

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

***Croton cajucara* Benth (SACACA) UMA PLANTA DA  
AMAZÔNIA - AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL  
ANTIOXIDANTE**

*Maurício Tieppo*

Porto Alegre – RS, 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

***Croton cajucara* Benth (SACACA) UMA PLANTA DA  
AMAZÔNIA - AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL  
ANTIOXIDANTE**

*Maurício Tieppo*

**Orientador:** Prof. Dr. Edison Capp

*Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Curso de Pós-Graduação em Medicina:  
Ciências Médicas da Universidade Federal  
do Rio Grande do Sul.*

Porto Alegre – RS, 2007

*A **Juliana**, minha “hermana”, minha melhor amiga, minha companheira sem faltas, pelo carinho, pelas nossas conversas, pelos momentos de estudo ou não, pelo incentivo e pela coragem, pela sua alegria, por ser a melhor irmã do mundo.*

*A **Dra. Norma Marroni**, pela presença em tantas etapas da minha vida.*

## **Agradecimentos**

- Aos meus pais, **Maucir** e **Norma**, pela compreensão e estímulo constantes, pela educação, por todos os abraços e palavras sábias, pelos momentos juntos, por estarem ao meu lado com toda a sua força e sabedoria.
- Em especial, a **Dra. Norma Possa Marroni**, pela orientação impecável, pelo incentivo constante de muito tempo, pela coragem, pelo apoio, pelo exemplo em todos os sentidos, muito obrigado.
- Ao **Dr. Edison Capp**, pela orientação, pelo apoio para a conclusão desta etapa, pelos esclarecimentos e pelas sugestões pertinentes e enriquecedoras.
- À **Dra. Themis Reverbel da Silveira**, por acreditar e por valorar nosso trabalho, pelo interesse, pelo enriquecimento e pelo apoio constante ao nosso grupo.
- Ao **grupo de pesquisa da Universidad de León**, em especial, **Dr. Javier González-Gallego**, pela atenção, disponibilidade e por acreditarem no meu trabalho.
- Aos **meus amigos e colegas do Laboratório de Hepatologia Experimental – Fisiologia** do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela amizade e pela ajuda imparcial.
- A todos do **Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas**, obrigada pela atenção, pela colaboração e pela oportunidade de participar deste programa de Pós-Graduação.

"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar; é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver ..."

***Martin Luther King***

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>AAA</b>	Ácido acetil aleuritólico
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferase
<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CcB</b>	<i>Croton cajucara</i> Benth
<b>Co</b>	Controle
<b>cps</b>	Contagem por segundo
<b>CTN</b>	<i>trans</i> -crotonina
<b>DCTN</b>	<i>trans</i> -dehidrocrotonina
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>DPPH<sup>•</sup></b>	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
<b>EAO</b>	Espécies Ativas do Oxigênio
<b>ERO</b>	Espécies Reativas do Oxigênio
<b>FA</b>	Fosfatase Alcalina
<b>GPx</b>	Glutaciona Peroxidase
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de Hidrogênio
<b>L</b>	Litro

<b>LDL</b>	Lipoproteína de baixa densidade
<b>LPO</b>	Lipoperoxidação
<b>mg</b>	Miligrama
<b>mL</b>	Mililitro
<b>NADPH</b>	Dinucleotídeo Fosfato de Nicotinamida Adenina
<b>nmol</b>	Nanomoles
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Ânion superóxido
<b>OH<sup>•</sup></b>	Radical hidroxila
<b>PIH</b>	Provas de integridade hepática
<b>PQ</b>	Paraquat
<b>QL</b>	Quimiluminescência
<b>SOD</b>	Superóxido Dismutase
<b>TBA-RS</b>	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
<b>t-BOOH</b>	Hidroperóxido de <i>tert-butila</i>
<b>TCA</b>	Ácido Tricloroacético
<b>U</b>	Unidade
<b>VLDL</b>	Lipoproteína de muito baixa densidade

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b>	Estrutura química, solubilidade e geração de EAO pelo paraquat	38
-----------------	--	----



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Vista geral da planta <i>Croton cajucara</i> Benth em seu ambiente natural	19
<b>Figura 2.</b> Vista geral das folhas de <i>Croton cajucara</i> Benth	20
<b>Figura 3.</b> Cascas do caule do <i>Croton cajucara</i> Benth	21
<b>Figura 4.</b> Componentes da raiz, casca e folhas do <i>Croton cajucara</i> Benth	22
<b>Figura 5.</b> Substâncias isoladas da folha do <i>Croton cajucara</i> Benth	23
<b>Figura 6.</b> Estrutura microscópica do fígado	27
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática da reação da LPO	34
<b>Figura 8.</b> Estrutura dos principais homólogos dos tocoferóis	41
<b>Figura 9.</b> Fases de crescimento de uma levedura selvagem quando iniciada em meio completo	44

## RESUMO

O *Croton cajucara* BENTH (SACACA) é uma planta da região Amazônica utilizada no tratamento de várias doenças. Objetivamos verificar sua ação antioxidante por testes *in vitro* e *in vivo*. Como teste químico foi utilizado 1,1-difenil 2-picrilhidrazil (DPPH\*), nos testes biológicos *in vitro* foram utilizadas células eucarióticas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* e *in vivo* foram utilizados ratos machos Wistar divididos em quatro grupos: I-Controle (n=5); II-Controle+SACACA (n=10) (extrato de folhas 1g/20mL H<sub>2</sub>O fervida-15min na dose de 1,5mL i.g.); III-PQ (n=8) (50mg/kg i.p.); IV-SACACA+PQ (n=10). O estresse oxidativo foi induzido por PQ aplicado no quinto dia do uso de sacaca. Após 24 horas os animais foram mortos e realizadas provas de integridade hepática (PIH), avaliação da lipoperoxidação - LPO (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS nmol/mgprot. e quimiluminescência - QL cps/mgprot.) e quantificação da enzima superóxido dismutase - SOD U/mg de prot.. A análise estatística ANOVA foi seguido de Newman-Keuls - p<0,05. Nos testes químicos o valor de DPPH\* para o grupo sacaca foi 9,39%±1,20 comparado com a vitamina E 12,59%±0,54. *In vitro* o percentual de sobrevivência das células com sacaca foi 100% em quanto no grupo PQ (10mM) foi 51,53%±0,00. Quando tratadas previamente com sacaca+PQ a sobrevivência foi 81,24%±0,50 na concentração de 0,001% e 62,42%±0,51 a 0,01%. No modelo *in vivo* na LPO por TBARS observou-se que o grupo IV difere dos grupos I, III [(I) 0,416±0,09; (II) 0,209±0,016; (III) 1,56±0,08; (IV) 0,236±0,029\*] e por QL denotou-se diferença do grupo III em relação aos grupos I e II [(I) 3657,57±395,0; (II) 3467,42±227,85; (III) 6336,40±208,9\*\*; (IV) 4727,0±254,0]. A atividade da enzima SOD apresenta diferença do grupo III em relação aos demais [(I) 5,04±0,62; (II) 1,765±0,147; (III) 13,05± 1,04\*\*\*; (IV) 5,203±0,443]. Nas PIH não houve diferença entre os grupos. Os dados obtidos sugerem que o extrato da Sacaca apresenta efeito antioxidante nos diferentes testes estudados.

## SUMÁRIO

<b>Lista de Abreviaturas</b>	6
<b>Lista de Tabelas</b>	8
<b>Lista de Figuras</b>	9
<b>RESUMO</b>	10
<b>INTRODUÇÃO</b>	12
<b>1 REVISÃO DE LITERATURA</b>	15
<b>1.1 <i>Croton cajucara</i> Benth</b>	15
<b>1.2 O Fígado</b>	24
<i>1.2.1 O ácino hepático</i>	26
<b>1.3 Espécies Ativas de Oxigênio</b>	28
<b>1.4 Paraquat</b>	37
<b>1.5 Vitamina E</b>	40
<b>1.6 Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como Modelo de Estudo</b>	42
<b>1.7 Avaliação da capacidade de varredura do radical DPPH*</b>	45
<b>2 OBJETIVOS DO ESTUDO</b>	46
<b>3 REFERÊNCIAS BIBLOGRÁFICAS</b>	48
<b>4 ARTIGO CIENTÍFICO</b>	52
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	58
<b>ANEXOS</b>	60

## INTRODUÇÃO

A espécie *Croton cajucara* Benth da família (Euphorbiaceae) é encontrada freqüentemente na região Norte do Brasil. Na Amazônia, é popularmente conhecida como Sacaca e significa “feitiço” na língua Tupi, e representar um recurso medicinal de grande importância no tratamento de várias doenças (1).

A folha e a casca do caule dessa planta são utilizadas de forma empírica pela população na forma de chá, para o tratamento da diabetes, diarreia, malárias, febre, distúrbios gastrintestinais, renais, hepáticos e no controle de níveis elevados de colesterol(1).

O uso freqüente dessa planta pela população do Norte do país foi um importante incentivo para os estudos da Sacaca. Este trabalho visou à comprovação dos efeitos da espécie relacionados ao seu uso prolongado e essa situação relacionada aos casos de hepatite tóxica ocorridos em Belém (2).

Estudos mostram que várias doenças têm sido freqüentemente associadas com danos oxidativos, pela formação de espécies ativas do oxigênio (EAO) e outros

radicais livres que podem ser produzidos por fontes exógenas ou endógenas. Uma forma adequada de amenizar essa situação é o uso de substâncias antioxidantes(3).

As fontes exógenas de geração de EAO incluem radiação, fumo, estresse, alguns medicamentos e outras substâncias como xenobióticos, compostos azo aromáticos e biperidil (4).

Nas membranas mitocondriais, encontram-se as proteínas transportadoras de elétrons, principalmente os citocromos, que reduzem uma molécula de oxigênio à água durante o processo da respiração celular. A redução requer quatro sucessivas transferências de elétrons e essa teoria foi denominada de redução univalente. Dois desses intermediários são chamados de radicais livres. São eles: o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e o radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) (3, 5).

Para proteger o organismo dessas EAO e do estresse oxidativo, têm-se os antioxidantes endógenos como a catalase, glutathione peroxidase, superóxido dismutase e antioxidantes exógenos como vitamina A, vitamina E e a vitamina C também chamado de ácido ascórbico. Vários autores descrevem ainda que os fitoterápicos, entre eles os bioflavonóides, teriam também ação antioxidativa. Alguns flavonóides, como a rutina e a quercetina, já estão sendo estudados e apresentaram bons resultados como antioxidantes (6-8).

O CcB é apenas uma de muitas outras plantas que são indicadas em tratamentos de disfunções hepáticas, controle de hiperglicemia e hiperlipidemia , utilizadas pela população sem que haja dados precisos quanto às interações e à posologia para

sua utilização. Mesmo sendo recomendada para tratamento de alterações hepáticas, não estão claros seus prováveis efeitos positivos ou negativos sobre a função hepática, assim como sua ação anti ou pró-oxidante e sua atividade mutagênica (9).

