

## EFEITO DE FLAVONÓIDES NO STRESSE OXIDANTE E FOTO-OXIDANTE NO ERITRÓCITO HUMANO

*JN Silva\*<sup>§</sup>, T Beirão\*, P Filipe\*<sup>§</sup>, A Fernandes<sup>§</sup>*

\* Centro de Metabolismo e Endocrinologia da Faculdade de Medicina de Lisboa, Lisboa, Portugal,

§ Disciplina de Mecanismos da Doença da Faculdade de Medicina de Lisboa, Lisboa, Portugal.

### RESUMO

Os flavonóides são substâncias com propriedades antioxidantes ubiqüitariamente distribuídos nas plantas. O seu consumo tem sido associado ao efeito protector cardiovascular e anti-onco-génico de certas dietas. O eritrócito constitui modelo celular adequado para o estudo dos efeitos de espécies reactivas de oxigénio (EROs), em virtude da sua simplicidade estrutural, acessibilidade e da vulnerabilidade dos seus constituintes à oxidação. Usámos suspensões de eritrócitos humanos para estudar o efeito de flavonóides na peroxidação lipídica induzida pelo cobre e pelo hidrocloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH) na ausência de metais de transição. O stress foto-oxidante em suspensões eritrocitárias foi induzido pela radiação ultravioleta A (UV-A) na presença de protoporfirina IX (PpIX) e avaliado pela determinação da peroxidação

lipídica e da foto-hemólise. A peroxidação lipídica foi avaliada pela formação de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) e pela indução de hemólise. Foi, ainda, avaliada a formação de meta-hemoglobina induzida pelo cobre. No nosso sistema, as TBARS, a hemólise e a meta-hemoglobina aumentam durante o tratamento com os diferentes estímulos oxidantes. Os flavonóides testados inibem a peroxidação lipídica, a hemólise e a formação de meta-hemoglobina. Certas características estruturais, como a presença do grupo *o*-catecol e a dupla ligação conjugada com o carbonilo em C4, parecem ser importantes para a actividade antioxidante dos flavonóides. Os nossos resultados mostram que alguns flavonóides, nomeadamente a quercetina e a rutina, protegem os eritrócitos da lesão oxidantes, o que sugere a sua eventual aplicação como adjuvantes na terapêutica de diversas situações

patológicas em que estão implicados os EROs bem como na respectiva prevenção.

**Palavras-chave:** flavonóides, quercetina, stresse oxidante, stresse foto-oxidante, hemólise, foto-hemólise, peroxidação lipídica, meta-hemoglobina, cobre, AAPH, protoporfirina IX.

## INTRODUÇÃO

As espécies reactivas de oxigénio (EROs) participam na patogénese de múltiplas situações patológicas das quais se salientam doenças cardiovasculares como a aterosclerose, doenças neurodegenerativas (doença de Alzheimer e doença de Parkinson), doenças auto-imunes (lúpus eritematoso sistémico, artrite reumatóide), vários tipos de cancro bem como no envelhecimento. A produção endógena excessiva de EROs, a exposição a fontes exógenas de EROs ou a diminuição das defesas antioxidantes podem levar a sobrecarga/lesão oxidante<sup>1</sup>. A suplementação com antioxidantes parece prevenir o aparecimento de certas doenças cardiovasculares e de certos tipos de cancro, sobretudo em populações deficitárias<sup>2</sup>.

Tem sido desenvolvido trabalho de vulto na identificação quer de agentes naturais quer de síntese com propriedades antioxidantes e que permitam prevenir ou tratar as referidas patologias. Os flavonóides estão amplamente distribuídos nas plantas superiores e também descritos em alguns fungos e líquenes. Ao longo dos anos, foi descoberto que desempenhavam uma função importante na dieta humana e considerados princípios activos de

muitas plantas medicinais (3). Estão presentes em frutos, vegetais, especiarias, cacau, chá verde e vinho tinto sendo, por isso, consumidos regularmente na dieta humana<sup>4-7</sup>. Foi estimado um consumo aproximado de flavonóides de 26 mg/dia, numa população holandesa, sendo o flavonóide mais consumido a quercetina<sup>8</sup>. À dieta mediterrânea baseada no consumo de azeite, frutas e vegetais, rica em flavonóides, têm sido atribuídas propriedades protectoras antioxidantes contra algumas doenças cardiovasculares bem como certos tipos de cancro. Diversos estudos sobre a biodisponibilidade de flavonóides em humanos sugerem a sua absorção intestinal, sendo detectados no plasma e urina na forma natural ou de metabólitos conjugados (glicosilados, metilados ou sulfatados), após administração de compostos puros ou alimentos ricos em flavonóides<sup>7,9</sup>.

Os flavonóides exibem uma grande variedade de efeitos biológicos. Recentemente, têm sido alvo de atenção devido às suas propriedades antioxidantes como captadores de EROs e inibidores da peroxidação lipídica por captação dos radicais  $O_2 \cdot$ ,  $HO \cdot$ ,  $LOO \cdot$  e desactivação de  $^1O_2$ <sup>10,11</sup>. Também podem actuar em sinergia com outros antioxidantes como o ascorbato e o ácido úrico<sup>12</sup>. Os flavonóides inibem eficazmente a oxidação das LDL *in vitro* e, provavelmente, *in vivo* com efeitos na prevenção do desenvolvimento da aterosclerose e da fragilidade dos vasos capilares<sup>11,13</sup>. Podem proteger o ADN dos danos oxidativos e evitar o desenvolvimento de certos tipos de cancro relacionados com a idade<sup>14</sup>. Para além dos efeitos antioxidantes, vários

estudos *in vitro* demonstraram que os flavonóides podem inibir, mas também induzir, uma grande variedade de sistemas enzimáticos nos mamíferos<sup>5,8</sup>, possuem efeitos anti-trombóticos, anti-inflamatórios e moduladores da resposta imunitária<sup>15,16</sup>, efeitos anti-cancerígenos e anti-mutagénicos<sup>8,17,18</sup> e acções anti-microbianas e anti-víricas<sup>15,19</sup>.

O eritrócito constitui sistema celular adequado para o estudo dos efeitos de EROs, em virtude da sua simplicidade estrutural (não possui núcleo, nem mitocôndrios), acessibilidade e vulnerabilidade dos seus constituintes à oxidação. As principais estruturas eritrocitárias afectadas pelas EROS são os constituintes membranares e a hemoglobina. A membrana celular é rica em ácidos gordos poli-insaturados sendo, por isso, alvo da peroxidação lipídica. As proteínas estruturais da membrana, espectrina e anquirina, são também substratos de reacções radiculares, bem como alguns sistemas transportadores de iões (transportador aniónico da banda 3 e várias ATPases). Também enzimas membranares podem ser inactivadas, particularmente se possuírem grupos sulfidrílicos.

O objectivo deste trabalho foi o estudo, em suspensões de eritrócitos humanos, do efeito de flavonóides no stresse oxidativo induzido pelo cobre, pelo AAPH bem como no stresse foto-oxidativo induzido pela radiação ultravioleta A (UV-A) na presença de protoporfirina IX (PpIX).

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Reagentes

Foram utilizados cloreto de sódio, hidrogenofosfato de sódio, di-hidro-

genofosfato de sódio, ácido fosfotúngstico, etanol p.a., ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), 1-butanol e azeto de sódio da Merck (Darmstadt, Alemanha); quercetina, rutina, luteolina, catequina, genisteína, daidzeína, quemperol, triton X-100, hidroxitolueno butilado (BHT), protoporfirina IX (PpIX) disódica e dimetilsulfóxido (DMSO) da Sigma (St. Louis, MO, USA); cloreto de cobre (II) da J. T. Baker Chemical Co. (Phillisburg, NJ, USA); hidrocloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH) da Polysciences (Warrington, PA, USA).

## MÉTODOS

### 1 Preparação e tratamento das suspensões de eritrócitárias

O sangue, obtido de doadores voluntários saudáveis, foi recolhido em tubos heparinizados e sujeito a uma centrifugação a 2000 g durante 10 minutos a 4° C. Após remoção do sobrenadante, ressuspenderam-se os eritrócitos em tampão de fosfatos de sódio 25 mM (pH=7,4) em NaCl 0,9 % (p/v) e procedeu-se à limpeza das células submetendo-as a duas centrifugações sucessivas com o protocolo anterior, retirando sucessivamente os sobrenadantes. Suspenderam-se os eritrócitos em tampão de fosfatos de sódio 25 mM (pH=7,4) em NaCl 0,9% (p/v), de modo a obter uma percentagem final dos eritrócitos de 2 % (indução de stress foto-oxidante pela radiação UVA na presença de PpIX) ou 5 % (v/v) (indução de stresse oxidante pelo cobre e AAPH).

As suspensões eritrocitárias a 5 % foram pré-incubadas com azeto de sódio 2 mM durante 60 minutos a 37°

C, para inibir a actividade da catalase. Posteriormente, foram incubadas durante 15 minutos com os flavonóides quercetina, rutina, luteolina, catequina, genisteína, daidzeína e quempferol na concentração final indicada nos resultados. Os flavonóides foram dissolvidos em etanol e a percentagem deste solvente presente nas misturas reaccionais foi de 0,5 % (v/v). Noutro conjunto de experiências, com o objectivo de estudar a penetração dos flavonóides no eritrócito e os seus eventuais efeitos anti-oxidantes, procedeu-se como anteriormente descrito até à incubação dos flavonóides quercetina e rutina durante 15 minutos. As misturas reaccionais foram, em seguida, centrifugadas a 2000 g durante 10 minutos à temperatura de 4° C e retirado o sobrenadante, com o objectivo de remover todo o flavonóide livre, isto é, não incorporado nos eritrócitos. Ressuspendeu-se o sedimento celular constituído pelos eritrócitos com tampão de fosfatos de sódio 10 mM (pH=7,4) em NaCl 0,9 % (p/v) e procedeu-se a nova centrifugação nas mesmas condições.

De seguida, as suspensões eritrocitárias foram expostas aos diferentes estímulos oxidantes, como descrito.

### 1.1 Indução de stress oxidante

#### 1.1.1 Sistema gerador de HO<sup>•</sup> com cloreto de cobre

O cloreto de cobre, preparado no próprio dia, foi adicionado na concentração final de 200 µM e as misturas foram incubadas a 37° C com agitação constante. Foram retiradas amostras nos tempos 0, 90, 180 e 270 minutos e analisadas por três técnicas: deter-

minação de TBARS, da hemólise e da meta-hemoglobina.

#### 1.1.2 Sistema gerador de peroxilo com AAPH

O AAPH, preparado imediatamente antes, foi adicionado na concentração final de 35 mM. As misturas reaccionais, sujeitas a uma atmosfera de oxigénio com pressão de 760 mmHg, foram incubadas a 37° C durante 180 minutos com agitação constante do tipo vai-vém em tubos de Thunberg. Os danos oxidativos foram avaliados por duas técnicas: detecção de TBARS e determinação da hemólise.

### 1.2 Indução de stress foto-oxidante

#### 1.2.1 Sistema gerador de O<sub>2</sub> com UV-A na presença de Pp IX

As soluções de Pp IX, preparadas no próprio dia, foram adicionadas às suspensões eritrocitárias, numa concentração final de 30 µM e as misturas incubadas a 37° C no escuro, durante 30 minutos com agitação constante. A protoporfirina IX foi diluída em DMSO e a concentração final deste solvente presente nos ensaios foi de 0,5 % (v/v). As suspensões globulares foram protegidas da luz ambiente ao longo de toda a experiência. Após a incubação, efectuou-se uma centrifugação a 2000 g durante 10 minutos e retirou-se o sobrenadante com o objectivo de remover a protoporfirina IX não incorporada no eritrócito. Ressuspendeu-se o sedimento eritrocitário com o referido tampão. Às várias misturas reaccionais, foram adicionados os flavonóides quercetina e rutina nas concentrações descritas nos resultados e a incubação decorreu a 37° C, du-

rante 15 minutos com agitação constante. Em seguida colocou-se 2 ml de cada mistura reaccional em várias placas de Petri, que foram sujeitas a diferentes doses de radiação UV-A, conforme indicado nos resultados. O sistema de irradiação utilizado foi um painel de irradiação UV-A Vilber-Lourmat TPF-35L com lâmpadas cujo espectro de irradiação é centrado a 365 nm. As placas de Petri foram colocadas sobre uma placa de vidro comercial que absorve a radiação UV-B residual, mas deixa passar grande parte da radiação UV-A. Utilizou-se um radiómetro Waldman UV-Meter para quantificar a radiação UV-A que atravessa as placas de Petri, atendendo a que estas também absorvem parte da radiação UV-A. A fluência da radiação UV-A nas condições experimentais foi de 2 mW/cm<sup>2</sup>. Foi verificado que durante a irradiação a temperatura das misturas reacionais não ultrapassou os 30° C. Após irradiação, avaliou-se a lipoperoxidação pela determinação de TBARS e calculou-se a percentagem de hemólise.

## 2 Avaliação da lipoperoxidação pela determinação de TBARS

A 1 ml da amostra da suspensão eritrocitária adicionou-se 10 µl de solução de Triton X 100 a 10 % (v/v) de modo a desintegrar a membrana dos eritrócitos. Agitou-se vigorosamente em vórtex durante 15 segundos. De seguida procedeu-se à desproteïnização pela adição gota-a-gota, mantendo a mistura em agitação permanente em vórtex, de 500 µl de ácido fosfotúngstico a 10 % (p/v). Deixou-se repousar 5 minutos e procedeu-se a centrifugação a 2000 g durante 10

minutos. Filtraram-se os sobrenadantes com papel de filtro para análise qualitativa. Como foram utilizadas diferentes diluições de eritrócitos nas experiências com os vários sistemas oxidantes, houve necessidade de adaptar os volumes utilizados para a reacção com o TBA, de modo a ser detectada a fluorescência emitida pelas TBARS. Nas experiências onde foi utilizado o cobre e AAPH para induzir a lipoperoxidação, a 300 µl do filtrado, adicionaram-se 250 µl de uma solução de ácido 2-tiobarbitúrico a 0,8 % (p/v) e 5,5 µl de BHT 5x10<sup>5</sup> M (este último composto foi diluído em solução etanólica a 90 %). Nas experiências onde a lipoperoxidação foi induzida pela radiação UV-A, a 500 µl do filtrado, adicionaram-se 350 µl de uma solução de ácido 2-tiobarbitúrico 0,8 % (p/v) e 9 µl de BHT 5x10<sup>5</sup> M. Os tubos foram rolhados, agitados em vórtex e sujeitos a um aquecimento em água fervente durante 30 minutos. Procedeu-se à extracção do fluoróforo pela adição de 2 ml de 1-butanol. Os tubos são agitados vigorosamente durante 15 segundos. Centrifugou-se a 2000 g durante 5 minutos e efectuou-se a leitura da fluorescência da fase superior das amostras, com comprimento de onda de excitação a 515 nm e emissão a 545 nm. Os resultados são expressos em unidades de fluorescência (UF)<sup>20</sup>.

## 3 Determinação da percentagem de hemólise

Retirou-se 0,5 ml de amostra que se adicionou a 4,5 ml do tampão utilizado para obtenção das suspensões eritrocitárias. Esta mistura foi centrifugada a 2000 g durante 10

minutos à temperatura de 4° C. O sobrenadante obtido foi utilizado para a determinação da percentagem de hemólise calculada espectrofotometricamente com base na absorvência do heme libertado a 409 nm. A absorvência a 409 nm é equivalente para a oxí-hemoglobina e produtos da oxidação da hemoglobina, usando-se por isso este comprimento de onda para a determinação da hemólise<sup>21</sup>. O valor correspondente a 100% de hemólise foi obtido adicionando 0,1 ml de cada amostra reaccional a 9,9 ml de água desionizada. A fórmula utilizada para o cálculo da hemólise, expressa percentualmente, é a seguinte<sup>20</sup>:

$$\% \text{ hemólise} = \text{Abs}_{409 \text{ nm}} \text{ sobrenadante} / \text{Abs}_{409 \text{ nm}} \times 10$$

#### 4 Determinação da percentagem de meta-hemoglobina

Retirou-se uma amostra de 0,5 ml de cada incubado à qual se adicionou 4,5 ml de tampão utilizado para obtenção das suspensões eritrócitárias. Esta mistura foi centrifugada a 2000 g durante 10 minutos à temperatura de 4° C. Retirou-se o sobrenadante. Em seguida hemolisou-se o sedimento pela adição de 0,6 ml de água desionizada. Centrifugou-se a 2000 g durante 10 minutos a 4° C. Numa *cuvette*, foi colocada água desionizada e adicionado o sobrenadante gota-a-gota, de forma a obter um valor de absorvência de 0,180 a 525 nm (ponto isobéstico da oxí e da meta-hemoglobina). A este comprimento de onda, obtém-se o valor da hemoglobina total. Registam-se os valores obtidos a 525 nm e efectua-se em seguida, a leitura da absorvência a 630 nm, comprimento de onda em que apenas a meta-hemoglobina absorve

significativamente.

O cálculo da percentagem de meta-hemoglobina presente, é feito a partir da relação entre as concentrações de meta-hemoglobina e de hemoglobina total, segundo a seguinte fórmula (20):

$$\% \text{ meta-hemoglobina} = \text{Abs}_{630 \text{ nm}} / \text{Abs}_{525 \text{ nm}} \times 10$$

#### 5 Métodos estatísticos utilizados

Assumiu-se que os resultados seguem uma distribuição normal pelo que se utilizaram métodos paramétricos. Nas comparações entre os vários grupos dos resultados, foi efectuada uma análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, seguida do teste *q* de Student-Newman-Keuls (SNK) que determina a significância da diferença de médias entre os vários grupos de resultados (22). Em todos os testes estatísticos realizados adoptou-se o valor de significância mínima de 0,05.

### RESULTADOS

#### Efeito de flavonóides na hemólise, formação de meta-hemoglobina e TBARS induzidas por cobre em suspensões eritrócitárias

##### *Hemólise*

O Cu(II) 200 µM induziu eficazmente a hemólise, que começa a aumentar significativamente a partir dos 90 minutos, continuando até ao final da experiência (ensaio Cu(II) + etanol). Nos ensaios com a quercetina, as duas concentrações mais elevadas (10 e 25 µM) inibiram a hemólise, um efeito já observável aos 180 minutos

mas estatisticamente significativo apenas aos 270 minutos. No final da experiência, a quercetina 10 e 25  $\mu\text{M}$  inibiu a hemólise em 57 e 90 %, respectivamente. A rutina nas duas concentrações mais elevadas (25 e 50  $\mu\text{M}$ ) inibiu claramente a hemólise induzido pelo cobre ao longo da experiência. Paradoxalmente, a rutina na menor concentração ensaiada (10  $\mu\text{M}$ ), acelerou a hemólise aos 90 e 180 minutos. Este efeito não se verificou aos 270 minutos, não existindo, neste tempo, diferenças significativas em relação ao controlo com cobre. No final da experiência, a rutina 25 e 50  $\mu\text{M}$  inibiram a hemólise em 93 e 97 %, respectivamente.

#### *Formação de meta-hemoglobina*

Os resultados indicam que o Cu(II) 200  $\mu\text{M}$  induz a formação de meta-hemoglobina no eritrócito humano ao longo das experiências, com maior intensidade entre os 90 e 180 minutos (ensaio Cu(II) + etanol). Aos 90 minutos, observa-se que as três concentrações de quercetina e rutina ensaiadas aceleraram significativamente a formação de metahemoglobina. Este efeito dos flavonóides, vai perdendo significância com o decorrer do tempo de incubação. Aos 180 minutos, apenas se verifica nas duas concentrações mais elevadas dos flavonóides, não existindo no final da experiência, diferenças significativas entre os ensaios com a quercetina e rutina e o controlo com Cu(II) e etanol.

#### *Formação de TBARS*

O Cu(II) 200  $\mu\text{M}$  provocou eficazmente a formação de TBARS ao longo do tempo, em três fases distintas (en-

saio de Cu(II) + etanol). Um ligeiro aumento até ao 90 minutos, seguida de uma fase de grande intensidade (entre os 90 e 180 min) e uma fase final onde a intensidade da formação é menor. A inibição pela quercetina e rutina ocorre em todas as concentrações ensaiadas e, embora pareça ocorrer ao longo da experiência, só começa a apresentar valores significativos a partir dos 180 min. No final da experiência (270 min), a percentagem de inibição da formação de TBARS é de 90 % nos ensaios com quercetina 10 e 25  $\mu\text{M}$ , 58 % com a quercetina 5  $\mu\text{M}$ , 94 % com a rutina 50  $\mu\text{M}$ , 92 % com a rutina 25  $\mu\text{M}$  e 83 % com a rutina 10  $\mu\text{M}$ . Não foram encontradas diferenças significativas entre os ensaios com a mesma concentração de quercetina e rutina.

#### **Efeito de flavonóides incorporados no eritrócito na hemólise, formação de meta-hemoglobina e TBARS induzidas por cobre em suspensões eritrocitárias**

##### *Hemólise*

Os resultados indicam um comportamento distinto entre os flavonóides estudados, possivelmente incorporados no eritrócito. Nos ensaios com a quercetina observou-se uma inibição da hemólise, apenas significativa aos 270 minutos (fig. 1A). A percentagem de inibição da hemólise no final da experiência, foi aproximadamente semelhante nas três concentrações de quercetina ensaiadas, sendo de 54, 55 e 61% para a quercetina 5, 10 e 25  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Nos ensaios com a rutina, pelo contrário, observou-se uma aceleração da hemólise aos 90 minutos (figura 1B). Este efeito perdeu significância com o decorrer do tempo,

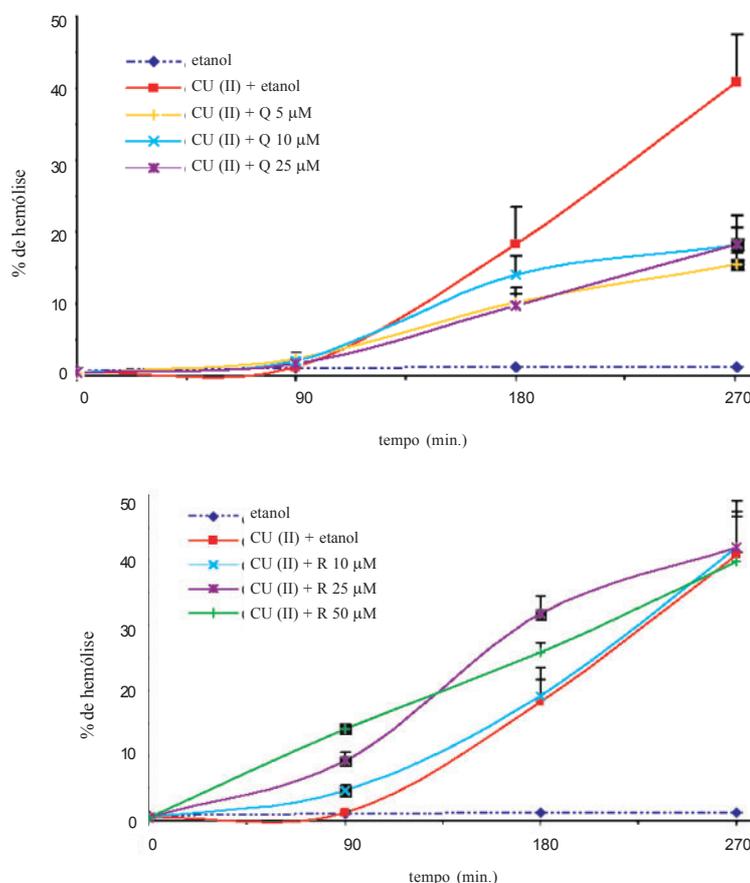
não se observando no final da experiência, qualquer efeito da rutina na hemólise induzida por cobre.

### Formação de meta-hemoglobina

Nos ensaios com a quercetina, não se obteve resultados significativos ao longo da experiência, excepto aos 180 min., onde se observa inibição da formação de metahemoglobina com a quercetina 5  $\mu\text{M}$ , possivelmente um falso positivo. Apesar de não significativo, no final da experiência as médias da percentagem de meta hemoglobina nos ensaios com quercetina, são mais baixas que o controlo com Cu(II) (fig. 2A). Pelo contrário, a rutina inibiu a formação de meta-hemoglobina ao longo do tempo nas três concentrações ensaiadas (fig. 2B). No final da experiência, a rutina 10  $\mu\text{M}$  inibiu a formação de metahemoglobina em 29 %, a rutina 25  $\mu\text{M}$  em 33 % e a rutina 50  $\mu\text{M}$  em 31 %.

### Formação de TBARS

A quercetina e rutina incorporadas no eritrócito inibiram significativamente a formação de TBARS a partir dos 180 min (figs. 3A e 3B, respectivamente). As percentagens de inibição de TBARS no final da experiência foram praticamente semelhantes com os dois flavonóides nas várias concentrações ensaiadas. A quercetina nas concentrações de 5, 10 e 25  $\mu\text{M}$  inibiu em 86, 86 e 87 %, respectivamente; a rutina 10, 25 e 50  $\mu\text{M}$  inibiu em 82, 84 e 86 %, respectivamente.



**Fig. 1** – Cinética do efeito da quercetina (A) e rutina (B) incorporadas nos eritrócitos na hemólise induzida por cobre 200  $\mu\text{M}$  em suspensões de eritrócitos a 5%. Os eritrócitos, pré incubados com azeto de sódio 2 mM 60 min. e durante 15 min. com o flavonóide, foram lavados duas vezes antes da adição de Cu(II) 200  $\mu\text{M}$ , para remover o flavonóide não incorporado no eritrócito. Foram colhidas amostras nos tempos de 0, 90, 180 e 270 min. Estão representados os ensaios de controlo com o solvente do flavonóide, sendo os restantes com a quercetina nas concentrações de 5, 10 e 25  $\mu\text{M}$  (A) e a rutina nas concentrações 10, 25 e 50  $\mu\text{M}$  (B). (■) indica os ensaios que variam significativamente do controlo com cobre+etanol – teste SNK. Os valores são média $\pm$ SEM de 4 experiências independentes.

### Efeito de flavonóides na hemólise e formação de TBARS induzidas por AAPH em suspensões eritrocitárias

#### Hemólise

Os resultados obtidos (figura 4) demonstram a ocorrência de inibição

Formação de TBARS

Alguns dos flavonóides ensaiados inibiram significativamente a formação de TBARS (quercetina, rutina e luteolina) enquanto outros parecem estimulá-la significativamente (genisteína e daidzeína) (figura 5). A dispersão dos resultados obtidos com os flavonóides, nas diferentes experiências, levaram a que não fossem diferenciáveis de qualquer controlo. Por este facto, nesta secção, os resultados dos TBARS não são apresentados em unidades arbitrárias de fluorescência, mas em unidades de fluorescência relativas ao controlo com etanol respeitante a cada experiência.

Efeito de flavonóides na hemólise e formação de TBARS induzidas por radiação UV-A na presença de Pp IX em suspensões eritrócitárias

Foto-hemólise

A irradiação por UV-A de suspensões de eritrócitos pré-incubadas com PpIX, induziu fortemente a hemólise, o mesmo não tendo ocorrido nas suspensões irradiadas na ausência de PpIX e nas suspensões não irradiadas na presença de PpIX. As curvas da hemólise obtidas indicam que a intensidade do processo hemolítico parece aumentar com o aumento de dose de radiação. Os flavonóides quercetina e rutina nas concentrações ensaiadas inibiram a hemólise, sendo esta inibição aproximadamente constante ao longo da irradiação, apenas ligeiramente superior no final da irradiação. Não foram encontradas diferenças significativas no potencial de inibição entre os dois flavonóides. Na

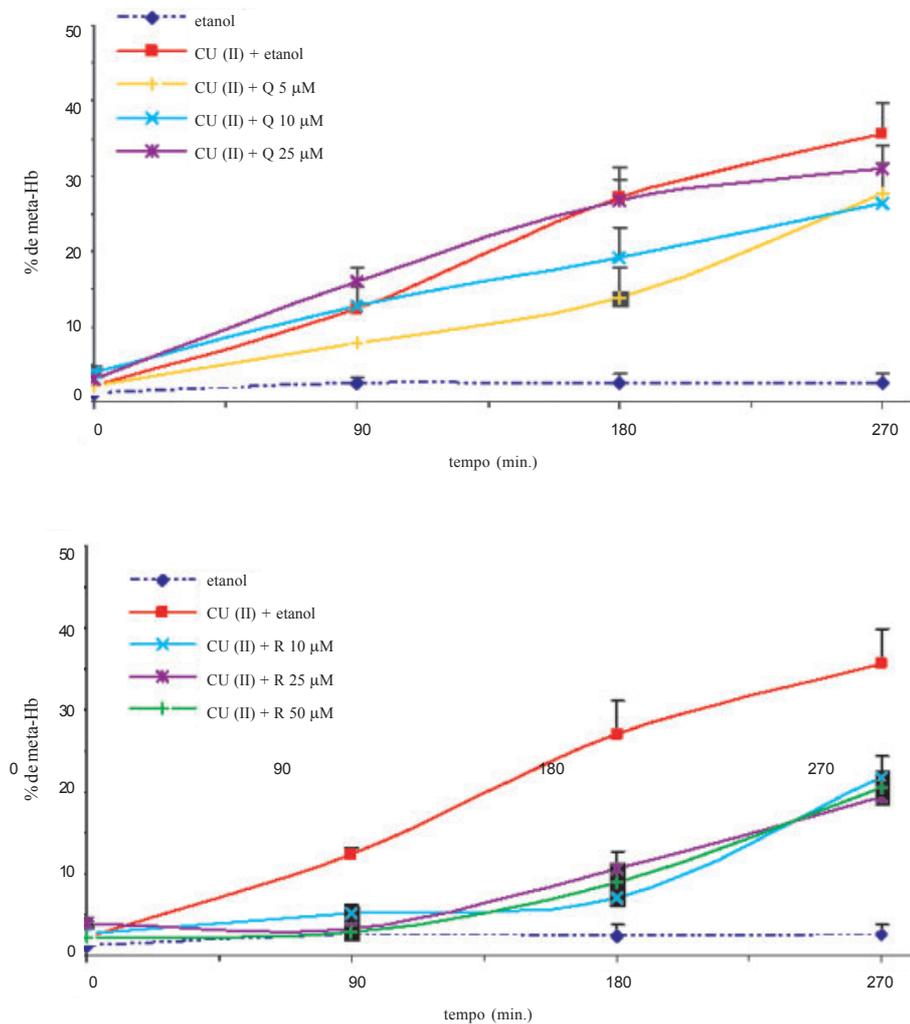
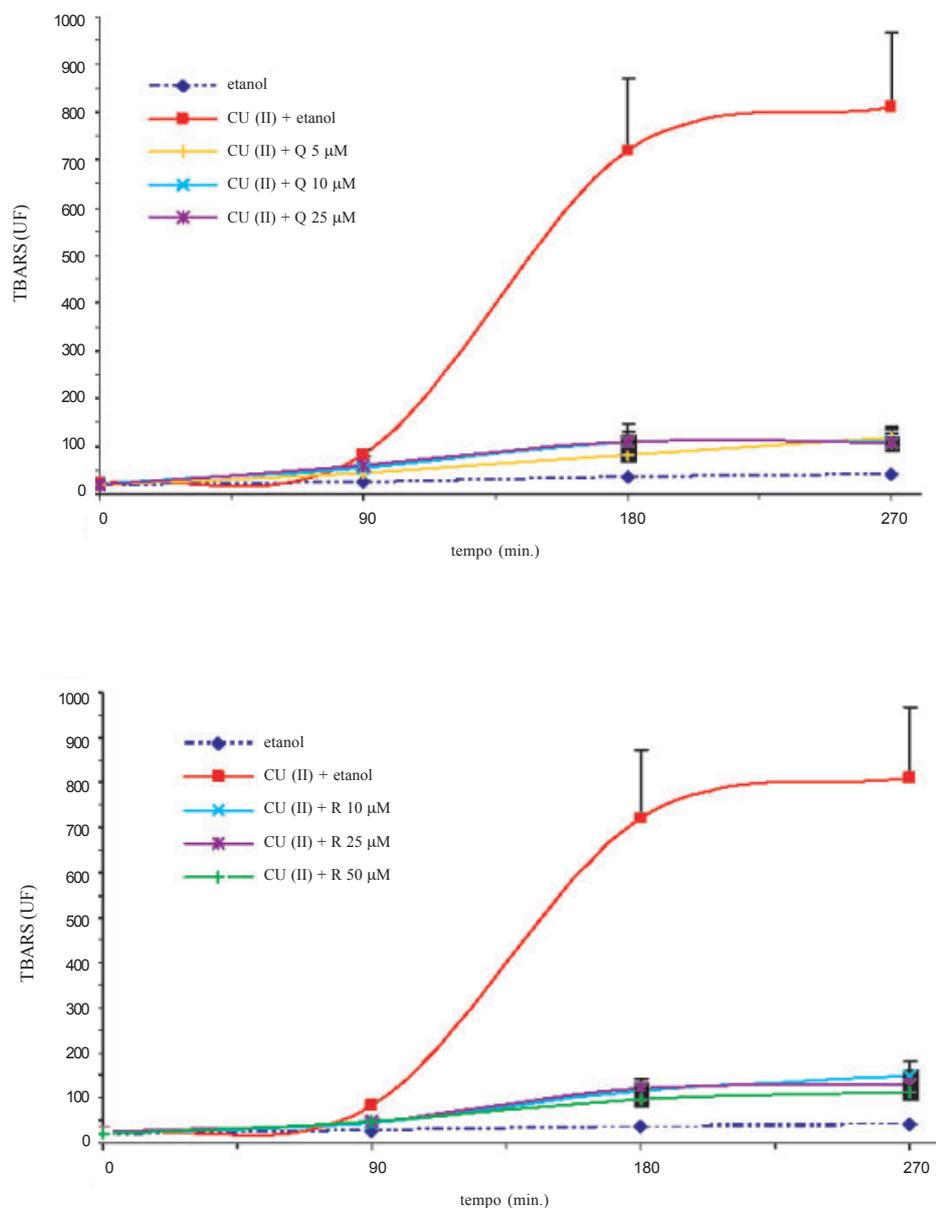
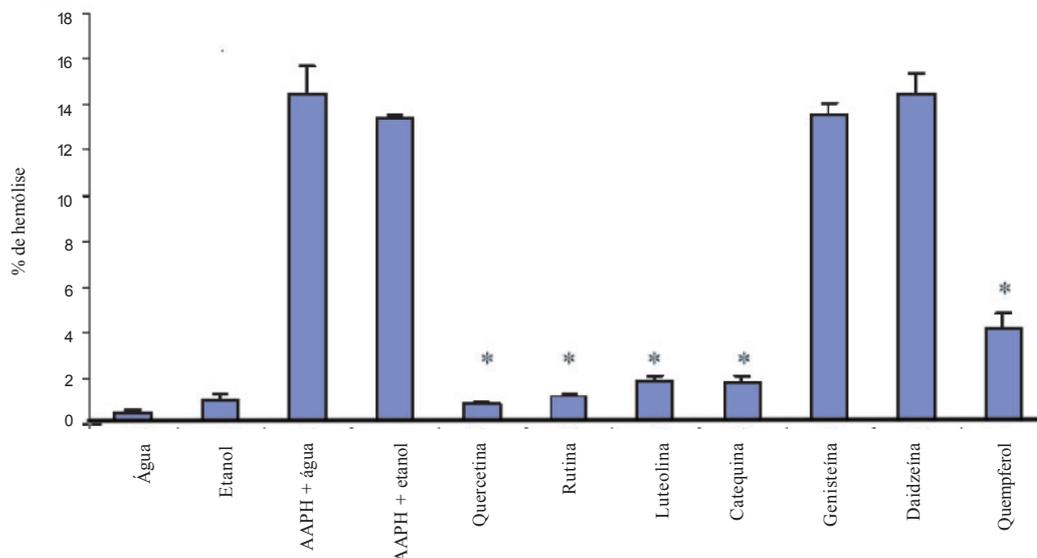


Fig. 2 – Cinética do efeito da quercetina (A) e da rutina (B) incorporada nos eritrócitos na formação de meta-hemoglobina induzida por cobre em suspensões de eritrócitos a 5%. Descrição experimental na Fig. 1. Estão representados os ensaios de controlo com o solvente do flavonóide, sendo os restantes com a quercetina nas concentrações de 5, 10 e 25 µM (A) e a rutina nas concentrações de 10, 25 e 50 µM (B). (■) indica os ensaios significativamente diferentes do controlo com cobre e etanol, utilizando o teste SNK. Os resultados são a média±SEM de 4 experiências independentes.

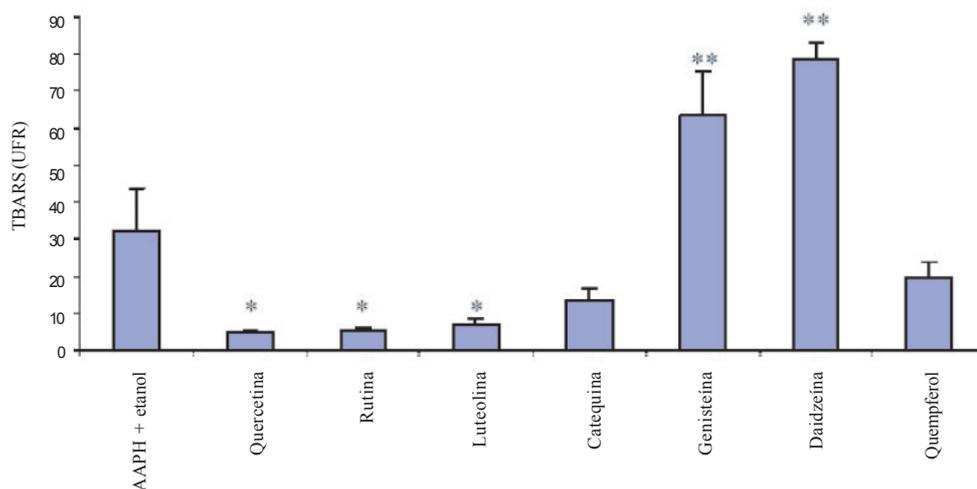
da hemólise por alguns dos flavonóides ensaiados, que podem ser ordenados hierarquicamente pela seguinte ordem decrescente de inibição: quercetina>rutina>catequina>luteolina>quempferol.



**Fig. 3** – Cinética do efeito da quercetina (A) e da rutina (B) incorporada nos eritrócitos na formação de TBARS induzida por Cu(II) 200 μM em eritrócitos a 5 %. Descrição experimental na fig. 1. Estão representados os ensaios de controlo com o solvente do flavonóide, sendo os restantes com a quercetina nas concentrações de 5, 10 e 25 μM (A) e a rutina nas concentrações de 10, 25 e 50 μM (B). (■) designa os valores dos ensaios com a quercetina que diferem significativamente do controlo com cobre e etanol (teste SNK). Os resultados apresentados são a média±SEM de 4 experiências independentes.



**Fig. 4** – Efeito dos flavonóides na hemólise induzida por AAPH 35 mM em suspensões de eritrócitos a 5 % (v/v). Os eritrócitos foram pré-incubados com azeto de sódio 2 mM durante 60 minutos e com os flavonóides durante 15 minutos antes da adição de AAPH 35 mM. Seguiu-se uma incubação durante 3 horas a 37° C em atmosfera de oxigénio a 760 mmHg. Os quatro primeiros ensaios são os controlos, sendo os restantes com AAPH e respectivo flavonóide na concentração de 50 µM. Os valores dos ensaios com os flavonóides que diferem significativamente do controlo com AAPH e etanol, são indicados por um asterisco (\*) – teste SNK. Os resultados apresentados são a média±SEM de cinco experiências independentes.



**Fig. 5** – Efeito dos flavonóides na formação de TBARS induzida por AAPH 35 mM em eritrócitos a 5 % (v/v). Condições experimentais na figura 4. Estão representados os ensaios do controlo com AAPH e com etanol, sendo os restantes com AAPH e respectivo flavonóide na concentração de 50 µM. Os valores dos ensaios com os flavonóides que inibiram significativamente são indicados por (\*) os que estimularam significativamente são indicados por (\*\*). Foi utilizado o teste SNK. Os resultados apresentados são a média±SEM de 5 experiências independentes.

dose mais elevada (1,8 J/cm<sup>2</sup>), a inibição da hemólise foi de 23, 31 e 33 % para a quercetina 5, 10 e 25 µM, respectivamente, e de 25, 28 e 27 % para a rutina 10, 25 e 50 µM, respectivamente.

#### *Formação de TBARS*

Nas suspensões eritrocitárias pré-incubadas com PpIX e expostas à radiação UV-A, detectou-se a formação de TBARS, o mesmo não ocorreu na ausência de PpIX e nas suspensões não irradiadas na presença de PpIX. A formação de TBARS é aparentemente linear e proporcional às doses de radiação UV-A utilizadas. Os resultados apontam para a inibição da formação de TBARS por ambos os flavonóides ao longo da irradiação e em todas as concentrações ensaiadas. Em concentrações idênticas, o potencial inibitório da quercetina na formação de TBARS foi significativamente superior ao da rutina (teste SNK). No final da experiência (dose de irradiação=1,8 J/cm<sup>2</sup>), a percentagem de inibição da formação de TBARS foi de 68, 74 e 80 % para a quercetina 5, 10 e 25 mM, respectivamente e de 23, 32 e 33 % para a rutina 10, 25 e 50 mM, respectivamente.

#### **Efeito de flavonóides incorporados no eritrócito na hemólise e na formação de TBARS induzidas pela radiação UV-A na presença de PpIX**

##### *Hemólise*

A quercetina e rutina, nas várias concentrações ensaiadas, inibiram eficazmente a hemólise ao longo da irradiação (fig. 6A e 6B, respecti-

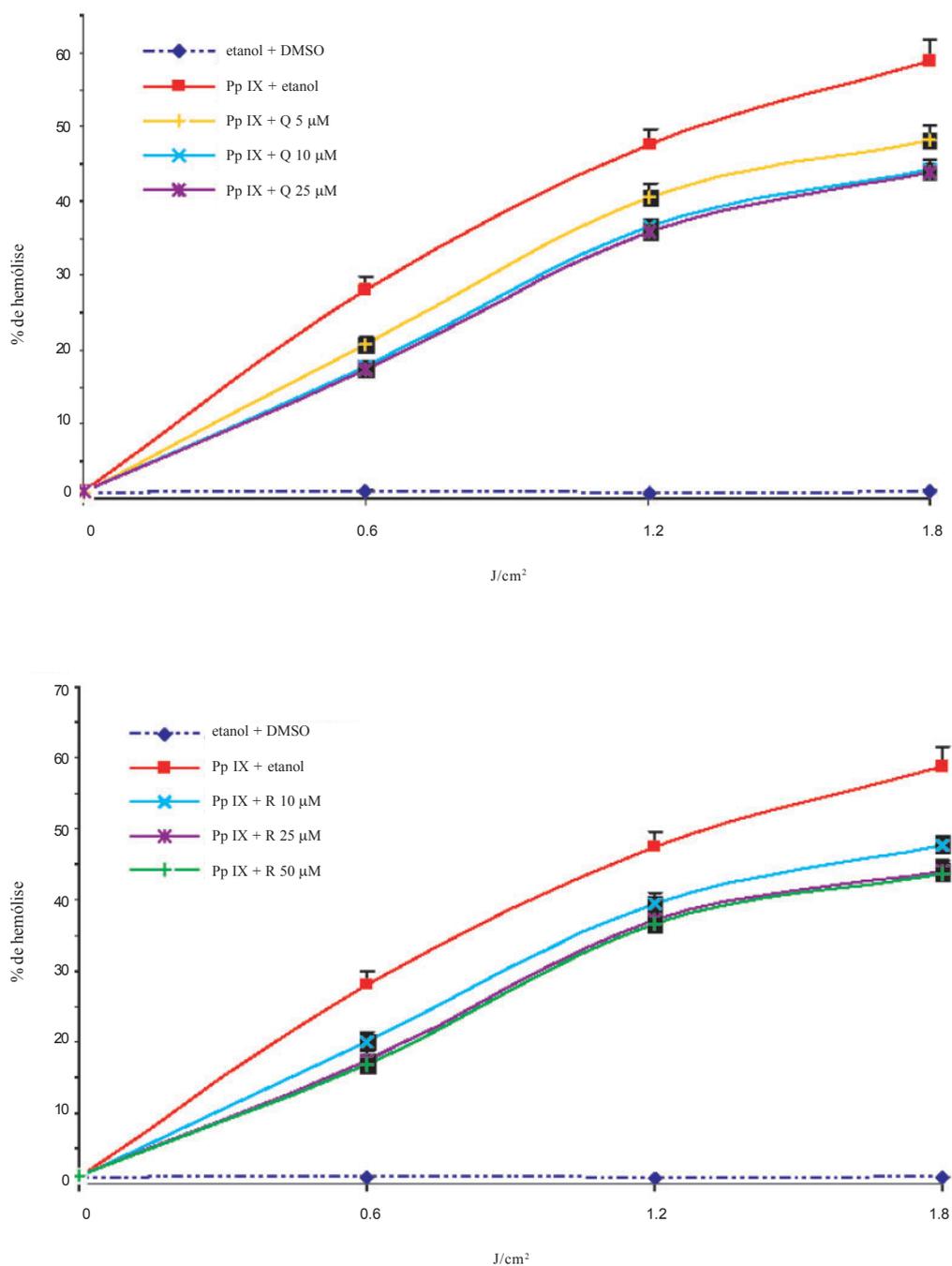
vamente), não existindo diferenças significativas entre os ensaios com concentração idêntica de quercetina e rutina (teste SNK). No final da irradiação (1,8 J/cm<sup>2</sup>) a quercetina 5, 10, 25 µM inibiu a hemólise respectivamente em 18, 25 e 25 % e a rutina 10, 25 e 50 µM em 19, 26 e 25 %, respectivamente.

#### *Formação de TBARS*

As três concentrações de quercetina ensaiadas, inibiram a formação de TBARS ao longo da irradiação na presença de PpIX (fig. 7A), apresentando no final da incubação inibições de 55, 68 e 77 % com a quercetina 5, 10 e 25 µM, respectivamente. As duas concentrações mais elevadas de rutina inibiram eficazmente a formação de TBARS ao longo da irradiação, enquanto a concentração menor só inibiu significativamente no final da irradiação (figura 7B). No final da irradiação, a rutina 10, 25 e 50 µM inibiu a formação de TBARS em 17, 23 e 25 %, respectivamente. Foram também detectadas diferenças significativas, em todas as doses de irradiação, entre os ensaios com a rutina 10 µM e as duas concentrações superiores (25 e 50 µM), mas não entre a rutina 25 e 50 µM. Existem, portanto, diferenças na inibição da formação de TBARS entre a concentração menor de rutina (10 µM) e a mais elevada (50 µM). Em concentrações idênticas, a rutina inibiu menos eficazmente a formação de TBARS que a quercetina (teste SNK).

#### **DISCUSSÃO**

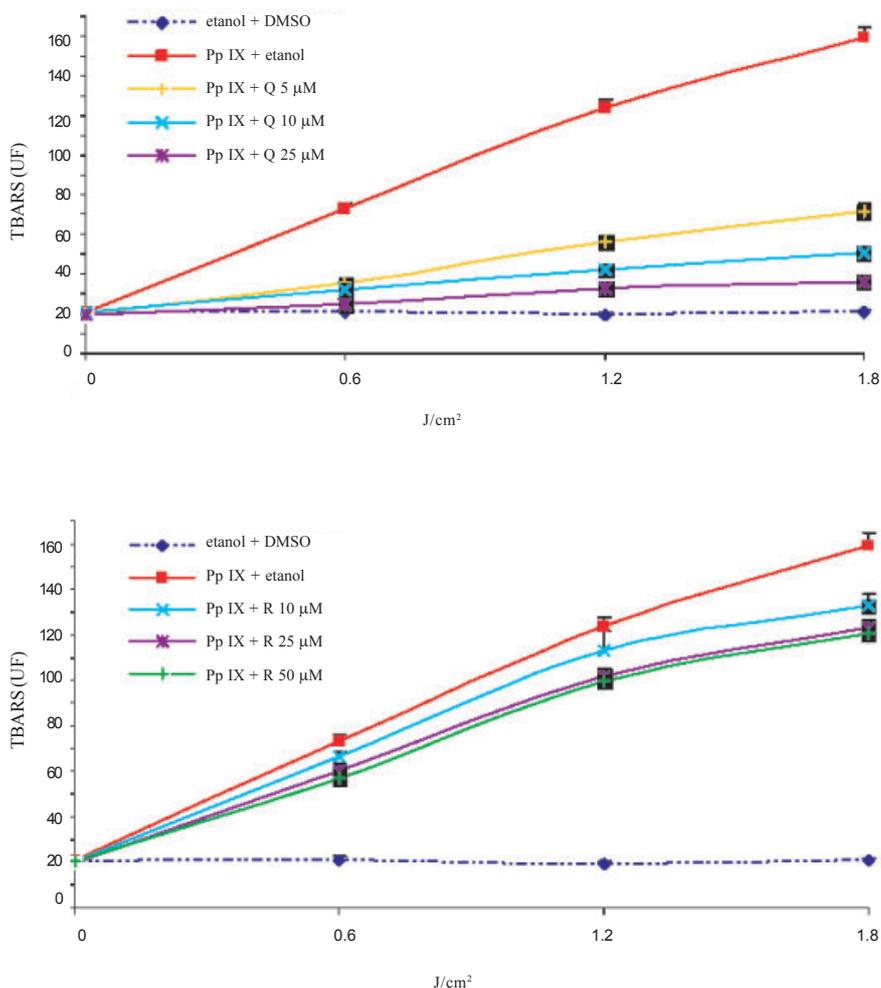
Os eritrócitos são particularmente susceptíveis à sobrecarga oxidante por



**Fig. 6** – Cinética do efeito da quercetina (A) e rutina (B) incorporadas nos eritrócitos na hemólise induzida por radiação UV-A em eritrócitos a 2% (v/v). Os eritrócitos foram pré-incubados 30 min com PpIX 30 µM. Após incubação com o flavonóide durante 15 min., os eritrócitos foram lavados duas vezes para remoção do flavonóide não incorporado no eritrócito e irradiados com UV-A nas doses referidas na figura. Estão representados os ensaios de controlo com os solventes utilizados e ensaios com a quercetina nas concentrações de 5, 10 e 25 µM (A) e a rutina nas concentrações de 10, 25 e 50 µM (B). (■) designa os valores dos ensaios que variam significativamente do controlo com PpIX e etanol (teste SNK). Os resultados são a média±SEM de 5 experiências independentes.

estarem normalmente expostos a altas concentrações de oxigénio, terem uma membrana susceptível à peroxidação lipídica, que delimita uma solução concentrada de uma proteína hémica - a hemoglobina - capaz de catalisar a lipoperoxidação, e por não terem capacidade de ressintetizar as biomoléculas lesadas. Existe evidência que EROs são realmente produzidas no eritrócito pela reacção de auto-oxidação da hemoglobina que gera  $O_2^{\cdot-}$  podendo este originar, secundariamente, espécies mais reactivas como o  $HO^{\cdot}$  (23). Além disso, EROs de origem extra-celular (geradas, por exemplo, nas células fagocitárias activadas), podem também atacar o eritrócito. A intoxicação por xenobióticos e outras fontes exógenas podem, de igual modo, provocar a indução de EROs no eritrócito. Os danos oxidantes provocam a peroxidação lipídica e oxidação das proteínas eritrocitárias, processos eventualmente conducentes à hemólise. As EROs estão também propostas como possíveis responsáveis pelo envelhecimento eritrocitário<sup>24</sup>.

O eritrócito, exposto a diferentes condições de stress oxidante, foi utilizado para estudar o efeito antioxidante de flavonóides. Neste trabalho *in vitro*, as condições foram obviamente diferentes e menos complexas do que as fisiológicas. Os outros componentes do sangue estão ausentes deste sistema, assim como a interacção dos flavonóides com a albumina, uma vez que foi demonstrado existir troca de flavonóides entre a albumina e o eritrócito<sup>25</sup>. Outro factor importante é a variabilidade biológica dos eritrócitos. A susceptibilidade ao ataque oxidante varia entre dadores, dependendo por exemplo das concentrações de antioxidantes não-enzimáticos



**Fig. 7** – Efeito da quercetina (A) e da rutina (B) incorporadas nos eritrócitos na formação de TBARS induzida por radiação UV-A em suspensões de eritrócitos a 2 % pré-incubadas com Pp IX 30 µM. Descrição experimental na figura 6. Estão representados os ensaios de controlo com os solventes utilizados e ensaios com a quercetina nas concentrações de 5, 10 e 25 µM (A) e a rutina nas concentrações de 10, 25 e 50 µM (B). (■) indica os valores dos ensaios com o flavonóide que variam significativamente do controlo com PpIX e com etanol (teste SNK). Os resultados são a média ±SEM de 5 experiências independentes.

presentes no eritrócito ( $\pm$ -tocoferol, ácido ascórbico, glutathione reduzido) e também da actividade das enzimas antioxidantes. A avaliação do stress oxidante no eritrócito foi efectuada por duas técnicas: cálculo da hemólise e determinação de lipoperoxidação pela formação de TBARS. Quando o

sistema oxidante utilizado foi o cobre, foi também determinada a formação de meta-hemoglobina, atendendo a que este metal é conhecido por provocar a oxidação da hemoglobina.

*Efeito de flavonóides na lipoperoxidação, hemólise e formação de meta-hemoglobina induzida pelo cobre(II)*

Apesar de o cobre estar normalmente indisponível *in vivo*, situações patológicas, como a doença de Wilson, ou resultantes de intoxicação por este metal podem elevar as concentrações plasmáticas de cobre provocando entre outros efeitos, hemólise intra vascular.

A exposição dos eritrócitos a sais de cobre induz diversos efeitos moleculares responsáveis pela hemólise, nomeadamente, no metabolismo oxidativo intermediário e nos sistemas redutores, na hemoglobina e nos constituintes da membrana<sup>20</sup>.

As interações cobre-hemoglobina podem levar à formação de meta-hemoglobina e de radicais livres de oxigénio. Na presença de pelo menos 4 iões cúpricos por tetrâmero de hemoglobina dá-se a rápida oxidação da hemoglobina, independentemente da presença de oxigénio e sem libertação imediata de radicais livres. Concentrações relativas de cobre menores podem, todavia, catalisar a auto-oxidação lenta da hemoglobina. Este efeito depende da presença de oxigénio com formação de radical superóxido<sup>26</sup>. O cobre acelera a conversão da meta-hemoglobina em hemicrómio e a desnaturação e precipitação da hemoglobina com formação de corpos de Heinz<sup>27</sup>.

A catálise da auto-oxidação da

hemoglobina pelo cobre, para além de implicar a ligação deste a grupos sulfidrilo da proteína hémica, envolve um ciclo de oxidação-redução do metal em que participa o oxigénio molecular, com libertação de superóxido. O cobre pode, desta forma, iniciar a lipoperoxidação por abstracção do hidrogénio alílico dos ácidos gordos poli-insaturados após geração de radicais HO· através da reacção de Fenton<sup>28</sup>. Por outro lado, o cobre pode participar na promoção da lipoperoxidação por activação redutora e decomposição de hidroperóxidos lipídicos pré-existentes a radicais peróxido e alcóxido<sup>29</sup>. A susceptibilidade da membrana à peroxidação relaciona-se com a sua composição lipídica, sendo constituída em cerca de 69 % por fosfolípidos. Destes, cerca de 26 % correspondem a fosfatidiletanolaminas das quais o ácido gordo poli-insaturado predominante é o ácido araquidónico. A lipoperoxidação no eritrócitos acarreta a perda de ácidos gordos poli-insaturados, de fosfatidiletanolamina e de fosfadilserina<sup>30</sup>. Embora a peroxidação também estimule um processo reparativo, a velocidade de reparação não será suficiente para evitar os efeitos da destruição dos ácidos gordos poli-insaturados o que determina alterações da permeabilidade globular<sup>31</sup>. Para além de induzir a destruição de lípidos, a lipoperoxidação dá lugar a produtos, como o dialdeído malónico, que também têm efeitos lesivos na membrana eritrocitária. A exposição de eritrócitos ao dialdeído malónico resulta: em alterações no cito-esqueleto com diminuição das bandas 1 e 2 da espectrina, com concomitante aparecimento de polímeros proteicos de alto peso molecular; na formação de ligações

cruzadas envolvendo predominantemente resíduos de lisina das proteínas da membrana; na formação de ligações cruzadas entre a hemoglobina e a membrana globular; e na produção de cromólípidos fluorescentes, resultantes de complexos 1-amino-3-iminopropeno<sup>32,33</sup>. Simultaneamente, a exposição da membrana eritrocitária ao superóxido e a compostos carbonílicos derivados da peroxidação dos lípidos provocam a diminuição da actividade da ATPase<sup>(20,34,35)</sup>.

A exposição ao cobre determina a alteração da permeabilidade da membrana aos iões condicionando o aumento da fragilidade osmótica. A diminuição da relação área/volume e da flexibilidade da membrana poderão ser os factores da acentuada redução da deformabilidade eritrocitária<sup>36</sup>. O estudo electroforético das membranas de eritrócitos humanos expostos ao Cu(II) revela diminuição da intensidade das bandas correspondentes à espectrina e à actina, o aparecimento de material de elevado peso molecular e a dimerização da principal proteína intrínseca (banda 3)<sup>37</sup>. A proteína da banda 3, uma proteína que atravessa toda a espessura da membrana, além de estar relacionada com o transporte de aniões, liga-se a outras proteínas quer da própria membrana, como a anquirina, quer citoplasmáticas. Estas alterações são devidas à oxidação directa dos grupos sulfidrilo de proteínas da membrana pelo ião Cu(II), com formação de ligações cruzadas persulfureto na espectrina e, no caso de o glutatião reduzido intracelular estar diminuído, dimerização da proteína da banda 3. Estes efeitos acarretam a incapacidade de manutenção dos gradientes de concentração dos catiões e um aumento da fragilidade

osmótica<sup>38</sup>.

Neste trabalho verifica-se que a lipoperoxidação induzida pelo cobre(II), avaliada pela formação de TBARS, aumentou ao longo da incubação em três fases distintas: uma primeira fase de ligeiro aumento, entre os 0 e 90 minutos, que pode corresponder à fase de iniciação da lipoperoxidação; uma segunda fase de grande intensidade, compreendida entre os 90 e 180 minutos, a fase de propagação da lipoperoxidação; e uma terceira fase, entre os 180 e 270 minutos, onde a intensidade de formação é menor e ocorre a estabilização do processo, provavelmente a fase de terminação da lipoperoxidação. Ambos os flavonóides estudados, quercetina e rutina, inibiram a formação de TBARS nas concentrações ensaiadas podendo indicar que os flavonóides actuaram como eficazes inibidores da lipoperoxidação.

A hemólise induzida pelo cobre(II) começou a partir dos 90 minutos, exactamente a fase onde se detectou um intenso aumento da formação de TBARS. Em contraste, no período entre os 180 minutos aos 270 minutos, apenas se observou um ligeiro aumento dos TBARS, mas a hemólise continuou com a mesma intensidade. Estes factos sugerem que a lipoperoxidação precede a hemólise. A quercetina e rutina inibiram a hemólise dependendo da concentração ensaiada. Paradoxalmente, a rutina 10 µM revelou um ligeiro efeito pró-hemolítico ao antecipar a hemólise provocada pelo cobre(II), apesar de ter inibido a formação de TBARS. A inibição da peroxidação lipídica pelos flavonóides pode não evitar só por si que o processo hemolítico induzido pelo cobre ocorra.

A quelatação de iões cobre não parece ser o mecanismo predominante na acção antioxidante dos flavonóides estudados. A quercetina e rutina inibiram a lipoperoxidação e a hemólise em concentrações bastante inferiores à do metal. Nos ensaios onde a concentração dos flavonóides foi de 25  $\mu\text{M}$ , concentração oito vezes inferior à do cobre(II), ambos os polifenóis ensaiados inibiram a lipoperoxidação e hemólise em aproximadamente 90 %.

A formação de meta-hemoglobina induzida por cobre foi acelerada na presença de quercetina e rutina, embora este efeito não tenha tido como consequência a estimulação da peroxidação lipídica ou da hemólise. Outros autores indicam os flavonóides como inibidores da formação de meta-hemoglobina, mas foram utilizados outros sistemas indutores de stresse oxidante e não cobre<sup>39</sup>.

*Efeito de flavonóides incorporados no eritrócito na lipoperoxidação, hemólise e formação de meta-hemoglobina induzidas por cobre*

Ambos os flavonóides estudados inibiram a formação de TBARS sugerindo que os flavonóides após serem incorporados a partir do meio extra-globular, podem encontrar-se provavelmente na membrana plasmática ou no interior do eritrócito.

A capacidade inibitória da hemólise pela quercetina foi inferior à detectada nas experiências onde também se encontra no espaço extra-globular. A rutina não apresentou qualquer efeito na sua inibição, tendo mesmo sido detectada uma ligeira antecipação da hemólise. Um comportamento semelhante já foi referido nos ensaios com a rutina 10  $\mu\text{M}$ , na secção anterior.

Assim, apesar de ocorrer a inibição dos TBARS o processo de hemólise pode prosseguir inalterado.

Como proposto em<sup>40</sup> a hemólise induzida por radicais pode não estar apenas relacionada com a lipoperoxidação, a oxidação e agregação de proteínas membranares podem originar “buracos” hemolíticos na membrana. Também Davies e Goldberg<sup>41</sup> sugerem que a oxidação das proteínas e sua degradação são processos independentes da lipoperoxidação.

A localização da quercetina no eritrócito e a sua interacção com os vários constituintes membranares poderão ser diferentes no caso da rutina. As moléculas quercetina e rutina apresentam apenas uma diferença estrutural: a quercetina possui um grupo OH na posição 3, enquanto a rutina tem um glicósido de raminose (rutinose). Esta diferença estrutural pode ser particularmente importante na interacção dos flavonóides com os constituintes da membrana e na possível penetração no eritrócito. A rutinose pode dificultar a difusão do flavonóide através da membrana e o consequente acesso ao interior do eritrócito<sup>42</sup>. Foi sugerido que a quercetina consegue atravessar a membrana plasmática por difusão passiva<sup>25</sup>. A quercetina ao ser retirada do meio extracelular, poderá continuar a proteger os danos oxidativos de proteínas membranares importantes para a manutenção da estabilidade da membrana, enquanto a rutina ao ser retirada do meio extra-celular, poderá deixar de exercer essa protecção. Embora não tenha sido objectivo deste trabalho, teria sido interessante estudar as alterações sofridas pelas diversas proteínas membranares e as possíveis diferenças entre os ensaios com a

quercetina e rutina.

A quercetina não teve qualquer efeito na formação de meta-hemoglobina induzida pelo cobre, embora as percentagens de formação de meta-hemoglobina tenham sido inferiores nos ensaios com este flavonóide. A rutina, pelo contrário, inibiu significativamente a formação de meta-hemoglobina ao longo do tempo. Nos ensaios onde a rutina também se encontra no meio extra-celular (secção anterior), detectou-se a antecipação da formação de meta-hemoglobina induzida pelo cobre(II). Poderão existir nas duas condições experimentais, diferentes mecanismos de acção da rutina na formação de meta-hemoglobina induzida pelo cobre(II).

#### *Efeito de flavonóides na lipoperoxidação e hemólise induzidas pelo AAPH*

O AAPH embora não exista em sistemas biológicos, apresenta as vantagens de possibilitar o estudo do stresse oxidativo da membrana do eritrócito, pelo ataque exterior de radicais peroxilo, resultantes da sua decomposição à temperatura fisiológica na presença de oxigénio, gerando radicais a uma velocidade constante<sup>43</sup>. Considera-se provável a existência de radicais peroxilo *in vivo* a partir da decomposição de hidroperóxidos lipídicos por aquecimento ou catalisada por um metal de transição<sup>44</sup>. Foi demonstrado que os radicais peroxilo gerados pelo AAPH induzem a lipoperoxidação e a oxidação das proteínas da membrana do eritrócito, processos que eventualmente provocam a hemólise<sup>45,46</sup>. A utilização deste gerador tem, no entanto, o inconveniente de não permitir a distinção en-

tre a captação do radical peroxilo originado pelo AAPH e a captação dos radicais peroxilo lipídicos.

Alguns dos flavonóides ensaiados inibiram significativamente a formação de TBARS e a hemólise induzidas pelo AAPH. Os resultados obtidos parecem estar relacionados com algumas das características estruturais dos flavonóides apontadas como importantes para sua actividade antioxidante: i) a presença de um grupo *o*-catecol (3',4'-OH) no anel B; ii) a ligação dupla conjugada com o carbonilo do carbono 4; iii) a combinação dos grupos hidroxilo das posições C3 e C5 com a função 4-oxo; iv) o número de grupos hidroxilo (47,48). Os flavonóides que mais inibiram a hemólise possuem o grupo *o*-catecol. O quempferol que não possui estrutura catecólica conferiu menor inibição, confirmando-se a presença deste grupo como importante para a actividade antioxidante.

Dos flavonóides ensaiados que inibiram a formação de TBARS, todos têm a estrutura catecólica e ligação dupla conjugada com o carbonilo em C4, sugerindo que estas duas características estruturais são importantes para a inibição da lipoperoxidação. As isoflavonas genisteína e daidzeína estimularam a formação de TBARS e, por isso, não inibiram a hemólise; estes flavonóides possuem um número reduzido de substituintes hidroxilo, grupos importantes para a actividade antioxidante. Outra possibilidade é a formação de substâncias pró-oxidantes, resultantes da reacção das isoflavonas com o AAPH.

*Efeito de flavonóides na lipoperoxidação e hemólise induzidas por UV-A em presença de PpIX*

A geração de EROs após irradiação de eritrócitos com UV-A na presença de protoporfirina IX é um modelo válido para o estudo dos efeitos de EROs uma vez que esta situação é possível *in vivo*. Doentes com protoporfiria eritropoética têm concentrações elevadas de PpIX nos eritrócitos, provocando fotossensibilidade e foto-hemólise quando expostos a radiação UV-A/visível<sup>49</sup>. A foto-hemólise é precedida por uma diminuição da concentração dos grupos sulfidrílicos da membrana, pela perda de ácidos gordos poli-insaturados com formação de dienos conjugados e de dialdeído malónico e pela inibição da actividade da acetilcolinesterase<sup>20</sup>. A exposição da PpIX à radiação ultravioleta e à luz visível, com comprimento de onda próximo dos 650 nm, será o evento desencadeador da formação de espécies reactivas de oxigénio. Após irradiação, a PpIX é excitada para o estado triplete, cuja energia é posteriormente transferida para o oxigénio molecular com formação de oxigénio singuleto. Durante este processo, o fotossensibilizador é regenerado possibilitando vários ciclos de produção de oxigénio singuleto. Apesar da sua curta semi-vida (4 ms em solução aquosa), o oxigénio singuleto é extremamente reactivo oxidando, de forma irreversível, componentes celulares essenciais, como proteínas, ácidos nucleicos, colesterol, entre outros<sup>50</sup>. Além disso, muitas substâncias como ALA e os seus ésteres metilados (pró-fármacos), utilizadas em terapêutica fotodinâmica são metabolizadas em protoporfirina IX<sup>51</sup>.

A quercetina e rutina inibiram significativamente a foto-hemólise induzida por radiação UV-A na presença de PpIX ao longo da irradiação. Apesar de não significativas, as percentagens de inibição da hemólise foram ligeiramente superiores nos ensaios com a quercetina em comparação com a rutina. Sorata *et al.* (52) também indicam a quercetina e a rutina como protectores da foto-hemólise na fotossensibilização induzida por hematoporfirina. Nas experiências efectuadas com outros sistemas oxidantes – cobre(II) e AAPH – constata-se que a protecção conferida pelos flavonóides na inibição da hemólise foi maior que a detectada na foto-hemólise induzida por UV-A e PpIX. A quercetina e a rutina poderão ser captadores mais eficientes dos radicais gerados nesses sistemas (peróxido gerado pelo AAPH ou HO<sup>•</sup> gerados pelo cobre), do que captadores/desactivadores do oxigénio singuleto gerados na fotossensibilização por PpIX.

Ao contrário dos sistemas de metais indutores de stresse oxidante - como constatado nas experiências com o cobre - a formação de TBARS induzida pela radiação UV-A na presença de PpIX, apresenta uma velocidade de formação praticamente linear, uma característica de sistemas geradores de <sup>1</sup>O<sub>2</sub><sup>53</sup>.

Ambos os flavonóides quercetina e rutina inibiram a formação de TBARS ao longo da irradiação, apresentado a quercetina claramente maior potencial inibitório que a rutina.

*Efeito de flavonóides incorporados no eritrócito na lipoperoxidação e hemólise induzidas por UV-A em presença de PpIX*

A quercetina e a rutina inibiram significativamente a foto-hemólise, sendo as percentagens de inibição semelhantes entre os dois flavonóides. Os flavonóides após terem sido removidos do meio extracelular, continuam a proteger o eritrócito da foto-hemólise, indicando que poderão ter sido incorporados no eritrócito.

A formação de TBARS foi inibida pelos 2 flavonóides, tendo a quercetina maior potencial inibitório que a rutina. No entanto, as percentagens de inibição da formação de TBARS foram inferiores às detectadas nos ensaios onde a quercetina e rutina também estão presentes no meio extra-celular. A remoção dos flavonóides poderá diminuir a protecção da lipoperoxidação dos fosfolípidos localizados no exterior da membrana.

A inibição da hemólise induzida pela UV-A e PpIX foi semelhante com ambos os flavonóides, mas a inibição da formação de TBARS detectada nos ensaios com a quercetina foi superior à rutina. Pelas razões referidas, a quercetina e a rutina podem talvez proteger de forma distinta diversos constituintes da membrana, ou apresentar uma localização subcelular diferente, não sendo possível no âmbito deste trabalho, apresentar mecanismos que expliquem estas diferenças.

Alguns dos flavonóides estudados revelaram potencial antioxidante nos três sistemas oxidantes utilizados, inibindo a lipoperoxidação e hemólise mesmo quando presentes apenas no espaço intraglobular. A presença de flavonóides no eritrócito pode desem-

penhar um papel importante na distribuição destas moléculas pelo organismo, tendo sido sugerido que os eritrócitos funcionam como reservatórios de flavonóides<sup>25</sup>. É importante referir que, neste trabalho, os flavonóides foram ensaiados em concentrações superiores às detectadas no plasma e na sua forma natural, enquanto no plasma são detectados principalmente na forma de conjugados glicosilados, sulfatados e metilados, alterações que podem diminuir a sua capacidade antioxidante<sup>4</sup>. Através da metilação ou glicosilação, as propriedades antioxidantes podem ser perdidas, mas pensa-se que os flavonóides podem continuar a desempenhar efeitos similares à molécula original por outros mecanismos como a regulação da expressão génica<sup>54</sup>.

Alguns autores consideram que são necessários mais estudos sobre a absorção, biotransformação e distribuição nos tecidos de moléculas consideradas “antioxidantes” como os polifenóis, antes de serem realmente apontadas como possuidoras dessas funções *in vivo*<sup>55</sup>.

## CONCLUSÕES

*Efeito de flavonóides na lipoperoxidação e hemólise induzidas por AAPH*

O AAPH quando sujeito a atmosfera de oxigénio, induziu a hemólise e a lipoperoxidação do eritrócito.

Alguns dos flavonóides estudados inibiram a lipoperoxidação e a hemólise, confirmando-se que certas características estruturais, como a presença do grupo *o*-catecol e a ligação dupla conjugada com o carbonilo em C4, são

importantes para a actividade antioxidante dos flavonóides.

As isoflavonas genisteína e daidzeína estimulam, nas condições experimentais utilizadas, a lipoperoxidação embora não apresentem qualquer efeito na hemólise.

*Efeito de flavonóides na lipoperoxidação, hemólise e formação de metahemoglobina induzidas por cobre*

Confirmou-se que o cobre induz a hemólise, lipoperoxidação e formação de metahemoglobina no eritrócito humano. A lipoperoxidação induzida pelo cobre precede a hemólise.

A quercetina e rutina inibiram a lipoperoxidação e a hemólise, dependendo da concentração ensaiada.

A antecipação pelos flavonóides da formação de meta-hemoglobina induzida por cobre não apresentou como consequência a estimulação da lipoperoxidação e hemólise.

A quelatação do cobre não parece ser o principal mecanismo na actividade antioxidante dos flavonóides.

*Efeito de flavonóides incorporados no eritrócito na lipoperoxidação, hemólise e formação de meta-hemoglobina induzidas por cobre*

A quercetina e rutina inibem a lipoperoxidação estando por isso, provavelmente, incorporadas no eritrócito.

Enquanto a quercetina apresentou um efeito protector da hemólise, a rutina não inibiu a hemólise. Este facto pode sugerir que os flavonóides apresentam uma localização intracelular diferente e protegem diferentes estruturas celulares importantes no processo hemolítico.

*Efeito de flavonóides na lipoperoxidação e hemólise induzidas por UV-A em presença de PpIX*

Confirmou-se que a PpIX é um potente fotossensibilizador provocando a hemólise e a peroxidação lipídica.

A quercetina e rutina diminuíram, ligeiramente, a foto-hemólise. Ambos os flavonóides inibiram a lipoperoxidação apresentando a quercetina claramente maior potencial inibitório.

*Efeito de flavonóides incorporados no eritrócito na lipoperoxidação e hemólise induzidas por UV-A em presença de PpIX*

Os resultados foram semelhantes aos descritos na secção anterior, indicando que os flavonóides incorporados continuam a inibir a foto-hemólise e a lipoperoxidação.

## REFERÊNCIAS

1. McCord, J. (2000) The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress. *Am. J. Med.*, 108, 652-659
2. Bendich, A. (1995) From natural antioxidants to pharmaceuticals. *In: The Oxygen Paradox* (eds. K. Davies, F. Ursini), CLEUP University Press, Italia, págs. 591-612
3. Bors, W., Heller, W., Michel, C., Stettmaier, K. (1996) Flavonoids and polyphenols: chemistry and biology. *In: handbook of antioxidants* (ed. E. Cadenas e L. Packer), Marcel Dekker Inc., Nova Iorque, págs. 409-466
4. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 79, 727- 47
5. Middleton Jr., E., Kandaswami, C., Theoharides, T. (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.*, 52, 673-751
6. Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G., (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids.

- Free Radic. Biol. Med.*, 20, 933-956
7. Scalbert, A., Williamson, G. (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, 130, 2073-2085
  8. Hollman, P., Hertog, G., Katan, M. (1996) Role of dietary flavonoids against cancer and coronary disease, *Bio. Soc. Trans.*, 24, 785-789
  9. Manach, C., Morand, C., Crespy, V., Demigné, C., Texier, O., Régéat, F., Rémésy, C. (1998) Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett.*, 426, 331-336
  10. Terao, J., Piskula, M. (1999) Flavonoids and Membrane Lipid Peroxidation Inhibition, *Nutrition*, 15, 790-791
  11. Torel, J., Cillard, J., Cillard, P. (1986) Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry*, 25, 383-385
  12. Filipe, P., Lança, V., Silva, J.N., Morlière, P., Santus, R., Fernandes, A. (2001) Flavonoids and urate antioxidant interplay in plasma oxidative stress. *Mol. Cell. Biochem.*, 221, 79-87
  13. Mangiapane, H., Thomson, J., Salter, A., Brown, S., Bell G., White, D. (1992) The inhibition of the oxidation by catequin, a naturally occurring flavonoid. *Biochem. Pharmacol.*, 43, 445-450
  14. Noroozi, M., Angerson, W., Lean, M. (1998) Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am. J. Clin. Nutr.*, 67, 1210-1218
  15. Formica, J., Regelson, W. (1995) Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Fd. Chem. Toxic.*, 33, 1061-1080
  16. Ueda, H., Chikako, Y., Yamazaki, M., (2004) A hydroxyl group of flavonoids affects oral anti-inflammatory activity and inhibition of systemic necrosis factor- $\alpha$  production, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 119-125
  17. Wiseman, H. (1996) Role of phyto-estrogens in the protection against cancer and heart disease, *Bio. Soc. Trans.*, 24, 795-800
  18. Asad, S., Singh, S., Ahmad, A., Hadi, S., (1998) Flavonoids: antioxidants in diet and potential anticancer agent, *Med. Sci. Res.*, 26, 723-728
  19. Urquiaga, I., Leighton, F., (2000) Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress, *Biol. Res.*, 33, 10-22
  20. Fernandes, A. (1987) A lipoperoxidação como mecanismo da toxicidade do cobre. Tese de Doutoramento, FMUL, Lisboa
  21. Kellogg E., Fridovich, I. (1977) Liposome Oxidation and Erythrocyte Lysis by Enzymically Generated Superoxide and Hydrogen Peroxide. *J. Biol. Chem.*, 262, 6121-6728
  22. Glantz, S. (1997) Primer of Biostatistics, 4<sup>th</sup> Ed., McGraw-Hill
  23. Hebbel, R. P., Eaton, J. W., Balasingam, M., Steinberg, M. H. (1986) Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. *J. Clin. Invest.*, 70, 1253-1259
  24. Bartosz, G. (1990) Erythrocyte membrane changes during aging in vivo. In: Blood Cell Biochemistry (ed. J. R. Harris), Plenum Press, New York, págs. 45-80
  25. Fiorani, M., Accorsi, A., Cantoni, O. (2003) Human red blood cells as a natural flavonoid reservoir. *Free. Radic. Res.*, 37, 1331-1338
  26. Winterbourn, C.C., Carrell, R.W. (1977) Oxidation of human haemoglobin by copper. Mechanism and suggested role of the thiol group of residue b93. *Biochem J.*, 165, 141-148
  27. Chiu, D., Lubin, B., Shohet, S.B. (1982) Peroxidative reactions in red cell biology. In: In free radicals in biology (ed. W.A. Pryor), Academic Press, New York, págs 115-160
  28. Carrell, R.W., Krishnamoorthy, R., Winterbourn, C.C. (1978) Hemoglobin autoxidation: the risk to the red cell and the contribution of copper. In: The Red Cell (ed. A. Liss), New York, págs 687-695
  29. Borg, D., Schaich, K. (1983) Reactions connecting autoxidation with oxyradical production, lipid peroxidation and cytotoxicity, In: Oxy Radicals and their Scavenger Systems, vol I. Molecular Aspects (eds. G. Cohen and R.A. Greenwald), Elsevier Biomedical, New York, pág 122
  30. Montgomery, R., Dryer, R.L., Conway, T.W., Spector, A.A. (1974) Biochemistry. A case-oriented approach. C-V. Mosby Company, Saint Louis. Págs 396-397
  31. Carrell, R.W., Winterbourn, C.C., Rachmilewitz E.A. (1975) Activated oxygen and haemolysis. *Br. J. Haematol.*, 30, 259-264
  32. Hochstein, P., Jain, S.K. (1981) Association of lipid peroxidation and polymerization of membrane proteins with erythrocyte aging. *Fed. Proc.*, 40, 183-188
  33. Jain, S.K., Mohandas, N., Clark, M.R., Shohet, S.B. (1983) The effect of malonyldialdehyde, a product of lipid peroxidation, on the deformability, dehydration and Cr-survival of erythrocytes. *Br. J. Haematol.*, 53, 247-255
  34. Bartosz, G., Fried, R., Grzelinska, E., Leyko, W. (1977) Effect of hydroperoxide radicals on bovine-erythrocyte membrane. *Eur. J. Biochem.*, 73, 261-264
  35. Kesner, L., Kindy, R.J., Chan, P.C. (1979) Inhibition of erythrocyte membrane

- (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-activated ATPase by ozone-treated phospholipids. *J. Biol. Chem.*, 254, 2705-2709
36. Adams, K.F., Johnson, G. Jr, Hornowski, K.E., Lineberger, T.H. (1979) The effect of copper on erythrocyte deformability – A possible mechanism of hemolysis in acute copper intoxication. *Biochim. Biophys. Acta*, 550, 279-287
  37. Haest, C., Kamp, D., Plasa, G., Deuticke, B. (1977) Intra- and intermolecular cross-linking of membrane proteins in intact erythrocytes and ghosts by SH-oxidizing agents. *Biochim. Biophys. Acta*, 469, 226-230
  38. Salhany, J.M., Swanson, S.C., Cordes, K.A., Gaines, S.B., Gaines, K.C. (1978) Evidence suggesting direct oxidation of human erythrocyte membrane sulphhydryls by copper. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 82, 1294-1299
  39. Ferrali, M., Signorini, C., Caciotti, B., Sugherini, L., Ciccoli, L., Giachetti, D., Comport, M. (1997) Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Lett.*, 416, 123-129
  40. Sato Y., Sato, K., Suzuki, Y. (1999) Mechanism of free radical-induced hemolysis of human erythrocytes: comparison of calculated rate constants for hemolysis with experimental rate constants. *Arch. Biochem. Biophys.*, 366, 61-69
  41. Davies, K., Goldberg, A. (1987) Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 262, 8220-8226
  42. Saija, A., Scalse, M., Lanza, M., Marzullo, D., Bonina, F., Casteli, F. (1995) Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with membranes. *Free Rad. Biol. Med.*, 19, 481-486
  43. Niki, E. (1990) Free radicals initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals. *In: Methods in Enzimology*, 186, Academic Press, Florida, págs. 100-108
  44. Halliwell, B., AeschBach, R., Loliger, J., Aruoma, O. (1995) The Characterization of Antioxidants. *Fd. Chem. Toxic.*, 33, 601-617
  45. Niki, E. (1996) á-tocopherol. *In : Handbook of antioxidants* (eds. Cadenas E. e Packer L.), Marcel Dekker Inc., N.Y., 3-26
  46. Sato Y., Kamo S., Takahashi T., Suzuki Y. (1995) Mechanism of free radical-induced hemolysis of human erythrocytes: hemolysis by water-soluble radical initiator. *Biochemistry*, 28, 8940-8949.
  47. Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M. (1998) Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.*, 186, 343-355
  48. Van Acker, F., Schouten O., Haenen G., Van der Vijgh, W. , Bast A. (2000) Flavonoids can replace alpha-tocopherol as an antioxidant. *FEBS Lett.*, 473, 145-148
  49. Goldstein, B., Harber, B. (1972) Erythropoietic protoporphyria: lipid peroxidation and red cell membrane damage associated with photohemolysis. *J. Clin. Invest.*, 51, 892-902
  50. Silva, J. (2005) Terapêutica fotodinâmica em Dermatologia. *Acta Fotobiol.*, 20, 59-72
  51. Kennedy, J. C., Pottier, R. H. (1992) Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J.Photochem. Photobiol.*, 98, 275-292
  52. Sorata, Y., Takahama, U., Kimura, M. (1984) Protective effect of quercetin and rutin on photosensitized lysis of human erythrocytes in the presence of hematoporphyrin. *Biochim. Biophys. Acta.*, 799, 313-317
  53. Girotti, A. (1998) Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J. Lipid. Res.*, 39, 1529-1542
  54. Williams, R., Spencer, J., Rice-Evans, C. (2004) Flavonoids : antioxidant or signalling molecules, *Free Rad. Biol. Med.*, 36, 838 – 849
  55. Azzi, A., Davies, K., Kelly, F. (2004) Free radical biology - terminology and critical thinking. *FEBS Lett.*, 558, 3-6

Anuncio