplas. Níveis elevados de TNF- α e IL-6 em ratos diabéticos induzidos por STZ são similares àqueles observados em pacientes diabéticos (TOPAL *et al.*, 2012; JAIN; RAINS; CROAD, 2007).

Os compostos bioativos presentes em extratos vegetais são conhecidos por modularem a inflamação no diabetes em diferentes tecidos e assim, reduzem as complicações crônicas. Extrato metanólico de *Crataegus microphylla* na dose 100 mg/kg reduziu as concentrações plasmáticas de TNF- α e IL-6, e atenuou a disfunção vascular associada à redução na expressão da iNOS em ratos diabéticos tratados por 30 dias (TOPAL *et al.*, 2012). As concentrações circulantes destas citocinas também foram normalizadas pelo extrato de *Semecarpus anacardium* na dose de 200 mg/kg em ratos diabéticos tratados por 30 dias (KHAN *et al.*, 2012).

O extrato aquoso e etanólico de *Psidium guajava* L. apresentaram efeitos protetores no rim de camundongos (Balb/c) diabéticos. Estes efeitos foram atribuídos à sua composição em fenólicos; o extrato aquoso (EA) continha expressiva quantidade de ácido caféico, miricetina e quercetina, enquanto que o extrato etanólico (EE) se destacou pelo alto conteúdo dos ácidos fenólicos cinâmico, cumárico e ferúlico. Dietas contendo 1 e 2% destes extratos e oferecidas por 12 semanas aumentaram a proteção antioxidante, caracterizada pelo aumento na atividade das enzimas SOD, CAT e GPx, e reduziram IL-6, TNF- α e IL-1 β no tecido renal (LIN; YIN, 2012).

A curcumina na dose de 100 mg/kg atenuou a inflamação renal em animais diabéticos por reduzir a expressão das citocinas próinflamatórias (TNF- α e IL-1 β) e infiltração de macrófagos no tecido, protegendo contra o desenvolvimento de nefropatia diabética (SOETIKNO *et al.*, 2011).

Os LTB₄ são um dos responsáveis pelo sinal quimiotático para células especializadas (neutrófilos, macrófagos e linfócitos), ajudando a desencadear a reação inflamatória (JEAN; BODINIER, 1994).

Concentrações de LTB₄ foram determinadas em ratos diabéticos. Concentrações reduzidas foram observadas no grupo diabético quando comparado ao controle. O tratamento com EA e FHA aumentou significativamente as concentrações de LTB₄ ($p < 0,05$). Os resultados estão apresentados na Figura 34.

Figura 34. Concentrações séricas de LTB4 de ratos controle e diabéticos. Ratos controle e diabéticos foram tratados com água (D-H₂O), EA (50 mg/kg) ou FHA (25 e 50 mg/kg) por 4 semanas. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Letras diferem entre si estatisticamente com $p < 0,05$.

Os leucócitos PMN constituem a primeira linha de defesa contra as infecções. No entanto, elevados níveis de glicose comprometem a funcionalidade destas células, explicando a susceptibilidade às infecções no diabetes. Nakagawa e Ishii (1996) demonstraram alterações na composição lipídica da membrana de leucócitos PMN de ratos diabéticos induzidos com STZ. Quantidade relativa de ácido araquidônico foi significativamente reduzida e de ácido linoléico aumentada nestes animais. No diabetes há alteração no metabolismo do ácido araquidônico e na modulação dos leucócitos PMN, bem como na redução da sua funcionalidade. Este último evento foi confirmado por Fortes *et al.* (1991) ao detectarem uma deficiente interação endotélio-leucócito com expressiva redução do número de células que rolaram de animais diabéticos induzidos por aloxana.

Isto explica concentrações reduzidas de LTB4 no soro de ratos diabéticos, como apresentado na Figura 34. No entanto, os compostos presentes no EA e FHA foram capazes de aumentar as concentrações de LTB4 nos ratos diabéticos, aumentando a funcionalidade das células PMN e provavelmente, diminuindo a susceptibilidade à infecção.

4.6. Atividade antioxidante em células HepG2

A viabilidade das células HepG2 expostas a condições basais (5,5 mM de glicose) e hiperglicêmicas (25, 50, 75 e 100 mM) foi avaliada em 24, 48 e 72 horas após incubação. Para avaliar se o efeito tóxico da glicose é dependente do número de células, foi realizado o ensaio de viabilidade com quantidades diferentes de células (4×10^3 , 8×10^3 ou 16×10^3 células/poço). Os resultados estão apresentados na Figura 35.

Após 24 horas de incubação, a viabilidade das HepG2 foi alterada pela condição hiperglicêmica quando estas estavam na quantidade igual a 4×10^3 células/poço e submetidas às concentrações de 75 e 100 mM de glicose. Nas quantidades de 8×10^3 e 16×10^3 células/poço não foram observadas diferenças em condições basais e hiperglicêmicas. A viabilidade também não foi alterada com 48 horas. Com 72 horas de incubação foi observado aumento na viabilidade de células HepG2 tratadas com 50, 75 e 100 mM quando estas estavam na quantidades igual a 8×10^3 e 16×10^3 células/poço. Redução na viabilidade foi observada para as células na quantidade de 4×10^3 nas concentrações de 50 e 100 mM de glicose quando comparadas as que estavam em maior quantidade (16×10^3), no entanto, não houve diferença estatística quando comparadas ao controle.

As melhores condições foram observadas para as quantidades iguais a 8×10^3 e 16×10^3 células/poço com 24 e 48 horas de incubação, pois a viabilidade não foi alterada em função do tempo e concentração de glicose, no entanto, a glicose serviu como estímulo para proliferação destas células como apresentado com 72 horas de incubação.

Em concordância com os dados obtidos neste estudo, Palmeira *et al.* (2007) avaliaram a viabilidade celular em células HepG2 expostas a condições de hiperglicemia (30 mM de glucose) por 48 h, 96 h e 7 dias sem, no entanto, observarem diferenças quando comparada com as células cultivadas em 5,5 mM de glicose na quantidades igual a 10^5 . Todas as culturas de células apresentaram viabilidade maior do que 85 % em todos os tratamentos e tempos.

Figura 35. Efeito da glicose na viabilidade de células HepG2. As células foram cultivadas em quantidades diferentes (4×10^3 , 8×10^3 ou 16×10^3 células/poço), submetidas a condições basais (5,5 mM de glicose) ou hiperglicêmicas (25 a 100 mM) e incubadas por 24, 48 e 72 horas. O ensaio de viabilidade foi feito usando o MTT. Os resultados foram expressos em % de células viáveis relativo ao controle (5,5mM de glicose). Letras diferem entre si na mesma concentração de glicose ($p < 0,05$); * $p < 0,05$ quando comparado ao controle (5,5 mM de glicose).

Células da medula supra-renal de ratos (PC12) foram incubadas na quantidade de 5×10^3 células/poço e o efeito máximo sobre a viabilidade foi observado com 100 mM de glicose que resultou em 52,7 % de viabilidade celular relativa. Adição de glicose nas concentrações de 125 e 150 mM teve efeito tóxico similar àqueles observados com 100 mM de glicose (KAEIDI *et al.*, 2011).

Diminuição da viabilidade de células neuronais em altas concentrações de glicose (30 mM) foram associadas com aumento da apoptose (dependente da atividade da caspase-3) e da expressão de TNF- α . O uso de inibidor do receptor de TNF- α (TNFR1) foi suficiente para prevenir a redução na viabilidade e o aumento da morte celular por apoptose (COSTA *et al.*, 2012). A hiperglicemia também aumentou a produção de EROs e TNF- α , ativando a transdução de sinal mediada pelo TNF- α , diminuindo a viabilidade celular e induzindo apoptose de células endoteliais de veia umbilical humana (ZHANG, Y. *et al.*, 2011). Estes achados demonstraram que o estresse oxidativo e inflamação estão envolvidos na patogênese das complicações crônicas do diabetes, como a neuropatia diabética e disfunção endotelial.

O efeito do EA de alecrim em células HepG2 expostas à hiperglicemia foi investigado, e os resultados estão apresentados na Figura 36. As células foram plaqueadas na quantidade de 16×10^3 células/poço, cujos resultados não apresentaram redução na viabilidade, independente da concentração de glicose e do tempo de exposição.

Com 24 horas de incubação foi observado aumento da viabilidade quando as células foram tratadas nas maiores concentrações de glicose (50 e 100 mM) e EA na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ quando comparadas ao controle. Estes resultados indicaram o efeito na manutenção da viabilidade de células HepG2 expostas à hiperglicemia pelo EA em pequenas concentrações. No entanto, o EA na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ acentuou a diminuição da viabilidade celular em condições hiperglicêmicas observadas com 24 horas. Estes resultados dão indícios do efeito citotóxico do EA de alecrim em condições hiperglicêmicas, este evento foi mais acentuado após 48 horas de incubação (Figura 36).

Como apresentado na Figura 36, o EA de alecrim nas doses de 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$ marcadamente preveniu a toxicidade induzida por altas concentrações de glicose após 48 horas, enquanto que EA em altas concentrações (50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) não preveniu o dano celular.

Figura 36. Efeito da glicose e do EA de alecrim na viabilidade de células HepG2. As células (16×10^3 /poço) foram submetidas a condições basais (5,5 mM de glicose) ou hiperglicêmicas (25 a 100 mM), na presença ou não de EA de alecrim (1, 10, 50 e 100 µg/mL), e incubadas por 24 e 48 horas. O ensaio de viabilidade foi feito usando o MTT. Os resultados foram expressos em % de células viáveis relativo ao controle (5,5 mM de glicose). Letras diferem entre si na mesma concentração de extrato aquoso ($p < 0,05$); * $p < 0,05$ quando comparado ao controle (5,5 mM de glicose).

Pycnogenol®, um extrato obtido da casca da espécie *Pinus pinaster* e que contém procianidinas, ácidos fenólicos, bioflavonoides e catequinas, em baixas concentrações (1 a 10 µg/mL) melhorou significativamente a viabilidade de células renais expostas a 30 mM de glicose por 24 horas (KIM; KIM; YOKOZAWA, 2011).

Recentemente, Lee *et al.* (2012) relataram que a inibição do crescimento de células HepG2 pode estar associada com aumento da concentração de compostos fenólicos. Estes autores testaram os ácidos fenólicos isolados em cultura de células HepG2 e constataram que os ácidos caféico e clorogênico apresentaram maior inibição do crescimento do que os ácidos hidroxibenzóico e *p*-cumárico.