A natureza nos oferece inúmeras fontes de produtos naturais, representados pela flora e fauna, que apresentam extraordinário reservatório de substâncias com potencial terapêutico. O CcB, que é uma planta utilizada pela população no tratamento de diversas enfermidades de modo empírico, logo, torna-se passível de investigações importantes como a verificação das possíveis propriedades antioxidantes dessa planta.

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

“Observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos” (2).

### 1.1 *Croton cajucara* Benth

O uso de plantas medicinais no mundo é comum o consumo de fitoterápicos, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos. De maneira indireta, essa modalidade de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial (2).

O gênero *Croton*, pela classificação taxonômica, pertence à ordem Euphorbiales da subfamília Crotonoideae que é um dos gêneros mais numerosos da família Euphorbiaceae, possuindo representantes tanto medicinais, quanto tóxicos (10, 11).

No Brasil, há mais de 300 das 700 espécies desse gênero, muitas das quais, têm suas propriedades químicas e/ou farmacológicas já conhecidas (2).

O *Croton cajucara* Benth distribui-se nas regiões Leste e Central da floresta Amazônica, principalmente no Pará, junto ao estuário do Rio Amazonas, assim como também no estado do Amapá. Já no próprio estado do Amazonas, só é encontrado em plantações cultivadas(2).

O CcB, de nome popular Sacaca, é uma planta arbustiva de casca pulverulenta, folhas alternas, lanceoladas, olentes, bastante comum na Amazônia. As Euphorbiaceas têm importância na medicina como fonte de toxinas e medicamentos. Resinas e diterpenos do Croton são usados em estudos experimentais de iniciação de tumores e podem ser úteis na terapia do câncer. Devido à diversidade bioquímica da família, parece provável que usos medicinais adicionais possam ser descobertos, uma vez que muitas pessoas na América, Ásia e África utilizam essas plantas para diversos males. Algumas espécies de Croton são usadas como cicatrizante e antiinflamatório; para doenças do aparelho digestivo, como antiviral, como antimicrobiano e antitumoral (12, 13).

No estado do Pará, as folhas e as cascas do caule dessa planta são utilizados em forma de chá ou pílulas no combate a diabetes, diarreia, malária, febre, distúrbios gastrintestinais, renais, hepáticos e no controle de níveis elevados de colesterol. (2, 9, 14).



A Sacaca também é comercializada em farmácias de manipulação e neste caso o pó das cascas do caule é vendido em cápsulas (concentração aproximada de 250 mg). Já as folhas são comercializadas livremente, para distúrbios do fígado e auxílio na digestão de alimentos gordurosos. O pó das folhas é vendido também em farmácias de manipulação, com indicação hepatoprotetora e para dietas de emagrecimento em alguns casos o pó é misturado com pó do boldo do Chile (2, 15, 16).

Os primeiros estudos fitoquímicos com as cascas do caule do CcB foram desenvolvidos pelo grupo de pesquisa da Universidade Federal do Pará. Desde então, essa espécie, bem como outras do gênero, vêm sendo investigadas (17).

Apesar de, o CcB possuir uma grande representatividade na medicina tradicional da região Amazônica, até o final da década de 80, apenas uma avaliação farmacológica havia sido efetuada com essa espécie (2, 18).

A Sacaca é considerada uma planta de crescimento secundário, aparece em clareiras recentes e terras abandonadas. Apesar de ser encontrada nas várzeas alagadas, parece preferir as várzeas altas, mais protegidas de alagamentos constantes. É uma árvore resistente a pragas e que não necessita de solos ricos, adaptando-se bem até aos solos de argila amarela, de fertilidade muito baixa, perto de Manaus (2, 16).

É uma árvore de seis a dez metros de altura, de copa estreita (figura1) e casca aromática e pulverulenta. As folhas são simples, subcoriáceas, lisas na superfície superior, de sete a dezesseis centímetros de comprimento (figura 2) (19).

Sua inflorescência, em racemos terminais com nove centímetros de comprimento, apresenta-se com sete flores femininas na base e doze masculinas na porção mediana terminal, de cor amarelada. Já os frutos são cápsulas globosas de um pouco menos de um centímetro de comprimento, com uma semente preta em cada carpelo. A planta multiplica-se apenas por sementes (19).

A colheita da sacaca consiste na extração das folhas da árvore, normalmente realizada a cada três meses, já que a planta é sensível demais ao sol forte para permitir um período maior de desfolhagem. Fazendeiros locais preferem colher as folhas velhas e mesmo amareladas por acreditarem que possuem melhores propriedades medicinais (informação não confirmada cientificamente). Uma planta de quatro anos produz dez quilos de folhas por ano (19).



**Figura 1.** Vista geral da planta *Croton cajucara* Benth em seu ambiente natural (20).



**Figura 2.** Vista geral da folha *Croton cajucara* Benth em seu ambiente natura (19).



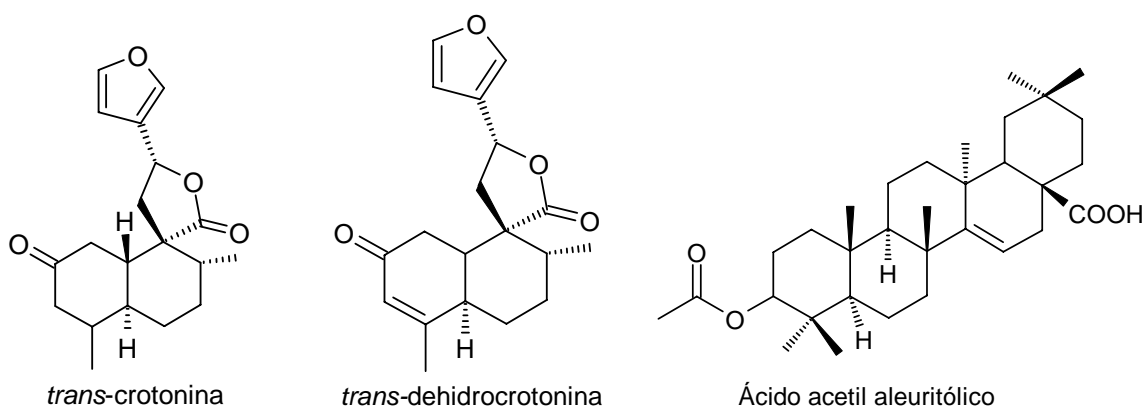
**Figura 3.** Cascas do caule do *Croton cajucara* Benth (20).

Em alguns países de clima tropical como o Brasil, a abundância de plantas medicinais oferece acesso a diversos produtos utilizados, através da automedicação, na prevenção e tratamento de doenças. Além disso, a utilização de plantas como meio curativo, é uma atividade altamente difundida e popular, às vezes, empregadas de maneira equivocada e até mesmo malévola, afinal muitas plantas possuem princípios tóxicos e o seu uso indiscriminado pode causar sérios problemas (19).

Inúmeros casos de hepatite tóxica foram notificados em hospitais públicos da região Amazônica devido ao uso prolongado dessa planta (2). A disseminação de uso tem chegado a lugares distantes do país, como em nosso estado, na cidade de Caxias do Sul/Rio Grande do Sul, onde também houve relatos de casos de hepatite fulminante pelo uso da planta.

Os extratos de plantas, praticamente todas as que contêm bioflavonóides, apresentam uma significativa ação antioxidante, capaz de diminuir os efeitos nocivos gerados por radicais livres e, conseqüentemente, o surgimento das patologias associadas a eles (15).

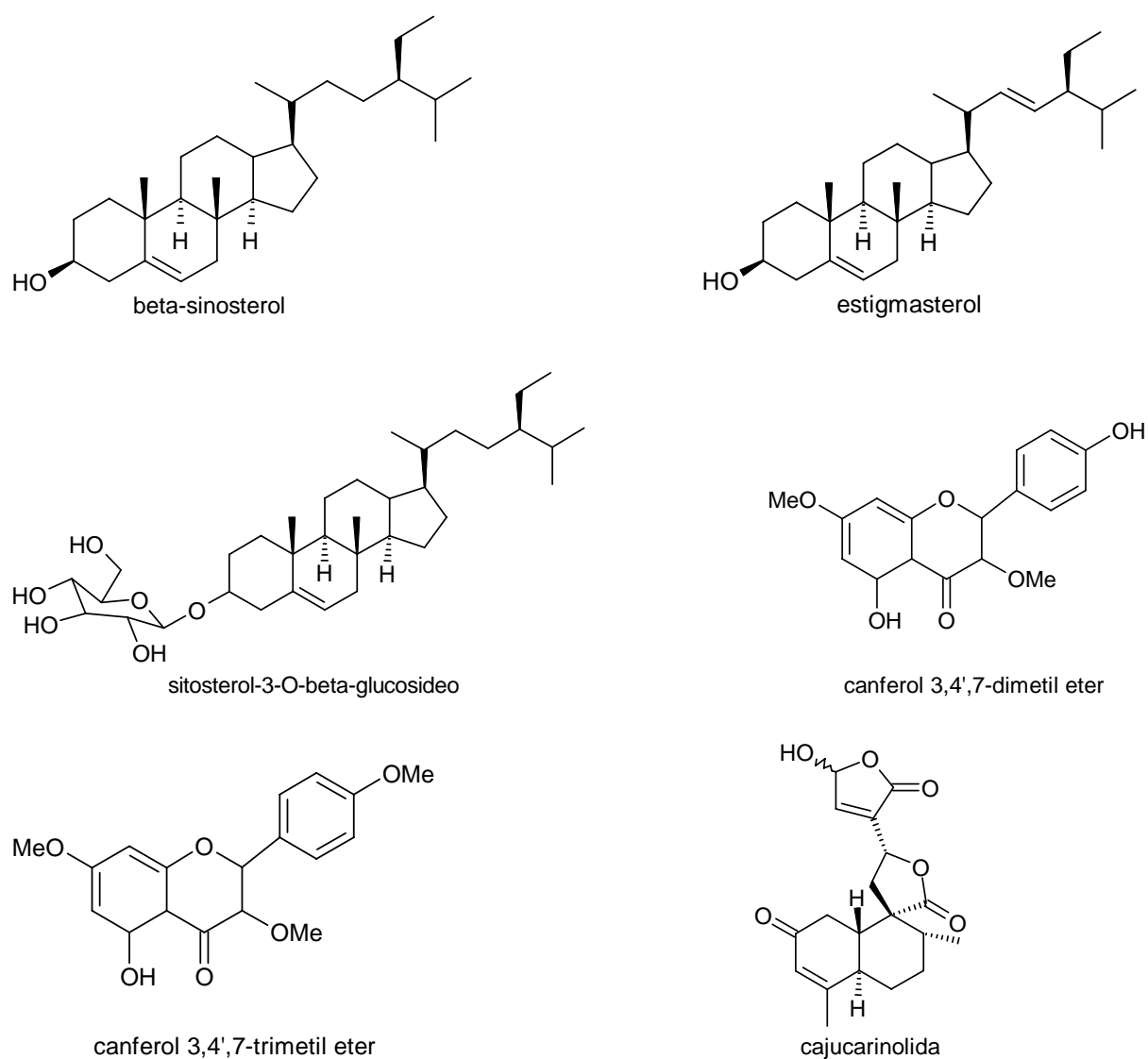
Em estudos fitoquímicos que investigaram partes distintas da planta *Croton cajucara* Benth como raiz, casca do caule e folhas, a casca apresentou-se rica em clerodanos do tipo diterpenos: *trans*dehidrocrotonina (DCTN) (figura 4), *trans*crotonina (CTN) (figura 4), *cis*cajucarina B e sacacarina. Nas plantas jovens (até 18 meses), o triterpeno ácido acetilaleuritólico (AAA) (figura 4) se apresenta-se em maior concentração na casca do caule, o diterpeno DCTN não está presente. O (DCTN) encontra-se em alta concentração (1,4% em casca seca) foi detectado em plantas adultas com idade de quatro a seis anos, enquanto plantas com três anos de idade têm somente 0,26% de diterpenos (21).



**Figura 4.** Componentes da raiz, casca e folhas do *Croton Cajucara* Benth (2).

A atividade farmacológica do maior componente do extrato da casca, o DCTN, tem sido extensivamente estudada sendo que foram detectados efeitos antiinflamatório, analgésico, antiulcerogênico, hipoglicêmico e hipolipidêmico(15).

Em estudos realizados com as folhas do CcB foi possível isolar e caracterizar três esteróides ( $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e 3,0-glicopiranosil- $\beta$ -sitosterol), dois flavonóides (3,7,4'-tri-*o*-metilcanferol e 3,7,-di-*o*-metilcanferol) e um diterpeno do tipo 19-*nor*-clerodano (cajucarinolida) (figura 5) (2, 16).



**Figura 5.** Substâncias isoladas da folha do *Croton cajucara* Benth (2).

Essas substâncias foram submetidas à avaliação de atividade antiinflamatória e antiálgica e, para tanto, diversos testes foram feitos, comprovando que os compostos *t*-CTN e AAA agem inibindo diferentes compostos inflamatórios, demonstrando terem afinidade pelos mecanismos das prostaglandinas e da

histamina. O chá da casca de CcB produziu redução na glicose plasmática, com diminuição de peso corporal, sugerindo uma atividade hipoglicêmica desta espécie (18).

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a civilização humana. Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (2).

No passado, a pesquisa experimental e clínica confirmou a eficácia de poucas plantas, como a *Silybum marianum*, *Picrorhiza kurroa*, *Curcuma longa*, *Camellia sinensis*, e *Glycyrrhiza glabra*. Em muitos casos, a pesquisa nasceu da experiência tradicional e da sabedoria popular e a partir daí os mecanismos e vias da ação dessas plantas, foram sendo descobertos, confirmando, nos estudos clínicos, a eficácia terapêutica de certas plantas ou extratos derivados de plantas. Além disso, as formulações à base de plantas medicinais também são importantes fontes de danos hepáticos *in vivo*, o que não é surpresa, já que o fígado é predominantemente um local de “clearance”, biotransformação e excreção de drogas (22).

## **1.2 O Fígado**

O fígado é o segundo órgão em tamanho do organismo humano e constitui cerca de 2,5% do peso corporal (23). A organização estrutural de seus elementos parenquimatosos e vasculares, formando a sua unidade funcional, o ácino hepático,



está disposta de tal maneira que lhe permite realizar mais de 1500 funções bioquímicas, que podem agrupar-se em:

#### 1) Metabólicas

- Síntese de proteínas plasmáticas.
- Conversão e desaminação de aminoácidos e formação da uréia
- Formação, armazenamento e degradação do glicogênio
- Gliconeogênese
- Formação de lipoproteínas, fosfolipídios e colesterol
- Metabolismo e armazenamento de vitaminas

#### 2) Detoxificação de substâncias

Os organismos vivos estão expostos a um grande número de compostos potencialmente tóxicos, tanto de origem endógena quanto exógena, tendo desenvolvido sistemas enzimáticos que facilitam a inativação e a eliminação desses compostos, principalmente compostos lipofílicos, facilmente absorvidos, que podem ser convertidos em derivados polares antes de serem excretados pelos rins ou pela bile(23).

O fígado reúne condições favoráveis para o metabolismo de fármacos lipofílicos, devido à presença de um endotélio sinusoidal fenestrado que permite a passagem de proteínas plasmáticas mediante difusão passiva dos sinusóides ao espaço de Disse. Uma vez formados, os metabólitos hidrossolúveis podem ser excretados novamente no espaço de Disse, passando aos sinusóides e à circulação sistêmica, sendo excretados pelo rim(23).

Os fármacos, em sua grande maioria, são metabolizados por um sistema de enzimas denominadas citocromo P-450, formado por duas proteínas, uma NADPH citocromo P-450 redutase e o citocromo P-450 (24).

### 3) Formação da bile

#### 1.2.1 O ácino hepático

Os hepatócitos e o sistema biliar estão perfeitamente relacionados com os elementos de vascularização do fígado, formando uma unidade funcional cujo conceito tem variado com o tempo. Ao fígado, chega sangue com duas procedências diferentes: sangue oxigenado, procedente da circulação central, através da artéria hepática e sangue da circulação portal, através da veia porta (figura. 6).

Ambos os tipos de sangue se estendem-se pelo parênquima hepático; o sangue da artéria hepática e da veia porta passa pelos sinusóides, confluindo posteriormente às veias centrolobulares e depois à veia hepática (25). O fígado é

constituído funcionalmente pelos chamados ácinos hepáticos, que são uma massa de parênquima hepático disposta ao redor de um eixo, o espaço porta, no qual se situam os ramos terminais da veia porta, artéria hepática, condutos biliares e vasos linfáticos (26).

O sangue ascende pela veia porta aos sinusóides e flui para os ramos da veia supra-hepática (25). Assim, os hepatócitos localizados próximos ao espaço porta são os primeiros expostos ao sangue aferente e recebem, portanto, as concentrações mais elevadas de solutos e nutrientes. Estes chegarão em menor quantidade aos hepatócitos centroacinares, estabelecendo-se um gradiente de concentração de solutos no sangue sinusoidal, que permite dividir os ácinos em três zonas (1, 2 e 3 de Rappaport) desde o espaço porta à veia central (26).

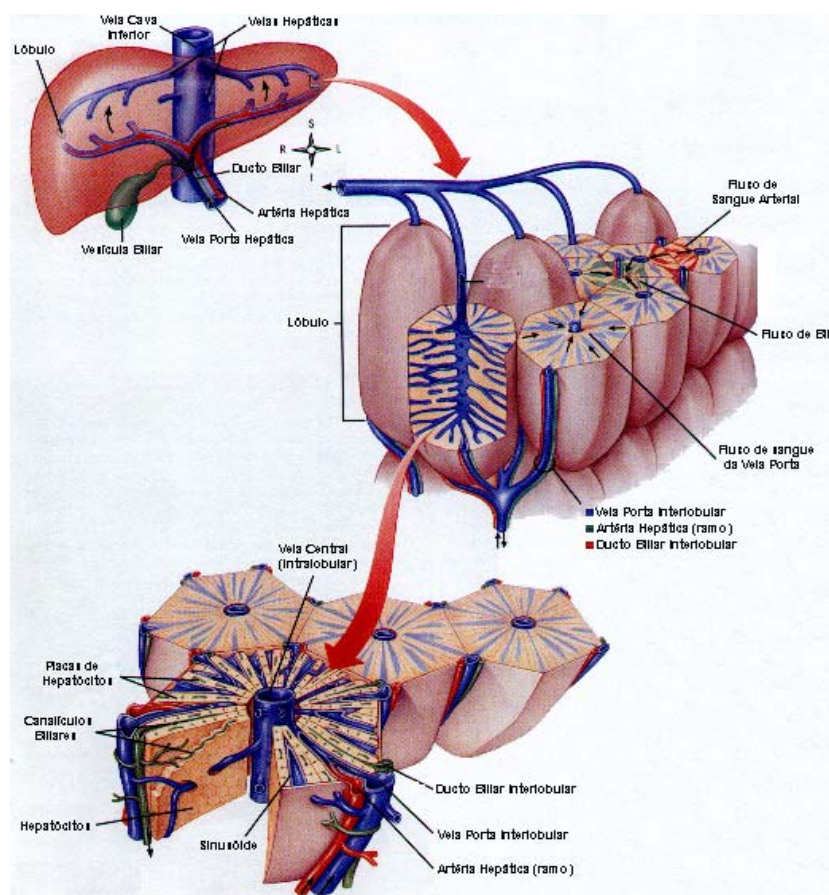


Figura 6. Estrutura microscópica do fígado (27).

### 1.3 Espécies Ativas de Oxigênio

O elemento oxigênio (símbolo químico O) existe como uma molécula diatômica, O<sub>2</sub>. Acima de 99% do O<sub>2</sub> na atmosfera é composto por isótopos de oxigênio-16, mas há traços de oxigênio-17 e oxigênio-18 (28).

Nos primórdios da Terra, os primeiros animais eram classificados como seres anaeróbicos, pois existia uma quantidade restrita de oxigênio na atmosfera. Os microorganismos anaeróbios ainda sobrevivem nos dias atuais, mas o seu crescimento é inibido e podem ser freqüentemente destruídos quando expostos ao oxigênio (O<sub>2</sub>) existente no ambiente (21%) (3). Os descendentes desses seres anaeróbios são aqueles que conseguiram se "adaptar" ao aumento nos níveis atmosféricos de O<sub>2</sub>. Entretanto, outros organismos tiveram seu processo de evolução envolvido com defesas antioxidantes para se protegerem da toxicidade do O<sub>2</sub> (29).

Exceto por algumas espécies anaeróbicas e aerotolerantes, todos os organismos requerem O<sub>2</sub> para produção eficiente de energia pelo uso da cadeia de transporte de elétrons que, por fim, doam elétrons para o O<sub>2</sub>, como nas mitocôndrias de células eucarióticas e nas membranas celulares de muitas bactérias (28).

Todos os seres vivos necessitam de energia para continuar vivos e manter um ambiente adequado para as células dos diversos tipos de tecido, mas, para que isso ocorra, deve existir uma adequada cadeia de reações químicas. O termo metabolismo se refere-se ao conjunto das reações químicas existentes dentro do

corpo humano, cujos produtos são continuamente degradados e sintetizados para manter a célula viva (29).

Para que o metabolismo celular ocorra, faz-se necessário o uso de energia derivada da oxidação dos nutrientes, a qual é dirigida para a formação de compostos fosfatados de alta energia, dentre eles o mais importante é o adenosina trifosfato (ATP). Quando há necessidade de energia para a realização de exercícios, ela é fornecida quimicamente, em forma de ATP, através da hidrólise de ATP (30). Todavia, o metabolismo do oxigênio também gera uma série de subprodutos reativos e potencialmente tóxicos, conhecidos como radicais livres (31).

No organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA. Dessa forma, encontram-se relacionados com várias patologias, tais como artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (32, 33).

As EAO (Espécies Ativas de Oxigênio) se formam durante a redução do oxigênio à água na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. O termo denominado de radical livre é determinado quando uma espécie química, que pode ser um átomo, como o hidrogênio ou um átomo de cloro, um metal de transição ou uma molécula, possui um elétron não pareado no seu último orbital (34). O elétron não pareado neste orbital confere uma alta reatividade à molécula, a qual apresenta forte

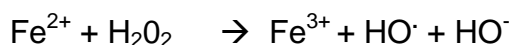
tendência a adquirir um segundo elétron para este orbital. Essas espécies altamente reativas têm o potencial de oxidar moléculas biológicas, incluindo proteínas, lipídios, glicídeos e ácidos nucleico. Quantidade aumentada de metabólitos oxidados dessas moléculas têm sido detectada em pacientes com uma variedade de doenças (35). A estabilidade do radical livre é adquirida por remoção de elétrons de moléculas vizinhas, produzindo um par eletrônico.

A reatividade química dos radicais livres é determinada pela molécula que apresenta o elétron não pareado, podendo apresentar grande variedade nos diferentes tipos de radicais. A forma que expressa e compara a reatividade química é determinada pelo tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) da espécie química, ou seja, um curto tempo de meia vida indica uma alta reatividade, sendo que o radical hidroxil parece ser o mais reativo (3).

Nas membranas mitocondriais encontram-se as proteínas transportadoras de elétrons, principalmente os citocromos, que reduzem uma molécula de oxigênio à água durante o processo de respiração. A redução completa de uma molécula de oxigênio à água requer quatro sucessivas transferências de elétron, duas delas, denominadas de redução univalente. Dois desses intermediários são chamados de radicais livres, são eles o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e o radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ). A maior parte do oxigênio (aproximadamente 95%) recebe os quatro elétrons de uma só vez, através do sistema oxidativo citocromo-oxidase, redução tetravalente. Porém, em cerca de 5% dos casos, a redução é monovalente, ou seja, a molécula de oxigênio recebe apenas um elétron de cada vez, proporcionando a formação de intermediários reativos e tóxicos, denominados espécies ativas de oxigênio (36).

O radical OH• é o mais deletério ao organismo, pois devido a sua meia-vida muito curta dificilmente pode ser seqüestrado *in vivo*. Esses radicais freqüentemente atacam as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição a insaturações (32). Essa espécie pode levar à injúria celular e de componentes estruturais do espaço extracelular.

O radical OH• é formado no organismo principalmente por dois mecanismos: reação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com metais de transição e homólise da água por exposição à radiação ionizante (37). O ferro reduzido (Fe<sup>2+</sup>) desenvolve uma importante rota na geração de radicais tóxicos, particularmente quando reage com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (38). O radical hidroxil é formado quando o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reage com o ânion superóxido O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, com catálise de íons divalentes de metais de transição como ferro e cobre, através da reação descrita por Haber-Weiss no ano de 1934 (3). É usualmente aceito que os efeitos tóxicos dos íons ferro são conseqüências da decomposição catalítica pelos íons Fe<sup>2+</sup> do peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos para a forma ativa do radical hidroxil, conforme reação.



Reação de decomposição catalítica pelos íons Fe<sup>2+</sup> do peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos, com conseqüente formação de radicais hidroxila (OH•) (39).

Acredita-se que essas reações sejam o passo inicial de muitos processos de danos causados por radicais livres, como lipoperoxidação, modificação oxidativa de proteínas e lipoproteínas, e aumento de anomalias em cromossomos (39).

A lipoperoxidação (LPO) é um processo natural de renovação das membranas celulares. Entretanto, o estresse oxidativo aumenta a LPO e provoca severo dano às membranas celulares, promovendo aumento na fluidez da membrana e quebra das funções secretórias e dos gradientes iônicos. A reação de oxidação pode ser iniciada pelo radical hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ) ou pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  (40, 41).

Ao iniciar a lipoperoxidação o radical livre remove um átomo de hidrogênio de um ácido graxo poliinsaturado (Figura 7). Como o átomo de hidrogênio possui um elétron, resta um elétron desemparelhado no átomo de carbono. Na fase de propagação, acontecem duas outras reações: 1) o carbono radical do lipídio poliinsaturado tende a se estabilizar por rearranjo molecular, produzindo dienos conjugados, os quais, por sua vez, rapidamente reagem com o oxigênio formando um radical peroxil; 2) o radical peroxil formado capta um próton de outra molécula de lipídio formando um hidroperóxido. Esta última reação torna a se repetir inúmeras vezes num processo de reação em cadeia. Na etapa final, dois radicais peroxil reagem entre si, formando um tetróxido instável que se decompõe, dando origem ao oxigênio singlete e a carbonilas excitadas, os quais podem emitir luz e serem medidos em detectores de quimiluminescência(42).

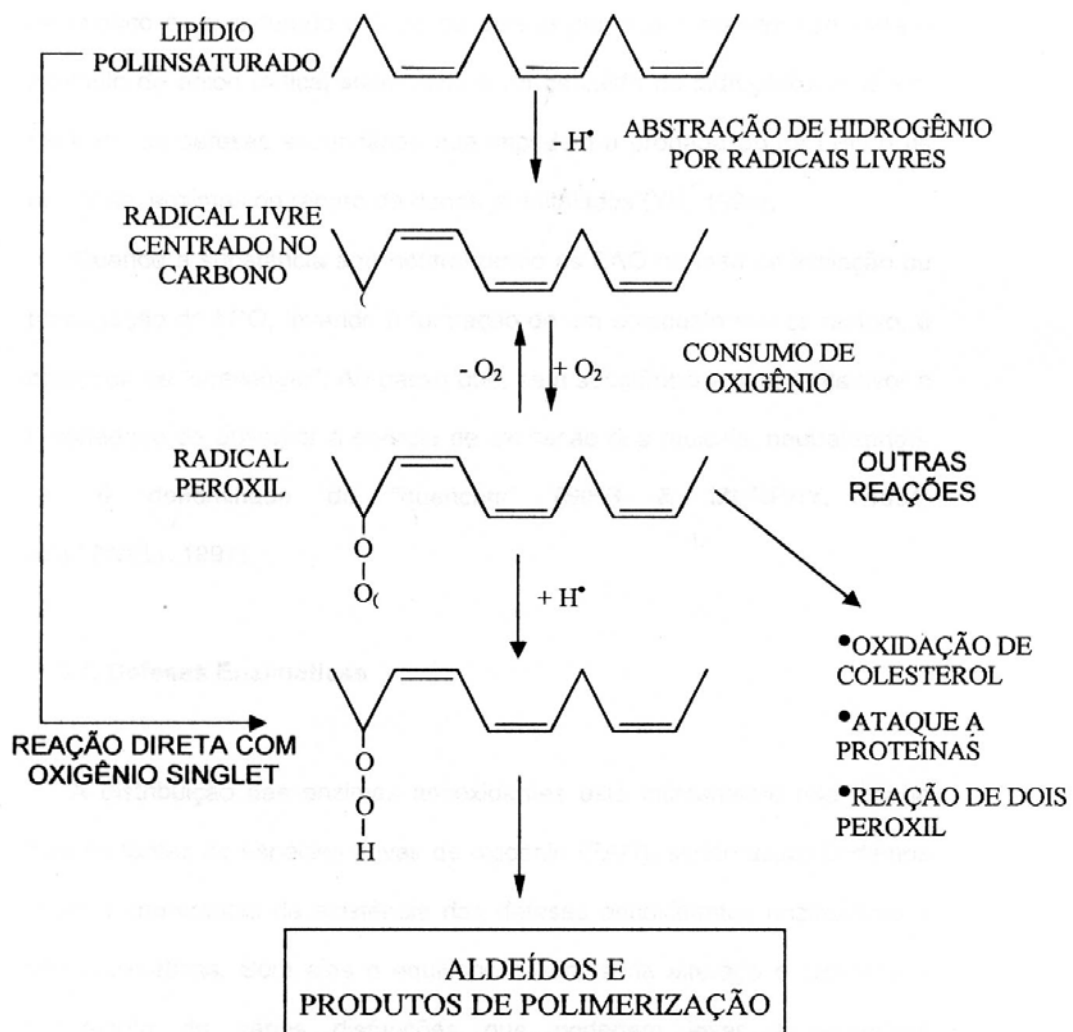
Os efeitos da lipoperoxidação sobre as biomembranas podem ser classificadas em quatro grupos:

- mudanças no microambiente lipídico de enzimas ligadas à membrana e nos canais iônicos e receptores, ativando ou inibindo a atividade dessas proteínas;



- formação de novos canais de permeabilidade;
- formação de ligações cruzadas entre proteínas e fosfolípidios, inativando-os irreversivelmente;
- oxidação dos grupos -SH nos sítios ativos de enzimas ligadas à membrana, ocasionando perda de suas funções.

Halliwell (1999) definem a lipoperoxidação (LPO) como sendo uma deterioração oxidativa dos lipídios poliinsaturados, ou seja, lipídios que contêm, no mínimo, dois carbonos unidos por ligações covalentes duplas (3). As membranas das células e das organelas são mais suscetíveis a LPO, pois contêm grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados. Assim, o processo de lipoperoxidação envolve a formação e propagação de radicais lipídicos, consumo de oxigênio e determina um rearranjo das duplas ligações nos lipídios. A eventual destruição dos lipídios da membrana, produz uma variedade de produtos de degradação, incluindo álcoois, cetonas, aldeídos e éteres (Figura 7) (43).



**Figura 7.** Representação esquemática da reação da LPO (3)

Junto com as alterações de permeabilidade da membrana poderá haver um acúmulo de cálcio intracelular, o que ativará outras enzimas cálcio-dependentes, como a fosfolipase, ocasionando um ciclo vicioso. Além de ativar outras enzimas, haverá um aumento na síntese de prostaglandinas, leucotrienos e fagocitose, o que pode gerar aumento na destruição das membranas celulares (44).

Como mecanismo compensador do processo oxidativo, o organismo possui um sistema antioxidante que é constituído por componentes enzimáticos e não

enzimáticos, que atuam conjuntamente na proteção celular. O sistema enzimático é considerado a linha de defesa primária, uma vez que evita o acúmulo do ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio. Existem, também, as defesas secundárias que impedem a propagação da LPO e as terciárias, enzimas de reparo de danos já instalados (3, 42).

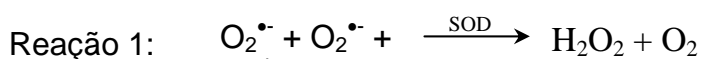
Quando a substância age neutralizando as EAO, na fase de iniciação ou propagação da LPO, levando à formação de um composto menos reativo, é chamada de "scavenger". Ao passo que, se a substância antioxidante tiver a propriedade de absorver a energia de excitação dos radicais, neutralizando-os, é denominada de "quencher" (3, 42, 45).

A distribuição das enzimas antioxidantes está intimamente relacionada com as fontes de EAO, sendo assim, podemos notar a importância da existência das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. Sem elas, o equilíbrio celular seria alterado e facilitaria o surgimento de várias disfunções que poderiam levar a processos patológicos (42).

A regulação das enzimas antioxidantes, necessária para manutenção da homeostase celular em condições adversas ao organismo, depende de vários fatores, como especificidade do órgão, idade, estágio de desenvolvimento, perfil hormonal e disponibilidade de cofatores (46).

O sistema enzimático encarregado da detoxificação das EAO é formado por várias enzimas, das quais destacam-se: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx) (42).

A SOD forma um grupo de enzima que catalisa a reação de dois ânions superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) com conseqüente formação de peróxido de hidrogênio, que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas (47).



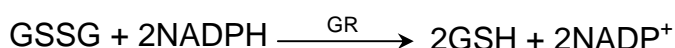
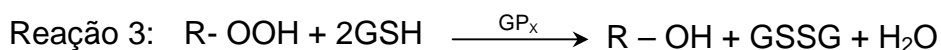
A SOD é classificada em três tipos distintos: SOD cobre e zinco (CuZnSOD), presente no citoplasma das células de eucariontes; SOD manganês (MnSOD), localizada na matriz mitocondrial e SOD ferro (FeSOD) que ocorre em bactérias (47).

Outra enzima importante é a CAT. O peróxido de hidrogênio, formado na dismutação do ânion superóxido, é transformado em água e oxigênio por ação dessa enzima. Esta, por sua vez, tem uma ação muito específica, já que atua em reações com peróxidos de hidrogênio, metila e etila (48).



Entre as peroxidases, que geralmente usam o grupo heme, se sobressai a atividade da glutaciona peroxidase ( $GP_x$ ), localizada no citosol e na matriz mitocondrial. Ela catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e dos hidroperóxidos orgânicos, através da oxidação da glutaciona reduzida (GSH), que será por sua vez,

regenerada por ação da glutathione redutase com consumo de NADPH. Neste processo de oxirredução, os grupamentos sulfidrilas doam dois hidrogênios para os peróxidos, transformando-os em álcool e/ou água, formando glutathione dissulfeto (GSSG) (3, 47).



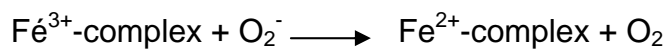
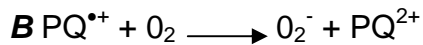
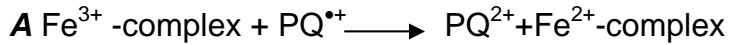
#### 1.4 Paraquat

Agentes químicos e físicos podem gerar estresse oxidativo como, por exemplo, poluição, fumo, radiação, drogas e estresse. É possível estudar os efeitos oxidantes e antioxidantes em células eucarióticas e procarióticas, utilizando um agente capaz de gerar estresse oxidativo (49-51). O paraquat, citado por vários pesquisadores em seus trabalhos, age como um agente agressor para organismos vivos (52).

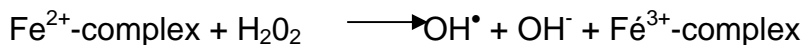
O paraquat é um herbicida do grupo bipyridil capaz de gerar EAO (Tabela 1) (3, 52). A redução do paraquat pela presença de NADPH gera o cátion radical paraquat ( $\text{PQ}^{\bullet+}$ ) que estimula a peroxidação lipídica. O radical formado pode se complexar com o ferro, reduzindo-o ou reagir com o  $\text{O}_2$  para formar  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . O balanço entre as reações do paraquat que se complexam com  $\text{Fe}^{+2}$  ou geram  $\text{O}_2^{\bullet-}$  depende da concentração de  $\text{O}_2$  no sistema, já que altas doses de  $\text{O}_2$  favorecem a formação de superóxido (3).

A adição de sais de ferro potencializa a habilidade do paraquat em causar a

liperoxidação e danos ao DNA, sugerindo que o paraquat também gera o radical OH<sup>•</sup> (3, 52, 53).

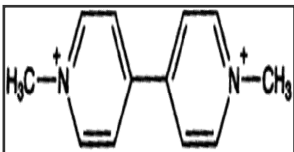


O complexo Fe<sup>2+</sup> pode então reagir com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formando OH<sup>•</sup>



O balanceamento entre rota A e rota B para geração de complexos reduzidos de ferro depende da concentração de O<sub>2</sub> no sistema (a alta concentração de O<sub>2</sub> estará favorecendo a rota B através da rota A) (3).

**Tabela 1.** Estrutura química, solubilidade e geração de EAO pelo paraquat.

Agente estressor	Estrutura química	Solubilidade	EAO geradas
Paraquat		Solúvel em água	PQ <sup>•+</sup> , O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> e possivelmente OH <sup>•</sup>

Segue referência tabela 1 (54)

O principal problema na agricultura do uso do herbicida PQ, é que este é venenoso para várias espécies animais, incluindo peixes, ratos, camundongos, gatos, cachorros, ovelhas, vacas e o homem (3).

Na ingestão oral, o PQ primeiramente resulta em efeitos locais, como irritação da boca, garganta e esôfago e, às vezes, causa vômitos e diarreia. Felizmente a absorção do herbicida bupiridil no intestino é relativamente baixa (3, 52).

A fração microsomal de vários tecidos animais, incluindo pulmão, pode reduzir o paraquat na presença de NADPH e o radical paraquat pode então reagir com o oxigênio formando  $O_2^{\bullet-}$ . A injeção intravenosa do paraquat em ratos causa uma rápida ativação da passagem de fosfato pentose para o pulmão. O NADPH é necessário para biossíntese de ácidos graxos, (necessários para reparar o dano à membrana lipídica), para biossíntese de surfactante, e para as reações da glutatona redutase. A síntese de ácidos graxos é diminuída em pulmões tratados com paraquat, e há um acúmulo de pontes de dissulfeto, formadas entre proteínas grupos -SH e glutadiona oxidada. Presumivelmente o peróxido de hidrogênio é formado a partir da reação do íon  $O_2^-$  superóxido pela enzima superóxido dismutase e no citosol a glutatona peroxidase forma a glutatona reduzida, a qual não pode ser reduzida rapidamente e se combina com proteínas (47).

Os efeitos danosos do PQ no tecido pulmonar *in vivo* e em células pulmonares isoladas são altamente potencializados pelas altas concentrações de  $O_2$ , mostrando a importância da reação do PQ com  $O_2$  *in vivo* (3, 52).

A adição de paraquat no pulmão de camundongos em frações microssomais na presença de NADPH estimula a peroxidação lipídica da membrana (55).

## 1.5 Vitamina E

A vitamina E pertence à família dos tocoferóis, tem o  $\alpha$ -tocoferol como a forma mais ativa e é antioxidante lipofílico e considerado uma defesa não enzimática (56).

O  $\alpha$ -tocoferol é considerado o mais importante de todos os tocoferóis conhecidos com atividade de vitamina E, porque ele representa cerca de 90% dos tocoferóis em tecidos animais e exibe a maior atividade na maioria dos sistemas de ensaio biológico (57).

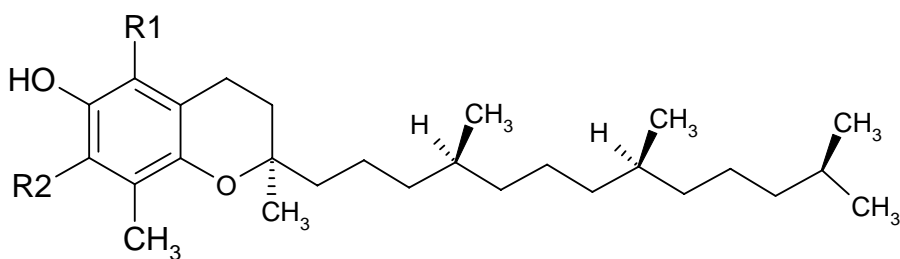
Na literatura, os termos  $\alpha$ -tocoferol e vitamina E são comumente usados como sinônimos. A vitamina E é uma molécula lipossolúvel que se concentra principalmente no interior das membranas celulares (3). O trolox, um derivado hidrossolúvel da vitamina E, é comumente empregado como controle em testes de avaliação de capacidade antioxidante (57).

A deficiência de vitamina E no organismo vem sendo relacionada com a degradação de lipídios, principalmente daqueles associados com às membranas das organelas (58). Desde então, a vitamina E vem sendo considerada o maior antioxidante lipossolúvel envolvido na proteção das membranas celulares (57). A vitamina E reage com o oxigênio singlete e com o radical  $O_2^{\bullet-}$ , contudo, a proteção sobre as membranas biológicas deve-se, principalmente, à reação com radicais



lipídicos peroxil e alcóxil através da doação de um hidrogênio para essas espécies terminando a cadeia de peroxidação. O radical tocoferil formado após a oxidação da vitamina E é muito pouco reativo para oxidar membranas lipídicas (3). Cabe destacar que altas doses de vitamina E podem gerar efeitos pró-oxidantes (57).

Os tocoferóis protegem as membranas por sua ação de “scavenger” de radicais peroxil, sem agir em outros passos da propagação da peroxidação lipídica (45, 57).



Homólogos	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
α-Tocoferol	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>
β-Tocoferol	-CH <sub>3</sub>	-H
γ-Tocoferol	-H	-CH <sub>3</sub>
δ-Tocoferol	-H	-H

**Figura 8.** Estrutura dos principais homólogos dos tocoferóis

Utilizando sistemas *in vitro* a capacidade da vitamina E de funcionar como antioxidante ou varredor de radicais livres é pequena, e pode estar relacionada ao caráter hidrofóbico de sua cadeia lateral (58).

## 1.6 Levedura *Saccharomyces cerevisiae* como Modelo de Estudo

Ensaio microbianos *in vitro* têm se mostrado muito adequados na triagem rotineira de vários produtos, em testes rápidos, sensíveis, econômicos, reprodutíveis que apresentam resultados confiáveis na identificação da atividade biológica. São utilizados e recomendados por conceituadas entidades governamentais e órgãos de pesquisa dos Estados Unidos, Canadá e vários países da Europa (59).

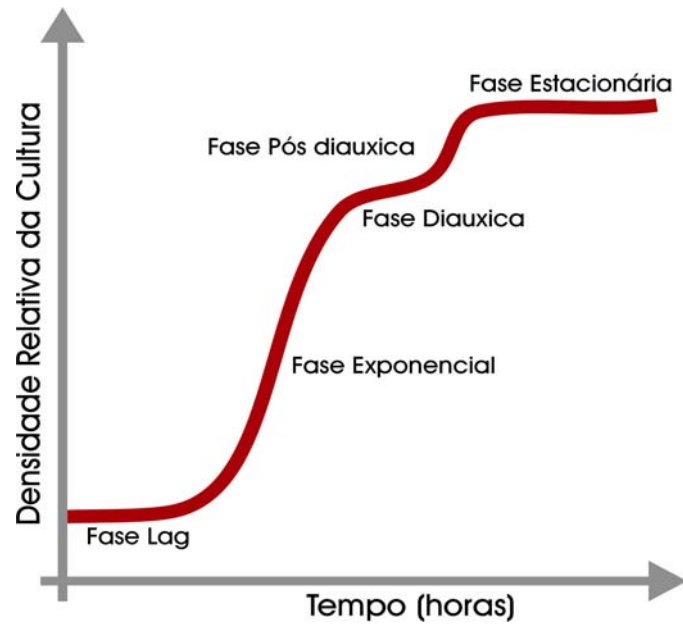
O fato de a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ser um dos microorganismos mais estudados do ponto de vista genético e metabólico levou-a a se tornar-se um dos microorganismos mais utilizados em testes biológicos (51, 60). A capacidade que a levedura apresenta de crescer em condições aeróbicas e anaeróbicas permite, também, o estudo durante diferentes situações metabólicas. Os dados obtidos nesse tipo de teste apresentam uma correlação de aproximadamente, 70% em relação ao observado no homem (59).

A levedura *S. cerevisiae* é um fungo unicelular, com ciclo eucarioto típico e completo, amplamente estudado e notavelmente semelhante às células de mamíferos no que se referem às macromoléculas, organelas e proteínas com homologia a proteínas humanas, tornando-a uma ferramenta importante nas pesquisas sobre mutagênese, reparo de DNA e mecanismos que respondem ao estresse oxidativo (51, 61).

As leveduras podem crescer tanto em condições anaeróbicas quanto aeróbicas e, portanto, são expostas continuamente às ERO geradas como bioprodutos do

metabolismo. A *S. cerevisiae* pertence ao grupo das leveduras anaeróbias facultativas. Isso significa que fermenta hexoses como a glicose e a frutose, independente da concentração de oxigênio. A glicose é a principal fonte de carbono da *S. cerevisiae*, uma preferência que é mediada por um complexo processo de repressão e ativação de genes e de proteínas, usualmente conhecido como repressão da glicose ou repressão catabólica (62, 63). Quando a concentração de glicose cai para menos de 0,2% no meio, há a desrepressão das enzimas que participam da biossíntese na mitocôndria e de outros genes necessários para o crescimento respiratório (62, 63).

Esse crescimento apresenta fases distintas do ponto de vista metabólico e cinético (figura 9). Após um breve período de adaptação em meio rico (YPD – 2% glicose), chamado de fase lag, as células iniciam uma divisão celular a cada hora e meia (fase exponencial), com energia proveniente da fermentação da glicose. Ao diminuir a disponibilidade de glicose no meio, ocorre a desrepressão catabólica (transição diáuxica), na qual há uma parada transiente na divisão celular, enquanto as células são preparadas para o metabolismo respiratório. Posteriormente, ela reassume a divisão celular em um ritmo mais lento (uma divisão a cada três ou quatro horas), utilizando o etanol como fonte de carbono produzido durante a fermentação (fase pós-diáuxica). Quando todas as fontes de carbono forem exauridas, as células entram na fase estacionária na qual podem sobreviver por muito tempo na ausência de nutrientes (64, 65).



**Figura 9.** Fases de crescimento de uma levedura selvagem quando iniciada em meio completo (Adaptado de Fuge e Werner, 1997) (65).

*S. cerevisiae* apresenta uma variedade de mecanismos de defesas antioxidantes. Possui duas enzimas superóxidos dismutases: SodCuZn, codificada pelo gene *SOD1*, localizada no citoplasma; e a SodMn, codificada no núcleo pelo gene *SOD2* e que é localizada na mitocôndria (66, 67). Ambas as enzimas fazem a dismutação do radical superóxido a peróxido de hidrogênio. Duas catalases foram identificadas, uma citosólica codificada pelo gene *CTT1* e outra perioxossomal codificada pelo gene *CTA1*. Leveduras mutadas para ambas as catalases são sensíveis a estresse por elevadas concentrações de  $H_2O_2$  (63).

Linhagens isogênicas de *S. cerevisiae* deficientes em defesas antioxidantes têm sido utilizadas para o estudo do mecanismo de ação de agentes físicos e químicos que interferem com o estado redox da célula (68, 69). Um método utilizado para determinação da natureza das lesões induzidas por agentes oxidantes, consiste em comparar a sensibilidade de mutantes deficientes em enzimas antioxidantes com

uma linhagem selvagem isogênica proficiente naquele tipo de defesa antioxidante. Pode-se também combinar um oxidante conhecido, como  $H_2O_2$ , t-BOOH (peróxido de *terc*-butil) e paraquat, com uma substância com potencial antioxidante. O aumento da viabilidade celular ao tratamento estará sugerindo atividade protetora (antioxidante) e a diminuição da viabilidade a um efeito deletério (pró-oxidante) (60, 70, 71).

### **1.7 Avaliação da capacidade de varredura do radical DPPH\***

O mecanismo de ação desta reação baseia-se na capacidade do antioxidante em doar hidrogênio para o 1,1 difenil 2-picrilhidrazil (DPPH\*) provocando a varredura deste radical livre e modificando a coloração da solução (72).

Para determinar a capacidade de varrer o radical livre estável DPPH\*, 200 $\mu$ L das amostras de antioxidantes em diferentes concentrações (2, 25, 100 e 200  $\mu$ M) foram misturados com 800  $\mu$ L de uma solução tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,0. A essa mistura foi adicionado 1000  $\mu$ L da solução etanólica de DPPH\* 500  $\mu$ M (Sigma Chem. Co.) e os tubos foram mantidos por 20 minutos ao abrigo da luz. A medida de absorvância foi feita em espectrofotômetro UV-visível, 517 nm. Para o branco, a amostra de antioxidante foi substituída por água destilada. A medida da absorvância do branco corresponde a concentração de DPPH\* da solução (250  $\mu$ M). Foram realizadas, no mínimo, quatro repetições e o resultado foi expresso em  $\mu$ M de radical DPPH\* que foi reduzido pelos antioxidantes.

## 2 OBJETIVOS DO ESTUDO

Esse trabalho tem por objetivo geral determinar a possível ação antioxidante do *Croton cajucara* Benth no aspecto químico e biológico *in vitro* e *in vivo*.

E tem como objetivos específicos:

- comparar a ação antioxidante do extrato de folhas de *Croton cajucara* Benth com a do trolox através de um teste químico, o qual verifica a capacidade de varredura do radical DPPH\*;
- determinar a sobrevivência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* tratada com extrato de folhas de *Croton cajucara* Benth em presença do agente estressor paraquat (1,1 - dimetil - 4,4 - bipyridil) através de um teste biológico *in vitro*;
- avaliar a peroxidação lipídica através do método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e quimiluminescência (QL) no homogeneizado de fígado de ratos frente ao estresse oxidativo, em tratados e não tratados com *Croton cajucara* Benth;

- avaliar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx) no homogeneizado de fígado de ratos frente ao estresse oxidativo, tratados e não tratados com *Croton cajucara* Benth.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Costa M, Di Stasi LC, Kirizawa M, Mendacolli SL, Gomes C, Trolin G. Screening in mice of some medicinal plants used for analgesic purposes in the state of Sao Paulo. Part II. *J Ethnopharmacol*. 1989 Nov;27(1-2):25-33.
2. Maciel MAM, Pinto AC, Veiga VF, Grynberg NF, Echevarria A. Plantas Mediciniais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim Nova*. 2002;25(3):429-38.
3. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res*. 1999 Oct;31(4):261-72.
4. Halliwell B. Free radicals and metal ions in health and disease. *Proc Nutr Soc*. 1987 Feb;46(1):13-26.
5. Halliwell BeB, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3th ed: Oxford University; 1999.
6. van Acker SA, van den Berg DJ, Tromp MN, Griffioen DH, van Bennekom WP, van der Vijgh WJ, et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med*. 1996;20(3):331-42.
7. Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med*. 1997;22(5):749-60.
8. Peres W, Tunon MJ, Collado PS, Herrmann S, Marroni N, Gonzalez-Gallego J. The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. *J Hepatol*. 2000 Nov;33(5):742-50.
9. Hiruma-Lima CA, Gracioso JS, Rodriguez JA, Haun M, Nunes DS, Souza Brito AR. Gastroprotective effect of essential oil from *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol*. 2000 Mar;69(3):229-34.
10. Oksuz S, Shieh HL, Pezzuto JM, Ozhatay N, Cordell GA. Biologically active compounds from the Euphorbiaceae; Part 1. Triterpenoids of *Euphorbia nicaeensis* subsp. *glareosa*. *Planta Med*. 1993 Oct;59(5):472-3.
11. Pezzuto JM, Che CT, McPherson DD, Zhu JP, Topcu G, Erdelmeier CA, et al. DNA as an affinity probe useful in the detection and isolation of biologically active natural products. *J Nat Prod*. 1991 Nov-Dec;54(6):1522-30.
12. Alviano WS, Mendonca-Filho RR, Alviano DS, Bizzo HR, Souto-Padron T, Rodrigues ML, et al. Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. *Oral Microbiol Immunol*. 2005 Apr;20(2):101-5.
13. Hiruma-Lima CA, Gracioso JS, Bighetti EJ, Grassi-Kassisse DM, Nunes DS, Brito AR. Effect of essential oil obtained from *Croton cajucara* Benth. on gastric ulcer



healing and protective factors of the gastric mucosa. *Phytomedicine*. 2002 Sep;9(6):523-9.

14. Luna Costa AM, Silva JC, Campos AR, Rao VS, Maciel MA, Pinto AC. Antioestrogenic effect of trans-dehydrocrotonin, a nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara* Benth. in rats. *Phytother Res*. 1999 Dec;13(8):689-91.

15. Silva RM, Oliveira FA, Cunha KM, Maia JL, Maciel MA, Pinto AC, et al. Cardiovascular effects of trans-dehydrocrotonin, a diterpene from *Croton cajucara* in rats. *Vascul Pharmacol*. 2005 Jun;43(1):11-8.

16. Maciel MAM, Pinto AC, Brabo SN, Silva MN. Terpenoids from *Croton Cajucara*. *Phytochemistry*. 1998;49:823-28.

17. Simões JC, Silva AJR, Serruya H, Bentes MHS. Dehidrocrotina, um norditerpeno de *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae) *Ciência e Cultura*. 1979;31:1140.

18. Campos AR, Albuquerque FA, Rao VS, Maciel MA, Pinto AC. Investigations on the antinociceptive activity of crude extracts from *Croton cajucara* leaves in mice. *Fitoterapia*. 2002 Apr;73(2):116-20.

19. Lorenzi H, Matos FJ. *PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL: nativas e exóticas*. São Paulo: Pantarum; 2002.

20. Miotto AM. Perfil lipídico e sensibilidade adrenérgica em átrio direito de ratos normo e hipercolesterolêmicos tratados ou não com infuso das cascas de *Croton cajucara* Benth. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2001.

21. Maciel MA, Pinto AC, Arruda AC, Pamplona SG, Vanderlinde FA, Lapa AJ, et al. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. *J Ethnopharmacol*. 2000 Apr;70(1):41-55.

22. Luper S. A review of plants used in the treatment of liver disease: part two. *Altern Med Rev*. 1999 Jun;4(3):178-88.

23. Esteller A, Cordero M. *Fundamentos de Fisiopatologia*. Madrid: McGraw-Hill - Interamericana; 2001.

24. Kaminsky LS, Guengerich FP. Cytochrome P-450 isozyme/isozyme functional interactions and NADPH-cytochrome P-450 reductase concentrations as factors in microsomal metabolism of warfarin. *Eur J Biochem*. 1985 Jun 18;149(3):479-89.

25. Lutt WW, Greenway CV. Conceptual review of the hepatic vascular bed. *Hepatology*. 1987 Sep-Oct;7(5):952-63.

26. Arias M, Boyer JL, Fausto N, Chisari FV, Schachter D, Shafritz DA. *The liver. Biology and pathobiology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.

27. Pereira Filho NA. *A ação da quercetina na sobrevida de ratos com cirrose biliar secundária*. Canoas: Universidade Luterana do Brasil; 2002.

28. Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4 ed. Oxford, New York: Oxford University Press; 2007.

29. Ganong WF. *Review of Medical Physiology McGraw-Hill Professional*; 2005.

30. Campbell M. *Bioquímica*. Porto Alegre: Artmed; 2000.

31. Augusto O. *Radicais Livres: bons, maus e naturais*. São Paulo: Oficina de Textos; 2006.

32. Barreiros ALBS, David JM, David JP. *ESTRESSE OXIDATIVO: RELAÇÃO ENTRE GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS E DEFESA DO ORGANISMO*. *Quim Nova*. 2006;29(1):113-23.

33. Husain SR, Cillard J, Cillard P. *Phytochemistry*. 1987;26:24-89.

34. Boveris A, Valdez LB, Zaobornyj T, Bustamante J. Mitochondrial metabolic states regulate nitric oxide and hydrogen peroxide diffusion to the cytosol. *Biochim Biophys Acta*. 2006 May-Jun;1757(5-6):535-42.

35. Maxwell SR. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*. 1995 Mar;49(3):345-61.
36. Meneghini RA. Toxicidade do Oxigênio. *Ciência Hoje*. 1987;5:28.
37. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. *J Lab Clin Med*. 1992;119:598.
38. Yokozawa T, Dong E, Oura H, Kashiwagi H, Nonaka G, Nishioka I. Magnesium lithospermate B suppresses the increase of active oxygen in rats after subtotal nephrectomy. *Nephron*. 1997;75(1):88-93.
39. Kozlov AB, Ostrachovitch EA, Afanas'ev IB. Mechanism of inhibitory effects of chelating drugs on lipid peroxidation in rat brain homogenates. *Biochem Pharmacol*. 1994 Mar 2;47(5):795-9.
40. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc*. 1988 Apr;63(4):381-9.
41. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. II. Involvement in human disease. *Mayo Clin Proc*. 1988 Apr;63(4):390-408.
42. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*. 2006 Jun;141(2):312-22.
43. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978;52:302-10.
44. Meerson FZ, Kagan VE, Kozlov Iu P, Belkina LM, Arkhipenko Iu V. [Role of lipid peroxidation in the pathogenesis of ischemic injury and the antioxidant protection of the heart]. *Kardiologiya*. 1982 Feb;22(2):81-93.
45. Sies H, Murphy ME. Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. *J Photochem Photobiol B*. 1991 Jan;8(2):211-8.
46. Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes. *Faseb J*. 1992 Jun;6(9):2675-83.
47. Mayevsky A, Chance B. Oxidation-reduction states of NADH in vivo: From animals to clinical use. *Mitochondrion*. 2007 Sep;7(5):330-9.
48. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*. 1979 Jul;59(3):527-605.
49. Flikweert MT, Kuyper M, van Maris AJ, Kotter P, van Dijken JP, Pronk JT. Steady-state and transient-state analysis of growth and metabolite production in a *Saccharomyces cerevisiae* strain with reduced pyruvate-decarboxylase activity. *Biotechnol Bioeng*. 1999;66(1):42-50.
50. Lopes MH, Lopes RA. Latex allergy in health care personnel. *Aorn J*. 2000 Jul;72(1):42-6.
51. Maris AF, Assumpcao AL, Bonatto D, Brendel M, Henriques JA. Diauxic shift-induced stress resistance against hydroperoxides in *Saccharomyces cerevisiae* is not an adaptive stress response and does not depend on functional mitochondria. *Curr Genet*. 2001 May;39(3):137-49.
52. Dawson A, Buckley N. Integrating approaches to paraquat poisoning. *Ceylon Med J*. 2007 Jun;52(2):45-7.
53. Bulkley GB. Free radicals and other reactive oxygen metabolites: clinical relevance and the therapeutic efficacy of antioxidant therapy. *Surgery*. 1993 May;113(5):479-83.
54. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev*. 1994 Aug;52(8 Pt 1):253-65.
55. Mustafa A, Gado AM, Al-Shabanah OA, Al-Bekairi AM. Protective effect of aminoguanidine against paraquat-induced oxidative stress in the lung of mice. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2002 Jul;132(3):391-7.

56. Christopher Min K. Structure and function of alpha-tocopherol transfer protein: implications for vitamin E metabolism and AAVED. *Vitam Horm.* 2007;76:23-43.
57. Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med.* 2007 Jul 1;43(1):4-15.
58. McCay PB. Vitamin E: interactions with free radicals and ascorbate. *Annu Rev Nutr.* 1985;5:323-40.
59. Rabello-Gay, Rodrigues MAR, Monteleone-Neto R. Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. Ribeirão Preto: Soc. Bras. Genet.; 1991.
60. Tieppo J, Verdelino R, Dias AS, Silva Vaz MF, Silveira TR, Marroni CA, et al. Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome. *Food Chem Toxicol.* 2007 Jul;45(7):1140-6.
61. Boeira JM, Viana AF, Picada JN, Henriques JA. Genotoxic and recombinogenic activities of the two beta-carboline alkaloids harman and harmine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res.* 2002 Mar 20;500(1-2):39-48.
62. De Winde JH, J.M. T, Winderick J. Adaptation to nutrient depletion in yeast. In: MAGER, W.H. (ED) *Yeast stress responses*. Springer-Verlag, Heidelberg,. 1997:7-52.
63. Gancedo JM. Yeast carbon catabolite repression. . *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 1998;62:334-61.
64. Pringle JR, Hartwell LH. *The Saccharomyces cerevisiae cell cycle*. New York: Cold Spring Hargbor; 1982.
65. Fuge EK, Werner M. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. . *Yeast Stress Response.* 1997:57-94.
66. Gralla EB, Kosman DJ. Molecular genetics os superoxide dismutase in yeast and related fungi. *Advances in Genetics.* 1992;30:251-319.
67. Longo VD, Gralla EB, Valentine JS. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal Biological Chemistry.* 1999;271(21):12275-80.
68. Brennan RJ, Schiestl RH. Free radicals generated in yeast by the Salmonella test negative carcinogens benzenes, urethane, thiourea and auramine O. *Mutation Research.* 1998;403:65-73.
69. Lee JH, Choi IY, Kil IS, Kim SY, Yang ES, Park JW. Protective role of superoxide dismutases against ionizing radiation in yeast. *Biochemica et Biophysica Acta.* 2001;1526:191-8.
70. Henriques JAP, Dafré LA, Picada JN, Maris AF. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos. In: Serafini, L. A., Barros, N., Azevedo, J.L. Guaíba: Editora Agropecuária; 2001.
71. Maris AF, Assumpção ALK, Bonatto D, Brendel M, Henriques JAP. Diauxic shift-induced stress resistance against hydroperoxides in *Saccharomyces cerevisiae* is not an adaptative stress response and does not depend on functional mitochondria. *Current Genetics.* 2000;39:137-49.
72. Brand- Williams WC, M.E.; Berset, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol.* 1985;28:25-30.

## **4 ARTIGO CIENTIFICO**













## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pelos dados obtidos neste trabalho conclui-se que:

- 1) O extrato aquoso mostrou atividade antioxidante contra o radical DPPH<sup>•</sup> nas concentrações 0,01% e 0,001% em comparação ao trolox na concentração de 0,001%.
- 2) O tratamento prévio das células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* com extrato de *Croton cajucara* Benth e PQ demonstrou aumento significativo na sobrevivência das células em comparação, quando tratadas exclusivamente com 10mM de paraquat. Esse fato pode indicar um possível efeito antioxidante do extrato.
- 3) Na análise da peroxidação lipídica no tecido hepático (TBA-RS e QL), observou-se maior lipoperoxidação nos animais do grupo paraquat. A administração de *Croton cajucara* Benth diminuiu significativamente a lipoperoxidação no grupo estudado.

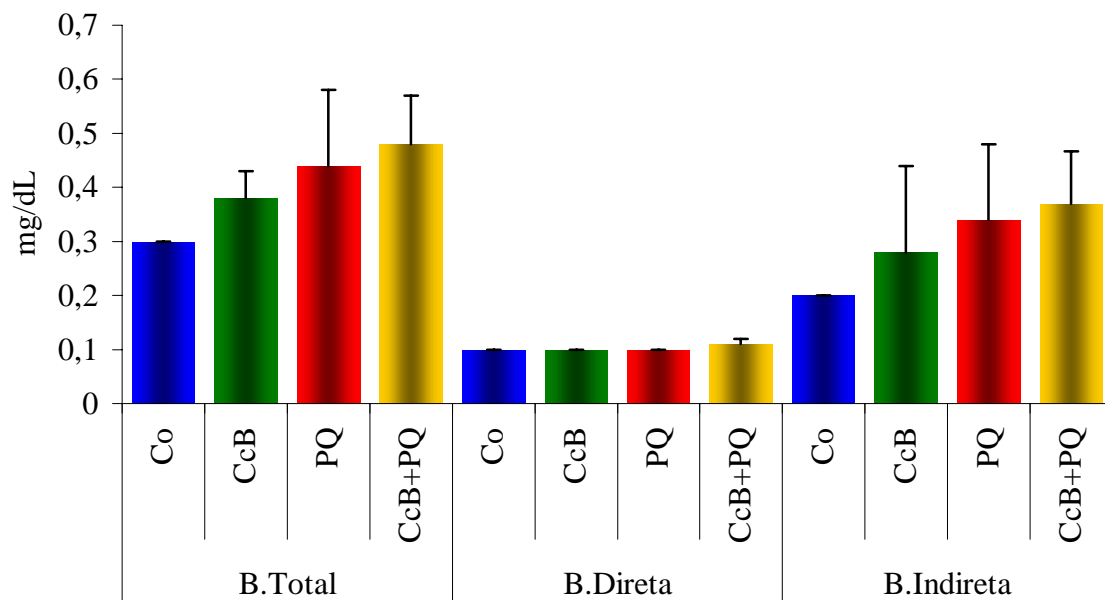
- 4) Houve aumento significativo na atividade da enzima antioxidante SOD e diminuição na atividade das enzimas CAT e GPx no tecido hepático dos animais do grupo paraquat e, respectivamente, diminuição estatisticamente significativa da atividade da SOD e aumento da atividade das enzimas CAT e GPx no grupo tratado *Croton cajucara* Benth mais paraquat.

A partir dos dados obtidos, sugerimos que a planta *Croton cajucara* Benth tem possíveis propriedades antioxidantes, as quais diminuiriam o processo de estresse oxidativo causado pela injúria hepática química nos animais lesados pela administração do herbicida paraquat. Esta constatação inspira futuras investigações sobre os componentes dessa espécie e sobre aspectos toxicológicos para elucidar mecanismos de ação e confirmar com maior especificidade qual dos componentes químicos “in natura” tem maior atividade antioxidante.

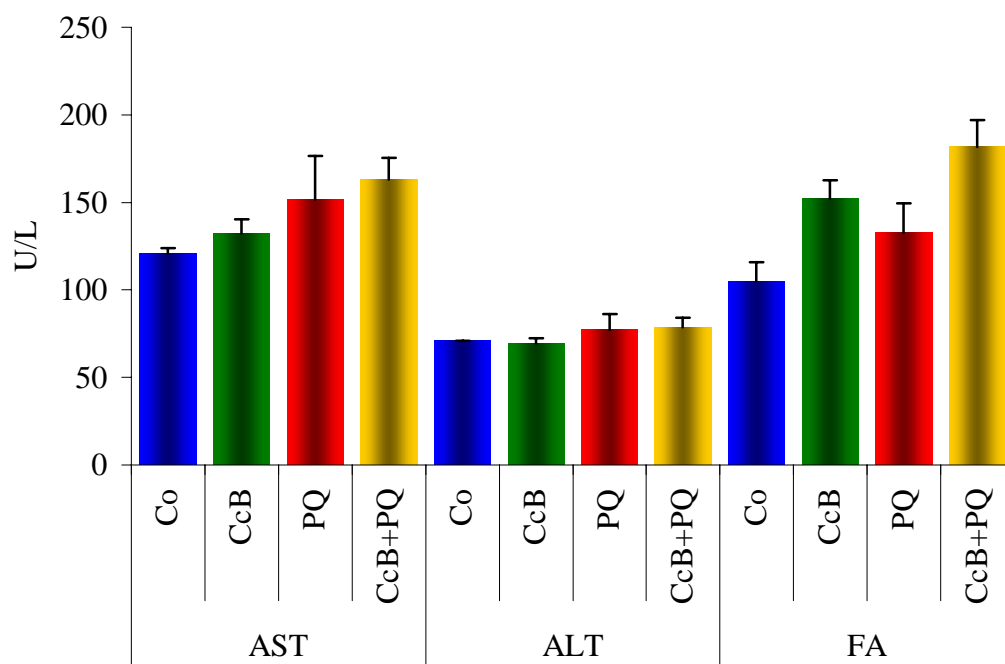
## ANEXOS

Em anexo observamos:

- 1- Os testes de função hepática (TFHs) através da análise das bilirrubinas, da alanina aminotransferase (ALT), da aspartato aminotransferase (AST), da fosfatase alcalina (FA);

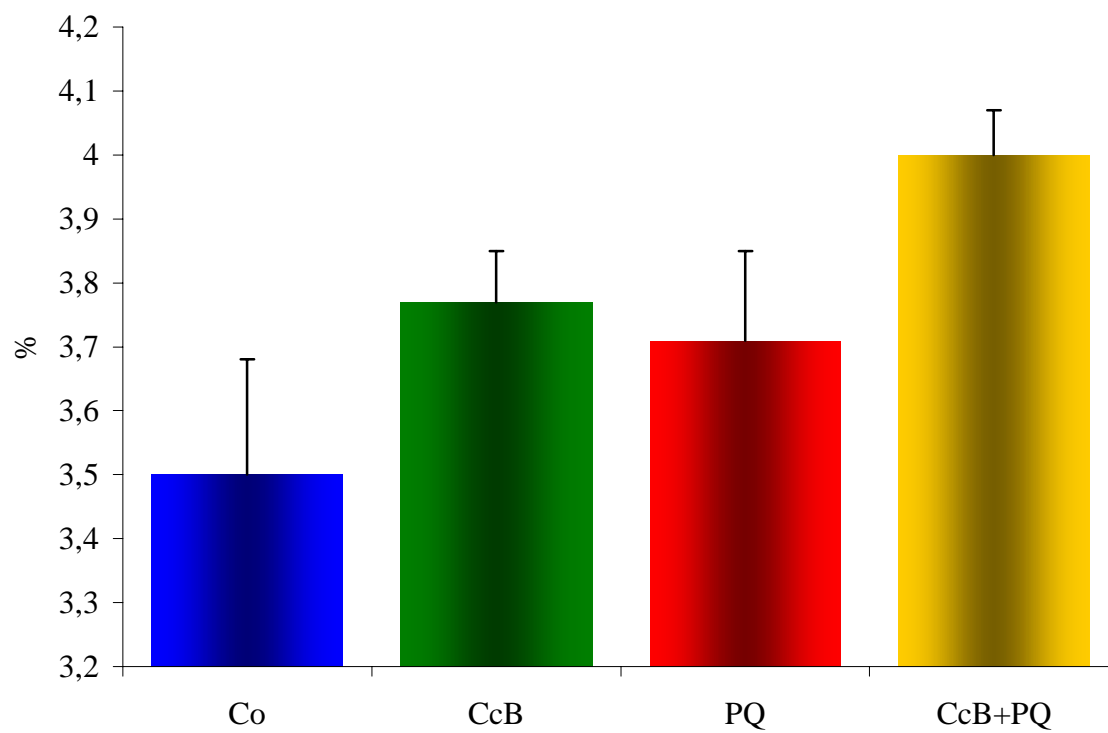


Avaliação das bilirrubinas total, direta e indireta nos diferentes grupos experimentais. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

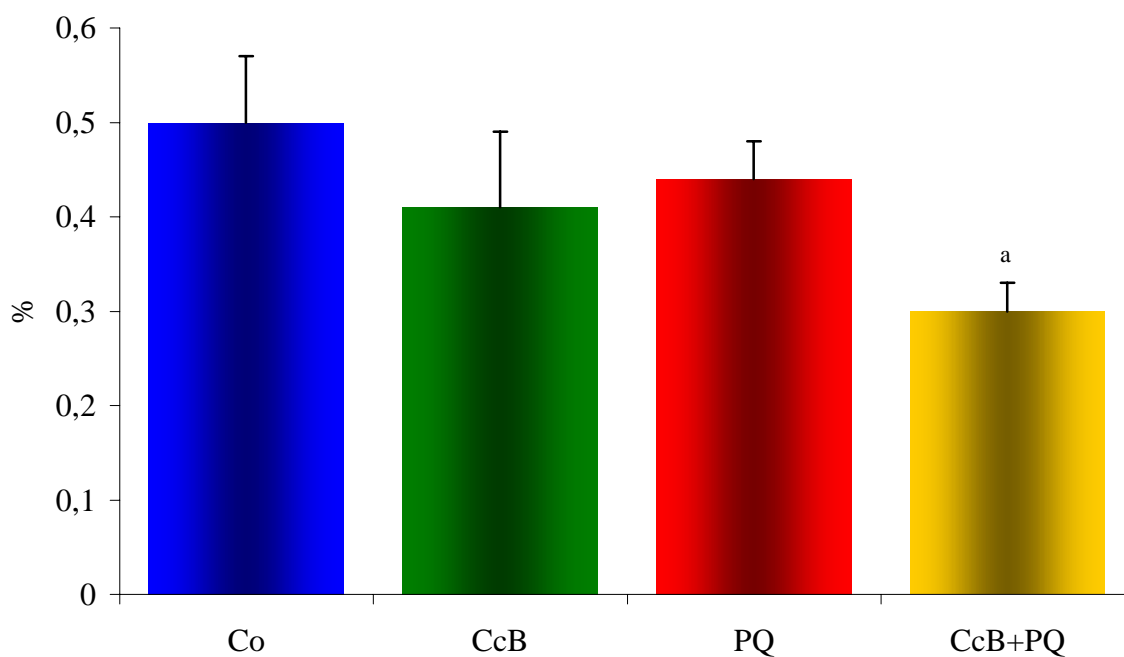


Avaliação das transaminases aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) nos diferentes grupos experimentais. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

2- A relação hepatossomática, e esplenossomática em um modelo animal de estresse oxidativo através de administração de paraquat e ação do CcB.



Relação hepatossomática nos diferentes grupos experimentais. Os resultados acima são expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).



Relação esplenossomática nos diferentes grupos experimentais. Os resultados acima são expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

**Tabela**  
Relação Esplenossomática nos diferentes grupos experimentais.

<b>Grupo</b>	<b>Relação Esplenossomática %</b>
<b>Co (5)</b>	0,5 $\pm$ 0,07
<b>CcB (10)</b>	0,41 $\pm$ 0,08
<b>PQ (8)</b>	0,44 $\pm$ 0,04
<b>CcB+PQ(10)</b>	0,3 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>

Os resultados acima são expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

Os valores entre parênteses indicam o número de animais em cada grupo.

As notações da letra sobrescrita apresentam a seguinte significância:

<sup>a</sup> Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Co e ao grupo PQ ( $p < 0,05$ ).

## DECLARAÇÃO

**NORMA ANAIR POSSA MARRONI**, brasileira, portadora da cédula de identidade RG sob o nº 1007460494, inscrita no CPF sob o nº 167.363.540-72, professora pesquisadora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e da Universidade Luterana do Brasil, declara para os devidos fins que na publicação científica do trabalho intitulado "*Croton cajucara Benth. leaf extract scavenges the stable free radical DPPH and protects against oxidative stress induced by paraquat*" publicado em janeiro de 2006 na revista "*Biological & Pharmaceutical Bulletin*", ISSN versão online 1347-5215 e ISSN versão impressa 0918-6158, volume 29(1), páginas 161-5, sob autoria de Marcelo Tieppo, Marilene Porawski, Mirian Salvador, Andrea Janz Moreira, Pilar Sanchez Collado, Javier González-Gallego e Norma Possa Marroni constou como autor **MARCELO TIEPPO** quando deveria constar **MAURÍCIO TIEPPO**, brasileiro, farmacêutico, portador da cédula de identidade RG sob o nº 1068480183, inscrito no CPF sob o nº 926.034.400-04, por erro de digitação da referida revista.

Porto Alegre, 31 de Julho de 2007.

DECIMO  
PRIMEIRO



Prof. Dra. Norma Anair Possa Marroni

CPF 167363540-72

Coordenadora do Laboratório de Hepatologia Experimental – Fisiologia UFRGS-  
HCPA e do Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes da ULBRA



**T563c Tieppo, Maurício**

Croton Cajucara Benth (sacaca) uma planta da Amazônia :  
avaliação de seu potencial antioxidante / Maurício Tieppo ;  
orient. Edson Capp. – 2007.

64 f.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em  
Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2007.

1. Antioxidantes 2. Croton 3. Uso terapêutico 4. Plantas medicinais

I. Capp, Edson II. Título.

NLM: QV 325

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA