

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

UNIFAL-MG

PLÍNIO RODRIGUES DOS SANTOS FILHO

**EFEITO DE EXTRATOS DE FOLHAS DE BARBATIMÃO SOBRE O DANO
OXIDATIVO E A GENOTOXICIDADE INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA**

ALFENAS-MG

2008

PLÍNIO RODRIGUES DOS SANTOS FILHO

**EFEITO DE EXTRATOS DE FOLHAS DE BARBATIMÃO SOBRE O DANO
OXIDATIVO E A GENOTOXICIDADE INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Ciências Farmacêuticas da
UNIFAL-MG, como parte dos requisitos
para obtenção do título de mestre.**

**Orientadora Profa. Dra. Cibele Marli
Cação Paiva Gouvêa.**

ALFENAS-MG

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos Filho, Plínio Rodrigues dos

Efeito de extratos de folhas de barbatimão sobre o dano oxidativo e a genotoxicidade induzida por ciclofosfamida. Alfenas, 2007.

39 p. : il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Universidade Federal de Alfenas/UNIFAL-MG. Área de concentração: Obtenção, identificação e avaliação da atividade de compostos bioativos.

Orientadora: Gouvêa, Cibele Marli Cação Paiva.

1. Barbatimão. 2. Extrato vegetal. 3. Farmacognosia.

PLÍNIO RODRIGUES DOS SANTOS FILHO

**EFEITO DE EXTRATOS DE FOLHAS DE BARBATIMÃO SOBRE O DANO
OXIDATIVO E A GENOTOXICIDADE INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Obtenção de insumos farmacêuticos e avaliação da atividade biológica.

Aprovada em: 19 de fevereiro de 2008.

Profa. Dra. Cibele Marli Cação Paiva Gouvêa (Orientadora)

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

Profa. Dra. Alaíde Braga de Oliveira

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Assinatura:

Prof. Dr. Marcos José Marques

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

AGRDECIMENTOS

À minha família que sempre me apoiou e incentivou a buscar novos horizontes me mostrando sempre que não se deve desistir frente ao primeiro obstáculo e propiciando que eu sempre buscase minha realização pessoal e profissional.

Aos meus amigos e colegas de laboratório pela colaboração direta e indireta durante minha trajetória estudantil até este momento.

À inúmeros professores que em muitas ocasiões se mostraram prestativos e dispostos a colaborar com o desenvolvimento desse trabalho.

À profa Dra Cibele Marli Cação Paiva Gouvêa que me orientou na execução deste trabalho e mais que uma orientadora constitui-se em um exemplo de profissional dedicada e que norteia seu trabalho por princípios éticos e de respeito a vida.

E finalmente a Deus sem o qual nada disso seria possível.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi determinar o efeito antioxidante e antígenotóxico de extratos de folhas de *Styphnodendron adstringens* (“barbatimão”). Foram obtidos o extrato aquoso (AEB), a fração aquosa (WFB) e o extrato etanólico (EEB) de folhas de barbatimão. Foram analisadas as atividades antioxidante *in vitro* e *in vivo* e o efeito dos extratos contra o agente genotóxico, ciclofosfamida (CP). O conteúdo de compostos fenólicos variou de 23,93 a 34,94%, os flavonóides de 3,63 a 5,02% e as proantocianidinas de 23,32 a 35,4 μM . Todos os extratos testados exibiram atividade antioxidante. A capacidade antioxidante total dos extratos foi de: $147,85 \pm 12,68$, $124,36 \pm 7,18$ e $148,64 \pm 8,41$ mg ácido ascórbico/g extrato, para o AEB, WFB e EEB respectivamente. A atividade sequestrante de DPPH dos extratos foi dependente da concentração e a atividade máxima foi obtida com 62 $\mu\text{g/mL}$ dos extratos. Estes apresentaram capacidade similar ao ácido ascórbico e maior que o BHT para reduzir o Fe^{3+} e esta atividade foi também dependente da concentração. O poder redutor máximo foi obtido com 250 $\mu\text{g/mL}$ dos extratos. Nos ensaios *in vivo* o AEB e EEB foram mais eficientes no cérebro, reduzindo a formação de TBARS, enquanto o WFB foi mais ativo no fígado, diminuindo a oxidação de proteínas. Em relação à fragmentação do DNA, foi visto que a CP induziu apoptose, confirmada pelo padrão de DNA escada. O AEB não produziu apoptose, mas também não protegeu as células contra o efeito da CP. O WFB foi antígenotóxico, pois não induziu apoptose e protegeu as células dos efeitos apoptóticos da CP. O EEB induziu necrose, evidenciada pela intensa lesão do DNA (arraste). Em conclusão, todos os extratos apresentaram atividade antioxidante e o WFB é antígenotóxico.

Palavras-chave: Barbatimão. Atividade antioxidante. Atividade Antígenotóxica.

ABSTRACT

The aim of the present study was to determine the antioxidant and antigenotoxic effect of leaf extracts of *Styphnodendron adstringens* (“barbatimão”). The aqueous (AEB), water fraction (WFB) and ethanolic (EEB) extracts of leaves were obtained. We analyzed the antioxidant activity in vitro and in vivo and the effect against a genotoxic agent, cyclophosphamide (CP), of the extracts. The extracts presented high content of phenolic compounds, flavonoids and proanthocyanidins. All of the extracts tested exhibit antioxidant activity. The total antioxidant capacity of the extracts was: 147.85 ± 12.68 , 124.36 ± 7.18 and 148.64 ± 8.41 mg ascorbic acid/g extract, for AEB, WFB and EEB respectively. The free radical DPPH scavenging activity of the extracts was concentration-dependent and the maximum activity was achieved with $62 \mu\text{g/mL}$. The extracts presented Fe^{3+} -reducing capacity similar to ascorbic acid and higher than BHT and it was also concentration-dependent. The maximum reducing power was achieved with $250 \mu\text{g/mL}$. The AEB and EEB were most efficient in brain, reducing TBARS formation while the WFB was most active in liver, decreasing protein oxidation. As for DNA fragmentation, it can be seen that CP induced apoptosis, confirmed by the DNA ladder pattern. The AEB neither induce apoptosis nor protected cells from the effects of CP. The WFB was antigenotoxic, as it did not induce apoptosis and protected cells from the apoptotic effect of CP. The EEB induced necrosis, as seen by the intense DNA lesion (smear). In conclusion all extracts presented antioxidant activity and WFB was antigenotoxic. WFB may be useful as cancer chemopreventive and/or anticarcinogenic agent.

Keywords: Barbatimão. Antioxidant activity. Antigenotoxic activity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEB	-Extrato aquoso de folhas de barbatimão
BHT	-Butil hidroxitolueno
CP	-Ciclofosfamida
DNA	-Ácido desoxirribonucléico
DPPH	-1,1-difenil-2-picralilidrazil
EEB	-Extrato etanólico de folhas de barbatimão
RNS	- Espécies reativas de nitrogênio
ROS	- Espécies reativas do oxigênio
MDA	-Malonaldeído
TBARS	-Espécies reativas do ácido tiobarbitúrico
WFB	-Fração aquosa de folhas de barbatimão

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA.....	9
1.1 Barbatimão.....	9
1.2 Estresse oxidativo e antioxidantes.....	11
1.3 Danos basais em biomoléculas: oxidação.....	15
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
3 ARTIGO.....	26
3.1 Abstract.....	27
3.2 Keywords.....	27
3.3 Introduction.....	28
3.4 Materials and methods.....	29
3.5 Results and discussion.....	31
3.6 Acknowledgments.....	34
3.7 References.....	34
3.8 Figure legends.....	38

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Barbatimão

Stryphnodendron adstringens (Martius) Coville (Fabaceae), conhecida popularmente como barbatimão, é uma árvore comum no cerrado, com ampla distribuição geográfica, ocorrendo em vários estados, desde o Pará, atravessando o Planalto Central até o norte do Paraná. É encontrada mais freqüentemente em fitofisionomias do cerrado típico, campo-sujo e cerradão (BORGES FILHO; FELFILI; 2003).

Apresenta folhas compostas bipinadas, com cinco a oito jugas, com seis a oito pares de folíolos por pina. O fruto é um legume sésstil, grosso, carnoso, linear-oblongo com cerca de 10 cm de comprimento. Seu pico de floração, produção de folhas novas e queda de folhas ocorrem entre julho e outubro. Apresenta inflorescências com número variável de flores pequenas de cor marrom, hermafroditas, com longevidade de apenas um dia, produzindo pequenas quantidades de néctar nas flores, o que atrai pequenos insetos (FELFILI et al., 1999).

Esta planta é conhecida ainda por outras denominações, tais como: “barbatimão-verdadeiro”, “barba-de-timão”, “chorãozinho-roxo” e “casca-da-virgindade”, sendo que sua casca e suas sementes são consideradas tóxicas. O extrato bruto obtido por decocção ou infusão da casca tem sido utilizado, popularmente, para o tratamento de leucorréia, diarreia, como agente antiinflamatório, antisséptico e para promover a coagulação sanguínea e cicatrização de feridas (SANTOS; TORRES; LEONART, 1987; PANIZZA et al., 1988).

Criadores de gado acreditam que o barbatimão apresenta atividade antifertilizante e/ou abortiva (BURGER et al., 1999). Rebecca et al. (2003) relataram que o extrato aquoso de *S. adstringens* tem efeitos complexos sobre o metabolismo do fígado. Estes autores demonstraram que o extrato de barbatimão altera a fosforilação oxidativa em pelo menos três modos de ação: desacoplamento, inibição do fluxo de elétrons na cadeia respiratória e inibição da ATP sintase.

S. adstringens apresenta ainda diversas outras atividades demonstradas. O extrato aquoso de barbatimão apresentou atividade antiinflamatória, analgésica e protetora da mucosa

gástrica (BERSANI-AMADO et al., 1996; LIMA; MARTINS; DE SOUZA JR., 1998; MARTINS; LIMA; RAO, 2002; REBECCA et al., 2001).

Rebecca et al. (2002) determinaram que a DL₅₀ para camundongos, utilizando extrato metanólico de casca de *S. adstringens*, é de 2699 mg/kg. Esses autores também demonstraram que a administração do extrato por via oral durante 7 dias não apresentou toxicidade. Contudo, a administração prolongada (30 dias) de 800 e 1600 mg/kg pareceu tóxica. O extrato de *S. adstringens* não apresentou genotoxicidade somática e germinativa para *Drosophila* (DE SOUSA et al., 2003).

S. adstringens é importante fonte de taninos (polifenóis) e apresenta taninos condensados, flavonóides, proantocianidinas, (8 classes de prodelfinidinas e 8 de prorobinetinidinas), substâncias tânicas (20 a 30%), taninos (18 a 27%), alcalóides, amido, matérias resinosas, mucilaginosas e matéria corante vermelha (MELLO; PETEREIT; NAHRSTEDT, 1996a; b). A Farmacopéia Brasileira 1 menciona que a casca desta planta possui pelo menos 20% de taninos. Santos et al. (2002) analisaram o extrato acetônico de folhas e casca de *S. adstringens* e verificaram a presença de compostos fenólicos, taninos e ésteres de ácido gálico, além de delfinidinas e flavonolglicosídeos nas folhas.

Os compostos fenólicos ou polifenóis constituem um dos grupos mais numerosos e ubíquos de metabólitos secundários de plantas, com mais de 8.000 estruturas conhecidas. Os polifenóis naturais incluem desde moléculas simples tais como: ácidos fenólicos, fenilpropanóides e flavonóides até compostos altamente polimerizados como as ligninas, melaninas e taninos, os quais apresentam ampla gama de efeitos biológicos (SOOBRAATTEE et al., 2005). Dentre estes, as proantocianidinas, taninos condensados, presentes em altas concentrações no barbatimão, apresentam atividades biológicas diversas, tais como: antioxidante, sendo mais importante a inibição da peroxidação lipídica; antimutagênica; anticarcinogênica; moduladora da atividade de enzimas, proteínas, peptídeos e aminas; antiviral; indutora da apoptose, além de outras (KOZIKOWSKI et al., 2003; OKUDA, 2005). As proantocianidinas são compostos oligoméricos ou poliméricos constituídos de subunidades flavan-3-ol e representam os produtos finais da via biossintética de flavonóides, consistindo principalmente de (+) catequinas e (-) epicatequinas (DIXON et al., 2005).

1.2 Estresse oxidativo e antioxidantes

Os organismos aeróbios dependem da disponibilidade de oxigênio para sua sobrevivência. Contudo, este é tóxico e os organismos conseguem sobreviver devido à presença de agentes antioxidantes. A expressão estresse oxidativo é utilizada para definir uma situação na qual organismos aeróbios apresentam um desequilíbrio entre os sistemas antioxidantes e os pró-oxidantes (espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio) com predomínio destes últimos e pode conduzir à oxidação maciça de substratos biológicos. O estresse oxidativo pode causar vários problemas metabólicos e participa da iniciação e desenvolvimento de numerosas doenças crônicas e degenerativas (HALLIWELL, 2007; NEGRE-SALVAYRE et al., 2007).

O termo radical livre é frequentemente usado para designar qualquer átomo ou molécula com existência independente, contendo um ou mais elétrons não-emparelhados, nos orbitais externos. Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e capazes de reagir com qualquer composto situado próximo à sua órbita externa, podendo atuar como oxidante (HALLIWELL, 2007).

Devido à sua configuração eletrônica, o oxigênio tende a receber um elétron de cada vez, formando compostos intermediários altamente reativos, destacando-se o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}). O ânion radical superóxido é o primeiro intermediário da redução monovalente do oxigênio a água, sendo formadas, a partir dele, as demais espécies reativas de oxigênio. Outras espécies radicalares incluem: o hidroperóxido (HO_2^{\cdot}), o alcóxila (RO^{\cdot}), o peróxila (ROO^{\cdot}) o óxido nítrico (NO^{\cdot}) e o dióxido de nitrogênio (NO_2^{\cdot}). As espécies não-radicalares incluem ainda: ácido hipocloroso ($HOCl$), ozônio (O_3), oxigênio singlete ($^1\Delta O_2$) e o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$). Destes, o peroxinitrito, seguido pelo radical hidroxila são os mais reativos na indução de alterações estruturais nas moléculas celulares e o peróxido de hidrogênio, apesar de não ser um potente radical livre, é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA. Os compostos derivados do oxigênio são chamados de espécies reativas de oxigênio (ERO) e os derivados do nitrogênio, de espécies reativas de nitrogênio (ERN) (COS et al., 2003). A geração de radicais livres constitui uma ação contínua e fisiológica, cumprindo funções biológicas essenciais. São formados em um cenário de reações de óxido-redução, provocando ou resultando dessas reações. Podem ceder o elétron solitário e serem

oxidados; ou podem receber outro elétron e serem reduzidos (LOUREIRO et al., 1992; MCELIGOT et al., 2005).

Os radicais livres e espécies reativas podem ser formados no citossol, retículo endoplasmático, nas mitocôndrias, peroxissomos, ou na membrana, e os alvos celulares incluem: proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA. As ERO podem ser formadas por reações enzimáticas da ciclooxigenase, lipooxigenase, além da autooxidação das catecolaminas, flavinas e ferridoxinas e pelas reações catalisadas por metais de transição, como o ferro e o cobre. Recentemente foram descritos mais dois sistemas enzimáticos que podem gerar espécies reativas e radicais: o sistema oxidativo de $\text{NADP/NADPH} + \text{H}^+$ e o da mieloperoxidase. O sistema oxidativo de $\text{NADP/NADPH} + \text{H}^+$ é responsável pela produção de ERO na explosão respiratória (respiratory burst), que ocorre durante a ativação de glóbulos brancos como neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos. A mieloperoxidase, na presença de H_2O_2 e Cl^- , gera ácido hipocloroso (HOCl), que rapidamente reage com o grupos tiol, dissulfeto e amino, formando cloraminas. Estas reagem com proteínas, modificando-as. Como fontes exógenas de radicais livres têm-se as radiações gama e ultravioleta, os medicamentos, a dieta, o cigarro e os poluentes ambientais (LOUREIRO et al., 1992; NASKALSKI; MARCINKIEWICZ; DROZDZ, 2002).

Para evitar os danos causados pelas ERO, os organismos desenvolveram vários mecanismos de defesa, isto é, potenciais de neutralização das ações dos radicais livres, chamados antioxidantes. O mecanismo de ação dos antioxidantes é bem variado e inclui desde a remoção do oxigênio do meio, varredura das ERO, seqüestro do metais catalizadores da formação de radicais livres, aumento da formação de antioxidantes endógenos ou mesmo através da interação de mais de um mecanismo (MCELIGOT et al., 2005).

Os organismos aeróbios são protegidos do ataque de radicais livres e espécies reativas por um sistema de defesa antioxidante composto por enzimas e substâncias protetoras não-enzimáticas. As principais enzimas são superóxido dismutase, catalase, NADPH-quinona oxidoreductase, glutathione peroxidase e enzimas de reparo. O sistema não-enzimático é composto por L-cisteína, α -tocoferol (vitamina E), curcumina, betacaroteno, ácido ascórbico (vitamina C), flavonóides, proteínas do plasma, selênio e glutathione (MCELIGOT et al., 2005).

O sistema de defesa antioxidante pode atuar em duas linhas. Uma delas atua como desintoxicante do agente antes que ele cause lesão. Esta linha é constituída por glutathione reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathione-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo

constituída por ácido ascórbico, glutathiona-redutase (GSH-Rd) e GSH-Px, entre outros. Com exceção da vitamina E (α -tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular. A ação dos antioxidantes inclui: redução da velocidade de iniciação dos processos radiculares, supressão da geração de radicais livres ou sua eliminação (COS et al., 2003).

Os hidroperóxidos lipídicos e o peróxido de hidrogênio são importantes precursores de radicais de oxigênio e enzimas, tais como glutathiona peroxidase, glutathiona redutase, peroxidase e catalase que, decompõem estes peróxidos sem gerar radicais livres, são denominados de antioxidantes preventivos, assim como as proteínas que reduzem íons metálicos como ferro e cobre, além dos carotenóides e da enzima superóxido dismutase que reduzem o oxigênio singlete e dismutam o ânion radical superóxido, respectivamente (RATNAM et al., 2006; GENESTRA, 2007).

Os antioxidantes seqüestrantes de radicais captam estes radicais rapidamente e inibem a iniciação da cadeia radicalar e/ou interrompem a propagação da mesma, doando um átomo de hidrogênio para formar um composto estável e um radical derivado do antioxidante. Esses antioxidantes podem ser hidrossolúveis ou lipossolúveis. Compostos tais como ácido ascórbico, ácido úrico, bilirrubina, albumina e componentes contendo grupamento tiol (glutathiona e outros) agem como antioxidantes hidrossolúveis, sendo capazes de seqüestrar radicais livres somente no meio aquoso, não podendo seqüestrar radicais lipofílicos localizados nas membranas celulares. Já o α -tocoferol, é conhecido como o mais importante antioxidante seqüestrador de radicais lipossolúveis, protegendo as membranas celulares contra radicais lipofílicos (RATNAM et al., 2006; GENESTRA, 2007).

Estes antioxidantes agem cooperativamente protegendo os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios das ERO. No entanto, em condições, nas quais são geradas ERO em excesso e o sistema antioxidante de defesa está em exaustão, é criado um estado de estresse oxidativo, levando a danos nestes sistemas (GENESTRA, 2007).

O efeito dos antioxidantes *in vivo* depende de fatores tais como: tipos de radicais livres formados; onde e como são gerados esses radicais; análise e métodos para a identificação dos danos e doses ideais para obter proteção. Assim, é perfeitamente possível que um antioxidante atue como protetor em determinado sistema, mas que falhe na proteção, ou mesmo que aumente as lesões induzidas em outros sistemas ou tecidos (HALLIWELL, 2007).

O estresse oxidativo está relacionado ao desenvolvimento e progressão de várias doenças humanas, entretanto, seu papel não é sempre o mesmo. Há doenças que são causadas pelo estresse oxidativo, como a carcinogênese. No caso da carcinogênese induzida por

radiação ionizante, p. ex., a radiação gera HO[•], a partir da água, e este radical pode atacar diretamente o DNA, causando mutação, ou gerar H₂O₂, espécie também oxidante do DNA. Há doenças que não têm como causa o estresse oxidativo, mas este contribui para a patologia, como a aterosclerose, doenças auto-imunes e diabetes. Assim, tem sido comum recorrer aos antioxidantes exógenos, para auxiliar o sistema endógeno (COS et al., 2003).

A atividade antioxidante de extratos de plantas está comumente associada à presença de compostos fenólicos (BRAVO, 1998; CAI et al., 2004), embora nem sempre se possa correlacionar essa atividade a grandes quantidades desses compostos (ORDOÑEZ et al., 2006). Sendo assim, muitos trabalhos visam à obtenção de compostos com atividade antioxidante, com o objetivo de minimizar os efeitos deletérios das ERO e ERN. Seja qual for o mecanismo de ação dos compostos antioxidantes, estes participam de reações de óxido-redução. O interesse pela descoberta de novos e seguros antioxidantes de fontes naturais tem aumentado, principalmente, para prevenir a deterioração de alimentos e para minimizar o dano oxidativo às células vivas (RATNAM et al., 2006). O uso de antioxidantes sintéticos tem diminuído devido a suspeita de atividade como promotores de carcinogênese, bem como, devido à rejeição de aditivos sintéticos em alimentos (NAMIKI, 1990). O papel de antioxidantes provenientes da dieta e seus benefícios para a saúde têm atraído grande atenção nos últimos anos, especialmente, os extraídos de plantas. Este interesse não tem sido somente na descoberta de novas moléculas biologicamente ativas para a indústria farmacêutica, mas também na utilização de extratos vegetais, como as infusões, para a medicação da população em geral (RATNAM et al., 2006).

Sabe-se que dentre os compostos fenólicos de origem vegetal, se encontra a maioria dos componentes químicos vegetais com atividade antioxidante. As propriedades benéficas desses compostos podem ser atribuídas à sua capacidade de sequestrar os radicais livres. Os taninos, um grupo de compostos fenólicos encontrado amplamente nos vegetais, são antioxidantes, atuando principalmente como sequestradores de radicais livres (OKUDA, 2005). Outros antioxidantes de origem vegetal incluem os tocoferóis, tocotrienóis, ácido ascórbico, carotenóides e ácidos lipóicos. O mecanismo de ação destes compostos é variável e inclui as seguintes atividades: sequestrante de radicais livres, quelante de metais de transição, inibitória de enzimas e sequestrante de oxigênio singlete (COS et al., 2003).

Cai et al. (2004) observaram uma correlação negativa entre o consumo de compostos fenólicos e o desenvolvimento de câncer. Os autores avaliaram 112 plantas, pertencentes a 50 famílias e observaram uma correlação positiva entre a atividade antioxidante e a presença de compostos fenólicos, incluindo os taninos.

1.3 Danos basais em biomoléculas: oxidação

Os radicais livres ou ERO apresentam papel fisiológico importante, envolvidos na sinalização celular, proliferação, diferenciação e morte celular. Contudo gerados em excesso pelos tecidos dos organismos vivos, têm sido associados a danos ao DNA, proteínas, lipídeos e carboidratos. O estresse oxidativo é decorrente de um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e as espécies oxidantes formadas. Fortes evidências apontam no sentido de que a ocorrência de bases oxidadas no DNA genômico e mitocondrial leva ao surgimento de mutações ao longo da vida de um indivíduo, podendo contribuir para o desenvolvimento de tumores (LOUREIRO et al., 2002; VALKO et al., 2004; MCELIGOT et al., 2005).

Os agentes que levam a esses danos incluem produtos normais do metabolismo celular, como as ERO, produtos da peroxidação lipídica, agentes alquilantes, estrógenos, ERN, agentes clorinantes e certos intermediários de algumas vias metabólicas, além de fontes exógenas inevitáveis, tais como radiação UV, radiação ionizante, radioisótopos de ocorrência natural e numerosas substâncias químicas genotóxicas presentes naturalmente ou como contaminantes na dieta e no ar (LOUREIRO et al., 2002).

Muitos dos danos endógenos observados no DNA correspondem a oxidações de bases. Vários são os oxidantes responsáveis pela oxidação de bases do DNA. O radical hidroxila (HO^{\bullet}) é extremamente reativo, podendo se adicionar a bases do DNA ou abstrair átomos de hidrogênio das mesmas e originar muitos dos produtos observados no genoma. É provável que o radical HO^{\bullet} desempenhe um papel na oxidação endógena do DNA, mas a sua formação deve ser imediatamente adjacente à molécula de ácido nucléico para que os danos sejam gerados. Neste caso o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) seria a espécie que se difundiria até o DNA, onde reagiria com íons metálicos gerando o oxidante (LOUREIRO et al., 2002).

As ERO e ERN podem danificar não só o DNA, mas também outros componentes celulares. Devido à sua abundância nas células e susceptibilidade à oxidação pela presença de grupos metilênicos entre ligações duplas, os ácidos graxos poliinsaturados são, para os oxidantes, alvos mais prováveis do que o DNA. Os produtos da peroxidação lipídica, tais como radical peroxila e aldeídos de cadeia curta podem também lesar o DNA (LOUREIRO et al., 2002).

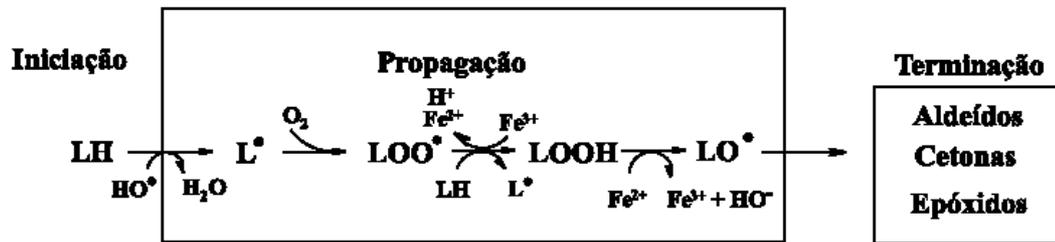
A oxidação de lipídeos ocorre em condições fisiológicas e consiste na oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, componentes básicos das membranas biológicas. Há duas vias, por meio das quais a peroxidação lipídica ocorre: a não-enzimática e a enzimática. Esses

processos resultam na formação de vários produtos reativos. A peroxidação lipídica não-enzimática consiste na oxidação de ácidos graxos poliinsaturados por radicais livres ou espécies reativas de oxigênio, enquanto na enzimática a formação de hidroperóxidos se dá pela inserção de uma molécula de oxigênio no centro ativo da lipooxigenase (HALLIWELL, 2007; MONTUSCHI; BARNES; ROBERTS, 2007)

A peroxidação lipídica se inicia pelo ataque à bicamada lipídica de qualquer espécie suficientemente reativa para abstrair um átomo de hidrogênio bis-alílico de um ácido graxo poliinsaturado. As espécies podem realizar essa oxidação são: HO[•], HO₂[•], NO₂[•], RO[•], RO₂[•]. Após iniciado, o processo se torna autocatalítico, levando à formação de hidroperóxidos e produtos secundários. É importante mencionar que a oxidação enzimática do ácido araquidônico, que ocorre durante a síntese de eicosanóides, é uma importante fonte de ERO. Além dos eicosanóides envolvidos na sinalização intra e intercelular, radicais de oxigênio e hidroperóxidos lipídicos são gerados durante as reações catalisadas por ciclooxigenases ou lipoxigenases. A peroxidação lipídica causa alterações na estrutura de membranas, especialmente, plasmática, com liberação de aldeídos α,β insaturados bioativos, tais como 4-hidróxi-2 nonenal, malonaldeído e acroleína (MONTUSCHI; BARNES; ROBERTS, 2007; NEGRE-SALVAYRE et al., 2007). Na membrana, ambos radicais de lipídios e de oxigênio, podem atacar resíduos de proteínas, principalmente grupamentos SH da cisteína, levando à formação de ligações cruzadas e agregação de proteínas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Dados da literatura indicam que o Ca⁺² potencia a produção mitocondrial de ERO e seus efeitos deletérios sobre a membrana mitocondrial (VERCESI et al., 2006; SCATENA et al., 2007).

Após a abstração do átomo de hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado (LH) levando à formação de um radical lipídico centrado no carbono (L[•]), este é estabilizado por um rearranjo molecular, adquirindo a estrutura de dieno conjugado. A adição extremamente rápida de uma molécula de oxigênio ao radical lipídico leva à formação do radical peroxila (LOO[•]). Este é capaz de reagir com outro ácido graxo poliinsaturado, iniciando uma nova cadeia de oxidação a partir da formação de outro radical lipídico (L[•]) (fase de propagação). O radical LOO[•] combina-se com o átomo de hidrogênio abstraído e forma um hidroperóxido lipídico (LOOH). Os radicais LOO[•] podem formar peróxidos cíclicos pelo ataque a uma dupla ligação na mesma cadeia. Esses peróxidos cíclicos também podem propagar a peroxidação lipídica e são instáveis na presença de metais de transição, tais como ferro e cobre, formando radicais alcoxila (LO[•]) e peroxila (LOO[•]) (FIGURA 1) (LOUREIRO et al., 2002; NEGRE-SALVAYRE et al., 2007).

A



B

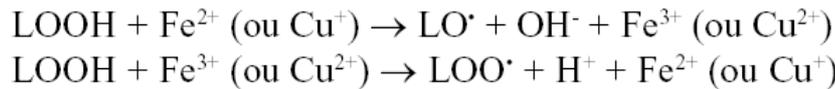


Figura 1- A-Representação geral das fases da peroxidação lipídica; B-Ação dos metais de transição na peroxidação lipídica (LOUREIRO et al, 2002).

Pode-se observar, portanto, que um único evento de iniciação leva à formação de várias moléculas de peróxidos como resultado da reação em cadeia. Um outro fator que aumenta a complexidade da peroxidação lipídica é que a abstração inicial de um átomo de hidrogênio pode ocorrer em diferentes pontos da cadeia de um ácido graxo poliinsaturado. Além disso, os radicais peróxido podem reagir de modo a formar peróxidos cíclicos e endoperóxidos (LOUREIRO et al., 2002).

A decomposição dos hidroperóxidos lipídicos é importante porque, além de gerar radicais que propagam a peroxidação lipídica, gera produtos não-radicalares. Esses produtos secundários (aldeídos, cetonas, epóxidos, entre outros) são mais estáveis do que os radicais livres que iniciaram o processo e os radicais lipídicos formados durante a fase de propagação. Conseqüentemente, podem atingir pontos distantes do local em que se formaram (LOUREIRO et al, 2002; NEGRE-SALVAYRE et al., 2007).

Os mecanismos pelos quais esses produtos secundários são gerados envolvem: cisão- β por clivagem homolítica entre o carbono do radical alcoxila e uma ligação C-C adjacente, originando um aldeído e um radical de hidrocarboneto que é estabilizado pela abstração de hidrogênio de uma outra molécula (esse mecanismo origina os gases etano e pentano, cujas medidas são utilizadas para a avaliação da peroxidação lipídica *in vivo*); estabilização do radical alcoxila, com formação do respectivo ácido oxodienólico ou ataque do radical alcoxila a uma dupla ligação adjacente, podendo formar epóxidos (NEGRE-SALVAYRE et al., 2007).

A peroxidação lipídica tem sido associada ao desenvolvimento de uma variedade de condições patológicas induzidas por exposição a agentes oxidantes. Considerando que os aldeídos α,β -insaturados (aqueles que apresentam uma dupla ligação C=C conjugada com o

grupo carbonila), variantes estruturais dos mesmos (tais como 4-hidroxi-2-alcenais e epoxialdeídos) e malonaldeído (MDA) são agentes alquilantes com capacidade de se ligarem covalentemente a grupos nucleofílicos presentes no DNA, peptídeos e proteínas, provocando alterações nas funções dessas moléculas, muitos trabalhos têm sugerido a implicação desses aldeídos em vários processos degenerativos associados ao estresse oxidativo (FIGURA 2) (TOYOKUNI; AKATSUKA, 2007).

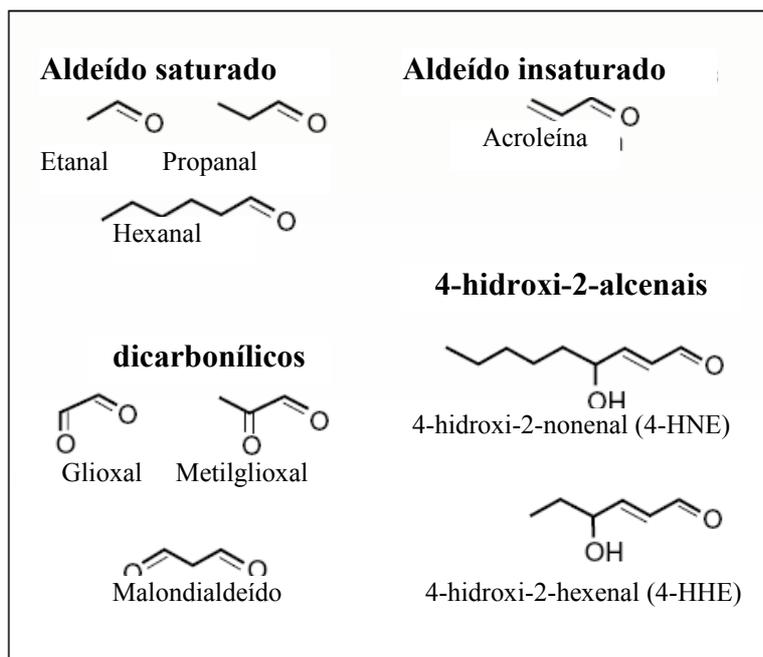


Figura 2-Fórmulas químicas de alguns aldeídos derivados da peroxidação lipídica (NEGRE-SALVAYRE et al., 2007).

A atividade da mieloperoxidase representa outra fonte endógena de formação de aldeídos α,β -insaturados. Na presença de H_2O_2 e Cl^- , esta enzima gera ácido hipocloroso (HOCl), que rapidamente reage com grupos tiol, dissulfeto e amino, formando cloraminas. Estas reagem com proteínas, modificando apenas os resíduos de Met e Cys expostos. Isto leva à inativação seletiva de enzimas, transportadores protéicos e peptídeos, incluindo $\alpha 1$ -inibidor de proteinase, $\alpha 2$ -macroglobulina e o ativador de plasminogênio (NASKALSKI; MARCINKIEWICZ; DROZDZ, 2002).

As cloraminas podem ainda perder o Cl^- e CO_2 , formando iminas que são hidrolisadas a aldeídos. No caso da Tre, o hidroxialdeído resultante sofre desidratação e origina acroleína, um potente eletrófilo exibindo alta reatividade com resíduos nucleofílicos tais como: Cys, His e Lys. Esta pode ser uma importante via de formação de alguns aldeídos em sítios de inflamação (NASKALSKI; MARCINKIEWICZ; DROZDZ, 2002).

A oxidação de proteínas ocorre como um efeito colateral do metabolismo aeróbio, por meio de radicais livres e como um efeito específico de granulócitos polimorfonucleares fagocíticos. A oxidação de proteínas leva a formação de carbonilas a partir dos aminoácidos, incluindo os aromáticos, que pode levar à alterações de enzimas e proteínas estruturais. A formação de carbonilas pode ocorrer também pela clivagem oxidativa do carbono α ou de resíduos glutamí. Os derivados carbonila podem ainda ser formados pela reação da cadeia lateral do aminoácido com produtos da peroxidação lipídica. O MDA reage com o grupamento amino da lisina, formando base de Schiff, que além de possuir função carbonila pode inativar a proteína. O 4-HNE pode reagir com resíduos de histidina, cisteína ou lisina levando a formação de adutos com estrutura hemiacetal. (FIGURA 3) (NEGRE-SALVAYRE et al., 2007; XU; CHANCE, 2007).

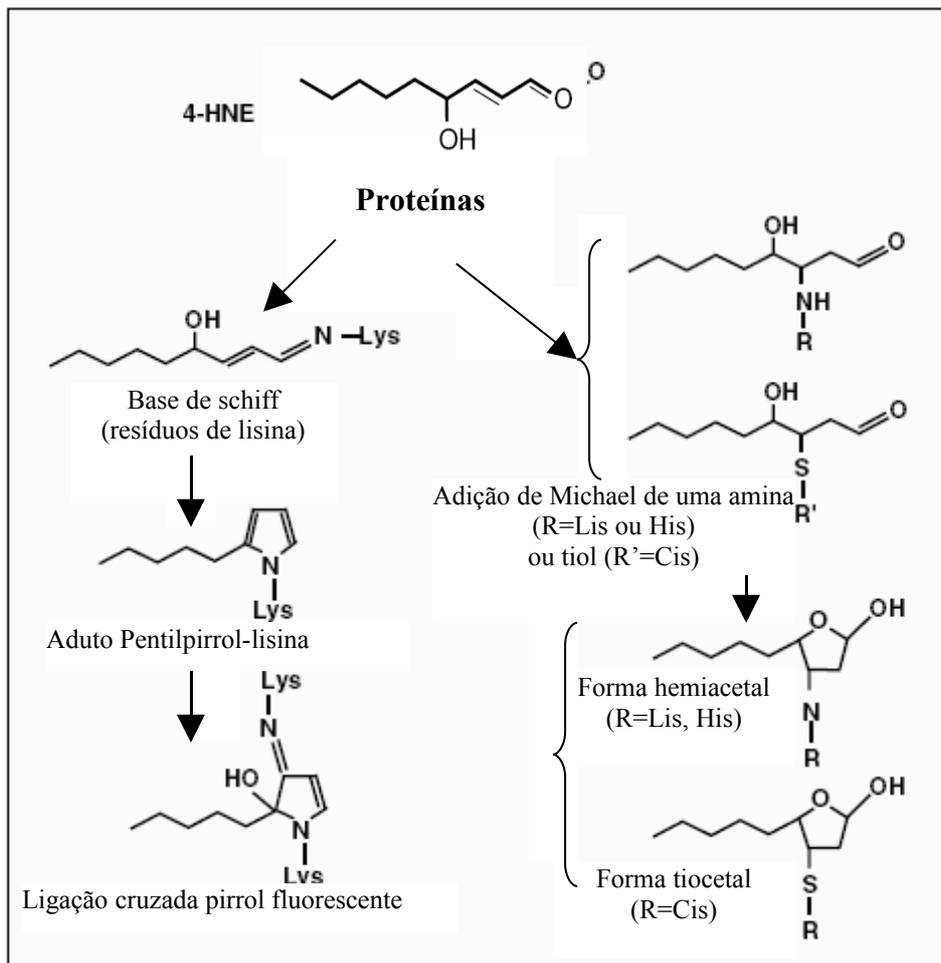


Figura 3-Reações esquemáticas do 4-Hidróxi-2-nonenal com proteínas levando a formação de adutos de proteína-4-HNE (NEGRE-SALVAYRE et al., 2007).

A oxidação dos aminoácidos alifáticos por HO• forma derivados hidroxilados e a oxidação de resíduos aromáticos forma radicais fenoxila a partir da tirosina e sua conversão a ditirosina. A oxidação de proteínas por HOCl é acompanhada por formação substancial de clorotirosina e pequena formação de ditirosina. Dopa e hidroxivalina e hidroxileucina representam duas categorias de intermediários reativos de longa duração. As proteínas ligadas à Dopa são capazes de reduzir íons metálicos e metaloproteínas, o que pode propagar as reações radiculares (XU; CHANCE, 2007).

O MDA e a acroleína (FIGURA 2) formados durante a peroxidação lipídica se ligam a compostos nucleofílicos. O MDA é um dos aldeídos mais abundantes resultante da peroxidação dos ácidos araquidônico, eicosapentenóico e docosaexenóico. Este reage com resíduos de Lys formando base de Schiff, sendo este o principal modificador de lipoproteínas de baixa densidade. A modificação de proteínas por aldeídos bifuncionais pode também levar à ligação cruzada inter e intramolecular. O acúmulo de adutos de MDA a proteínas leva a formação do pigmento lipofuscina, que se acumula nos lisossomos, progressivamente, com o envelhecimento (NEGRE-SALVAYRE et al., 2007).

Alguns medicamentos, especialmente os antineoplásicos, podem atuar por meio de reações de óxido-redução. Este é o caso da ciclofosfamida (CP) (FIGURA 3), uma droga antineoplásica (agente genotóxico), amplamente, utilizada para o tratamento de tumores malignos, tais como linfoma, mieloma múltiplo e leucemia, além de outros (MURATA et al., 2004). Apesar do amplo espectro de usos clínicos, a CP também apresenta muitos efeitos adversos como toxicidade hepática e renal. Diversos estudos têm mostrado que a exposição à CP pode alterar o balanço redox dos tecidos sugerindo que distúrbios bioquímicos e fisiológicos podem ser resultado do estresse oxidativo (HAQUE et al. 2001; SUGUMAR et al. 2007). Seus metabólitos podem interagir com macro moléculas como proteínas, lipídeos, RNA e principalmente DNA (DE SALVIA et al., 1999).

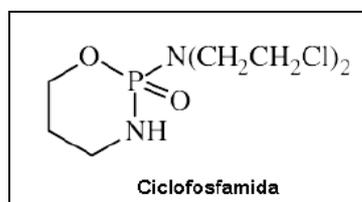


Figura 4-estrutura química da ciclofosfamida (MURATA et al. 2004).

A CP é metabolizada pela isoenzima hepática citocromo P450 2B1, convertendo-se a 4-hidroperoxi CP (4-HC). A 4-HC é prontamente convertida a 4-hidroxi-CP, sem ativação metabólica. A 4-hidroxi-CP é instável e sofre quebra espontânea gerando o intermediário

reativo fosforamida mostarda e acroleína (propanal). A fosforamida mostarda é convertida a íon aziridínio, que pode alquilar o N7 dos resíduos de guanosina do DNA. Esta reação com a guanosina da outra fita do DNA forma a ligação cruzada no DNA, sendo este considerado o mecanismo primário da ação da CP. Entretanto, a citotoxicidade da CP é também devida à fragmentação do DNA. Millar et al. (1986) demonstraram que a 4-HC é 250 e 2 vezes mais eficiente na indução de quebras de fita única do DNA e formação de sítios álcali-lábeis do que a CP e fosforamida mostarda respectivamente. Murata et al. (2004) demonstraram que a 4-HC induz apoptose de células HL-60, observado pela formação do padrão de DNA escada e a formação de 8-oxo-7,8-diidro-2-desoxiguanosina. Assim, a 4-HC pode liberar H_2O_2 , causando lesão oxidativa no DNA (FIGURA 4).

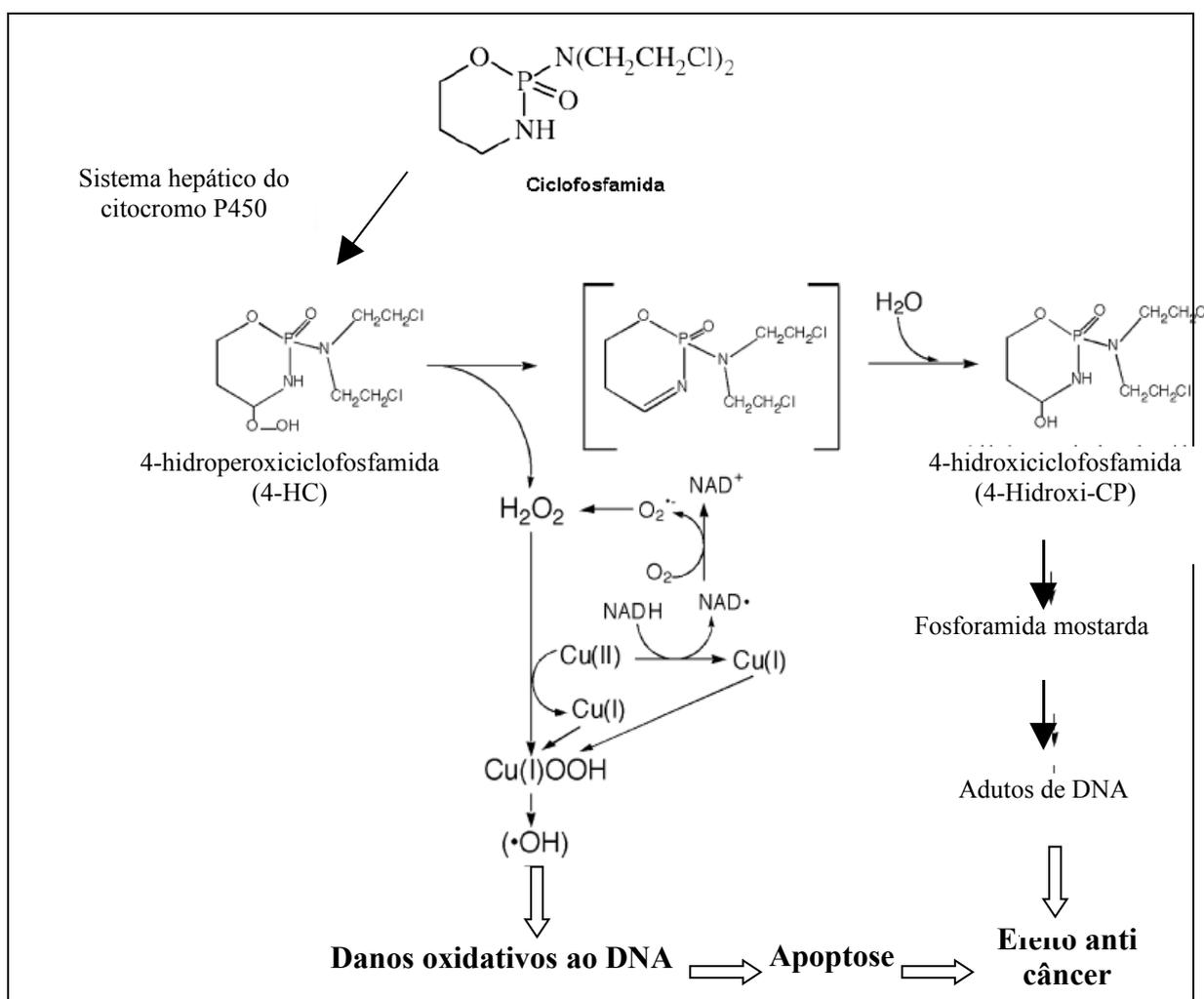


Figura 5- Mecanismo de geração de H_2O_2 e dano no DNA pelo 4-Hidroperóxiciclofosfamida (MURATA et al. 2004).

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERSANI-AMADO, C. A. et al. Avaliação das atividades antiinflamatória e antibacteriana do extrato bruto do *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão). **Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1996.

BORGES FILHO, H.; FELFILI, J. M. Avaliação dos níveis de extrativismo da casca de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] no Distrito Federal, Brasil. **Rev. Árvore**, v. 27, p. 735-745, 2003.

BURGER, M. E.; AHLERT, N.; BALDISSEROTTO, B.; LANGELOH, A.; SCHIRMER B.; FOLETTO, R. Analysis of the abortive and/or infertilizing activity of *Stryphnodendron adstringens* (Mart. Coville). **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.36, 1999.

CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sci.**, v. 74, p. 2157-2184, 2004.

COS, P., DE BRUYNE, T., HERMANS, N., APERS, S., BERGHE, D.V., VLIETINCK, A.J.. Proanthocyanidins in health care: current and new trends. **Curr. Med. Chem.**, v. 11, p. 1345-1359, 2003.

DE SALVIA, R.; FIORE, M.; AGLITTI, T.; FESTA, F.; RICORDY, R.; COZZI, R. Inhibitory action of melatonin on H₂ O₂ and cyclophosphamide- induced DNA damage. **Mutagenesis**, v.14, p.107–112, 1999.

DE SOUSA, N. C.; CARVALHO, S.; SPANÓ, M. A.; GRAF, U. Absence of genotoxicity of a phytotherapeutic extract from *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 41, p. 293-299, 2003.

DIXON, R.A.; XIE, D.Y.; SHARMA, S.B. Proanthocyanidins-a final frontier in flavonoid research? **New Phytol.**, v. 165, p. 9-28, 2005.

FELFILI, J. M.; SILVA JUNIOR, M. C.; DIAS, B. J.; REZENDE, A. V. Estudo fenológico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville no cerrado sensu stricto da Fazenda Água Limpa no Distrito Federal, Brasil. **Rev. Bras. Bot.**, v.22, p.83-90, 1999.

GENESTRA, M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. **Cell Signal.**, v. 19, p.1807-1819, 2007.

HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. New York: Oxford University Press. 3 ed., 1999.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 35, p.1147-50, 2007.

HAQUE, R.; BIN-HAFEEZ, I.; AHMAD, S.; PARVEZ, S.; PANDEY, S.; RAISUDDIN. Protective effects of *Embllica officinalis* Gaertn. in cyclophosphamide-treated mice. **Hum. Exp. Toxicol.**, v.20 p.643–650, 2001.

KOZIKOWSKI, A.P.; TUCKMANTEL, W.; BOTTCHER, G.; ROMANCZYK, L.J. Jr. Studies in polyphenol chemistry and bioactivity. 4.(1) Synthesis of trimeric, tetrameric, pentameric, and higher oligomeric epicatechin-derived procyanidins having all-4beta,8-interflavan connectivity and their inhibition of cancer cell growth through cell cycle arrest. **J.Org.Chem.**, v. 68, p. 1641-1658, 2003.

LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O.; DE SOUZA, P. T., Jr. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for antiinflammatory activity. **Phytother. Res.**, v. 12, p. 218-220, 1998.

LOUREIRO, A.P.M.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M. H. G. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. **Química Nova**, v. 25, p. 777-793, 2002.

MARTINS D. T., LIMA J.C., RAO V. S. The acetone soluble fraction from bark extract of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville inhibits gastric acid secretion and experimental gastric ulceration in rats. **Phytother. Res.**, v. 16, p. 427-431, 2002.

MCELIGOT, A. J.; YANG, S.; MEYSKENS JR., F. L. Redox regulation by intrinsic species and extrinsic nutrients in normal and cancer cells. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 25, p. 261-295, 2005.

MELLO, J.C.P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and prodelpinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 41, p. 807-813, 1996a.

MELLO, J.C.P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Prorobinetinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 42, p. 857-862, 1996b.

[MILLAR, B.C.](#); [TILBY, M.J.](#); [ORMEROD, M.G.](#); [PAYNE, A.W.](#); [JINKS, S.](#); [LOVEROCK, P.S.](#) Comparative studies of total cross-linking, cell survival and cell cycle perturbations in Chinese hamster cells treated with alkylating agents in vitro. **Biochem. Pharmacol.**, v. 35, p. 1163-11699, 1986.

MONTUSCHI, P.; BARNES, P.; ROBERTS, L.J. Insights into oxidative stress: the isoprostanes. **Curr. Med. Chem.**, v. 14, p. 703-717, 2007.

MURATA, M.; SUZUKI, T.; MIDORIKAWA, K.; OIKAWA, S.; KAWANISHI, S. Oxidative DNA damage induced by a hydroperoxide derivative of cyclophosphamide. **Free Radic. Biol. Med.**, V. 37, p. 793-802, 2004.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 29, p. 273-300, 1990.

NASKALSKI, J.W.; MARCINKIEWICZ, J.; DROZDZ, R. Myeloperoxidase-mediated protein oxidation: its possible biological functions. **Clin. Chem. Lab. Med.** v. 40, p. 463-468, 2002.

NEGRE-SALVAYRE, A.; COATRIEUX, C.; INGUENEAU, C.; SALVAYRE, R. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. **Br. J. Pharmacol.**, p. 1-15, 2007 doi:10.1038/sj.bjp.0707395

OKUDA, T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2012-2031, 2005.

ORDOÑEZ, A.A.L. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts **Food Chem.**, v. 97 p. 452-458, 2006.

PANIZZA, S.; ROCHA, A.B.; GECCHI, R.; SOUZA E.; SILVA, R.A.P. *Stryphnodendron barbadetiman* (vellozo) *martius*: teor em tanino na casca e sua propriedade cicatrizante. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.10, p.101-106, 1988.

RATNAM, D.V.; ANKOLA, D.D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D.K.; KUMAR, M.N. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **J. Control Release**, v. 113, p. 189-207, 2006.

REBECCA M. A.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; GRESPAN, R.; CUMAN, R.K.N.; CAPARROZ-ASSEF, S. M.; DE MELO, P.J.C.; BERSANI-AMADO C. A. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 83, p. 101-104, 2002.

REBECCA, M. A.; IWAMOTO, E. L. I.; BRACHT, A. M. K.; PAGADIGORRIA, C. L. S.; ASSEF, S. M. C.; MELLO, J. C. P.; AMADO, C. A. B. Efeito do extrato bruto liofilizado do barbatimão sobre mitocôndrias de fígado de rato. In: FESBE, 2001, Caxambu. Anais da FESBE. Caxambu : FESBE, 2001. v. 16. p. 414-414..

REBECCA, M.A.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; KELMER-BRACHT, A.M.; CAPARROZ-ASSEF, S.M.; CUMAN, R.K.; PAGADIGORRIA, C.L.; DE MELLO, J.C.; BRACHT, A.; BERSANI-AMADO, C.A. Effect of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimao) on energy metabolism in the rat liver. **Toxicol. Lett.**, v. 143, p. 55-63, 2003.

SANTOS, C. A. M.; TORRES, K. R.; LEONART, R. **Plantas medicinais** (Herbarium, Flora et Scientia). Curitiba: Scientia et Labor, p. 39, 1987.

SANTOS, S. C.; COSTA, W.F.; RIBEIRO, J.P.; GUIMARÃES, D.O.; FERRI, P.H.; FERREIRA, H.D.; SERAPHIN, J. C. Tannin composition of barbatimão species. **Fitoterapia**, v. 73, p. 292-299, 2002.

SCATENA, R.; BOTTONI, P.; BOTTA, G.; MARTORANA, G.E.; GIARDINA, B. The role of mitochondria in pharmacotoxicology: a reevaluation of an old, newly emerging topic. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 293, p.C12-C21. 2007.

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

SUGUMAR, E.; ABRAHAM, P.; KANAKASABAPATHY, I. Normal plasma creatinine level despite histological evidence of damage and increased oxidative stress in the kidneys of cyclophosphamide treated rats. **Clin. Chim. Acta**, v. 376, p. 244–245, 2007.

TOYOKUNI, S.; AKATSUKA, S. Pathological investigation of oxidative stress in the post-genomic era. **Pathol. Int.** v. 57, p. 461-473, 2007.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C. J.; TELSER, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 266, p. 37–56, 2004.

VERCESI, A.E.; KOWALTOWSKI, A.J.; OLIVEIRA, H.C.; CASTILHO, R.F. Mitochondrial Ca²⁺ transport, permeability transition and oxidative stress in cell death: implications in cardiotoxicity, neurodegeneration and dyslipidemias. **Front Biosci.**, v. 11, p. 2554-2564, 2006.

XU, G.; CHANCE, M.R. Hydroxyl radical-mediated modification of proteins as probes for structural proteomics. **Chem. Rev.**, v. 107, p. 3514-3543, 2007.

Phytomedicine

Antioxidant and antigenotoxic effects of *Stryphnodendron adstringens* (“barbatimão”) leaf extracts

P.R. Santos Filho^a, C.M.C.P. Gouvêa^{a*}

^aDepartamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714, 37130-000, Alfenas, MG, Brazil

*Corresponding author. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714, 37130-000, Alfenas, MG, Brazil

Tel.: +55 35 32991483; fax + 55 35 32991067

E-mail address: cibele gouvea@hotmail.com (C.M.C.P. Gouvêa)

Abstract

The aim of the present study was to determine the antioxidant and antigenotoxic effect of leaf extracts of *Styphnodendron adstringens* (“barbatimão”). The aqueous (AEB), water fraction (WFB) and ethanolic (EEB) extracts of leaves were obtained. We analyzed the antioxidant activity in vitro and in vivo and the effect against a genotoxic agent, cyclophosphamide (CP), of the extracts. The extracts presented high content of phenolic compounds, flavonoids and proanthocyanidins and antioxidant activity. The AEB and EEB were most efficient in brain, reducing TBARS formation while the WFB was most active in liver, decreasing protein oxidation. WFB inhibited the DNA lesion induced by CP. In conclusion all extracts presented antioxidant activity and WFB was antigenotoxic. WFB may be useful as cancer chemopreventive and/or anticarcinogenic agent.

Keywords: *Styphnodendron adstringens*, apoptosis, antioxidant, lipid peroxidation, protein oxidation, DNA ladder

Introduction

Stryphnodendron adstringens (Martius) Coville (Fabaceae), known as 'barbatimão', occurs in the central savannah region of Brazil and is a rich source of tannins (Santos et al., 2002) and proanthocyanidins (Mello et al., 1996a; b). Stem bark is the main part of the plant used popularly as an anti-inflammatory, astringent, in the treatment of wounds and vaginal infections (Santos et al., 1987; Panizza et al., 1988).

Polyphenolic compounds are widely distributed in higher plants and are an integral part of the human diet. Recent interest in these substances has been stimulated by their potential health benefits against chronic diseases, which are believed to arise mainly from their antioxidant activity (Croft, 1998). An important but often neglected group of polyphenolic compounds is that of the tannins, which can be further classified into three major groups, i.e. the hydrolysable, the condensed and the complex tannins (Cos et al., 2003). The condensed tannins, proanthocyanidins, are widely distributed in higher plants and they have proven to possess health benefits (Matsumoto et al., 2001; Okuda, 2005).

Several reports have proven the anti-ulcerogenic, anti-inflammatory, antibacterial (Lima et al., 1998; Audi et al., 1999), antiprotozoan (Holetz et al., 2005; Luize et al., 2005) and antifungal (Ishida et al., 2006) activity of bark extract of *S. adstringens*. However there are no reports on the antioxidant and antigenotoxic activity of this plant. The aim of the present study was to determine the antioxidant and antigenotoxic effect of leaf extracts of *S. adstringens*.

Materials and Methods

Plant material. Leaves of *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, (Fabaceae) were collected in may, 2006, in the city of Alfenas, at Minas Gerais - MG, Brazil, was identified and a voucher specimen was deposited at the University herbarium.

Preparation of leaf extract. The leaves were dried at 37° C and then pulverized. The aqueous extract (AEB) was obtained by decoction of 10 g of leaves in 100 mL of deionized water, at 90°, for 10 min and filtered. The water fraction (WFB) was remained after powder leaf extraction (100 g) with 70% (v/v) acetone aqueous solution (1L) and partitioning with ethyl acetate. The ethanol extract (EEB) was obtained by maceration of 100 g of powder in 1 L of 70% (v/v) ethanol aqueous solution and the solvent was evaporated under vacuum. All extracts were lyophilized and stored at -20° C, until use. For use the extracts were dissolved in deionized water.

Extract partial characterization. The total phenolic compounds (Woisk and Salatino, 1998), total flavonoids (Park et al., 1997) and proanthocyanidins content (Rösch et al., 2003) were determined.

Total antioxidant capacity. The total antioxidant capacity was determined (Prieto et al., 1999).

DPPH assay. The hydrogen atoms or electrons donation ability of the extracts was measured from the bleaching of purple colored methanol solution of DPPH according to Yen and Wu (1999).

Reducing power. The reducing power was determined according to the method of Oyaizu (1986).

Nitric oxide scavenging assay. Nitric oxide scavenging activity was measured spectrophotometrically according to Sreejayan and Rao (1997).

Animals and treatment. Male Wistar rats (120 ± 20 g) were housed with access to food and water *ad libitum*, and light-dark cycles of 12 h, were used. The animals were divided into eight groups (each group consisted of 6 rats). Control group received water; CP group received cyclophosphamide (40 mg/kg, orally), 24 h before euthanasia; extract groups received 500 mg/kg body wt, administered orally for 7 days and extract + CP groups received the extract for 7 days and CP 24 h before euthanasia.

Brain and liver analysis. After euthanasia, the brain and liver were quickly excised. Tissues were homogenized in 3 vol. of ice-cold phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) containing phenylmethylsulfonyl fluoride (1mM). The homogenate was centrifuged at $3000 \times g$ for 15 min. The supernatant was used for lipid peroxidation assay, through the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) based on Buege and Aust (1978) and for determination of protein carbonyl content (Mercier et al., 2004).

Protein assay. The total protein concentration was determined by the biuret method (Varley, 1988).

DNA ladder apoptosis assay. After euthanasia, the right femur was quickly removed and the bone marrow cells collected. The fragmented DNA of the cells was isolated using the SDS/Proteinase K/RNase A extraction method (DeSierve et al., 2002). The λ -Hind III was used as pattern of molecular weigh. The presence of apoptosis was indicated by the appearance of a ladder of oligonucleosomal DNA fragments that are approximately 180–200 bp multiples and the necrosis by the appearance of a smear on the agarose gel.

Statistical analysis. Data were analyzed using ANOVA with post hoc analysis by Tukey test. Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM).

Results and Discussion

The interplay between free radicals and antioxidants is important in maintaining health, aging and age-related diseases. Free radicals induce oxidative stress, which is balanced by the body's endogenous antioxidant systems with an input from co-factors, and by the ingestion of exogenous antioxidants. If the generation of free radicals exceeds the protective effects of antioxidants, this can cause oxidative damage which accumulates during the life cycle, and has been implicated in aging, and age dependent diseases such as cardiovascular disease, cancer, neurodegenerative disorders, and other chronic conditions (Rahman, 2007).

The partial characterization of the extract (Table 1) showed that EEB presented the higher phenolics and flavonoids content while the WFB presented the higher proanthocyanidins content.

All of the extracts tested exhibit antioxidant activity. The total antioxidant capacity of the extracts was: 147.85 ± 12.68 , 124.36 ± 7.18 and 148.64 ± 8.41 mg ascorbic acid/g extract, for AEB, WFB and EEB respectively. The free radical DPPH scavenging activity of the extracts was concentration-dependent and the maximum activity was achieved with $62 \mu\text{g/mL}$. The extracts showed a similar scavenging activity to ascorbic acid and higher than BHT (Fig. 1A). The extracts presented Fe^{3+} reducing capacity similar to ascorbic acid and higher than BHT and it was also concentration-dependent. The maximum reducing power was achieved with $250 \mu\text{g/mL}$ (Fig. 1B). The extracts showed no nitric oxide scavenging activity.

The antioxidant activity of plant compounds has been attributed to various mechanisms, including prevention of chain initiation, binding of transition metal ion catalyts, decomposition of peroxides, prevention of continued hydrogen abstraction, reductive capacity and radical scavenging (Cos et al., 2003). When antioxidative capacities of the extracts are compared to their phenolic content, it could be concluded that antioxidative nature of the

extracts might depend on their constituents. It has been reported that the antioxidant activity of phenolics was mainly due to their redox properties, hydrogen donors and single oxygen quenchers (Rice-Evans et al., 1995).

The DPPH assay is a conventional method for antioxidant activity analysis with a high level of sensitivity. The *in vitro* studies using DPPH method showed that all extracts present strong antioxidant activity. The mechanism involved in the reduction of DPPH free radicals is based on a scavenging activity. In this system, the structure (both planar and spatial) of the antioxidant compound, present in the extract, is important for its capacity of donating hydrogen ions. Based on the mechanism of reduction of the DPPH molecule, extensively described in the literature, and on previous knowledge of the chemistry of some plants, it is possible to infer that the strong antioxidant activity of some polar extracts is due, at least in part, to the presence of substances with an available hydroxyl group. Compounds able to donate hydrogen are derived from the shikimate pathway, as the flavonoids (Harborne and Williams, 2001; Mensor et al., 2001). In the present study all of the extracts showed DPPH scavenging activity, which could be attributed to its high total phenolic compounds and flavonoids content.

The *in vivo* studies showed that all extracts showed antioxidant activity, but they acted differently in brain and liver (Table 2). The AEB and EEB were most efficient in brain, reducing TBARS formation while the WFB was most active in liver, decreasing protein oxidation.

As for DNA fragmentation depicted in Fig. 2, it can be seen that cyclophosphamide (CP), a genotoxic agent, induced apoptosis, confirmed by the DNA ladder pattern. The AEB neither induce apoptosis nor protected cells from the effects of CP. The WFB was antigenotoxic, as it did not induce apoptosis and protected cells from the apoptotic effect of CP. The EEB induced necrosis, as seen by the intense DNA lesion (smear).

Membranes and lipids are particularly susceptible to the oxidant process and to the peroxidative reaction induced by free radicals. Lipid peroxidation is characteristically a free radical chain reaction initiated by the abstraction of a hydrogen atom from a polyunsaturated fatty acid side chain. The initiation of lipid peroxidation is carried out in most cases by free radicals, causing cellular injury by inactivation of membrane enzymes and receptors, depolymerisation of polysaccharides as well as protein cross-linking and fragmentation. Lipid peroxidation is found to be an important pathophysiological event in chronic diseases. Alkoxy and peroxy radicals formed eventually yield numerous carbonyl products such as (MDA). The carbonyl cytotoxic products are responsible for DNA damage and protein oxidation, causing gene and chromosome alteration, protein modification and inactivation (Barrera et al., 2007).

Oxidative stress is involved in the activation of transcription factors and the triggering of apoptosis (Chandra et al., 2000). Apoptosis is a process of cell death that is critically regulated based on the expression of cell's intrinsic suicide machinery, which further leads to the characteristic pattern of morphological, biochemical, and molecular changes. The present study showed typical apoptotic characteristics such as laddering of DNA induced by cyclophosphamide and EEB. The WFB prevented the DNA fragmentation induced by CP, being antigenotoxic.

It has been shown that apart from flavonoids, proanthocyanidins have antioxidant properties. They presented free radical scavenging, chelation of transition metals, inhibition of lipid peroxidation activity and these compounds possess chemopreventive properties through different mechanisms of action, including apoptotic-modulating and antioxidant activities (Cos et al., 2003). In the present work the extracts showed the presence of proanthocyanidins and also those properties already described. The WFB was antigenotoxic, as it inhibited DNA laddering formation, caused by CP, which may be attributed to its proanthocyanidins content.

It should be pointed out that popularly the bark is the most used part of the medicinal plant *S. adstringens* and the decontrolled extractivism put this plant under the risk of extinction (Ibama, 2007). We used leaves that can assure a sustainable use of the plant.

In conclusion, this study demonstrates that all extracts presented antioxidant activity and WFB was antigenotoxic. WFB may be useful as cancer chemopreventive and/or anticarcinogenic agent.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge financial support (Process 1305-06) and fellowship received from FAPEMIG (Fundação de apoio à pesquisa de Minas Gerais).

References

- Audi, E.A., Toledo, D.P., Peres, P.G., Kimura, E., Pereira, W.K., Melo, J.C., Nakamura, C., Alves-do-Prado, W., Cumam, R.K., Bersani-Amado, C.A., 1999. Gastric antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens* in rats. *Phytother. Res.* 13, 26426-6.
- Barrera, G., Pizzimenti, S., Dianzani, M.U., 2007. Lipid peroxidation: control of cell proliferation, cell differentiation and cell death. *Mol. Aspects Med.* doi:10.1016/j.mam.2007.09.012.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* 52, 302-310.
- Chandra, J., Samali, A., Orrenius, S., 2000. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 323-333.
- Cos, P., De Bruyne, T., Hermans, N., Apers, S., Berghe, D.V., Vlietinck, A.J., 2003. Proanthocyanidins in health care: current and new trends. *Curr. Med. Chem.* 11, 1345-1359.
- Croft, K.D., 1998. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Ann. NY. Acad. Sci.* 854, 435-442.

DeSiervi, A., Vazquez, E.S., Rezaval, C., Rossetti, M.V., del Batlle, A.M., 2002. Delta-aminolevulinic acid cytotoxic effects on human hepatocarcinoma cell lines. *BMC Cancer*, 2, 6.

Harborne, J.B., Williams, C.A., 2001. Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep.* 18, 310-333.

Holetz, F.B., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P., Mello, J.C.P., Morgado-Díaz, J.A., Toledo, C.E.M., Nakamura, C.V., 2005. Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpeσοai*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 100, 397-401.

Ibama. Plantas medicinais ameaçadas de extinção.

<<http://www.ibama.gov.br/flora/divs/plantasextincao.pdf>>, accessed 30/11/2007.

Ishida, K., Mello, J.C., Cortez, D.A. Filho, B.P., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C.V., 2006. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 942-949.

Lima, J.C.S., Martins, D.T.O., De Souza, P.T., 1998. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for anti-inflammatory activity. *Phytother. Res.* 12, 218-220.

Luize, P.S., Tiuman, T. S., Morello, L. G., Maza, P. K., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho B. P., Cortez, D. A. G., Mello, J. C. P., Nakamura, C. V., 2005. Effects of medicinal extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Braz. J. Pharm. Sc.* 41, 1-10.

Matsumoto, H., Inaba, H., Kishi, M., Tominanga, S., Hirayama, Tusda, M. T., 2001. Orally administrated delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms. *J. Agric. Food Chem.* 49, 1546-1551.

Mello, J.C.P., Petereit, F., Nahrstedt, A., 1996a. Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry*, 41, 807-813.

- Mello, J.P., Petereit, F., Nahrstedt, A., 1996b. Prorobinetinidins from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry*. 42, 857-862.
- Mensor, L.L., Menezes, F.S., Leitão, G.G., Reis, A.S., Santos, T.C., Coube, C.S., 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother. Res.* 15, 27-30.
- Mercier, Y., Gatellier, P., Renerre, M., 2004. Lipid and protein oxidation in vitro, and antioxidant potential in meat from Charolais cows finished on pasture or mixed diet. *Meat Sc.* 66, 467-473.
- Okuda, T., 2005. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry*. 66, 2012-2031.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn. J. Nutr.* 44, 307-315.
- Panizza, S., Rocha, A.B., Gecchi, R., Silva, R.A.P.S., 1988. *Stryphnodendron barbadetiman* (Vellozo) Martius: teor em tanino na casca e sua propriedade cicatrizante. *Rev. Ciênc. Farmac.* 10, 101-106.
- Park, Y.K., Koo, M.H., Ikegaki, M., Contado, J.L., 1997. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Arq. Biol. Tecnol.* 40, 97-106.
- Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem.* 269, 337-341.
- Rahman, K., 2007. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors, *Clin. Interv. Aging.* 2, 219-236.

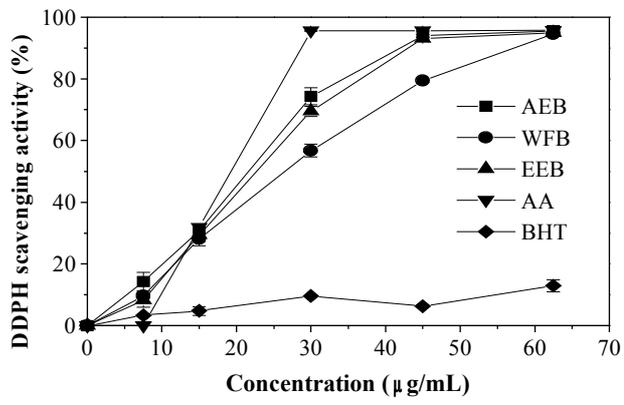
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B., 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic. Res.* 22, 375-383.
- Rosch, D., Bergmann M., Knorr, D., Kroh, L.W., 2003. Structure-antioxidant efficiency relationships of phenolic compounds and their contribution to the antioxidant activity of sea buckthorn juice. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4233-4239.
- Santos, C.A.M., Torres, K.R., Leonart, R., 1987. Plantas medicinais (Herbarium, Flora et Scientia). *Scientia et Labor, Curitiba*, pp. 39.
- Santos, S.C., Costa, W.F., Ribeiro, J.P., Guimarães, D.O., Ferri, P.H., Ferreira, H.D., Seraphin, J.C. 2002. Tannin composition of barbatimão species. *Fitoterapia.* 73, 292-299.
- Sreejayan, N., Rao, M.N.A., 1997. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J. Pharm. Pharmacol.* 49, 105-107.
- Varley, H. 1988. The plasma proteins. In: Varley, H. (Ed.), *Practical Clinical Biochemistry*. CBS, Delhi, pp. 236-238.
- Woisk, R.G., Salatino, A., 1998. Analisis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apicult. Res.* 37, 99-105.
- Yen, G., Wu, J., 1999. Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*. *Food Chem.* 65, 375-379.

Figure legends

Fig 1. Antioxidant activities of barbatimão leaf extracts. A, DPPH scavenging activity; B, reducing power. AEB, aqueous extract; WFB, water fraction; EEB, ethanolic extract; AA, acid ascorbic (standard); BHT, butylated hydroxytoluene (standard).

Fig. 2. Effect of barbatimão leaf extracts on apoptosis in bone marrow cells of rats. 1, 123 bp ladder marker; 2, Control; 3, Cyclophosphamide (CP); 4, Aqueous extract (AEB); 5, AEB plus CP; 6, Water fraction (WFB); 7, WFB plus CP; 8, ethanolic extract (EEB); 9, EEB plus CP. DNA ladder formation indicates apoptosis as seen in lanes 3 and 5 and DNA smear as seen in lanes 8 and 9 indicates necrosis.

A



B

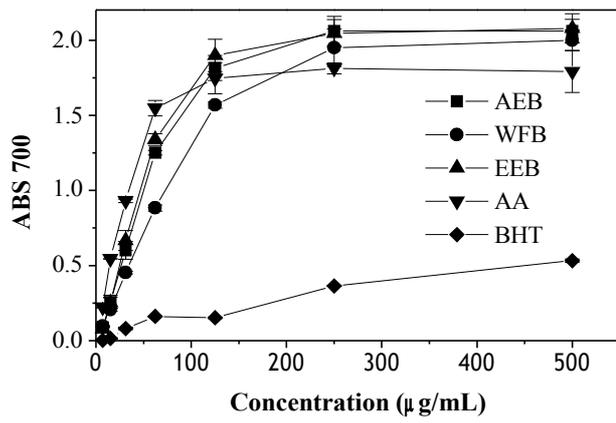


Fig 1.

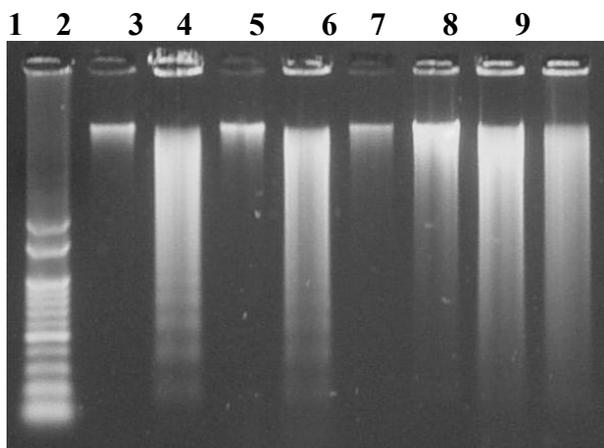


Fig. 2.

Table 1. Barbatimão leaf extracts total phenolic compounds, flavonoids and proanthocyanidins content

Extracts	Content		
	Phenolics (%)	Flavonoids (%)	Proanthocyanidins (μM)
AEB	32.00 \pm 2.05 ^a	5.02 \pm 0.29 ^{ab}	23.32 \pm 1.75 ^a
WFB	23.93 \pm 1.29 ^b	3.63 \pm 0.22 ^a	35.40 \pm 2.10 ^b
EEB	34.94 \pm 2.95 ^a	6.44 \pm 0.19 ^b	24.75 \pm 1.28 ^a

AEB, aqueous extract; WFB, water fraction and EEB, ethanolic extract of barbatimão leaves. The results are mean \pm SEM of three independent experiments (N=5). Different letters in columns indicate significantly difference ($p < 0.05$) by the Tukey test.

Table 2. Effect of barbatimão leaf extracts on lipid (TBARS) and protein (carbonyl content) oxidative damage in rat brain and liver

Groups	TBARS (μM MDA/mg protein)		Carbonyl (mM DNPH/mg protein)	
	Brain	Liver	Brain	Liver
Control	1.011 \pm 0.200 ^a	0.060 \pm 0.011 ^a	0.056 \pm 0.007 ^a	0.023 \pm 0.003 ^a
CP	0.753 \pm 0.095 ^a	0.071 \pm 0.011 ^a	0.078 \pm 0.010 ^a	0.020 \pm 0.002 ^a
AEB	0.583 \pm 0.114 ^b	0.100 \pm 0.009 ^a	0.143 \pm 0.008 ^b	0.015 \pm 0.002 ^a
AEB+CP	0.864 \pm 0.075 ^a	0.082 \pm 0.013 ^a	0.098 \pm 0.004 ^a	0.018 \pm 0.002 ^a
WFB	0.699 \pm 0.086 ^a	0.087 \pm 0.009 ^a	0.068 \pm 0.008 ^a	0.013 \pm 0.001 ^b
WFB+CP	0.864 \pm 0.086 ^a	0.149 \pm 0.009 ^b	0.126 \pm 0.014 ^b	0.012 \pm 0.001 ^b
EEB	0.536 \pm 0.068 ^b	0.074 \pm 0.005 ^a	0.046 \pm 0.004 ^a	0.034 \pm 0.002 ^c
EEB+CP	1.096 \pm 0.280 ^a	0.067 \pm 0.005 ^a	0.092 \pm 0.012 ^a	0.040 \pm 0.001 ^c

AEB, aqueous extract; WFB, water fraction and EEB, ethanolic extract of barbatimão leaves; CP, cyclophosphamide. The results are mean \pm SEM of three independent experiments (N=6). Different letters in columns indicate significantly difference ($p < 0.05$) by the Tukey test.