A quercetina nas concentrações de 50 e 100 μ M promoveu redução de 15 e 60 %, respectivamente, no crescimento de células HepG2 após 24 horas de incubação, nenhuma alteração foi observada para a rutina. Após período de incubação mais longo (48 h), a quercetina inibiu o crescimento na maior concentração (100 μ M) e a rutina nas concentrações intermediárias (10-50 μ M), enquanto que as doses mais baixas (0,1 e 1 μ M) não apresentou efeito no crescimento celular (ALÍIA *et al.*, 2006). A apigenina também foi capaz de reduzir a viabilidade das células HepG2 de maneira dose-dependente, por aumentar a produção de EROs e reduzir atividade e expressão gênica da catalase, mostrando que a apoptose induzida pela apigenina pode ser mediada pela via dependente de H_2O_2 (VALDAMERI *et al.*, 2011). Em concordância com estes estudos, a composição do EA de alecrim pode estar relacionada com a redução na viabilidade de células HepG2.

Os compostos fenólicos são geralmente reconhecidos como antioxidantes, mas algumas substâncias fenólicas podem exercer atividade pró-oxidativa em certas condições, como na presença de metais de transição. Estudos têm mostrado que a autooxidação de alguns fitoquímicos fenólicos mediada por metais gera radicais semiquinona, resultando no aumento da atividade *redox* e na produção de EROs, incluindo o H_2O_2 (LEE *et al.*, 2005; KOBAYASHI *et al.*, 2004). Assim, os compostos fenólicos em doses relativamente baixas podem exercer atividades biológicas importantes, enquanto que em excesso, apresentam toxicidade.

Os efeitos deletérios da hiperglicemia são causados pela toxicidade da glicose que é tipicamente acompanhada por aumento da produção de radicais livres, principalmente do ânion superóxido pela mitocôndria, e pela deficiência da capacidade antioxidante (PANG *et al.*, 2011; ROLO; PALMEIRA, 2006).

O efeito da glicose e do EA de alecrim na formação das espécies reativas em células HepG2 foi investigado. Este ensaio teve como objetivo investigar se o efeito citotóxico da glicose e do EA de alecrim nas concentrações de 50 e 100 μ g/mL foi atribuído ao aumento na formação das espécies reativas.

Exposição à alta concentração de glicose (100 mM) levou ao aumento significativo na produção das espécies reativas pelas células HepG2 com 24 horas, (25 a 30 RFU). Este aumento foi mais pronunciado (25 a 55 RFU) após 72 horas de incubação, sendo dependente da concentração de glicose. O EA de alecrim nas concentrações de 1 a 50 µg/mL reduziu as concentrações de espécies reativas tanto em condições basais quanto hiperglicêmicas após 48 e 72 horas. Aumento de espécies reativas foi observado quando as células foram expostas às altas concentrações de glicose (50 e 100 mM) e tratadas com EA (100 µg/mL) por 72 horas. Os resultados estão apresentados na Figura 37.

Figura 37. Efeito do EA de alecrim na formação de espécies reativas em células HepG2. As células foram cultivadas em condições basais (5,5 mM de glicose) ou hiperglicêmicas (25 a 100 mM de glicose) e tratadas com EA de alecrim nas concentrações de 1 a 100 µg/mL e incubadas por 48 e 72 horas. O ensaio de formação das espécies reativas foi feito usando o probe DCF-DA. Os resultados foram expressos em unidade de fluorescência relativa (RFU).

Estes achados revelam que o EA em pequenas concentrações tem a capacidade de reduzir as espécies reativas em células HepG2 induzidas pela

hiperglicemia e de proteger os hepatócitos contra os danos relacionados ao estresse oxidativo.

Estes resultados corroboraram com os obtidos com as antocianinas. Aumento nos níveis de EROs pelas HepG2 observado em condições hiperglicêmicas foi reduzido pela antocianina (cianidina-3-O- β -glicosídeo) de forma dose-dependente, com redução máxima (68 %) na maior concentração (100 μ M). A cianidina-3-O- β -glicosídeo, assim como o EA de alecrim, foram capazes de reduzir as concentrações de EROs também em condição basal (ZHU *et al.*, 2012).

Por outro lado, deve-se ressaltar que altas concentrações de compostos fenólicos podem contribuir com o dano oxidativo celular, inclusive em células HepG2, por aumentar as concentrações de espécies reativas como o H₂O₂.

Resultados semelhantes foram encontrados com o extrato etanólico de própolis. O extrato etanólico de própolis manteve a viabilidade das células HepG2 nas concentrações de 6 a 60 μ g/mL, e nas concentrações de 120 e 240 μ g/mL a viabilidade foi significativamente reduzida. As baixas concentrações de extrato etanólico de própolis também foram relacionadas com menor produção das EROs, em contrapartida, a redução máxima na produção das EROs foi observada com a concentração intermediária (25 μ g/mL) (KANG *et al.*, 2010).

Assim como os hepatócitos, as células endoteliais são susceptíveis ao estresse oxidativo causado pela hiperglicemia. Células endoteliais tiveram sua viabilidade reduzida pela metade quando expostas a 40 mM de glicose por 36 horas. No entanto, a viabilidade foi mantida pelos extratos aquosos das espécies *Cordyceps militaris* e *Cordyceps sinensis* nas concentrações de 25 e 20 μ g/mL. A proteção apresentada por estes extratos foi atribuída a capacidade de inibir o aumento das EROs e as concentrações de óxido nítrico induzidos pela glicose, e redução da atividade da caspase-3 (SHU; CHIEN; DUH, 2011).

Como forma de se proteger dos danos causados pelo estresse oxidativo, os mamíferos desenvolveram um sistema antioxidante dependente de glutathione (GSH) que desempenha papel fundamental na defesa celular contra as EROs. As funções citoprotetoras de GSH são devido à sua capacidade de reagir diretamente com moléculas reativas, desta forma, a depleção de GSH compromete o equilíbrio *redox* e viabilidade celular, destacando o importante papel da biossíntese *de novo* de GSH na manutenção de níveis intracelulares adequados (ZHU *et al.*, 2012; FORMAN; ZHANG; RINNA, 2009).

O efeito da hiperglicemia e do EA de alecrim nas concentrações de GSH foi avaliado, e os resultados encontram-se na Figura 38. Células HepG2 expostas à condição hiperglicêmica (50 mM) tiveram concentrações de GSH aumentadas significativamente. Ao contrário de células tratadas com EA mesmo submetidas a condições hiperglicêmicas mantiveram as concentrações de GSH iguais às células em condição basal (5,5 mM).

Figura 38. Efeito do EA de alecrim nos níveis de GSH em células HepG2. As células foram cultivadas em condições basais (5,5 mM de glicose) ou hiperglicêmica (50 mM de glicose), tratadas com EA de alecrim na concentração de 10 µg/mL e incubadas por 72 horas. Os resultados foram expressos em µM de GSH. Legenda: NG – condição normoglicêmica (5,5 mM), HG – condição hiperglicêmica (50 mM), NG + EA 10 – normoglicêmica (5,5 mM) + EA na concentração de 10 µg/mL e HG + EA 10 – hiperglicêmica (50 mM) + EA na concentração de 10 µg/mL. Letras diferem entre si estatisticamente com $p < 0,05$.

O Nrf2 é um fator de transcrição ativado pelo estresse oxidativo e regula a expressão de numerosos genes de sobrevivência celular, como os genes antioxidantes e desintoxicantes de EROs. Em condições de estresse oxidativo, o Nrf2 aumenta a expressão de genes envolvidos na síntese de GSH (glutamato cisteína ligase - GCL) para manter as concentrações de GSH aumentadas e assim, proteger as células do dano oxidativo. Elevadas concentrações de GSH podem estar associadas com o aumento da atividade transcrricional do Nrf2, induzido pela hiperglicemia (ZHU *et al.*, 2012; JOHNSON *et al.*, 2008).

Em células endoteliais humanas, a hiperglicemia (30 mmol/L) aumentou a atividade transcrricional do Nrf2 e este evento foi acompanhado pela indução adaptativa do gene GCL. A administração de catalase e do antioxidante *N*-acetilcisteína preveniu o aumento da atividade transcrricional do Nrf2 e atenuou a indução do gene GCL, respectivamente. O H_2O_2 apresenta efeito direto na ativação do fator de transcrição Nrf2 (UNGVARI *et al.*, 2011).

Concentrações elevadas de GSH em células HepG2 podem estar associadas com aumento da atividade transcricional do Nrf2 induzido pela hiperglicemia (Figura 38). O EA pode ter atenuado a indução do gene GCL, responsável pela síntese de GSH da mesma forma que o antioxidante *N*-acetilcisteína, mantendo concentrações basais de GSH.

O Nrf2 também modula a expressão dos genes HO-1 e SOD-2. Aumento da hiperglicemia é acompanhado pela redução na expressão da HO-1 quando comparado à condição normoglicêmica. O EA de alecrim aumentou a expressão da HO-1 em condição basal e hiperglicêmica, bem como aumentou a expressão da SOD-2 na hiperglicemia (50 mM) (Figura 39).

Figura 39. Efeito do EA de alecrim na expressão gênica da HO-1 e SOD-2 em células HepG2. As células foram cultivadas em condições basais (5,5 mM de glicose) ou hiperglicêmica (50 mM de glicose), tratadas com EA de alecrim na concentração de 10 µg/mL e incubadas por 72 horas. Legenda: NG – condição normoglicêmica (5,5 mM), HG – condição hiperglicêmica (50 mM), NG + EA 10 – normoglicêmica (5,5 mM) + EA na concentração de 10 µg/mL e HG + EA 10 – hiperglicêmica (50 mM) + EA na concentração de 10 µg/mL. Letras diferem entre si estatisticamente com $p < 0,05$.

O EA de alecrim protegeu as células HepG2 por aumentar a expressão gênica da HO-1, uma enzima chave envolvida na degradação do ferro. Portanto, aumento na expressão da HO-1 protege tanto os hepatócitos como outras linhagens celulares contra o estresse oxidativo (CHENG; SIOW; MANN, 2011).

O mesmo mecanismo foi observado pelas antocianinas e pelos flavonoides (buteína e floretina). As antocianinas aumentaram a expressão gênica da HO-1 em células β , protegendo-as da necrose e apoptose induzida por peróxido

de hidrogênio (ZHANG, B. *et al.*, 2011). O tratamento com buteína e floretina atenuou o dano oxidativo causado pelo *tert*-butilhidroperóxido em hepatócitos primários de ratos por meio da indução na expressão protéica e gênica da HO-1. Os mecanismos envolvidos foram ativação e translocação do Nrf2 (YANG *et al.*, 2011).

Células neuronais também foram protegidas pelo aumento na expressão da gênica HO-1 induzido pelos compostos fenólicos. A curcumina nas concentrações de 5 a 25 μ M após 6 horas de incubação aumentou a expressão tanto gênica quanto protéica da HO-1 em células neuronais de ratos. No entanto, em altas concentrações (50-100 μ M) também causou efeito tóxico sem alterar a expressão protéica da HO-1 (SCAPAGNINI *et al.*, 2006). Células neuronais apresentaram aumento na expressão da HO-1 quando tratadas também com um éster de ácido caféico (SCAPAGNINI *et al.*, 2002), éster do ácido ferúlico e resveratrol (SCAPAGNINI *et al.*, 2004). A indução da HO-1 pelo resveratrol foi acompanhada pelo aumento na transativação do Nrf2 em células de hepatócitos humano (HUH7), demonstrada recentemente por Wagner *et al.* (2011).

A proteção do EA de alecrim em células HepG2 submetidas à condição hiperglicêmica foi mediada também pelo aumento na expressão gênica da SOD-2 (Figura 39). Este aumento previniu dano oxidativo causado pelo ânion superóxido. Os compostos fenólicos são conhecidos por aumentar atividade e/ou expressão das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx em condições normais tanto no fígado (YEH; YEN, 2006) quanto no coração de ratos. O aumento na atividade e expressão dessas enzimas antioxidantes no tecido cardíaco foi acompanhado pela expressão aumentada da HO-1 e do Nrf2 pelos ácidos gálico, ferúlico e *p*-cumárico (YEH; CHING; YEN, 2009).

Os efeitos dos compostos fenólicos são mediados principalmente pelo seu metabolismo, que está relacionado com a formação de quinonas obtidas como resultado da oxidação pelas enzimas do citocromo P450. Estas quinonas reagem rapidamente com os grupos tióis da Keap1 e aumentam a resposta antioxidante dependente do Nrf2-ARE (HUR; GRAY, 2011).

5. CONCLUSÕES

- Os compostos fenólicos encontrados no alecrim foram principalmente os ácidos rosmarínico e carnósico, e os flavonoides. Estes compostos estão relacionados com alta capacidade antioxidante *in vitro*, seja agindo como antirradicais, substâncias redutoras ou inibindo a cascata de lipoperoxidação;
- Ao contrário dos resultados obtidos para o EA, FHA e ácido caféico, a fração de ácidos fenólicos livres (AFL) não atenuou os marcadores de estresse oxidativo em animais diabéticos. A atividade antioxidante *in vivo* pode estar relacionada com o sinergismo de substâncias fenólicas presentes no EA e FHA de alecrim;
- A atividade anti-inflamatória do EA de alecrim nos modelos de inflamação aguda está relacionada com inibição da via de metabolização do ácido araquidônico, redução dos níveis de TNF- α e IL-6 e redução da produção de NO, possivelmente, através da inibição das enzimas LOX e COX, redução da ativação do fator de transcrição NF κ B e redução da atividade da enzima iNOS, respectivamente;
- O EA de alecrim atenua a inflamação crônica em animais diabéticos, reduzindo os níveis de TNF- α e IL-6, além de manter a funcionalidade das células polimorfonucleares, aumentando os níveis de LTB₄, e assim, protegendo os animais contra infecções;
- Os efeitos antioxidantes do EA de alecrim foram reproduzidos em células humanas (HepG2) submetidas a altas concentrações de glicose, e o mecanismo de proteção estão associados à redução na produção de EROs e à modulação da expressão gênica de hemoxigenase-1 e superóxido dismutase-2, possivelmente associados ao fator de transcrição de sobrevida celular envolvido na defesa antioxidante, o Nrf2.

O EA de alecrim possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias observadas tanto *in vitro* quanto *in vivo*, apresentando dessa forma, benefícios nas DCNT, nas quais o estresse oxidativo e a inflamação atuam de forma significativa, como no diabetes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOLFATHI, A. A.; MOHAJERI, D. ; REZAIE, A.; NAZERI, M. Protective Effects of Green Tea Extract against Hepatic Tissue Injury in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012. In press. Disponível em:<<http://www.hindawi.com/journals/ecam/2012/740671/>>. Acesso em: 13 de Maio de 2012.
- ABUARQOUB, H.; FORESTI, R.; GREEN, C. J.; MOTTERLINI, R. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory actions of 2-hydroxychalcone in RAW 264.7 murine macrophages. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v.209, p.1092-1099, 2006.
- AFONSO, M. S. **Avaliação do efeito do extrato aquoso e da fração fenólica livre do Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o estado antioxidante e o perfil lipídico em ratos com hipercolesterolemia induzida pela dieta**. São Paulo, 2010. 83p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- AFONSO, M.S.; SANT'ANA, L.S. Effects of pretreatment with Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in the prevention of lipid oxidation in salted tilapia fillets. **Journal of Food Quality**, v.31, p.586-595, 2008.
- AFONSO, M.S.; SANT'ANA, L.S.; PINTO, J.P.A.N.; XIMENES, B. Atividade antioxidante e antimicrobiana do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em filés de tilápia (*Oreochromis ssp*) salgados secos durante o armazenamento congelado. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.10, p.12-17, 2008.
- AKULA, U. S.; ODHAV, B. *In vitro* 5-Lipoxygenase inhibition of polyphenolic antioxidants from undomesticated plants of South Africa. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.2(9), p.207-212, 2008.
- ALEZANDRO, M. R.; LUI, M. C. Y.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I.; Condimentos comerciais e ingredientes industriais: avaliação da capacidade antioxidante e do conteúdo de flavonoides para o desenvolvimento de alimentos funcionais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.31, n.2, p. 527-533, 2011.
- ALÍA, M.; MATEOS, R.; RAMOS, S.; LECUMBERRI, E.; BRAVO, L.; GOYA, L. Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). **European Journal of Nutrition**, v.45, n. 1, p.19-28, 2006.
- ALMELA, L.; SÁNCHEZ-MUNOZ, B.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.A.; ROCA, M.J.; RABE, V. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. **Journal of Chromatography A**, v.1120, n.1, p.221-229, 2006.
- AMAROWICZ, R.; PEGG, R.B.; RAHIMI-MOGHADDAM, P.; BARL, B.; WEIL, J.A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies, **Food Chemistry**, v.84, p. 551-562, 2004.
- AMIN, A.; HAMZA, A.A. Hepatoprotective effects of Hibiscus, Rosmarinus and Salvia on azathioprine-induced toxicity in rats. **Life Sciences**, v.77, n.3, p.266-278, 2005.

ANDERSON, E.J.; LUSTIG, M.E.; BOYLE, K.E.; WOODLIEF, T.L.; KANE, D.A.; LIN, C.T.; PRICE III, J.W.; KANG, L.; RABINOVITCH, P.S.; SZETO, H.H.; HOUMARD, J.A.; CORTRIGHT, R.N.; WASSERMAN, S.D.H.; NEUFER, P.D. Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. **Journal of Clinical Investigation**, v.119, p.573–581, 2009.

ANDRADE-WARTHA, E. R. S. **Propriedades antioxidantes de clones do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.): efeito sobre a lipoperoxidação e enzimas participantes do sistema antioxidante de defesa do organismo animal**. São Paulo, 2007. 116p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

BAGRI, P.; ALI, M.; AERI, V.; BHOWMIK, M.; SULTANA, S. Antidiabetic effect of *Punica granatum* flowers: Effect on hyperlipidemia, pancreatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, n.1, p.50-54, 2009.

BAKIREL, T.; BAKIREL, U.; KELEŞ, O. Ü.; ÜLGEN, S. G.; YARDIBI, H. *In vivo* assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 64-73, 2008.

BALTEAU, M.; TAJEDDINE, N.; DE MEESTER, C.; GINION, A.; ROSIERS, C.D.; BRADY, N.R.; SOMMEREYNS, C.; HORMAN, S.; VANOVERSCHELDE, J-L.; GAILLY, P.; HUE, L.; BERTRAND, L.; BEAULOYE C. NADPH oxidase activation by hyperglycemia in cardiomyocytes is independent of glucose metabolism but requires SGLT1. **Cardiovascular Research**, August 22, 2011 (*in press*). [doi: 10.1093/cvr/cvr230]

BANERJEE, S. Inhibition of mackerel (*Scomber scombrus*) muscle lipoxygenase by green tea polyphenols, **Food Research International**, v. 39, n. 4, p. 486–491, 2006.

BASTOS, D.H.M.; ROGERO, M.M.; ARÊAS, J.A.G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.53, n.5, p.646-656, 2009.

BATISTA-GONZALEZ, A.E.; SILVA, A.M.O.; NOVOA, A.V.; PINTO, R.J.; MANCINI, D.P.; MANCINI-FILHO, J. Analysis of *in vitro* and *in vivo* antioxidant properties of hydrophilic fractions from the seaweed *Halimeda monile* L. **Journal of Food Biochemistry**, v.36, p.189-197, 2012.

BEM, A.F.; KUNDE, J. A importância da determinação da hemoglobina glicada no monitoramento das complicações crônicas do diabetes mellitus. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.42, n.3, p.185-191, 2006.

BENGMARK, S. Curcumin, an atoxic antioxidant and natural NFκB, cyclooxygenase-2, lipoxygenase, and inducible nitric oxide synthase inhibitor: a shield against acute and chronic diseases. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.30, p.45–51, 2006.

BEUTLER, E. **Red cell metabolism: a manual of biochemical methods**. 2.ed. New York, London: Grune & Stratton, 1975. p.89-90.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v.181, n.26, p.1199-1200, 1958.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.677-685, 1985.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BREST, C. Use of Free Radical Method Evaluate Antioxidant Activity. **LWT - Food Science and Technology**, v.28, p.25-30, 1995.

BRENTJENS, R; SALTZ, L. Islet cell tumors of the pancreas: the medical oncologist's perspective. **The Surgical Clinics of North America**, v.81, n.3, p.527-42, 2001.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v.414, p.813-820, 2001.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechanism. **Diabetes**, v.54, p.1615-1625, 2005.

BROWNLEE, M.; HIRSCH, I.B.; Glycemic Variability: a hemoglobin A1c-independent risk factor for diabetic complications. **The Journal of the American Medical Association**, v.295, p.1707–1708, 2006.

BRUNETON, J. **Farmacognosia - Fitoquímica Plantas Medicinales**. 2 ed. Zaragoza, Espanha: ACRIBIA Espanha, 2001. 1099p.

BUBONJA-SONJE, M.; GIACOMETTI, J.; ABRAM, M. Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1821–1827, 2011.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A.R.S. Anti-Inflammatory compounds of plant origin. Part. I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-kappaB). **Planta Med**, v. 69, p. 973-983, 2003.

CAO, G.; ALESSIO, H.M.; CULTER, R. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free Radical Biology & Medicine**, v.14, p.303-311, 1993.

CARMICHAEL, J.; MITCHELL, J.B.; DEGRAFF, W.G.; GAMSON, J.; GAZDAR, A.F.; JOHNSON, B.E.; GLATSTEIN, E.; MINNA, J.D. Chemosensitivity testing of human lung cancers cell lines using the MTT assay. **British Journal of Cancer**, v.57, p. 540-547, 1985.

CELIK, S.; ERDOGAN, S. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects brain against oxidative stress and inflammation induced by diabetes in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.312, p.39-46, 2008.

CELIK TAS, O.Y.; KOCABAS, E.E.H.; BEDIR, E.; SUKAN, F.V.; OZEK, T.; BASER, K.H.C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 100, p. 553–559, 2007.

CHARAMI, M-T.; LAZARI, D.; KARIOTI, A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.; SOULELES, C. Antioxidant and antiinflammatory activities of *Sideritis perfoliata* subsp. *perfoliata* (Lamiaceae). **Phytotherapy Research**, v.22(4), p. 450–454, 2008.

CHARO, I. F.; TAUB, R. Anti-inflammatory therapeutics for the treatment of atherosclerosis. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v. 10, p. 365-376, 2011.

CHECKER, R.; SANDUR, S.K.; SHARMA, D.; PATWARDHAN, R.S.; JAYAKUMAR, S.; KOHLI, V.; SETHI, G.; AGGARWAL, B. B.; SAINIS, K.B. Potent Anti-Inflammatory Activity of Ursolic Acid, a Triterpenoid Antioxidant, Is Mediated through Suppression of NF- κ B, AP-1 and NF-AT. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p.1-15, 2012.

CHEN, H.; LIN, Y.; HSIEH, C. Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1418-1424, 2007

CHEN, Q.; SHI, H.; HO, C. Effects of rosemary extracts and major constituents on lipid oxidation and soybean lipoxygenase activity. **Journal of the American Oil Chemists society**, v.69, n.10, p.999-1002, 1992.

CHENG, G.; CAO, Z.; XU, X.; VAN MEIR, E. G.; LAMBETH, J. D. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. **Gene**, v.269, p.131-140, 2001.

CHENG, X.; SIOW, R.C.M.; MANN, G.E. Impaired Redox Signaling and Antioxidant Gene Expression in Endothelial Cells in Diabetes: A Role for Mitochondria and the Nuclear Factor-E2-Related Factor 2-Kelch-Like ECH-Associated Protein 1 Defense Pathway. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.14, n.3, p.469-487, 2011.

CHOUHAN, H.S.; SINGH, S.K. Phytochemical analysis, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Phyllanthus simplex*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.137, p.1337–1344, 2011.

CIOROI, M. Study on total polyphenols and reducing power of aqueous extracts from selected Lamiaceae species. **Journal of Agroalimentary Processes and Technologies**, v. 15, n. 4, p. 521-524, 2009.

CLERE, N.; FAURE, S.; MARTINEZ, M. C.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Anticancer Properties of Flavonoids: Roles in Various Stages of Carcinogenesis. **Cardiovascular e Hematological Agents in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 62-77, 2011.

COSTA, G.N.; VINDEIRINHO, J.; CAVADAS, C.; AMBRÓSIO, A.F.; SANTOS, P.F. Contribution of TNF receptor 1 to retinal neural cell death induced by elevated glucose. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 50, p. 113–123, 2012.

DCCT (The Diabetes Control and Complications Trial), Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin dependent diabetes mellitus. **The New England Journal of Medicine**, v.329, p.977–986, 1993.

DCCT (The Diabetes Control and Complications Trial), Research Group. The relationship of glycemic exposure (HbA1c) to the risk of development and progression of retinopathy in the Diabetes Control and Complications Trial. **Diabetes**, v.44, n.8, p.968-983, 1995.

DEARLOVE, R. P. **Inhibition of protein glycation by polyphenolic extracts of culinary herbs and spices**. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Georgia Southern University, 2007.

DEETAE, P.; PARICHANON, P.; TRAKUNLEEWATTHANA, P.; CHANSEETIS, C.; SITTIWAT, L. Antioxidant and anti-glycation properties of Thai herbal teas in comparison with conventional teas. **Food Chemistry**, v. 133, p. 953–959, 2012.

DEL BANO, M.J.; LORENTE, J.; CASTILLO, J.N.; BENAVENTE-GARCIA, O.; MARIN, M.P.; DEL RIO, J.A.; ORTUNO, A.; IBARRA, I. Flavonoid Distribution during the Development of Leaves, Flowers, Stems, and Roots of *Rosmarinus officinalis*. Postulation of a Biosynthetic Pathway. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.4987-4992, 2004.

DICKINSON, P.J.; CARRINGTON, A.L.; FROST, G.S.; BOULTON, A.J.M. Neurovascular disease, antioxidants and glycation in diabetes. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v.18, p.260-272, 2002.

DORMAN, H. J. D.; PELTOKETO A.; HILTUNEN, R.; TIKKANEN, M.J. Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. **Food Chemistry**, v.83, p. 255–262, 2003.

DRUMMOND, G.R.; SELEMIDIS, S.; GRIENDLING, K.K.; SOBEY, C.G. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. **Nature Reviews**, v.10, p.453-471, 2011.

DUARTE, D. B.; VASKO, M. R.; FEHRENBACHER, J. C. Models of Inflammation: Carrageenan Air Pouch. **Current Protocols in Pharmacology**, v.56, p 561-568, 2012.

DUDONNÉ, S.; VITRAC, X.; COUTIÈRE, P.; WOILLEZ, M.; MÉRILLON, J. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n.5, p.1768–1774, 2009.

DUSSOSSOY, E.; BRAT, P.; BONY, E.; BOUDARD, F.; POUCHERET, P.; MERTZ, C.; GIAIMIS, J.; MICHEL, A. Characterization anti-oxidative and anti-inflammatory effects of Costa Rican noni juice (*Morinda citrifolia* L.). **Journal of Ethnopharmacology**, v.133, p.108–115, 2011.

EDEAS, M. Strategies to target mitochondria and oxidative stress by antioxidants: key points and perspectives. **Pharmaceutical Research**, v. 28, p. 2771–2779, 2011.

EDLUND, J.; FASCHING, A.; LISS, P.; HANSELL, P.; PALM, F. The roles of NADPH-oxidase and nNOS for the increased oxidative stress and the oxygen consumption in the diabetic kidney. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v.26, p.349–356, 2010.

EDWARDS, J.C.W.; SEDGWICK, A.D.; WILLOUGHBY, D.A. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an *in vivo* tissue culture system. **The Journal of Pathology**, v.134, p.147-156, 1981.

ERKAN, N.; AYRANCI, G.; AYRANCI, E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. **Food Chemistry**, v.110(1), p.76-82, 2008.

FERNANDES, A.S.F. **Propriedades nutricionais, nutracêuticas e antioxidantes de espécies silvestres condimentares utilizadas na gastronomia tradicional do nordeste transmontano**. Bragança, 2010. 52p. Dissertação de Mestrado - Escola Superior Agrária de Bragança.

- FOLLI, F.; CORRADI, D.; FANTI, P.; DAVALLI, A.; PAEZ, A.; GIACCARI, A.; PEREGO, C.; MUSCOGIURI, G. The Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus Micro- and Macrovascular Complications: Avenues for a Mechanistic-Based Therapeutic Approach. **Current Diabetes Reviews**, August 22, 2011 (*in press*). [PMID: 21838680, PubMed - as supplied by publisher]
- FORMAN, H. J.; ZHANG, H.; RINNA, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, p. 1–12, 2009.
- FORTES, Z.B .; FARSKY, S. P .; OLIVEIRA, M.A .; GARCIA-LEME, J. Direct Vital Microscopic Study of Defective Leukocyte-Endothelial Interaction in Diabetes Mellitus. **Diabetes**, v. 40, n.10, p. 1267-1273, 1991.
- FOWLER, M.J. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. **Clinical Diabetes**, v.29, n.3, p.116-122, 2011.
- GAMARO, G. D.; SUYENAGA, E.; BORSOI, M.; LERMEN, J.; PEREIRA, P.; ARDENGHI, P. Effect of Rosmarinic and Caffeic Acids on Inflammatory and Nociception Process in Rats. **International Scholarly Research Network Pharmacology**, v. 2011, 6 pages, 2011.
- GANDHI, G. R.; IGNACIMUTHU, S.; PAULRAJ, M. G. Hypoglycemic and b-cells regenerative effects of Aegle marmelos (L.) Corr. Bark extract in streptozotocin-induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1667–1674, 2012.
- GANDHI, G. R.; IGNACIMUTHU, S.; PAULRAJ, M. G. *Solanum torvum* Swartz. fruit containing phenolic compounds shows antidiabetic and antioxidant effects in streptozotocin induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, n.11, p.2725-2733, 2011.
- GARBACKI, N.; TITS, M.; ANGENOT, L.; DAMAS, J. Inhibitory effects of proanthocyanidins from *Ribes nigrum* leaves on carrageenin acute inflammatory reactions induced in rats. **BMC Pharmacology**, v. 4, n. 25, p. 1-9, 2004.
- GARCIA, T.J. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **The New England Journal of Medicine**, v.353, p.429-430, 2005.
- GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circulation Research**, v.107, n.9, p.1058-70, 2010.
- GIADA, M.L.R.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de compostos fenólicos de alimentos. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v.28, p.91-107, 2004.
- GRIFFIS, C.A., COMPTON, P., DOERING, L. The effect of pain on leucocyte cellular adhesion molecules. **Biological Research For Nursing**, v.7, p.297-312, 2006.
- GRUPO INTERDISCIPLINAR DE PADRONIZAÇÃO DA HEMOGLOBINA GLICADA – A1c. **A importância da hemoglobina glicada (A1c) para a avaliação do controle glicêmico em pacientes com Diabetes mellitus: aspectos clínicos e laboratoriais**. São Paulo, Posicionamento 2004.
- GUIMARÃES, R.; BARROS, L.; BARREIRA, J.C.M.; SOUSA, M.J.; CARVALHO, A.M.; FERREIRA, I.C.F.R. Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and Orange. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p.99-106, 2010.

- HALIM, M. E.; MISRA, A. The effects of the aqueous extract of *Pterocarpus santalinus* heartwood and vitamin e supplementation in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 3, p. 398-409, 2011.
- HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, v.52, n.8, p.253-265, 1994.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1989. 543p.
- HARAGUCHI, H.; SAITO, T.; OKAMURA, N.; YAGI, A. Inhibition of lipid peroxidation and superoxide generation by diterpenoids from *Rosmarinus officinalis*. **Planta Medica**, v.61, p.333-336, 1995.
- HARTGE, M.M.; UNGER, T.; KINTSCHER, U. The endothelium and vascular inflammation in diabetes. **Diabetes and Vascular Disease Research**, v.4, p.84-88, 2007.
- HE, D.; DAI, S. Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Effects of *Paeonia Lactiflora* Pall., a Traditional Chinese Herbal Medicine. **Frontiers in Pharmacology**, v. 2, n. 10, p.1-5, 2011.
- HE, Y.; MARTINEZ-FLEITES, C.; BUBB, A.; GLOSTER, T.M.; DAVIES, G.J. Structural insight into the mechanism of streptozotocin inhibition of O-GlcNAcase. **Carbohydrate Research**, v.344, p.627-631, 2009.
- HERRERO, M.; PLAZA, M. ; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and in-vitro assays. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p.2512-2520, 2010.
- HILÁRIO, M.O.E.; TERRERI, M.T.; LEN, C.A. Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **Journal of Pediatrics**, v.82(5 Supl), p.S206-12, 2006.
- HINNEBURG, I.; DORMAN, H.J. D.; HILTUNEN, R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. **Food Chemistry**, v. 97, p.122-129, 2006.
- HOSSAIN, M.B.; BARRY-RYAN, C.; MARTIN-DIANA, A.B.; BRUNTON, N.P. Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 126, p. 339–346, 2011.
- HUR, W.; GRAY, N. S. Small molecule modulators of antioxidant response pathway. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.15, p.162–173, 2011.
- JAIN, M.; PARMAR, H.S. Evaluation of antioxidative and anti-inflammatory potential of hesperidin and naringin on the rat air pouch model of inflammation. **Inflammation Research**, v.60, p.483–491, 2011.
- JAIN, S. K.; RAINS, J. L.; CROAD, J. L. Effect of chromium niacinate and chromium picolinate supplementation on lipid peroxidation, TNF- α , IL-6, CRP, glycated hemoglobin, triglycerides, and cholesterol levels in blood of streptozotocin-treated diabetic rats. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, p. 1124-1131, 2007.

JARDINI, F. A. **Atividade dos compostos fenólicos antioxidantes da romã (*Punica granatum*, L.) – avaliação *in vivo* e em culturas de células.** São Paulo, 2010. 115p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

JAYAPRAKASHA, G.K.; SINGH, R.P.; SAKARIAH, K.K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. **Food Chemistry**, v. 73, n. 3, p. 285–290, 2001.

JEAN, T.; BODINIER, M.C. Mediators involved in inflammation: effects of Daflon 500 mg on their release. **Angiology**, v. 45, p. 554-559, 1994.

JIA, Z.; TANG, M.; WU, J. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v.64, p.555-559, 1999.

JOHNSON, J.A.; JOHNSON, D.A.; KRAFT, A.D.; CALKINS, M.J.; JAKEL, R.J.; VARGAS, M.R.; CHEN, P-C. The Nrf2-ARE Pathway: An Indicator and Modulator of Oxidative Stress in Neurodegeneration. **The Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1147, p.61-69, 2008.

JONES, D.P. Redefining Oxidative Stress. **Antioxidants and Redox Signaling**, v.8, p.1865–1879, 2006.

JUNG, U. J.; LEE, M. K.; PARK, Y. B.; JEON, S-M; CHOI, M-S. Antihyperglycemic and Antioxidant Properties of Caffeic Acid in *db/db* Mice. The **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.318, n.2, p.476-483, 2006.

KAEIDI, A.; ESMAEILI-MAHANI, S.; SHEIBANI, V.; ABBASNEJADB, M.; RASOULIANC, B.; HAJIALIZADEHA, Z.; AFRAZI, S. Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract attenuates early diabetic neuropathic pain through prevention of high glucose-induced apoptosis: *In vitro* and *in vivo* studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 188–196, 2011.

KANG, L-J.; LEE, H. B.; BAE, H-J.; LEE, S-G. Antidiabetic effect of propolis: reduction of expression of glucose-6-phosphatase through inhibition of Y279 and Y216 autophosphorylation of GSK-3 α/β in HepG2 cells. **Phytotherapy Research**, v.24(10), p.1554–1561, 2010.

KARASU, Ç. Glycoxidative Stress and Cardiovascular Complications in Experimentally-Induced Diabetes: Effects of Antioxidant Treatment. **The Open Cardiovascular Medicine Journal**, v.4, p.240-256, 2010.

KATHIRAVAN. S.; SHWETHA.V.K. Protective efficacy of the ethanolic extract of *rosmarinus officinalis* (Linn) against bradykinin induced inflammation in rats. **International Journal Of Ayurvedic And Herbal Medicine**, v. 2, n. 2, p. 366:379 2012.

KHALIL, O. A.; RAMADAN, K. S.; DANIAL, E. N.; ALNAHDI, H. S.; AYAZ, N. O. Antidiabetic activity of *Rosmarinus officinalis* and its relationship with the antioxidant property. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 6, n.14, p. 1031-1036, 2012.

KHAN, H. B. H.; VINAYAGAM, K. S.; MOORTHY, B. T.; PALANIVELU, S.; PANCHANATHAM, S. Anti-inflammatory and anti-hyperlipidemic effect of *Semecarpus anacardium* in a High fat diet: STZ-induced Type 2 diabetic rat model. **Inflammopharmacology**. Publicado online: 25 de Janeiro de 2012.

- KHANUM, H.; RAMALAKSHMI, K.; SRINIVAS, P.; BORSE, B.B. Synergistic antioxidant action of oregano, ajowan and borage extracts. **Food and Nutrition Sciences**, v. 2, p. 387-392, 2011.
- KIM, Y. J.; KIM, Y. A.; YOKOZAWA, T. Pycnogenol modulates apoptosis by suppressing oxidative stress and inflammation in high glucose-treated renal tubular cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 2196–2201, 2011.
- KIRANA, H.; SRINIVASAN, B.P. Effect of *Cyclea peltata* Lam. roots aqueous extract on glucose levels, lipid profile, insulin, TNF- α and skeletal muscle glycogen in type 2 diabetic rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, p. 499–502, 2010.
- KNODLER, M.; CONRAD, J.; WENZIG, E.M.; BAUER, R.; LACORN, M.; BEIFUSS, U.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. Anti-inflammatory 5-(110Z-heptadecenyl)- and 5-(80Z,110Z-heptadecadienyl)-resorcinols from mango (*Mangifera indica* L.) peels. **Phytochemistry**, v.69, p.988–993, 2008.
- KOBAYASHI, H.; OIKAWA, S.; HIRAKAWA, K.; KAWANISHI, S. Metal-mediated oxidative damage to cellular and isolated DNA by gallic acid, a metabolite of antioxidant propyl gallate. **Mutation Research**, v.558, p.111–120, 2004.
- KOLEVA, I. I.; BEEK, T. A. V.; LINSSEN, J.P. H.; GROOT, A.; EVSTATIEVA, L. N. Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative Study on Three Testing Methods. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 8-17, 2002.
- KONTOGIORGIS, C.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Biological evaluation of several coumarin derivatives designed as possible anti-inflammatory/antioxidant Agents. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v.18, n.1, p.63–69, 2003.
- KRYGIER, K.; SOSULSKI, F.; HOGGER, L. Free, sterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.30, n.2, p.330-334, 1982.
- KUO, C.; SU, J.; CHIU, C.; PENG, C.; CHANG, C.; SUNG, T.; HUANG, S.; LEE, W.; CHYAU, C. Anti-Inflammatory Effects of Supercritical Carbon Dioxide Extract and Its Isolated Carnosic Acid from *Rosmarinus officinalis* Leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 8, p. 3674-3685, 2011.
- LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, v.46, p.244-282, 2007.
- LEE, C. P.; CHEN, Z. Y.; YU, P. Y.; WANG, Y. C.; DUH, P. D. Identification of bioactive compounds and comparison of apoptosis induction of three varieties of sugarcane leaves. **Journal of Functional Foods**, n. 4, p. 391–397, 2012.
- LEE, I.; LIM, J.; GAL, J.; KANG, J. C.; KIM, H. J.; KANG, B. Y.; CHOI, H. J. Anti-inflammatory activity of xanthohumol involves heme oxygenase-1 induction via NRF2-ARE signaling in microglial BV2 cells. **Neurochemistry International**, v. 58, p. 153–160, 2011.
- LEE, K. W.; HUR, H. J.; LEE, H. J.; LEE, C. Y. Antiproliferative Effects of Dietary Phenolic Substances and Hydrogen Peroxide. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n.6, p. 1990–1995, 2005.
- LEI, X.G.; VATAMANIUK, M.Z. Two Tales of Antioxidant Enzymes on β Cells and Diabetes. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.14, n.3, p.489-503, 2011.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v.51, n.2, p.216-226, 2008.

LIAO, J.; DENG, J.; CHIU, C.; HOU, W.; HUANG, S.; SHIE, P.; HUANG, G. Anti-Inflammatory activities of cinnamomum cassia constituents *in vitro* and *in vivo*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012. In press. Disponível em:< <http://www.hindawi.com/journals/ecam/2012/429320/>>. Acesso em 13 de Maio de 2012.

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.)**. São Paulo, 2008. 182p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

LIMA, A.B. **Estudo da ação antinociceptiva e anti-inflamatória do 1-nitro-2-feniletano, principal constituinte da *Aniba canelilla***. Belém, 2008. 83p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Pará.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research**, v. 674, p. 137–147, 2009.

LIN, C.; YIN, M. Renal Protective Effects of Extracts from Guava Fruit (*Psidium guajava* L.) in Diabetic Mice. **Plant Foods for Human Nutrition**. Publicado online: 12 de Maio de 2012.

LOGANAYAKI, N.; SIDDHURAJUB, P.; MANIANA, S. Antioxidant, anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of *Ammannia baccifera* L. (Lythraceae), a folklore medicinal plant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, p. 230–233, 2012.

LORENZI, H.; MATOS, F.J. In: MATOS, F.J.A. (Ed.). **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas**. 1 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2006. 512p.

LUE, B-M.; NIELSEN, N. S.; JACOBSEN, C.; HELLGREN, L.; GUO, Z.; XU, X. Antioxidant properties of modified rutin esters by DPPH, reducing power, iron chelation and human low density lipoprotein assays. **Food Chemistry**, v.123(2), p.221-230, 2010.

LUIS, J.C.; PÉREZ, R.M.; GONZÁLEZ, F.V. UV-B radiation effects on foliar concentrations of rosmarinic and carnosic acids in rosemary plants. **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1211–1215, 2007.

MacMAHON, S.B., CAFFERTY, W.B.J., MARCHAND, F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. **Experimental Neurology**, v.192, p.444-462, 2005.

MANCINI-FILHO, J.; NOVOA, A.V.; GONZALEZ, A.E.B.; ANDRADE-WARTHA, E. R.S.; SILVA, A.M.O.; PINTO, R.J.; MANCINI, D.P. Free Phenolic Acids from the Seaweed *Halimeda monile* with Antioxidant Effect Protecting against Liver Injury. **Zeitschrift für Naturforschung. C, A Journal of Biosciences**, v.64C, p.657-663, 2009.

MARIN, D.P.; BOLIN, A.P.; MACEDO, R.C.S.; SAMPAIO, S.C. OTTON, R. ROS production in neutrophils from alloxan-induced diabetic rats treated *in vivo* with astaxanthin. **International Immunopharmacology**, v.11, p.103-109, 2011.

- MATA, A.T. ; PROENÇA, C. ; FERREIRA, A.R. ; SERRALHEIRO, M.L.M. ; NOGUEIRA, J.M.F.; ARAÚJO, M.E.M. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. **Food Chemistry**, v. 103, p. 778-786, 2007.
- MATHEW, B. B.; TIWARI, A.; JATAWA, S.K. Free Radicals and Antioxidants: A Review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, n. 12, p. 4340-4343, 2011.
- MATTOUGH, F. A.; BUDIN, S. B.; HAMID, Z. A.; ALWAHAIBI, N.; MOHAMED, J. The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications. **SQU Medical Journal**, v. 12, n. 1, p. 5-18, 2012.
- MC CORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase, an enzyme function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v.244, p.6049-6055, 1969.
- MELLENDEZ-RAMIREZ, L.Y.; RICHARDS, R.; CEFALU, W.T. Complications of type 1 Diabetes. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v.39, p.625-640, 2010.
- MELO, G. A. N.; GRESPAN, R.; FONSECA, J. P.; FARINHA, T. O.; SILVA, E. L.; ROMERO, A. L.; BERSANI-AMADO, C. A.; CUMAN, R. K. N. Rosmarinus officinalis L. essential oil inhibits *in vivo* and *in vitro* leukocyte migration. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 9, p. 944–949, 2011.
- MENDES, A.L. Diabetes “Mellitus” tipo 2 no mundo: Atualização do tratamento medicamentoso. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v.99, n.2, p.32-38, 2011.
- MÉNDEZ, J.D.; XIE, J.; AGUILAR-HERNÁNDEZ, M.; MÉNDEZ-VALENZUELA, V. Trends in advanced glycation end products research in diabetes mellitus and its complications. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.341, p.33-41, 2010.
- MENG, G., ZHU, H.; YANG, S.; WU, F.; ZHENG, H.; CHEN, E.; XU, J. Attenuating effects of Ganoderma lucidum polysaccharides on myocardial collagen cross-inking relates to advanced glycation end product and antioxidant enzymes in high-fat-diet and streptozotocin-induced diabetic rats. **Carbohydrate Polymers**, v.84, n.1, p.180-185, 2011.
- MENGONI, E. S.; VICHERA, G.; RIGANO, L. A.; RODRIGUEZ-PUEBLA, M. L.; GALLIANO, S. R.; CAFFERATA, E. E.; PIVETTA, O. H.; MORENO, S.; VOJNOV, A. A. Suppression of COX-2, IL-1 β and TNF- α expression and leukocyte infiltration in inflamed skin by bioactive compounds from Rosmarinus officinalis L. **Fitoterapia**, v. 82, p. 414–421, 2011.
- MEOTTI, F.C. **Mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva e anti-inflamatória do flavonóide miricitrina: estudos *in vivo* e *in vitro***. Santa Maria, 2006. 131p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica - Universidade Federal de Santa Maria.
- MEZIANE-ASSAMI, D.; TOMAO, V.; RUIZ, K.; MEKLATI, B.Y.; CHEMAT, F. Geographical differentiation of rosemary based on GC/MS and fast HPLC analyses. **Food Analytical Methods**, 2012. In press. Disponível em: < <http://www.springerlink.com/content/673407pu3461574v/>>. Acesso em: 16 de Maio de 2012.
- MILLER, H.E. Simplified method for evaluation of antioxidants. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v.48, n.2, p.91, 1971.

MORAIS, S.M.; CAVALCANTI, E.S.B.; COSTA, S.M.O.; AGUIAR, L.A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, n.1B, p.315-320, 2009.

MOREIRA, A.V.B. **Efeito antioxidante dos compostos fenólicos de especiarias sobre os ácidos graxos das séries w3 e w6**. São Paulo, 2003. 153p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

MOREIRA, A.V.B.; MANCINI FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição da PUCCAMP**, v.17, n.4, p.411-424, 2004.

MORENO, S.; SCHEYER, T.; ROMANO, C. S.; VOJNOV, A. A. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. **Free Radical Research**, v. 40, n. 2, p. 223–231, 2006.

MUELLER, M.; HOBIGER, S.; JUNGBAUER, A. Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. **Food Chemistry**, v.122, p. 987-996, 2010.

NAKAGAWA, Y.; ISHII, E. Changes in arachidonic acid metabolism and the aggregation of polymorphonuclear leukocytes in rats with streptozotocin-induced diabetes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1315, n. 2, p. 145-151, 1996.

NALYSNYK, L.; HERNANDEZ-MEDINA, M.; KRISHNARAJAH, G. Glycaemic variability and complications in patients with diabetes mellitus: evidence from a systematic review of the literature. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v.12, p.288–298, 2010.

NEGI, G.; KUMAR, A.; JOSHI, R.P.; SHARMA, S.S. Oxidative stress and Nrf2 in the pathophysiology of diabetic neuropathy: Old perspective with a new angle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.408, p.1-5, 2011.

NEWSHOLME, P.; HABER, E.P.; HIRABARA, S.M.; REBELATO, E.; PROCOPIO, J.; MORGAN, D.; OLIVEIRA-EMILIO, H.R.; CARPINELLI, A.R.; CURI, R. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. **Journal of Physiology**, v.583, p.9-24, 2007.

NINFALI, P.; GENNARI, L.; BIAGIOTTI, E.; GANGI, F.; MATTOLI, L.; MAIDECCHI, A. Improvement in botanical standardization of commercial freeze-dried herbal extracts by using the combination of antioxidant capacity and constituent marker concentrations. **Journal of AOAC International**, v. 92, n.3, p. 797–805, 2009.

NINFALI, P.; MEA, G.; GIORGINI, S.; ROCCHI, M.; BACCHIOCCA, M. Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. **British Journal of Nutrition**, v. 93, p. 257–266, 2005.

NOVOA, A.V.; ANDRADE-WARTHA, E.R.S.; LINARES, A.F.; SILVA, A.M.O.; GENOVESE, M.I.; GONZÁLEZ, A.E.B.; VUORELA, P.; COSTA, A.; MANCINI-FILHO, J. Antioxidant activity and possible bioactive components in hydrophilic and lipophilic fractions from the seaweed *Halimeda incrassata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.21, p.53-57, 2011.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v.95, p.351–358, 1979.

OKUTAN, H.; OZCELIK, N.; YILMAZ, H. R.; UZ, E. Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat heart. **Clinical Biochemistry**, v.38, p.191-196, 2005.

OLIVEIRA, L. R. **Avaliação dos compostos fenólicos e das propriedades antioxidantes da polpa do pequi (*Caryocar* spp) processado e in natura**. São Paulo, 2010. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of selected foods, 2007. Disponível em: <<http://www.drgourmet.com/column/dr/2010/usda-orac.pdf>>. Acessado em: 07 de fevereiro de 2012.

OYAIZU, M. Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. **Japanese Journal of Nutrition**, v.44, p.307-315, 1986.

ÖZTÜRK, N.; TUNÇEL, M.; UYSAL, U. D.; ONCU-KAYA, E. M.; KOYUNCU, O. Determination of Rosmarinic Acid by High-Performance Liquid Chromatography and Its Application to Certain *Salvia* Species and Rosemary. **Food Analytical Methods**, v. 4, n.3, p. 300-306, 2011.

PALMEIRA, C. M.; ROLO, A. P.; BERTHIAUME, J.; BJORK, J. A.; WALLACE, K. B. Hyperglycemia decreases mitochondrial function: The regulatory role of mitochondrial biogenesis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 225, p. 214–220, 2007.

PANG, J.; GONG, H.; XI, C.; FAN, W.; DAI, Y.; ZHANG, T. Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1 is Involved in Glucose Toxicity Through SIRT1 Modulation in HepG2 Hepatocytes. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, p. 299–306, 2011.

PARK, J. B. Identification and quantification of a major anti-oxidant and anti-inflammatory phenolic compound found in basil, lemon thyme, mint, oregano, rosemary, sage, and thyme. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.62, n.6, p.577–584, 2011.

PATEL, S.S.; SHAH R.S.; GOYAL, R.K. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of Dihar, a polyherbal ayurvedic formulation in streptozotocin induced diabetic rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.47, n. 7, p. 564-570, 2009.

PÉREZ, M.B.; CALDERÓN, N. L.; CROCI, C. A. Radiation-induced enhancement of antioxidant activity in extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Food Chemistry**, v. 104, p. 585-592, 2007.

PÉREZ-FONS, L.; ARANDA, F.J.; GUILLÉN, J.; VILLALÁIN, J.; MICOL, V. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) diterpenes affect lipid polymorphism and fluidity in phospholipid membranes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.453, p.224–236, 2006.

PEREZ-MATUTE, P.; ZULET, M.A.; MARTINEZ, J.A. Reactive species and diabetes: counteracting oxidative stress to improve health. **Current Opinion in Pharmacology**, v.9, p.771-779, 2009.

PESHEV, D.; PEEVA, L.G.; PEEV, G.; BAPTISTA, I.I.R.; BOAM, A.T. Application of organic solvent nanofiltration for concentration of antioxidant extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Chemical Engineering Research and Design**, v. 89, p. 318–327, 2011.

PIGEOLET, E.; CORBISIER, P.; HOUBION, A.; LAMBERT, D.; MICHIELS, C.; RAES, M.; ZACHARY, M.D.; REMACLE, J. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 51, n.3, p.283-297, 1990.

PISAREV, V.B.; SNIGUR, G.L.; SPASOV, A.A.; SAMOKHINA, M.P.; BULANOV, A.E. Mechanisms of Toxic Effect of Streptozotocin on β -Cells in the Islets of Langerhans. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v.148, n.6, p.937-939, 2009.

PRIOR, R.L.; GU, L.; WU, X.; JACOB, R.A.; SOTOUDEH, G.; KADER, A.A.; COOK, R.A. Plasma antioxidant capacity changes following a meal as a measure of the ability of a food to alter *in vivo* antioxidant status. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 26, n.2, p. 170–181, 2007.

PROESTOS, C.; CHORIANOPOULOS, N.; NYCHAS, G-J.E.; KOMAITIS, M. RP-HPLC Analysis of the Phenolic Compounds of Plant Extracts. Investigation of Their Antioxidant Capacity and Antimicrobial Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.4, p.1190-1195, 2005.

RACKOVA, L.; OBLOZINSKY, M.; KOSTALOVA, D.; KETTMANN, V.; BEZAKOVA, L. Free radical scavenging activity and lipoxigenase inhibition of Mahonia aquifolium extract and isoquinoline alkaloids. **Journal of Inflammation**, v.4, n. 15, p. 1-7, 2007.

RAJASEKARAN, S.; SIVAGNANAM, K.; SUBRAMANIAN, S. Antioxidant effect of Aloe vera gel extract in streptozotocin-induced diabetic rats. **Pharmacological Reports**, v.57, p.90–96, 2005.

RAM, H. N. A. ; SRIWASTAVA, N. K. ; MAKHIJA, I. K.; SHREEDHARA, C. S. Anti-inflammatory activity of Ajmodadi Churna extract against acute inflammation in rats. **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**, v.3, n.1, p. 33–37, 2012.

RAMACHANDRAN, S.; RAJASEKARAN, A.; MANISENTHILKUMAR, K.T. Investigation of hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant activities of aqueous extract of Terminalia paniculata bark in diabetic rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 2012. In press. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2221169112600203>>. Acesso em: 16 de Maio de 2012.

RICHEIMER, S.L.; BERNART, M.W.; KING, G.A.; KENT, M.C.; BEILEY, D.T. Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.73, n.4, p.507-514, 1996.

ROGHANI, M.; BALUCHNEJADMOJARAD, T. Hypoglycemic and hypolipidemic effect and antioxidant activity of chronic epigallocatechin-gallate in streptozotocin-diabetic rats. **Pathophysiology**, v. 17, p. 55–59, 2010.

ROLO, A. P.; PALMEIRA, C. M. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 212, p. 167–178, 2006.

ROSENFELD, G. Corante pancreático para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do may-grunwald e do giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantan**, v.20, p.329-335, 1947.

ROZMAN, T.; JERSÈK, B. Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of *Listeria*. **Acta agriculturae Slovenica**, v. 93, p. 51–58, 2009.

SADEGHI, H.; HAJHASHEMI, V.; MINAIYAN, M.; MOVAHEDIAN, A.; TALEBI, A. A study on the mechanisms involving the anti-inflammatory effect of amitriptyline in carrageenan-induced paw edema in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 667, p. 396–401, 2011.

SANTANGELO, C.; VARI, R.; SCAZZOCCHIO, B.; DI BENEDETTO, R.; FILESI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, intracellular signaling and inflammation. **Ann Ist Super Sanità**, vol.43, n.4, p.394-405, 2007.

SBD - SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Dietrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2009.

SCAPAGNINI, G.; BUTTERFIELD, D.A.; COLOMBRITA, C.; SULTANA, R.; PASCALE, A.; CALABRESE, V. Ethyl ferulate, a lipophilic polyphenol, induces HO-1 and protects rat neurons against oxidative stress. **Antioxid Redox Signal**, v.6, n.5, p. 811-818, 2004.

SCAPAGNINI, G.; COLOMBRITA, C.; AMADIO, M.; D'AGATA, V.; ARCELLI, E.; SAPIENZA, M.; QUATTRONE, A.; CALABRESE, V. Curcumin activates defensive genes and protects neurons against oxidative stress. **Antioxid Redox Signal**, v.8, p. 395-403, 2006.

SCAPAGNINI, G.; FORESTI, R.; CALABRESE, V.; GIUFFRIDA, S. A.M, GREEN, C.J.; MOTTERLINI, R. Caffeic acid phenethyl ester and curcumin: a novel class of heme oxygenase-1 inducers. **Molecular Pharmacology**, v.61, n.3, p.554-61, 2002.

SCIENTIFIC OPINION OF THE PANEL ON FOOD ADDITIVES FLAVOURINGS PROCESSING AIDS-SOPFA. Materials in contact with food on a request from the commission on the use of rosemary extracts as a food additive. **European Food Safety Authority Journal**, v. 721, p. 1–29, 2008.

SENTURK, M.; KUFREVIOGLU, O.; I.; CIFTCI, M. Effects of some analgesic anaesthetic drugs on human erythrocyte glutathione reductase: an *in vitro* study. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 2, p. 420–424, 2009

SHANMUGAM, K.R.; MALLIKARJUNA, K.; NISHANTH, K.; KUO, C.H.; REDDY, K.S. Protective effect of dietary ginger on antioxidant enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissues. **Food Chemistry**, v.124, n.4, p.1436-1442, 2011.

SHARMA, A.K.; BHARTI, S.; GOYAL, S.; ARORA, S.; NEPAL, S.; KISHORE, K.; JOSHI, S.; KUMARI, S.; ARYA, D.S. Upregulation of PPAR γ by Aegle marmelos ameliorates insulin resistance and β -cell dysfunction in high fat diet fed streptozotocin induced type 2 diabetic rats. **Phytother Res**, v. 10, p. 1457–1465, 2011.

SHAW, J.E.; SICREE, R.A.; ZIMMET, P.Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.87, p.4-14, 2010.

SIES, H. Oxidative Stress: Introductory Remarks. In: ____ **Oxidative Stress**. London: Academic Press, 1985. p.1–8.

SIES, H.; KOCH, O.R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. **FEBS Letters**, v.103, p.287-290, 1979.

SILVA, A.M.O. **Efeito dos compostos fenólicos presentes no alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre as enzimas antioxidantes e os parâmetros bioquímicos de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina.** São Paulo, 2008. 83p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

SILVA, A.M.O.; ANDRADE-WARTHA, E.R.S.; CARVALHO, E.B.T.; LIMA, A.; NOVOA, A.V.; MANCINI-FILHO, J. Efeito do extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o estresse oxidativo em ratos diabéticos. **Revista de Nutrição**, v.24, p.121-130, 2011.

SILVA, A. M. O.; VIDAL-NOVOA, A.; BATISTA-GONZÁLEZ, A. E.; PINTO, J. R.; PORTARIMANCINI, D. A.; REINA-URQUIJO, W.; MANCINI-FILHO, J. In vivo and in vitro antioxidant activity and hepatoprotective properties of polyphenols from *Halimeda opuntia* (Linnaeus) Lamouroux. **Redox Report**, v.17(2), p. 47-53, 2012.

SINDHU, R.K.; KOO, J.R.; ROBERTS, C.K.; VAZIRI, N. D. Dysregulation of hepatic superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in diabetes response to insulin and antioxidant therapies. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 26, p. 43-53, 2004.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição da PUCCAMP**, v.15, n.1, p.71-81, 2002.

SOETIKNO, V.; SARI, F. R.; VEERAVEEDU, P. T.; THANDAVARAYAN, R. A.; HARIMA, M.; SUKUMARAN, V.; LAKSHMANAN, A. P.; SUZUKI, K.; KAWACHI, H.; WATANABE, KENICHI. Curcumin ameliorates macrophage infiltration by inhibiting NF-κB activation and proinflammatory cytokines in streptozotocin induced-diabetic nephropathy. **Nutrition & Metabolism**, v. 8, n.35, p. 2-11, 2011.

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

SOTELO-FÉLIX, J.I.; MARTINEZ-FONG, D.; MURIEL, P.; SANTILLÁN, R.L.; CASTILLO, D.; YAHUACA, P. Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, p.145-154, 2002.

SU, L.; YIN, J. ; CHARLES, D. ; ZHOU, K. ; MOORE, J. ; YU, L. Total phenolic contents, chelating capacities, and radical-scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf. **Food Chemistry**, v.100, p. 990-997, 2007.

SU, Y.; CHIOU, W.; CHAO, S. ; LEE, M.; CHEN, C.; TSAI, Y. Ligustilide prevents LPS-induced iNOS expression in RAW264.7 macrophages by preventing ROS production and down-regulating the MAPK, NF-κB and AP-1 signaling pathways. **International Immunopharmacology**, v.11, p. 1166-1172, 2011.

SUHAJ, M. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 531-537, 2006.

SULTANA, B.; ANWAR, F.; PRZYBYLSKI, R. Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. Trees. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1106-1114, 2007.

SWAIN, T.; HILLS, W.E. The phenolic constituents of *Punus domestica*. I-quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.19, p.63-68, 1959.

TAI, J.; CHEUNG, S.; WU, M.; HASMAN, D. Antiproliferation effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on human ovarian cancer cells *in vitro*. **Phytomedicine**, v. 19, n. 5, p. 436–443, 2012.

TALWAR, S.; NANDAKUMARA, K.; NAYAKA, P. G.; BANSALA, P.; MUDGALA, J.; MOR, V.; RAO, C.M.; LOBO, R. Anti-inflammatory activity of Terminalia paniculata bark extract against acute and chronic inflammation in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, p. 323-328, 2011.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical Biochemistry**, v.27, n.3, p.502-22, 1969.

TOPAL, G.; KOÇ, E.; KARACA, Ç.; ALTUĞ, T.; ERGIN, B.; DEMIRCI, C.; MELIKOĞLU, G.; MERİÇLİ, A. H.; KUCUR, M.; ÖZDEMİR, O.; DOĞAN, B. S.U.Effects of Crataegus microphylla on Vascular Dysfunction in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. **Phytotherapy Research**, Publicado online: 14 de Maio de 2012.

TOUNEKTI, T.; VADEL, A.M.; ENNAJEH, M.; KHEMIRA, H.; MUNNÉ-BOSCH, S. Ionic interactions and salinity affect monoterpene and phenolic diterpene composition in rosemary (*Rosmarinus officinalis*). **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 174, n. 3, p. 504–514, 2011.

TRINDADE, R.A.; LIMA, A.; ANDRADE-WARTHA, E.R.; SILVA, A.M.O.; MANCINI-FILHO, J.; VILLAVICENCIO, A.L.C.H. Consumer's evaluation of the effects of gamma irradiation and natural antioxidantes on general acceptance of frozen beef burger. **Radiation Physics and Chemistry**, v.78, p.293-300, 2009.

TROUILLAS, P.; CALLISTE, C.A.; ALLAIS, D.P.; SIMON, A.; MARFAK, A.; DELAGE, C.; DUROUX, J.L. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. **Food Chemistry**, v. 80, n. 3, p. 399–407, 2003.

TSAI, P. ; TSAI, T. ; HO, S. *In vitro* inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of Streptococcus sobrinus. **Food Chemistry**, v.105, p. 311-316, 2007.

TSAI, P.; TSAI, T.; YU, C.; HO, S. Evaluation of NO-suppressing activity of several Mediterranean culinary spices. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 440-447, 2007.

TSAI, T-H.; TSAI, T-H.; CHIEN, Y-C.; LEE, C-W.; TSAI, P-J. *In vitro* antimicrobial activities against cariogenic streptococci and their antioxidant capacities: A comparative study of green tea versus different herbs. **Food Chemistry**, v.110(4), p.859-864, 2008.

TZUNG-HSUN TSAI, T.H.; TSAI, T.H.; CHIEN, Y.C.; LEE, C.W.; TSAI, P.J. *In vitro* antimicrobial activities against cariogenic streptococci and their antioxidant capacities: A comparative study of green tea versus different herbs. **Food Chemistry**, v. 110, v. 4, p. 859–864, 2008.

UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). **Lancet**, v.352, p.837–853, 1998.

UNGVARI, Z.; BAILEY-DOWNS, L.; GAUTAM, T.; JIMENEZ, R.; LOSONCZY, G.; ZHANG, C.; BALLABH, P.; RECCHIA, F. A.; WILKERSON, D.C.; SONNTAG, W. E.; PEARSON, K.; CABO, R.; CSISZAR, A. Adaptive induction of NF-E2-related factor-2-driven antioxidant genes in endothelial cells in response to hyperglycemia. **American Journal of Physiology**, v. 300, n. 4, p. 1133-1140, 2011.

VALDAMERI, G.; TROMBETTA-LIMA, M.; WORFEL, P. R.; PIRES, A. R. A.; MARTINEZ, G. R.; NOLETO, G. R.; CADENA, S. M. S. C.; SOGAYAR, M. C.; WINNISCHOFER, S. M. B.; ROCHA, M. E. M. Involvement of catalase in the apoptotic mechanism induced by apigenin in HepG2 human hepatoma cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 193, p. 180–189, 2011.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, p.44-84, 2007.

VANITHADEVI, B.; ANURADHA, C.V. Effect of rosmarinic acid on insulin sensitivity, glyoxalase system and oxidative events in liver of fructose-fed mice. **International Journal of Diabetes and Metabolism**, v.16, p.35-44, 2008.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, p.1323-1338, 2007.

VATTEM, D.A.; SHETTY, K. Biological functionality of ellagic acid: a review. **Journal of Food Biochemistry**, v.29, p.234-266, 2005.

VIDAL, A.; ANDRADE-WARTHA, E.R.S.; SILVA, A.M.O.; PAVAN, R.; LIMA, A.; FALLARERO, A.; BATISTA, A.E.; MANCINI-FILHO, J. Actividad antioxidante y polifenoles de las algas marinas halimeda opuntia y halimeda monile. **Ars Pharmaceutica**, v.50, p.24-31, 2009.

VIDAL, A.; FALLARERO, A.; ANDRADE-WARTHA, E.R.S.; SILVA, A.M.O.; LIMA, A.; TORRES, R.P.; VUORELA, P.; MANCINI-FILHO, J. Composición química y actividad antioxidante del alga marina roja *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, p.589-600, 2006.

WAGNER, A. E.; BOESCH-SAADATMANDI, C.; BRECKWOLDT, D.; SCHRADER, C.; SCHMELZER, C.; DÖRING, F.; HASHIDA, K.; HORI, O.; MATSUGO, S.; RIMBACH, G. Ascorbic acid partly antagonizes resveratrol mediated heme oxygenase-1 but not paraoxonase-1 induction in cultured hepatocytes - role of the redox-regulated transcription factor Nrf2. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.11, n.1, p. 2- 8, 2011.

WAGNER, H.; BLADT, S. Flavonoid drugs including *Ginkgo Biloba* and *Echinaceae* Species. In: _____ **Plant drug Analysis**. A thin Layer Chromatography atlas. 2.ed. Verlag Berlin Heidelberg: Springer, 1996. P.195-197.

- WANG, H.; JOSEPH, J. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, p. 612–616, 1999.
- WASSMANN, S.; WASSMANN, K.; NICKENIG, G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. **Hypertension**, v.44, p.381-386, 2004.
- WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v.27, p.1047-1053, 2004.
- WOJDYŁO, A.; OSZMIAŃSKI, J.; CZEMERYŚ, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, v.105, p. 940-949, 2007.
- WU, C.; HUANG, S.; LIN, J.; YEN, G. Inhibition of advanced glycation endproduct formation by foodstuffs. **Food & Function**, v. 2, n. 5, p. 224-234, 2011.
- WU, J.; HSIEH, C.; WANG, H.; CHEN, H.; Inhibitory effects of guava (*Psidium guajava* L.) leaf extracts and its active compounds on the glycation process of protein. **Food Chemistry**, v. 113, p.78–84, 2009.
- YAMAGISHI, S-I.; MATSUI, T. Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.3, n.2, p.101-108, 2010.
- YANG, Y.; LII, C.; LIN, A.; YEH, Y.; YAO, H.; LI, C.; LIU, K.; CHEN, H. Induction of glutathione synthesis and heme oxygenase 1 by the flavonoids butein and phloretin is mediated through the ERK/Nrf2 pathway and protects against oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, p. 2073–2081, 2011.
- YEH, C. T.; CHING, L. C.; YEN, G. C. Inducing gene expression of cardiac antioxidant enzymes by dietary phenolic acids in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, p. 163–171, 2009.
- YEH, C.; YEN, G. Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multidrug resistance–associated protein 3 mRNA expression. **Journal of Nutrition**, v.136, p.11-15, 2006a.
- YEH, C.; YEN, G. Modulation of hepatic phase II phenol sulfotransferase and antioxidant status by phenolic acids in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.17, n.8, p.561-569, 2006b.
- YESILADA, E.; KUPELI, E. *Clematis vitalba* L. aerial part exhibits potent antiinflammatory, antinociceptive and antipyretic effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p.504–515, 2007.
- YILMAZ, H. R.; UZ, E.; YUCEL, N.; ALTUNTAS, I.; OZCELIK, N. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat liver. **Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology**, v.18, n.4, p.234-238, 2004.
- YOO, K. M.; LEE, C. H.; LEE, H.; MOON, B.; LEE, C. Y. Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. **Food Chemistry**, v. 106, p. 929–936, 2008.
- YOUNG, R. N. Inhibitors of 5-lipoxygenase: a therapeutic potential yet to be fully realized? **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 34, p. 671–685, 1999.

ZAOUALI, Y.; BOUZAIN, T.; BOUSSAID, M. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 3144–3152, 2010.

ZEGURA, B.; DOBNIK, D.; NIDERL, M. H.; FILIPIC, M. Antioxidant and antigenotoxic effects of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extracts in *Salmonella typhimurium* TA98 and HepG2 cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 32, p. 296–305, 2011.

ZHANG, B.; KANG, M.; XIE, Q.; XU, B.; SUN, C.; CHEN, K.; WU, Y. Anthocyanins from Chinese Bayberry Extract Protect β Cells from Oxidative Stress-Mediated Injury via HO-1 Upregulation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 537–545, 2011.

ZHANG, Y.; SHI, H.; SUN, G.; LI, S.; XU, X.; YE, C.; LI, X.; WANG, S. High Glucose Induces Dysfunction and Apoptosis in Endothelial Cells: Is the Effect of High Glucose Persistence more Important than Concentration? **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 119, n. 4, p. 225–233, 2011.

ZHOU, H.Y.; SHIN, E.M.; GUO, L.Y.; ZOU, L.B.; XU, G.H.; LEE, S.H.; ZE, K.R.; KIM, E.K.; KANG, S.S.; KIM, Y.S. Anti-inflammatory activity of 21 (α , β)-methylemelanodiols, novel compounds from *Poncirus trifoliata* Rafinesque. **European Journal of Pharmacology**, v. 572, p. 239–248, 2007.

ZHU, W.; JIA, Q.; WANG, Y.; ZHANG, Y.; XIA, M. The anthocyanin cyanidin-3-O- β -glucoside, a flavonoid, increases hepatic glutathione synthesis and protects hepatocytes against reactive oxygen species during hyperglycemia: Involvement of a cAMP–PKA-dependent signaling pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 2, p. 314–327, 2012.

ANEXO 01: Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FCF/USP) para realização dos ensaios com animais de laboratório.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/26/2011

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto **“Avaliação do efeito dos compostos fenólicos do alecrim (Rosmarinus officinalis L.) sobre a inflamação e atividade/expressão das enzimas antioxidantes de ratos diabéticos.”** (Protocolo CEUA/FCF/307), de responsabilidade da pesquisadora **Ana Mara de Oliveira e Silva** sob a orientação do Prof. Dr. Jorge Mancini Filho, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi **APROVADO** em reunião de 14 de março de 2011.

São Paulo, 15 de março de 2011.

Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP