

CARLA ADRIANA HARTMANN VIEIRA MIYASHIRO  
MESTRADO PROFISSIONAL EM FARMÁCIA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E  
ANTIINFLAMATÓRIA DO FLAVONÓIDE RUTINA E DERIVADOS  
CONTENDO METAL DE TRANSIÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de  
Mestrado Profissional em Farmácia da  
Universidade Bandeirante de São Paulo  
como requisito para obtenção do título de  
Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Eunice  
Okuyama

SÃO PAULO  
2010

Miyashiro, Carla Adriana Hartmann Vieira  
Avaliação da atividade antioxidante e antiinflamatória do flavonóide rutina e derivados contendo metal de transição / Carla Adriana Hartmann Vieira Miyashiro. – São Paulo: [s.n.], 2010.  
82 f; il.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado – Universidade Bandeirante de São Paulo - Programa de Farmácia.  
Orientadora: Profa. Dra. Cristina Eunice Okuyama

1. Flavonóides 2. Rutina 3. Superóxido 4. Migração celular 5. Neutrófilo 6. Inflamação 7. Mieloperoxidase 8. Radical livre 9. Peritonite 10. Metal de transição

## DEDICATÓRIA

Dedico ao meu marido pelo apoio incondicional e aos meus filhos que muitas vezes souberam compreender minha ausência.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao técnico de laboratório Ivair, pelo valioso aprendizado em manipular os animais, e sua contribuição valiosa sobre as técnicas empregadas neste projeto.

A todos os alunos de iniciação científica que fazem parte do laboratório de Farmácia da Universidade Bandeirante de São Paulo em especial ao aluno Daniel.

A minha orientadora pela imensa ajuda e compreensão no decorrer do projeto.

A Professora Dra. Regina Mara da Silva Pereira por ceder a droga teste.

A Universidade Bandeirante de São Paulo e a FAPESP por financiar e dar condições para a condução da pesquisa.

## RESUMO

Desde sua descoberta, os flavonóides são alvos de diversas pesquisas devido a seu grande potencial de ação sobre o organismo. A rutina, um flavonóide, possui atividade antiinflamatória e antioxidante. Existem estudos que demonstram sinergismo positivo quando um flavonóide é administrado concomitantemente com alguns metais de transição, como o cobre, zinco, níquel e ferro.

Neste trabalho foi avaliada uma possível potencialização das atividades antioxidante e antiinflamatória do flavonóide rutina após complexação com metais de transição, através dos ensaios de seqüestro do radical superóxido (in vitro) e na peritonite em camundongos (in vivo).

Nos resultados da avaliação da atividade antioxidante foi demonstrado que em todas as concentrações de rutina, R-Ni<sub>2</sub>, R-Cu<sub>2</sub> e R-Fe<sub>1</sub> (1, 10 e 100µM) foram observadas atividades antioxidantes dos compostos pelo seqüestro de radicais superóxido. Assim, pode-se sugerir que a complexação do flavonóide com metal de transição aumenta a atividade antioxidante do composto. No entanto, quando se compara a melhora da capacidade de seqüestro do radical superóxido da rutina isolada, foi observado que a R-Cu<sub>2</sub> apresentou um aumento significativo desta atividade nas concentrações de 10 e 100µM (P<0,05).

Na avaliação antiinflamatória os resultados obtidos demonstram que a rutina complexada com cobre II (R-Cu<sub>2</sub>) apresentou uma redução na migração celular no modelo de peritonite induzida pela carragenina, bradiginina e PGE<sub>2</sub>. Entretanto, na peritonite induzida pela histamina e substância P, tanto o complexo quanto a rutina isolada, não apresentaram atividade frente a migração celular total.

Todavia pode-se concluir que o flavonóide rutina complexado com metal cobre II apresentou um aumento na atividade de seqüestro do radical superóxido e inibição na migração celular.

Palavras-chave: flavonóides, superóxido, migração celular, estresse oxidativo.

## ABSTRACT

Since its discovery, the flavonoids are the subject of numerous studies due to its great potential to act on the body. Rutin, a flavonoid, possesses anti-inflammatory and antioxidant. Studies show positive synergism when a flavonoid is administered concomitantly with some transition metals such as copper, zinc, nickel and iron.

We assessed a possible enhancement of antioxidant and anti-inflammatory flavonoid rutin after complexation with transition metals by the assay of scavenging the superoxide (in vitro) and peritonitis in mice (in vivo). The results of the evaluation of antioxidant activity was demonstrated in all concentrations of phenolic compounds, R-Ni<sub>2</sub>, Cu<sub>2</sub> R-and R-Fe<sub>1</sub> (1, 10 and 100µM) were observed antioxidant activity of compounds for the scavenging of superoxide radicals. Thus, it can be suggested that the complexation of flavonoid-metal transition increases the antioxidant activity of the compound. However, when comparing the improved ability of scavenging the superoxide free of rutin, it was observed that the R-Cu<sub>2</sub> showed a significant increase of activity at concentrations of 10 and 100µM (P <0.05). In evaluating the anti-inflammatory results show that rutin complexed with copper II (Cu<sub>2</sub>-R) showed a reduction in cell migration in the model of peritonitis induced by carrageenan, bradykinin and PGE<sub>2</sub>. However, in peritonitis induced by histamine and substance P, both the complex as free rutin did not show activity against total cell migration. However it can be concluded that the flavonoid rutin complexed with copper II showed an increase in activity of superoxide radical sequestration and inhibition of cell migration.

Keywords: flavonoids, superoxide, cell migration, oxidative stress.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 - Estrutura química básica dos flavonóides.....	03
Figura 02 - Estrutura molecular da rutina.....	04
Figura 03 – Diapedese.....	09
Figura 04 – Liberação de radicais livres pelo neutrófilo.....	12
Figura 05 - Reação de formação do radical superóxido e redução do NBT.....	20
Figura 06 - Curva de absorção em 560nm versus o tempo expresso em segundos. A curva controle demonstra o nível de absorção no qual todo o NBT disperso no meio se reduz à formazan. As demais curvas representam a rutina isolada e a rutina complexada ao Níquel-II, ambas nas seguintes concentrações: 1, 10 e 100µM.....	30
Figura 07 - Atividade antioxidante no seqüestro do radical superóxido, demonstrado em porcentagem, da R-Ni2 quando comparada a Rutina isolada, em diferentes concentrações (1, 10 e 100 µM) durante o tempo de 300s.....	31
Figura 08 - Curva de absorção em 560nm versus o tempo expresso em segundos. A curva controle demonstra o nível de absorção no qual todo o NBT disperso no meio se reduz à formazan. As demais curvas representam a rutina isolada e a R-Fe1, ambas nas seguintes concentrações: 1, 10 e 100µM.....	32
Figura 09 - Atividade antioxidante no seqüestro do radical superóxido, demonstrado em porcentagem, da R-Fe1 quando comparada a Rutina, em diferentes concentrações (1, 10 e 100µM) durante o tempo de 300s.....	33
Figura 10 - Curva de absorção em 560nm versus o tempo expresso em segundos. A curva controle demonstra o nível de absorção no qual todo o NBT disperso no meio se reduz à formazan. As demais curvas representam a rutina isolada e a rutina complexada ao Cobre-II, ambas nas seguintes concentrações: 1, 10 e 100 µM.....	34
Figura 11 - Atividade antioxidante no seqüestro do radical superóxido, demonstrado em porcentagem, da R-Cu2 quando comparada a Rutina, em diferentes concentrações (1, 10 e 100 µM) durante o tempo de 300s.....	35
Figura 12 - Atividade antioxidante no seqüestro do radical superóxido, demonstrado em porcentagem, da rutina, R-Cu2, R-Ni2 e R-Fe1, em diferentes concentrações (1, 10 e 100 µM) durante o tempo de 300s.....	36

Figura 13 - Avaliação da atividade antiinflamatória da rutina isolada (Rut) e da rutina complexada ao cobre-II (R-Cu <sub>2</sub> ), quando administradas via oral nas concentrações de 10 e 100mg/kg, sobre a migração leucocitária induzida pela peritonite aguda tendo como agente flogístico a carragenina.....	38
Figura 14 - Representação da contagem diferencial celular: (■) neutrófilo, (■) linfócito e (■) monócito, na cavidade peritoneal após indução da peritonite por carragenina, nos grupos controle, dexametasona (5mg/kg), rutina e R-Cu <sub>2</sub> (10 e 100 mg/kg).....	39
Figura 15 - Atividade antiinflamatória da rutina isolada (Rut) e da rutina complexada ao cobre-II (R-Cu <sub>2</sub> ), quando administradas via oral nas concentrações de 10 e 100mg/kg, sobre a migração leucocitária induzida pela peritonite aguda tendo como agente flogístico a histamina.....	40
Figura 16 - Representação da contagem diferencial celular: (■) neutrófilo, (■) linfócito e (■) monócito, na cavidade peritoneal após indução da peritonite por histamina, nos grupos controle, dexametasona (5mg/kg), rutina e R-Cu <sub>2</sub> (10 e 100 mg/kg).....	41
Figura 17 - Atividade antiinflamatória da rutina isolada (Rut) e da rutina complexada ao cobre-II (R-Cu <sub>2</sub> ), quando administradas via oral nas concentrações de 10 e 100mg/kg, sobre a migração leucocitária induzida pela peritonite aguda tendo como agente flogístico a bradicinina.....	42
Figura 18 - Representação da contagem diferencial celular: (■) neutrófilo, (■) linfócito e (■) monócito, na cavidade peritoneal após indução da peritonite por bradicinina, nos grupos controle, dexametasona (5mg/kg), rutina e R-Cu <sub>2</sub> (10 e 100 mg/kg).....	43
Figura 19 - Atividade antiinflamatória da rutina isolada (Rut) e da rutina complexada ao cobre-II (R-Cu <sub>2</sub> ), quando administradas via oral nas concentrações de 10 e 100mg/kg, sobre a migração leucocitária induzida pela peritonite aguda tendo como agente flogístico a prostaglandina E <sub>2</sub> .....	44
Figura 20 - Representação da contagem diferencial celular: (■) neutrófilo, (■) linfócito e (■) monócito, na cavidade peritoneal após indução da peritonite por PGE <sub>2</sub> , nos grupos controle, dexametasona (5mg/kg), rutina e R-Cu <sub>2</sub> (10 e 100mg/kg).....	45
Figura 21 - Atividade antiinflamatória da rutina isolada (Rut) e da rutina	

complexada ao cobre-II (R-Cu<sub>2</sub>), quando administradas via oral nas concentrações de 10 e 100mg/kg, sobre a migração leucocitária induzida pela peritonite aguda tendo como agente flogístico a substância P..... 46

Figura 22 - Representação da contagem diferencial celular: (■) neutrófilo, (■) linfócito e (■) monócito, na cavidade peritoneal após indução da peritonite por substância P, nos grupos controle, dexametasona (5mg/kg), rutina e R-Cu<sub>2</sub> (10 e 100mg/kg)..... 47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Grupos divididos de acordo com o tratamento.....	23
Tabela 02 - Volumes administrados e tempo de tratamento de cada agente flogístico.....	25
Tabela 03 – Capacidade antioxidante da rutina e derivados contendo metal de transição.....	37
Tabela 04 – Porcentagem de inibição dos nº de leucócitos totais migrantes para cavidade peritoneal.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA: ácido araquidônico

B<sub>2</sub>: receptores de bradicinina 2

BK: bradicinina

Ca<sup>2+</sup>: cálcio

COX: cicloxigenase

COX-1: cicloxigenase-1

COX-2: cicloxigenase-2

COX-3: cicloxigenase-3

CR: receptor de complemento

DAG: diacilglicerol

DNA: ácido desoxirribonucléico

FC $\bar{\delta}$ R: receptor de porção FC

GTP: guanosina trifosfato

H1: receptor de histamina 1

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio

ICAM-1: molécula de adesão endotelial-1

IL-8: interleucina-8

IL-10: interleucina-10

iNOS: óxido nítrico sintetase

IP: intraperitoneal

LOX: lipoxigenase

LT: leucotrieno

MPO: mieloperoxidase

NADH: dinucleotídeo nicotinamida adenina

NADPH: forma reduzida do dinucleotídeo nicotinamida adenina

NBT: Nitrobluetetrazolium

NK: natural killer

NO: óxido nítrico

PBS: tampão salina fosfato

PGE<sub>2</sub>: prostaglandina E<sub>2</sub>

PGF<sub>2</sub>: prostaglandina F<sub>2</sub>  
PIP<sub>2</sub>: fosfatidilinositol 4,5 bifosfato  
PK: proteína quinase  
PLA<sub>2</sub>: prostaglandina A<sub>2</sub>  
PLD:fosfolipase D  
PMN: polimorfonucleado  
PMS: phenazine methosulfate  
R-Cu: rutina cobre  
R-Fe: rutina ferro  
R-Ni: rutina níquel  
RNS: espécie reativa de nitrogênio  
ROS: espécie reativa de oxigênio  
SOD: superóxido dismutase  
TNF: fator de necrose tumoral  
TXA<sub>2</sub>: tromboxano A<sub>2</sub>  
V-CAM: molécula de adesão vascular

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	03
2.1 CARACTERÍSTICAS DOS FLAVONÓIDES.....	03
2.1.1 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS FLAVONÓIDES.....	04
2.2 RADICAIS LIVRES.....	05
2.3 FISIOPATOLOGIA DA INFLAMAÇÃO.....	07
2.3.1 MARGINAÇÃO, ROLAMENTO E ADESÃO.....	08
2.3.2 CITOCINAS E A LIBERAÇÃO DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE.....	09
2.3.3 ÁCIDO ARAQUIDÔNICO.....	13
2.3.4 ATIVIDADE DOS FLAVONÓIDES NO PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	14
2.4 FLAVONÓIDES E METAL DE TRANSIÇÃO.....	16
<b>3. OBJETIVO</b> .....	18
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	19
4.1 PREPARAÇÃO DAS DROGAS COMPLEXADAS.....	19
4.2 ENSAIOS DE TRIAGEM DA EFICÁCIA DAS DROGAS COMPLEXADAS ATRÁVES DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	19
4.2.1 SEQUESTRO DOS RADICAIS SUPERÓXIDO.....	20
4.2.1.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	20
4.2.1.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	21
4.3 ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA.....	22
4.3.1 ANIMAIS.....	22
4.3.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	23
4.3.3 MANIPULAÇÃO DA SUSPENSÃO.....	24
4.3.4 PREPARAÇÃO DOS AGENTES FLOGÍSTICOS.....	24

4.3.5 PERITONITE INDUZIDA POR DIFERENTES AGENTES FLOGÍSTICOS.....	26
4.3.6 CONTAGEM DE LEUCÓCITOS TOTAIS.....	28
4.3.7 CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS.....	29
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
5.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	30
5.2 ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA.....	37
5.2.1 PERITONITE AGUDA INDUZIDA POR CARRAGENINA.....	38
5.2.2 PERITONITE AGUDA INDUZIDA POR HISTAMINA.....	40
5.2.3 PERITONITE AGUDA INDUZIDA POR BRADICININA.....	42
5.2.4 PERITONITE AGUDA INDUZIDA POR PROSTAGLANDINA E <sub>2</sub> .....	44
5.2.5 PERITONITE AGUDA INDUZIDA POR SUBSTÂNCIA P.....	46
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>57</b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>67</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Flavonóides são compostos obtidos de produtos de origem natural, predominantemente do reino vegetal. Em geral, são sintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e constituem um dos mais abundantes metabólitos secundários de vegetais. O primeiro flavonóide isolado foi a rutina, em 1930, obtida através da extração de laranjas e, desde então se percebeu seu enorme potencial terapêutico.

Há, aproximadamente, 8.000 flavonóides já descritos, cuja maioria apresenta grande ação sobre os sistemas biológicos, dentre as quais, atividades antimicrobianas, antivirais, antiulcerogênico, citotóxico, antineoplásico, antioxidante, anti-hepatotóxico, anti-hipertensivo, hipolipidêmico, antiinflamatório, antiplaquetário, aumento da permeabilidade capilar, inibição de exsudação protéica e migração leucocitária.

A inflamação é decorrente da lesão tecidual desencadeada por um traumatismo o que irá desencadear importantes alterações teciduais, como: 1) vasodilatação de vasos sanguíneos locais, conseqüentemente o aumento do fluxo sanguíneo local; 2) Maior permeabilidade dos capilares e o extravasamento de grande quantidade de líquidos para os espaços intersticiais; 3) Formação de coágulos nos espaços intersticiais devido a enorme quantidade de fibrinogênio derivado dos capilares; 4) Migração de granulócitos e monócitos para o local do tecido lesionado. Os principais mediadores responsáveis por essas reações se incluem: a histamina; a bradicinina; e as prostaglandinas.

No processo inflamatório temos a primeira linha de defesa constituída por macrófagos, pois estes estão presentes nos tecidos e migram facilmente para área lesionada dentro da primeira hora.

Em seguida começa a surgir a segunda linha de defesa caracterizada pelos neutrófilos provenientes da corrente sanguínea e surgem ao longo das primeiras horas. Essa migração é ocasionada pela liberação de produtos provenientes do tecido lesionado e conseqüentemente temos a alteração da superfície interna do endotélio capilar, que permite a aderência das células; separação das células endoteliais dos capilares ocasionando a abertura de orifícios permitindo a passagem do neutrófilo, processo denominado de diapedese.

Portanto para que os macrófagos e neutrófilos cheguem ao sítio inflamatório o tecido lesionado libera muitas substâncias químicas que induzem seus deslocamentos, processo esse chamado de quimiotaxia.

Os flavonóides podem inibir alguns estágios do processo inflamatório e seus efeitos podem ser mensurados através de alguns mediadores da inflamação, por exemplo, bradicinina.

Atualmente o homem anseia por entender algumas doenças, pois influencia em demasia sua qualidade de vida. Entre estas doenças estão as associadas com o processo inflamatório. Assim este estudo objetiva avaliar "in vitro" e "in vivo" algumas propriedades farmacológicas da rutina e seus derivados complexados com metais de transição que poderão auxiliar o homem a combater danos ao organismo, como a presença de radicais livres e a inflamação.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Características dos flavonóides

Os flavonóides pertencem a um grande grupo de substâncias químicas caracterizados por um esqueleto de carbono C3-C6-C3 e são encontrados em frutas cítricas e vegetais.

São polifenóis, ou seja, possuem um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados e/ou seus derivados funcionais. A estrutura padrão da maioria dos flavonóides é composta por 15 átomos de carbono (C) em seu núcleo fundamental, constituindo de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas. Nos compostos tricíclicos, as unidades são chamadas núcleos A, B e C (Figura 1) (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004).

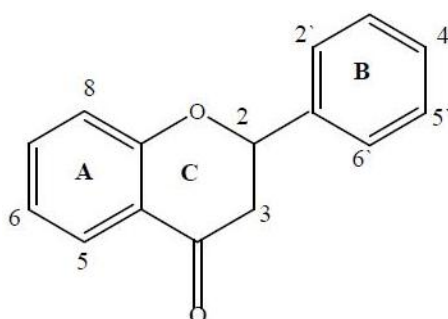


Figura 01: Estrutura química básica dos flavonóides.

Fonte: Dornas et al. (2008).

Já foram identificados mais de 8.000 flavonóides diferentes (DORNAS et al., 2008). Os de origem natural se apresentam na forma oxigenada ou conjugada a açúcares na maioria das vezes, sendo conhecida como heterosídeo, quando na sua forma livre, ou seja, sem a conjugação a outra molécula, é denominada aglicona ou genina (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004; MACHADO, 2006).

A rutina foi o primeiro flavonóide a ser descoberto, em 1930, isolado a partir de laranjas. No início se pensou ser mais um composto pertencente ao grupo das vitaminas, sendo denominada na época vitamina P (Figura 2) (MACHADO, 2006).

A *Dimorphandra mollis* Benth (fava d'anta) é uma árvore encontrada na flora brasileira e nativa do cerrado mineiro, que constitui importante patrimônio

sociocultural e econômico. Sua característica farmacêutica está no fruto e seu principal princípio ativo é a rutina (quercetina-3-rutinosídeo), glicosídeo flavônico ou flavonol glicosídico, que contém hesperidina e eriodictina, incluídos no grupo dos bioflavonóides. Atua no fortalecimento dos vasos sanguíneos, sendo muito usado para o tratamento e prevenção de pequenas varizes. O Brasil produz 50% da rutina consumida no mundo (NIJVELDT et al., 2001).

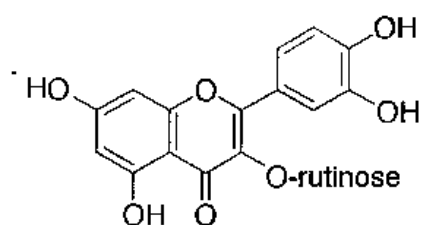


Figura 02: Estrutura molecular da rutina.

Segundo Pereira (2005) a *Dimorphandra mollis* Benth é o principal precursor do flavonóide rutina e durante a condução de sua pesquisa, na qual avaliou a sustentabilidade e a sua conservação, por meio do cultivo conjugado ou simbiótico dela com o eucalipto, constatou o aumento da produtividade de ambas as espécies.

#### 2.1.1. Atividade(s) biológica(s) dos flavonóides

Existe uma imensa variedade de flavonóides encontrados em frutas e vegetais (MIDDLETON JUNIOR et al., 2000). Os flavonóides são classificados em flavonols, antocianidinas, flavonas, flavononas e chalconas (VAN ACKER et al., 1998; DORNAS et al., 2008).

Os flavonóides são muito interessantes por apresentarem uma gama de atividades farmacológicas e serem utilizados no tratamento de doenças tais como alergia (SHAIK et al., 2006), diabetes mellitus (HABIBUDDIN et al., 2008), câncer (MILLER et al., 2008), e também nos processos de infecções virais (DROEBNER et al., 2007) e inflamatórios (CHARAMI et al., 2008), além de atuar como antioxidantes (BOOTS; HAENEN; BAST et al., 2008).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente as suas propriedades redutoras. Estas características desempenham um papel importante no seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo

tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (BOOTS; HAENEN; BAST et al., 2008).

Os flavonóides são conhecidos pela sua potente atividade antioxidante, incluindo a eliminação de radicais livres, modular a produção de óxido nítrico pelo endotélio vascular e células do sistema imune (HUANG et al., 2004).

Eles também apresentam um papel importante na diminuição da permeabilidade capilar, da exsudação e migração de leucócitos (PATHAK; PATHAK; SINGLA et al., 1991), processos que estão intimamente ligados com os processos inflamatórios.

## 2.2. Radicais livres

Um radical livre é definido como qualquer átomo, grupo de átomos ou molécula contendo um ou mais elétrons desemparelhados ocupando a órbita externa. O ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o radical hidroxila ( $\cdot OH$ ) e o óxido nítrico ( $\cdot NO$ ) são exemplos de radicais livres, tais características os tornam altamente instáveis e quimicamente reativos (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Existem, entretanto, compostos igualmente reativos que não possuem elétron desemparelhado na última camada e, portanto, não podem ser classificados como radicais livres. Essas substâncias são classificadas de maneira mais ampla como espécies reativas de oxigênio (ROS) ou espécies reativas de nitrogênio (RNS) e incluem o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o cátion nitrosônio ( $NO^+$ ), o ânion nitroxila ( $NO^-$ ) e o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (DRÖGE, 2002).

O desequilíbrio entre a produção da ROS/RNS e remoção pelos sistemas de defesa antioxidante é denominado estresse oxidativo e pode ser proveniente de processos fisiológicos, como a inflamação aguda (SIKORA et al., 2008). O estresse oxidativo é uma condição celular ou fisiológica de elevada concentração da ROS/RNS que causa danos moleculares às estruturas celulares, com conseqüente alteração funcional e prejuízo das funções vitais, em diversos tecidos e órgãos, tais como músculo, fígado, tecidos adiposos (BARJA DE QUIROGA, 1992; GOLDFARB, 1993), vascular (FENSTER et al., 2002) e cerebral (KEYNES; GARTHWAITE, 2004).

No entanto, o efeito deletério do estresse oxidativo varia consideravelmente de acordo com a idade, o estado fisiológico e a dieta (NIESS et al., 1999).

A produção dos radicais livres é catalisada por ação de algumas enzimas e quando há um desequilíbrio entre as moléculas oxidantes (radicais livres) e a produção de antioxidantes endógenos se instala o estresse oxidativo. (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Contudo, existem mecanismos de proteção chamados de antioxidantes endógenos, sendo considerados a primeira linha de defesa contra os radicais livres. Tais substâncias são capazes de neutralizá-los impedindo a lesão celular (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Existem 03 sistemas enzimáticos antioxidantes:

1º SOD (Superóxido dismutase): catalisa a destruição do radical ânion superóxido;

2º Catalase: atua na dismutação do peróxido de hidrogênio;

3º GSH (Glutathiona): catalisa, também, a dismutação do peróxido de hidrogênio (BARREIROS; DAVID J. M.; DAVID J.P., 2006).

Os antioxidantes atuam no organismo por diferentes mecanismos. Para sua exemplificação temos a complexação de íons metálicos, a captura de radicais livres, a decomposição de peróxidos, a inibição de enzimas envolvidas na produção de espécies reativas de oxigênio e a modulação de células sinalizadoras.

Cerqueira e colaboradores (2007) ressaltam que grande parte dos organismos aeróbios necessita do oxigênio molecular para sua sobrevivência, porém espécies reativas de oxigênio ameaçam a integridade celular por meio da oxidação podendo comprometer processos biológicos importantes. Em virtude dos inúmeros malefícios gerados pelos radicais livres, o organismo procura manter seu equilíbrio, protegendo-se dos danos oxidativos por meio de antioxidantes. Todavia se essas defesas não forem suficientes temos o desequilíbrio instalado e, por conseguinte o estresse oxidativo.

Os radicais livres são derivados dos metabólitos de oxigênio e se formam através de reações de óxido-redução, ou seja, cedem um elétron, oxidando-se ou recebendo outro assim reduzindo-se. Essas reações de óxido-redução ocorrem em todos os sistemas biológicos que tenham metabolismo aeróbico.

Atualmente, tratamentos que auxiliam na diminuição do estresse oxidativo e a intervenção dos processos inflamatórios são importantes na terapia de doenças

relacionadas com estas disfunções (RADER; DAUGHERTY, 2008). O uso de compostos com atividade antioxidante, como os flavonóides, apresenta grande participação nas terapias, devido ao seqüestro de radicais livres e conseqüentemente a diminuição de danos celulares. Também, segundo Cerqueira e colaboradores (2007) os polifenóis são substâncias capazes de captar radicais alcóxila, alquiperóxila, superóxido, radical hidroxila e óxido nítrico.

### **2.3. Fisiopatologia da inflamação**

A inflamação aguda é a primeira resposta a uma lesão celular ou tecidual, na qual contempla uma série de alterações seqüenciais. Ela é mediada através de substâncias, como histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas e leucotrienos. Segundo Lieberman (2009), a histamina desempenha papel fundamental através do aumento da permeabilidade celular, pois se inicia a vasodilatação, desencadeada ao ligar-se à receptores  $H_1$  das células endoteliais.

Esse processo aumenta o fluxo sanguíneo local, conseqüentemente o extravasamento de grande quantidade de líquidos e de proteínas para os espaços intersticiais.

Uma das etapas iniciais de todo processo inflamatório é a marginação que consiste no deslocamento dos leucócitos na porção periférica dos vasos sanguíneos e, na seqüência rolam sob o endotélio, para se aderirem fortemente, atingindo o espaço intercelular do endotélio. Todo esse processo será desencadeado por mediadores químicos originados no local do processo inflamatório.

A inflamação pode ocorrer em 03 fases distintas e cada uma mediada por diferentes mecanismos: uma aguda que tem como característica principal a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular, a fase sub-aguda que consiste na infiltração de leucócitos e fagócitos e por fim a fase crônica caracterizada pela degeneração dos tecidos e na presença de fibroses (ROTELLI et al., 2003).

### 2.3.1. Marginação, rolamento e adesão

O recrutamento leucocitário promove uma série de mudanças não só nas células leucocitárias como nas células endoteliais vasculares ativadas por várias citocinas, como IL-1 e TNF. As células endoteliais secretam substâncias quimioatrativas que conduzem os neutrófilos para extremidade dos vasos sanguíneos, este processo é de extrema importância para o seu recrutamento ao sítio inflamatório (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2003).

Inicia-se o rolamento por intermédio das seletinas, que são moléculas de adesão presentes na superfície das células do endotélio e do leucócito, essas moléculas são compostas por oligossacarídeos chamados de Sialil-Lewis X que tem a finalidade de promover um maior número de pontes de ligações entre a superfície do leucócito e a superfície do endotélio. Entretanto para que o processo ocorra os leucócitos precisam aderir-se de maneira eficaz as células do endotélio, permitindo que as integrinas possam ser estimuladas e ativadas, por ação de mediadores inflamatórios, tornando-se ávidas por se ligarem principalmente a receptores ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1), se tornando um pré-requisito para ativação do leucócito (YANG et al., 2005; HEIT; COLARUSSO; KUBES, 2005). Esse mecanismo é fundamental para gerar respostas rápidas como na reorganização do citoesqueleto (WEI et al., 2004; HORDIJK et al., 2003). Quando ligadas aos receptores ICAM-1 gera-se um sinal para dentro da célula via proteína ERM, responsáveis pela formação da actina e miosina o que resultará na contração endotelial (HORDIJK et al., 2003). Algumas ligações resultam na formação da ROS no qual se gera um estresse da fibra citoesquelética, alterando a estrutura da actina e miosina. A formação da ROS também resulta na degradação da junção protéica do endotélio o que leva a abertura do endotélio, assim finalmente os leucócitos conseguem atravessar a membrana endotelial e chegar ao local em que ocorreu o dano tecidual (DEKKER; SEGAL, 2000; JASON et al., 2001).

Portanto a adesão e a mobilidade dos leucócitos se dão via proteína G, dirigido pela ativação das integrinas e seguido pela alteração da actina e miosina (ENGELHARD; WOLBURG, 2004). A esse fenômeno da inflamação se atribui o nome de diapedese (Figura 03).

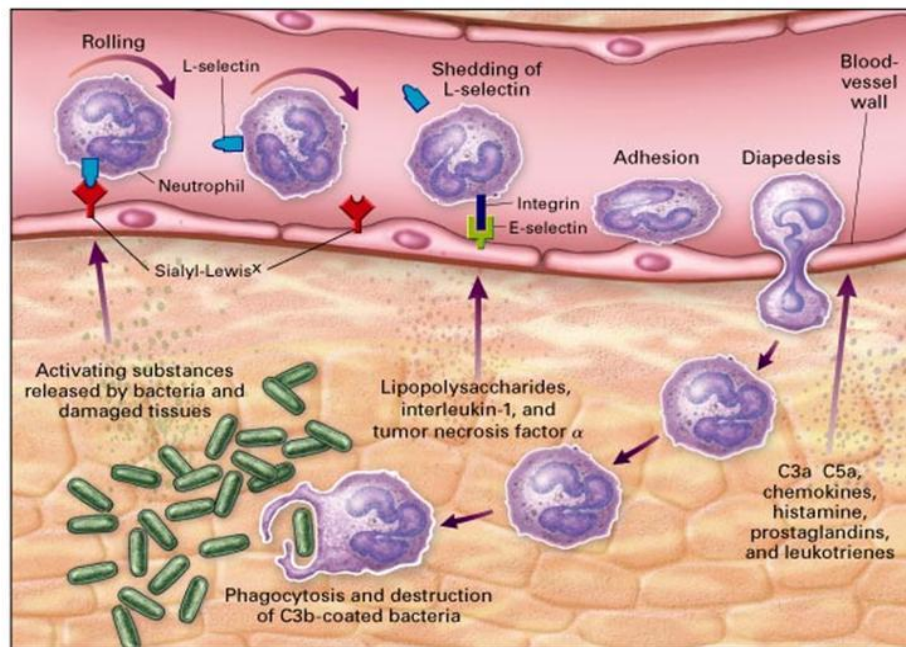


Figura 03: Diapedese. Fonte: DELVES; ROITT, (2000).

### 2.3.2. Citocinas e a liberação da enzima mieloperoxidase

O sistema imunológico reconhece a presença dos patógenos ou qualquer outro dano tecidual através de diversas proteínas que estão expressas em sua superfície. Uma das células responsáveis pela resposta imunológica é o neutrófilo (DEKKER; SEGAL, 2000; JASON et al., 2001). Porém, para que ocorra a ativação dessa célula é necessário que se estabeleça uma comunicação entre as células endoteliais e quem desempenha esse papel são as citocinas, as quais tornam-se parte integrante do processo inflamatório. Elas não ficam estocadas como os hormônios, mas são rapidamente sintetizadas e secretadas por diferentes células e podem frequentemente afetar também a ação de outras citocinas (HEINRICH et al., 1998).

As citocinas atuam em cascatas. Entre elas encontramos as interleucinas (ILs), TNF, INF, entre outras, aja visto que para a resposta inflamatória aguda a IL-8 é considerada uma das mais importantes, pois atua como fator quimiotático em atrair o neutrófilo e outras células para a o local da inflamação (TOWNSEND; MCKENZIE, 2000; XING et al., 2000). Um fator bastante importante é que a secreção do TNF

inibe a apoptose do neutrófilo (VITKOVIC; BOCKAERT; JACCQUE, 2000) elevando a sua sobrevivência no sítio de ação.

Temos, também, as quimiocinas que são fundamentais para os leucócitos, dentre eles o neutrófilo, pois atuam em seu crescimento, na sua diferenciação e na ativação, imprescindíveis para que ocorra quimiotaxia.

Além disso, elas interagem com o receptor acoplado à proteína G (AMANDA et al., 1998). A ativação da subunidade beta-gama da proteína G dispara uma série de reações, iniciando pela hidrólise do  $PIP_2$  gerando o  $IP_3$  e DAG com imediata consequência do aumento do cálcio de setores intracelulares. Esta mobilização de cálcio é uma das mais freqüentes atividades determinada pela quimiocina (MURDOCH; FINN, 2000).

Uma das principais interleucinas ativadoras de neutrófilos, como descrito anteriormente, é a IL-8, porém a IL-1 e o TNF são indutores da adesão dos polimorfonucleares (PMN) junto às células endoteliais, processo essencial para a sua transmigração, como visto acima (DINARELLO, 2000). Essas citocinas são chamadas de pró-inflamação, nome atribuído em virtude a capacidade em auxiliar no processo inflamatório (SIKORA et al., 2008).

Os polimorfonucleados (PMN) são células especializadas morfológica e bioquimicamente e seu principal mecanismo de defesa é a fagocitose como também secretar substâncias biologicamente ativas para o espaço pericelular. Porém sua atividade antipatogênica é inespecífica, o que ocasiona não somente a morte do microrganismo como também de vários outros tecidos ao seu redor (YUGAI et al., 1992).

Considerável interesse tem sido demonstrado pelo uso de antioxidantes na prevenção de danos provenientes de radicais livres. Dentre as principais ROS formadas "in vivo" são:  $O^{2-}$  (superóxido ânion radical), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ácido hipocloroso (HOCl) e o radical hidroxila ( $HO^{\cdot}$ ). O radical superóxido é uma das ROS formados durante o *burst* oxidativo que ocorrem em numerosos eventos fisiológicos. VALKO (2007) descreve que a ROS desencadeia alguns sinais de transdução, ou seja, são capazes de transmitir sinais para dentro da célula e podem atuar em diferentes níveis da cascata de sinalização.

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima que catalisa várias reações, presente nos PMN (neutrófilos) e tem sido correlacionada em várias doenças (KHALIL; PEPATO; BRUNETTI, 2008).

Entretanto, existe um processo de *burst* respiratório que se inicia durante a fagocitose dos neutrófilos, pois é o mecanismo mais efetivo dessas células para a defesa do organismo contra patógenos, sendo esse processo mediado pela enzima MPO dependente de oxigênio. O que gera um alto consumo de oxigênio por parte desta célula durante a tentativa de se eliminar o microrganismo (NAUSEFF; METCALF; ROOT, 1983). É uma enzima oxidante presente no processo inflamatório, todavia ela não é uma enzima específica e pode oxidar diferentes substratos como os polifénóis, presentes nos flavonóides. Portanto, a oxidação de alguns flavonóides ocorre com a produção de um radical ânion superóxido, pois um de seus elétrons pode ser catalisado por diferentes enzimas, tendo grande resistência a reações não enzimáticas mesmo quando na presença do oxigênio (MOMIC; SAVIC; VASIC, 2009).

Os flavonóides, como mencionado anteriormente, são compostos polifenólicos encontrados em várias plantas, podendo inibir a síntese e a liberação de várias enzimas, mas principalmente atuam como um poderoso antioxidante (CYRINO et al., 2002).

Eles possuem mais de um grupo potencialmente reativo e a sua capacidade antioxidante esta baseada, fundamentalmente, na alta capacidade em doar hidrogênio. Portanto uma das suas principais funções é o seqüestro do radical livre. Contudo alguns estudos demonstram que quando estão na presença de alguns metais, como o cobre, essa ação se potencializa (ALIAGA; LISSI, 2004).

A primeira etapa, desse conjunto de atividades, é mediada por receptores de membrana, especificamente o CR e FC $\delta$ R, no qual reconhece alguns carboidratos na superfície do patógeno ou componentes do sistema complemento ou o depósito de anticorpos. A segunda etapa consiste na fagocitose que resumidamente consiste na liberação de substâncias tóxicas, provindas de seus vacúolos (azurófilos) dentre essas substâncias estão a ROS. O envolvimento desse processo com várias doenças inflamatórias tem sido alvo de vários estudos, objetivando a descoberta de novas drogas com a capacidade de modular tais processos (ALIAGA; LISSI, 2004; KANASHIRO et al., 2004).

Inicialmente a primeira ROS produzida pelo neutrófilo é o anion superóxido mediada pela enzima NADPH oxidase. As NADPH oxidases são enzimas associadas à membrana citoplasmática e como mencionado anteriormente, elas catalisam a produção do ânion superóxido por meio da redução do oxigênio, sendo

assim o substrato na doação do elétron. (GOLDSBY; KIND; OSBORNO, 2002; Figura 04). Contudo esse ânion é rapidamente convertido em  $H_2O_2$ , espontaneamente, pela enzima superóxido dismutase. Adicionalmente, o conteúdo dos grânulos azurófilos liberados pelos neutrófilos tem grande quantidade da enzima MPO a qual tem a capacidade de catalisar o  $H_2O_2$  na formação de espécies halogenadas.

Assim alguns mecanismos essenciais dos flavonóides, sob a produção da ROS estimulada pelos neutrófilos, são sugeridos: a inibição da enzima NADPH oxidase ou da enzima MPO, sua capacidade de seqüestrar radicais livres ou na supressão dos receptores CR e FC $\delta$ R (KANASHIRO et al., 2004; Figura 04).

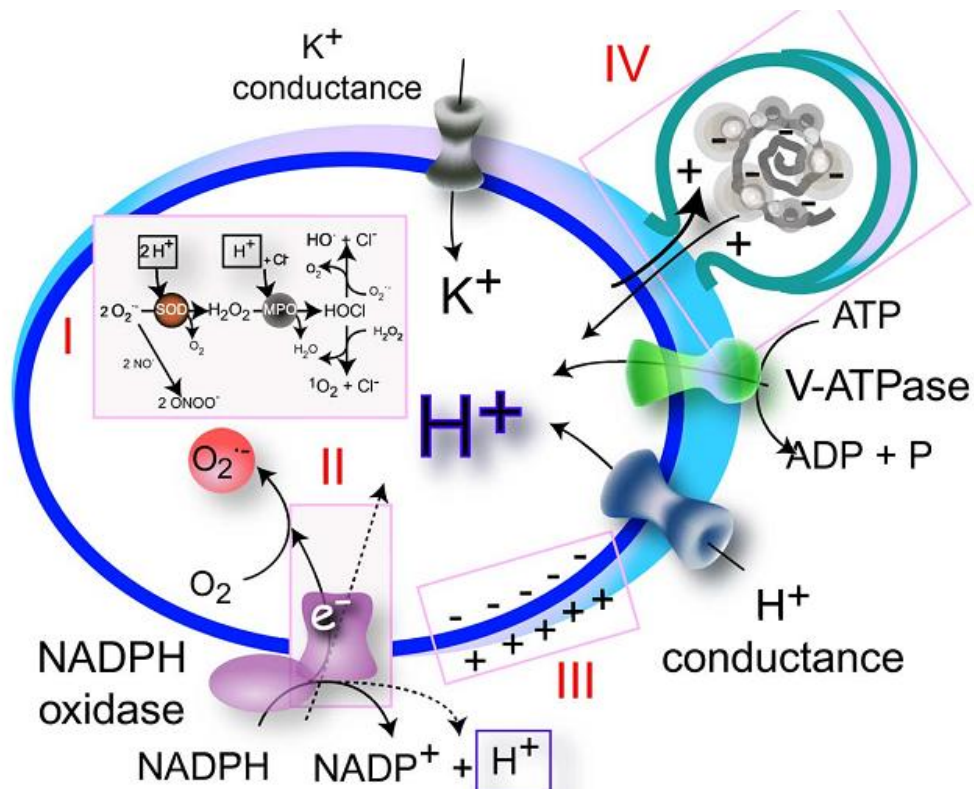


Figura 04: Liberação de radicais livres pelo neutrófilo: I. Produção do ânion superóxido através da consumo dos prótons durante a dismutação dirigida pela formação de outras espécies de oxigênio reativo via SOD e MPO. II. A NADPH oxidase permiti o influxo de prótons no interior do fagossoma. III. Alteração do potencial de membrana. IV. os cátions são deslocados em resposta ao potencial elétrico intensificando a secreção granular pelo aumento da forma iônica no lúmen fagossomal. Fonte: LEE; HARRISON; GRINSTEIN, (2003).

A NADPH oxidase é ativada pelo LTB<sub>4</sub> e por proteínas quinases, assim como a inibição do potencial de membrana também está diretamente relacionado a sua ativação, processo que influencia na liberação de Ca<sup>2+</sup> intracelular, via IP<sub>3</sub> quinase, gerando o efluxo de cátions para a ativação da produção do ânion superóxido, bem como, com a ativação rápida de íons de hidrogênio resultando no influxo desses íons (TINTINGER; STEEL; ANDERSON, 2005). O IP<sub>3</sub> também interage com receptores que induzem a mobilização de Ca<sup>2+</sup> das vesículas intracelulares contribuindo com o aumento de Ca<sup>2+</sup> no citosol (TINTINGER; STEEL; ANDERSON, 2005).

O mecanismo de aumento do Ca<sup>2+</sup> citosólico é um pré-requisito para ativação do neutrófilo devido a existência de funções dessa célula que são Ca<sup>2+</sup> dependentes, como ativação da membrana citoplasmática associada a geração de superóxido, NADPH oxidase, adesão ao endotélio vascular, degranulação, ativação da fosfolipase A<sub>2</sub> e a síntese de IL-8, por exemplo, um dos sítios localizados perifericamente abaixo da membrana citoplasmática esta diretamente envolvida com a β-integrina fundamental no processo da diapedese, descrito acima (TINTINGER; STEEL; ANDERSON, 2005).

Portanto os neutrófilos, células alvo deste estudo, durante a resposta inflamatória aguda são ativados em duas etapas. Primeiramente sofrem estímulos pró-inflamatórios que os deixam no estágio de estimulação induzindo sua aderência à parede do endotélio. Quando sofrem o segundo estímulo atingem a completa ativação com a degranulação dos grânulos azurófilos e ativação da NADPH oxidase (SANTOS, 2007).

### 2.3.3. Ácido araquidônico (AA)

O ácido araquidônico (AA) é o produto primário para a síntese dos eicosanóides encontrado nos fosfolipídios de membrana, mas para que isso ocorra, ele deve estar na forma livre, e sua liberação ocorre através de hidrólise catalisada por fosfolipases específicas. Isso ocorre devido a algum estímulo hormonal, ou a outros, como por exemplo, uma fosfolipase específica presente na maioria dos tipos celulares de mamíferos, que vai hidrolisar os fosfolipídios de membrana liberando o ácido araquidônico (SILVA et al., 2002). O ácido araquidônico livre pode ser

metabolizado por duas classes principais de enzimas, as cicloxigenases (COX) e pela lipoxigenases (LOX) (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

Na cicloxigenase (COX), um grupo de enzimas presentes no retículo endoplasmático liso, converte o ácido araquidônico em prostaglandinas (PG's) e em tromboxanos (SILVA et al., 2002). A COX apresenta duas isoformas diferentes; a COX-1 e 2, além de uma variante a COX-3. A COX-1 é constituída de uma enzima presente na maioria dos tipos celulares, porém a COX-2 é descrita como uma enzima indutora, na maioria dos casos, da produção de grande quantidade de PG's, com isso, sendo estreitamente relacionada a sua ativação com processos inflamatórios agudos e alguns tipos de processos crônicos. Com isso a inibição da COX-2, se mostre como chave no desenvolvimento de novos mecanismos de ação para compostos antiinflamatórios (KIM et al., 2004).

LOX são enzimas responsáveis pela síntese de hidroxí ácidos e LT's a partir do AA. Os 5-,12- e 15-LOX são os mais importantes para a síntese de espécies de LT's e hidroxíácidos que tem grande importância nas inflamações e reações alérgicas (KIM et al., 2004).

A prostaciclina possui efeito vasodilatador, potencializador quimiotático, e aumenta a permeabilidade de outros mediadores, além de estar envolvida com processos relacionados à dor e febre durante a inflamação (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

Os leucotrienos, principalmente o LTB<sub>4</sub>, além de colaborarem com o aumento da permeabilidade vascular, têm uma potente atividade quimiotática para leucócitos, eosinófilos e monócitos, e também os ativam, promovendo a degranulação e a produção de superóxidos que irão aumentar os danos teciduais (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

#### 2.3.4. Atividade dos flavonóides no processo inflamatório

Segundo Kim e colaboradores (2004), há indícios de que alguns tipos de flavonóides podem modular a expressão de genes pró-inflamatórios, e conseqüentemente, diminuir a resposta inflamatória. Porém, não se sabe ao certo o quanto da expressão desses genes interfere realmente na resposta inflamatória. Em contrapartida, houve a identificação da atividade antiinflamatória por parte dos flavonóides, e que pode estar atribuída à modulação dos genes pró-inflamatórios.

SELLOUM e colaboradores (2003) comenta que os flavonóides inibem algumas enzimas chaves envolvidas na inflamação e na sinalização celular da cicloxigenase e lipoxigenase, com o envolvimento também na produção de mensageiros secundários, como o  $IP_3$  – quinase. Alguns autores atribuem a sua capacidade farmacológica na inibição da fosfolipase  $A_2$ , entretanto recentes descobertas atribuem à rotina a capacidade de seqüestrar radicais livres gerados pelas ROS e proveniente do processo conhecido como *burst* dos neutrófilos.

Um dos importantes mecanismos celulares antiinflamatórios dos flavonóides é descrita por diversos autores em modular a atividade de enzimas do AA, inibindo enzimas como fosfolipase  $A_2$  ( $PLA_2$ ), COX, e LOX, e também inibindo a enzima óxido nítrico sintetase (iNOS). A inibição destas enzimas reduz a produção de AA, PG's, LT's e NO, que são mediadores cruciais no mecanismo da inflamação (KIM et al., 2004).

Alguns estudos indicam que alguns flavonóides têm a capacidade de agir no metabolismo final do araquidonato, alterando com isso a síntese de prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, denominados eicosanóides, mediadores já presentes na inflamação aguda (SILVA et al., 2002).

A  $PLA_2$  é a principal responsável pela liberação do AA da membrana lipídica da membrana celular. O primeiro flavonóide que se percebeu ter a capacidade de inibir a  $PLA_2$  foi a quercetina, inibindo a  $PLA_2$  de neutrófilos humanos. Depois disso, diversos outros flavonóides (principalmente dos grupos flavonol e bi-flavonóide) se mostraram como inibidores da  $PLA_2$  (KIM et al., 2004).

Em muitos tecidos a bradicinina também estimula a  $PLA_2$  promovendo a liberação do ácido araquidônico e a formação de prostaglandinas e leucotrienos (MORAIS et al., 1999).

Grande parte da atividade dos flavonóides descrita em artigos contempla sua ação no sangue e em células endoteliais, o que não torna uma surpresa, pois as principais áreas de pesquisa estão concentradas na inflamação e no câncer. Embora os flavonóides tenham sido estudados por mais de 50 anos o mecanismo celular envolvido em sua ação biológica não está completamente elucidado (BENAVENTE-GARCÍA; CASTILLO, 2008).

Muitas de suas propriedades farmacológicas estão ligadas a sua capacidade de modificar a atividade enzimática envolvida na ativação celular, por meio de sua

composição estrutural, assim tendo grande ênfase no seqüestro de radicais livres que estão relacionados a processos degenerativos desencadeados pela ROS.

A inflamação, como visto acima, é um processo tipicamente caracterizado pelo aumento da permeabilidade vascular do tecido endotelial e do influxo de células leucocitárias até o sítio inflamatório.

Diversos estudos com flavonóides têm demonstrado que suas propriedades antiinflamatórias estão ligadas a atividade biológica e a síntese de diferentes mediadores pró-inflamatórios, principalmente os provenientes do ácido araquidônico, como as PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> e TXA<sub>2</sub> (BENAVENTE-GARCÍA; CASTILLO, 2008).

Novamente BENAVENTE-GARCÍA e colaboradores (2008) descrevem a biosíntese dos derivados do ácido araquidônico, mediadores fundamentais para ação da fosfolipase A<sub>2</sub> e de enzimas oxidativas como cicloxigenase e lipoxigenase. Alguns desses mecanismos estão sendo exaustivamente discutidos sobre as possíveis ações dos flavonóides, dentre essas discussões estão: a inibição da fosfodiesterase e de proteínas quinase, cruciais para a sinalização celular durante o processo inflamatório (MANTHEY, 2000).

Segundo NIJVELDT (2001) os flavonóides quando administrados por via oral diminuem a mobilização dos leucócitos durante a reperfusão leucocitária, processo que decorre em detrimento a diminuição da secreção de substâncias do sistema complemento. Menciona também outras duas possibilidades de mobilização leucocitária por meio da inibição da degranulação dos neutrófilos sem afetar a produção do ânion superóxido e do efeito inibitório sobre os mastócitos através da modulação dos receptores dos canais de cálcio presentes em sua membrana plasmática. MANTHEY (2000) menciona outra via na qual relaciona a inibição da biosíntese de prostanoide e da liberação da histamina (NIJVELDT et al., 2001).

#### **2.4. Flavonóides e metal de transição**

Estudos farmacológicos têm demonstrado que os flavonóides não glicosilados, como a quercetina e o canferol, possuem um maior efeito antioxidante e antiinflamatório quando estão na presença de íons ou metais de transição como Fe(II) e Cu(II) (VAN ACKER et al., 1998). O flavonóide rutina (quercetina glicosilada) também mostrou maior eficiência na presença de íons de Fe(II) e Cu(II)

(AFANAS'EVA et al., 2001). Entretanto, estes estudos foram realizados *in situ*, não sendo isolado nenhum complexo.

A naringina é uma flavona ativa como antioxidante e antiinflamatório (KORKINA; AFANAS'EVA, 1997), bem como um efetivo inibidor da proliferação *in vitro* de linhagens de tumores de mama em humanos (AFANAS'EVA et al., 2001). Pereira e colaboradores (2007) demonstraram que a complexação Naringina-Cu (II), aumenta a atividade antioxidante, antiinflamatória e a atividade citotóxica em células tumorais quando comparada ao flavonóide livre.

Existem estudos que demonstram que flavonóides complexados com metais, como o ferro, possuem uma efetiva habilidade em promover o seqüestro de radicais livres e um potente benefício terapêutico para o tratamento de patologias e disfunções associadas ao estresse oxidativo (KOSTYUK et al., 2007).

Todavia, a obtenção de compostos com atividade antioxidante e antiinflamatória complexados com metais de transição, como o ferro, cobre e o zinco, poderia apresentar um interessante papel no combate a disfunções fisiológicas relacionadas com os danos provocados pelo aumento de radicais livres, isso se dá porque os flavonóides complexados com metais de transição adquirem um novo centro que mimetiza a ação da enzima superóxido dismutase e essa nova característica potencializa a atividade antioxidante e antiinflamatória (AFANAS'EVA et al., 2001).

Pereira e colaboradores (2007) mencionam em seu estudo que alguns flavonóides podem ter sua ação inflamatória potencializada em virtude de sua complexação com metais de transição. Esses metais demonstram ter alta afinidade antioxidante reforçando a sua eficácia em diminuir o progresso da inflamação.

A obtenção de compostos com atividade antioxidante e antiinflamatória complexados com metais de transição, como o ferro, cobre e o níquel, podem apresentar um interessante papel no combate às doenças relacionadas ao aumento de radicais livres, como o estresse oxidativo e a aterosclerose. Desta forma, com o presente trabalho podemos avaliar uma possível potencialização das atividades biológicas do flavonóide rutina através da complexação com metais de transição.

### **3. OBJETIVO GERAL**

O presente estudo objetivou avaliar a atividade antioxidante e antiinflamatória da rutina e seus derivados que contêm metais de transição.

#### **3.1. Objetivos Específicos**

- Analisar a atividade antioxidante da rutina e derivados contendo metal de transição através de ensaios “in vitro”.

- Analisar a atividade antiinflamatória da rutina e derivado contendo metal de transição através de estudos “in vivo” com camundongos.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Preparação da drogas complexadas**

Os processos de síntese dos compostos rutina complexado a metais de transição foram realizadas no Laboratório de Química de Coordenação da Universidade Bandeirante (UNIBAN). Estes complexos foram doados pela Profa. Dra. Regina Mara da Silva Pereira, resultantes do projeto de pesquisa FAPESP (Processo – 05/60749-9).

### **4.2 Ensaio de triagem da eficácia das drogas complexadas através da avaliação da atividade antioxidante**

A avaliação do seqüestro de radicais livres, “in vitro”, consistiu na mensuração da formação de um dos tipos de radicais livres mais comuns, o superóxido. Por meio dele verificou-se a redução do composto *Nitrobluetetrazolium* (NBT), formando um precipitado de coloração escuro arroxeado chamado Formazan. O composto testado competiu com o NBT pela reação com os radicais superóxido, assim verificou-se que a eficiência antioxidante do composto isolado comparado ao complexado, formou menos Formazan, como demonstrado na Figura 05. E a sua quantificação foi realizada por meio da leitura no comprimento de onda de 560nm, em espectrofotômetro UV-Vis da marca FEMTO®.

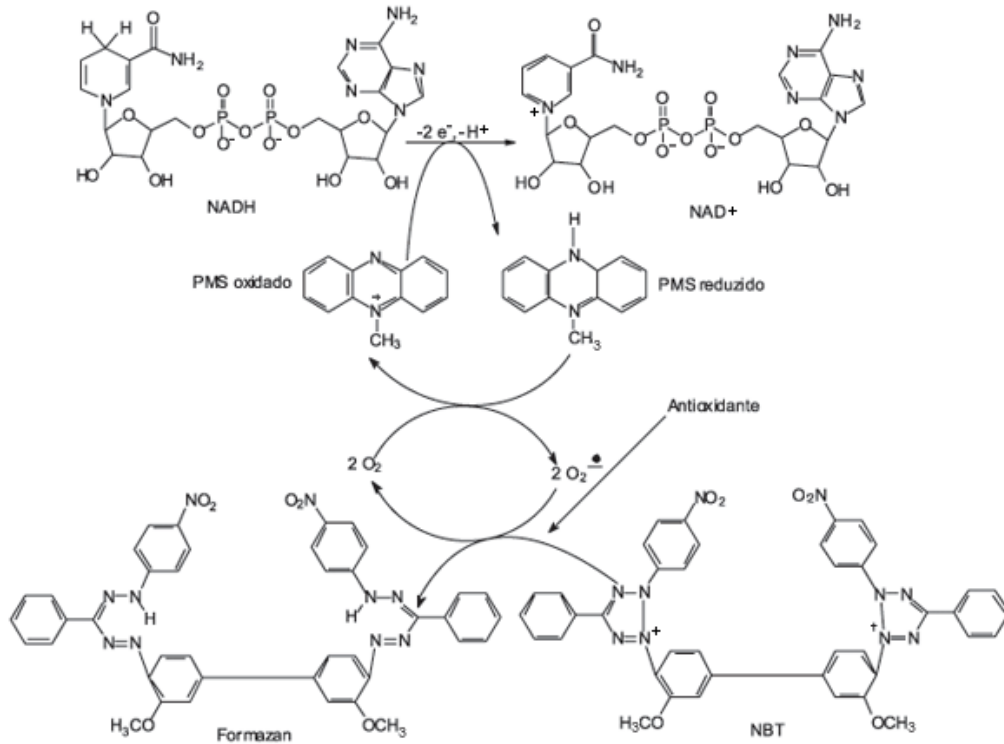


Figura 05: Reação de formação do radical superóxido e redução do NBT.

Fonte: Oliveira et al. (2009).

#### 4.2.1 Seqüestro dos radicais superóxido

##### 4.2.1.1 Protocolo experimental

O princípio do teste se baseou na redução do *Nitrobluetetrazoníum* (NBT) por meio da atividade do radical superóxido ( $O_2^-$ ) ocasionando a formação dos cristais de formazan, como descrito anteriormente.

A rutina e seus derivados complexados com níquel II (R-Ni2), cobre II (R-Cu2) e ferro I (R-Fe1), foram testadas nas concentrações de 1, 10 e 100 $\mu$ M, sendo que o controle negativo não recebeu nenhuma droga.

Pesou-se a droga em um tubo tipo *ependorf* em seguida se acrescentou o solvente DMSO.

A R-Ni<sub>2</sub> e R-Cu<sub>2</sub> foram preparadas sem aquecimento, contudo a R-Fe<sub>1</sub> teve de ser preparada sob aquecimento de  $\pm 40^{\circ}\text{C}$ . Todas as drogas foram preparadas momentos antes da avaliação e acondicionadas em frasco âmbar.

Os reagentes utilizados foram preparados de tal forma que as concentrações finais foram de: NADH à  $156\mu\text{M}$ , NBT à  $50\mu\text{M}$ , PMS à  $20\mu\text{M}$  e tampão fosfato à  $20\text{mM}$  (pH = 7,4) (YU et al., 2005).

A preparação de cada reagente consistiu nas seguintes etapas:

I. Tampão Fosfato (pH 7,4) na concentração de  $20\text{mM}$ , utilizou-se  $2,0\text{ml}$  da solução A ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  anidro,  $200\text{mM}$ ) e  $8,0\text{ml}$  da solução B ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anidro,  $200\text{mM}$ ) e volume final de  $1000\text{ml}$ . Sua validade foi restringida há 07 dias e estocada sob refrigeração.

II. Solução de NADH foi preparada um volume final de  $1,0\text{ml}$  (PM 709,4) onde o volume pipetado foi de  $50\mu\text{l}$ , sendo a concentração final de  $20\mu\text{M}$ .

III. O mesmo raciocínio, descrito no item supracitado, foi empregado para preparar as soluções de NBT (PM 817,64;  $50\mu\text{M}$ ) e PMS (PM 306,34;  $20\mu\text{M}$ ), sendo que o diferencial estava no volume inicial pipetado de PMS, que foi de  $5\mu\text{l}$ .

Todas as soluções estoque preparadas foram mantidas sob refrigeração e ao abrigo da luz, por no máximo 07 dias.

#### *4.2.1.2 Procedimento experimental*

Com todas as soluções previamente preparadas, se iniciou a leitura de cada droga, sendo que para cada grupo de rotina complexada utilizou-se a rotina isolada como comparador, todas nas mesmas concentrações.

O padrão de leitura descrito a seguir foi utilizado para todas as drogas testadas.

O volume final da solução foi de  $2500\mu\text{l}$ , como descrito anteriormente, sendo que  $50\mu\text{l}$  de NADH,  $50\mu\text{l}$  de NBT,  $5\mu\text{l}$  de PMS e tampão fosfato (pH 7,4) para completar o volume. Inicialmente, o espectrofotômetro foi pré-aquecido por 15

minutos, em seguida se selecionou o modo fotométrico para digitação do comprimento de onda (560nm) e a unidade absorvância.

Todo procedimento foi realizado sob baixa incidência de luz para que não houvesse a interferência sobre a reação e/ou reagentes que são fotossensíveis. E devido a alta instabilidade do superóxido foi necessário uma rápida leitura após a mistura de todos os reagentes.

Primeiramente houve a calibração do equipamento com a leitura do branco, composto apenas pelo tampão fosfato (pH 7,4), posteriormente foi feita a leitura do controle (rutina isolada) e das rotinas complexadas na seguinte seqüência:

- I. Pipetou-se 5µl do PMS e foi acrescido dentro da cubeta que encontrava-se previamente encaixada no espectrofotômetro.
- II. Se preparou em um frasco âmbar a mistura dos reagentes, nos volumes descritos acima, de NADH, NBT, tampão fosfato (pH 7,4) e os compostos-testes citadas anteriormente e com o auxílio do vórtex, no tempo de 10 segundos e em velocidade baixa, para que houvesse a completa homogeneização do sistema.
- III. Por fim o conteúdo do vidro âmbar foi retirado e adicionado a cubeta que estava encaixada no equipamento, com 5µl de PMS. Fechou-se o compartimento de amostra, rapidamente e iniciou-se a leitura.

### **4.3. Atividade antiinflamatória**

A atividade antiinflamatória foi mensurada pela contagem celular total e diferencial em lavado peritoneal, após indução da peritonite pelos seguintes agentes flogísticos: Carragenina, Bradicinina (BK), Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), Histamina e Substância P (SP) (CARLSSON; RIPPE, 1999; PEREIRA; MADEIROS; FRODE, 2006).

#### **4.3.1. Animais**

Utilizaram-se 30 camundongos *Swiss* machos com peso médio de 30g, nos quais foram mantidos no Laboratório de Farmacologia Experimental da Universidade Bandeirante de São Paulo – UNIBAN sob condições temperatura de 22 ± 3 °C, em

ciclo claro/escuro de 12 horas, com acesso a água e ração *ad libitum*, exceto durante os experimentos. Os animais foram mantidos no laboratório por 1 hora antes da realização dos experimentos para aclimatação sendo que os experimentos foram conduzidos de acordo com o manejo experimental de animais de laboratório e normas para investigação em animais conscientes (ZIMMERMAN, 1983), e submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da UNIBAN - CEP/UNIBAN (parecer nº 301\_08, de 06/10/2008; ANEXO 01).

#### 4.3.2. Protocolo Experimental

Dividiu-se os animais em seis grupos, com "n" de 5 animais para cada grupo, como segue:

Tabela 01: Grupos divididos de acordo com o tratamento.

<b>GRUPO</b>	<b>DOSAGEM</b>
Grupo Dexametasona - Controle positivo	5mg/kg de dexametasona
Grupo Salina – Controle negativo	Solução salina 0,9%
Grupo Rutina 10	10mg/kg de rutina
Grupo Rutina 100	100mg/kg de rutina
Grupo Rutina-Cobre <sup>2</sup> 10 (R-Cu <sup>2</sup> )	10mg/kg de R-Cu <sup>2</sup>
Grupo Rutina-Cobre <sup>2</sup> 100 (R-Cu <sup>2</sup> )	100mg/kg de R-Cu <sup>2</sup>

Os animais receberam administração das drogas testes pela via oral, por meio da técnica de gavagem, com volume administrado de 0,1ml/10g de animal. Assim, as drogas foram preparadas no volume final de 4,0ml, contando com as perdas inerentes ao processo.

Para preparar a rutina nas concentrações de 10mg/kg em um volume final para ambas de 4,0ml e um volume de administração de 0,1ml/10g de animal pesou-se um total de 4,0mg de rutina e para concentração de 100mg/kg pesou-se um total de 40,0mg. Devido a diferença de peso molecular entre as drogas, a suspensão de

R-Cu2 foi preparada nas mesmas concentrações citadas anteriormente, no entanto foi levado em consideração a equivalência molar em relação a rotina.

#### 4.3.3. Manipulação da suspensão

Devido às características físico-químicas das drogas e mimetizar uma possibilidade de futura formulação, decidiu-se elaborar uma suspensão e para prepará-la procedeu-se da seguinte maneira:

- I. Após pesar as drogas testes, as mesmas foram depositadas em um gral, contendo Emulgin<sup>1</sup> a 1%;
- II. Pistilou-se ambas as substâncias até completa homogeneização;
- III. Por fim adicionou-se água grau Milli-Q, gradativamente e delicadamente. Após completa homogeneização a suspensão foi estocada em frasco âmbar, previamente identificado.

Esse processo foi adotado em todas as avaliações de cada agente flogístico para que se tivesse a total atividade das drogas testes.

Dentre os agentes antiinflamatórios apenas a dexametasona<sup>2</sup> diferiu em seu preparo, pois utilizamos a injetável (ampola) na concentração de 4mg/ml. No qual se determinou que cada animal do grupo controle positivo iria receber, via subcutânea (dorso do animal), 0,5mg/Kg, 4 horas antes do tratamento com as drogas-testes.

#### 4.3.4. Preparação dos agentes flogísticos:

Carragenina:

Utilizou-se carragenina na concentração de 1% para cada 0,1ml/10g de peso do animal. Pesou-se a carragenina em um tubo graduado e em seguida acrescentou-se q.s. de solução de PBS<sup>3</sup> estéril com agitação vigorosa para eliminar os grumos para finalizar o volume final foi completado com a mesma solução de PBS estéril.

<sup>1</sup> Eumulgin – lote 071014425084 – Fabricado 10.2007 – Validade 10.2009

<sup>2</sup> Dexametasona – lote 07054114; Fabricante Ativus - Fabricado 07.2007 -Validade 06.2009

<sup>3</sup> PBS Fabricante Sigma-Aldich – lote 107K8217

#### Bradicinina:

Preparou-se a bradicinina para que ela atingisse a dose de 10nmol por cavidade peritonial, assim foi preparada a solução de 1mg/ml. Pesou-se em tubo a bradicinina, sendo dissolvida em q.s. de solução de PBS<sup>1</sup> estéril até completa homogeneização, por fim completou-se o volume final para 4ml.

#### Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>):

Seu preparo foi semelhante à bradicinina, entretanto houve diferença na concentração da solução que correspondeu a 0,5mg/ml para se ter a dose de 10nmol/cavidade peritonial.

#### Histamina:

Preparou-se uma solução de concentração de 1mg/ml, para se ter a dose de 100µg/cavidade.

#### Substância P:

Seu preparo, também, foi semelhante as demais, por conseguinte houve diferença na dose que correspondeu a 20nmol/cavidade peritonial, entretanto a concentração da solução foi de 1mg/ml.

Tabela 02: Volumes administrados e tempo de tratamento de cada agente flogístico.

<b>Agente Flogístico</b>	<b>Volume Administrado (µl)</b>	<b>Tempo de Tratamento (h)</b>
Bradicinina	100µl	1
Prostaglandina E <sub>2</sub>	200µl	1
Histamina	100µl	1
Substância P	100µl	1,5
Carragenina	0,1ml/10g de animal	4

<sup>1</sup> PBS Fabricante Sigma-Aldich – lote 107K8217

#### 4.3.5. Peritonite induzida por diferentes agentes flogísticos

O grupo dexametasona frente a todos os agentes flogísticos recebeu 5mg/kg, pela via subcutânea, 4 horas antes da indução da peritonite. Os outros grupos receberam tratamento com os demais compostos, por via oral, 1 hora antes da indução da peritonite.

Para que se tivesse o tempo preciso durante as administrações, por gavagem e i.p., gastou-se 2,5 minutos em cada animal, ou seja, a cada 05 minutos se manipulava 02 animais, e após o último animal receber a administração da suspensão, via gavagem, iniciou-se a primeira administração, via i.p., no primeiro animal que havia recebido a administração oral das drogas testes.

O grupo que representou o controle negativo recebeu apenas o veículo da suspensão sem que houvesse a incorporação de qualquer princípio ativo e submetidos a todos os demais procedimentos incomuns entre grupos.

Após 1 hora do tratamento com as drogas teste os animais receberam pela via i.p. os agentes flogísticos carragenina, histamina, bradicinina, PGE<sub>2</sub> e SP para indução da peritonite (CARLSSON; RIPPE, 1999; PEREIRA; MADEIROS; FRODE, 2006).

Houve apenas um diferencial no experimento conduzido para o agente flogístico bradicinina, pois para que não ocorresse sua degradação foi administrada uma solução de captopril<sup>1</sup> (5mg/kg; i.p.). Tal procedimento foi introduzido quando passado 30 minutos após o início do tratamento pelas drogas testes e iniciado no primeiro animal que havia recebido, através de administração por via intraperitoneal. Com a finalização da administração das drogas testes foi iniciada a administração do agente flogístico, porém sua administração foi realizada no lado oposto ao qual foi administrada a solução de captopril.

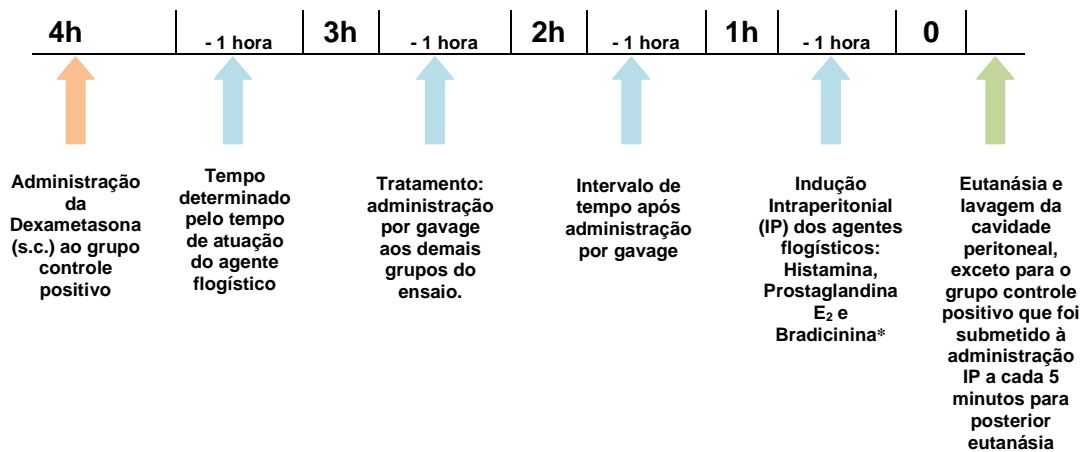
Após o período de indução da peritonite os animais foram submetidos a eutanásia por deslocamento cervical, e imediatamente submetidos a coleta do exsudato.

<sup>1</sup> Captopril Lote: BO44-10/2007 - Fabricante: Baldacci - Validade: 10/2009

Novamente, pipetou-se o lavado interno ( $\pm 600\mu\text{l}$ ) e esse foi transferido para um tubo de *ependorf*, previamente, identificado e armazenamento juntamente com gelo reciclado.

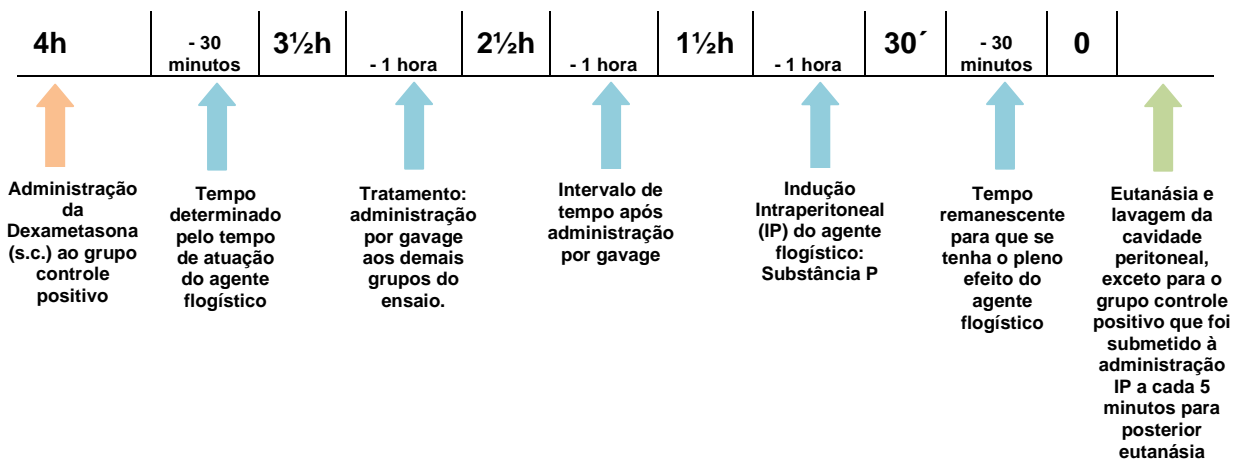
Os esquemas abaixo representam de maneira concisa uma linha de tempo com a seqüência na qual se conduziu o ensaio a partir do marco principal que foi a administração da dexametasona.

1. Esquema de administração dos agentes flogísticos: Histamina, Prostaglandina  $E_2$  e Bradicinina:

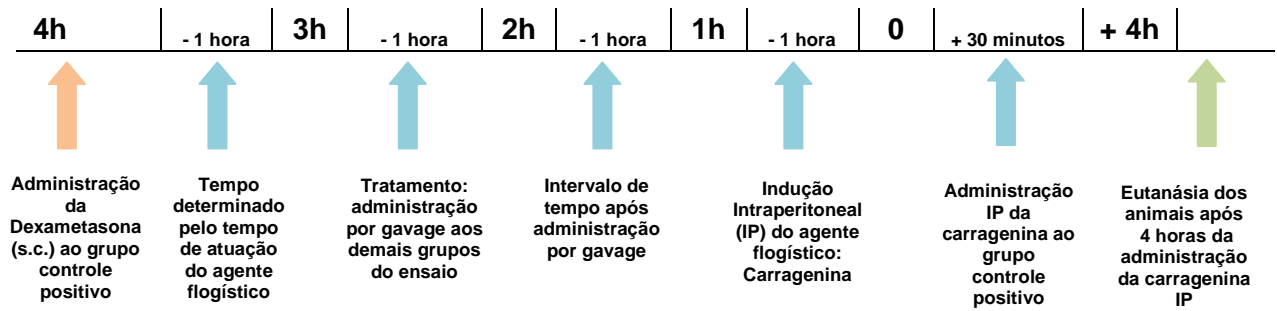


\* Diferencial do procedimento da bradicinina foi à administração da solução de captopril.

2. Esquema de administração do agente flogístico: Substância P:



### 3. Esquema de administração do agente flogístico: Carragenina:



O próximo passo foi realizar a contagem das células leucocitárias totais e posteriormente o preparo do esfregaço para leitura das lâminas para contagem diferencial dos leucócitos.

#### 4.3.6. Contagem de leucócitos totais

A leitura foi realizada para cada amostra de exsudato coletado e ela foi realizada da seguinte maneira (AHUMADA et al., 1997).

- I. Pegou-se o tubo de *ependorf* com exsudato e agitou-se para que houvesse a re-suspensão das células sedimentadas;
- II. Coletou-se com auxílio de uma pipeta automática uma alíquota de 20µl do exsudato e transferiu-se para outro tubo de *ependorf*, também, previamente identificado;
- III. Nesse último tubo de *ependorf* acrescentou-se mais 380µl do líquido de Turk e se agitou para que houvesse completa homogeneização da solução;
- IV. Em seguida foi realizada a contagem dos leucócitos totais por meio do auxílio da Câmara de Neubauer espelhada, sendo que para todas as amostras as leituras foram realizadas em duplicatas.

Durante a leitura foi utilizado microscópio da marca NIKON (modelo alpha shot-2, YS-2) com a objetiva de 40 vezes para contagem das células leucocitárias que estavam localizadas nos quatro quadrantes grandes externos.

#### 4.3.7. Contagem diferencial dos leucócitos

A leitura foi realizada com três amostras de cada grupo, selecionadas ao acaso, do exsudato coletado e ela foi realizada da seguinte maneira:

- I. Pegou-se o tubo de *ependorf* com exsudato e centrifugou-se a 500rpm durante 5 minutos;
- II. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 100µl de PBS<sup>1</sup>;
- III. Após identificação da lâmina, a amostra foi espalhada com auxílio da pipeta;
- IV. Em seguida, aguardou-se a secagem do esfregaço e então, a lâmina foi corada utilizando corante panótico<sup>2</sup>, sendo realizada a imersão de cada lâmina por 10 vezes em cada um dos três reagentes, com posterior lavagem em água corrente para remoção do excesso de corante;
- V. As lâminas foram colocadas em suporte específico, todas na posição vertical para secarem ao ar livre. Após estarem totalmente secas foi realizada a contagem diferencial dos leucócitos.

Durante a leitura foi utilizado microscópio da marca NIKON (modelo alpha shot-2, YS-2) com a objetiva de 100 vezes e óleo de imersão para contagem diferencial das células leucocitárias.

#### 4.4. Análise estatística

A comparação dos resultados da atividade antioxidante dos compostos separados em grupos experimentais e o grupo rotina isolada foi realizada utilizando-se análise de variância, segundo o Teste de Bonferroni, considerando diferenças significativas com  $P < 0,05$ . One-way ANOVA, seguido por teste de Dunnett e/ou Tukey foram usados para calcular as diferenças significativas entre os grupos na avaliação da atividade antiinflamatória dos compostos.

<sup>1</sup> PBS Fabricante Sigma-Aldich – lote 107K8217

<sup>2</sup> Panótico é um processo de coloração utilizado durante a análise de células hematológicas, pois permite a distinção dos leucócitos através dos seus diferentes tipos de núcleos.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Atividade antioxidante

A figura 06 demonstra a curva de absorção (comprimento de onda 560nm) versus o tempo (600s). A curva controle demonstra toda a redução do NBT em formazan. As demais curvas representam as diferentes concentrações de rutina isolada (1, 10 e 100 $\mu$ M) comparadas com as curvas das diferentes concentrações de R-Ni2 (1, 10 e 100 $\mu$ M).

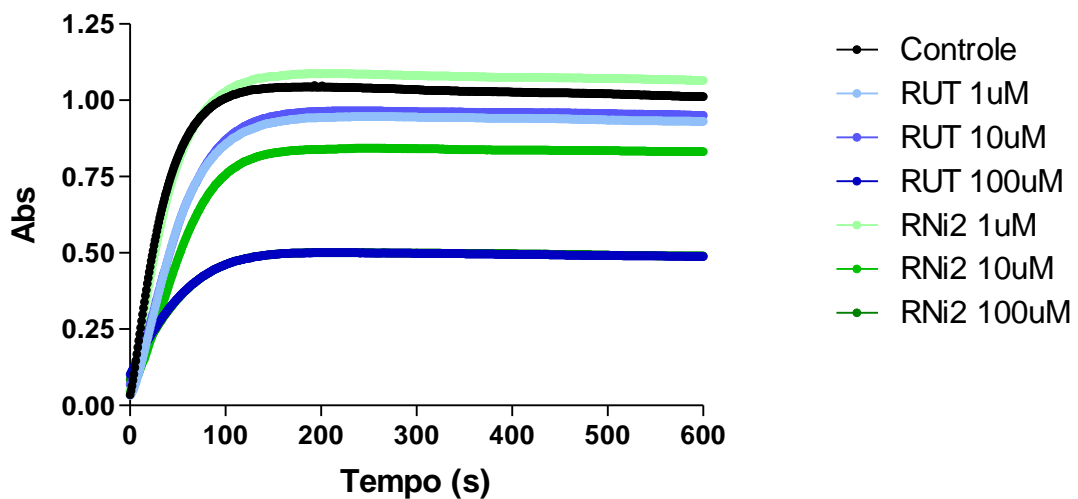


Figura 06: Curva de absorção em 560nm versus o tempo expresso em segundos. A curva controle demonstra o nível de absorção no qual todo o NBT disperso no meio se reduz à formazan. As demais curvas representam a rutina isolada e a rutina complexada ao Níquel-II, ambas nas seguintes concentrações: 1, 10 e 100 $\mu$ M.

Na figura 07 estão representados os resultados obtidos por meio da comparação entre o grupo da rutina isolada e o grupo da R-Ni<sub>2</sub>, sendo que a análise ficou restrita ao tempo de 300 s, pois foi neste momento em que a curva se estabilizou, devido a reação ter consumido todo o oxigênio presente. Foi observada um aumento significativo na atividade da R-Ni<sub>2</sub> quando comparada a rutina isolada na concentração de 10µM.

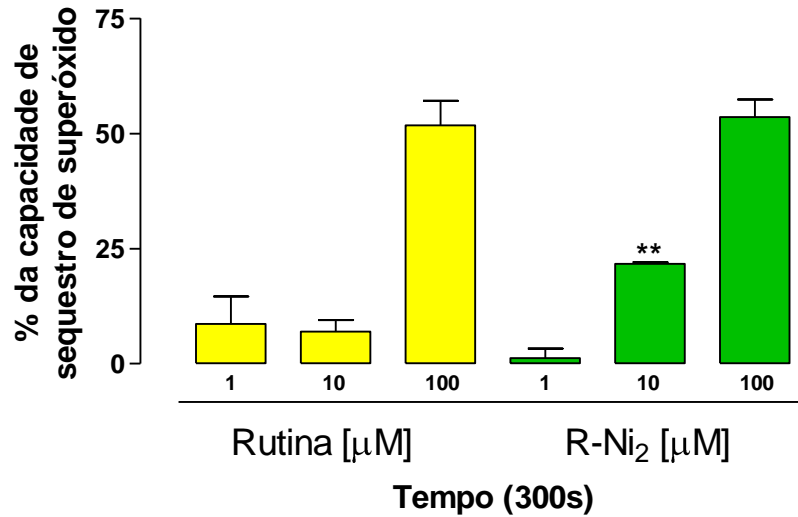


Figura 07: Atividade antioxidante no seqüestro do radical superóxido, demonstrado em porcentagem, da R-Ni<sub>2</sub> quando comparada a Rutina isolada, em diferentes concentrações (1, 10 e 100 µM) durante o tempo de 300s. \*\* P < 0,01, rutina versus R-Ni<sub>2</sub>.

A figura 08 demonstra a curva de absorção (comprimento de onda 560 nm) versus o tempo (600s). A curva controle demonstra toda a redução do NBT em formazan. As demais curvas representam as diferentes concentrações de rutina isolada (1, 10 e 100 $\mu$ M) comparadas com as curvas das diferentes concentrações de R-Fe1 (1, 10 e 100 $\mu$ M).

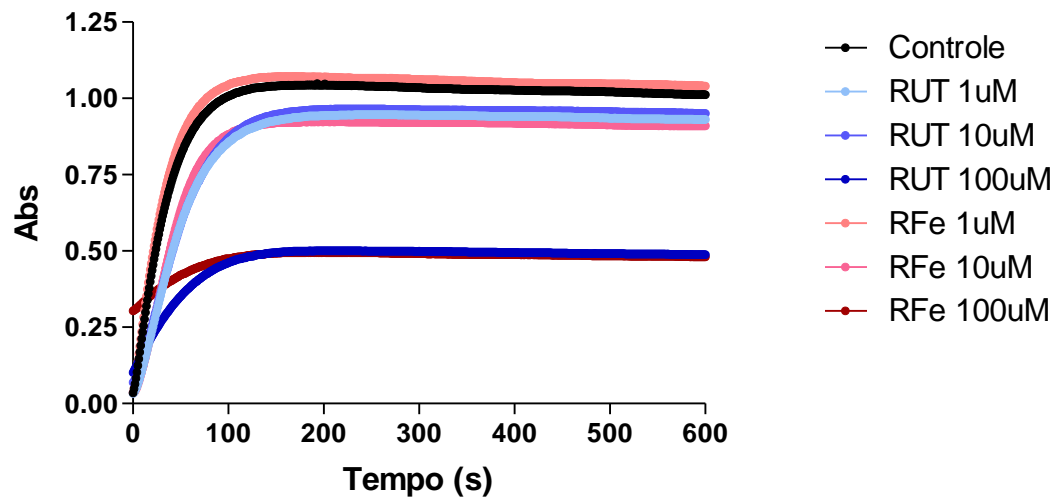


Figura 08: Curva de absorção em 560nm versus o tempo expresso em segundos. A curva controle demonstra o nível de absorção no qual todo o NBT disperso no meio se reduz à formazan. As demais curvas representam a rutina isolada e a R-Fe1, ambas nas seguintes concentrações: 1, 10 e 100 $\mu$ M.

Na figura 09 estão representados os resultados obtidos por meio da comparação entre o grupo da rutina isolada e o grupo da R-Fe1, sendo que a análise ficou restrita ao tempo de 300s, pois foi neste momento em que a curva se estabilizou, devido a reação ter consumido todo o oxigênio presente. Foi observada que não houve diferença na atividade entre a R-Fe1 quando comparada a rutina isolada, nas concentrações analisadas.

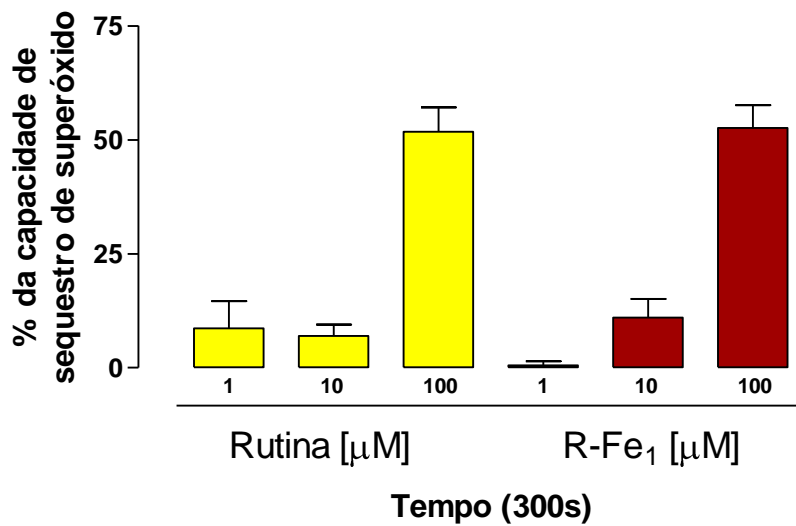


Figura 09: Atividade antioxidante no seqüestro do radical superóxido, demonstrado em porcentagem, da R-Fe1 quando comparada a Rutina, em diferentes concentrações (1, 10 e 100µM) durante o tempo de 300s.

A figura 10 demonstra a curva de absorção (comprimento de onda 560nm) versus o tempo (600s). A curva controle demonstra toda a redução do NBT em formazan. As demais curvas representam as diferentes concentrações de rutina isolada (1, 10 e 100 $\mu$ M) comparadas com as curvas das diferentes concentrações de R-Cu2 (1, 10 e 100 $\mu$ M).

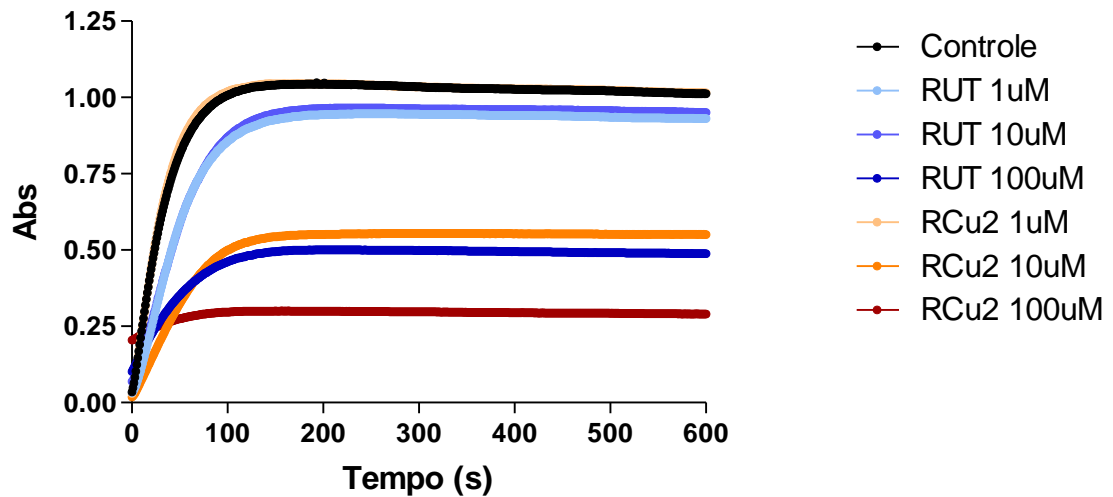


Figura 10: Curva de absorção em 560nm versus o tempo expresso em segundos. A curva controle demonstra o nível de absorção no qual todo o NBT disperso no meio se reduz à formazan. As demais curvas representam a rutina isolada e a rutina complexada ao Cobre-II, ambas nas seguintes concentrações: 1, 10 e 100  $\mu$ M.

Na figura 11 estão representados os resultados obtidos por meio da comparação entre o grupo da rutina isolada e o grupo da rutina complexada ao Cobre-II, sendo que a análise ficou restrita ao tempo de 300s, pois foi neste momento em que a curva se estabilizou, devido a reação ter consumido todo o oxigênio presente. Nas concentrações de 10 e 100 $\mu$ M, foi observada uma diferença significativa na atividade antioxidante da R-Cu<sub>2</sub> quando comparada a rutina isolada.

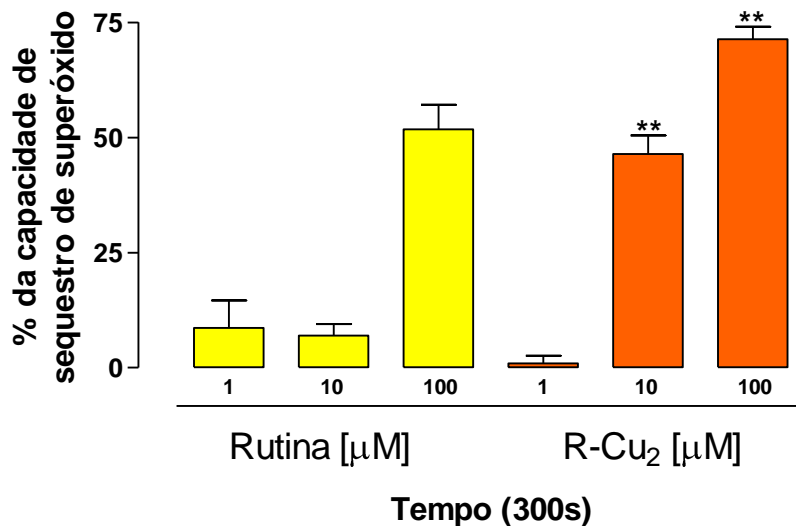


Figura 11: Atividade antioxidante no seqüestro do radical superóxido, demonstrado em porcentagem, da R-Cu<sub>2</sub> quando comparada a Rutina, em diferentes concentrações (1, 10 e 100  $\mu$ M) durante o tempo de 300s. \*\* P < 0,01, rutina versus R-Cu<sub>2</sub>.

A figura 12 demonstra todas as drogas testadas na capacidade de sequestro de superóxido. Com este gráfico visualizamos que R-Cu<sub>2</sub> apresentou melhor atividade antioxidante quando comparada aos demais compostos. Com este resultado foi escolhido o composto R-Cu<sub>2</sub> para dar sequência na realização dos experimentos.

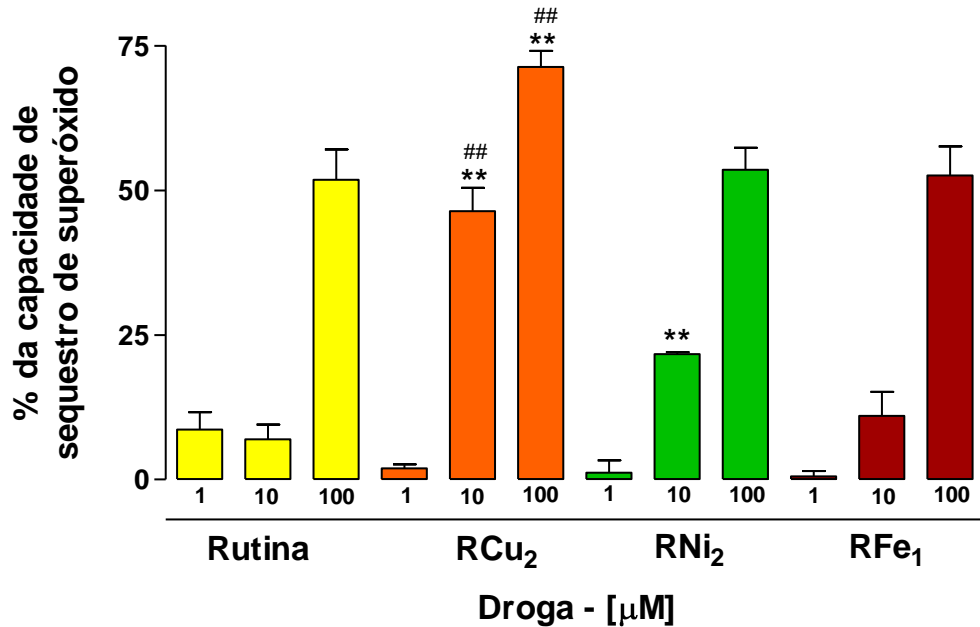


Figura 12: Atividade antioxidante no seqüestro do radical superóxido, demonstrado em porcentagem, da rutina, R-Cu<sub>2</sub>, R-Ni<sub>2</sub> e R-Fe<sub>1</sub>, em diferentes concentrações (1, 10 e 100 µM) durante o tempo de 300s. \*\* P < 0,01, rutina versus compostos.

## P < 0,01, R-Cu<sub>2</sub> versus R-Ni<sub>2</sub> e R-Fe<sub>1</sub>.

A tabela 03 demonstra todas as drogas testadas na capacidade de seqüestro do radical superóxido. Nesta tabela podemos demonstrar os valores quantificados da máxima capacidade antioxidante (tempo de 300s) dos compostos analisados.

Tabela 03: Capacidade antioxidante da rutina e derivados contendo metal de transição.

<b>Droga</b>	<b>Concentração</b>	<b>Capacidade Antioxidante (média <math>\pm</math> SD; %)</b>
Rutina	1	8,66 $\pm$ 2,99
	10	6,95 $\pm$ 2,54
	100	51,80 $\pm$ 5,29
R-Cu2	1	1,95 $\pm$ 0,65
	10	46,42 $\pm$ 4,01**
	100	71,32 $\pm$ 2,76**
R-Ni2	1	1,21 $\pm$ 2,10
	10	21,69 $\pm$ 0,34**
	100	53,57 $\pm$ 3,82
R-Fe1	1	0,53 $\pm$ 0,92
	10	11,01 $\pm$ 4,12
	100	52,59 $\pm$ 4,99

\*\* (P<0,01) Diferença estatística quando comparado grupo rutina vs gupos.

## 5.2 Atividade antiinflamatória

A técnica da peritonite aguda tem por finalidade avaliar a migração leucocitária, por meio da contagem total de leucócitos, que são liberados durante o processo da inflamação aguda e foram observados após a coleta do exsudato. Esse processo ocorre após a inoculação do agente flogístico via administração intraperitoneal.

Entretanto para que fosse observada a eficácia das drogas testadas nesse experimento, as mesmas foram elaboradas e administradas de acordo com o que fora descrito no item 4.3 de Materiais e Métodos.

O fator determinante para se utilizar apenas o composto R-Cu2 na avaliação antiinflamatória foram os resultados obtidos no seqüestro do radical superóxido.

### 5.2.1. Peritonite aguda induzida pela carragenina

Na figura 13 observa-se que a peritonite aguda induzida pela carragenina. O grupo pré-tratado com a rutina-Cobre 2 (R-Cu2) nas concentrações de 10 e 100mg/kg, mostrou-se eficaz em inibir, significativamente, a migração leucocitária,  $P < 0,05$ , quando comparada ao grupo controle negativo, que recebeu apenas o veículo. Quando se comparou o grupo R-Cu2 com o grupo da rutina isolada, nota-se também uma efetividade significativa da droga complexada nas concentrações testadas.

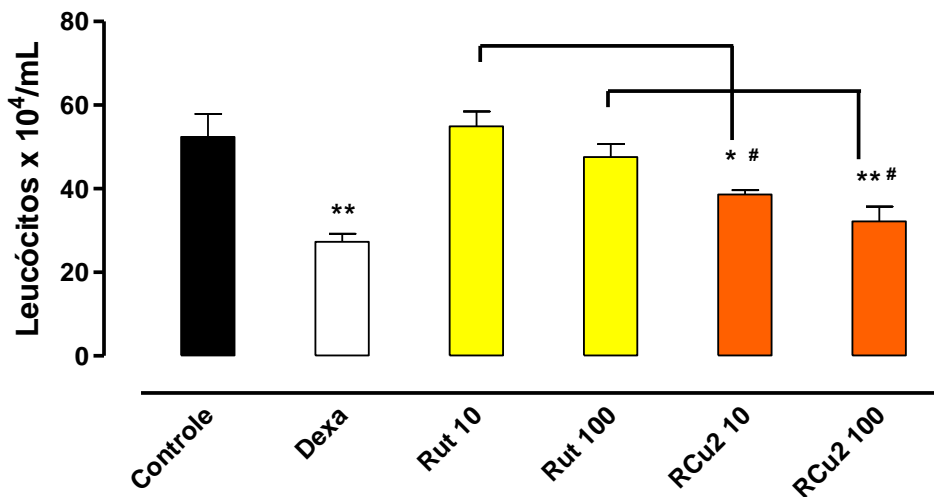


Figura 13: Avaliação da atividade antiinflamatória da rutina isolada (Rut) e da rutina complexada ao cobre-II (R-Cu2), quando administradas via oral nas concentrações de 10 e 100mg/kg, sobre a migração leucocitária induzida pela peritonite aguda tendo como agente flogístico a carragenina. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ , quando comparado controle versus grupos. # $P < 0,05$ , quando comparado Rutina versus R-Cu2.

Na contagem diferencial dos leucócitos no lavado da cavidade peritoneal foi verificado uma maior quantidade de neutrófilos e monócitos nos grupos avaliados (figura 14).

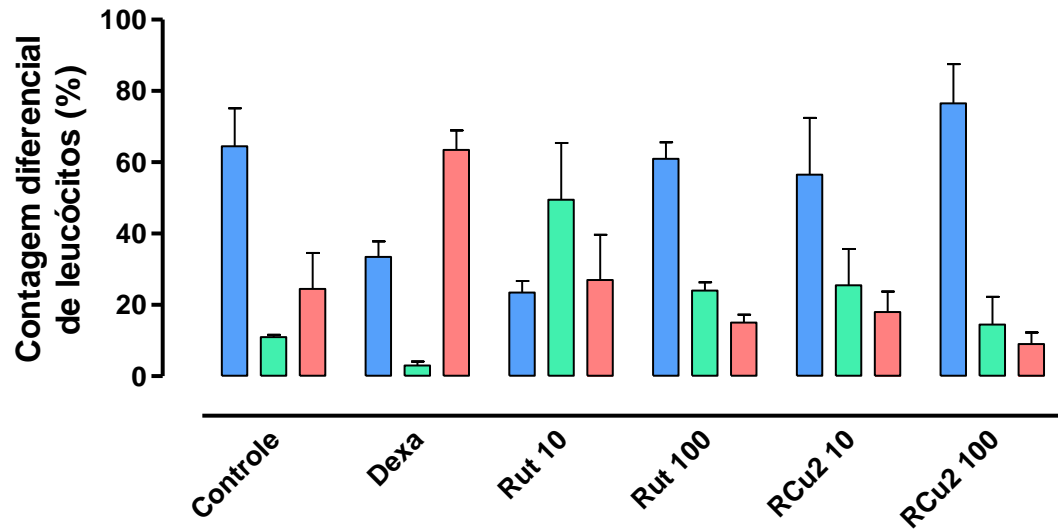


Figura 14: Representação da contagem diferencial celular: (■) neutrófilo, (■) linfócito e (■) monócito, na cavidade peritoneal após indução da peritonite por carragenina, nos grupos controle, dexametasona (5mg/kg), rutina e R-Cu2 (10 e 100 mg/kg).

### 5.2.2. Peritonite aguda induzida pela histamina

Na figura 15 observa-se a peritonite aguda induzida pela histamina. O grupo pré-tratado com a R-Cu2 nas concentrações de 10 e 100mg/Kg, não se mostrou eficaz em inibir, a migração leucocitária, quando comparada ao grupo controle negativo, que recebeu apenas o veículo. Mesmo quando se comparou o grupo da R-Cu2 com o grupo da rutina isolada, nota-se que não houve diferença entre eles.

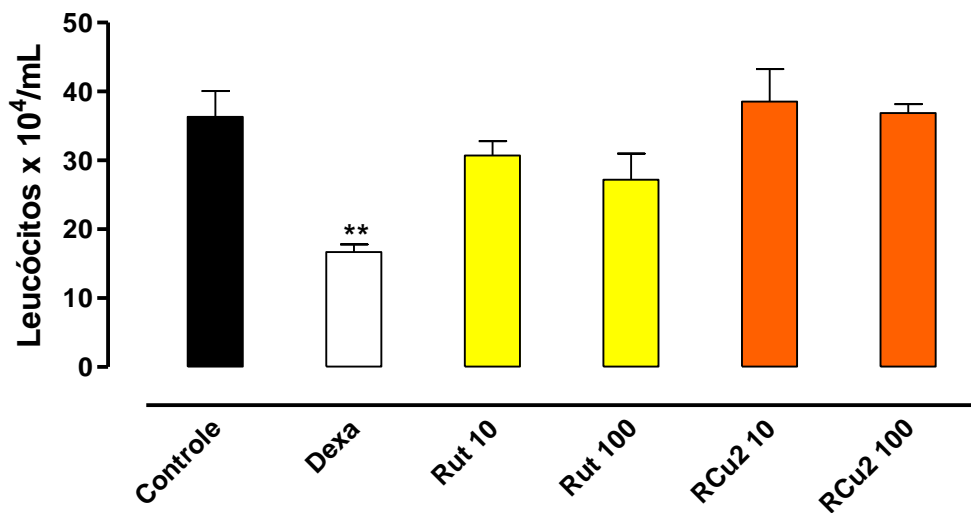


Figura 15: Atividade antiinflamatória da rutina isolada (Rut) e da rutina complexada ao cobre-II (R-Cu2), quando administradas via oral nas concentrações de 10 e 100mg/kg, sobre a migração leucocitária induzida pela peritonite aguda tendo como agente flogístico a histamina. \*\*P<0,01, quando comparado controle versus grupos.

Na contagem diferencial dos leucócitos no lavado da cavidade peritoneal foi verificado uma maior quantidade de linfócitos e monócitos nos grupos avaliados (figura 16).

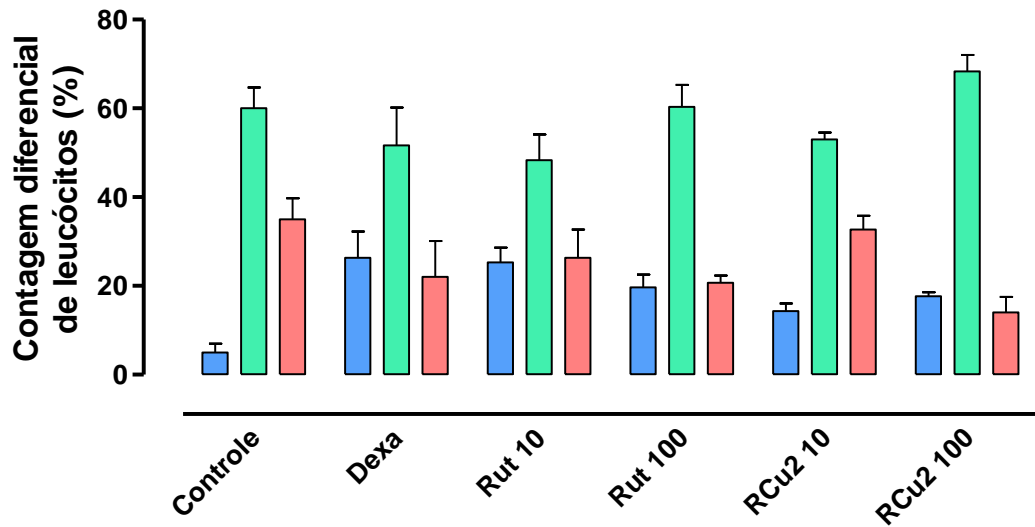


Figura 16: Representação da contagem diferencial celular: (■) neutrófilo, (■) linfócito e (■) monócito, na cavidade peritoneal após indução da peritonite por histamina, nos grupos controle, dexametasona (5mg/kg), rutina e R-Cu2 (10 e 100 mg/kg).

### 5.2.3. Peritonite aguda induzida pela bradicinina

Na figura 17 observa-se a peritonite aguda induzida pela bradicinina. O grupo pré-tratado com R-Cu2 nas concentrações de 10 e 100mg/kg, mostrou-se eficaz em inibir, significativamente, a migração leucocitária, \*P<0,05 e \*\*P<0,01, quando comparada ao grupo controle negativo, que recebeu apenas o veículo. Neste experimento também se observou que o grupo controle positivo (dexametasona) não foi eficaz sob influência da bradicinina. Também não houve diferença de atividade entre o grupo R-Cu2 e rutina isolada.

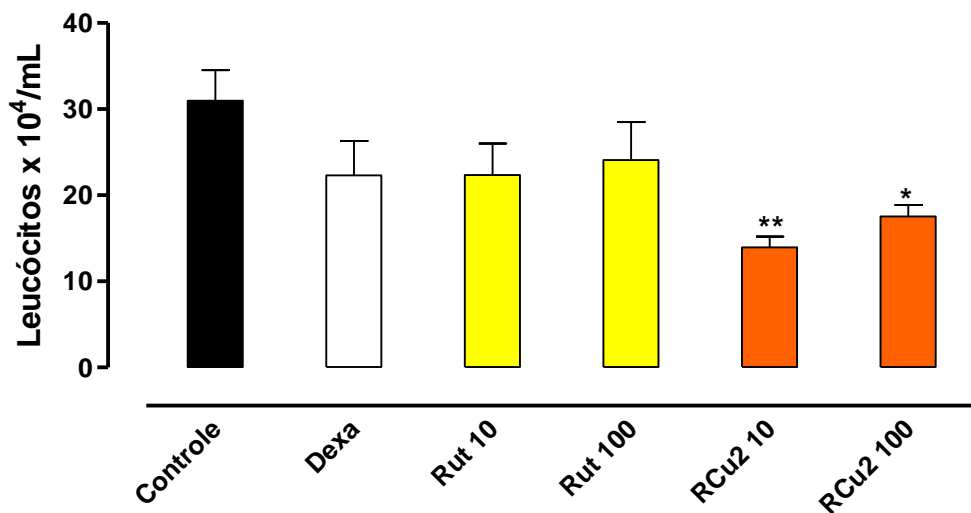


Figura 17: Atividade antiinflamatória da rutina isolada (Rut) e da rutina complexada ao cobre-II (R-Cu2), quando administradas via oral nas concentrações de 10 e 100mg/kg, sobre a migração leucocitária induzida pela peritonite aguda tendo como agente flogístico a bradicinina. \*P<0,05; \*\*P<0,01, quando comparado controle versus grupos.

Na contagem diferencial dos leucócitos no lavado da cavidade peritoneal foi verificado uma maior quantidade de linfócitos nos grupos avaliados (figura 18).

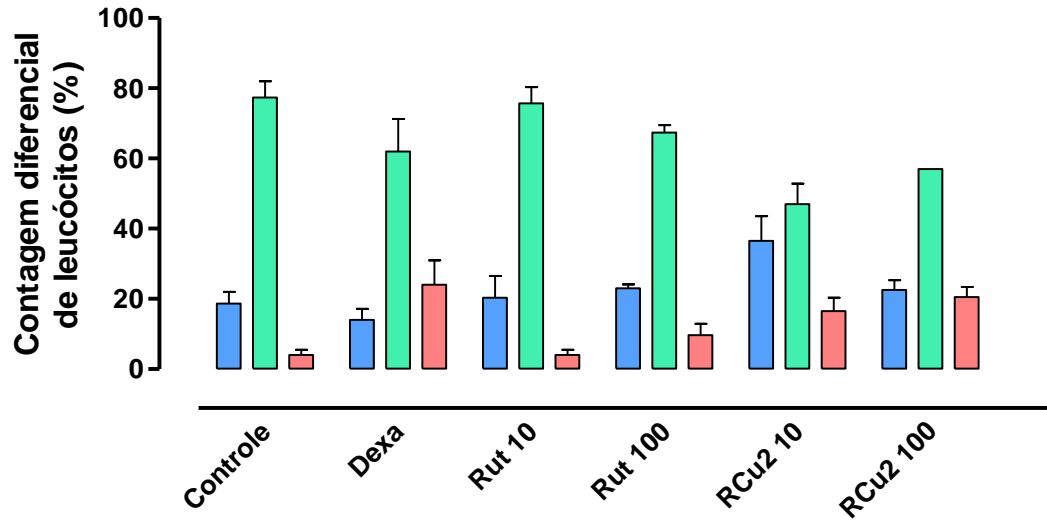


Figura 18: Representação da contagem diferencial celular: (■) neutrófilo, (■) linfócito e (■) monócito, na cavidade peritoneal após indução da peritonite por bradicinina, nos grupos controle, dexametasona (5mg/kg), rutina e R-Cu<sub>2</sub> (10 e 100 mg/kg).

#### 5.2.4. Peritonite aguda induzida pela prostaglandina E<sub>2</sub>

Na figura 19 observa-se a peritonite aguda induzida pela prostaglandina E<sub>2</sub>. O grupo pré-tratado com a rutina-Cobre 2 (RCu-2) nas concentrações de 10 e 100mg/kg, como o grupo da rutina isolada na concentração de 100mg/kg, mostraram-se eficazes em inibir, significativamente, a migração leucocitária, \*\*P<0,01, quando comparada ao grupo controle negativo, que recebeu apenas o veículo. Quando se compara R-Cu2 com o grupo da rutina isolada, não houve diferença significativa.

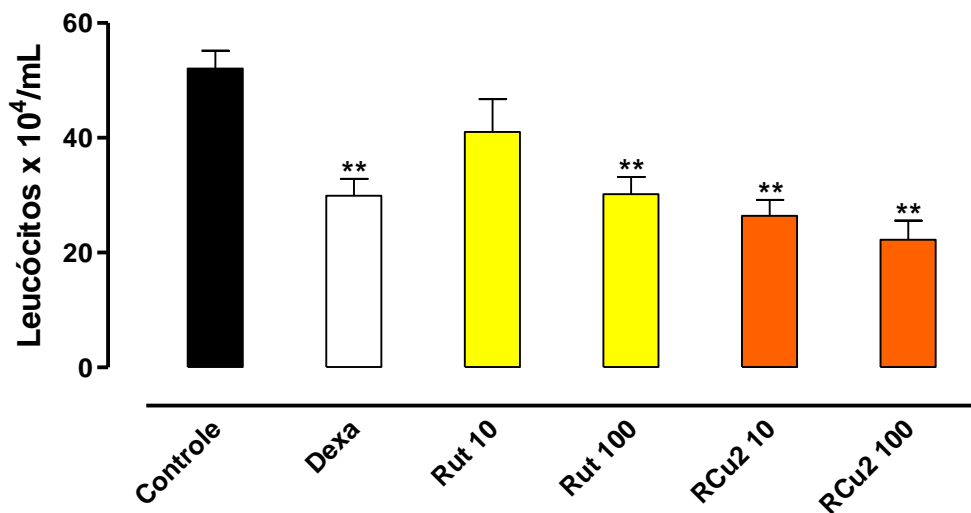


Figura 19: Atividade antiinflamatória da rutina isolada (Rut) e da rutina complexada ao cobre-II (R-Cu2), quando administradas via oral nas concentrações de 10 e 100mg/kg, sobre a migração leucocitária induzida pela peritonite aguda tendo como agente flogístico a prostaglandina E<sub>2</sub>. \*\*P<0,01, quando comparado controle versus grupos.

Na contagem diferencial dos leucócitos no lavado da cavidade peritoneal foi verificado uma maior quantidade de linfócitos nos grupos avaliados (figura 20).

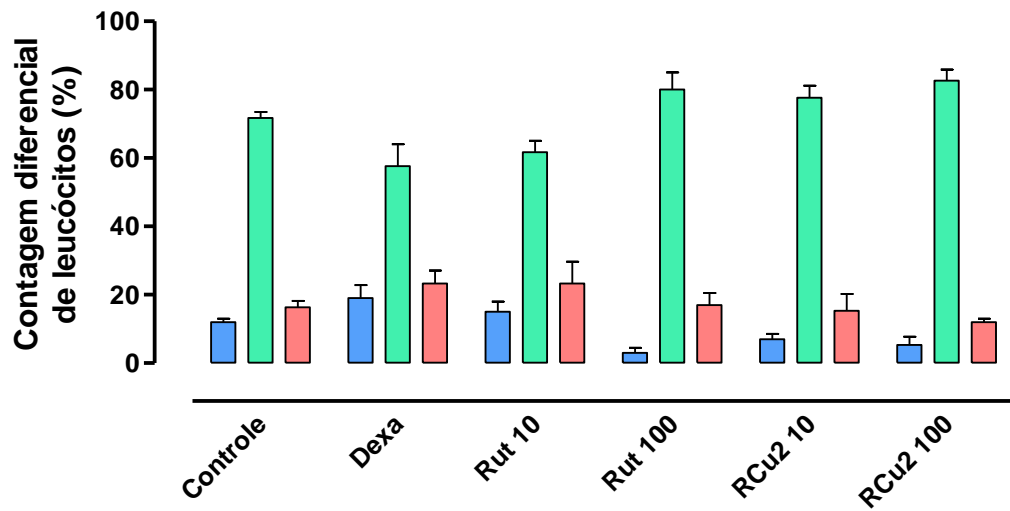


Figura 20: Representação da contagem diferencial celular: (■) neutrófilo, (■) linfócito e (■) monócito, na cavidade peritoneal após indução da peritonite por PGE<sub>2</sub>, nos grupos controle, dexametasona (5mg/kg), rutina e R-Cu<sub>2</sub> (10 e 100mg/kg).

### 5.2.5. Peritonite aguda induzida pela substância P

Na figura 21 observa-se a peritonite aguda induzida pela substância P. O grupo pré-tratado com R-Cu2 nas concentrações de 10 e 100mg/kg, não mostrou-se eficaz em inibir, a migração leucocitária, quando comparada ao grupo controle negativo, que recebeu apenas o veículo. Mesmo quando se comparou o grupo R-Cu2 com o grupo da rutina isolada, nota-se que não houve diferença entre eles. E se pode visualizar, novamente, neste que o grupo controle positivo (dexametasona) não foi eficaz sob influência da substância P.

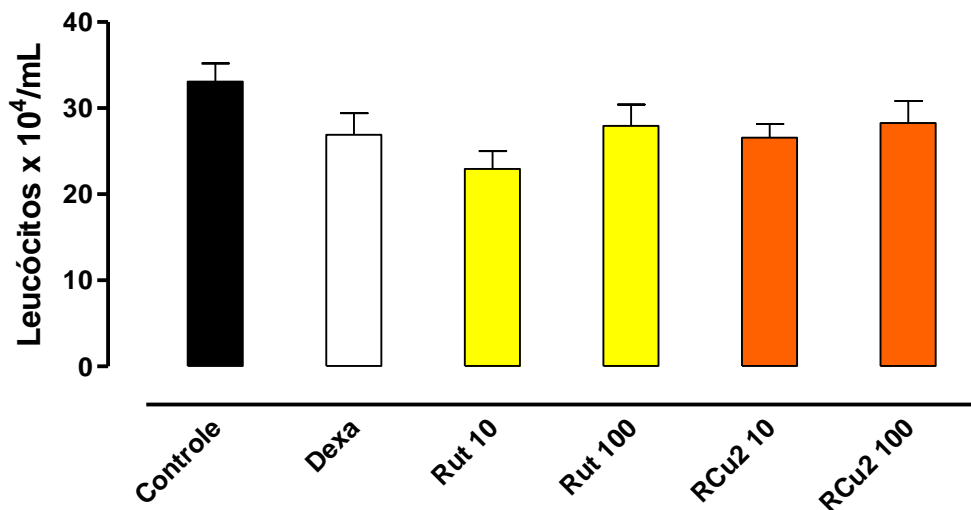


Figura 21: Atividade antiinflamatória da rutina isolada (Rut) e da rutina complexada ao cobre-II (R-Cu2), quando administradas via oral nas concentrações de 10 e 100mg/kg, sobre a migração leucocitária induzida pela peritonite aguda tendo como agente flogístico a substância P.

Na contagem diferencial dos leucócitos no lavado da cavidade peritoneal foi verificado uma maior quantidade de linfócitos nos grupos avaliados (figura 22).

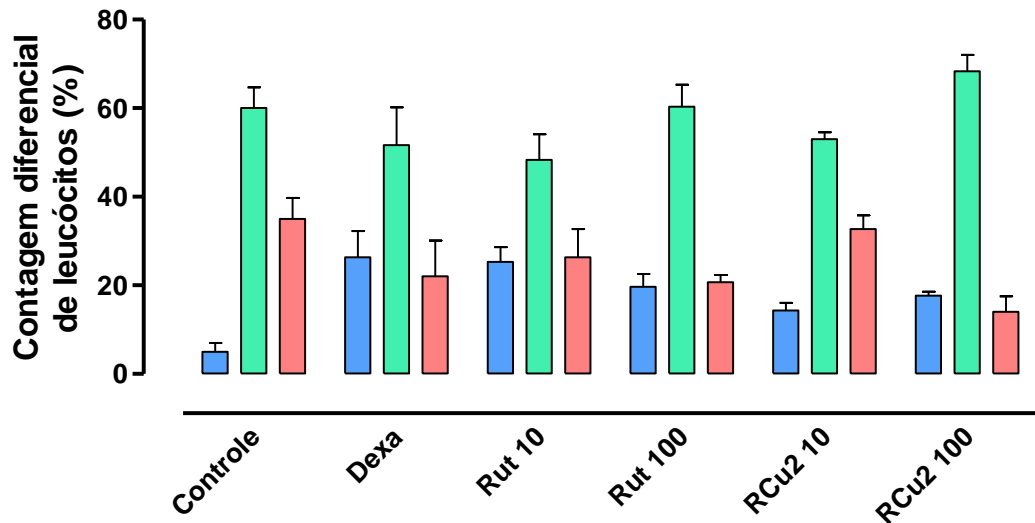


Figura 22: Representação da contagem diferencial celular: (■) neutrófilo, (■) linfócito e (■) monócito, na cavidade peritoneal após indução da peritonite por substância P, nos grupos controle, dexametasona (5mg/kg), rutina e R-Cu2 (10 e 100mg/kg).

Para melhor compreensão dos resultados da migração leucocitária induzida pelos agentes flogísticos: carragenina, histamina, bradicinina, PGE<sub>2</sub> e substância P, os resultados estão expressos em porcentagem de inibição do número de leucócitos totais para a cavidade peritoneal, comparados com o grupo controle negativo em relação aos tratamentos realizados com dexametasona e as doses de rutina complexada e isolada (Tabela 04).

Tabela 04: Porcentagem de inibição dos nº de leucócitos totais migrantes para a cavidade peritoneal.

<b>Grupos</b>	<b>Carragenina</b>	<b>Histamina</b>	<b>Bradicinina</b>	<b>PGE<sub>2</sub></b>	<b>SP</b>
<b>Dexametasona</b>	47,91%**	54,07%**	28,02%	42,51%**	18,75%
<b>Rut10mg/kg</b>	0%	15,45%	27,86%	21,27%	30,65%
<b>Rut100mg/kg</b>	9,16%	25,14%	22,21%	42,01%**	15,57%
<b>RCu210mg/kg</b>	26,22%*	0%	54,93%**	49,23%**	19,68%
<b>RCu2100mg/kg</b>	38,50%**	0%	43,43%*	57,25%**	14,61%

\* P<0,05 e \*\*P<0,01, quando comparado controle versus grupos.

## 6. DISCUSSÃO

Os flavonóides compreendem um grupo muito extenso de compostos, encontrados principalmente no reino vegetal (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004; COSTA, 2002). São biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e do acetato (DORNAS et al., 2008). Pode ocorrer ainda, variação de concentração e até mesmo de tipos de flavonóides numa mesma planta, variando de acordo com sua localização na estrutura da planta (folha, raiz, caule e flor) (MACHADO, 2006).

Os flavonóides são grupos de compostos polifenólicos e tem recebido particular atenção por apresentarem uma gama de atividades farmacológicas no tratamento de diversas doenças.

Estudos indicam uma potencialização das atividades biológicas de flavonóides quando associados ou complexados com metais de transição. No presente trabalho, foram realizados testes para avaliação da atividade antioxidante e antiinflamatória com os compostos rutina e rutina complexada com metais de transição (níquel II, cobre II e ferro I).

Segundo Nijveldt e colaboradores (2001), um importante efeito dos flavonóides é o seqüestro de radicais livres derivados do oxigênio, sendo esta, talvez, a atividade mais eficaz destes compostos. A atividade antioxidante da rutina já é bem descrita. Noroozi e colaboradores (1998) relataram que a rutina apresentou resultados melhores que os da vitamina C na inibição dos danos oxidativos induzidos pelo  $H_2O_2$  no DNA de linfócitos humanos e, Hanasaki e colaboradores (1994) descreveram que a rutina teve melhor atividade sobre o radical hidroxila do que o manitol, demonstrando a importância deste composto.

Afanas'eva e colaboradores (2001) relatam que a rutina apresenta melhor eficácia na atividade antioxidante e antiinflamatória quando associado a metais de transição. Kostyuk e colaboradores (2007) também reportam que os flavonóides complexados tem suas atividades antioxidantes aumentadas. Desta forma, verificamos que ocorre potencialização da atividade antioxidante destes compostos, tanto na presença, quanto após a complexação com metais.

Nos resultados obtidos no presente trabalho foi verificado que em todas as concentrações de rutina, R-Ni<sub>2</sub>, R-Fe<sub>1</sub> e R-Cu<sub>2</sub> (1, 10 e 100µM) foram observadas atividades antioxidantes dos compostos pelo seqüestro de radicais superóxido, como podemos observar nas figuras 07, 09 e 11, respectivamente. No entanto,

quando se compara a melhora da capacidade de seqüestro do radical superóxido da rutina isolada, foi observado que a R-Cu<sup>2+</sup> apresentou um aumento significativo desta atividade nas concentrações de 10 e 100µM (P<0,01), como observado na figura 11.

Assim, pode-se sugerir que a complexação do flavonóide com metal de transição aumenta a atividade antioxidante do composto. E que este aumento no potencial antioxidante é mais expressivo com a presença do metal cobre junto ao flavonóide. Isto também fica claro, quando observamos o aumento da atividade antioxidante do cobre quando comparado aos demais metais (Ni<sup>2+</sup> e Fe<sup>1+</sup>), como observamos na figura 12.

Resultados semelhantes também puderam ser vistos, como o trabalho de Li e colaboradores (2007) no qual se demonstrou que os metais de transição cobre, zinco e níquel complexados com o flavonóide naringenina apresentam aumento na atividade antioxidante "in vitro".

Pereira (2007) também verificou durante a experimentação de um flavonóide complexado à metal de transição, submetido ao ensaio de peritonite induzido por carragenina, a diminuição do processo inflamatório por meio da regressão da migração de células leucocitárias na cavidade peritoneal.

Fenômeno que também pode ser explicado por meio de um processo fisiologicamente comum no qual os metais de transição livres em meio biológico são excelentes antioxidantes, visto que catalisam reações como Fenton e da Haber-Weiss. Assim, quando temos a interação do metal de transição à estrutura do flavonóide potencializamos o efeito antioxidante dessa substância (BARREIROS; DAVID J. M.; DAVID J.P., 2006).

Outra hipótese que pode ser atribuída é a importância de quão são fundamentais alguns metais no auxílio as reações quando catalisadas por enzimas. Esse componente adicional é chamado de co-fatores fazendo com que um íon orgânico possa potencializar a atividade de substâncias (LEHNINGER, 2002).

Todavia acredita-se que o efeito antioxidante reforça a tese do sinergismo entre a rutina e o metal de transição e que possa estar inibindo de maneira significativa a enzima Cu-Zn SOD, pois segundo BAR-PELED e colaboradores (1996), ela é fundamental para o metabolismo do ânion superóxido e torna-se necessário a presença destes co-fatores enzimáticos, como Cu II. Portanto ela é de suma importância para defesa do organismo devido a dismutação do radical ânion superóxido (KURUTAS et al., 2005) .

Muitos flavonóides têm demonstrado a capacidade de inibir a permeabilidade capilar e, com isso, inibir a exsudação protéica e migração de leucócitos (SILVA et al., 2002).

No experimento realizado neste trabalho, foram utilizados cinco agentes flogísticos: carragenina, histamina, bradicinina, prostaglandina E<sub>2</sub> e substância P.

A carragenina um mucopolissacarídeo derivado de algas marinhas, que desencadeia o processo inflamatório mediado por prostaglandinas, do tipo não-neurogênica, apresenta pico máximo entre 2 a 4 horas após aplicação (SARTORI, 2003; BOLETA-CERANTO; VEIGA; ARSATI, 2005). Segundo ROTELLI e colaboradores (2003) o processo inflamatório induzido pela carragenina deflagra 03 fases: primeiro o aumento de histamina, na segunda fase a mediação da cininas e por fim a proliferação das prostaglandinas o que corrobora com que foi estudado por NAUSEEF; METCALF; ROOT (1983).

A histamina desempenha papel fundamental no processo inflamatório através do aumento da permeabilidade celular, pois se inicia a vasodilatação, desencadeada ao ligar-se à receptores H<sub>1</sub> das células endoteliais. A histamina é fundamental para a contração e separação das células endoteliais permitindo assim a passagem dos leucócitos circulantes. Ela também esta envolvida na expressão da molécula de adesão P-seletina pelas células do endotélio. O principal local de armazenamento da histamina na maioria dos tecidos é no mastócito e no sangue, o basófilo. A histamina estimula as terminações nervosas e nos tecidos periféricos atua nos receptores neuronais. Para nosso projeto o fato de maior relevância é o feito ativador da histamina sobre a fosfolipase A<sub>2</sub>, enzima essa responsável pela formação de prostaglandinas (GOODMAN & GILMAN, 1996).

Assim como a histamina, a bradicinina é proveniente do sistema das cininas e tem como característica principal, o controle do tônus vascular (MORAIS et al., 1999). Também regula algumas ações inerentes ao processo inflamatório como a dor, excitando neurônios que promovem a liberação de neuropeptídios como a substancia P, e na fase aguda ela é responsável pela potencialização da aderência e ativação dos neutrófilos. Ela estimula também, a liberação do ácido araquidônico, por meio da ativação da fosfolipase A<sub>2</sub>, processo fundamental para a síntese da prostaglandina - E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e podem desencadear a produção de mediadores da inflamação como IL-1 e TNF nas células inflamatórias (GOODMAN & GILMAN, 1996).

A síntese da prostaglandina  $E_2$  é iniciada com a ativação da proteína G que resulta na ativação da proteína quinase dependente de GTP que promove a fosforilação do substrato protéico e ativação da enzima fosfolipase  $A_2$  desencadeando a elevação citosólica do  $Ca^{2+}$  e conseqüentemente a liberação do araquidonato, precursor de sua produção (HILÁRIO, 2006).

Já a substância P é um peptídeo de origem neuronal, responsável pela dor e indutor da liberação de mediadores inflamatórios como citocinas, radicais de oxigênio, derivados do ácido araquidônico e histamina que potencializam a lesão tecidual e estimulam o recrutamento de leucócitos, amplificando a resposta inflamatória (HOLZER; HOLZER-PETSCHKE, 1997).

Um dos principais sinais da inflamação é caracterizada pela formação do edema ou o extravasamento do exsudato para o peritônio, decorrente ao grande fluxo de proteínas em direção ao interstício, ação essa proveniente desses mediadores da inflamação.

O controle positivo utilizado foi a dexametasona, que é um antiinflamatório esteroidal usado no tratamento de diversas doenças. Seu principal mecanismo de ação se deve por meio da inibição da transcrição do gene da enzima cicloxigenase-2 e a indução da proteína lipocortina, que inibe a fosfolipase  $A_2$  (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

Sendo assim, o objetivo principal deste estudo pôde ser visualizado com sucesso, pois se verificou durante o processo de inflamação aguda, alvo deste projeto que diferentes mediadores biológicos que influenciam etapas específicas de sua cascata, nos quais determinados agentes antiinflamatórios exibem propriedades terapêuticas através do bloqueio da ação ou da síntese de mediadores pró-inflamatórios. A ação de alguns flavonóides tem sido alvo de inúmeros estudos quanto a sua atividade antiinflamatória, na inibição da síntese e da atividade biológica de diferentes mediadores pró-inflamatórios, principalmente os mediadores derivados do ácido araquidônico, como a  $PGE_2$ ,  $PGF_2$  e o  $TXA_2$ , todos fundamentais no processo da inflamação (BENAVENTE-GARCÍA; CASTILLO, 2008). Por exemplo, a inibição da prostaglandina irá diminuir adesão das plaquetas e neutrófilos na parede do endotélio lesionado, sendo bem descrito por MANTHEY (2000) que também propõe a inibição do sistema complemento e a diminuição da agregação plaquetária. Ambos os mecanismos tem fundamental importância no processo inflamatório.

Todavia alguns mediadores derivados do ácido araquidônico são fundamentais para ativação do neutrófilo e estão estritamente ligados a estimulação e produção do dano tecidual por meio da ROS.

Lembrando que o processo inflamatório é um processo extremamente complexo, no qual MANTHEY (2000) demonstra em seu artigo o poder de alguns flavonóides em inibir a lipoxigenase da cicloxigenase, corroborando com que foi descrito acima.

Outros estudos têm demonstrado que os flavonóides atenuam a liberação da histamina pela inibição de leucotrienos gerados por reações catalisadas pela lipoxigenase (MANTHEY, 2000).

Segundo MANTHEY (2000) existem evidências sobre a possibilidade de ação sobre a fosfodiesterase, enzima envolvida na ativação celular por meio de sua influência nos níveis de cAMP, fundamental no controle plaquetário e na expressão de citocinas, como TNF; IL-10; IL-1; ICAM-1; E-seletinas; V-CAM, dentre outras. Portanto a ativação celular envolve uma série de quinases fundamentais para iniciação de certos processos inflamatórios.

Os leucócitos circulantes de maior abundância no sangue são os neutrófilos e compreendem até 70% do total dos glóbulos brancos circulantes em condições fisiológicas normais (SANTOS, 2007).

Durante a resposta inflamatória aguda, o neutrófilo é a principal célula pró-inflamatória de defesa do sistema imune. Além disso, os neutrófilos são responsáveis pela liberação de mediadores pró-inflamatórios, como as citocinas que atuam no recrutamento e ativação de outras células efetoras. Seus domínios intracelulares interagem com várias proteínas desencadeando sinais de transdução que levam a uma grande variedade de respostas (SANTOS, 2007).

A ativação de algumas enzimas citoplasmáticas, como as fosfolipases C, D e A<sub>2</sub> e diferentes proteínas quinases (PK), norteiam uma variedade de respostas dos neutrófilos, como adesão ao endotélio, quimiotaxia, fagocitose, retardo da apoptose e o "burst" respiratório (SANTOS, 2007).

Os resultados obtidos demonstram que a rutina complexada com cobre II (R-Cu<sub>2</sub>) apresentou uma redução na migração celular no modelo de peritonite induzida pela carragenina, bradicinina e PGE<sub>2</sub>, como podemos observar nas figuras 11, 15 e 17. Na peritonite induzida pela carragenina o complexo R-Cu<sub>2</sub> teve uma atividade significativa quando comparada com o grupo controle e com a rutina isolada nas

duas concentrações avaliadas (10 e 100mg/kg). Visto o mecanismo de ação ativado pela carragenina, ou seja, a liberação de PGE<sub>2</sub> pela via da fosfolipase A<sub>2</sub> oxidada pela ação da cicloxigenase (COX). Na presença da bradicinina e PGE<sub>2</sub>, o complexo teve uma resposta efetiva na redução da migração total de leucócitos quando comparada ao controle.

Na efetividade do composto R-Cu<sub>2</sub> atuando sobre o processo inflamatório agudo induzido pela carragenina no modelo de peritonite, todas as doses apresentaram inibição da resposta quanto à migração de leucócitos, especialmente neutrófilos, para o sítio inflamatório. Desta forma, estes resultados deixam claro que R-Cu<sub>2</sub> pode estar atuando em uma ou várias das manifestações celulares e vasculares induzidas pela carragenina, como citado anteriormente, na peritonite.

Já a administração de bradicinina causa reação inflamatória duradoura. Este efeito é primariamente mediado por ativação de receptores B<sub>2</sub> da bradicinina (MORAIS et al., 1999). Quanto a avaliação da droga em questão, R-Cu<sub>2</sub>, ressalta-se a eficácia obtida em todas as doses testadas em inibir o extravasamento inflamatório, sugerindo que a presença do metal pode estar antagonizando receptores B<sub>2</sub> e conseqüentemente inibindo a ação da bradicinina e os eventos de inflamação relacionados a ela.

A atividade antiinflamatória pode ser realizada por diversos mecanismos. Coutinho e colaboradores (2009) descreveram que a rutina age no processo inflamatório através dos mecanismos de inibição da enzima cicloxigenase e na inibição de citocinas pró-inflamatórias. Os resultados obtidos corroboram com a hipótese de que compostos, na presença de metais de transição, têm seus efeitos potencializados, pois o tratamento de rutina complexada com cobre II (R-Cu<sub>2</sub>) interferiu na migração celular. Isto também leva a sugerir que esta inibição seja realizada através de mecanismos desencadeado pela via de liberação da prostaglandina E<sub>2</sub> e pela cinina.

Além disso, na peritonite induzida pela histamina e substância P, tanto o complexo quanto a rutina isolada, não apresentaram atividade frente à migração celular total. Sendo assim, pode-se descartar a atuação do composto R-Cu<sub>2</sub> nos efeitos mediado pelos receptores H<sub>1</sub> (histamina) e NK-1 e NK-3 (substância P).

A eficácia da molécula de flavonóide complexada ao Cu II deve ter correlação com sua estrutura química e a maior afinidade e especificidade por alguns receptores, formando um complexo fármaco-receptor que leva à resposta biológica e

sua intensidade é modulada pelo número de complexo fármaco-receptor formado. (HOWLAND; MYCEK, 2007)

Conseqüentemente se diminuimos a população de neutrófilos conseguimos diminuir a migração das células para o local da inflamação e/ou a exposição de ânions superóxido diminuindo sua capacidade quimiotática.

No resultado de contagem diferencial de leucócitos foi observado aumento de neutrófilos nos animais com peritonite induzida pela carragenina. Enquanto que nos animais que receberam os demais agentes flogísticos, houve uma maior expressão de linfócitos. Esse aumento de linfócitos nos demais grupos pode ser decorrente ao tempo de indução da peritonite. Para melhor conhecimento destes resultados, outras investigações deveriam ser realizadas.

Com todos estes resultados, foi observado que o flavonóide rutina complexado com metal cobre II apresentou um aumento na atividade de seqüestro do radical superóxido e inibição na migração celular. Além disso, neste projeto pode-se sugerir um possível mecanismo de atuação do composto R-Cu<sup>2+</sup> na habilidade de inibir a degranulação do neutrófilo pela provável ação inibitória da PGE<sub>2</sub> e pela diminuição da liberação do ácido araquidônico e outros mediadores químicos (NIJVELDT et al.,2001). Como também na diminuição da produção do ânion superóxido proveniente do “burst” respiratório assim inibindo a sinalização molecular durante o processo de quimiotaxia (BARREIROS; DAVID J. M.;DAVID J.P., 2006). Inibição essa comprovada por meio da aplicação da técnica de redução do NBT (*in vitro*) (HALLIWELL et al.,1995).

## 7. CONCLUSÃO

Contudo podemos concluir que o flavonóide rutina teve sua atividade antioxidante potencializada através da complexação com metais de transição como o níquel II e o cobre II. O complexo rutina-cobre II aumentou significativamente a capacidade de seqüestro do radical superóxido quando comparada com a rutina isolada, "in vitro".

Além disso, o complexo rutina-cobre II demonstrou reduzir a migração celular em modelo de peritonite induzida por carragenina, bradicinina e prostaglandina E<sub>2</sub>, em camundongos.

Com isso, verificamos que a complexação do flavonóide rutina ao metal de transição, especialmente o Cu II, apresenta grande atividade antioxidante e antiinflamatória, podendo ser um grande potencial terapêutico.

Fica a sugestão de aprofundarmos tais constatações através de novos ensaios que enriqueçam ou corroborem com tais evidências, pois muitos investigadores acreditam que se conseguirmos bloquearmos a inflamação aguda teremos conseqüentemente a melhora do quadro da inflamação crônica e automaticamente a diminuição de patologias como artrite, asma psoríase e outras.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia celular e molecular** 4<sup>o</sup> edição, Ed. Revinter, p. 274-283, Rio de Janeiro, 2003.

AFANAS'EVA, I. B.; OSTRAKHOVITCH, E. A.; MIKHAL'CHIK, E. V. ; IBRAGIMOVA, G. A.; KORKINA L. G. Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. **Biochem Pharmacol.** v.15; n. 61(6), p.677-84, 2001.

AHUMADA, C. et al. The effects of a triterpene fraction isolated from *Crataegus monogyna* Jacq. on different acute inflammation models in rats and mice. Leucocyte migration and phospholipase A<sub>2</sub> inhibition. **J. Pharm. Pharmacol.** v. 49, p. 329-331, 1997.

ALIAGA, C.; LISSI, E. A. Comparasion the free radical scavenger theoretical study. **Can J Chem.** v 82, p 1668-1673, 2004.

AMANDA, E. I. The chemokine family. Potential therapeutic targets from allergy to HIV infection. **Eur J Dermatol.** v 8, n 3, p 147 – 157, 1998.

BARJA DE QUIROGA, G. Brown fat thermogenesis and exercise: two examples of physiological oxidative stress? **Free Radic Biol Med.** v. 13, n.4, p.325-40, 1992.

BAR-PELED, O.; KORKOTIAN, E.; SEGAL, M.; GRONER, Y. Constitutive overexpression of CU/ZN superoxide dismutase exacerbates kainic acid-induced apoptosis of transgenic-CU/ZN superoxide dismutase neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v 93, p 8530- 8535, 1996.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova** v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO J. Review: Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular and anti-inflammatory activity. **J. Agric. Food Chem.** v. 56, p. 6185-6205, 2008.

BIANCHI, M.L.P; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr. Campinas.** v. 12, n. 2, p. 123-130, maio/ago., 1999.

BOLETA-CERANTO, D. C. F.; VEIGA, M. C. F. A.; ARSATI, F. Efeito da dexametasona e do meloxicam sobre o extravasamento plasmático induzido por carragenina na ATM de ratos. **Revista Odonto Ciência**, Porto Alegre, v. 20, n. 50, p. 354-360, out./dez. 2005.

BOOTS, A. W.; HAENEN, G. R.; BAST, A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. **Eur J Pharmacol.** v.13, n.585(2-3), p. 325-37, 2008.

CARLSSON, O.; RIPPE, B. Peritoneal lymphatic absorption and solute exchange during zymosan-induced peritonitis in the rat. **Am J Physiol.** v. 277, p.H1107-12, 1999.

CERQUEIRA, F M et al. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **QUIM NOVA.** v. 30, n. 2, p 441- 449, 2007.

CHARAMI, M. T. et al. Antioxidant and antiinflammatory activities of *Sideritis perfoliata* subsp. *perfoliata* (Lamiaceae). **Phytother Res.** v.22, n.4, p.450-4, 2008.

COSTA, A. F. **Farmacognosia.** 2º vol. 5º ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002. 1117 p.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonóides: potenciais agentes terapêuticos. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 3, jul. 2009. Disponível em: <<http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/view/51/98>>. Acesso em: 31 out. 2009.

CYRINO, L. A. R.; HACKLL, P. N.; CUTTLE, G.; NICOLAU, M. Efeito da quercetina sobre o extravasamento plasmático no sistema nervoso dura-máter de ratos. **Rev Bras Farmacogn.** v 12, p 37-39, 2002.

DEKKER, L. V. ; SEGAL, A W. Perspectives: signal transduction. Signals to move cells. **Science.** v 287, n 5455, p 982 – 985, feb., 2000.

DELVES, P. J.; ROITT, I. M. Advances in Immunology: The Immune System. **The New England Journal of Medicine.** v. 343, n. 1, July 6, 2000.

DINARELLO, C.A. Proinflammatory Cytokines. **Chest** , v118, n 2, p 503-508, August 2000.

DORNAS, W. C. et al. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 28, n. 3, p. 241-249, mar. 2008.

DROEBNER, K.; EHRHARDT, C.; POETTER, A.; LUDWIG, S.; PLANZ, O. CYSTUS052, a polyphenol-rich plant extract, exerts anti-influenza virus activity in mice. **Antiviral Res.** v76, n.1, p.1-10, May 15, 2007.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev.** v.82, n.1, p.47-95, 2002.

ENGELHARD, T. B.; WOLBURG, H. Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? **Eur. J. Immunol.** v 34, n 11, p 2955 – 2963, nov 2004.

FENSTER, C. P.; WEINSIER, R. L.; DARLEY-USMAR, V. M.; PATEL, R. P. Obesity, aerobic exercise, and vascular disease: the role of oxidant stress. **Obes Res.** v.10, n.9, p.964-8, 2002.

GOLDFARB, G.H. Antioxidants: role of supplementation to prevent exercise-induced oxidative stress. **Med Sci Sports Exerc.** v25, n.2, p.232-6, 1993.

GOLDSBY, R.; KIND, T.; OSBORNO, B. **Kuby Imunologia**. 4<sup>a</sup> ed. Vol 1. 2002.

GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9<sup>o</sup> Ed., 1996, Editora MacGraw-Hill, Rio de Janeiro.

HABIBUDDIN, M. et al. Antidiabetic effect of alcoholic extract of *Caralluma sinaica* L. on streptozotocin-induced diabetic rabbits. **J Ethnopharmacol**. v.8; n.117(2), p.215-20, 2008.

HALLIWELL, B. et al. The characterization of antioxidants. **Fd. Chem. Toxic**. v.33, n. 7, p. 601-617, 1995.

HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxigens scavenging and antioxidantive effects of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 16, n. 6, p. 845-850, June 1994.

HEINRICH, P.C.; BEHRMANN, I. MULLER-NEWEN, G.; SCHAPER, F.; GRAEVE, L.. Interleukin-6-type cytokine signaling through the gp 130/jak/stat pathway. **Biochem J**. v 334, p 297 – 314, 1998.

HEIT, B.; COLARUSSO, P.KUBES, P. Fundamentally different roles for LFA-1, MAC-1 and  $\alpha$  4-integrin in neutrophil chemotaxis. **J Cell Sci**, v 118, p. 5205-20, Nov 2005.

HILÁRIO, M. O. E. et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors. **Jornal de Pediatria**. v 82, n 5, p 206-212, 2006.

HOLZER, P.; HOLZER-PETSCHKE, U. Tachykinins in the gut. Part II. Roles in neural excitation, secretion, and inflammation. **Pharmacol Ther**. v 73, n 3, p 219-263, 1997.

HORDIJK, P. Endothelial signaling in leukocyte transmigration. **Cell Biochem Biophys**. v 38, n 3, p 305 – 322, 2003.

HOWLAND, R.D.; MYCEK, M.J. **Farmacologia ilustrada**, 3<sup>o</sup>ed., 2007, Editora Artmed. São Paulo.

HUANG, Y et al. Inhibition of nitric oxide/cyclic gmp-mediated relaxation by purified flavonoids, baicalin and baicalein, in rat aortic rings. **Biochemical Pharmacology**. v.67, p 787-794, 2004.

JASON, J.; ARCHIBALD, L. K.;NWANYAANWU, O. C.; BYRD, M. G.; KAZEMBE, P. N.; DOBBIE, H.; JARVIS, W. R. Comparasion of serum and cell-specific cytokines in humans. **Clin Diagn Lab Immunol**. v 8, n 6, p 1097 – 1103, 2001.

KANASHIRO, A.; KABEYA, L. M.; POLIZELLO, A. C. M.; LOPES, N. P.; LOPES, J. L. C.; LUCIANO-VALIM, Y. M. Inhibitory activit of flavonoids from *Lychnosphora sp* on generation of reactive oxygen species by neutrophils upon stimulation by immune complexes. **Phytother. Res**. v 18, n 1, p 61-65, 2004.

KHALIL, N. M.; PEPATO, M. T.; BRUNETTI, I. L. Free radical scavenging profile and myeloperoxidase inhibition of extracts from antidiabetic plants: *Bauhinia forficata* and *Cissus sicyoides*. **Biol Res**. v 41, p 165-171, jun 2008.

KEYNES, R. G.; GARTHWAITE, J. Nitric oxide and its role in ischaemic brain injury. **Curr Mol Med**. v.4, n.2, p.179-91, 2004.

KIM, H. P. *et al*. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **Journal of Pharmacological Sciences**, Tokyo, v. 96, n. 3, p. 229-245, Nov. 2004.

KORKINA, L. G.; AFANAS'EV, I. B. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. **Adv Pharmacol**. v.38, p.151-63, 1997.

KOSTYUK, V. A.; POTAPOVICH, A. I.; KOSTYUK, T. V.; CHERIAN, M. G. Metal complexes of dietary flavonoids: evaluation of radical scavenger properties and protective activity against oxidative stress in vivo. **Cell Mol Biol**. v.15; n.53(1), p.62-9, Apr., 2007.

KURUTAS, E. B.; CETINKAYA, A.; BULBULOGLU, E.; KANTARCEKEN, B. Effects of antioxadant therapy on leukocyte myeloperoxidase and CU/ZUN-superoxide

dismutase and plasma malondialdehyde levels in experimental colitis. **Mediators of Inflammation**. v 2005, n 6, p 390-394, 2005.

LEHNINGER. **Princípios de Bioquímica**. 3<sup>a</sup> edição, 2002, Ed. SARVIER. São Paulo.

LEE, W.L.; HARRISON, R.E.; GRINSTEIN, S. Phagocytosis by neutrophils. **Microbes and Infection**. v.5, p. 1299-1306, 2003.

LI, T. R.; YANG, Z. Y.; WANG, B. D. Synthesis, characterization and antioxidant activity of naringenin schiff base and its Cu(II), Ni(II), Zn(II) complexes. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 55, n. 1, p. 26-28, Jan. 2007.

LIEBERMAN, P. Histamine, antihistamines, and the central nervous system. **Allergy Asthma Proc**. v.30, n.5, p. 482-6, 2009.

MACHADO, H. **Atividades dos flavonóide rutina e naringina sobre o tumor ascítico de Ehrlich *in vivo***. Dissertação (*Magister scientiae*) – Programa de pós graduação em bioquímica agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

MANTHEY, J.A. Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. **Microcirculation**. v. 7, p. S29-S34, 2000.

MIDDLETON, E. Jr. et al Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. **Biochemical Pharmacology**. v. 43, n.6, p.1167-1179, 1992.

MILLER, E.G. et al. Inhibition of oral carcinogenesis by citrus flavonoids. **Nutr Cancer**. v.60, n. 1, p.69-74, 2008.

MOMIC, T.; SAVIC, J; VASIC, V. Oxidation of quercetin by myeloperoxidase, **Research Letters in Physical Chemistry**. v 2009, p 1-4, march 2009.

MORAIS, F. V.; MOLINA, H. M.; BORGES, D. K.; KOUYOUMDJIAN, M. Enzima inativadora de bradicinina liberada de fígado preservado *ex-vivo*. **Rev. Ass. Med Brasil**. v 45, n 1, p 19-23, 1999.

MURDOCH, C.; FINN, A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. **Blood**. v 95, n 10, p 3032 – 3043, 2000.

NAUSEEF, W. M.; METCALF, J. A.; ROOT, R. K. Role of myeloperoxidase in the respiratory burst of human neutrophils. **Blood**. v 61, n 3, p 483-492, march., 1983.

NISS, A. M. et al. Free radicals and oxidative stress in exercise--immunological aspects. **Exerc Immunol Rev**. 5:22-56, 1999.

NIJVELDT, R. J. et al. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 74, n. 4, p. 418-425, Oct., 2001.

NOROOZI, M.; ANGERSON, W. J.; LEAN, M. E. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 67, n. 6, p. 1210-1218, June 1998.

OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 689-702, mar. 2009.

PATHAK, D.; PATHAK, K.; SINGLA, A. K. Flavonoids as medicinal agents – Recent advances. **Fitoterapia**. v.57, n.5, p.371-89, 1991.

PEREIRA, J.A.A & OLIVEIRA, C.A. Efeitos do *Eucalyptus camaldulensis* sobre a colonização micorrízica e a modulação em *Dimorphandra mollis* e *Stryphnodendron adstringens*, Brasilândia, Minas Gerais. **Cerne**. v.11, n.4, p. 409-415, out./dez., 2005.

PEREIRA, R.; MADEIROS, Y.S.; FRODE, J.C. Antiinflammatory effects of Tacrolimus in a mouse model of pleurisy. **Transplant Immunology**. v. 16, p. 105-111, 2006.

PEREIRA, R. M. et al. Synthesis and characterization of a metal complex containing naringin and Cu, and its antioxidant, antimicrobial, antiinflammatory and tumor cell cytotoxicity. **Molecules**. v.12, n.7, p.1352-66, Jul., 2007.

RADER, D. J.; DAUGHERTY, A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. **Nature**. v.21; n.451(7181), p. 904-13, 2008.

ROTELLI, A. E.; GUARDIA, T.; JUÁREZ, A. O.; La ROCHA, N. E.; PELZER, L. E. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. **Pharmacological Research**, v 48, p 601 – 606, 2003.

SANTOS, K.C. **Análise proteômica comparativa entre neutrófilos não ativados e neutrófilos ativados com PMA, um análogo do diacilglicerol**. Dissertação. Programa de pós graduação em patologia molecular. Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

SARTORI, L. R. et al. Atividade antiinflamatória do granulado de *Calendula officinalis* L. e *Matricaria recutita* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 13, supl.1, p. 17-19, 2003.

SELLOUM, L.; BOURICHE, H.; TIGRINE, C.; BOUDOUKHA, C. Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. **Exp Toxic Pathol**. v 54, p 313-318, 2003.

SILVA, R. R. et al. Efeito de Flavonóides no Metabolismo do Ácido Aracônico. **Revista da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e do Hospital das Clínicas da FMRP Universidade de São Paulo**, Ribeirão Preto, v. 35, n. 2, p. 127-133, abr./jun. 2002.

SIKORA, J. P.; CHLEBNA-SOKOL, P.; ANDRZEJEWSKA, E.; CHRUL, S.; POLAKOWSKAE, E.; WYSOCKA, A.; SIKORA, A. Clinical evaluation of proinflammatory cytokine inhibitors (s TNF r I, s TNF r II, IL-1ra), anti-inflammatory, cytokines (IL-10, IL-13) and activation of neutrophils after burn-induced inflammation. **Clinical Immunology**. v 68, p 145 – 152, april 2008.

SHAIK, Y. B. et al. Role of quercetin (a natural herbal compound) in allergy and inflammation. **J Biol Regul Homeost Agents**. v.20, n. 3-4, p.47-52, 2006.

TINTINGER, G.; STEEL, H.C.; ANDERSON R. Taming the neutrophil: calcium clearance and influx mechanisms as novel targets for pharmacological control. **Clin. Exp. Immunol.** v. 141, n. 2, p.191-200, 2005.

TOWNSEND, M. J.; MCKENZIE, A. N. Unravelling the net? Cytokines and diseases. **J Cell Sci**. v 113, p 3549 – 3550, 2000.

VALKO, M.; et al. Review: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **IJBCB**. v. 39, p. 44-84, 2007.

VAN ACKER, S. A. et al. Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. **Biochem Pharmacol**. v.56, n.8, p.935-43, Oct 15, 1998.

VITKOVIC, L.; BOCKAERT, J.; JACCQUE, C. “Inflammatory” cytokines: neuromodulators in normal brain? **J Neurochem**. v 74, n 2, p 457 – 471, 2000.

WEI, H.; SONG, J.; FANG, L.; LI, G.; CHATTERJEE S. Identification of a novel transcript of human PECAM-1 and its role in the transendothelial migration of monocytes and  $CA^{+2}$  mobilization. **Biochem. Biophys. Res. Commun**. v 320, n 4, p 1228 – 1235, aug 2004.

XING, Z. Current understanding of macrophage type 1 cytokine responses during intracellular infections. **Histol Histopathol**. v 15, n 1, p 199-205, 2000.

YANG, L.; FROIO, R. M.; SCIUTO, T. E.; DUORAK, A. M.; ALON, R.; LUSCINSKAS, F. W. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. **Blood**, v 106, n 2, p 584-592, Jul 2005.

YU, J.; WANG, L.; WALZEM, R.L.; MILLER, E.G.; PIKE, L.M.; PATIL, B.S. Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. **J Agric Food Chem.** v.23; n.53(6), p. 2009-14, 2005.

YUGAI, M. T.; FORMAZYUK, V. E.; SERGIENKO, V. I.; RYABTSEVA, A. A.; ROMASHOVA, M. P. Role neutrophil produced myeloperoxidase in the pathogenesis of cataract. **Buletim of Experimental Biology and Medicine.** v 114, n 4, p 1432-1435, october 1992.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain.** n 6, p 109–110, 1983.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A.. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento.** Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS / UFSC, 5ª ed. Revista e ampliada, primeira reimpressão, p. 577-614. 2004.

**ANEXO 01**



**UNIVERSIDADE BANDEIRANTE DE SÃO PAULO  
CONSELHO DA PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COMISSÃO DE ÉTICA**

(Resolução CONSEPE-UNIBAN nº 17/06 de 11/02/2006)

**PARECER**

O projeto de Pesquisa “**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIINFLAMATÓRIA DO FLAVONÓIDE RUTINA E DERIVADO CONTENDO METAL DE TRANSIÇÃO**” protocolado sob o nº **301\_08**, de responsabilidade do docente **Cristina Eunice Okuyama**, após avaliação pela Comissão de Ética, constatou que o mesmo está de acordo com os princípios éticos de pesquisa e em conformidade com o Regulamento da Comissão, tendo sido aprovado na reunião ordinária de 06/10/2008.

São Paulo, 8 de outubro de 2008.

**Prof. Dr. Camillo Anauate Netto**  
**Coordenador da Pesquisa Institucional**  
**UNIBAN BRASIL**