

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EFEITO ANTIOXIDANTE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Baccharis*
trimera: UMA AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO*.

Bruno da Cruz Pádua

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

Reitor

João Luiz Martins

Vice-Reitor

Antenor Barbosa Junior

Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação

André Barros Cota

NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Coordenador

Milton Hércules Guerra de Andrade

NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Coordenador

Luís Carlos Crocco Afonso

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EFEITO ANTIOXIDANTE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Baccharis trimera*: UMA AVALIAÇÃO *IN VITRO E IN VIVO*.

Bruno da Cruz Pádua

Orientadora

Professora Doutora Maria Lúcia Pedrosa

Co-orientadora

Professora Doutora Daniela Caldeira Costa

Professor Doutor Marcelo Eustáquio Silva

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para à obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica Estrutural e Fisiológica.

Ouro Preto, M.G.
2010

Este trabalho foi realizado no **Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular** e no **Laboratório de Nutrição Experimental** do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, com auxílio da *CAPES, FAPEMIG E UFOP*.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais, Antônio e Neuza,
Por seus exemplos de vida e por tudo que eles representam.

E aos meus irmãos e sobrinhos,

Por alegrarem o meu viver a cada dia.

Obrigado por acreditarem tanto em mim...

Amo vocês!

*“Nenhuma mente que se abre para uma nova
idéia voltará a ter o tamanho original”*

Albert Einstein

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Gostaria de agradecer a **Professora Maria Lúcia Pedrosa**, a **Professora Daniela Caldeira Costa** e ao **Professor Marcelo Estáquio Silva**, primeiramente, por sempre acreditarem no futuro deste projeto e nas reais potencialidades da carqueja como planta medicinal. E, por conseguinte, pela competência com que me orientaram na construção desta dissertação e pelo tempo que generosamente me dedicaram transmitindo-me os melhores e mais úteis ensinamentos, com paciência, lucidez e confiança. Sou muito grato a vocês por todo o aprendizado, e os tenho como exemplo a seguir durante toda a minha vida profissional.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por estar sempre ao meu lado e por me conceder a graça de chegar até aqui.

A todos **meus familiares** pela amizade e confiança.

Ao **Guilherme Malafaia, Régia Ferreira, Érica Pimenta e Juliana Santiago**, pessoas incríveis que conheci em Ouro Preto e que se tornaram grandes amigos. Obrigado pela companhia e pelos momentos de risadas, reflexões e divertimento.

A minha amiga **Ana Carolina Craveiro**, um verdadeiro misto de ternura, explosão, seriedade, loucura... uma pessoa realmente complexa, mas verdadeiramente singular na sua amizade, no seu amor e no seu modo de dizer vai amigo você consegue. Te amo minha doidinha.

À **Larissa Bonomo**, grande amiga que pude ter o enorme prazer de conhecer no período da minha iniciação científica e conviver durante todo este período.

À **Glauco Rodrigues, ao Lucas Dornela e à Monica Sotero** pela amizade e pela enorme contribuição na idealização deste trabalho

Aos amigos de Ouro Preto, **Thássia Cavalcante, Edgar Júnior, Tomás Lopes, Beatriz Arenghe, Darília Leite, Victor Santos e Augusto Peluso** que tornaram cada momento uma festa, cada rock inesquecível e cada perigo um ADORO!!!

Aos amigos de Belo Horizonte **Filipe Pinheiro, Carlos Bento, João Francisco, Ronaldo Lage e Milene Barbosa** que tornaram cada minuto em Belo Horizonte o suficiente para torná-la inesquecível.

Aos **colegas da pós-graduação** pela agradável convivência.

Ao **Jair Pastor Mota** e a **Maria Aparecida Reis Trópia**, pela dedicação e disponibilidade que sempre me atenderam.

A todos os amigos do Laboratório de Nutrição Experimental, em especial a **Aline Mayrink, Bárbara Quirino, Emerson Cruz, Fabiano Kenji, Fernanda Camini, Joamyr Rossoni, Joyce Ferreira, Heberth De Paula, Lorena Silva, Maísa Silva, Melina Souza, Rogério Tadeu, Sandra Camilo, Simone Cunha e Wanda Faria** a minha gratidão e a certeza de que, sem vocês, este trabalho não teria sido possível.

A todos os amigos do **Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular**, obrigado pelos momentos de risadas compartilhados na bancanda.

RESUMO

Baccharis trimera (Asteraceae) é uma planta amplamente distribuída na América do Sul e conhecida popularmente como carqueja. Muitas atividades biológicas têm sido atribuídas a diversas preparações desta espécie: analgésica, hepatoprotetora, antiinflamatória e antioxidante. Pesquisas da composição química de *B. trimera* demonstraram que este vegetal possui componentes bioativos como os triterpenos, relatados como os principais responsáveis pela atividade antiinflamatória da planta e os flavonóides, relacionados à proteção do organismo contra os radicais livres. No presente estudo, utilizando-se ratos Fischer machos, avaliamos, em um modelo de fagocitose, o efeito de *B. trimera* sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em neutrófilos e, em um modelo de inflamação, o efeito de *B. trimera* tanto sobre a produção de óxido nítrico e de EROs, quanto sobre as defesas antioxidantes e as concentração de biomarcadores do estresse oxidativo. A toxicidade dos tratamentos foi avaliada pelas atividades de transaminases e creatinina, marcadores da função hepática e renal, respectivamente, e por análises histológicas. No ensaio *in vitro*, neutrófilos de ratos machos foram isolados e incubados com extrato de *B. trimera* na concentração de 0,5 µg/mL, 5 µg/mL e 50 µg/mL, enquanto que no ensaio *in vivo* os ratos foram tratados com 600 mg/kg de *B. trimera* e 24h depois com 835 mg/Kg de acetaminofen (APAP). O extrato reduziu a produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos tanto nos modelos experimentais *in vitro* quanto *in vivo*, além disso, análise dos níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBAR), em outro modelo metodológico, indicou que os animais tratados com *B. trimera* e em seguida intoxicados com APAP apresentaram níveis de TBAR inferiores aos dos animais que receberam somente APAP. Esses dados associados à redução na concentração de NO em ratos tratados com o extrato de carqueja e posteriormente intoxicados com acetaminofen são fortes indícios que confirmam o real efeito antioxidante atribuído à *B. trimera*. Apesar desses efeitos, análises bioquímicas e histológicas indicaram que *B. trimera* não foi eficiente em reverter os danos hepáticos provocados pelo APAP.

ABSTRACT

Baccharis trimera (Asteraceae), is a widely spread plant in South America and popularly known as carqueja. Many biological activities have been attributed to many preparations using this species: analgesic, hepatoprotective, anti-inflammatory and anti-oxidizing. Researches on the chemical composition of *B. trimera* show that this plant has bioactive compounds such as triterpenes, reported as the main responsible for the anti-inflammatory activity of the plant and flavonoids, related to the organism's protection against free radicals. In the present study, using male Fischer rats, the effect of *B. trimera* on the production of reactive oxygen species (ROS) in neutrophils was evaluated in a phagocytosis model; and in an inflammation model, the effect of *B. trimera* on the production of nitric oxide and ROS, as well as on the anti-oxidizing defenses and the concentration of oxidative stress biomarkers. The toxicity of treatments was evaluated through hepatic and kidney function. In the *in vitro* essay, neutrophils of male rats were isolated and incubated in *B. trimera* extract in the concentrations of 0,5 µg/mL, 5 µg/mL e 50 µg/mL, whereas in the *in vivo* essay the rats were treated with 600 mg/kg of *B. trimera* and 24 hours later with 835 mg/Kg of acetaminophen (APAP). The extract reduced the production of reactive oxygen species in neutrophils in the *in vitro* experimental model as well as in the *in vivo* model. In addition, analysis of the levels of substances reactive to tiobarbituric acid (TBAR) indicated that the animals treated with *B. trimera* and next intoxicated with APAP presented TBAR levels lower than the animals which received only APAP. These data associated with a reduction in the concentration of NO in rats treated with the extract of *B. trimera* and then intoxicated with acetaminophen are strong indicators which confirm the real anti-oxidizing effect attributed to *B. trimera*. Despite these effects, biochemical and histological analyses indicated that *B. trimera* was not efficient in reversing the hepatic damages caused by APAP.

SUMÁRIO

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE FIGURAS	XIII
ABREVIATURAS	XIV
ANEXOS	XV
ANEXO I – PROTOCOLOS DAS DOSAGENS BIOQUÍMICAS	XV
ANEXO II – ARTIGO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO.....	XV
ANEXO III – RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS.....	XV
1 - INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 – ESPÉCIES REATIVAS	4
RADICAIS OXIGÊNIO	5
DERIVADOS DE OXIGÊNIO NÃO RADICAIS	5
2.2. ESTRESSE OXIDATIVO.....	10
2.3. SISTEMAS ANTIOXIDANTES	12
2.4 - UTILIZAÇÃO DO GÊNERO <i>BACCHARIS</i> COMO PLANTA MEDICINAL	16
2.4.1 – <i>BACCHARIS TRIMERA</i>	17
2.4.2 - COMPONENTES BIOATIVOS DE <i>BACCHARIS TRIMERA</i>	19
2.4.2.1 - <i>Flavonóides</i>	19
2.4.2.2 – <i>Triterpenóides</i>	21
3 – OBJETIVOS	24
3.1 – OBJETIVO GERAL	24
3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3.2.1 - <i>In vitro</i> :.....	24
3.2.2 - <i>In vivo</i> :.....	24
4 – MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 - <i>REAGENTES</i>	25
4.2 - <i>ANIMAIS</i>	25
4.3 – <i>COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO</i>	25
4.4 – <i>PREPARAÇÃO DO EXTRATO</i>	25
4.5 – <i>ISOLAMENTO DE LEUCÓCITOS POLIMORFONUCLEARES</i>	26
4.6 – <i>OPSONIZAÇÃO DE PARTÍCULAS DE ZIMOSAN</i>	26
	X

4.7 – ENSAIO “IN VITRO”	27
4.8 - AVALIAÇÃO DA INJÚRIA HEPÁTICA INDUZIDA POR APAP	27
4.9 – ENSAIO “IN VIVO”	27
4.9.1 - <i>Análise das espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico</i>	27
4.9.2 - <i>Análise das defesas antioxidantes, concentração de biomarcadores do estresse oxidativo e marcadores da função hepática e renal</i>	28
4.9.3 – <i>Histopatologia</i>	28
4.10 - AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	29
4.11 – DOSAGENS BIOQUÍMICAS.....	29
4.11.1 - <i>Paraoxonase – Atividade Arilesterase em soro</i>	29
4.11.2 - <i>Paraoxonase – Atividade Paraoxonase no soro</i>	30
4.11.3 - <i>Concentração de Glutathione Total em tecidos</i>	31
4.11.4 - <i>Catalase</i>	33
4.11.5 - <i>Proteína Carbonilada</i>	34
4.11.6 – <i>Proteínas totais em tecidos – método de Lowry</i>	35
4.11.7 – <i>TBARS</i>	37
4.11.8 - <i>Óxido Nítrico</i>	38
4.12 – ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
5 - RESULTADOS.....	41
6 - DISCUSSÃO.....	52
7 - CONCLUSÃO	60
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
9 - ANEXOS.....	74
ANEXO I – PROTOCOLOS DAS DOSAGENS BIOQUÍMICAS	74
1.1 - <i>Alanina Aminotransferase</i>	74
1.2 - <i>Aspartato Aminotransferase</i>	75
1.3 – <i>Dosagem de creatinina</i>	77
ANEXO II – TRABALHO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO	79
ANEXO III – RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela I - Nomes, simbologia, meia-vida em segundos e peculiaridades químicas de metabólitos radicais e não radicais do oxigênio.

Tabela II – Efeito do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* sobre as defesas antioxidantes de ratos 24 h após o tratamento com APAP.

Tabela III – Efeito do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* sobre os produtos do estresse oxidativo de ratos 24 h após o tratamento com APAP.

Tabela IV – Efeito do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* sobre os marcadores bioquímicos de função hepática e renal de ratos 24 h após o tratamento com APAP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Complexo NADPH oxidase.

Figura 2 – Formação do óxido nítrico a partir da L-arginina.

Figura 3: Respostas celulares a diferentes graus de estresse oxidativo.

Figura 4 - Dismutação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água catalisada pela catalase.

Figura 5 - Dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio catalisada pela glutatona.

Figura 6 – Conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio catalisada pela SOD.

Figura 7: Foto da espécie de *Baccharis trimera*.

Figura 8 – Estrutura geral dos flavonóides.

Figura 9 – Estruturas das principais classes de flavonóides.

Figura 10 – Efeito de *B. trimera* sobre a modulação de EROs (painel A) e a viabilidade celular (painel B) em neutrófilos *in vitro*.

Figura 11 – Painel A - Efeito de *B. trimera* sobre a produção de ERO de neutrófilos *in vitro*. Painel B – curva temporal típica do ensaio de quimioluminescência acompanhado em intervalos de 1 minuto durante 30 minutos.

Figura 12 – Hepatotoxicidade do APAP em ratos Fischer pela atividade de ALT.

Figura 13 – Hepatotoxicidade do APAP em ratos Fischer pela atividade de AST.

Figura 14 – Efeito do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* sobre a produção de ERO em neutrófilos de ratos 24 h após o tratamento com APAP.

Figura 15 – Efeito do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* sobre a produção de óxido nítrico em neutrófilos de ratos 24 h após o tratamento com APAP.

Figura 16 – Efeito do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* sobre a produção de óxido nítrico no plasma de ratos 24 h após o tratamento com APAP.

Figura 17 – Secção do fígado de ratos após 24hs de administração com PBS (A), e/ou APAP (B), e/ou extrato de *B. trimera* (C), e/ou extrato de *B. trimera* e APAP (D).

ABREVIATURAS

ALT - Alanina aminotransferase

AST - Aspartato aminotransferase

APAP - Acetaminofen

DNA - Ácido desoxirribonucléico

EROs - Espécies reativas de oxigênio

ERNs - Espécies reativas de nitrogênio

GSH - Glutathiona reduzida

GSSG - Glutathiona oxidada;

HIV - Vírus da imunodeficiência adquirida

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

NADPH - Nicotidamida adenina dinucleotídeo fosfato

NAPQUI - N-acetil-p-benzoquinona-imine

NO - Óxido nítrico

NOS - Óxido nítrico sintase

O₂^{·-} - Radical superóxido

OH - Radical hidroxila

ONOO⁻ - Radical peroxinitrito

PON – Paraoxonase

RLU – Unidade de luz relativa

SOD - Superóxido desmutase

TBAR - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

ZC3b – Partículas de zimosan opsonizado

ANEXOS

Anexo I – Protocolos das Dosagens Bioquímicas.

I.1 - Alanina Aminotransferase

I.2 - Aspartato Aminotransferase

I.3 - Creatinina

Anexo II – Artigo submetido à publicação

Anexo III – Resumos publicados em anais de congressos

1 - INTRODUÇÃO

Estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a capacidade de ação dos sistemas de defesa antioxidante para neutralizá-las e prevenir seus efeitos deletérios (Mayne, 2003). Dentre as espécies reativas estão as espécies reativas de oxigênio (EROs), moléculas derivadas do metabolismo do oxigênio e produzidos em todos os sistemas biológicos. Tais espécies incluem o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila (OH), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o óxido nítrico (NO) e o radical peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$). As EROs são capazes de oxidar diferentes biomoléculas incluindo DNA, proteínas, carboidratos, ácidos graxos e muitas outras estruturas celulares (Bagchi & Puri, 1998), resultando em um dano tecidual com conseqüente morte celular (Nordberg et al., 2001).

Esses danos oxidativos podem desempenhar um significativo papel patológico em diversas doenças humanas. Existem evidências de que as espécies reativas possam estar envolvidas em mais de 100 doenças ou eventos nosológicos, como na malária, na infecção pelo HIV, doenças cardíacas, arteriosclerose, diabetes, câncer e úlcera gástrica (Elmastas, 2006; Gülçin et al., 2005). Em muitos desses eventos, a origem das espécies reativas parece estar diretamente relacionada à ativação de neutrófilos por proteínas do complemento (Thommsen, 1985).

Os neutrófilos são leucócitos polimorfonucleares formados na medula óssea. Eles têm um papel crucial na defesa do organismo contra bactérias, fungos e protozoários, constituindo a principal célula efetora da imunidade inata. Em resposta a um patógeno invasor, os neutrófilos migram para o tecido afetado, formando a primeira linha de defesa do organismo contra infecções (Faurichou et al., 2003 e Nathan, 2006). Quando ativados sofrem uma “explosão respiratória”, durante a qual uma grande quantidade de oxigênio é convertida em ânion superóxido, pela ação da enzima NADPH oxidase (Babior, 1994). Outras espécies reativas decorrentes dessa “explosão respiratória” são as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) originadas a partir da reação do óxido nítrico com o ânion superóxido, formando assim o peroxinitrito. Esse peroxinitrito, juntamente com o óxido nítrico e as outras EROs, são potentes agentes tóxicos produzidos pelos neutrófilos, sendo capazes de matar os microrganismos fagocitados e, quando liberados no meio extracelular, também causar lesões oxidativas aos tecidos do hospedeiro (Hampton et al., 1998).

Um estudo realizado por Zhang et al., (1994) sugere que a injúria tecidual mediada por neutrófilos é decorrente de sua ativação, migração e aderência aos tecidos infectados, com conseqüente produção e liberação de espécies reativas. Enquanto que o de Bautista et al., (1992) demonstra que os neutrófilos contribuem para a lesão tecidual através da liberação de outros oxidantes extracelulares como o ácido hipocloroso.

A íntima relação existente entre os radicais livres produzidos pelos neutrófilos e as diversas doenças correlacionadas acelerou as investigações feitas com plantas utilizadas na medicina popular, uma vez que os seus compostos naturais são utilizados como opções para o combate a diferentes patologias.

Neste contexto, pode-se destacar o gênero *Baccharis*, pertencente à família Asteraceae do Reino Plantae. Estudos têm demonstrado que extratos preparados com as partes aéreas destas plantas podem ser usados no tratamento de diversas patologias humanas, tais como em doenças hepáticas, problemas circulatórios, processos inflamatórios exacerbados e até mesmo em regimes de emagrecimento (Coelho et al. 2004; Januário et al. 2004; Melo et. al. 2001).

Em virtude desses efeitos biológicos, pesquisas sobre a composição química da espécie *Baccharis trimera*, uma planta amplamente distribuída na América do Sul e conhecida popularmente como carqueja, demonstraram que este vegetal possui vários componentes bioativos como flavonóides, diterpenos e triterpenos (Verdi et al., 2005). Os triterpenos, juntamente com um conjunto de saponinas descritos por Gené et al., 1996, têm sido relatados como os principais responsáveis pela atividade antiinflamatória da planta (Della-Loggia et al., 1994; Akihisa et al., 1996), enquanto que os flavonóides, por possuírem ação antioxidante, têm sido relacionados à proteção do organismo contra os radicais livres (Rodrigues et. al., 2009).

Uma vez que os neutrófilos estão envolvidos na progressão de várias doenças, a descoberta de produtos naturais capazes de modular sua resposta será de grande relevância. Diante disso o presente estudo teve como intuito elucidar os possíveis efeitos antioxidantes de *B. trimera* sobre os neutrófilos, utilizando-se dois modelos experimentais que, por mecanismos distintos, levam a uma ativação de neutrófilos com conseqüente aumento na produção de espécies reativas.

O primeiro modelo para este fim foi o de fagocitose induzida por zimosan (ZC3b). O zimosan é uma preparação de células de levedura (*Saccharomyces*

cerevisiae) que, em contato com o soro sanguíneo, ativa o sistema complemento, produzindo partículas revestidas (opsonizadas) com componentes do mesmo (C3b, C3bi). Estes, por sua vez, são reconhecidos por receptores de membrana dos neutrófilos, levando ao processo de fagocitose. Já o segundo modelo foi o de inflamação induzido por acetaminofen (APAP). Como se sabe, o APAP é uma droga analgésica e antipirética segura em doses terapêuticas. Contudo, em quantidade elevada gera, em excesso, um intermediário altamente reativo e citotóxico, o N-acetil-p-benzoquinona-imine (NAPQUI) (Lee, et al., 1996; Vermeulen, et al., 1992) que pode causar danos no fígado e nos rins e até mesmo, em humanos e animais de laboratórios, conduzi-los à morte (Jollow, et al., 1974).

Além disso, pelo fato de haver poucos estudos *in vivo* que avaliam os efeitos decorrentes do uso dessa planta na literatura, resolvemos também avaliar algumas propriedades funcionais derivadas do consumo do extrato de *B. trimera*, especialmente sobre as defesas antioxidantes, concentração de biomarcadores do estresse oxidativo e marcadores da função hepática e renal.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Espécies Reativas

O oxigênio é uma molécula fundamental para os organismos aeróbios, utilizada tanto na produção de energia através da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria dos eucariotos, como na membrana celular de muitas bactérias, e em inúmeras vias metabólicas fundamentais (Halliwell e Gutteridge, 2007).

A idéia que o oxigênio pode causar danos ao organismo não é recente. Trabalhos pioneiros que atribuíram toxicidade ao oxigênio foram realizados por John Bean e Paul Bert há mais de meio século (Bean, 1945; Bert, 1943). Em 1956, Denham Harman sugeriu que radicais livres estariam envolvidos em eventos fisiológicos, particularmente, no processo de envelhecimento (Harman, 1956). Esta hipótese inspirou numerosos estudos que contribuíram para o conhecimento atual sobre radicais livres e espécies reativas derivadas do oxigênio. Embora os radicais livres já sejam conhecidos há várias décadas, indiscutivelmente, nos últimos anos, eles têm ganhado notoriedade nas diversas áreas do conhecimento médico, em função de sua efetiva associação com diversos processos fisiopatológicos de grande importância.

De fato, devido à sua alta reatividade química as espécies reativas podem atuar modificando os componentes celulares como lípidos, ácidos nucleicos, proteínas e carboidratos. Além disto, estas espécies reativas podem comprometer a função mitocondrial, levando a alterações morfológicas (Cadenas, 1995). Estas alterações são provocadas devido à formação do ânion superóxido a partir da redução do oxigênio pela transferência de um único elétron, ou da formação de peróxido de hidrogênio pela transferência de dois elétrons ou, ainda, pela formação do radical hidroxil e do oxigênio “singlet” (Cadenas, 1995)..

Como pode ser observado na tabela I, há diversos tipos de espécies reativas e estas apresentam peculiaridades que as diferenciam em vários aspectos (Bagchi & Puri, 1998), tais como: origem ou fontes, meia-vida, reatividade e até mesmo prováveis alvos.

Tabela I - Nomes, simbologia, meia-vida em segundos e peculiaridades químicas de metabólitos radicais e não radicais do oxigênio.

Nomes, Símbolos	Meia-vida/seg.	Peculiaridades
RADICAIS OXIGÊNIO		
Superóxido ($O_2^- \bullet$)	-	Gerado por fagócitos ou linfócitos e fibroblastos no processo inflamatório; pode atuar como sinalizador molecular e na produção de radical hidroxila ($OH \bullet$), oxigênio singleto (1O_2) e peroxinitrito (ONOOH). Gerado também por NAD(P)H oxidase e irradiação.
Hidroxila ($OH \bullet$)	(10^{-9})	Formado a partir da reação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com metais de transição e por hemólise da água exposta à radiação; é muito deletério ao organismo devido a sua alta reatividade em sistemas biológicos. Causa danos ao DNA, RNA, às proteínas, lipídios e membranas do núcleo e mitocondrial.
Peroxila ($ROO \bullet$)	(7)	Gerado na etapa de propagação da lipoperoxidação, quando pode atacar hidrogênio de cadeias de ácidos graxos poliinsaturados, formando hidroperóxidos lipídicos. São susceptíveis à ação de antioxidantes exógenos.
Óxido nítrico ($NO \bullet$)	(1-10)	Origina peroxinitrito (ONOOH) quando reage com superóxido ($O_2^- \bullet$). É produzido em vários tipos de células, especialmente fagócitos e células vasculares endoteliais e no metabolismo da arginina. Pode ser produzido no organismo pela ação da enzima óxido nítrico sintase.
Alcoxila ($RO \bullet$)	(10^{-6})	Formado na peroxidação de lipídios. É susceptível a ação de antioxidantes exógenos, que podem interromper processos de lipoperoxidação.
DERIVADOS DE OXIGÊNIO NÃO RADICAIS		
Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)	-	Gerado pela β -oxidação de ácidos graxos ou pela dismutação de superóxido ($O_2^- \bullet$) por ação de enzimas oxidases. É capaz de transpor membranas celulares e originar radicais hidroxila ($OH \bullet$). Pode oxidar proteínas com resíduos de metionina ou grupos tióis muito reativos. Apresenta forte atividade antimicrobiana.
Ácido hipocloroso (HOCL)	Estável	Apresenta forte atividade antimicrobiana
Oxigênio singleto (1O_2)	(10^{-5})	É uma forma muito deletéria do oxigênio ao organismo, pois é um intermediário da toxicidade fotoinduzida do O_2 . Pode reagir com ácidos graxos, aminoácidos e com carotenóides devido as múltiplas insaturações conjugadas.
Peroxinitrito (ONOOH)	($0,05^{-1}$)	É um poderoso agente oxidante que pode causar depleção de grupos sulfidril (-SH) e oxidação de muitas moléculas. Está associado a patogênese de células e disfunção de órgãos relacionados a aterosclerose. Apresenta forte atividade antimicrobiana

Adaptado de: Kohen e Nyska, 2002; Sies, 1993; Barreiros & David, 2006; Stadtman, 2003; Halliwell & Chricó, 1993; Turrens & Boveris, 1980 e Radomski & Salas, 1995.

Embora os oxidantes possam ter como fonte outros compartimentos citoplasmáticos, as mitocôndrias figuram como a principal fonte intracelular de EROs na maioria dos tecidos (Turrens, 2003), devido ao vazamento de elétrons da cadeia respiratória (Wei e Lee, 2002), caracterizando, assim, de certa forma, uma “geração accidental” (Halliwell & Cross, 1994).

São consideradas ainda, quatro importantes fontes endógenas de oxidantes: a β -oxidação peroxissomal de ácidos graxos, onde há liberação de H_2O_2 como um subproduto, que é degradado por ação da enzima catalase. Evidências sugerem que, sob certas condições, peróxidos escapam dessa degradação resultando em sua liberação em outros compartimentos celulares (Beckman e Ames, 1998). Uma segunda fonte seria a eliminação de subprodutos do metabolismo das enzimas do sistema citocromo P450. Estas enzimas previnem efeitos tóxicos agudos causados por substâncias exógenas, mas também resultam em subprodutos oxidantes (Ames et al., 1993). Uma terceira fonte seria a reação de Fenton, que é uma das formas mais simples de gerar o radical hidroxila a partir da decomposição do H_2O_2 catalisada pelo ferro (Fe^{+2}) presente em um meio ácido (Villa e Nogueira, 2005). E uma quarta fonte seria a partir de atividade celular fagocítica, que produz uma mistura de oxidantes (óxido nítrico, radical superóxido e peróxido de hidrogênio) em resposta a estímulos, como em infecções causadas por vírus, bactéria e outros parasitas (Ames et al., 1993).

Em relação a esta última fonte endógena, as EROs têm a sua produção efetuada principalmente por um sistema dependente de enzima. A enzima responsável pela produção destas espécies, durante a explosão respiratória, é conhecida como NADPH-oxidase (**Figura 1**).

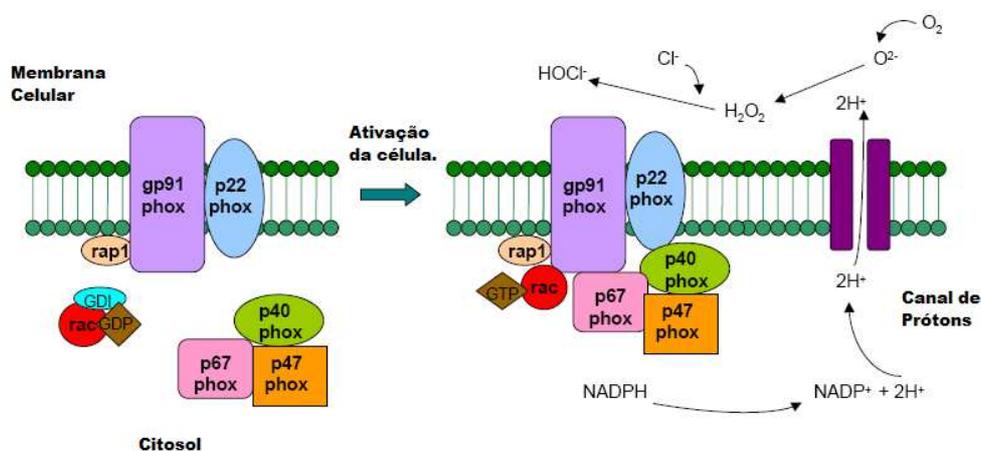


Figura 1 – Complexo NADPH oxidase. (Fonte: Assari, et al., 2006)

Em células não estimuladas, a NADPH oxidase é formada por um componente associado à membrana, o citocromo b558 constituído de duas subunidades gp91_{phox} e p22_{phox} e por três componentes citosólicos p47_{phox}/p67_{phox}/p40_{phox} formando um complexo (Forman et al., 2001). A glicoproteína gp91_{phox} contém dois hemes e um sítio de ligação ao NADPH que interage com p22_{phox} para formar o complexo do citocromo b558.

A ativação dos polimorfonucleares conduz a translocação de GTPase Rac, p47_{phox} e p67_{phox} para a membrana plasmática, onde p67_{phox} interage através de seu domínio de ativação com as subunidades ligadas a membrana. Esta interação é requerida para a ativação da oxidase e facilita a transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio. Duas proteínas adicionais têm sido demonstradas interagir com o citocromo b558: rap1a e p40_{phox}, estando envolvidas no recrutamento de p47_{phox} e p67_{phox} a membrana (Brandes et al., 2005).

Uma vez ativada, a NADPH-oxidase catalisa a redução de oxigênio a O₂^{•-} pela doação de um elétron, à custa do NADPH (Babior, 1994).



Outras espécies reativas decorrentes do “burst” respiratório são as ERNs. Em neutrófilos, estas espécies são geradas através do sistema óxido nítrico sintase (NOS) (Bryant et al., 1992; Chen e Mehta, 1996; Fukuyama et al., 1996). Esta enzima remove, oxidativamente, o nitrogênio terminal do grupo guanidino da L-arginina, para formar citrulina e óxido nítrico (**Figura 2**) (Knowles e Mocada, 1994).

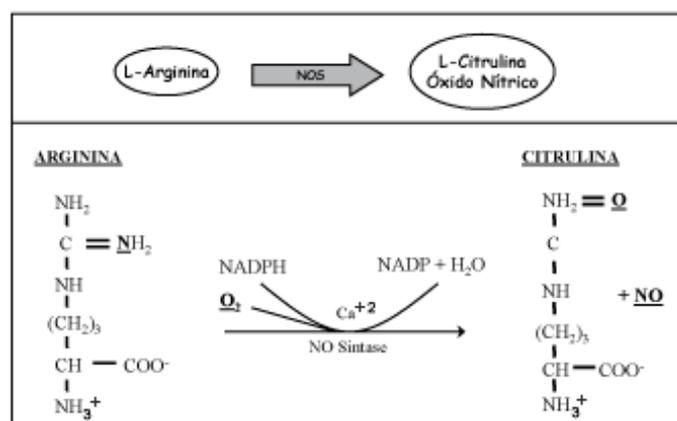


Figura 2 – Formação do óxido nítrico a partir da L-arginina (Fonte: Lehninger, 2002.)

Existem, descritas na literatura, três isoformas distintas da NOS, todas ubiquamente distribuídas, e o papel fisiológico desempenhado pelo óxido nítrico parece estar relacionado à isoforma da qual ele é proveniente. A primeira isoforma clonada foi descoberta nas células neuronais dos sistemas nervoso central e periférico e é denominada nNOS (NOS neuronal ou NOS do tipo I) (Bredt et al., 1991; Nakane et al., 1993). Esta isoforma também já foi encontrada em células musculares, neutrófilos, ilhotas de pâncreas, endométrio e epitélio gastrointestinal (Nathan e Xie, 1994). Outra isoforma, a eNOS (NOS tipo III ou endotelial), foi inicialmente identificada em células endoteliais (Lamas et al., 1992; Sessa et al., 1992), embora também seja encontrada em neurônios do hipocampo, rins, células do epitélio brônquico e plaquetas (Dinerman et al., 1994; Nathan e Xie, 1994). Existe também uma terceira isoforma da NO sintase, denominada iNOS (NOS tipo II), inicialmente clonada e purificada em macrófagos (Xie et al., 1992), mas também pode ser encontrada em neutrófilos, eosinófilos, neurônios, endotélios, hepatócitos, células da musculatura lisa, condrócitos e outras células (Nusler e Billiar, 1993; Nathan e Xie, 1994).

O óxido nítrico produzido pelo sistema óxido nítrico sintase está relacionado com a modulação do tônus vascular, a morte de parasitas dependente de macrófagos e, possivelmente, de células cancerosas, além de participar dos processos inflamatórios (Coffey et al., 2001; Bentz et al., 2002). Em contextos diferentes, o óxido nítrico pode agir na transdução de sinais ou como molécula citotóxica nos mecanismos de defesa (Mustafa et al., 2001).

A toxicidade do óxido nítrico é dependente da sua concentração e do microambiente no qual ele é produzido. Embora seja considerado por muitos autores como uma molécula pouco reativa, o óxido nítrico é capaz, assim como o íon superóxido, de gerar moléculas de maior reatividade, que assim como o próprio óxido nítrico, desempenham importante papel nas reações inflamatórias e no combate a infecções (Coffey et al., 2001).

A geração de espécies reativas de nitrogênio é, na maioria das situações, decorrente da interação do próprio óxido nítrico com moléculas que tenham caráter de radical. O oxigênio molecular e seus intermediários reativos são capazes de reagir com o óxido nítrico, logo, a disponibilidade de EROs pode ser um fator determinante na ação

do óxido nítrico como molécula citotóxica, sugerindo a possibilidade de um balanço entre as EROs e as ERNs (Darley-Usmar et al, 1995).

Assim, tem-se tornado de grande importância a avaliação do balanço ERO/ERN, uma vez que, quando há um desequilíbrio na produção de ERO, estas espécies reagem com o óxido nítrico produzindo peróxido nitrito, que é um composto instável e, por isso, capaz de formar espécies ainda mais danosas às células (Darley-Usmar et al., 1995; Kaminski et al., 2001). Esse desequilíbrio no balanço ERO/ERN associado a uma falha das defesas antioxidantes pode gerar um quadro conhecido como estresse oxidativo.

2. 2. Estresse oxidativo.

Por definição, estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a capacidade de ação dos sistemas de defesa antioxidante para neutralizá-las e prevenir seus efeitos deletérios (Mayne, 2003). Então, para que prevaleça o equilíbrio homeostático e as funções biológicas sejam preservadas, é necessário que o organismo controle a presença de ambos, oxidante e antioxidante, continuamente (Sies, 1993).

No balanço entre a produção de oxidantes e a defesa antioxidante *in vivo*, parece prevalecer um equilíbrio relativo, onde há uma ligeira tendência para maior produção de oxidantes, de tal forma que níveis baixos de estresses oxidativos contínuos são controlados por sistemas de reparo. Entretanto, isso não ocorre se o estresse oxidativo for severo, o que poderá resultar em dano e morte celular (Halliwell e Cross, 1994). Sob tais circunstâncias, a taxa de geração de espécies reativas pode exceder a capacidade local de defesa antioxidante e contribuir para o dano. Logo, o resultado é o ataque a diferentes alvos no organismo (Mayne, 2003).

De um modo geral, as conseqüências do estresse oxidativo podem ser variadas, de acordo com o tipo celular e com sua intensidade (**Figura 3**). Segundo Halliwell e Gutteridge, (2007), os principais efeitos são:

1. **Proliferação celular:** algumas células podem responder ao estresse oxidativo através do aumento da taxa de divisão celular.
2. **Adaptação:** aumento das defesas celulares, como catalase, superóxido dismutase e glutathione, deixando a célula totalmente, parcialmente ou superprotegida (a célula estará mais resistente frente a futuros insultos oxidativos mais intensos). Além disto, os alvos de dano oxidativo podem ser redirecionados, ou ainda, a produção basal de ERO pode ser reduzida.
3. **Dano celular:** pode envolver dano a um ou mais tipos de biomoléculas, como lipídios, proteínas, DNA, carboidratos, etc. Em casos de dano menor, a célula pode sobreviver com algum dano oxidativo persistente e irreparável, ou ainda promover o seu reparo.
4. **Senescência:** sobrevivência da célula, mas com o sistema de divisão celular comprometido.

5. **Morte celular:** após o dano a célula pode desencadear o processo de morte celular. Danos oxidativos ao DNA, mitocôndria, ou em outros alvos celulares, podem causar morte celular por apoptose ou por necrose.

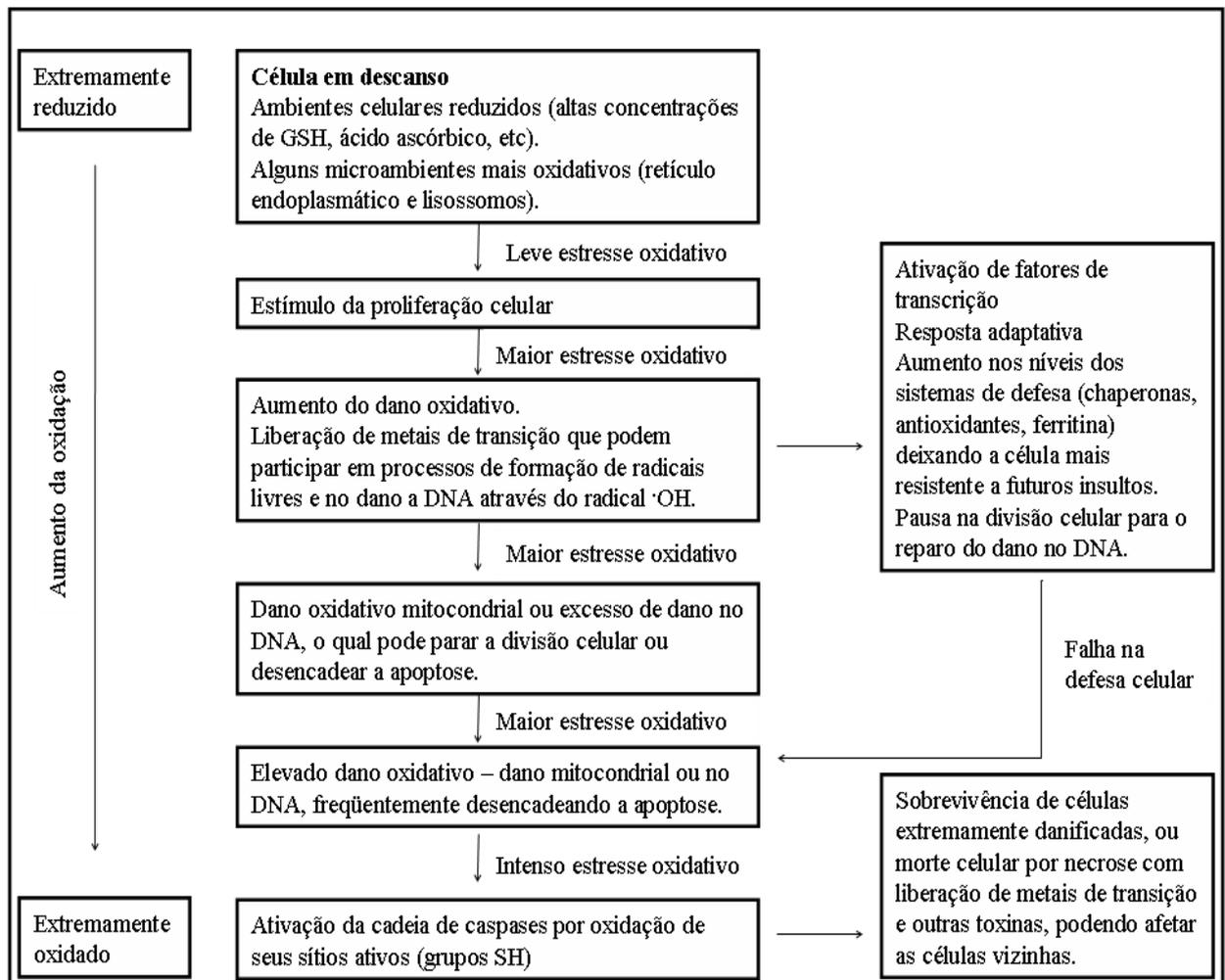


Figura 3: Respostas celulares a diferentes graus de estresse oxidativo (Adaptado de Halliwell e Gutteridge, 2007).

2. 3. Sistemas Antioxidantes

Uma substância antioxidante seria aquela capaz de inibir a oxidação. Ou seja, é uma molécula estável o bastante para doar um elétron a uma espécie reativa, neutralizando-a e reduzindo sua capacidade de danificar biomoléculas (Bagchi e Puri, 1998).

Entretanto, dada a complexidade dos mecanismos antioxidantes desenvolvidos ao longo da evolução, utiliza-se com frequência a expressão “sistema antioxidante” já que há antioxidantes diferentes favorecendo a manutenção da homeostase do estado redox do corpo, através de mecanismos distintos (Berry e Kohen, 1999).

Em função disto, desenvolveu-se nos organismos, um sistema de proteção antioxidante altamente complexo, que envolve uma variedade de componentes endógenos e exógenos, funcionando interativamente para neutralizar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Kaliora et al., 2005; Sies, 1993; Bagchi e Puri, 1998).

A definição de antioxidantes tem sido baseada em parâmetros distintos na literatura, pois antioxidantes podem diferir quanto ao local de ação, ao mecanismo, à composição e às propriedades físico-químicas.

Uma definição ampla e utilizada com frequência na literatura é a que considera antioxidante como: “uma substância que, quando presente em baixas concentrações, comparada ao substrato oxidável, diminui ou previne, significativamente a oxidação desse substrato” (Halliwell e Gutteridge, 1991). Esta definição incluiria também, compostos de natureza enzimática e não enzimática (Sies, 1993).

Neste contexto, a ação dos antioxidantes pode ocorrer de três formas distintas: antes da produção das espécies reativas (prevenção), após a produção (interceptação) ou ainda atenuando seus efeitos, fazendo reparos de danos (sistemas de reparo) (Berry e Kohen, 1999).

A classificação dos antioxidantes, também é diversificada, atendendo a critérios variados. Logo, os antioxidantes podem ser classificados como:

- i. Primários: quando rompem cadeias de radicais livres e podem doar átomos de hidrogênio rapidamente a um radical (Halliwell and Gutteridge, 1991).
- ii. Secundários: quando apresentam caráter preventivo. O mecanismo envolve remoção de iniciadores de ROS/RNS (Halliwell and Gutteridge, 1991).
- iii. Funcionais: previnem os efeitos deletérios da oxidação, inibindo o início da

- lipoperoxidação, sequestrando radicais livres e/ou quelando íons metálicos (Rodrigues et al., 2003).
- iv. Endógenos: produzidos pelo organismo, são essenciais para manter ótima “saúde” celular e sistêmica, embora não sejam suficientes para neutralizar todo o estresse oxidativo, especialmente o induzido por fatores externos como: exposição ao álcool, medicamentos, trauma, resfriados, infecções, toxinas, radiação e atividade física extenuante (Kaliora et al., 2005).
 - v. Exógenos: Podem ser adquiridos através da dieta ou suplementação alimentar. Há evidências de sua eficiência neutralizando estresse oxidativo, particularmente, o provocado por causas exógenas (Kaliora et al., 2005). Carotenóides, α -tocoferol, ácido ascórbico e flavonóides são exemplos deste tipo de antioxidante.
 - vi. Sistema enzimático: É uma forma de interceptação que atua como detoxificadora de agentes oxidantes antes que estes causem lesões. A interceptação enzimática é realizada por um sofisticado conjunto de enzimas antioxidantes altamente eficientes, como: catalase (**Figura 4**), glutathione (**Figura 5 a, b, c**) e SOD (**Figura 6**), (Sies, 1993). Incluem-se também, vários minerais essenciais como selênio, cobre, manganês e zinco necessários para a formação ou atividade destas enzimas pois, em caso de provisão nutricional inadequada, há comprometimento da função enzimática (Bagchi e Puri, 1998).
 - vii. Sistema não-enzimático: composto por moléculas estáveis, o bastante para doar um elétron a um radical livre e neutralizá-lo, reduzindo sua capacidade de dano (Bagchi e Puri, 1998). Estas moléculas estão envolvidas na proteção contra propagação de reações oxidativas em cadeia, por mecanismo de interceptação. Há, no mínimo, dois pré-requisitos básicos para uma boa interceptação não-enzimática: em primeiro lugar, apresentar capacidade efetiva de neutralizar espécies reativas iniciais e em segundo, reagir com compostos solúveis em água, possibilitando, dessa forma, sua própria regeneração. Estão incluídos neste grupo: α -tocoferol, β -caroteno, ubiquinol-10, bilirrubina, licopeno, flavonóides, urato, ascorbato entre outros (Sies, 1993).
 - viii. Como alguns nutrientes hidrossolúveis e lipossolúveis representam um aspecto importante do sistema de defesa antioxidante (Mayne, 2003), compostos dietéticos que aumentam a atividade de antioxidantes endógenos, embora não

neutralizam espécies reativas, também são classificados como antioxidantes (Kaliora *et al.*, 2005).

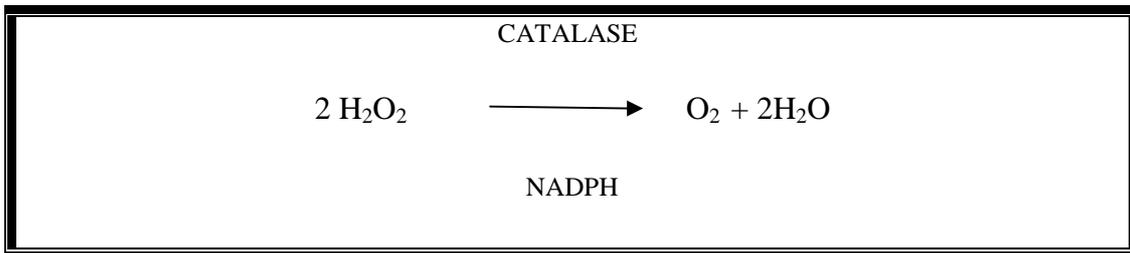


Figura 4 - Dismutação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água catalisada pela catalase. NADPH = Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma oxidada; H_2O_2 = peróxido de hidrogênio.

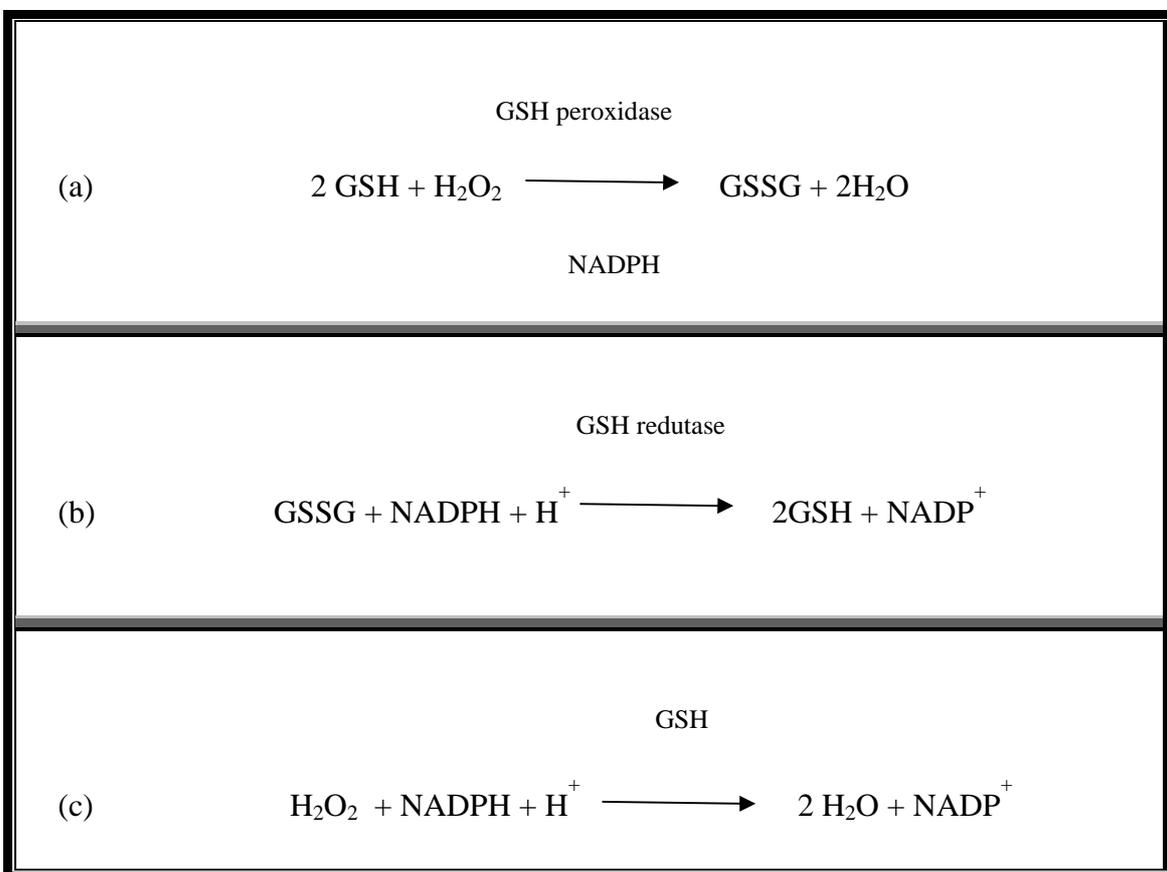


Figura 5 - Dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio catalisada pela glutathiona. GSH = Glutathiona reduzida; H_2O_2 = peróxido de hidrogênio GSSG = Glutathiona oxidada; NADPH = Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma oxidada; NADP^+ = Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida; GSSG = Glutathiona oxidada.

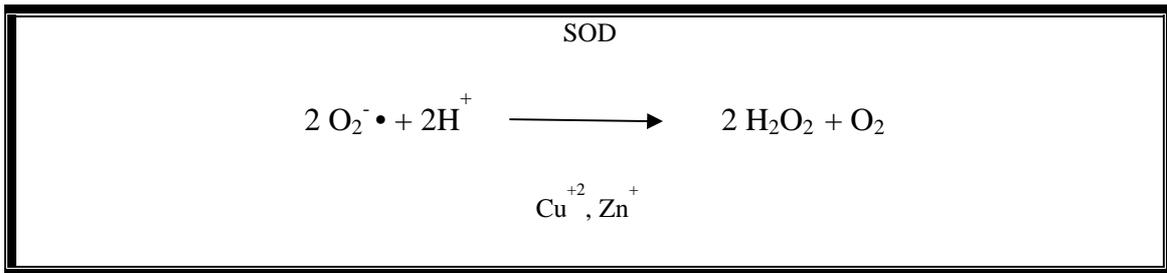


Figura 6 – Conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio catalisada pela SOD. SOD = Superóxido dismutase; $\text{O}_2^{\cdot -}$ = superóxido; H_2O_2 = peróxido de hidrogênio; Cu = cobre; Zn = zinco.

Em suma, para ser considerada um bom antioxidante, uma substância deve apresentar algumas características essenciais, como: extinguir especificamente espécies reativas ou contribuir para que tal ocorra; interagir com outros antioxidantes dentro da “rede de antioxidante”; apresentar efeito positivo na expressão de genes que codificam produtos antioxidantes; ser absorvido prontamente, no caso dos exógenos; ter uma concentração em tecidos e biofluidos a um nível fisiologicamente pertinente; trabalhar em ambos os domínios de membrana e efetivamente evitar danos por ação de espécies reativas.

Na tentativa de descobrir antioxidantes que apresentem todas essas características citadas, aumentaram-se o interesse em se encontrar compostos antioxidantes naturais para substituir os antioxidantes sintéticos, os quais têm seu uso restrito devido a alguns serem carcinogênicos (Ito et al., 1983; Zheng & Wang, 2001). Nesse contexto, muitas plantas utilizadas na medicina popular vêm sendo estudadas, uma vez que os seus compostos naturais, por apresentarem ação antioxidante, podem proteger o corpo humano dos radicais livres e retardar o progresso de muitas doenças crônicas (Pryor, 1991; Kinsella et al., 1993; Lai et al., 2001).

2.4 - Utilização do gênero *Baccharis* como planta medicinal

Atualmente o consumo de plantas medicinais pela população mundial tem sido muito significativo. Dados mostram que cerca de 80% da população mundial já fizeram uso de algum tipo de erva na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável (Mangiaterra, 2005). Segundo Martins *et al.*, (2000), são muitos os fatores que vêm colaborando no desenvolvimento de práticas de saúde que incluam plantas medicinais, dentre eles, destacam-se principalmente, os fatores econômicos e sociais.

As plantas medicinais são plantas que possuem substâncias biologicamente ativas, podendo assim, serem utilizadas na fitoterapia, já que essa defende o tratamento de doenças a partir de medicamentos preparados com base em substâncias vegetais ou princípios delas extraídos (Mangiaterra, 2005).

Com o objetivo de comprovar as ações terapêuticas dos fitoterápicos várias espécies vegetais estão sendo pesquisadas, dentre elas as da família Asteraceae, que é o grupo sistemático mais numeroso dentro da divisão Angiosperma, compreendendo cerca de 1.100 gêneros e 25.000 espécies (Verdi *et al.*, 2005).

As Asteraceae são plantas de aspecto extremamente variado, incluindo principalmente pequenas ervas ou arbustos e raramente árvores. Cerca de 98% dos gêneros são constituídos por plantas de pequeno porte e são encontradas em todos os tipos de habitats, mas principalmente, nas regiões tropicais montanhosas na América do Sul (Verdi *et al.*, 2005). Plantas dessa família são extensivamente estudadas quanto à sua composição química e atividade biológica, sendo que algumas têm proporcionado o desenvolvimento de novos fármacos, inseticidas, entre outros.

O gênero *Baccharis*, pertencente à família das *Asteraceae*, está representado por mais de 500 espécies distribuídas principalmente no Brasil, Argentina, Colômbia, Chile e México, ocupando as regiões mais elevadas. A alta concentração de espécies no Brasil e nos Andes indica que uma dessas áreas é o provável centro de origem desse gênero. No Brasil estão descritas 120 espécies de *Baccharis*, com a maior parte delas localizadas na região sudeste do país principalmente nos campos de altitude, onde formam subarbustos perenes de 50 a 80 cm de altura, muito ramificados na base e com ramos de expansões trialadas (Lorenzi e Matos, 2002).

Muitas das espécies pertencentes a este gênero são utilizadas na medicina popular para o tratamento de males do estômago, desordens hepáticas e renais, atividades antivirais, antiinflamatória e antimicrobiana e na produção de fragrâncias comerciais (óleo de carqueja) (Soicke and Leng-Peschlow, 1987) Grande parte desses efeitos biológicos está relacionado à fitoquímica destas plantas.

Verdi *et al.* (2005) relataram que de 120 espécies do gênero *Baccharis* estudadas, os compostos que mais se destacam são os flavonóides, diterpenos, triterpenos e alcalóides, sendo nitidamente observado maior acúmulo de flavonas, flavonóis e de diterpenos labdanos e clerodanos. Entre as espécies mais pesquisadas quanto à composição química e/ou atividade biológica, encontra-se a *B. trimera*.

2.4.1 – *Baccharis trimera*

Baccharis trimera (**Figura 7**) é uma planta subarborescente, dióica, aromática, com altura variável entre 1,0 e 1,6 m (Castro e Ferreira, 2000). É uma espécie de elevada rusticidade (Castro e Ferreira, 2000) que cresce bem em condições de pleno sol (Bona, 2002), sendo típica de lugares abertos ou de campo (Oliveira et al., 1999). É considerada invasora de pastagens, ocorrendo em solos pedregosos, margens das estradas, barrancos ou lugares úmidos nas ribanceiras dos rios (Correa Júnior et al., 1994). Adapta a solos pobres e ácidos apresentando resistências às geadas (Vichnewski et al., 1990), além de ser altamente tolerante à presença de cobre no solo (Weber et al., 2001)



Figura 7: Foto da espécie de *Baccharis trimera*. (Fonte: www.rain-tree.com/Carqueja-powder.htm)

No Brasil, o primeiro registro desta planta como uso medicinal foi efetuado por Correa em 1931, que escreveu sobre o uso da sua infusão no tratamento da esterilidade feminina e impotência masculina (Lorenzi e Matos, 2002). Atualmente, na medicina popular a carqueja é usada como diurética, tônica, digestiva (Carneiro e Fernandes, 1996), protetora e estimulante do fígado, antianêmica, anti-reumática, depurativa, para o controle da obesidade, diabetes, hepatite e gastro-enterites (Castro e Ferreira, 2000).

Muitos outros trabalhos foram desenvolvidos com o intuito de comprovar os efeitos biológicos atribuídos à *B. trimera*, dentre eles podemos destacar o trabalho de Abad *et al.* (1999), no qual os autores avaliaram extratos aquosos e etanólicos de sete espécies de planta usadas como medicamento na Bolívia para testar a atividade antiviral contra o herpes tipo I (HSV-1), vírus de estomatite vesicular (VSV) e polivírus do tipo I. Os extratos aquosos da maioria das espécies investigadas mostraram possuir atividade antiviral, sendo que a *Satureja boliviana* e *B. trimera* foram ativas contra dois vírus diferentes (HSV-1 e VSV). Este efeito antimicrobiano foi confirmado por Avancini *et al.* (2000) que sugeriram a possibilidade da utilização de *B. trimera* como desinfetante e anti-séptico em problemas relacionados aos ambientes de produção animal, mais especificamente aqueles causados por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus uberis*.

Somados a estes estudos estão os trabalhos de Coelho *et al.* (2004) que evidenciaram um efeito terapêutico anti-artrítico da carqueja (*B. genistelloides*) usando o colágeno para induzir o modelo de artrites e os trabalhos recentes de Rodrigues *et al.*, 2009 e Paul *et al.*, 2009 que atribuíram à carqueja efeitos antioxidantes e antiinflamatórios, respectivamente.

De fato *B. trimera* destaca-se por sua atividade antioxidante e antiinflamatória. Lima *et al.* (2004) relataram que o chá é referido na literatura como uma das melhores fontes de compostos fenólicos, substâncias que têm sido alvo de grande atenção nos últimos anos, especialmente, por apresentarem atividade antioxidante. Enquanto que Gené *et al.*, 1996 e Della-Loggia *et al.*, 1994; Akihisa *et al.*, 1996 atribuíram aos triterpenos os principais responsáveis pela atividade antiinflamatória da planta

2.4.2 - Componentes bioativos de *Baccharis trimera*.

2.4.2.1 - Flavonóides

Os flavonóides são substâncias fenólicas de baixo peso molecular, e que possuem em sua estrutura química anéis aromáticos, tendo como base o 2-fenil-benzopirano ($C_6.C_3.C_6$). A **figura 8** mostra a estrutura genérica dos flavonóides e utiliza um sistema de números para distinguir as posições dos carbonos ao redor da molécula. Os três anéis fenólicos são referidos como A, B e C. O benzeno do primeiro anel é condensado com o sexto carbono do terceiro anel que na posição 2 carrega um anel de fenil-benzeno como substituinte. O terceiro anel pode ser um pirano heterocíclico, gerando as estruturas básicas das leucoantocianinas (ou proantocianinas, ou catequinas) e das antocianinas, denominado de núcleo flavan. No caso do terceiro anel apresentar-se como uma pirona, ocorre a formação das flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, chalconas e auronas, recebendo a denominação de núcleo 4-oxo-flavonóide (Aherne & O'brien, 2002).

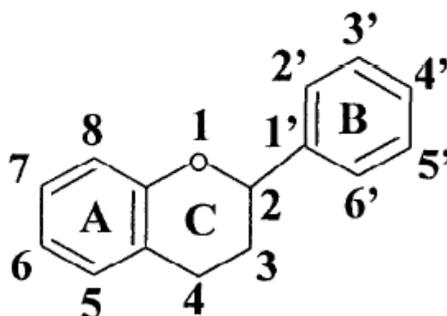


Figura 8 – Estrutura geral dos flavonóides. Fonte: Cook & Samman, 1996.

Mais de 4.000 diferentes tipos de flavonóides extraídos de plantas já foram descritos na literatura. As atividades bioquímicas destes compostos fenólicos dependem principalmente da sua estrutura química, e é a partir dela que os flavonóides também são classificados. As principais classes de flavonóides incluem: flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas, dihidroflavonois e chalconas (**Figura 9**). Muitos flavonóides ocorrem naturalmente nas plantas acompanhados por glicídios, como a D-glicose, galactose, lignina e arabinose, recebendo a denominação de glicoflavonóide. Quando se apresentam isentos de glicídios, a estrutura recebe o nome de aglicona (Calabro *et al.*, 2004).

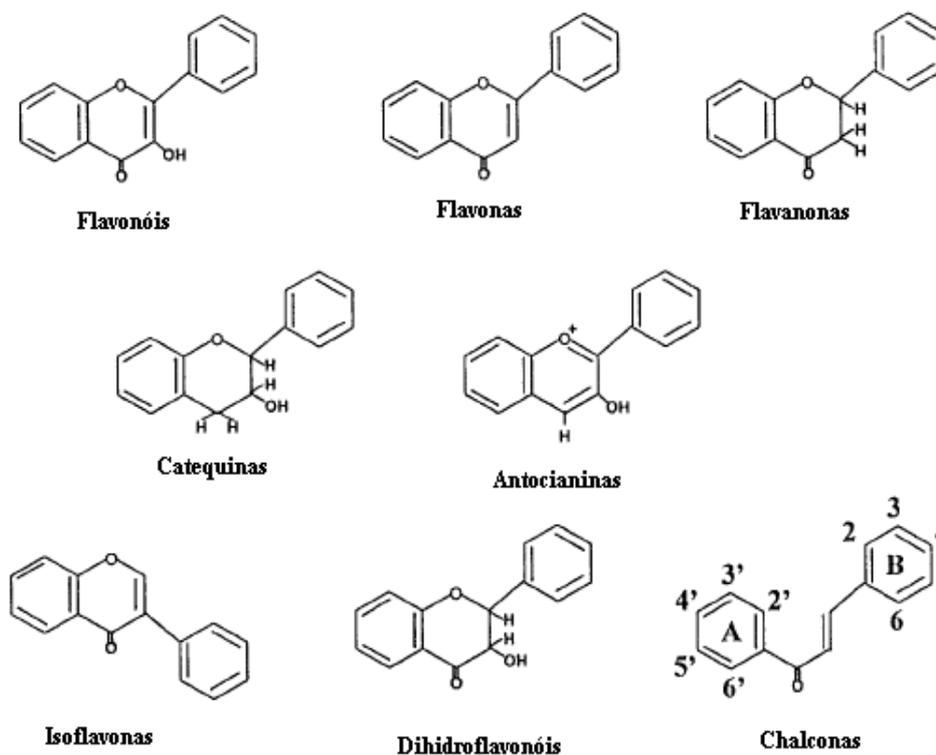


Figura 9 – Estruturas das principais classes de flavonóides. Adaptado de: Cook & Samman, 1996.

Os flavonóides são encontrados em diversos alimentos de origem vegetal, como maçã, uva, cebola, repolho, brócolis, chicória, aipo, açaí, cacau, chá e vinho tinto sendo, portanto, importantes constituintes da dieta humana. Estes compostos fenólicos têm um papel significativo como componentes da dieta, uma vez que seu consumo está associado à várias ações citoprotetoras (Youdim & Joseph, 2001). Muitos dos benefícios fisiológicos dos flavonóides têm sido atribuídos principalmente à sua capacidade antioxidante, podendo exercer um efeito direto (eliminando as espécies reativas) ou indireto (aumentando a atividade ou expressão de enzimas antioxidantes).

O efeito de eliminar as espécies reativas exercido pelos flavonóides se deve à capacidade destes compostos em neutralizar os radicais livres (ânion superóxido, radicais hidroxilas e peroxilas) ou quelar íons metálicos (cobre e ferro). Os flavonóides apresentam grupos hidroxilas em sua estrutura, portanto eles podem inibir as reações de oxidação das espécies reativas de oxigênio, por doarem átomos de hidrogênio às espécies, estabilizando-as e transformando-se em quinonas (substâncias pardas). Ao

quelar íons metálicos ocorre a inibição da Reação de Fenton, uma forma endógena de produzir espécies reativas (Enio, 2003; Harborne & Willians, 2000; Tian & McLaughlin, 2000). Em adição a estes efeitos sob as espécies reativas, evidências mostram que flavonóides regulam a atividade de enzimas antioxidantes, modulam receptores nucleares, atuam sobre a expressão gênica e caminhos de sinalização celular (Seeram & Heber, 2006).

A literatura, de um modo geral, mostra que os flavonóides exibem uma ampla faixa de atividades incluindo efeitos, vasodilatadores, anticarcinogênico, antibacteriano, antialérgico (atuando sobre moduladores da função imune) e neuroprotetivos (Azam *et al.*, 2004; Heo & Lee, 2004; Higa *et al.*, 2003; Maher, 2006; Mercer *et al.*, 2005).

2.4.2.2 –Triterpenóides

Os compostos fenólicos e os terpenóides são os maiores constituintes presentes em frutas, vegetais e diferentes especiarias (Wagner e Elmadfa, 2003). Em relação aos terpenóides, eles são moléculas constituídas por trinta átomos de carbono distribuídos em seis unidades isoprenóides com cinco átomos de carbono cada (Patočka, 2003).

A diversidade funcional de alguns dos terpenóides está relacionada à sua atuação como hormônios (giberelinas), pigmentos fotossintéticos (phytol e carotenóides), e transportadores de elétrons (ubiquinona, plastoquinona) (Langenheim, 1994). Atualmente, uma ampla variedade de respostas biológicas podem ser obtidas em seres humanos através de vários terpenóides (Paduch, et al. 2007). Dentre os efeitos encontrados para essas moléculas estão os antimicrobianos, antifúngicos, antiparasitários, antivirais, antialérgicos, anti-espasmódico, hipoglicemiante, antiinflamatória, quimioterápicos e imunomoduladores (Paduch, et al. 2007; Wagner e Elmadfa, 2003).

Evolutivamente, os terpenóides foram os primeiros compostos secundários a serem descobertos, e hoje eles representam um grupo diversificado de pequenas moléculas sintetizadas por plantas (Bouvier, et al., 2005; Tholl, 2006). Só para se ter uma idéia, mais de 55.000 terpenos foram isolados e este número quase que dobra a cada década (Breitmaier, 2006; McGarvey e Croteau, 1995). Acredita-se que essa variedade de terpenóides nas plantas seja devida à expansão da superfamília da terpeno

sintase, enzima responsável pela síntese dos monoterpênóides, sesquiterpênóides, diterpênóides e triterpênóides.

Os triterpenos são formados de seis unidades de isopreno com 30 átomos de carbono, mas na natureza, os triterpenos ocorrem como estruturas cíclicas chamadas triterpênóides (Bouvier et al., 2005). Triterpênóides pentacíclicos são muito abundantes em produtos naturais. Na medicina chinesa plantas ricas nessa família de triterpênóides, como ginseng e *Platycodon*, são bastante utilizadas para prevenir o ganho de peso e a peroxidação lipídica. De fato, análise fitoquímica de *Platycodon grandiflorum* mostrou que esses efeitos biológicos podem estar relacionados a uma grande quantidade de antioxidantes e de saponinas (Martinez-Vazquez et al., 1999; Zhao et al., 2005).

As saponinas, referidas quimicamente como glicosídeos triterpenos e esteróide, são triterpênóides biologicamente ativos presente em uma variedade de famílias de plantas. Seu nome é derivado da palavra em latim *sapo* que significa sabão, uma vez que quando misturadas com a água formam espuma (Oleszek, 2002).

As saponinas têm um vasto leque de propriedades, que inclui a formação de espuma e suas propriedades emulsificantes (Price et al., 1987), propriedades farmacológicas e medicinais (Attelé et al., 1999), propriedades hemolítica (Oda et al., 2000; Sparg et al., 2004), bem como atividade antimicrobianas e inseticida (Sparg et al., 2004).

Gené et al., (1996) ao testar o extrato butanólico de *B. trimera* em modelos de inflamação, analgesia e ucerogênese viu que esta planta mostrou fortes propriedades anti-inflamatórias e analgésicas, que ele atribuiu, pelo menos em parte, à inibição da biossíntese de prostaglandina. Segundo ele, essa inibição está relacionada a um conjunto de saponinas e de flavonóides encontrados nessa planta.

Este trabalho somado aos de outros autores já citados confirmam que muitas das propriedades biológicas atribuídas a *B. trimera*, até o momento, se devem a sua fitoquímica, que por apresentar quantidades significativas de flavonóides e triterpênóides tem despertado grande interesse, por parte dos pesquisadores, na tentativa de se descobrir novas e reais aplicabilidades farmacológicas.

Partindo desse pressuposto, e do fato de não haver nenhum trabalho que correlacione *B. trimera* com neutrófilos e APAP, resolvemos avaliar o efeito do extrato desta planta sobre a produção de radicais livres em neutrófilos, sobre a atividade das

enzimas antioxidantes e sobre os produtos do estresse oxidativo. Além disso, sendo o fígado um órgão muito importante na regulação do metabolismo, avaliamos a função hepática através de marcadores séricos bioquímicos, com o intuito de assegurar a utilização do extrato de *B. trimera* pela medicina popular.

3 – OBJETIVOS

3.1 – Objetivo Geral

Avaliar, *in vitro* e *in vivo*, as propriedades antioxidantes do extrato hidroalcoólico de *Baccharis trimera* em ratos Fischer machos.

3.2 – Objetivos Específicos

3.2.1 - In vitro:

- Avaliar a produção de ERO em neutrófilos de ratos Fischer incubados com partículas opsonizadas com zimosan, extrato de *B. trimera* ou ambos.

3.2.2 - In vivo:

3.2.2.1 - Em ratos Fischer pré-tratados com extrato de *B. trimera* e uma hora depois intoxicados com APAP objetivamos:

- Isolar os neutrófilos destes animais e em seguida realizar as dosagens de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico;
- Recolher o plasma destes animais e em seguida realizar a dosagem de óxido nítrico.

3.2.2.2 - Em ratos Fischer tratados durante sete dias com extrato de *B. trimera* e intoxicados no último dia com APAP objetivamos:

- Avaliar o efeito do tratamento sobre as defesas antioxidantes (paraoxonase, catalase e glutathione total);
- Avaliar o efeito do tratamento sobre os produtos de estresse oxidativo (TBAR e proteína carbonílica);
- Avaliar o efeito do tratamento sobre os marcadores bioquímicos de função hepática (aminotransferases e fosfatase alcalina) e renal (creatinina);
- Analisar a histologia do fígado a fim de verificarmos os efeitos do extrato de *B. trimera*, APAP e sua interação sobre este órgão.

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Reagentes

O acetaminofen (APAP) utilizado foi da Janssen-cilag farmacêutica. O azul de tripan, luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4phthalozinedione) e o zimosan foram adquiridos da Sigma. Os gradientes Leukopaque e Monopaque foram obtidos da Bion LTDA. O Kit para a medição dos níveis séricos de alanina aminotransferases (ALT) e aspartato aminotransferases (AST) foram adquiridos a partir da Labtest Diagnóstica, Brasil.

4.2 - Animais

Nos experimentos foram utilizados ratos albinos machos, da linhagem Fisher, com aproximadamente 12 semanas de idade e pesando cerca de 180 g, provenientes do Laboratório de Nutrição Experimental da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Todos os animais foram mantidos em gaiolas individuais dispostas em ambiente com temperatura, luminosidade e umidade controladas e receberam dieta comercial para rato (Labina) e água, ambos *ad libbitum*. O presente trabalho foi realizado de acordo com as normas internacionais de proteção aos animais e com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFOP (OF 01/2009 e OF 011/2009).

4.3 – Coleta do material botânico

As partes aéreas de *B. trimeria* foram coletadas em abril de 2008, na cidade de Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil. A espécime, de exsicata número OUPR 22127, foi identificada pela Professora Doutora Viviane R. Scalon e em seguida depositada no Herbário José Badini da UFOP.

4.4 – Preparação do extrato

Após identificação, as partes aéreas da planta foram secas em estufa ventilada e em seguida pulverizadas em moinho mecânico e armazenadas em frascos de plástico. Na obtenção do extrato hidroalcoólico, cerca de 100 g da planta foram submetidas à extração com água destilada e álcool 70% na proporção de 1:1 durante 24 h. Em seguida realizou-se a filtração a vácuo e a evaporação do solvente no rotavapor.

O extrato bruto formado, de coloração verde escuro e cheiro adocicado, foi diluído em phosphate buffered saline (PBS 7,4) obtendo-se as concentrações de 50, 5 e 0.5 µg/mL que foram utilizadas no ensaio *in vitro* e a concentração 600 mg/kg que foi utilizada no ensaio *in vivo*. A metodologia adotada para a confecção do extrato, com algumas modificações, foi baseada no trabalho de Grace et al., 2008.

4.5 – Isolamento de leucócitos polimorfonucleares

Os neutrófilos foram obtidos a partir do sangue periférico por hemorragia do plexo braquial segundo a técnica descrita por Bicalho et al., 1981. Resumidamente, 4 ml de sangue periférico heparinizado, foram adicionados sobre 6 ml de gradiente duplo de Leukopaque e Monopaque (densidade = 1,08 e 1,12, respectivamente) em tubos siliconizados. Após centrifugação a 100 G por 20 minutos foram obtidas duas fases distintas separadas por dois anéis interfásicos, sendo o anel superior formado por células mononucleares e o inferior por neutrófilos. O anel rico em neutrófilos foi colocado em tubo siliconizado, com o auxílio de uma pipeta. Em seguida, esse anel foi lavado duas vezes em PBS pH 7,4. Após as duas lavagens as células foram ressuspensas em 1,0 ml de PBS pH 7,4. Os neutrófilos foram usados para dosagem de nitrito e para o ensaio de quimioluminescência. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de exclusão com azul de Tripán e mostrou-se sempre superior a 95%.

4.6 – Opsonização de partículas de zimosan

A opsonização do zimosan foi feita adicionando-se 900 µL de PBS (pH 7,4) a 100µL de zimosan (13mg/mL), conforme realizado no estudo de Lovrien, et al., 1989. Em seguida a solução foi centrifugada por 2 min a 400 RPM. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspenso em 200 µl de soro autólogo fresco e 800 µL de PBS. Tal solução foi incubada por 30 min em banho-maria a 37°C, sendo agitada em intervalos de 10 min. Posteriormente, a solução foi novamente centrifugada por 2 min a 400 RPM, sendo o sobrenadante desprezado e o pellet ressuspenso em 500µL de PBS. O volume de zimosan opsonizado com soro (ZC3b) utilizado para os experimentos foi de 50µL.

4.7 – Ensaio “*in vitro*”

Para avaliar a geração de EROs foi realizado um ensaio de quimioluminescência amplificado por luminol durante a ativação das células fagocíticas, como descrito por Chaves, et al., 2000. O ensaio de quimioluminescência permite avaliar, diretamente, a atividade da NADPH-oxidase, a enzima responsável pela geração de espécies reativas de oxigênio, durante a ativação das células fagocíticas (Babior, 1994). Esta técnica baseia-se na reação entre luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4phthalozinedione) e as espécies reativas geradas. A reação ocorre no interior de um sistema de cátodo e ânodo, o que permite a captação e registro dos fótons emitidos pelo α -aminophthalato.

Para a realização do procedimento experimental, neutrófilos de ratos *Fisher* (1 x 10⁶ células em solução PBS pH 7,4) foram incubados com 500 μ L de luminol (10⁻⁴M) por 10 min, em tubos de siliconizados. Os fótons emitidos neste intervalo foram registrados de 1 em 1 min pela impressora interna do luminômetro. Decorridos os 10 min iniciais de corrida, abriu-se o aparelho colocando-se PBS (basal) ou partículas de ZC3b ou extrato de *B. trimera* (Bt). Para todos os ensaios, o volume final foi ajustado para 700 μ L com PBS. A emissão de fótons em todos os ensaios foi registrada por mais 30 min em intervalos de 1 em 1 minuto e, ao final dos ensaios, obtivemos curvas de 40 min, cujos valores foram expressos em RLU/min.

4.8 - Avaliação da injúria hepática induzida por APAP

Para avaliar a injúria hepática induzida por APAP foram utilizados dez ratos, divididos em dois grupos de cinco animais de acordo com o tratamento recebido: grupo controle (C), o qual recebeu, por gavagem, 600 mg/kg de PBS e o grupo APAP, que também, por gavagem, recebeu uma dose única de 835mg/kg de APAP. A dose de APAP usada teve como referência o trabalho de Yen, et al., 2008. Em diferentes intervalos de tempo amostras de sangue foram coletadas, via plexo ocular, para a quantificação da atividade da ALT e AST em resposta a uma elevada dose de APAP.

4.9 – Ensaio “*in vivo*”

4.9.1 - Análise das espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico

Para realização do ensaio *in vivo* correspondente ao modelo de inflamação foram utilizados 20 ratos divididos em quatro grupos de cinco animais de acordo com o

tratamento recebido: Grupo Controle (C) o qual recebeu 600mg/kg de PBS; Grupo APAP o qual recebeu uma dose única de 835mg/kg de acetaminofen; Grupo *B. trimera* (Bt) o qual recebeu 600mg/kg do extrato de *B. trimera* e Grupo *B. trimera* + Acetaminofen (Bt. + APAP) o qual recebeu, primeiramente, 600mg/kg do extrato de *B. trimera* e, uma hora depois, uma dose única de 835mg/kg de acetaminofen. Todos os tratamentos foram administrados por gavagem. Vinte quatro horas após a dose de APAP, os animais foram anestesiados e o sangue foi recolhido por hemorragia do plexo braquial em tubos heparinizados para a obtenção do plasma e dos neutrófilos utilizados na dosagem de óxido nítrico. Os ensaios de quimioluminescência para quantificar a produção de EROs foram realizados com os neutrófilos (1×10^6) de cada grupo experimental e registrados por 30 min em intervalos de 1 min. Ao final dos ensaios, obtivemos curvas de 30 min, cujos valores foram expressos em RLU/min.

4.9.2 - Análise das defesas antioxidantes, concentração de biomarcadores do estresse oxidativo e marcadores da função hepática e renal.

Neste experimento foram utilizados 20 ratos divididos em quatro grupos de cinco animais de acordo com o tratamento recebido: Grupo Controle (C), recebeu, por gavagem, 600mg/kg de PBS durante 7 dias; Grupo *B. trimera* (Bt.), recebeu, por gavagem, 600mg/kg do extrato de *B. trimera* durante 7 dias; Grupo Acetaminofen (APAP), recebeu, por gavagem 600mg/kg de PBS durante 7 dias e posteriormente uma dose única de 835mg/kg de acetaminofen, Grupo *B. trimera* + acetaminofen (Bt. + APAP), recebeu, por gavagem 600mg/kg do extrato de *B. trimera* durante 7 dias e posteriormente uma dose única de 835mg/kg de acetaminofen. Vinte quatro horas após a dose de APAP, os animais foram anestesiados tendo o sangue e o fígado recolhidos para as análises bioquímicas. A dose de APAP usada e o delineamento experimental teve como referência o trabalho de Yen, et al., 2008.

4.9.3 – Histopatologia

Os fígados dos ratos foram removidos 24 h após a administração de PBS e/ou extrato de *B. trimera*, e/ou APAP, e/ou extrato de *B. trimera* e APAP e fixados em formol 10%. Os fígados fixados foram processados e embebidos com parafina. Secções de 5 – 6 μ m foram montadas e coradas com hematoxilina e eosina (H&E). Imagens fotomicrográficas foram capturadas com o auxílio de uma câmara digital.

4.10 - Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade dos neutrófilos utilizados nos ensaio foi monitorada pelo teste de exclusão de azul de tripan (Oliveira-Lima e Dias da Silva, 1970). Na determinação da viabilidade celular dos neutrófilos utilizados no ensaio de quimioluminescência, os neutrófilos foram centrifugados a 100G por 15 minutos, e o “pellet” ressuspense em 200µl de PBS pH 7,4, ao qual foi adicionado imediatamente 1 gota de solução 0,1% de azul de tripan em salina. Em todos os ensaios monitorados a viabilidade celular nunca se mostrou inferior a 95%.

4.11 – Dosagens Bioquímicas

Neste trabalho realizamos as seguintes dosagens bioquímicas utilizando-se kits comerciais Labtest Diagnóstica S.A.: Alanina Aminotransferase, Aspartato Aminotransferase e Creatinina.

4.11.1 - Paraoxonase – Atividade Arilesterase em soro

Princípio da técnica

Determinação da atividade arilesterásica da enzima paraoxonase, usando fenilacetato como substrato, tendo como base a velocidade de hidrólise do fenilacetato, conforme descrito por Eckerson *et al.* (1983) em humanos e também por Beltowski *et al.* (2002) em ratos.

Procedimento de dosagem

Em tubo de ensaio adicionaram-se 2mL de tampão Tris-HCl, 9mmol/L, pH = 8,0 contendo 0,9mmol/L de cloreto de cálcio e 5µL de soro. Foi misturado no vórtex e adicionado 0,5mL da solução Tris- fenilacetato (1 µL de fenilacetato para cada 1500 µL de TrisHCL 9mM; pH=8,0). Após exatamente 3 minutos, a absorbância foi lida em 270nm. O espectrofotômetro foi zerado com o branco que contém todos os reagentes acima, exceto o soro.

Cálculo

Utilizamos a definição para atividade enzimática de acordo com Beltowski *et al.* (2002). Segundo a qual 1U da enzima paraoxonase é equivalente a hidrólise de 1µmol de fenilacetato ($\epsilon = 1310 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) por minuto (usualmente a atividade dessa

enzima é representada por 1mL de soro). A atividade arilesterásica da enzima foi calculada utilizando a lei de Lambert Beer:

$$A = C.b.\varepsilon$$

Onde:

ε – Coeficiente de extinção molar;

b – caminho óptico, igual a 10 mm.

A= absorbância

C= concentração ou atividade enzimática

4.11.2 - Paraoxonase – Atividade Paraoxonase no soro

Princípio da técnica

Determinação da atividade paraoxonásica, usando paraoxon como substrato, tendo como base a velocidade de hidrólise deste, com a liberação do para-nitrofenol por minuto, conforme descrito por Beltowski *et al* (2002).

Procedimento de dosagem

Inicialmente preparou-se uma solução contendo 9 mL de tampão glicina/NaOH 50mM pH10,5, contendo CaCl_2 0,9 mM e 2 μL de paraoxon. Em um tubo de polipropileno adicionaram 780 μL dessa solução e 20 μL de soro. A solução foi homogeneizada e lida a absorbância das amostras no espectrofotômetro em 412nm, exatamente à cada minuto, por 3 minutos. O branco (tubo com 780 μL da solução preparada inicialmente e 20 μL de água) foi utilizado para zerar o aparelho.

Cálculo da atividade de enzima

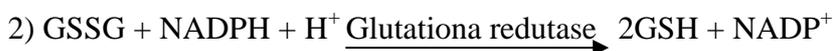
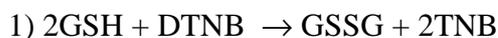
Segundo Beltowski *et al* (2002) 1U da enzima paraoxonase é equivalente a hidrólise de 1nmol de paraoxon ($\varepsilon = 18290 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) por minuto (usualmente a atividade desta enzima é representada por 1mL de soro). A atividade paraoxonásica da enzima paraoxonase foi calculada segundo a lei de Lambert Beer. A absorbância utilizada nessa expressão é o delta (absorbância por minuto) obtido das absorbâncias lidas no 1º e 3º minuto, subtraindo a absorbância do terceiro minuto pela absorbância

do primeiro minuto, e dividindo por 2, visto que são 2 minutos entre as duas absorvâncias.

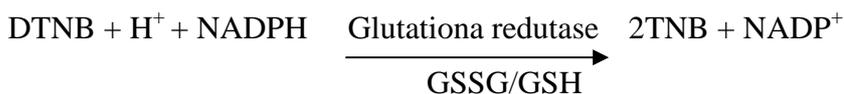
4.11.3 - Concentração de Glutathiona Total em tecidos

Princípio da técnica

Utilizou-se o kit Sigma # CS0260. A glutathiona está presente nas células principalmente na sua forma reduzida (GSH) representando em torno de 90%, o restante aparece na forma de glutathiona oxidada (GSSG). Este kit utiliza um método cinético para mensurar os níveis de glutathiona total (GSH+GSSG) em amostras biológicas, através da redução do DTNB (Ácido 5,5'-Ditio-bis-(2-nitrobenzóico) à TNB.



A combinação das duas reações:



Preparo dos reagentes de estoque

Solução de ácido sulfosalicílico (SSA) 5%.

Tampão fosfato 5X (500mM), contendo 5mM EDTA.

Solução padrão estoque de glutathiona: 0,3mg de glutathiona reduzida em 0,1mL de água destilada.

Solução de estoque de DTNB: 8mg de DTNB foram diluídos em 5,33mL de dimetil sulfosalicílico (DMSO), resultando em uma solução com 1,5mg/mL de concentração.

Estoque de NADPH (solução de 40mg/mL).

Preparação da amostra biológica

100mg de tecido foi homogeneizado com 1mL de ácido de sulfosalicílico 5% (SSA), e em seguida centrifugado a 10000g, por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica.

Preparo dos reagentes de trabalho

Solução de enzimas diluída: Diluir 15,2µL de glutathiona redutase (100unidades/mL) em 250µL de tampão fosfato 1x.

Solução de NADPH de trabalho: Da solução de estoque de NADPH preparada são retirados 30 μ L para 7,5mL de tampão fosfato 1x.

Mistura de trabalho: 8mL de tampão 1x, 228 μ L da solução de enzimas diluída e 228 μ L de DNPH solução de estoque.

Solução padrão de glutatona – preparar para a curva padrão: Diluir 10 μ L de solução estoque de glutatona padrão com 2mL de ácido SSA 5%.

Procedimento para dosagem

A confecção da curva padrão e as dosagens nas amostras foram feitas em placas de Elisa. Os reagentes e a seqüência de adições estão descritas nas tabelas abaixo.

Procedimento para curva padrão

Poço	1	2	3	4	5
[GSH] μ M	50	25	12,5	6,25	3,125
Solução de GSH (μ L)	50	25(tubo 1)	25(tubo 2)	25(tubo 3)	25(tubo 4)
SSA 5% (μ L)	-	25	25	25	25
nmoles de GSH em 10 μ L de amostra	0,5	0,25	0,125	0,062	0,0312

Procedimento para o teste

	Amostra	SSA 5%	Mistura de trabalho
Branco	-	10 (μ L)	150 (μ L)
Padrão (tubos preparados para a curva)	10 (μ L)	-	150 (μ L)
Amostra	10 (μ L)	-	150 (μ L)

As amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, 50µL de NADPH foram adicionados às mesmas e o cronômetro disparado. As absorbâncias das amostras foram lidas durante 5 minutos, no leitor de ELISA à 412 nm.

Cálculo

Foi feito um gráfico utilizando os pontos obtidos na curva padrão (estes pontos obtidos foram o delta das absorbâncias). Após análise de regressão linear, foi determinado a equação da reta. Esta equação foi utilizada para determinar a concentração em nmoles de glutatona total em 10µL de amostra, e este valor convertido para 1mL de amostra.

4.11.4 - Catalase

Princípio da técnica

Determinação da atividade da enzima catalase, baseado na sua capacidade de converter o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e oxigênio molecular, conforme descrito por Aebi, (1984).

Preparação da amostra biológica

100mg do fígado foi homogeneizado com 1mL de tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 e em seguida centrifugado por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica.

Procedimento de dosagem

Em um tubo de polipropileno colocaram-se 50µL de tampão fosfato pH 7,2; (0,1mM) e 40 µL de água destilada, o qual foi mantido em banho maria 30°C por 1 minuto. Em seguida adicionaram-se 10µL da amostra e 900µL de H₂O₂ (10mM). Homogeneizou-se a solução, o espectrofotômetro foi zerado com H₂O₂ (10mM) em 240nm e determinaram-se as absorbâncias das amostras exatamente a cada minuto, durante cinco minutos.

Cálculo

1U de catalase é equivalente a hidrólise de 1µmol de H₂O₂ ($\epsilon = 39,4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) por minuto (Aebi, 1984). Usualmente a atividade dessa enzima é representada em

Unidade por mL de amostra. Calculamos a atividade da catalase segundo a lei de Lambert Beer. A absorbância utilizada nessa expressão é o delta obtido das cinco absorbâncias lidas (absorbância final –absorbância inicial / 4).

4.11.5 - Proteína Carbonilada

Princípio da técnica

A oxidação de proteína por ROS leva à formação de derivados carbonílicos. Estes podem ser mensurados por métodos sensíveis, particularmente aqueles que utilizam o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). O DNPH reage com grupos carbonílicos gerando a hidrazona correspondente, a qual pode ser analisada espectrofotometricamente. A determinação da concentração sérica de proteína carbonilada foi realizada conforme descrito por Levine *et al.* (1994).

Preparação da amostra biológica

200mg do fígado ou rim foram homogeneizados com 1mL de tampão fosfato 50mM, pH: 6,7 contendo EDTA 1mM. Em seguida centrifugado a 10000g, por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica.

Reagentes utilizados e forma de preparo

Ácido Clorídrico 2,5M.

DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina): 0,01g de DNPH foi diluído em 10mL de HCL 2,5M (preparado anteriormente). Obtendo uma solução com 0,1% de DNPH. Esta solução foi estocada no escuro à 4°C. Estável por uma semana.

Solução de TCA (ácido tricloroacético) 10%

SDS 6% - Dodecil Sulfato de Sódio.

Mistura de etanol e acetato de etila: Em um frasco foi misturado 30mL de etanol e 30mL de acetato de etila. Esta mistura deve ser mantida em geladeira.

Procedimento de dosagem

Para cada amostra utilizou-se dois tubos de polipropileno, um foi denominado de Amostra (A) e outro de Controle (C). Transferiu-se 500µL de homogeneizado de fígado ou rim para cada tubo (amostra (A) / controle (C)). Em seguida foi adicionado aos tubos 500µL de TCA 10% e misturado no vórtex, logo após, foram centrifugados (tubo A e C)

à 5000g por 10 minutos à 4°C. O próximo passo foi adicionar ao tubo A 500µL de DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) e no tubo C 500µL de HCL à 2,5M. Ambos foram mantidos no escuro à temperatura ambiente por um período de 30 minutos, e a cada 15 minutos eram misturados no vórtex. Em seguida foi adicionado 500µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% em cada tubo, misturado no vórtex e centrifugados à 5000g por 10 minutos à 4°C. Depois de centrifugados, o sobrenadante dos tubos foi descartado e 1mL de mistura de etanol com acetato de etila foi adicionado aos tubos e misturados no vórtex. Uma nova centrifugação foi realizada. Em seguida o sobrenadante dos tubos A e C foram descartados e à estes foram adicionados mais 1mL da mistura etanol e acetato de etila, foram misturados no vórtex e novamente centrifugados. No final das centrifugações, o sobrenadante dos tubos A e C foram novamente descartados e adicionado em ambos 1mL de SDS 6%, misturados no vórtex e centrifugados à 10000g por 10 minutos à 4°C. Finalmente o sobrenadante dos tubos foram retirados e transferidos para cubeta, onde foram lidos no espectrofotômetro à 370nm.

Cálculos

A concentração de proteína carbonilada foi determinada utilizando a seguinte equação de Lambert Berr:

$$A = C.b.\varepsilon$$

Onde A é a subtração da absorbância do tubo A (amostra) pela absorbância do tubo C (controle), C é a concentração, b é o caminho óptico e ε é o coeficiente de extinção molar. O conteúdo de proteína carbonilada foi calculado usando o coeficiente de extinção molar de 22 000 M⁻¹ cm⁻¹ e expresso por nmol de proteína carbonilada formada por mg de proteína.

Para se obter a concentração de proteína carbonilada em relação à concentração de proteínas totais no fígado ou rim, este parâmetro foi determinado pelo método de Lowry (descrito a seguir).

4.11.6 – Proteínas totais em tecidos – método de Lowry

Princípio da técnica

O método de dosar proteína Lowry é um ensaio muito confiável e amplamente usado. Este método foi descrito a primeira vez por Lowry et al. (1951). O método de

Lowry é baseado nas ligações das proteínas, que em meio alcalino, com os íons cobre (Cu^{2+}) formando uma cor azul que é dependente em partes, do índice de tirosina e triptofano da amostra, já que os íons cobre catalisam a oxidação de aminoácidos aromáticos.

Reagentes utilizados e forma de preparo

Reagente A: Foi dissolvido 0,25g de sulfato de cobre e 0,5 de citrato de sódio em 100 mL de água destilada. A solução foi armazenada, no escuro, em temperatura ambiente.

Reagente B: Foi dissolvido 5g de carbonato de sódio e 1g de hidróxido de sódio em 250mL de água destilada. Foi armazenado a temperatura ambiente.

Reagente C: Foi adicionado 1mL do reagente A em 50mL do reagente B. Preparado na hora do teste.

Reagente D: Foi dissolvido um 1mL de Folin-Ciocalteu em 1mL de água destilada. Preparado na hora do teste.

Curva padrão para proteínas totais:

Foram realizados quatro pontos para a curva, pelo seguinte procedimento:

P1- 25 μ L de uma solução estoque de proteínas a 0,2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto foi de 0,05mg/mL.

P2- 7,5 μ L de uma solução estoque de proteínas a 2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto foi de 0,15mg/mL.

P3- 715 μ L de uma solução estoque de proteínas a 2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto foi de 0,35mg/mL.

P4- 25 μ L de uma solução estoque de proteínas a 2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto foi de 0,5mg/mL.

Procedimento de dosagem de proteínas totais:

Em um tubo de polipropileno, foram pipetados 10 μ L de amostra ou padrão e completados para 100 μ L com água destilada. O branco, usado para zerar o espectrofotômetro, foi feito apenas com 100 μ L de água destilada. Posteriormente foi adicionado 1mL do reagente C em todos os tubos. A mistura foi levada ao vórtex e mantida a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado em cada

tubo, 100 μ L do reagente D. O volume foi misturado e incubado a temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 660nm.

Cálculos

Foi feito um gráfico expressando a concentração do padrão (Eixo Y) X absorvância do padrão (Eixo X). Após regressão linear, foi determinada a equação da reta com a seguinte característica: Concentração = a X Absorvância + b. Esta equação foi utilizada para determinar a concentração de proteínas totais nos homogenatos de tecidos. Todas as concentrações foram obtidas em mg/mL.

4.11.7 – TBARS

Princípio da técnica

Determinação da concentração de TBARS foi baseada na capacidade do ácido tiobarbitúrico (TBA) em se ligar a lipídeos oxidados, esta dosagem foi realizada conforme descrito por Buege and Aust, (1978).

Preparação da amostra biológica

100mg do fígado ou rim foi homogeneizado com 1mL de tampão fosfato, pH 7,4 e em seguida centrifugado por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica.

Procedimento de dosagem

Em um tubo foi colocado 500 μ L de homogeneizado, 250 μ L de ácido tricloroacético (TCA) 28% dissolvido em HCl 0,25N, 250 μ L de ácido tiobarbitúrico 1% dissolvido em ácido acético 1:1 e 125 μ L de BHT 5mM dissolvido em etanol. Este tubo foi levado ao vórtex e colocado em um banho maria a 95°C por 15 minutos. Após esse período, este tubo foi centrifugado por 10 minutos a 10000g. O sobrenadante foi lido no espectrofotômetro a 535nm, que foi zerado com água destilada.

Cálculo

A concentração de TBARS foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar $\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, segundo a lei de Lambert Beer. Usualmente essa concentração é representada em nmoles por mg de proteína.

4.11.8 - Óxido Nítrico

Princípio da técnica

A concentração de óxido nítrico (NO) foi determinada usando o kit BioAssay System (DINO – 250). O NO é oxidado para nitrato e nitrito, que é uma prática comum medir a quantidade total de NO^{2-} / NO^{3-} para saber os níveis de NO na amostra. Então este kit mede a produção de NO pela redução de nitrato a nitrito usando o método de Griess adaptado.

Preparação da amostra biológica

Os neutrófilos utilizados foram homogeneizados com PBS 1X, pH 7,4. E centrifugados a 10000g, por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica. Além desses homogeneizados, foi também utilizado plasma.

Desproteinação da amostra biológica

Em tubos de polipropileno, 100µL da amostra (homogeneizado de neutrófilos ou plasma) foram adicionados a 80µL de sulfato de zinco 75mM e centrifugados a 14000rpm, por 5 minutos à 4°C. Em seguida o sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 120µL de NaOH 55mM. Outra centrifugação foi feita a 14000rpm, por 5 minutos à 4°C. Então o sobrenadante foi misturado a 70µL de tampão glicina, fornecido pelo kit. Após essa desproteinação, as amostras foram utilizadas no teste.

Preparo dos reagentes

Tampão de ativação diluído: foram misturados 1 volume do tampão 3x, que é o fornecido pelo kit a 2 volumes de água destilada. Foi armazenado por 12 meses, a 4 °C.

Ativação do cádmio: foram utilizados 3 grânulos de Cádmio por amostra. Estes grânulos foram transferidos para um tubo falcon de 50mL e lavados três vezes com água destilada. Após esse procedimento, foi retirado o resíduo de água com uma pipeta e adicionado 200µL de tampão de ativação diluído por grânulo de cádmio. Foi incubado a temperatura ambiente por 5 minutos e misturado intermitentemente. Em seguida, os grânulos foram novamente lavados três vezes com água destilada e secados com papel de filtro. Esse procedimento de ativação deve ser realizado em no máximo 20 minutos antes do teste.

Procedimento para curva padrão

O padrão de óxido nítrico foi feito dissolvendo 30 μ L de nitrito padrão estoque em 570 μ L de água. Identificaram-se 8 tubos de polipropileno e adotou-se o procedimento delineado na tabela abaixo:

CONC (μ MOL/L)	50	40	30	20	15	10	5	0
Padrão nitrito(μ L)	150	120	90	60	45	30	15	0
H ₂ O (μ L)	0	30	60	90	105	120	135	150
Tampão glicina (μ L)	50	50	50	50	50	50	50	50

Procedimento para dosagem

Na amostra que foi desproteinada foram adicionados 3 grânulos de cádmio ativados e incubados por 15 minutos a temperatura ambiente. A confecção da curva padrão e as dosagens nas amostras foram feitas em placas de Elisa. Em cada *well* foi colocado 50 μ L de reagente A, 100 μ L de amostra ou padrão e 50 μ L de reagente B. A placa foi incubada 5 minutos a temperatura ambiente e lida em espectrofotômetro a 570 nm. O branco utilizado para os cálculos de concentração foi o ultimo ponto da curva que possui concentração “0” de nitrito.

Cálculos

Foi feito um gráfico expressando a concentração do padrão (Eixo Y) X absorvância do padrão (Eixo X). Após uma regressão linear, foi determinado a equação da reta. Esta equação foi utilizada para determinar a concentração de óxido nítrico. Todas as concentrações foram obtidas em μ mol/L. Para se obter a concentração de óxido nítrico no fígado em relação à concentração de proteínas totais, este parâmetro foi determinado pelo método de Lowry. Assim a concentração de óxido nítrico no fígado foi expressa em μ moles/mg de proteína.

4.12 – Análise estatística

Os dados foram submetidos a testes de normalidades e após verificarmos que os mesmos seguiam distribuição normal optamos por utilizar o teste-t de Student's pareado. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

5 - RESULTADOS

Ensaio in vitro

➤ *Efeito do extrato hidroalcoólico B. trimera sobre a modulação de espécie reativas de oxigênio em neutrófilos de ratos estimulados com zimosan*

Para avaliar o efeito do extrato de *B. trimera* sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos, testamos três diferentes concentrações do extrato a fim de descobrir qual dessas apresentava maior potencial inibitório sobre as EROs sem, no entanto, diminuir a viabilidade da célula (**Figura 10**). Nossos resultados mostraram que os extratos de *B. trimera* nas concentrações de 50, 5 e 0.5 µg/mL foram capazes de inibir significativamente a liberação das EROs, sendo este efeito dose dependente, uma vez que o extrato de concentração 50 µg/mL apresentou uma alta porcentagem de inibição (96,8%) acompanhada de uma baixa viabilidade (48%), enquanto o extrato de concentração 0.5 µg/mL apresentou uma baixa taxa de inibição (51%) acompanhada de uma alta viabilidade (92%). Diante disso, nossos resultados mostraram que o extrato de carqueja na concentração de 5 µg/mL apresentou uma melhor relação inibição/viabilidade, já que foi capaz de inibir cerca de 85% da liberação de EROs mantendo uma viabilidade celular acima de 95%.

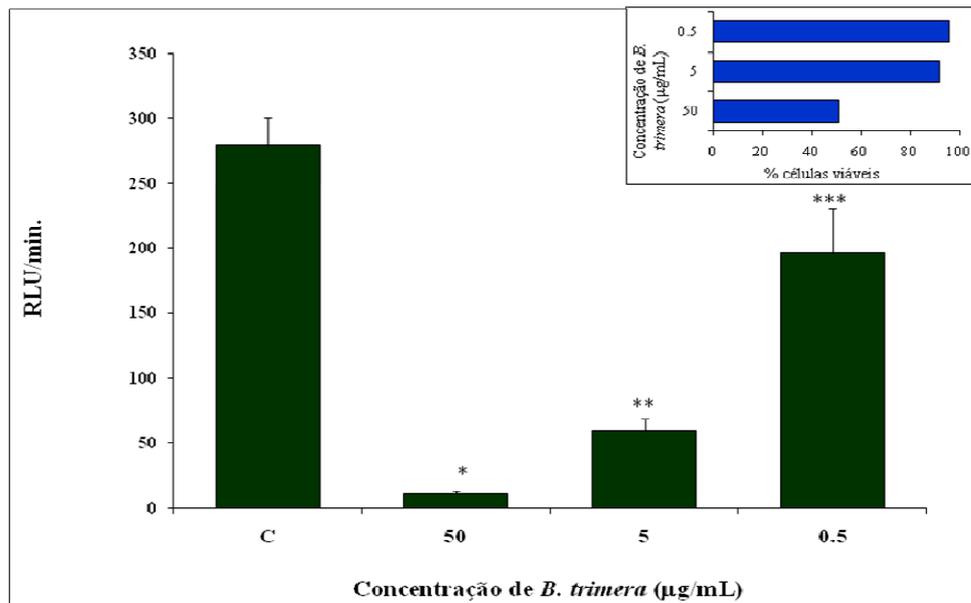


Figura 10 – Efeito de *B. trimera* sobre a modulação de EROs (painel A) e a viabilidade celular (painel B) em neutrófilos *in vitro*. Os dados estão representados como média + desvio padrão. * $p = 0,00005$ em relação ao controle, ** $p = 0,00003$ em relação ao controle, *** $p < 0,05$ em relação ao controle.

Para avaliação da geração de EROs durante a ativação das células fagocíticas utilizamos o ensaio de quimioluminescência amplificado por luminol. Os resultados da **Figura 11 – Painel A** mostram que a concentração de 5 µg/mL do extrato foi capaz de inibir significativamente a produção de EROs ($p = 0,00003$) quando comparados ao metabolismo basal dos neutrófilos. Já os neutrófilos incubados com partículas de ZC3b foram capazes de ativar, significativamente ($p=0,003$) a produção de EROs. Entretanto, quando os neutrófilos foram pré-incubados com *B. trimera* e posteriormente incubados com ZC3b houve uma redução significativa de 83% na produção de EROs quando comparado às células incubadas apenas com ZC3b. Estes resultados sugerem que o extrato hidroalcoólico de *B. trimera* apresenta propriedades antioxidantes, sendo capaz de modular a produção e/ou liberação de EROs tanto em neutrófilos não estimulados, quanto em neutrófilos estimulados com partículas de zimosan. A ação conjunta e isolada do extrato de *B. trimera* e do zimosan também pode ser evidenciada pela análise da curva temporal do ensaio de quimioluminescência (**Painel B**). Como podemos observar, este gráfico demonstra que já no primeiro minuto de adição do extrato de *B. trimera* (11^o minuto) ocorre uma inibição significativa de EROs.

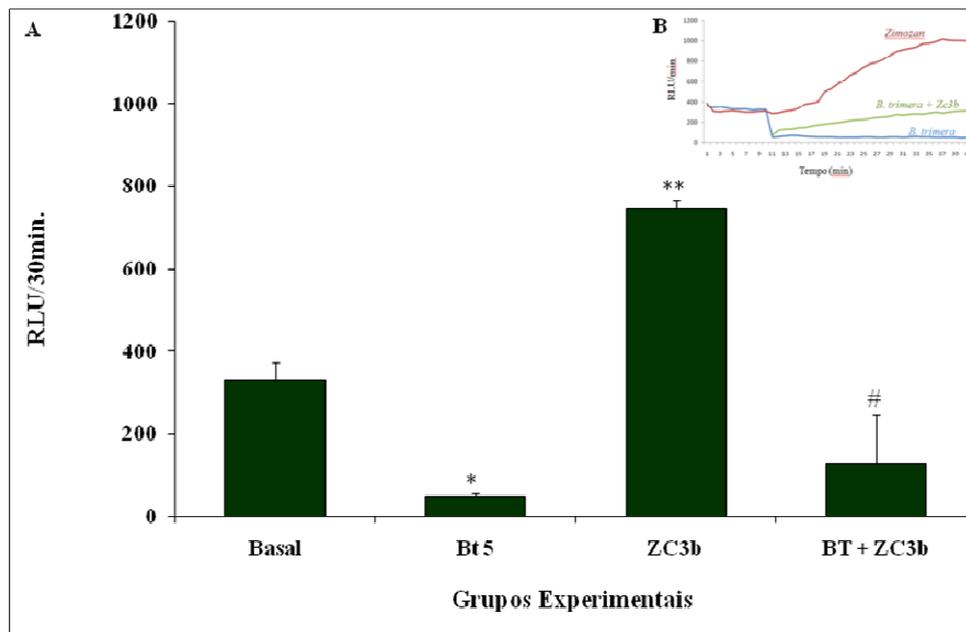


Figura 11 – Painel A - Efeito de *B. trimera* sobre a produção de ERO de neutrófilos *in vitro*. Painel B – curva temporal típica do ensaio de quimioluminescência acompanhado em intervalos de 1 minuto durante 30 minutos. Os dados estão representados como média + desvio padrão. * $p = 0,00003$ em relação ao controle, ** $p = 0,003$ em relação ao controle, # $p = 0,001$ em relação ao ZC3b.

Atividade da ALT e AST

Para a caracterização do modelo de inflamação no ensaio *in vivo*, realizamos previamente uma curva onde analisamos, em diferentes períodos de tempo, a atividade da ALT e AST após a administração de APAP. Conforme pode ser observado na **Figura 12**, os animais do grupo controle (C) que receberam PBS apresentaram baixa atividade de ALT ($9,586 \pm 1,86$ UI). Em contraste, os animais que receberam um tratamento oral de 835 mg/kg de APAP demonstraram uma maior atividade desta enzima, embora essa elevação só tenha sido significativa após as seis primeiras horas, atingindo o seu pico máximo vinte quatro horas ($142,209 \pm 5,67$ UI) após a administração do APAP. Quarenta e oito horas após a dose de APAP a atividade de ALT começou a diminuir chegando, no tempo de setenta e duas horas ($26,546 \pm 6,15$ UI), a valores significativamente menores que os encontrados no tempo de vinte quatro horas, indicando, portanto, que mecanismos endógenos de reparos podem ter sido ativados.

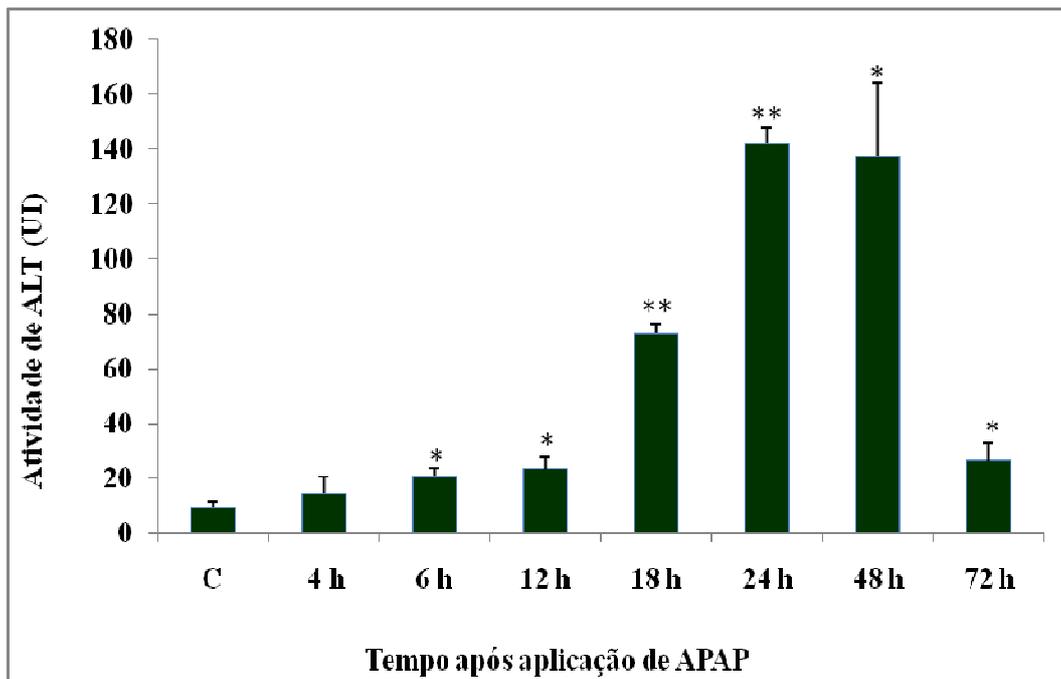


Figura 12 – Hepatotoxicidade do APAP em ratos Fischer. A atividade sérica de alanina aminotransferase (ALT) foi medida nos tempos indicados após uma dose única de APAP (835 mg/kg, p.o.). Os dados estão representados como média + desvio padrão. * $p < 0,05$ em relação ao controle, ** $p < 0,001$ em relação ao controle.

Como mostrado na **figura 13**, o grupo controle que recebeu PBS apresentou uma menor atividade de AST ($81,84 \pm 10,50$). Assim como ocorrido na atividade de ALT, a atividade de AST também foi aumentada após a administração de APAP, sendo este aumento significativo após as seis primeiras horas, atingindo o seu pico máximo vinte quatro horas ($241,03 \pm 42,20$ UI) e quarenta e oito horas ($247,16 \pm 20,50$) após a administração do APAP.

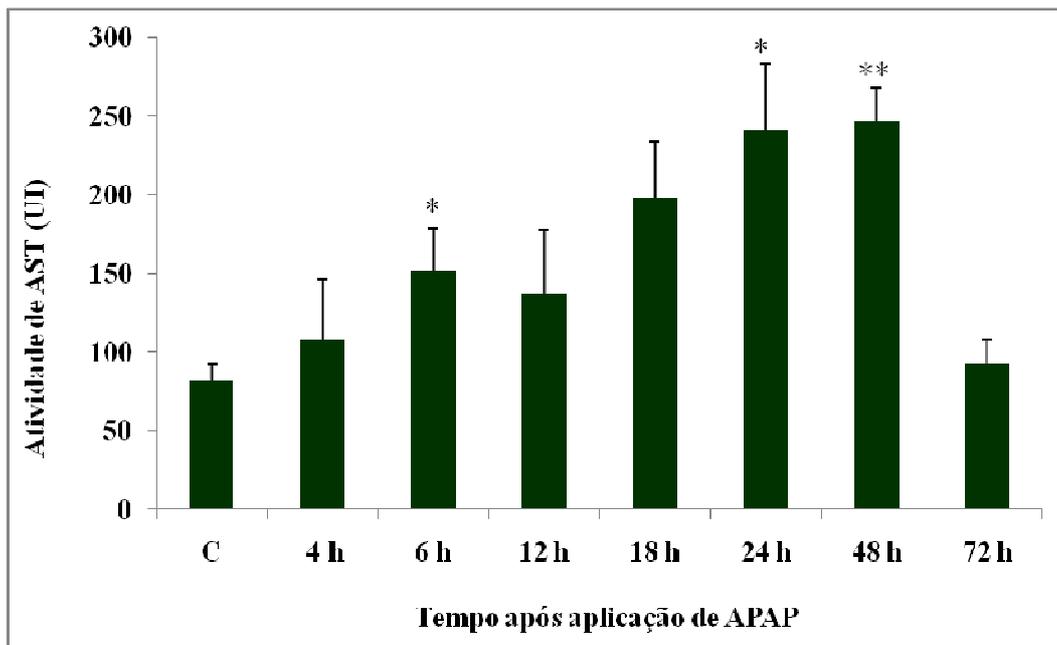


Figura 13 – Hepatotoxicidade do APAP em ratos Fischer. A atividade sérica de aspartato aminotransferase (AST) foi medida nos tempos indicados após uma dose única de APAP (835 mg/kg, p.o.). Os dados estão representados como média + desvio padrão. * $p < 0,05$ em relação ao controle, ** $p < 0,001$ em relação ao controle.

Ensaio in vivo:

- ***Efeito do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* sobre a produção de espécie reativas de oxigênio em neutrófilos de ratos intoxicados com APAP.***

Os resultados da **Figura 14** mostram que a administração oral de APAP (835mg/kg) induziu um aumento significativo na produção de EROs (1768 ± 447 RLU) quando comparados ao controle (329 ± 283 RLU). Nos animais pré-tratados com extrato de *B. trimera* e posteriormente com APAP, também observamos uma redução significativa na produção de EROs (917 ± 344 RLU) em relação aos neutrófilos que receberam somente APAP. Apesar deste efeito os animais tratados somente com *B. trimera* não apresentaram redução significativa na produção de EROs.

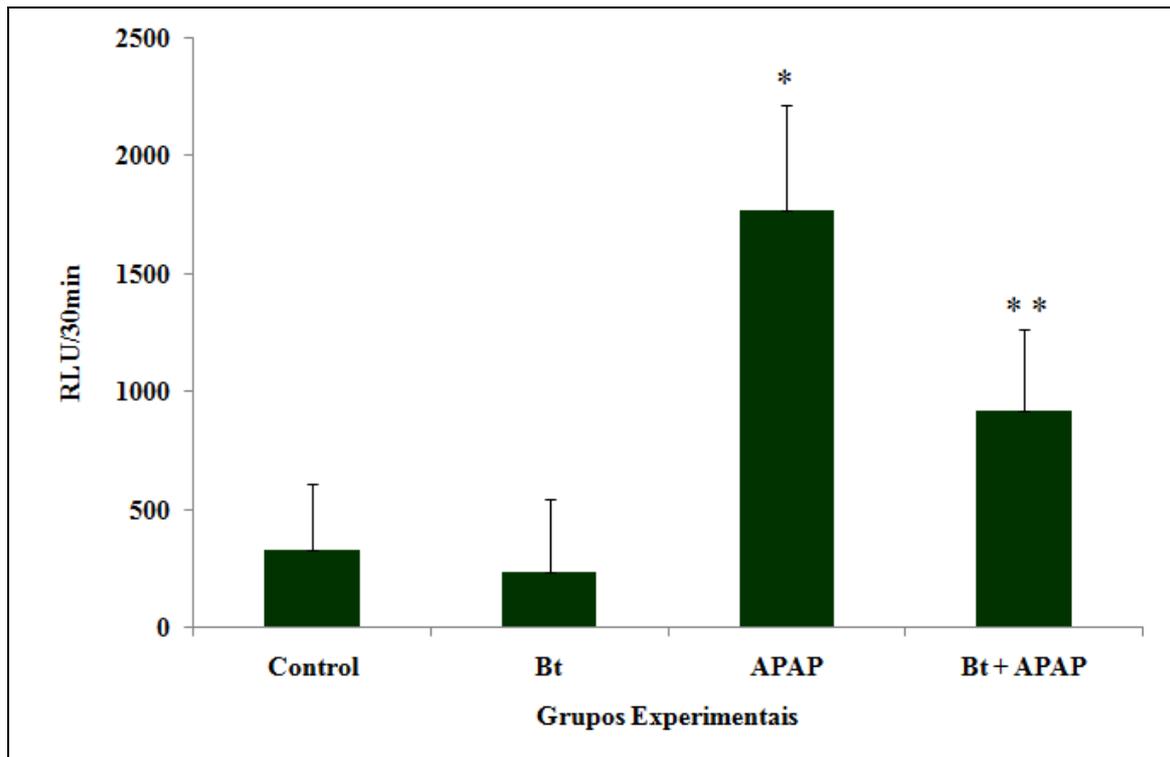


Figura 14 – Efeito do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* sobre a produção de ERO em neutrófilos de ratos 24 h após o tratamento com APAP. Os ratos foram tratados com uma dose de 600 mg/kg de *B. trimera* 1 h antes da administração de APAP. * $p < 0,0001$ em relação ao controle, ** $p < 0,01$ em relação ao APAP.

➤ ***Efeito do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* sobre a produção de óxido nítrico em neutrófilos de ratos tratados com APAP.***

Na **Figura 15** examinamos o efeito da dose hepatotóxica de APAP sobre a produção de óxido nítrico em neutrófilos. Como podemos observar não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais.

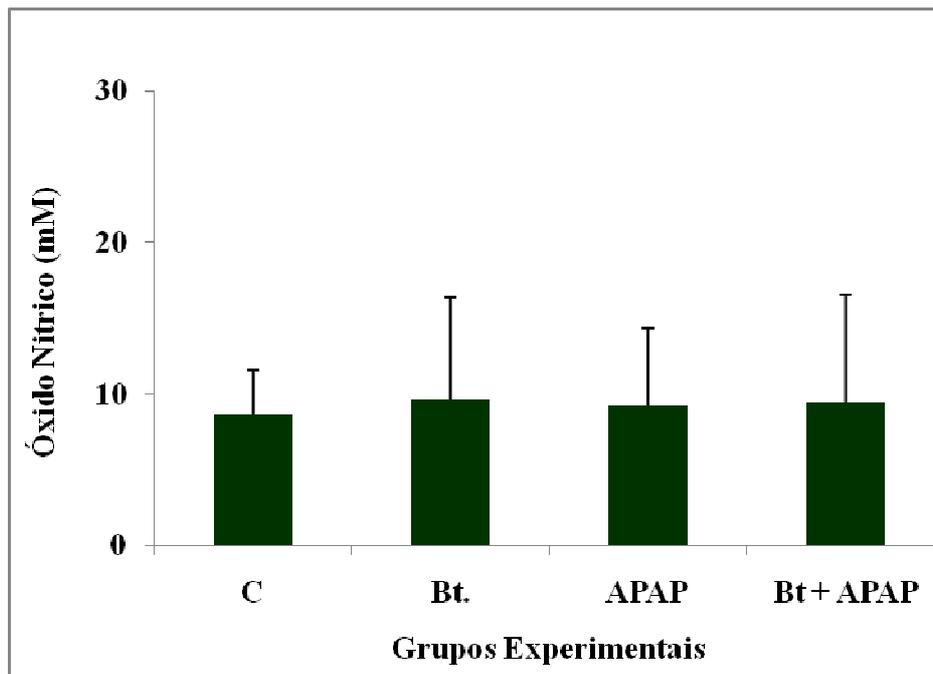


Figura 15 – Efeito do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* sobre a produção de óxido nítrico em neutrófilos de ratos 24 h após o tratamento com APAP. Os ratos foram tratados com uma dose de 600 mg/kg de *B. trimera* 1 h antes da administração de APAP. * $p < 0,05$ em relação ao controle, ** $p < 0,05$ em relação ao APAP. ($n=5$).

➤ ***Efeito do extrato hidroalcoólico de B. trimera sobre a produção de óxido nítrico no plasma de ratos tratados com APAP.***

Na **Figura 16** também examinamos o efeito da dose hepatotóxica de APAP sobre a produção de óxido nítrico, porém em outro compartimento, o plasma. Neste compartimento observamos que os animais intoxicados com APAP apresentaram uma maior produção de NO quando comparados aos animais controle. Em contrapartida, os animais tratados com o extrato de *B. trimera* e em seguida intoxicados com APAP apresentaram uma menor produção de NO em relação aos animais que receberam apenas APAP. Esse resultado evidencia a capacidade de *B. trimera* em impedir o aumento das concentrações de NO no plasma induzido pelo APAP.

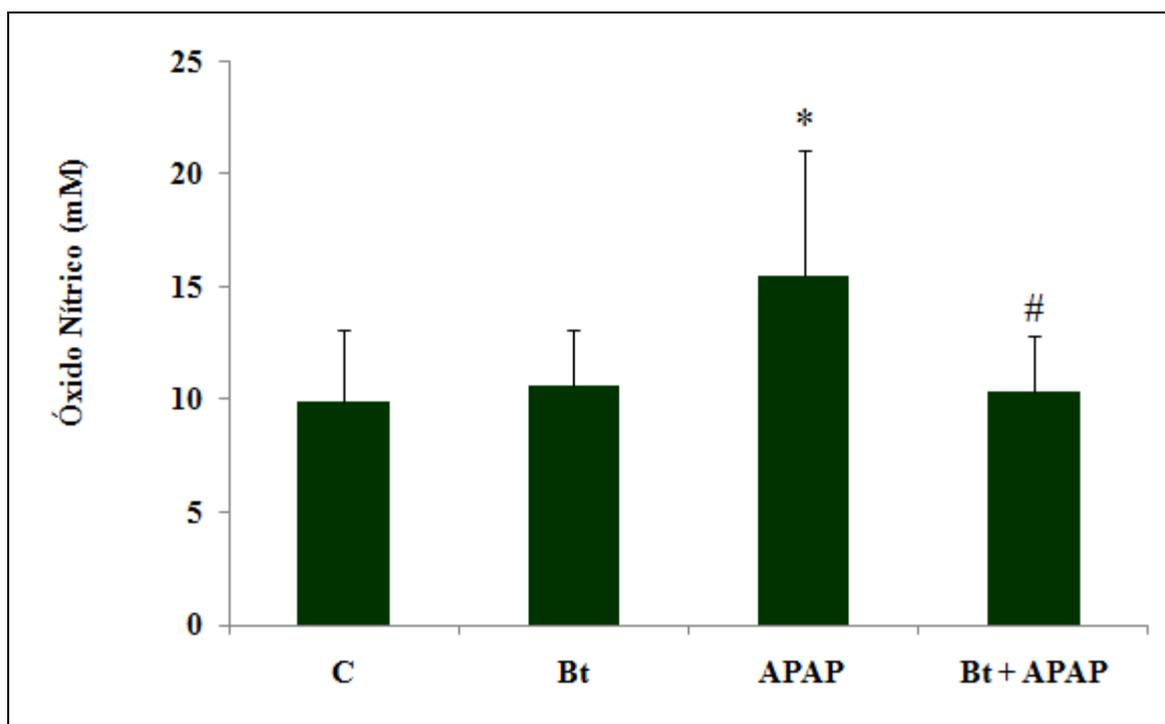


Figura 16 – Efeito do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* sobre a produção de óxido nítrico no plasma de ratos 24 h após o tratamento com APAP. Os ratos foram tratados com uma dose de 600 mg/kg de *B. trimera* 1 h antes da administração de APAP. * $p < 0,05$ em relação ao controle, # $p < 0,05$ em relação ao APAP ($n=10$).

➤ **Efeito do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* sobre as defesas antioxidantes.**

Na **Tabela II**, investigamos o *status* antioxidante dos animais por mensurar a atividade sérica da paraoxonase (PON) utilizando o fenilacetato e o paraoxon como substratos, a atividade da catalase e a concentração de glutathiona total no fígado dos animais.

Em relação ao substrato fenilacetato e ao substrato paraoxon observamos que os animais que receberam APAP apresentaram uma redução na atividade da PON de 20% e 12,5%, respectivamente em comparação ao grupo controle. Entretanto a adição do extrato de *B. trimera* não foi capaz de retornar a atividade da PON a valores semelhantes ao do controle.

A atividade da catalase e os níveis de glutathiona não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais.

Tabela II – Efeito do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* sobre as enzimas antioxidantes e glutatona de ratos 24 h após o tratamento com acetaminofen (APAP).

Grupos	PON Fenilacetato (U/mL)	PON Paroxon (U/mL)	Catalase U/mg de proteína	Glutaciona (nmoles/mg de proteína)
Controle	4,9 ± 0,21	0,16 ± 0,02	132,53 ± 20,24	0,75 ± 0,04
Cont. + APAP	3,92 ± 0,32*	0,14 ± 0,01*	157,59 ± 32,53	0,74 ± 0,12
Carqueja	5 ± 0,29	0,17 ± 0,01	144,37 ± 21,12	0,77 ± 0,04
APAP + carqueja	3,95 ± 0,34	0,13 ± 0,01	147,45 ± 19	0,77 ± 0,08

* $p < 0,05$ em relação ao controle, ** $p < 0,05$ em relação ao APAP.

➤ **Efeito do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* sobre os produtos de estresse oxidativo.**

Na **Tabela III**, analisamos como biomarcadores do estresse oxidativo os níveis séricos de TBAR e proteína carbonílica.

Os animais tratados com o extrato de *B. trimera* e intoxicados com APAP reduziram em 42,71% os níveis de TBAR em relação ao grupo que recebeu apenas APAP. Os níveis de proteína carbonílica não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais.

Tabela III – Efeito do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* sobre os níveis de TBAR e proteína carbonílica de ratos 24 h após o tratamento com APAP.

Grupos	TBAR Fígado (U/mg de proteína)	Prt Carb. Fig (nmoles/mg de proteína)
Controle	4,03 ± 0,29	0,11 ± 0,02
Cont. + APAP	5,01 ± 0,93	0,12 ± 0,05
Carqueja	5,61 ± 2,44	0,11 ± 0,03
APAP + carqueja	2,87 ± 1,04**	0,09 ± 0,01

* $p < 0,05$ em relação ao controle, ** $p < 0,05$ em relação ao APAP.

➤ **Efeito do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* sobre os marcadores bioquímicos de função hepática e renal.**

Para avaliar se o APAP e o extrato de *B. trimera* provocaram uma injúria hepática foi determinado a atividade sérica da alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e da fosfatase alcalina. E para avaliar se os mesmos provocaram um dano renal foi analisado os níveis de creatinina. (**Tabela IV**).

Os animais que receberam APAP apresentaram uma maior atividade de AST (178%) e ALT (764%) quando comparados aos animais do grupo controle. O grupo tratado com *B. trimera* e intoxicado com APAP elevou a atividade da AST em 40% quando comparados ao grupo que recebeu somente APAP.

Os dados de fosfatase alcalina revelaram que a atividade dessa enzima foi aumentada em 25,87 % nos animais que receberam APAP. Contudo, quando os animais foram tratados com o extrato de *B. trimera* e então submetidos à dose de APAP, foram capazes de reduzir a atividade da fosfatase em 38,96% quando comparado ao grupo que recebeu somente o APAP.

Em relação à creatinina observamos que os ratos intoxicados com APAP apresentaram maiores níveis deste parâmetro ($75,39 \pm 4,8$) quando comparados aos valores correspondentes ao do grupo controle ($69 \pm 3,41$).

Tabela IV – Efeito do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* sobre os marcadores bioquímicos de função hepática e renal de ratos 24 h após o tratamento com APAP.

Grupos	AST (U/I)	ALT (U/I)	Fosfatase (U/L)	Creatinina ($\mu\text{mol/dL}$)
Controle	$19,11 \pm 3,31$	$10,78 \pm 1,58$	$47,58 \pm 5,79$	$69 \pm 3,41$
Cont. + APAP	$53,23 \pm 5,96^*$	$93,2 \pm 39,48^*$	$59,89 \pm 4,01^*$	$75,39 \pm 4,8^*$
Carqueja	$18,41 \pm 1,69$	$15,52 \pm 3,35^*$	$42,19 \pm 2,94$	$70,97 \pm 2,66$
APAP + carqueja	$74,6 \pm 10,21^{**}$	$91,24 \pm 34,47$	$36,96 \pm 2,98^{**}$	$75,63 \pm 2,55$

* $p < 0,05$ em relação ao controle, ** $p < 0,05$ em relação ao APAP

Análises histológicas do fígado de animais tratados com APAP após 24h indicam degeneração microgoticular discreta dos hepatócitos (**Figura 17B**) quando comparado ao fígado de animais controles que não apresentavam alterações hepáticas significativas (**Figura 17A**). O tratamento isolado com o extrato de *B. trimera* revelou uma degeneração macrogoticular dos hepatócitos (**Figura 17C**), enquanto que a

associação *B. trimera* e APAP, além da degeneração microgoticular e macrogoticular, revelou também um processo inflamatório dos hepatócitos (**Figura 17D**), o que mostra que *B. trimera* não conseguiu reduzir o dano hepático provocado pelo APAP.

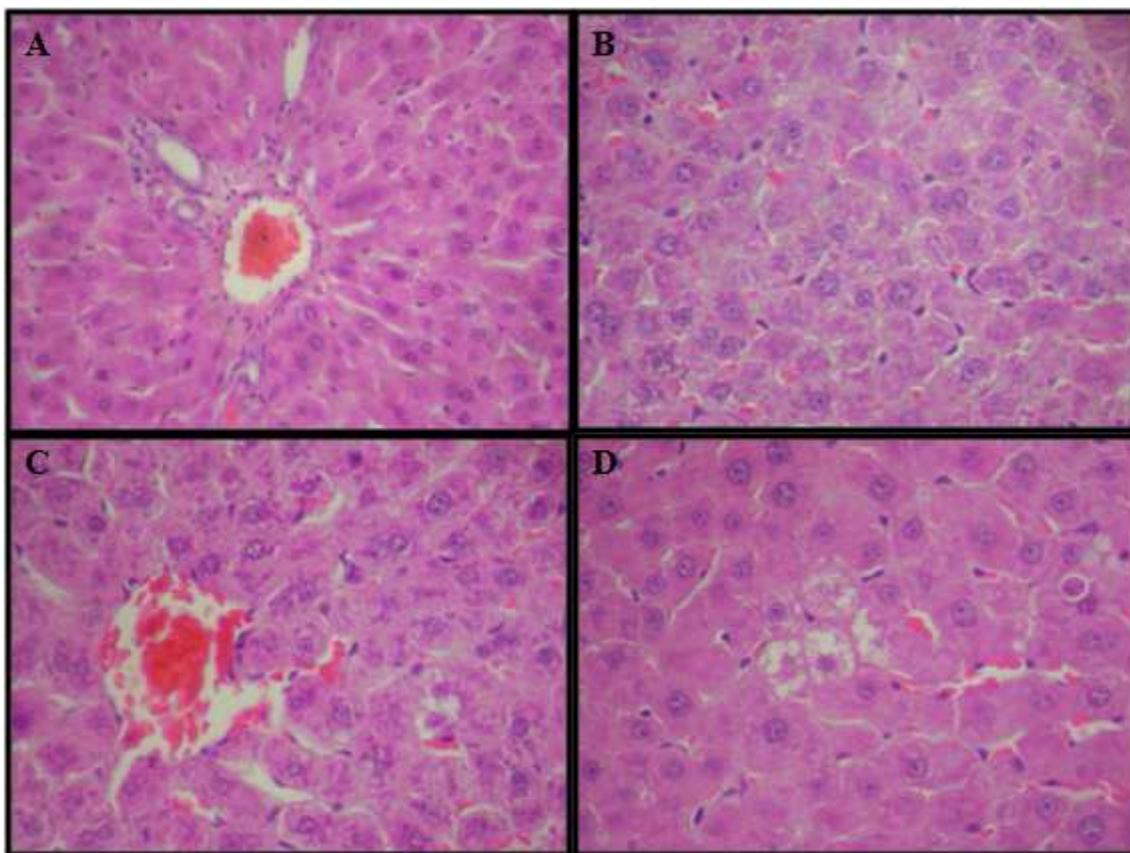


Figura 17 – Secção do fígado de ratos após 24hs de administração com PBS (A), e/ou APAP (B), e/ou extrato de *B. trimera* (C), e/ou extrato de *B. trimera* e APAP (D), mostrando: **A** - fígado normal de rato com ausência de alterações hepáticas significativas; **B** - degeneração microgoticular discreta dos hepatócitos; **C** - degeneração macrogoticular dos hepatócitos; **D** - inflamação e degeneração macrogoticular e microgoticular. As secções do fígado foram coradas com H&E (400x).

6 - DISCUSSÃO

Trabalhos realizados com *B. trimera* relatam que esta espécie apresenta importantes propriedades biológicas tais como antioxidante e antiinflamatória. Gene et al., (1996) demonstraram que a fração butanólica de *B. trimera* mostrou forte atividade anti-inflamatória em um modelo de inflamação induzido por carragenina, enquanto que Rodrigues et al, (2009), observaram que o tratamento com *B. trimera* foi eficiente, devido às suas propriedades antioxidantes, em reduzir a genotoxicidade induzida por H₂O₂ em camundongos. Esses trabalhos, associados ao de Paul et al., (2009), que evidenciou um efeito imunomodulador de *B. trimera* levou-nos ao interesse de investigar o efeito desta planta sobre a produção e/ou liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em neutrófilos, uma vez que estes estão envolvidos na instalação e na progressão de vários processos inflamatórios, bem como, na geração de EROs comuns à esses processos (Jaeschke et al., 1990).

Apesar dos poucos estudos relacionados à toxicidade de *B. trimera*, recentemente foram encontradas alterações histopatológicas no fígado de ratas grávidas tratadas com um extrato hidroetanólico da planta (Grance et al., 2008), somado a isto, Rodrigues et. al, (2009), mostraram que *B. trimera* produziu alguns efeitos genotóxicos e mutagênicos, estando estes, relacionados ao consumo de altas doses do extrato.

Nesse contexto, para analisar o papel de *B. trimera* sobre a produção de EROs em neutrófilos, foram testados três diferentes concentrações do extrato a fim de obter uma melhor relação inibição/viabilidade celular. Após os ensaios, observamos que as diferentes concentrações do extrato de *B. trimera* foram capazes de reduzir a produção de EROs em neutrófilos, sendo essa redução dose dependente, uma vez que o extrato na concentração 50 µg/mL apresentou uma maior taxa de inibição das EROs em relação ao extrato na concentração 0.5 µg/mL. Contudo, apesar do maior potencial inibitório, o extrato de concentração 50 µg/mL provocou uma maior mortalidade das células, corroborando o fato de que alguns compostos químicos presentes na planta, quando em excesso, são realmente tóxicos. Diante disso, utilizamos no ensaio *in vitro* a concentração intermediária de 5 µg/mL, uma vez que ela foi capaz de inibir cerca de 85% da produção de EROs mantendo uma viabilidade celular acima de 95%.

Nos ensaios *in vitro* o extrato de *B. trimera* na concentração de 5 µg/mL, foi capaz de reduzir significamente a produção EROs, mesmo após estímulo com partículas

opsonizadas de zimozan (ZC3b). Em virtude desse efeito antioxidante, pesquisas sobre a composição química da espécie *B. trimera*, demonstraram que o extrato etanólico do vegetal apresenta uma mistura de 5 flavonóides: quercetina, luteolina, nepetina, apigenina e hispidulina (Soicke e Leng-Peschlow, 1987), conhecidos por suas propriedades antioxidantes, uma vez que doam átomos de hidrogênio para os radicais livres (Joavanovic et al., 1998; Merken and Beecher, 2000). Estes compostos também podem modular a atividade de enzimas presente em mamíferos, tais como citocromo P450 e enzimas antioxidantes (Ferguson, 2001). Apesar dos flavonóides poderem atuar tanto na neutralização, quanto na inibição da produção de EROs, observamos em nosso ensaio *in vitro*, pela análise da curva temporal, que os flavonóides de *B. trimera* podem estar agindo como neutralizadores (scavengers) de espécies oxidantes, uma vez que no primeiro minuto de adição do extrato de *B. trimera*, ocorre uma inibição significativa de EROs, demonstrando que, provavelmente, não haveria tempo hábil para um processo regulatório enzimático. Este raciocínio não vale para os ensaios com zimozan, uma vez que este é capaz de estimular a produção de espécies oxidantes através de receptores FcR e CR, induzindo a produção de EROs (McKenzie and Schreiber, 1998). Diante disso, é provável que a atividade antioxidante elucidada pelo extrato hidroalcoólico de *B. trimera* seja, em parte, devida a ação dos flavonóides. Porém, apesar de inferirmos que *B. trimera* age no seqüestro de radicais livres, outros estudos serão necessários para confirmar esta hipótese e para esclarecer o ponto exato de ação destes compostos químicos antioxidantes, uma vez que eles podem atuar tanto na neutralização das EROs quanto na modulação da enzima responsável pela produção destas espécies em neutrófilos, a NAPH oxidase.

A partir destes resultados nos questionamos se o extrato de *B. trimera* também seria capaz de modular a resposta dos neutrófilos em um modelo *in vivo* de inflamação induzido por APAP. Para se alcançar este objetivo, o primeiro passo foi descobrir a partir de qual tempo, após a dose de APAP, encontraríamos uma maior lesão hepática e, conseqüentemente, um maior recrutamento de neutrófilos. Neste contexto, o presente estudo demonstrou através da atividade de ALT e AST, que a administração da dose subletal de APAP levou a uma significativa injúria hepática após decorrido 24 h do tratamento. Estas observações corroboram outros trabalhos que encontraram efeito similar com altas doses de APAP (Smith, et al., 1998, Meotti, et al., 2006).

Como se sabe, APAP é uma droga analgésica e antipirética segura em doses terapêuticas. Contudo, em quantidades elevadas pode causar danos no fígado e nos rins e até mesmo levar a morte em humanos e animais de laboratórios (Jollow, et al., 1974). Em doses terapêuticas o APAP é rapidamente metabolizado no fígado, principalmente, através de glucoronidação e sulfatação, e uma pequena porção é oxidada pelo citocromo p-450 2E1, para gerar um intermediário altamente reativo e citotóxico, o N-acetil-p-benzoquinona-imine (NAPQUI) (Lee, et al., 1996; Vermeulen, et al., 1992), o qual é rapidamente conjugado pela glutathione (GSH) hepática para gerar um produto não-reativo solúvel em água, o ácido mercaptúrico.

Depois de uma elevada dose de APAP a capacidade para glucoronidação e sulfatação é excedida (Slattery e Levy, 1979; Prescott, 1980; Hjelle e Klaassen, 1984) e uma grande quantidade de NAPQUI é formada via citocromo P-450 2E1 (Hjelle e Klaassen, 1984), resultando em uma rápida depleção na concentrações de GSH (Mitchell, et al., 1973). Subseqüentemente, NAPQUI se liga covalentemente no DNA e em proteínas, especialmente as mitocondriais, presentes nas células hepáticas parenquimais, resultando em uma injúria hepática (Corcoran, et al., 1980; Holme, et al., 1984).

Apesar dessas evidências, não se sabe ao certo se esses efeitos são atribuídos exclusivamente ao NAPQUI ou se metabólitos reativos gerados pelas células inflamatórias também contribuem para essa toxicidade.

Liu et al., 2006 relataram que células natural Killer e células NKT (linfócitos que apresentam um receptor de célula T com cadeias alfa invariantes) possuem um crítico papel na injúria hepática induzida por APAP, uma vez que produzem interferon gama (IFN-gama) e modulam a produção de quimiocinas e o recrutamento de neutrófilos para o fígado. No entanto, diversos trabalhos, como os de Jaeschke et al., 2005 e Cover et al., 2006 mostraram evidências experimentais que sugerem que os neutrófilos, mesmo sendo recrutados para o fígado durante a hepatotoxicidade induzida por APAP, não contribuem para iniciação e progressão da lesão hepática, mas podem contribuir de forma a provocar danos adicionais no fígado já danificado.

Apesar do papel dos neutrófilos na patofisiologia da hepatotoxicidade induzida por APAP ser ainda controverso (Jaeschke et al., 2005), estudos demonstram que uma alta dose desta droga é capaz de induzir um recrutamento de neutrófilos culminando,

conseqüentemente, em um aumento na produção de ERO (Zhang et al., 1994, Bautista et al., 1992).

Essa íntima relação existente entre os radicais livres produzidos pelos neutrófilos e a hepatotoxicidade induzida por APAP possibilitou o uso deste modelo na elucidação, *in vivo*, dos efeitos de *B. trimera* sobre as EROs.

Observamos que o extrato de *B. trimera* não foi capaz de alterar a produção basal de EROs. Entretanto, o extrato de *B. trimera* reduziu significativamente à produção de EROs em neutrófilos dos animais pré-tratados com extrato e posteriormente com APAP. Como nesse ensaio *in vivo* o tempo experimental foi de 24 horas, é provável que os constituintes químicos de *B. trimera* tenham reduzido a produção de EROs agindo na regulação da NADPH oxidase, principal enzima regulatória responsável pela produção de espécies reativas em neutrófilos. De fato, estudos realizados por Tauber et al, (1984) e Poolman et al, (2005) mostraram que diferentes polifenóis como, a quercetina e o resveratrol, são capazes de inibir a atividade desta enzima. Essa inibição está relacionada ao fato desses polifenóis diminuírem a expressão das subunidades formadoras da NADPH oxidase e inibir a atividade da proteína quinase C, uma enzima que cataliza um importante passo na ativação da NADPH oxidase de fagócitos, uma vez que ela fosforila a subunidade p47phox. Esse efeito encontrado sugere que o extrato hidroalcoólico de *B. trimera* apresenta propriedades antioxidantes em neutrófilos também em ensaios *in vivo* e que os flavonóides possuem uma grande habilidade em modular enzimas e receptores celulares (Hodek, et al., 2002).

Em 1998 Gardner et al relataram em seu trabalho que o óxido nítrico também é um importante mediador da hepatotoxicidade induzida pelo APAP. De fato, em processos infecciosos, células ativadas como macrófagos, neutrófilos e células endoteliais secretam simultaneamente NO e intermediários reativos do oxigênio, e a ação citotóxica indireta do NO consiste, principalmente, na sua reação com esses intermediários do oxigênio. Essa relação existente entre o NO e a hepatotoxicidade induzida por APAP fez com que analisássemos sua presença tanto em neutrófilos quanto no plasma.

Não observamos diferenças significativas sobre os níveis de oxido nítrico em neutrófilo. Contudo, a análise do resultado para o compartimento plasmático mostrou que os animais que receberam uma dose tóxica de APAP apresentaram um aumento significativo dos níveis de NO. Em contrapartida, o tratamento com *B. trimera* impediu

esse aumento. Sabe-se que estímulos inflamatórios, tais como endotoxinas e citocinas inflamatórias, pode induzir uma NOS dependente de cálcio em uma variedade de células incluindo macrófagos e neutrófilos (Radomski et al., 1990; Nusser e Billiar, 1993; Schini et al., 1994). A expressão dessa NOS leva a uma superprodução de NO, resultando em danos nas células endoteliais, neuronais e epiteliais (Tepperman et al., 1993; Minc-Golomb et al., 1994; Stoclet et al., 1998). Acredita-se que esse dano pode estar relacionado ao fato do NO reagir com radicais superóxidos, formando o peroxinitrito, um agente oxidante ainda mais potente, capaz de causar nitrificação de proteínas e injúria tecidual (Beckman et al., 1990; Radi et al., 1991 a,b).

A possibilidade que o NO seja crucial para hepatotoxicidade induzida por APAP tem sido sugerida pelo fato da aminoguanidina, um inibidor da iNOS, atenuar os danos provocados pela overdose de APAP (Gardner et al., 1998). Nesse contexto, o aumento na produção de NO que encontramos em nossos resultados em virtude da administração de APAP pode ser confirmada em estudos de natureza similar, em que o tratamento de ratos (Gardner, et al., 2002) e camundongos (Michael, et al., 1999) com doses hepatotóxicas de APAP resultou em danos na região centrilobular do fígado que foram correlacionados com a expressão da iNOS (Gardner, et al., 2002). Em adição, Yanagisawa et al., (1998), relatou que a indução de iNOS pode, realmente, ter um papel na progressão da necrose tubular aguda induzida por xenobióticos.

Apesar de não haver estudos correlacionando *B. trimera* com NO, podemos inferir que a redução do NO no plasma que essa planta provocou, pode estar relacionada a capacidade de alguns compostos químicos presentes no extrato, em seqüestrar as moléculas de NO formadas e/ou inibir a atividade da iNOS.

Pelo fato de *B. trimera* ter apresentado, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, um significativo efeito antioxidante, avaliamos também o seu efeito sobre a atividade das enzimas antioxidantes, sobre os produtos do estresse oxidativo e sobre marcadores de função hepática e renal.

Em relação às enzimas antioxidantes, avaliamos primeiramente a atividade da paraoxonase (PON), uma enzima que além de ser antioxidante, também exerce propriedades antiinflamatórias, uma vez que reduz a adesão de monócitos nas células endoteliais e reduz a quimiotaxia de macrófagos exercida por fosfolipídios oxidados (Ahmed et al., 2003).

A paraoxonase é uma esterase dependente de cálcio, sua família consiste de 3 genes: PON1, PON2 e PON3 (Chait et al., 2005). O RNAm da PON1 é expresso principalmente no fígado, o da PON3 é expresso no fígado e rim, enquanto que PON2 é amplamente expresso em muitos tecidos, incluindo células da parede arterial, como macrófagos. A PON1 e PON3 são secretadas pelo fígado associadas a HDL, contribuindo assim para o efeito ateroprotetor desta lipoproteína (Ng et al., 2004). Todas as três proteínas possuem atividade hidrolítica tendo atividade arilesterásica ou paraoxonase, dependendo dos substratos a serem hidrolisados, ácidos carboxílicos aromáticos ou compostos organofosfatos, respectivamente (Getz & Reardon, 2004).

No presente estudo, encontramos que ratos intoxicados com APAP apresentaram uma redução de ambas às atividades da PON e que o tratamento com *B. trimera* não impediu com que essa redução ocorresse. Nossos resultados sugerem que provavelmente o extrato de *B. trimera* não exerceu efeito antioxidante sobre a atividade da PON. Este fato pode estar relacionado com dose experimental usada, uma vez que já é bem estabelecido que antioxidantes podem aumentar a atividade e os níveis da PON1, agindo diretamente na expressão do gene desta enzima ou indiretamente na redução do estresse oxidativo (o qual inativa PON1) (Durrington et al., 2002).

Em relação à atividade de catalase e aos níveis de glutathione, não observamos alterações provocadas pelo tratamento com APAP ou pelo tratamento do APAP em combinação com o extrato de *B. trimera*. Dados da literatura demonstram que o consumo de compostos fenólicos pode propiciar um aumento na atividade das defesas antioxidantes ou até mesmo não apresentar nenhum tipo de efeito (Alia et al., 2003; Breinholt *et al.*, 1999; Dragsted *et al.*, 2004). Estes resultados contraditórios indicam que a resposta à atividade dessas defesas depende da origem do estresse oxidativo, do modelo animal utilizado, da defesa antioxidante estudada e do tipo e fonte do antioxidante dietético.

Além da análise das atividades das enzimas antioxidantes como biomarcadores do estresse oxidativo, os produtos de estresse oxidativo também têm sido descritos para demonstrar a ocorrência de injúria oxidativa (Perry et al., 2000). Dentre esses produtos estão às substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBAR). Os níveis dessas substâncias são usados como marcadores do balanço redox e da peroxidação lipídica em células hepáticas. A peroxidação lipídica é o processo através do qual as ERO agredem

os ácidos graxos polinsaturados dos fosfolípidos das membranas das células, desintegrando-as e permitindo a entrada dessas espécies nas estruturas intracelulares.

Em relação a este parâmetro nossos resultados mostraram que animais tratados com extrato de *B. trimera* e em seguida intoxicados com APAP apresentaram níveis de TBAR inferiores aos dos animais que receberam somente APAP. Apesar do APAP não ter elevado significativamente os níveis de TBAR, sabe-se que plantas, pelo fato de apresentarem constituintes antioxidantes, são eficientes em reduzir a peroxidação lipídica induzida pelo acetaminofen (Tseng et al., 1997; Patrizia et al., 2005). Uma das explicações para isso, é que estes fitoquímicos são capazes de minimizar o estresse oxidativo no fígado de animais intoxicados com APAP (Sidhartha et al., 2006).

Além dos níveis de TBAR, os níveis de proteína carbonílica também são usados como marcadores bioquímicos para detectar a modificação oxidativa de resíduos de aminoácidos em proteínas (Beal, 2002). Cátions tais como, Fe^{2+} ou Cu^{2+} , podem se ligar a locais de ligação de cátions nas proteínas, e assim permitir o ataque dessas proteínas por espécies reativas, como H_2O_2 ou O_2^- . Essas espécies transformam a cadeia de aminoácidos em carbonilas (Levine et al., 1994). Mudanças oxidativas em proteínas essenciais podem resultar em perda da função. Em nossos resultados não encontramos alterações nos níveis de proteína carbonílica provocadas pelo tratamento com APAP ou pelo tratamento do APAP em combinação com o extrato de *B. trimera*.

O efeito do tratamento de *B. trimera* e do APAP sobre o fígado foi avaliado através da análise da atividade das enzimas hepáticas AST, ALT e fosfatase alcalina e sobre os rins através da quantificação dos níveis de creatinina.

A AST e a ALT são enzimas intracelulares presentes em grandes quantidades no citoplasma dos hepatócitos. Lesões ou destruição das células hepáticas liberam essas aminotransferases para a circulação. A fosfatase alcalina pertence a um grupo de enzimas que catalisa a hidrólise de vários fosfomonoésteres em pH alcalino, ela está localizada nas membranas de revestimento dos canalículos biliares, portanto um aumento nos níveis séricos de ALP está relacionado com a ocorrência de desordens do trato biliar (Motta, 2003). Em relação a esses marcadores, observamos que a administração do APAP elevou a atividade da AST, ALT e fosfatase alcalina. O grupo tratado com o extrato de *B. trimera* e em seguida intoxicado com APAP apresentou uma

menor atividade da fosfatase alcalina, em contrapartida apresentaram uma atividade de AST ainda maior quando comparados ao grupo que recebeu somente APAP.

Aumentos na atividade de AST, ALT e fosfatase alcalina no grupo tratado com APAP indica que a dose usada foi capaz de causar uma hepatotoxicidade centrilobular dependente do citocromo P450 (Hinson et al., 1980). Essa injúria foi confirmada histologicamente pela presença de uma degeneração microgoticular discreta dos hepatócitos. A habilidade de *B. trimera* em prevenir o aumento na atividade de AST, ALT e fosfatase alcalina foi vista somente para esta última enzima, uma vez que o extrato da planta contribuiu para o dano hepático por aumentar a atividade de AST.

Em relação à creatinina encontramos um efeito somente do APAP, uma vez que ele foi capaz de elevar os níveis plasmáticos deste metabólito em relação aos animais controle. Como a velocidade de excreção da creatinina é relativamente constante e sua produção não é influenciada pelo metabolismo protéico ou outros fatores externos, a concentração da creatinina sérica é uma excelente medida para avaliar a função renal. Qualquer condição que reduz a velocidade de filtração glomerular promove uma menor excreção urinária de creatinina, com conseqüente aumento na concentração plasmática da mesma (Motta, 2003). Diante disso é provável que o extrato de *B. trimera* esteja provocando alguma alteração renal.

Os resultados encontrados para esses marcadores de função hepática e renal corrobora, em parte, com o trabalho de Grance et al. 2008, uma vez que eles demonstraram, através de análises bioquímicas e histopatológicas, que o tratamento de ratas grávidas com extrato de *B. trimera* provoca uma significativa alteração hepática e renal, embora tais alterações sejam reversíveis a partir do momento que a administração do extrato é interrompida.

7 - CONCLUSÃO

Os dados obtidos no presente estudo mostraram uma importante atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de *B. trimera*, uma vez que ele foi, *in vitro* e *in vivo*, capaz de neutralizar e reduzir a produção de ERO em neutrófilos, respectivamente. Apesar de não termos analisados outros tipos celulares e citocinas presentes em um processo inflamatório a capacidade de *B. trimera* modular a produção de radicais livres em neutrófilos, que são as principais células recrutadas em um quadro de inflamação, atribui a esta planta, pelo menos em parte, também um função antiinflamatória. Porém, para confirmar este efeito outros estudos são necessários visando compreender o papel de *B. trimera* no processo inflamatório.

Esse efeito antioxidante encontrado para *B. trimera* também pode ser evidenciado pela análise dos níveis de óxido nítrico, que se mostraram reduzidos após tratamento com extrato de *B. trimera* e dos biomarcadores do estresse oxidativo, uma vez que o extrato hidroalcoólico dessa planta foi capaz de reduzir os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

Apesar deste importante efeito antioxidante, nossos resultados mostram que *B. trimera* não promove efeito hepatoprotetor significativo, principalmente quando associada ao APAP.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad M.J., Bermejo, P., Gonzales E., Iglesias I., Irurzun A., Carrasco L., 1999. Antiviral activity of Bolivian plant extracts. *General Pharmacology* 32, 499-503.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105, 121-126.
- Aherne, S.A., O'brien, N.M., 2002. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*. 18(1), 75-81.
- Ahmed, Z., Babaei, S., Maguire, G. F., 2003. Paraoxonase-1 reduces monocyte chemotaxis and adhesion to endothelial cells due to oxidation of palmitoyl, linoleoyl glycerophosphorylcholine. *Cardiovasc Res*. 57, 225–231.
- Akihisa, T., Yasukawa, K., Uma, H., Kasahara, T., Yamanouchi, S., Takido, M., Kumaki, K., Tamura, T., 1996. Triterpene alcohols from the flowers of *Compositae* and their anti- inflammatory effects. *Phytochemistry* 43, 1255-1260.
- Alia, M., Horcajo, C., Bravo, L., Goya, L., 2003. Effect of grape antioxidant dietary fiber on total antioxidant capacity and the activity of liver antioxidant enzymes in rats. *Nutr Res*. 23, 1251– 1267.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M., 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 90, 7915-7922.
- Assari, T., 2006. Chronic Granulomatous Disease; fundamental stages in our understanding of CGD. *Medical Immunology* 5 (4), 1-8.
- Attele, A.S., Wu, J.A., Yuan, C.S., 1999. Ginseng pharmacology. Multiple constituents and multiple actions. *Biochem. Pharmacol*. 58, 1685–1693.
- Avancini C.A.M., Wiest, J.M., Mundstock, E., 2000. Atividade bacteriostática e bactericida do decocto de *Baccharis trimera* (Less.) D. C., *Compositae*, carqueja, como desinfetante ou anti-séptico. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 52(3), 1-7.
- Azam, S., Hadi, N., Khan, N.U., Hadi, S.M., 2004. Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties. *Toxicol In Vitro* 18, 555– 561.
- Babior, B.M., 1994. Activation of the respiratory burst oxidase. *Environmental Health Perspectives* 102 (10), 53-56.
- Bagchi, K., Puri, S., 1998. Free radicals and antioxidants in health and disease. *Eastern Mediterranean Health Journal* 4, 350–360.
- Barreiros, A.L.B.S.; David J.M., 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. *Quimica Nova* 29 (1), 113-123.

Bautista, A.P., Spitzer, J.J., 1992. Platelet activating factor stimulates and primes the liver, Kupffer cells and neutrophils to release superoxide anion. *Free Radic Res Commun* 17, 195–209.

Beal, M.F., 2002. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med.* 32, 797–803.

Bean, J.W., 1945. Effects of oxygen at increased pressure. *Physiol Rev.* 25:1-4. In: Miquel, J. & Ramírez-Boscá, A., 2004. Estrés oxidativo y suplementación antioxidante de la dieta en el envejecimiento, la aterosclerosis y la disfunción inmunitaria. *Ars. Pharm.* 45(2), 91-109.

Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., Freeman, B.A., 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide, superoxide. *Proceedings of National Academy of Sciences of U.S.A.* 87, 1620–1624.

Beckman, K.B., Ames, B.N., 1998. The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiological reviews* 78 (2), 547-581.

Beltowski J., Wojcicka G., Jamroz A., 2002. Differential effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors on plasma paraoxonase 1 activity in the rat. *Pol. J. Pharmacol.* 54, 661-671.

Bentz, B.G., Chandra, R., Haines, G.K., Robinson, A.M., Shah, P., Radosevich, J.A., 2002. Nitric oxide and apoptosis during human head and neck squamous cell carcinoma development. *Am. J. Otolaryngol.* 23 (1), 4-11.

Berry, E.M., Kohen R., 1999. Is the biological antioxidant system integrated and regulated? *Medical Hypotheses* 53(5), 397–401.

Bert, P., 1943. *Barometric Pressure: Researches in Experimental Physiology*, translated by Hitchcock MA. Hitchcock FA. Columbus: College Book. In: Miquel J. & Ramírez-Boscá A., 2004. Estrés oxidativo y suplementación antioxidante de la dieta en el envejecimiento, la aterosclerosis y la disfunción inmunitaria. *Ars. Pharm.* 45 (2), 91-109.

Bicalho, H.M.S., Gontijo, M.C., Nogueira-Machado, J.A., 1981. A simple technique for simultaneous human leuckocytes separation. *Journal of Immunology* 40, 115-116.

Bona, C.M., 2002. Estaquia, colagem e sombreamento de carqueja. *Dissertação (Mestrado em Agronomia, Produção Vegetal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.*

Bouvier, F., Rahier, A., Camara, B., 2005. Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Prog. Lipid. Res.* 44, 357–429.

- Brandes, R., Kreuzer, J., 2005. Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovascular Research* 65, 16-27.
- Bredt, D.S., Hwang, P.M., Glatt, C.E., Lowenstein, C., Reed, R.R., Snyder, S.H., 1991. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature (London)* 351, 714-718.
- Breinholt, V., Lauridsen, S.T., Dragsted, L.O., 1999. Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolizing and antioxidant enzymes in female rat. *Xenobiotica* 29, 1227– 1240.
- Breitmaier, E., 2006. *Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany.
- Bryant, J.L., Metha, P., Von Der Porten, A., Metha, J.L., 1992. Co- purification of 130 kD nitric oxide synthase and a 22 kD link protein from human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189, 558.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52, 302-310.
- Cadenas, E., 1995. Mechanisms of oxygen activation and reactive oxygen species detoxification. In: SAMI, A. *Oxidative stress and antioxidant defenses in biology*. New York: Capman & Hall.
- Calabro, M. L., Galtieri, V., Cutroneo, P., Tommasini, S., Ficarra, P., Ficarra, R., 2004. Study of the extraction procedure by experimental design and validation of a LC method for determination of flavonoids in Citrus bergamia juice. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35, 349–363.
- Carneiro, M.A.A., Fernandes, G.W., 1996. Herbivoria. *Ciência Hoje, São Paulo* 20, 35-39.
- Castro, H.G., Ferreira, F.A., 2000. *Contribuição ao estudo das plantas medicinais carqueja (Baccharis genistelloides)*. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora Ltda, 102p.
- Chait, A., Han, C., Oram, J., Heinecke, J., 2005. The immune system and atherogenesis. Lipoprotein-associated inflammatory proteins: markers or mediators of cardiovascular disease? *J. Lipid. Res.* 46, 389–403.
- Chaves, M.M., Rocha-Vieira, E., Lima e Silva, R., Nogueira-Machado, J.A., 2000. Increase of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species generated by phagocytosing granulocytes related to age. *Mechanisms of ageing and development* 119, 1-8.
- Chen, L.Y., Metha, J.L., 1996. Variable effects of L- arginine analogs on L-arginine nitric oxide pathway in human neutrophils and platelets may relate to different nitric oxide isoforms. *J. Pharmacol. Exper. Therap.* 276, 253-257.

Coelho, M.G.P., Reis, P.A., Gava, V.B., Marques, P.R., Gayer, C.R., Laranja, G.A.T., Felzenswalb, I. & Sabino, K.C.C., 2004. Anti-arthritic effect and subacute toxicological evaluation of *Baccharis genistelloides* aqueous extract. *Toxicology Letters* 154, 69-80.

Coffey, M.J., Coles, B., O'Donnell, V.B., 2001. Interactions of nitric oxide-derived reactive nitrogen species with peroxidases and lipoxygenases. *Free Radic. Res.* 35 (5), 447-464.

Cook, N.C., Samman, S., 1996. Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *J. Nutr.* 7, 66-71.

Corcoran, G.B., Mitchell, J.R., Vaishnav, Y.N., Horning, E.C., 1980. Evidence that acetaminophen and N-hydroxyacetaminophen form a common arylating intermediate, N-acetyl-p-benzoquinoneimine. *Mol. Pharmacol.* 18, 536-542.

Corrêa, M.P., 1931. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. vol. 2, Ministério da Agricultura.

Correa Júnior, C., Ming, L.C., Scheffer, M.C., 1994. *Cultivo de plantas medicinais, codimentares e aromáticas*. Jaboticabal: FUNEP, 151p.

Cover, C., Liu, J., Farhood, A., Malle, E., Waalkes, M.P., Bajt, M.L., Jaeschke, H., 2006. Pathophysiological role of the acute inflammatory response during acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 216, 98-107.

Darley-Usmar, V., Wiseman, H., Halliwell, B., 1995. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett.* 369, 131-135.

Dela-Loggia R., Tubaro, A., Sosa, S., Becker, H., Saar, S.T., Isaac, O., 1994. The role of triterpenoids in the anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta Med.* 60, 516-520.

Dinerman, J.L., Dawson, T.M., Schell, M.J., Snowman, A., Snyder, S.H., 1994. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4214-4218.

Dragsted, L. O., Pedersen, A., Hermetter, A., Basu, S., Hansen, M., Haren, G. R., 2004. The 6-a-day study: effects of fruit and vegetables on markers of oxidative stress and antioxidative defense in healthy nonsmokers. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 1060-1072.

Durrington, P. N., Mackness, B., Mackness, M.I., 2002. The hunt for nutritional and pharmacological modulators of paraoxonase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 1248-1250.

Eckerson H.W., Wyte C.M., La Du B.N., 1983. The human serum paraoxonase / arylesterase polymorphism. *Am. J. Hum. Genet* 35, 1126-1138.

- Elmastas, M., Gülçin, I., Isildak, Ö., Küfrevioğlu, Ö.I., Ibaoglu, K., Aboul-Einen, H.Y., 2006. Radical scavenging activity and antioxidant capacity of bay leaf extracts. *Journal of the Iranian Chemical Society* 3 (3), 258-266.
- Enio, C.V., 2003. Alimentos funcionais. *Rev Med Minas Gerais*. 13(4), 260-262
- Faurschou, M., Borregaard, N., 2003. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes. Infect.* 5 (14), 1317-1327.
- Ferguson, L.R., 2001. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research* 475, 89-111.
- Forman, H. J., Torres, M., 2001. Redox signaling in macrophages. *Molecular Aspects of Medicine* 22, 189-216.
- Fukuyama, N., Ichimori, K., Su, Z., Ishida, H., Nakazawa, H., 1996. Peroxynitrite formation from activated human leukocytes. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 224, 414-419.
- Gardner, C.R., Heck, D.E., Yang, C.S., Thomas, P.E., Zhang, X.J., DeGeorge, G.L., Laskin, J.D., Laskin, D.L., 1998. Role of nitric oxide in acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat. *Hepatology* 27, 748-754.
- Gardner, C.R., Laskin, J.D., Dambach, D.M., Sacco, M., Durham, S.K., Bruno, M.K., Cohen, S.D., Gordon, M.K., Gerecke, D.R., Zhou, P., Laskin, D.L., 2002. Reduced hepatotoxicity of acetaminophen in mice lacking inducible nitric oxide synthase: potential role of tumor necrosis factor- α , interleukin-10. *Toxicology and Applied Pharmacology* 184, 27-36.
- Gené, R.M., Cartana, C., Rarella, T., Cañigüeral, S., 1996. Anti-inflammatory and analgesic of *Baccharis trimera*: identification of its active constituents. *Planta Medica* 62, 232-235.
- Getz, G.S., Reardon, C.A., 2004. Paraoxonase, a cardioprotective enzyme: continuing issues. *Curr. Opin. Lipidol.* 15, 261-267.
- Grance, S.R.M., Teixeira, M.A., Leite, R.S., Guimarães, E.B., Siqueira, J.M., Filiu, W.F.O., Vasconcelos, S.B.S., Vieira, M.C., 2008. *Baccharis trimera*: Effect on hematological and biochemical parameters and hepatorenal evaluation in pregnant rats. *Ethnopharmacology* 117, 28-33.
- Gülçin, D., Berashvili, A., Gepdiremen., 2005. Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perilla pankinensis* decne. *Journal Ethnopharmacol* 101, 287-293.
- Halliwell, B., Chrigo, S., 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 57, 215-255.

- Halliwell, B., Cross, C.E., 1994. Oxygen-derived Species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ. Health Perspect.* 102(10), 5-12.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1991. *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York: Oxford Univ. Press. 198.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Nova York: Oxford University Press 1, 851p.
- Hampton, M.B., Kettle, A.J., Winterbourn, C.C., 1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. *Blood* 92 (9), 3007-3017.
- Harborne, J.B., Willians, C.A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481-504.
- Harman, D., 1956. Aging, a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298-300.
- Heo, H.J., Lee, C.Y., 2004. Protective effects of quercetin and vitamin C against oxidative stress-induced neurodegeneration. *J. Agric. Food Chem.* 52(25), 7514-7517.
- Higa, S., Hirano, T., Kotani, M., Matsumoto, M., Fujita, A., Suemura, M., Kawase, I., Tanake, T., 2003. Fisetin, a flavonol, inhibits TH2-type cytokine production by activated human basophils. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 111, 1299-1306.
- Hinson, J.A., Pohl, L.R., Monks, T.J., Gillele, J.R., Guengerich, F.P., 1980. 3-Hydroxyacetaminophen. A microsomal metabolites of acetaminophen. Evidence against an epoxide as the reactive metabolite of acetaminophen. *Drug Metab Dispos* 8, 289-94.
- Hjelle, J.J., and Klaassen, C.D., 1984. Glucuronidation and biliary excretion of acetaminophen in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 228, 407-413.
- Hodek, P., Trefil, P., and Stiborová, M., 2002. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem.-Biol. Interact.* 139, 1-21.
- Holme, J.A., Dhalin, D.C., Nelson, S.D., and Dybing, E., 1984. Cytotoxic effects of N-acetyl-p-benzoquinone imine, a common arylating intermediate of paracetamol and N-hydroxyparacetamol. *Biochem. Pharmacol.* 33, 401-406.
- Ito, N., Fukushima, S., Hasegawa, A., Shibata, M. & Ogiso, T., 1983. Carcinogenicity of buthylated hydroxy anisole in F344 rats. *J. The National Cancer Institue.* 27, 1-4.
- Jaeschke, H., Farhood, A., and Smith, C.W., 1990. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J.* 4, 3355- 3359.
- Jaeschke, H., 2005. Role of inflammation in the mechanism of acetaminopheninduced hepatotoxicity. *Expert. Opin. Drug. Metab. Toxicol.* 1, 389-97.

Januário, A.H., Santos, S.L., Marcussi, S., Mazzi, M.V., Pietro, R.C.L.R., Sato, D.N., Ellena, J., Sampaio, S.V., França, S.C. & Soares, A.M., 2004. Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. *Chemico-Biological Interactions* 150, 243-251.

Jollow, D.J., Thorgeirsson, S.S., Potter, W.Z., Hashimoto, M., and Mitchell, J.R., 1974. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. *Pharmacology* 12, 251–271.

Jovanovic, S.V., Steenken, S., Simic, M.G., Hara, Y., 1998. Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reaction of flavonoid radicals. In: Rice Evans, C., Parcker, L. (Eds.), *Flavonoid in Health and Disease*. Marcel Dekker, New York, pp. 137–161.

Kaliora, A.C., Dedoussis, G.V.Z., Schmidt, H., 2005. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis*. 18, 1-17.

Kaminnski, H.J., Andrade, F.H., 2001. Nitric Oxide: biologic effects on muscle and role in muscle diseases. *Neuromuscular disorders* 11, 517-524.

Kinsella, J.E., Frankel, E., German, B., Kanner, J., 1993. Possible mechanism for the protective role of the antioxidant in wine and plant foods. *Food Technology* 47,85-89.

Knowles, R.G., Mocada, S., 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* 298, 249-258.

Kohen, R., Nyska, A., 2002. Oxidation of Biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology* 30 (6), 620–650.

Lai, L.S., Chou, S.T., Chao, W.W., 2001. Studies on the antioxidant activities of Hsiantao (*Mesona procumbens* Hemsl) leaf gum. *J. Agricultural and Food Chemistry* 49, 963-968.

Lamas, S., Madersen, P.A., Lee, W.Y., Clarck, S.L., 1992. Endothelial nitric oxide syntase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6348-6352.

Langenheim, J.H., 1994. Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *J. Chem. Ecol.* 20, 1223–1280.

Lee, S.S.T., Buter, J.T.M., Pineau, T., Fernandez-Salguero, P., Gonzalez, F.J., 1996. Role of CYP2E1 in the hepatotoxicity of acetaminophen. *J. Biol. Chem.* 271, 12063–12067.

Lehninger A. *Princípios da bioquímica*. 3ª ed. São Paulo: Sarvier; 2002.

- Lima, V., 2004. Nota prévia: teor de compostos fenólicos totais em chás brasileiros. *Brazilian Journal of Food Technology* 7(2), 187-190.
- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.R., Shacter, E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 233, 346-357.
- Liu, Z.X., Han, D., Gunawan, B., Kaplowitz, N., 2006. Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology* 43, 1220–30.
- Lorenzi, H, Matos, F.J.A., 2002. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum 512p.
- Lovrien, R., William, K.K., Ferrey, M.K., Ammed, D.A., 1989. *App. Environ. Microbiol.* 53, 2935.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Maher, P., 2006. Comparison of the neurotrophic activities of the flavonoid fisetin and some of its derivatives. *Free Radic. Res.* 40, 1105-1111.
- Mangiaterra, P.A., 2005. *Evaluación de parâmetros botânicos y fitoquímicos para el control de calidad de carqueja*. Bueno Aires, Argentina: Universidade de Belgrano.43 p.
- Martinez-Vazquez, M., Gonzalez-Esquinca, A.R., Cazares Luna, L., Moreno Gutierrez, MN., Garcia-Argaez, A.N., 1999. Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K. *Journal of Ethnopharmacology* 66(7), 9–82.
- Martins, E.R., Castro, D.M., Castellani, D.C., Dias, J.E., 2000. *Plantas medicinais*. Viçosa: UFV. 220p.
- Mayne, S.T., 2003. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J. Nutr.* 133, 933-940.
- McGarvey, D. J., Croteau, R., 1995. Terpenoid Metabolism. *Plant Cell*, 7, 1015–1026.
- McKenzie, S.E, Schreiber, A.D., 1998. Fc gamma receptors in phagocytes. *Curr Opin Hematol* 5(1), 16-21.
- Melo, S.F., Soares, S.F., Da Costa, R.F., Da Silva, C.R., De Oliveira, M.B.N., Bezerra, R.J.A.C., De Araújo, A.C., Bernardo-Filho, M., 2001. Effect of the *Cymbopogon citratus*, *Maytenus ilicifolia* and *Baccharis genistelloides* extracts against the stannous chloride oxidative damage in *Escherichia coli*. *Mutation Research* 496, 33-38.
- Meotti, F.C., Rosa, J.M., Brocardo, P.S., Balz, D., Waltrick, A.P., Bagio, A., Goulart, E.C., 2006. Protective effect of crude extract from *Wedelia paludosa* (Asteraceae) on the hepatotoxicity induced by paracetamol in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 58, 137-142.

- Merken, H.M., Beecher, G.R., 2000. Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 577–599.
- Michael, S.L., Pumford, N.R., Mayeux, P.R., Niesman, M.R., Hinson, J.A., 1999. Pretreatment of mice with macrophage inactivators decreases acetaminophen hepatotoxicity, the formation of reactive oxygen, nitrogen species. *Hepatology* 30, 186–195.
- Minc-Golomb, D., Tsarfaty, I., Schwartz, J.P., 1994. Expression of inducible nitric oxide synthase by neurones following exposure to endotoxin, cytokine. *British Journal of Pharmacology* 112, 720–722.
- Mitchell, J.R., Jollow, D.J., Potter, W.Z., Gillette, J.R., and Brodie, B.B., 1973. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 187, 211–217.
- Motta, V.T., 2003. *Bioquímica clínica para o laboratório: Princípios e interpretações*. Editora Médica Missau, Caxias do Sul, p. 419.
- Mustafa, U., Necmettin T., Hakan, B., Koray, G., Omer, G., Cengiz K., 2001. Nitric Oxide (NO) Metabolism in the cerebrospinal fluid of patients with severe head injury inflammation as a possible cause of elevated no metabolites. *Surg. Neurol.* 56, 350-6.
- Nakane, M., Schimidt, H.H., Pollock, J.S., Förstermann, U. Murad, F., 1993. Cloned human brain nitric oxide syntase is highly expressed in esqueletal muscle. *FEBS Lett.* 316, 175-180.
- Nathan, C., 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology*, London 6, 173-182.
- Nathan, C., Xie, Q., 1994. Nitric oxide syntases: roles, tolls and controls. *Cell* 78, 915-918.
- Ng, C.J., Shih, D.M., Hama, S., 2004. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 153–163.
- Nordberg, J., Arnér, E.S.J., 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine* 31, 1287 – 1312.
- Nussler, A.K., Billiar, T.R., 1993. Inflammation, immunoregulation and inducible nitric oxide synthase. *J. Leukoc. Biol.* 54, 171-178.
- Oda, K., Matsuda, H., Murakami, T., Katayama, S., Ohgitani, T., Yoshikawa, M., 2000. Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. *Biol. Chem.* 381, 67–74.
- Oleszek, W.A., 2002. Chromatographic determination of plant saponins. *J. Chromatogr. A.* 967, 147–162.

- Oliveira, E.J., Gontijo, S.V., Maluf, W.R., 1999. Cultive carqueja em sua horta. Boletim técnico de hortaliças N° 0271 edição. Universidade Federal de Lavras. Departamento de Agricultura. Disponível em <http://www2.ufla.br>. Acesso em 20 de agosto de 2002.
- Oliveira-Lima, A., Dias da Silva, W., 1970. Imunologia, imunopatologia, alergiamétodos, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 236 p.
- Paduch, R., Kandefer-Szerszen, M., Trytek, M., Fiedurek, J., 2007. Terpenes: substances useful in human healthcare. Arch. Immunol. Ther. Exp. 55, 315–327.
- Patrizia P., Giuseppina, A., Stefania, M., Marisa, M., Rokia, S., Rita, P.A., 2005. Anti-inflammatory activity of Verminoside from *Kigelia africana* and evaluation of cutaneous irritation in cell cultures and reconstituted human epidermis. J. Nat. Prod. 68, 1610–1614.
- Patočka, J., 2003. Journal of Applied Biomedicine 1, 7-12.
- Paul, E.L., Lunardelli, A., Caberlon, E., Oliveira, C.B., Santos, R.C.V., Biolchi, V., Bastos, C.M.A., Moreira, K.B., Nunes, F.B., Grace, G., J.R. de Oliveira, 2009. Anti-inflammatory and Immunomodulatory Effects of *Baccharis trimera* Aqueous Extract on Induced Pleurisy in Rats and Lymphoproliferation In Vitro. Inflammation 32 (6), 429-425.
- Perry, G., Raina, A.K., Nunomura, A., Wataya, T., Sayre, L.M., Smith, M.A., 2000. How important is oxidative damage? Lessons from Alzheimer's disease. Free Radic. Biol. Med. 28, 831–834.
- Poolman TM, Ng LL, Farmer PB, et al., 2005. Inhibition of the respiratory burst by resveratrol in human monocytes: correlation with inhibition of PI3K signaling. Free Radic Biol Med 39, 118–132.
- Prescott, L.F., 1980. Kinetics and metabolism of paracetamol and phenacetin. Br. J. Clin. Pharmacol., 10, 291S–298S.
- Price, K.R., Johnson, I.T., Fenwick, G.R., 1987. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedstuffs. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 26, 27–135.
- Pryor, W.A. The antioxidant nutrient and disease prevention: What do we know and what do we need to find out? Amer J Clin Nutri 53, 391-393.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., Freeman, B.A., 1991a. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide, nitric oxide. Journal of Biological Chemistry 266, 4244–4250.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., Freeman, B.A., 1991b. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide, nitric oxide. Archives of Biochemistry and Biophysics 288, 481–487.

- Radomski, M.W., Palmer, R.M., Moncada, S., 1990. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proceedings of National Academy of Sciences of U.S.A.* 87, 10043–10047.
- Radomski, M.W., Salas, E., 1995. Nitric Oxide Biological mediator, modulator and factor of injury: its role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 118, 69–80.
- Rodrigues, C.R.F., Dias, J.H., Mello, R.N., Richter, M.F., Picada, J.N., Ferraz, A.B.F., 2009. Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 125 (1), 97–101.
- Rodrigues, H.G., Diniz, Y.S., Faine, L.A., Almeida, J.A., Fernandes, A.A.H., Novelli, E.L.B., 2003. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol HDL. *Rev. Nutr.* 16(3), 315–320.
- Schini, V.B., Busse, R., Vanhoutte, P.M., 1994. Inducible nitric oxide synthase in vascular smooth muscle. *Arzneimittelforschung* 44, 432–435.
- Seeram, N.P., Heber, D., 2006. Impact of berry phytochemicals on human health: Effects beyond antioxidation. In *Lipid Oxidation and Antioxidants: chemistry, Methodologies and Health Effects*; ACS Symposium Series 956; Ho, C T., Shahidi, F S. Eds. Oxford University Press: New York, 2006; Chapter 21.
- Sessa, W.C., Harrison, J.K., Barber, C.M., Zeng, D., Duriex, M.E., D'Angelo, D.D., Lynch, K.R., Peach, M.T., 1992. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 267, 15274–15276.
- Sidhartha, D.R., Nirav Patel, N.S., Akila Nagori, A.N., Sidney, J.S., 2006. Pre-exposure to a novel nutritional mixture containing a series of phytochemicals prevents acetaminophen-induced programmed and unprogrammed cell deaths by enhancing BCL-XL expression and minimizing oxidative stress in the liver. *Mol Cell Biochem* 11.
- Sies, H., 1985. Oxidative stress: introductory remarks. *Oxidative Stress*. New York: Academic. 1–8. In: Stocker R., Keaney J. F., 2004. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Rev Physiol.* 84, 1381–1478.
- Sies, H., 1993. Strategies of antioxidant defense. *Review. Eur. J. Biochem.* 215(2), 213–219.
- Slattery, J.T., and Levy, G., 1979. Acetaminophen kinetics in acutely poisoned patients. *Clin. Pharmacol. Ther.* 25, 184–195.
- Smith, G.S., Nadig, D.E., Kokoska, E.R., Solomon, H., Tiniakos, D.G., Miller, T.A., 1998. Role of neutrophils in hepatotoxicity induced by oral acetaminophen administration in rats. *J. Surg. Res.* 80, 252–258.

- Soicke, H, Leng-Peschlow, E., 1987. Characterization of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. *Planta Medica* 53, 37-39.
- Sparg, S.G., Light, M.E., van Staden, J., 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethnopharmacol.* 94, 219–243.
- Stadtman, E. R., 2003. Role of Oxidant Species in Aging. *Current Medicinal Chemistry.* 11, 1105-1112.
- Stoclet, J.C., Muller, B., Andriantsitohaina, R., Kleschyov, A., 1998. Overproduction of nitric oxide in pathophysiology of blood vessels. *Biochemistry (Mosc)* 63, 826–832.
- Tauber, A.I., Fay, J.R., Marletta M.A., 1984. Flavonoid inhibition of the human neutrophil NADPH-oxidase. *Biochem Pharmacol* 33, 1367–1369.
- Tepperman, B.L., Brown, J.F., Whittle, B.J., 1993. Nitric oxide synthase induction, intestinal epithelial cell viability in rats. *American Journal of Physiology* 265, G214–G218.
- Tholl, D., 2006. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolis. *Curr. Opin Plant Biol.* 9, 297–304.
- Thommasen, H.V., 1985. The role of the polymorphonuclear leukocyte in the pathogenesis of the adult respiratory distress syndrome. *Clinical and Investigative Medicine* 8, 185-194.
- Tian, F.; McLaughlin, J.L., 2000. Bioactive flavonoids from the black locust tree, *Robinia pseudoacacia*. *Pharm Biol.* 38: 229–234.
- Tseng, T.H., Kao, E.S., Chu, C.Y., Chou, F.P., Lin Wu, H.W., Wang, C.J., 1997. Protective effects of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. *Food Chem Toxicol* 35, 1159–64.
- Turrens, J. F. e Boveris, A., 1980. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *J. Biochem.* 191, 421-427.
- Turrens, J. F., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552, 335-344.
- Verdi, L.G., Brighent, I.M.C., Pizzolatti, M.G., 2005. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Química Nova* 28(1), 85-94.
- Vermeulen, N.P.E., Bessems, J.G.M., Vandestraat, R., 1992. Molecular aspects of paracetamol-induced hepatotoxicity and its mechanism-based prevention. *Drug. Metab. Rev.* 24, 367–407.

- Vichnewski, W., Análises fitoquímicas de extratos alcoólicos de Asteraceae, *Baccharis trimera*, *Calea teucrifolia*, *Eremanthus eleagnus* e *Vernonia fruticulosa*, 1990. Encontro regional de química. Resumos São Carlos, 1890.
- Villa, R.D., Nogueira, R.F.P., 2005. O uso de reações de fenton na remediação de solo contaminado com p, p' DDT. *Eclética Química* 30 (2), 69-75.
- Wagner, K.H., Elmadfa, I., 2003. Biological relevance of terpenoids. Overview focusing on mono-, di- and tetraterpenes. *Ann. Nutr. Metab.* 47, 95 –106.
- Weber, R.L.M., Termignoni, R.R., Porto, M.L., 2005. Comportamento in vitro de *Baccharis trimera* (carqueja) em diferentes níveis de sobrecarga por cobre. XIII São iniciação científica. Ciências Biológicas. Universidade Federal de Rio Grande do Sul, p. 297. Disponível em <http://seberi.propesq.ufrgs.br>. Acesso em 20 de janeiro de 2005.
- Wei, Y.H., Lee, H.C., 2002. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Soc. Exp. Biol. Med.* 227, 671-682.
- Xie, Q.W., Cho, H.J., Calaycay, J., Munford, R.A., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Ding, A., Troso, T., Nathan, C., 1992. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*, 256, 225-228.
- Yanagisawa, T., Maemura, S., Sasaki, H., Endo, T., Okada, M., East, P.W., Virgo, D.M., Creasy, D.M., 1998. Subacute and chronic toxicity studies of tryethylenetetramine dihydrochloride (TJA-250) by oral administration to F-344 rats. *J Toxicol Sci* 42, 619.
- Yen, F.L., Wua, T.H., Lin, L.T., Cham, T.M., Lin, C.C., 2008. Nanoparticles formulation of *Cuscuta chinensis* prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology* 46, 1771–1777.
- Youdim, K.A., Joseph, J.A., 2001. A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: a multiplicity of effects. *Free Radic. Biol. Med.* 30(6), 583–594.
- Zhang, J.X., Jones, D.V., Clemens, M.G., 1994. Effect of activation on neutrophil-induced hepatic microvascular injury in isolated rat liver. *Shock* 1, 273–278.
- Zhao, H.L., Sim, J.S., Shim, S.H., Ha, Y.W., Kang, S.S., & Kim, Y. S., 2005. Antiobese and hypolipidemic effects of platycodin saponins in diet-induced obese rats: Evidences for lipase inhibition and calorie intake restriction. *International Journal of Obesity* 29, 983–990.
- Zheng, W., Wang, S.Y., 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agricultural and Food* 49, 5165-5170.

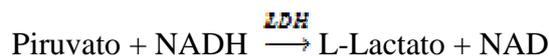
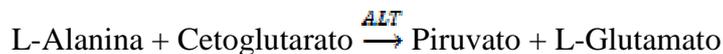
9 - ANEXOS

Anexo I – Protocolos das Dosagens Bioquímicas

1.1 - Alanina Aminotransferase

Princípio

A ALT catalisa a transferência de grupos amina da alanina para o cetoglutarato, com formação de glutamato e piruvato. Este é reduzido a lactato por ação da lactato desidrogenase (LDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD. A conseqüente redução da absorbância em 340 ou 365 nm, monitorizada espectrofotometricamente, é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra.



Amostra

Recomenda-se jejum mínimo de 8 horas. Usar soro ou plasma (EDTA, heparina). A atividade enzimática é estável por 4 dias entre 2 – 8 °C e por 2 semanas a 10 °C negativos.

Produto Utilizado

ALT/GPT Liquiform, Catálogo 74-4/30 - ANVISA - 10009010029

Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Reagente 1: Armazenar entre 2 – 8°C.

Reagente 2: Armazenar entre 2 – 8°C.

Reagente de Trabalho: O conjunto de um frasco de Reagente 1 e de um frasco de Reagente 2 permite preparar o Reagente de Trabalho. Estável por 5 dias entre 15 - 25 °C e 14 dias entre 2 – 8°C. Contém tampão 80 mmol/L, pH 7,8, L-Alanina 500 mmol/L, 2-cetoglutarato 15 mmo/L, NADH 180

Equipamentos

1. Fotômetro com cubeta termostaticada a 37 °C capaz de medir a absorvância em 340 ou 365 nm com exatidão.
2. Pipetas para medir amostras e reagentes.
3. Cronômetro.

Procedimento

Condições de Reação: comprimento de onda de 340 ou 365 nm; cubeta termostaticada a 37°C com 10 mm de espessura de solução; banda de passagem de 8 nm ou menos e luz espúria menor que 0,1%.

1. Adicionar 0,1 mL de amostra a 1,0 mL do Reagente de Trabalho.
2. Homogeneizar.
3. Transferir para a cubeta termostaticada a 37 °C.
4. Esperar 1 minuto.
5. Fazer a leitura inicial, disparando simultaneamente o cronômetro.
6. Repetir as leituras após 1, 2 e 3 minutos.

Cálculos

Calcular a média das diferenças de absorvância por minuto ($\Delta A/\text{minuto}$) e utilizar para calcular o resultado.

$$\text{ALT/GPT (U/L) 340 nm} = \Delta A/\text{minuto} \times 1746$$

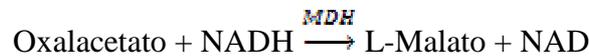
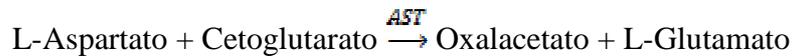
Conversão: Unidades Convencionais (U/L) x 16,7 = Unidades SI (nkat/L).

1.2 - Aspartato Aminotransferase

Princípio

A AST catalisa a transferência de grupos amina da alanina para o cetogluturato, com formação de glutamato e oxalacetato. Este é reduzido a malato por ação da malato desidrogenase (MDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD. A conseqüente redução da absorvância em 340 ou 365 nm, monitorizada

espectrofotometricamente, é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra.



Amostra

Recomenda-se jejum mínimo de 8 horas. Usar soro ou plasma (EDTA, heparina). A atividade enzimática é estável por 4 dias entre 2 – 8°C e por 2 semanas a 10°C negativos.

Produto Utilizado

AST/GOT Liquiform, Catálogo 75-4/30 - ANVISA - 10009010018

Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Reagente 1: Armazenar entre 2 – 8°C.

Reagente 2: Armazenar entre 2 – 8°C.

Reagente de Trabalho: o conjunto de um frasco de Reagente 1 e de um frasco de Reagente 2 permite preparar o Reagente de Trabalho. Estável por 5 dias entre 15 – 25°C e por 14 dias entre 2 – 8°C; Contém tampão 80 mmol/L, pH 7,8, L-Aspartato 240 mmol/L, 2-cetoglutarato 12 mmol/L, NADH 180 µmol/l, LDH ≥900 U/L, MDH ≥600 U/L e azida sódica 14,6 mmol/L.

Equipamentos

1. Fotômetro com cubeta termostatizada a 37 °C capaz de medir a absorbância em 340 ou 365 nm com exatidão.
2. Pipetas para medir amostras e reagentes.
3. Cronômetro.

Procedimento

Condições de Reação: comprimento de onda de 340 ou 365 nm; cubeta termostaticada a 37°C com 10 mm de espessura de solução; banda de passagem de 8 nm ou menos e luz espúria menor que 0,1%.

1. Adicionar 0,1 mL de amostra a 1,0 mL do reagente de trabalho.
2. Homogeneizar.
3. Transferir para a cubeta termostaticada a 37 °C.
4. Esperar 1 minuto.
5. Fazer a leitura inicial, disparando simultaneamente o cronômetro.
6. Repetir as leituras após 1, 2 e 3 minutos.

Cálculos

Calcular a média das diferenças de absorbância por minuto ($\Delta A/\text{minuto}$) e utilizar para calcular o resultado.

$$\text{AST/GOT (U/L) } 340 \text{ nm} = \Delta A/\text{minuto} \times 1746$$

Conversão: Unidades Convencionais (U/L) x 16,7 = Unidades SI (nkat/L).

1.3 – Dosagem de creatinina

Princípio

A creatinina e outros componentes do soro, reagem com a solução de picrato em meio alcalino, formando um complexo de cor vermelha que é medido fotometricamente. A adição de um acidificante abaixa o pH para 5,0; promovendo a decomposição do picrato de creatinina, porém, a cor derivada dos cromogênios permanecendo inalterada, sendo também medida fotometricamente. A diferença entre as duas leituras fornece o valor da creatinina verdadeira.

Procedimento

Usa-se 62,5µL de soro, 500µL de tampão e 125µL de ácido pícrico para cada teste, para fazer o padrão usa-se 500µL de tampão, 62,5µL de amostra e 125µL de ácido

pícrico e o branco, que é usado para zerar o aparelho, é feito com 500 μ L de tampão 62,5 μ L de água destilada e 125 μ L de ácido pícrico. Os testes, o padrão e o branco foram misturados e colocados em banho-maria a 37°C por 10 minutos. Em seguida o espectrofotômetro foi zerado utilizando o branco. As leituras foram realizadas a 510nm. Estas absorvâncias dos testes correspondem a A_1 . Após as leituras das absorvâncias A_1 o branco e os testes receberam 25 μ L de acidificante, sendo, em seguida, misturados e deixados a temperatura ambiente por 5 minutos. O aparelho é zerado novamente e as leituras são feitas em 510nm. Estas absorvâncias dos testes correspondem a A_2 . Para se determinar a concentração de creatinina do teste, é feita uma subtração das absorvâncias A_1 e A_2 , ($A_1 - A_2$) o resultado é dividido pela absorvância do padrão e multiplicada pela concentração do mesmo. Os valores obtidos em unidades convencionais (mg/dL) foram multiplicados por 88,4 para serem convertidos em unidades internacionais (μ mol/L).

Anexo II – Trabalho submetido à publicação

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Ethnopharmacology

Manuscript Draft

Title: Antioxidant properties of Baccharis trimera in neutrophils of Fisher rats.

Article Type: Full Length Article

Corresponding Author: Mrs Daniela Caldeira Costa, Ph.D

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Ouro Preto

First Author: Bruno C Pádua

Order of Authors: Bruno C Pádua; Lucas D Silva; Joamyr V Júnior; Jorge L Humberto, PhD; Miriam M Chaves, PhD; Marcelo E Silva, PhD; Maria Lúcia Pedrosa, PhD; Daniela Caldeira Costa, Ph.D

Anexo III – Resumos publicados em anais de congressos

- Pádua, B ; Silva, LD ; Teixeira, MOS ; Silva, M.E. ; Humberto, J.; Chaves, M.M; Pedrosa, M.L.; Costa, D.C. Effect of *Baccharis trimera* on the Production of Reactive Oxygen Species in Neutrophils of Fisher Rats Stimulated with Particles of Zimosan. In: XXXVIII Reunião Anual da SBBq, 2009, Águas de Lindóia. Sociedade brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2009.
- Silva, L.D.; Teixeira, M.O.S.; Pádua, B.C.; Silva, M.E.; Humberto, J; Chaves, M.M.; Pedrosa, M.L.; Costa, D.C. Avaliação do efeito da carqueja (*Baccharis trimera*) sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em granulócitos de ratos estimulados com partículas de zimosan. In: III Congresso de Ciências Farmacêuticas- Concifop, 2009, Ouro Preto. III Congresso de Ciências Farmacêuticas, 2009.
- Pádua, B ; Silva, LD ; Teixeira, MOS ; Silva, M.E. ; Humberto, J.; Chaves, M.M; Pedrosa, M.L.; Costa, D.C. Extrato de carqueja (*Baccharis trimera*) reduz, em um modelo de inflamação induzido por paracetamol, a produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos. 10º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição – SBAN, 2009, São Paulo.
- Pádua, B ; Silva, LD ; Teixeira, MOS ; Silva, M.E. ; Humberto, J.; Chaves, M.M.;Costa, D.C.; Pedrosa, M.L. Antioxidant Effect of *Baccharis trimera* Hydroalcoholic Extract: an *in Vivo* Essay. In: XXXIX Reunião Anual da SBBq, 2010, Foz do Iguaçu. Sociedade brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2010.
- Silva, L.D.; Pádua, B.C.; Teixeira, M.O.S.; Silva, M.E.; Humberto, J.; Chaves, M.M; Costa, D.C.; Pedrosa, M.L. Effect of *Baccharis trimera* (Carqueja) on the Production of Nitric Oxide in Fischer Rats. In: XXXIX Reunião Anual da SBBq, 2010, Foz do Iguaçu. Sociedade brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2010.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)