



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA METABÓLICA**



Baccharis trimera inibe a produção de espécies reativas de oxigênio através da via de sinalização da PKC e NADPH oxidase em células SK Hep-1

GLAUCY RODRIGUES DE ARAÚJO

Ouro Preto
2015

GLAUCY RODRIGUES DE ARAÚJO

Baccharis trimera inibe a produção de espécies reativas de oxigênio através da via de sinalização da PKC e NADPH oxidase em células SK Hep-1

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica

Orientadora: Prof. Dra. Daniela Caldeira Costa

Co-orientadora: Prof. Dra. Miriam Martins Chaves

Ouro Preto
2015



UFOP

**Universidade Federal
de Ouro Preto**

Reitor

Prof. Dr. Marccone Jamilson Freitas Souza

Vice-Reitor

Prof.^a Dr.^a Célia Maria Fernandes Nunes

Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação

Prof. Dr. Fábio Faversoni

NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Coordenador

Prof.^a Dr.^a Renata Nascimento de Freitas

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Coordenador

Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes

A659b

Araújo, Glaucy Rodrigues.

Baccharis trimera inibe a produção de espécies reativas de oxigênio através da via de sinalização da PKC e NADPH oxidase em células SK Hep-1 [manuscrito] / Glaucy Rodrigues Araújo. - 2015.

120f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Caldeira Costa.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Rutina. 2. Estresse oxidativo. I. Costa, Daniela Caldeira. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 577.164.3

Catálogo: www.sisbin.ufop.br

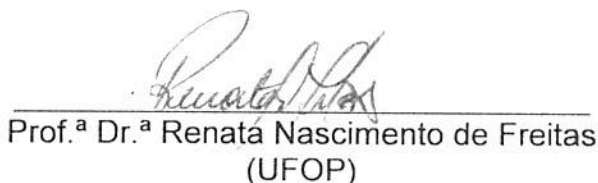
Ata da Banca Examinadora de Defesa de Tese Intitulada:

"*Baccharis trimera* inibe a produção de espécies reativas de oxigênio através da via de sinalização da PKC e NADPH oxidase em células SK Hep-1".


Aos quatro dias do mês de Dezembro de 2015, às 9:00h, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese da aluna **Glaucy Rodrigues de Araújo**. A defesa da tese iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

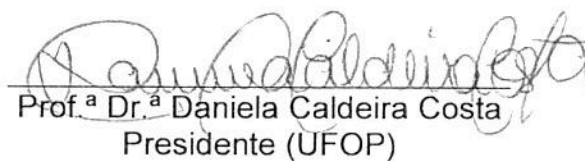
Membros da Banca Examinadora:


Prof. Dr. Mauro César Isoldi (UFOP)


Prof.ª Dr.ª Renata Nascimento de Freitas (UFOP)


Prof.ª Dr.ª Tânia Toledo de Oliveira (UFV)


Prof.ª Dr.ª Karen Cristiane Martinez de Moraes (UNESP)


Prof.ª Dr.ª Daniela Caldeira Costa
Presidente (UFOP)

DATA DA DEFESA: 04/12/2015

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NUPEB – ICEB II – sala 49 | Universidade Federal de Ouro Preto
Campus Universitário Morro do Cruzeiro | CEP 35.400-000 – Ouro Preto – MG – Brasil
Tel: 55 (31) 3559.1680 | E-mail: cbiol@nupeb.ufop.br | www.nupeb.ufop.br/cbiol

*“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar,
não seremos capazes de resolver os problemas
causados pela forma como nos acostumamos
a ver o mundo”. (Albert Einstein)*

*Aos meus pais, Maria e Alceu,
com muito amor.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço primeiramente à minha querida orientadora **Daniela**, por sempre acreditar em mim e não me deixar desistir. Obrigada por dedicar muito do seu tempo pra me incentivar. Obrigada por seus ensinamentos e por me oferecer seus conhecimentos de forma tão ímpar. Você é uma profissional que eu tenho como espelho e você me faz acreditar que podemos vencer e concluir o que está a nossa espera. E além de uma excelente profissional, como pessoa te admiro muito. Muito obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

Obrigada meu **Deus**, por me iluminar nessa caminhada.

Primeiramente gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para que eu estivesse entregando hoje minha tese de doutorado. Posso me perder nos pensamentos e esquecer alguém importante que faria jus também em estar nesta lista tão grande, a vocês o meu obrigado.

Muito obrigada a **profa Míriam Martins Chaves** por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório, por todo o apoio e ensinamento durante o desenvolvimento deste projeto.

Muito obrigada, **mãe e pai**, pela confiança que vocês sempre depositaram em mim e por não me deixarem desistir nunca. Espero um dia poder ser uma pequena parte do que vocês são. Desculpem-me as ausências em momentos tão importantes, mas meu coração se apertava junto aos seus, mesmo tão distante. **Átila**, obrigada por estar sempre apoiando a nossa família e fazendo também a minha parte, meu carinho. **Vô Wilson, meu vô**, o senhor é meu exemplo de vida e sabedoria. Sua alma é a mais elevada que conheço. Muito obrigada por ser o melhor avô do mundo. Obrigada também a minha **vozinha Neiva** (*in memoriam*) que me deixou participar da sua vida por um logo tempo e me ensinou que o mais importante é o amor. E ao meu **Tio Gladson** (*in memoriam*), pelas risadas e alegrias compartilhadas. A **toda minha família** linda, muito obrigada pelo apoio e por me fazerem tão feliz.

Parrera, meu amigo, companheiro e namorado, obrigada por me fazer chegar até aqui. Seus conselhos e seu ombro me fortaleceram. Obrigada por tudo e que continuemos nossa caminhada juntos. Obrigada à **família do Parrera**, que também já considero como minha, muito obrigada pelo apoio e por serem tão gentis. **Renata, Thaisa e 1L**, muito obrigada por me fazerem acreditar no sentido da amizade, saudade enorme de vocês.

A todos do LBM, em especial aos meus companheiros de laboratório: **Natália, Ana Carolina, Ana Carla, Pedro, Carol, Janaína, Karine, Geysla, Jorge e Rafaela**, muito obrigada por sempre estarem disponíveis, contem comigo pro que precisarem. A

ARAÚJO, G. R.

querida **Andrea Ferreira**, sem sua ajuda, eu não conseguiria, muito obrigada pela disponibilidade. **Mauricio**, pela ajuda incondicional e ter se tornando um grande amigo. **Ana Carolina e Janaína**, obrigada pelo apoio e por me ajudarem a concretizar parte deste trabalho. **Joamyr**, meu querido amigo e companheiro de trabalho, eu não tenho palavras pra te agradecer, muito obrigada por tudo, sem você eu jamais estaria aqui.

À **Escola de Nutrição**, e todos os professores e meus ex-alunos, obrigada pela experiência profissional e ser essencial para que eu concluísse esse trabalho.

Aos amigos que se tornaram família, **Aline, Simone, Aure, Lorena, Melina, Bruno e Joamyr**, sem vocês nada disso teria graça. Muito obrigada pelo companheirismo e por tornarem tudo mais especial e mais fácil.

Aos meus queridos amigos **Raquel e Vencido**, pela recepção e permitirem me sentir na minha casa, sou muito grata a vocês.

Minha **amiga-irmã Songa**, muito obrigada pela irmandade, você é muito especial pra mim. **Fera**, obrigada pelos melhores momentos de descontração. **Kamilla**, obrigada pela disponibilidade e pelo carinho.

À minha amada e eterna casinha **República Feijão com Arroz**, meu porto seguro. Minhas meninas, vocês são ESSENCIAIS na minha vida, sem vocês eu não teria forças pra continuar. Obrigada pelos rocks e por me proporcionarem só momentos de alegrias...amo muito vocês!

AGRADECIMENTO AOS COLABORADORES

Laboratório de Biologia Molecular e Celular;
Laboratório de Enzimologia e Proteômica;
Laboratório de Farmacognosia;
Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular;
Laboratório de Biologia e Tecnologia de Micro-organismos;
Laboratório de Imunoparasitologia;
Laboratório de Fitoquímica e Biologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia
(UFMG)
Laboratório de Bioquímica do Envelhecimento e Doenças Correlacionadas
(UFMG)

Muito obrigada pelo suporte necessário.

Apoio Financeiro

Este trabalho foi realizado no **Laboratório de Bioquímica Metabólica** do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto e no **Laboratório de Bioquímica do Envelhecimento e Doenças Correlacionadas** da Universidade Federal de Minas Gerais com o auxílio financeiro da FAPEMIG, CAPES, CNPq e UFOP

Sumário

Lista de Tabelas.....	xiii
Lista de Figuras.....	xiv
Lista de Abreviaturas.....	xvi
Resumo.....	xviii
Abstract.....	xx
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Plantas Medicinais e Fitoterápicos.....	4
2.2. O Gênero <i>Baccharis</i>	6
2.2.1. <i>Baccharis trimera</i> : uma revisão sistemática.....	8
2.3. Flavonoides: aspecto geral.....	15
2.3.1. Quercetina.....	17
2.3.2. Rutina.....	19
2.4. Sinalização redox.....	21
2.4.1 NADPH oxidase e a via de sinalização da PKC.....	22
3. OBJETIVOS.....	28
3.1. Objetivo geral.....	28
3.2. Objetivos específicos.....	28
4. METODOLOGIA.....	29
4.1. Reagentes.....	29
4.2. Material Botânico.....	29
4.3. Preparação dos extratos e soluções.....	29
4.4. Preparação das amostras para a análise cromatográfica e espectral.....	30
4.5. Avaliação de compostos fenólicos dos extratos hidroetanólico e aquoso.....	30
4.6. Análise da capacidade antioxidante <i>in vitro</i> por DPPH•.....	31
4.7. Cultivo celular.....	32
4.8. Ensaio de viabilidade celular (MTT).....	33
4.9. Tratamentos.....	34
4.10. Análise da produção de Espécies Reativas de Oxigênio por citometria de fluxo.....	35
4.11. Western Blotting.....	38
4.11.1. Preparação do Homogenato celular.....	38
4.11.2. Dosagem de proteínas.....	38
4.11.3. Eletroforese, transferência e revelação.....	38

4.11.4 Método de coloração utilizando Azul de Comassie	39
4.12. Atividade da PKC.....	40
4.13. Análise Estatística	40
5. RESULTADOS	41
5.1. Análise cromatográfica e espectral dos extratos hidroetanólico e aquoso de <i>Baccharis trimera</i>	41
5.2. Análise dos compostos fenólicos totais.....	47
5.3. Avaliação do poder antioxidante <i>in vitro</i> por DPPH.....	47
5.4. Avaliação da Viabilidade Celular através do teste de MTT.....	49
5.5. Análise quantitativa da produção de ERO por citometria de fluxo.....	54
5.5.1. Influência da via de sinalização de PKC e da NADPH oxidase na produção de ERO em células SK Hep-1	54
5.5.2. Avaliação da produção de ERO em células incubadas com os extratos hidroetanólico ou aquoso de <i>B. trimera</i> , quercetina e rutina.....	55
5.5.3. Representação qualitativa da produção de ERO por microscopia de fluorescência..	60
5.6. Análise da expressão proteica da PKC através de Western Blotting	61
5.7. Atividade da PKC	62
5.8. Análise da expressão da subunidade p47 ^{phox} e p47 ^{phox} fosforilada	63
7. CONCLUSÃO	80
8. REFERÊNCIAS	81

Lista de Tabelas

Tabela 1: Compostos identificados no extrato hidroetanólico de <i>Baccharis trimera</i>	41
Tabela 2: Compostos identificados no extrato aquoso de <i>Baccharis trimera</i>	44
Tabela 3: Atividade antioxidante dos extratos hidroetanólico e aquoso de <i>Baccharis trimera</i> e dos compostos quercetina e rutina por DPPH.....	48

Lista de Figuras

Figura 1: Espécies de <i>Baccharis</i>	8
Figura 2: <i>Baccharis trimera</i>	9
Figura 3: Estrutura geral dos Flavonoides.....	16
Figura 4: Quercetina.	18
Figura 5: Rutina.....	20
Figura 6: Estrutura do complexo enzimático da NADPH oxidase.....	23
Figura 7: Esquema da estrutura das isoformas da PKC.....	24
Figura 8: Processos que conduzem a ativação da enzima PKC.....	25
Figura 9: Sustentação da ativação da PKC por ERO.....	26
Figura 10: Delineamento experimental dos diferentes tratamentos.....	37
Figura 11: Perfil do extrato hidroetanólico de <i>B. trimera</i>	42
Figura 12: Estruturas químicas dos compostos do extrato hidroetanólico.....	43
Figura 13: Perfil do extrato aquoso de <i>B. trimera</i>	45
Figura 14: Estruturas químicas dos compostos do extrato aquoso.....	46
Figura 15: Avaliação de compostos fenólicos totais.....	47
Figura 16: Viabilidade celular com o extrato hidroetanólico de <i>B. trimera</i>	50
Figura 17: Viabilidade celular com o extrato aquoso de <i>B. trimera</i>	51
Figura 18: Viabilidade celular com o composto quercetina.....	52
Figura 19: Viabilidade celular com o composto rutina.....	53
Figura 20: Produção de ERO em células SK Hep-1 e a influência da via PKC/NADPH oxidase.....	54
Figura 21: Produção de ERO em células SK Hep-1 expostas aos extratos hidroetanólico e aquoso (10 µg mL ⁻¹) de <i>B. trimera</i> e aos compostos quercetina e rutina (10 µM).....	55
Figura 22: Produção de ERO em células SK Hep-1 expostas aos extratos hidroetanólico e aquoso (25 µg mL ⁻¹) de <i>B. trimera</i> e aos compostos quercetina e rutina (25 µM).....	57
Figura 23: Produção de ERO em células SK Hep-1 expostas aos extratos hidroetanólico e aquoso (50 µg mL ⁻¹) de <i>B. trimera</i> e aos compostos quercetina e rutina (50 µM).....	58
Figura 24: Gráficos representativos da análise de ERO.....	59
Figura 25: Representação qualitativa da geração de ERO em células SK Hep-1.....	60
Figura 26: Avaliação da expressão proteica da PKC em células SK Hep-1 incubadas com o extrato hidroetanólico de <i>Baccharis trimera</i> e quercetina.....	62

Figura 27: Avaliação da atividade de PKC em células SK Hep-1 incubadas com o extrato hidroetanólico de *B. trimera* e da quercetina.....63

Figura 28: Avaliação da expressão proteica de p47^{phox} em células SK Hep-1 incubadas com o extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* e quercetina.....64

Figura 29: Avaliação da expressão proteica da subunidade p47^{phox} fosforilada em células SK Hep-1 incubadas com o extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* e quercetina.....65

Figura 30: Proposta de mecanismos para o efeito antioxidante do extrato hidroetanólico de *B. trimera*.....80

Lista de Abreviaturas

- (Ins (1,4,5) P₃) Inositol-1,4,5-trifosfato
AMP1 Adenosina monofosfato 1
APAP Paracetamol
Aq Extrato Aquoso de *Baccharis trimera*
ATP adenosina trifosfato
BSA Albumina Sérica Bovina
Ca²⁺ Cálcio
carboxy-H₂DCFDA (5-ou-6)-carboxy-2',7' dichlorodihydro fluorescein diacetate
CLAE-EM Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CO₂ Dióxido de Carbono
DAG Diacilglicerol
DMEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO Dimetilsulfóxido
DPI Difenileneiodonium chloride
DPPH 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EDTA ácido etilenodiamino tetra-acético
EFS Extração em Fase sólida
ERO Espécies Reativas de Oxigênio
Fe⁺² Ferro
H₂O₂ Peróxido de hidrogênio
He Extrato Hidroetanólico de *Baccharis trimera*
HepG2 Hepatocarcinoma humano
HSV-1 Virus Herpes tipo 1
HT22 Células neuronais do hipocampo
HT29 Adenocarcinoma de útero
HTC Células hepáticas
HUVEC's Células endoteliais de cordão umbilical humano
iNOS Óxido Nítrico Sintase Induzida
Iono Iônica
LC-MS [M-H]- cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em modo negativo
m/z razão massa/carga
MeOH Metanol
Mo₈O₂₃ Molibideno
MTT Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
NAPH oxidase Enzima Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase
NCI-H889 Células de câncer de pulmão humano
NOX NADPH oxidase não fagocítica

ARAÚJO, G. R.

O₂ Oxigênio
O₂^{•-} anion superóxido
OMS Organização Mundial de Saúde
°OH Radical hidroxila
PBS Solução Salina Tamponada
PC12 Feocromocitoma da medula adrenal de rato
PDVF Difluoreto de polivinilideno
PI3K/Akt lipídio cinase/ serina-treonina cinase
PKC Proteína Cinase C
PLC Fosfolipase C
PMA Forbol 12-miristate 13-acetato
Que Quercetina
RAW264.7 Macrófago-monócito de camundongo leucêmico
RBL-2H3 Células de linhagem de mastócitos
Rut Rutina
SHG44 Células de glioma
SH-SY5Y Células neuroblastoma humano
SK Hep-1 Células de hepatocarcinoma humano
TBARS ácido tiobarbitúrico
TMB Tetrametilbenzidina
TR (min) tempo de retenção em minutos,
Trolox 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrameticromo-2-ácido carboxílico
U251 Células de glioma
UV (nm) ultra violeta em nanômetros
V79 Fibroblastos de Hamster
VSMCs Células musculares lisas vasculares
VSV Virus de estomatite vesicular
W₈O₂₃ Tungstênio

Resumo

Baccharis trimera, popularmente conhecida como "carqueja", é uma planta nativa sul-americana que possui uma alta concentração de compostos fenólicos e, portanto, alto potencial antioxidante. Apesar do potencial antioxidante de *B. trimera* descrito na literatura, não existem relatos sobre as vias de sinalização envolvidas neste processo. A enzima NADPH oxidase é uma fonte importante na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em condições patológicas, como no câncer, no diabetes e em processos inflamatórios. Esta enzima é ativada por meio de diferentes moduladores, entre os quais destaca-se a proteína cinase C (PKC), que fosforila a subunidade p47^{phox} da NADPH oxidase, como um contribuinte para a ativação do complexo enzimático e a consequente geração de ERO. Com base nestas informações, o objetivo do presente estudo foi avaliar a composição fitoquímica dos extratos aquoso e hidroetanólico de *Baccharis trimera* bem como a influência destes extratos na modulação de ERO e na via de sinalização da PKC e NADPH oxidase em células de hepatocarcinoma humano (SK Hep-1). No presente estudo, a quercetina e a rutina foram utilizadas como controles positivos, pois o efeito antioxidante destes flavonoides tem sido bem estabelecido, sendo estes compostos já identificados em extratos de *B. trimera*. No extrato hidroetanólico foram identificados cinco flavonoides enquanto no extrato aquoso foram identificados três flavonoides por CLAE-EM. A atividade antioxidante *in vitro* por DPPH também foi avaliada e os resultados demonstraram que o extrato hidroetanólico possui um maior potencial em sequestrar o radical DPPH bem como uma maior quantidade de compostos fenólicos em comparação ao extrato aquoso. Em relação à viabilidade celular, observamos que o extrato hidroetanólico de *B. trimera* manteve acima de 70% a porcentagem de células viáveis, entretanto em 24 e 48 horas de incubação houve uma redução da viabilidade (<70%) em concentrações iguais ou superiores a 25µgmL⁻¹. Em relação ao extrato aquoso observamos que a porcentagem de células viáveis foi mantida acima de 70% em 12, 24 e 48 de incubação. Em relação a produção de espécies reativas foi observado que os extratos de *B. trimera* (aquoso e hidroetanólico) diminuíram os níveis de ERO em células SK Hep-1 não estimuladas. Níveis reduzidos de ERO também foram observados nas células tratadas com quercetina e rutina. Os resultados mostraram que as células estimuladas com PMA / ionomicina (ativadores de PKC) tiveram um aumento significativo na produção de ERO, e esta

produção voltou aos níveis basais após tratamento com o DPI (inibidor da NADPH oxidase). O extrato hidroetanólico de *B. trimera* e quercetina, mas não o extrato aquoso e a rutina, modularam a produção de ERO através da inibição da expressão e atividade da proteína PKC e também através da redução da fosforilação da subunidade p47^{phox} da enzima NADPH oxidase. Em conjunto, estes resultados sugerem um mecanismo potencial de ação de *B. trimera* na inibição da produção de ERO através da via de sinalização da PKC/NADPH oxidase.

Abstract

Baccharis trimera, popularly known as "carqueja" is a native South American plant having high concentration of phenolic compounds and therefore high potential antioxidant. Although the antioxidant potential of *B. trimera* described in the literature there are no reports on the signaling pathways involved in this process. The NADPH oxidase is a major source in production of reactive oxygen species (ROS) in pathological conditions such as cancer, diabetes and inflammation. This enzyme is activated by different modulators, among which we highlight protein kinase C (PKC), which phosphorylates p47^{phox} subunit of NADPH oxidase, as a contributor to the activation of the enzyme complex and the subsequent generation of ROS. Based on this information, the aim of this study was to evaluate the phytochemical composition of aqueous and hydroethanolic extracts of *Baccharis trimera* and the influence of these extracts on ROS modulation induced by PKC signaling pathway in human hepatocellular carcinoma cells (SK-Hep 1). In the present study, quercetin and rutin were used as positive controls, since the antioxidant effect of these flavonoids have been well established, and these compounds have been identified in *B. trimera* extracts. In hydroethanolic extract five flavonoids were identified, and in the aqueous extract identified three flavonoids by CLAE-MS. The antioxidant activity in vitro was also evaluated by DPPH and the results demonstrated that the hydroethanolic extract has a higher potential scavenger the DPPH radical as well as a greater quantity of phenolic compounds as compared to aqueous extract. About cell viability, we observed that the hydroethanolic extract of *B. trimera* maintained above 70% of viable cells, however at 24 and 48 hours of incubation there was a reduction of viability (<70%) in concentrations equal to or greater than 25µgmL⁻¹. About aqueous extract we found that the percentage of viable cells was maintained above 70% at 12, 24 and 48 of incubation. It was observed that extracts of *B. trimera* (aqueous and hydroethanolic) decreased ROS levels in the SK-Hep 1 cells unstimulated. Reduced levels of ROS were also observed in cells treated with quercetin and rutin. The results showed that cells stimulated with PMA / ionomycin (PKC activators) had a significant increase in ROS production and this production returned to basal levels after treatment with DPI (NADPH oxidase inhibitor). The *B. trimera* hydroethanolic extract and quercetin, but not the aqueous extract and rutin, modulate the production of ROS by inhibiting the

ARAÚJO, G. R.

expression and activity of PKC protein and downregulation p47^{phox} phosphorylation. Together, these results suggest a potential mechanism of inhibition by *B. trimera* in ROS production by PKC/NADPH oxidase signaling pathway.

1. INTRODUÇÃO

Antioxidantes exógenos, sintéticos ou naturais, têm sido usados como métodos terapêuticos alternativos para o tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, pois estes compostos são capazes de combater os efeitos danosos das espécies reativas de oxigênio (ERO) (PAPAS, 1999; AUGUSTYNIAC *et al.*, 2010; TAGHVAEI e JAFARI, 2015). O estresse oxidativo tem sido implicado no aparecimento e progressão de muitas doenças crônicas, como câncer, diabetes, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (MC CORD, 2000; BOCCI e VALACCHI, 2015). Alterações no estado redox afetam as vias de sinalização responsáveis pela homeostase dos processos biológicos, podendo levar a danos nas funções celulares (TOBWALA *et al.*, 2014).

A maioria dos antioxidantes naturais apresenta em sua composição substâncias fenólicas, sendo estas responsáveis pela ação antioxidante, seja atuando como sequestradores das espécies reativas e/ou induzindo a expressão gênica de enzimas antioxidantes (RICE-EVANS, 2001; KRINSKY, 1992). Os compostos fenólicos podem ser encontrados em diferentes alimentos, como frutas, legumes e também em plantas medicinais. A dieta mediterrânea está associada com o risco reduzido de doenças cardiovasculares devido ao consumo adequado de azeite de oliva e vinho, que contém altas concentrações de compostos fenólicos (XIA *et al.*, 2010; CARLUCCIO *et al.*, 2003). Os estudos atuais sobre os efeitos biológicos dos flavonoides, uma classe dos compostos fenólicos, incidem sobre os seus mecanismos de absorção, metabolismo e biodisponibilidade. Assim, a fim de elucidar o papel fisiológico destes compostos mais estudos moleculares tornam-se necessários para avaliar a sua eficácia na prevenção e tratamento de certas doenças, juntamente com eventuais riscos decorrentes da sua utilização (KOSLOWSKA e SZOSTAK-WEGIEREK, 2014; MAJEWSKA-WIERZBICKA e CZECHOT, 2012; TARKO *et al.*, 2013).

Baccharis trimera, popularmente conhecida como "carqueja", é uma planta nativa da América do Sul, amplamente distribuída na Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai. Esta planta possui uma elevada concentração de compostos fenólicos e, portanto, apresenta potencial antioxidante (MIRABALLES *et al.*, 2013). Entre os

compostos fenólicos anteriormente descritos presentes em extratos de *B. trimera* estão: apigenina, isoquercetina, luteolina, nepetina, quercetina, 3-O-metilquercetina e rutina (SOICKE e LENG-PESCHLOW, 1987; PÁDUA *et al.*, 2014). Dentre estes flavonoides presentes nos extratos de *B. trimera*, dois são amplamente reconhecidos pela sua atividade antioxidante, a quercetina e a rutina (PÁDUA *et al.*, 2010; JIMENEZ *et al.*, 2015; KAMALAKKANNAN E STANELY, 2006; SONG *et al.*, 2014).

A quercetina exerce uma série de efeitos fisiológicos e moleculares em uma variedade de organismos, incluindo os seres humanos. Embora a quercetina possua atividade antioxidante, a sua capacidade de se ligar a proteínas e modular sua atividade sugere que este fitoquímico tem vários modos de ação (MILES *et al.*, 2014). Dentre alguns efeitos já conhecidos está a inibição da enzima nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase em células musculares lisas vasculares (VSMCs) (JIMENÉZ *et al.*, 2015). A rutina é conhecida por também exercer efeitos antioxidantes. Song *et al.* (2014) demonstraram que a rutina é capaz de aumentar a atividade de enzimas antioxidantes e prevenir a citotoxicidade em células expostas ao estresse oxidativo induzido por etanol. A rutina também é capaz de reduzir a produção de ERO em células de neuroblastoma humano – SH-SY5Y (WANG *et al.*, 2012).

Sabendo dos importantes efeitos da quercetina e rutina na ação antioxidante dos flavonoides, e ainda que estes estejam presentes nos extratos de *B. trimera*, torna-se relevante avaliar se os efeitos antioxidantes encontrados para o extrato de *B. trimera* poderiam ser relacionados a estes compostos.

Apesar do potencial antioxidante de *B. trimera* descrito na literatura (VIEIRA *et al.*, 2011; PÁDUA *et al.*, 2010, 2014), até o momento não existem relatos sobre as vias de sinalização envolvidas neste processo. A NADPH oxidase é a enzima responsável pela produção de ERO em vários tipos celulares (MEIER *et al.*, 1991; SCHRAMM *et al.*, 2012). A NADPH oxidase é uma enzima multicomponente compreendendo diferentes subunidades: as subunidades p22^{phox} e gp91^{phox} que estão localizadas na membrana, e as subunidades p40^{phox}, p47^{phox} e p67^{phox} que estão localizadas no citosol (LEUNG e CHAN, 2009). Os mecanismos envolvidos na ativação da NADPH oxidase são complexos e variados; no entanto, a inibição da translocação da subunidade citosólica para a membrana pode conduzir à inibição desta enzima. A atividade da

NADPH oxidase pode também ser reduzida através da inibição da fosforilação da subunidade p47^{phox} através de inibidores da proteína cinase C (PKC) (MARALDI, 2013). PKC são proteínas cinases pertencentes ao grupo das serinas / treoninas cinases e desempenham papéis importantes na sinalização celular, tais como a ativação da NADPH oxidase (GERALDES e KING, 2010).

É descrito que os compostos fenólicos exibem atividade antioxidante e podem inibir a NADPH oxidase e a via de sinalização da PKC (MARALDI, 2013). Assim, uma das metas do presente estudo foi investigar se a capacidade antioxidante do extrato de *B. trimera* poderia estar relacionada à inibição da expressão e/ou atividade enzimática da PKC e se esta via poderia modular a fosforilação da subunidade p47^{phox} da enzima NADPH oxidase. Sabendo-se da importância destes compostos como antioxidantes, torna-se cada vez mais necessário a elucidação dos mecanismos de sinalização subjacentes para que haja um melhor entendimento dos seus efeitos biológicos, considerando-se a integração entre as vias de sinalização (*cross-talk*) e a necessidade da elucidação de alvos terapêuticos mais específicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Plantas Medicinais e Fitoterápicos

As plantas medicinais são aquelas capazes de aliviar ou curar enfermidades e têm tradição de uso como remédio em uma população ou comunidade. Para usá-las é preciso conhecer a planta e saber onde colhê-la e como prepará-la. Quando a planta medicinal é industrializada para se obter um medicamento tem-se como resultado o fitoterápico. O processo de industrialização evita contaminações por micro-organismos, agrotóxicos e substâncias estranhas, além de padronizar a quantidade e a forma certa que deve ser usada, permitindo uma maior segurança de uso. Os medicamentos fitoterápicos industrializados no Brasil devem ser registrados na ANVISA/Ministério da Saúde antes de serem comercializados (ANVISA, 2010).

É reconhecida a importância dos produtos naturais, incluindo aqueles derivados de plantas no desenvolvimento de drogas terapêuticas (CALIXTO, 1997). As plantas medicinais são importantes para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de fármacos, não somente quando seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como matérias-primas para a síntese ou modelos para compostos farmacologicamente ativos (WHO, 2003).

Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida na maior parte do mundo, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece que grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para sua atenção primária, tendo em vista que 80% desta população utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% destes utilizam plantas ou preparações destas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Atualmente, os fitoterápicos são amplamente utilizados em diversos países. O mercado mundial de medicamentos fitoterápicos é de US\$ 43 bilhões por ano. Somente nos Estados Unidos da América, este mercado representa US\$ 5 bilhões por ano, sendo o setor de mais rápido crescimento no mercado farmacêutico norte-americano (ASCHWANDEN, 2001). Baseado em pesquisa por telefone nos Estados Unidos, estimou-se que em 1990 foram gastos US\$13,3 bilhões com tratamentos alternativos (EISENBERG *et al.*, 1993), e o valor subiu para US\$27 bilhões em 1997 (EISENBERG

et al., 1998). Outro mercado que tem crescido nos últimos anos é a suplementação através do tratamento/encapsulamento de produtos vegetais. Os dados mais informativos são do conselho Americano de Botânica, que monitora a venda anual destes suplementos desde 1999. Com exceção de 2002 e 2003, as vendas aumentaram a cada ano, de 4110 milhões de dólares em 1999 para 5600 milhões em 2012 (LINDSTROM *et al.*, 2013).

Embora o nosso país possua a maior diversidade vegetal do mundo, com cerca de 60.000 espécies vegetais superiores catalogadas (PRANCE, 1977), apenas 8% foram estudadas para pesquisas de compostos bioativos e 1100 (1.8%) espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais (GUERRA *et al.*, 2001).

A grande maioria dos estudos com fitoterápicos que demonstram benefícios para a saúde têm-se centrado no fato de que muitos desses produtos químicos ativos possuem atividade antioxidante. Entretanto alguns ensaios clínicos mostram um decepcionante resultado em relação a este efeito e com compostos que são extensivamente consumidos na dieta humana (WILLIAMS E HORD, 2005). Isto provavelmente se deve ao fato das doses consumidas serem baixas em relação àquelas que resultariam em uma diminuição da produção de espécies reativas. Assim, muitos estudos estão sendo realizados com o intuito de compreender os efeitos e mecanismos dos fitoterápicos nas doses que são as tipicamente consumidas (VIRGILI E MARINO, 2008; SPENCER, 2010; HOLST E WILLIAMSON, 2008). Além disso, alguns fitoterápicos em altas doses podem ser carcinogênicos e neurotóxicos, apesar da dose baixa ser benéfica.

Plantas medicinais, da mesma forma que os medicamentos sintéticos, possuem grupos de compostos farmacologicamente ativos que atuam no organismo. O emprego terapêutico dessas plantas exige o conhecimento desses grupos para a avaliação das potencialidades terapêuticas e para a formulação de uma estratégia adequada para seu uso (PERON *et al.*, 2008).

Segundo Seeff *et al.* (2015), plantas utilizadas com propósito medicinal englobam três categorias. Primeiro as ervas em seu estado bruto, como caules, sementes, flores e folhas, utilizadas ao longo dos séculos e selecionadas geralmente por curandeiros tradicionais. Os componentes químicos desta categoria ainda não são completamente conhecidos e nem caracterizados e dependem da localização geográfica,

clima e solo em que se encontram. Em segundo lugar estão as plantas cujos constituintes químicos foram utilizados para sintetizar potentes drogas convencionais eficazes no combate a doenças e que ajudaram a iniciar a indústria farmacêutica. Em meados dos anos 80, aproximadamente 80% dos fármacos eram derivados de plantas, hoje está próximo de 15%. A terceira categoria engloba o crescente mercado de plantas, que cria e comercializa produtos com nome comercial. Este tipo de comércio tem crescido cada vez mais em países ocidentais, na esperança de melhorar o bem-estar, assim como para o tratamento de doenças. Estes produtos podem conter vários complementos, de 2 a mais de uma dúzia, e podem incluir componentes como as vitaminas. Os constituintes normalmente são selecionados por seus benefícios individuais, sem a evidência de que a combinação seja complementar. Da mesma forma que ocorre com as plantas medicinais, poucos foram avaliados cientificamente para testar o verdadeiro benefício.

Compostos fenólicos naturais é o maior grupo de fitoquímicos e, tem atraído cada vez mais a atenção como potenciais agentes para a prevenção e tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (LI *et al.*, 2014).

O Brasil é o país de maior biodiversidade do planeta que associada a uma rica diversidade étnica e cultural tem o potencial necessário para desenvolvimento de pesquisas com resultados em tecnologias e terapêuticas apropriadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Dentre as plantas medicinais culturalmente conhecidas e utilizadas em diversas ocasiões estão as plantas do gênero *Baccharis*.

2.2. O Gênero *Baccharis*

Baccharis é o maior gênero da família Asteracea, com mais de 500 espécies distribuídas nos continentes Norte e Sul Americanos. As espécies deste gênero estão distribuídas principalmente em regiões de clima ameno e tropical, como Brasil, Argentina, Colômbia, Chile e México. Desde 2002 houve um aumento em informações sobre as estruturas e atividades farmacológicas dos novos compostos isolados e identificados a partir de espécies de *Baccharis* (ABAD e BERMEJO, 2007). No Brasil

estão descritas 120 espécies de *Baccharis*, sendo a maior parte delas localizadas na região sudeste do país (VERDI *et al.*, 2005).

O estudo de espécies do gênero *Baccharis* tem mostrado grandes avanços devido ao seu intenso uso na medicina caseira na América Latina. Sua composição fitoquímica destaca a ocorrência de flavonoides, diterpenos e triterpenos, sendo nitidamente observado o maior acúmulo de flavonas, flavonóis e de diterpenos labdanos e clerodanos (JAKUPOVIC *et al.*, 1990; VERDI *et al.*, 2005). Entre as espécies mais pesquisadas quanto à composição química e/ou atividade biológica, encontram-se *B. megapotamica*, *B. incarum*, *B. trimera*, *B. trinervis*, *B. salicifolia*, *B. crispa*, *B. coridifolia*, *B. dracunculifolia*, *B. grisebachii* e *B. tricuneata* (VERDI *et al.*, 2005) (Figura 1). Guimarães *et al.* (2012) observaram que o extrato de *B. dracunculifolia* exerceu atividade antioxidante através da eliminação direta dos radicais livres e efeito quelante sobre o ferro, protegendo as membranas celulares da oxidação e perda de sua função. Mais estudos, como o de Coelho *et al.* (2004) evidenciaram um efeito terapêutico antiartrítico de *Baccharis genistelloides* sem toxicidade renal e hepática, e encontraram ainda um efeito hipoglicemiante e hipotriglicéridêmico em animais saudáveis. O trabalho de Lima *et al.* (2004) relatou que o chá é referido na literatura como uma das melhores fontes de compostos fenólicos, uma vez que possui uma grande quantidade de flavonoides. A partir das folhas da *B. dracunculifolia* e *B. genistelloides* do sudeste do Brasil são extraídos, por arraste a vapor, o óleo de vassoura e o óleo de carqueja, de alto valor para a indústria de fragrância (MOTL e TRKA 1983).

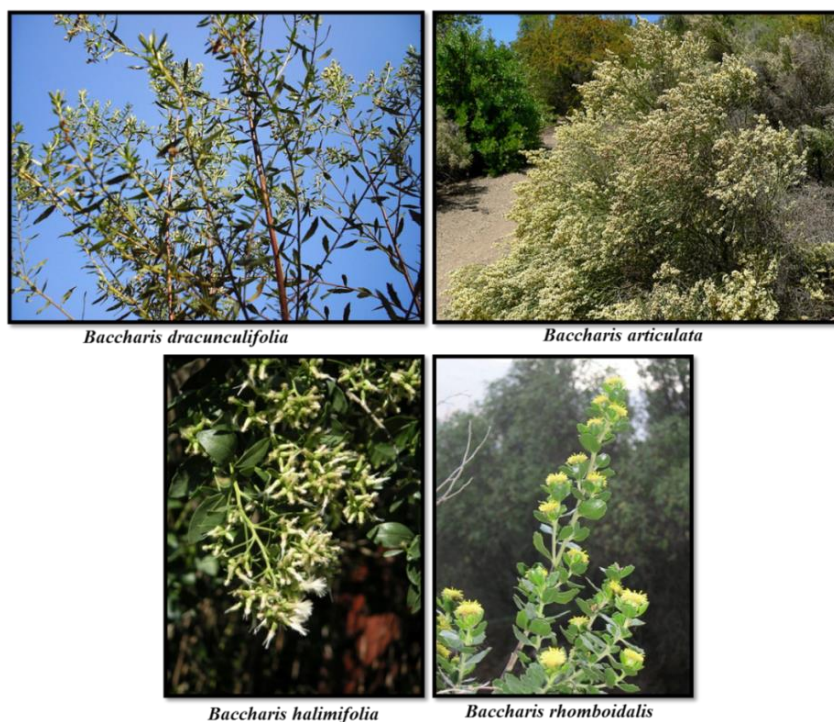


Figura 1: Espécies de *Baccharis*. Fonte: <http://en.wikipedia.org/wiki/Baccharis>

Entre as espécies mais pesquisadas quanto à composição química e atividade biológica, encontra-se a *Baccharis trimera*. Correa em 1984 fez o primeiro registro desta planta como uso medicinal e normalmente sendo consumida na forma de chá. Muitas das espécies da família Asteracea são utilizadas na medicina popular para o tratamento de males do estômago, desordens hepáticas e renais, atividades antivirais, anti-inflamatória e antimicrobiana e na produção de fragrâncias comerciais (óleo de carqueja) (SOICKE e LENG-PESCHLOW, 1987). Atualmente, na medicina popular a carqueja é usada como diurética, tônica, digestiva, protetora e estimulante do fígado, antianêmica, antireumática, depurativa, para o controle da obesidade, diabetes, hepatite e gastroenterites (CASTRO e FERREIRA, 2000).

2.2.1. *Baccharis trimera*: uma revisão sistemática

A *Baccharis trimera* (Figura 2) tem tido espaço em diversos estudos, incluindo ensaios biológicos, uma vez que esta planta é amplamente utilizada como alternativa no tratamento de doenças na cultura popular. Entretanto, quando realizamos uma busca no

site *PubMed* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) com o termo *Baccharis trimera* apenas 36 artigos aparecem indexados com este termo.



Figura 2: *Baccharis trimera*. Fonte:

http://es.wikipedia.org/wiki/Baccharis_trimera#mediaviewer/File:Baccharis_trimera.jpg

As pesquisas com esta espécie começaram no ano 1977, Herz e colaboradores identificaram 3 novos diterpenoides extraídos de *Baccharis trimera* em um extrato de acetato de etila. Outro artigo com *Baccharis trimera* só foi publicado 10 anos depois por Soicke e Leng-Peshlow em 1987, o qual identificou flavonoides presentes nessa espécie: apigenina, 7,4'-di-O-metil-apigenina, cirsimaritina, eupatorina, genkvanina, hispidulina, isoquercetina, luteolina, nepetina, quercetina, 3-O-metilquercetina, 5,6-dihidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavona e rutina. Soicke e Leng-Peshlow também avaliaram a propriedade hepatoprotetora desta planta.

Em 1996, Gené e colaboradores avaliaram o efeito anti-inflamatório e analgésico de *Baccharis trimera* e demonstraram que o pré-tratamento intraperitoneal com a fração butanólica do extrato aquoso inibiu a inflamação induzida por dextrano em até 71% na dose de 100mg kg⁻¹. A fração butanólica também foi capaz de reduzir em 95.1% a contração abdominal na dose de 100mg kg⁻¹. Sendo assim, este estudo sugeriu que a *B. trimera* apresenta um potencial anti-inflamatório e analgésico.

A partir deste estudo, o intervalo de publicação com a *Baccharis trimera* diminuiu, mostrando que o interesse dos pesquisadores aumentou em relação a esta espécie.

Existem ainda outros efeitos biológicos conhecidos na literatura, como por exemplo, o efeito antiviral, no qual os autores avaliaram os extratos aquosos e etanólicos de sete espécies de plantas usadas como medicamento na Bolívia para testar a atividade antiviral contra o herpes tipo I (HSV-1), vírus de estomatite vesicular (VSV) e polivírus do tipo I. Os extratos aquosos da maioria das espécies investigadas mostraram atividade antiviral, sendo que *Baccharis trimera* foi ativa contra dois vírus diferentes (HSV-1 e VSV) (ABAD *et al.*, 1999).

Hnatyszyn *et al.* (2003) demonstraram que os extratos de diclorometano e metanólico de *B. trimera* apresentaram efeito relaxante em células musculares lisas. Januário *et al.* (2004) isolaram um diterpenoide do extrato clorofórmico/metanólico de *Baccharis trimera* e observaram que este composto inibiu a hemorragia, a atividade proteolítica, e o edema induzido por veneno de cobra e ainda suas metaloproteases, indicando que esse diterpeno isolado de *Baccharis* possui um efeito antiofídico potente.

Em 2005, Oliveira *et al.*, avaliaram o efeito hipoglicemiante dos extratos brutos etanólico e aquoso e também da fração butanólica de *Baccharis trimera*. Foi observado que apenas o extrato aquoso da planta (2000 mg kg⁻¹) foi capaz de reduzir a glicemia em animais diabéticos tratados duas vezes ao dia por 7 dias com este extrato. Simões-Pires *et al.* (2005) analisaram a atividade antioxidante *in vitro*, por DPPH, do extrato aquoso de *Baccharis trimera* e observaram que este extrato possuía capacidade sequestradora de radicais.

Em 2006 dois artigos foram publicados sobre a *Baccharis trimera* e que estão na base de dados do PubMed. Betoni *et al.* (2006), avaliaram o efeito sinérgico de extratos de diversas plantas, dentre elas a *Baccharis trimera*, com diferentes antimicrobianos contra o *Staphylococcus aureus*, e todos os extratos analisados apresentaram efeito antimicrobiano quando utilizados juntos. Dickel *et al.* (2006), realizaram um estudo em que foi feito o levantamento das plantas medicinais utilizadas com a finalidade de perda de peso pela população de Porto Alegre e a associação com as atividades biológicas

destas plantas. Em relação à *Baccharis trimera*, houve relatos do uso desta planta para redução do peso.

Em 2007 Mendes *et al.*, avaliaram a capacidade de *Baccharis trimera* na adaptação de animais expostos a diferentes estresses. *Baccharis trimera* administrada por via intravenosa e oral não foi capaz de alterar a capacidade locomotora de animais expostos a exercício forçado. Em relação à proteção contra ulceração, não foi encontrado nenhum efeito protetor da *Baccharis trimera* nos animais avaliados, entretanto foi observado um efeito antioxidante moderado do extrato hidroetanólico de *B. trimera*.

Grance *et al.* (2008) avaliaram o efeito do extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* em ratas grávidas. Os resultados mostraram que este extrato administrado na dose de 8.4mg kg⁻¹ foi tóxico para as células dos rins e fígado das ratas, entretanto quando o tratamento foi interrompido a toxicidade foi revertida. Peron *et al.* (2008) realizou tratamentos com duas concentrações da infusão de *Baccharis trimera*, não sendo observado ação citotóxica nas células de medula óssea de ratos Wistar após 24 horas de tratamento.

Paul *et al.* (2009) encontraram um efeito anti-inflamatório do extrato aquoso de *Baccharis trimera*. Rodrigues *et al.* (2009a) e Paul *et al.* (2009) atribuíram à carqueja efeitos antioxidante e anti-inflamatório, respectivamente. Estudos prévios do nosso laboratório demonstraram atividade antioxidante do extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* através da redução da produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos de ratos intoxicados com paracetamol (APAP) (PÁDUA *et al.*, 2010).

Biondo *et al.* (2011) observaram um efeito regulatório da secreção gástrica exercido por um extrato aquoso de *Baccharis trimera*. Os resultados indicaram que os componentes do extrato que inibem a secreção do ácido gástrico podem agir principalmente na via colinérgica. Nogueira *et al.* (2011) observaram efeito anti-inflamatório do extrato aquoso de *Baccharis trimera* em um modelo de inflamação induzido por carragenina em camundongos. Neste mesmo estudo, diferentes linhagens celulares foram expostas ao extrato aquoso e às frações aquosa e etanólica deste extrato e foi observado que células epiteliais renais são mais sensíveis e apresentaram uma diminuição significativa na proliferação celular. O extrato foi ainda capaz de reduzir a

atividade da enzima de detoxificação glutationa-S-transferase. Vieira *et al.* (2011) também encontraram atividade antioxidante dos extratos aquoso e etanólico de diferentes espécies de *Baccharis*, dentre elas *Baccharis trimera*, observando uma capacidade desses extratos em sequestrar o radical DPPH, reduzir a peroxidação lipídica e ainda a oxidação de proteínas.

Trojan-Rodrigues *et al.* (2012) listaram estudos que indicavam que diversas plantas possuíam efeito antidiabético, dentre elas a *Baccharis trimera*.

Em 2012, Oliveira *et al.*, avaliaram o conteúdo fenólico, atividade anti-inflamatória e antioxidante do extrato de *Baccharis trimera* e observaram que no extrato etanólico foi encontrado uma grande quantidade de compostos fenólicos e atividade anti-inflamatória. De Oliveira *et al.* (2012) observaram que o óleo essencial de *Baccharis trimera* possui atividade contra *Shistosoma mansoni*, causando a destruição do tegumento nos ovos das fêmeas.

Lázaro *et al.* (2013), avaliaram o efeito de *Baccharis trimera* sobre carrapatos que atacam bovinos - *Rhipicephalus microplus* – e observaram que o extrato aquoso de *Baccharis trimera* impede a eclosão dos ovos dos carrapatos, o que poderia ser um potente agente farmacológico contra esses artrópodes. No estudo de Menezes *et al.* (2013) foi detectado genotoxicidade do extrato aquoso de *Baccharis trimera* coletada em regiões expostas a extração e queima de carvão. Miraballes *et al.*, 2013 realizaram um estudo para avaliar a eficiência da destilação a vapor do extrato aquoso de *Baccharis trimera*, e foi observado que tal técnica foi eficaz na redução do odor e sabor característicos do extrato sem alterar o conteúdo de polifenóis e atividade antioxidante, sugerindo assim uma metodologia eficaz e de baixo custo promissora para produção de extratos antioxidantes para produtos alimentares.

O objetivo do estudo de Oliveira *et al.*, 2013 foi avaliar o efeito antiproliferativo dos compostos fenólicos e terpenoides de *Baccharis trimera* em células cancerosas cervicais. Os compostos fenólicos da planta foram capazes de suprimir a formação de colônias, inibir a proliferação e a motilidade celular, enquanto os terpenoides inibiram a proliferação, mas aumentaram a formação das colônias e não reduziram a motilidade celular. Os dois compostos fenólicos e terpenoides foram capazes de aumentar os níveis da enzima lactato desidrogenase, indicando perda da integridade membranar. Ainda, os

compostos fenólicos promoveram a morte celular, e os terpenoides induziram apoptose, indicando que esses compostos poderiam apresentar atividade anticâncer.

Nosso grupo publicou um segundo estudo em 2013, em que o extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* foi capaz de melhorar o sistema de defesa antioxidante, inibindo a expressão gênica de subunidades da NADPH oxidase (gp91^{phox} e p47^{phox}) e da enzima Óxido Nítrico Sintase Induzida (iNOS) em um modelo de inflamação induzido por APAP, o que poderia justificar a redução na produção de ERO e óxido nítrico nos neutrófilos desses animais (PÁDUA *et al.*, 2013). Oliveira *et al.* (2014) investigaram pela primeira vez a eficácia do extrato bruto de diclorometano e a fração aquosa de *Baccharis trimera* em larvas juvenis e adultas de *Shistosoma mansoni*, e observaram que *Baccharis trimera* causou a mortalidade do *Shistosoma* através de alterações tegumentares e morfológicas, bem como a oviposição quando as fêmeas eram expostas aos ensaios *in vitro*.

Garcia *et al.*, também em 2014 avaliaram o efeito de dois diterpenos do extrato aquoso de *Baccharis trimera* sobre o bloqueio de cálcio na veia portal de ratos. Foi observado que os dois diterpenos estudados reduziram as contrações induzidas por cloreto de cálcio na veia portal dos animais.

Vieira *et al.* (2014) avaliaram fungos bioativos presentes em *Baccharis trimera* e observaram que há uma grande quantidade de fungos nessa planta e que a sua atividade antimicrobiana pode estar relacionada com os fungos presentes nela, pois são capazes de produzir metabólitos bioativos antimicrobianos.

Em nosso laboratório, Pádua *et al.* (2014) confirmaram o efeito hepatoprotetor de *Baccharis trimera* em um modelo de inflamação induzido por APAP. Foi observado um aumento na atividade das enzimas antioxidantes e uma diminuição nos biomarcadores de dano oxidativo, como TBARS e proteína carbonilada, no fígado desses animais.

O trabalho de Menezes *et al.* (2015), investigou o perfil fitoquímico, a capacidade antioxidante, genotoxicidade e o potencial mutagênico do extrato aquoso de *Baccharis trimera* retirada de duas regiões distintas de mineração de carvão. Foi observado genotoxicidade e efeito mutagênico do extrato em células V79 (fibroblastos de hamsters) quando expostas a altas concentrações dos extratos. Nenhuma diferença foi

observada em relação aos compostos fenólicos e flavonoides presentes nos extratos, assim como nenhuma diferença no perfil antioxidante entre os dois extratos avaliados.

Paiva *et al.* (2015) utilizaram *Caenorhabditis elegans* como um modelo para examinar os efeitos antioxidantes do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* na resistência ao estresse e longevidade bem como o efeito deste extrato em um modelo para a doença de *Alzheimer*. Os resultados deste grupo demonstraram que o tratamento com o extrato hidroalcoólico melhorou a resistência ao estresse oxidativo, aumentando a taxa de sobrevivência e reduzindo os níveis de ERO, e que este efeito independe de vias de sinalização, como p38, JNK e ERK. O extrato de carqueja ainda exibiu efeito protetor contra a paralisia induzido pelo peptídeo β -amilóide em *C. elegans*.

Minteguiaga *et al.* (2015) caracterizaram os extratos voláteis de quatro espécies de *Baccharis*, dentre elas *Baccharis trimera* e observaram picos de 180 componentes. E o último estudo publicado sobre *Baccharis trimera* indexado no *PubMed*, até o momento (28 de outubro de 2015), foi o de Boechat *et al.* (2015), que apresentou como objetivo determinar as concentrações de metais pesados na biomassa de plantas que crescem em local contaminado com diversos metais, para assim identificar acumuladores de metal e fornecer informações para utilização de plantas nativas para remediar os locais contaminados por esses metais. *Baccharis trimera* foi efetiva em acumular os metais cobre e zinco.

Como observado em alguns estudos citados acima, os constituintes mais conhecidos do gênero *Baccharis* apresentam propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias, sendo que nos últimos anos têm sido desenvolvidos estudos que avaliam estes efeitos tanto em cultura de células quanto em modelos animais.

De modo geral, os compostos que mais se destacam são os flavonoides, clerodanos e labdanos, embora também se tenha observado com certa frequência a presença de outros compostos, como por exemplo, os tricotecenos. Os flavonoides relatados até agora na espécie *Baccharis trimera* são apigenina, 7,4'-di-O-metil-apigenina, cirsimaritina, eupatorina, genkwanina, hispidulina, isoquercetina, luteolina, nepetina, quercetina, 3-O-metilquercetina, 5,6 -di-hidroxi-7, 3 ', 4'-trimethoxyflavona e rutina (SOICKE E LENG-PESCHLOW, 1987; GENÉ *et al.*, 1996).

Sendo assim, analisando os resultados obtidos por estudos científicos onde são identificados vários flavonoides nos extratos de *Baccharis trimera* e, sabendo-se que estes compostos possuem diferentes atividades biológicas em organismos vivos, torna-se relevante avaliar a influência desses extratos em vias de sinalização, uma vez que estas podem ser potentes alvos terapêuticos em doenças associadas ao estresse oxidativo.

2.3. Flavonoides: aspecto geral

Os flavonoides são compostos fenólicos que participam de importantes funções no crescimento, desenvolvimento e na defesa dos vegetais contra o ataque de patógenos (DIXON E HARISSON, 1990) e estão presentes na maioria das plantas (FELDMANN, 2001). Os compostos fenólicos podem ser consumidos através de chás, frutas, verduras, legumes e vinho. Sua biodisponibilidade ainda está em discussão, e depende de fatores relacionados com o processamento dos alimentos, do perfil do indivíduo que está consumindo (idade, sexo, composição da flora intestinal), bem como das interações entre estes polifenóis e outras moléculas (proteínas salivares e enzimas digestivas) (LEWANDOWSKA *et al.*, 2013; HALBWIRTH, 2010; CHEYNIER, 2005; D'ARCHIVIO *et al.*, 2010). No fígado, os compostos fenólicos são submetidos a reações catalisadas por enzimas de fase I, como por exemplo, reações de oxidação, redução, hidrólise e hidratação, e podem ser parcialmente hidroxilados pelo citocromo P450 (HODEK *et al.*, 2002).

Lopez-Revuelta *et al.* (2006) demonstraram que flavonoides possuem uma atividade antioxidante e uma função protetora no tratamento de doenças degenerativas mediadas pelo estresse oxidativo, entretanto são pouco utilizados terapêuticamente na medicina ocidental (MIDDLETON *et al.*, 2000). Os compostos fenólicos constituem um amplo grupo de substâncias e mais de 8000 já foram identificados (PIETTA, 2000). Sua estrutura consiste em um núcleo fundamental de 15 átomos de carbono arranjados em 3 anéis, sendo dois anéis fenólicos substituídos (A e B) e um pirano acoplado a um dos anéis fenólicos (C) (Figura 3). Esta estrutura química os permite doar hidrogênio ou elétrons aos radicais livres, atribuindo-lhes a característica antioxidante.

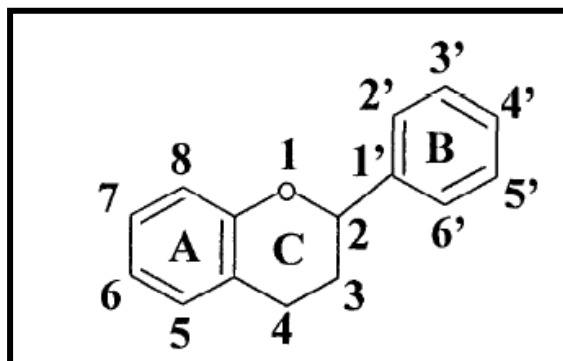


Figura 3: Estrutura geral dos flavonoides. Fonte: Cook & Samman, 1996.

As atividades bioquímicas destes compostos fenólicos dependem principalmente da sua estrutura química, e é a partir dela que os flavonoides também são classificados. Podem ser subdivididos em: flavonas, flavonóis, chauconas, auronas, flavanonas, flavanas, antocianidinas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, isoflavonas e isoflavonoides (BRAVO, 1998).

Flavonas e flavonóis são de origem biossintética muito próximas. Os flavonóis são flavonas substituídas na posição C3 por hidroxila. Os flavonóis mais encontrados em vegetais são camferol, quercetina e miricetina, observados, por exemplo, no chá preto (*Camelia sinensis*) (FENNEMA, 1992). Pietta (2000) demonstrou que a presença de uma hidroxila em C3 no anel heterocíclico e um catecol no anel B favorece a atividade antioxidante. O efeito de eliminar as espécies reativas exercido pelos flavonoides se deve à capacidade destes compostos em neutralizar as espécies reativas (ânion superóxido, radicais hidroxila e peroxila) ou quelar íons metálicos (cobre e ferro). Os flavonoides apresentam grupos hidroxilas em sua estrutura, portanto eles podem inibir as reações de oxidação das espécies reativas de oxigênio, por doarem átomos de hidrogênio às espécies, estabilizando-as. Ao quelar íons metálicos ocorre a inibição da Reação de Fenton, uma forma endógena de produzir espécies reativas (ENIO, 2003; HARBORNE & WILLIANS, 2000; TIAN & MCLAUGHLIN, 2000). Em adição a estes efeitos sobre as espécies reativas, evidências mostram que flavonoides regulam a atividade de enzimas antioxidantes, modulam receptores nucleares, atuam sobre a expressão gênica e vias de sinalização celular (SEERAM & HEBER, 2006).

As propriedades antioxidantes de compostos vegetais dependem não só do teor de polifenóis, mas também do seu tipo. Por exemplo, quercetina e α -tocoferol demonstraram maiores propriedades antioxidantes *in vitro*, comparados a apigenina e canferol, dentre outros (CZECZOT e PODSIAD, 2005; DUTHIE e MORRICE, 2012).

Os flavonoides tem o potencial de ligarem-se ao local de ligação do ATP em um grande número de proteínas, incluindo ATPases mitocondriais e plasmáticas, como revisto por Willians *et al.* (2004). Estudos prospectivos têm demonstrado que há uma relação inversa entre o consumo de flavonoides na dieta e o risco de doenças coronarianas e infarto (HERTOG *et al.*, 1993a; WANG *et al.*, 2014)

Os flavonoides apresentam múltiplos efeitos de defesa para o corpo humano. Entretanto, os mecanismos subjacentes ainda não são totalmente compreendidos. De acordo com o atual conhecimento, uma dieta que inclui flavonoides deve ser incentivada (KOZLOWSKA e SZOSTAK-WEGIEREK, 2014). No entanto, deve ser enfatizado que a toxicidade de flavonoides consumidos em grandes doses permanece desconhecida. Por esta razão, a utilização dos suplementos dietéticos deve ser considerada com cautela.

Dentre os flavonoides mais estudados atualmente e com efeitos antioxidantes reconhecidos estão a quercetina e a rutina, que são abundantemente consumidas em alimentos e que também já foram descritas por estarem presentes em extratos de *Baccharis trimera*.

2.3.1. Quercetina

O consumo médio diário na dieta ocidental de flavonóis mais flavonas é estimada em 23 mg, com a quercetina contribuindo com 60 a 75% do total (HERTOG *et al.*, 1993b; SAMPSON *et al.*, 2002).

A quercetina é a principal representante da subclasse flavonol da família dos flavonoides, sendo a mais abundante (CERMAK, *et al.* 1998). Este composto é amplamente encontrado em frutos, folhas de vegetais, chás, vinho tinto, dentre outros. Na dieta, a quercetina é frequentemente encontrada como β -glicosídeo, ou seja, com um açúcar ligado na posição 3 do anel C (FORMICA e REGELSON, 1995; YAMAMOTO *et al.*, 1999) (Figura 4). No entanto, a quercetina pode ser encontrada sem a molécula de

açúcar ligada, e neste caso é referida como aglicona. A natureza da glicosilação é conhecida por influenciar a eficiência de sua absorção (CRESPY *et al.*, 1999). Sabe-se ainda que os compostos fenólicos, como a quercetina, podem interagir com proteínas salivares ricas em prolina na cavidade oral, entretanto as formações destes agregados pouco influenciam sua disponibilidade (CAI e BENNICK, 2006).

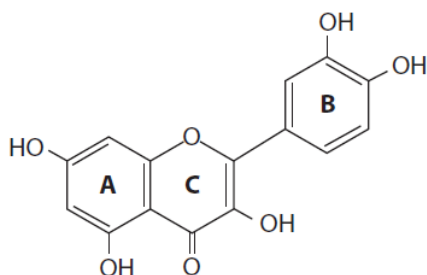


Figura 4: Quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi flavona). Fonte: Pecivová *et al.*, 2012.

Sob o ponto de vista farmacológico, é atribuída uma série de ações biológicas à quercetina, tais como anti-inflamatória (GUARDIA *et al.*, 2001; HARBORNE e WILLIAMS, 2000; MORIKAWA *et al.*, 2003; ROTELLI *et al.*, 2003), antimicrobiana para alguns tipos de bactérias gram positivas e gram negativas (LIMA *et al.*, 1990), antiviral (OHNISHI *et al.*, 1993; SIMÕES, 1992), antioxidante (AQUINO *et al.*, 2002; PÁDUA *et al.*, 2010), entre outras. Recentemente, Xu *et al.* (2014) demonstraram que a quercetina tem efeito protetor nos danos causados pela endometriose em ratas grávidas. As ações em questão são produzidas pela substância isolada, mas também quando presente em extratos vegetais. Neste caso, dependendo dos parâmetros de transformação ou do produto obtido, há variação na intensidade do efeito (DE SOUZA, 2002).

A quercetina possui efeito antioxidante, propriedade esta bastante difundida na literatura (KESSLER *et al.*, 2003; SAK, 2014; JIMENEZ *et al.*, 2015; ALMAGHRABI, 2015).

Colaborando com os resultados já descritos, Boadi, Iyere e Adunyah (2003) compararam o efeito antiperoxidativo da quercetina e o flavonoide genisteína em um estudo *in vitro*. Os autores concluíram que a quercetina foi mais efetiva que a genisteína ao diminuir os níveis de peróxido, atribuindo a esse resultado, modificações estruturais em ambos os flavonoides.

Entretanto existem outras vertentes para o estudo da quercetina, em que é demonstrado que a mesma interfere no metabolismo de ERO e leva a apoptose celular. Em certas situações, a quercetina é capaz de gerar quantidade de ERO suficiente para causar apoptose através das vias de sinalização como ERO/AMPK α 1/p38 e a cinase reguladora de sinal de apoptose e AMP α 1/Ciclo oxigenase 2 (LEE *et al.*, 2010). Consequentemente, a geração de ERO ativa AMPK α 1, que ativa p38, levando ao recrutamento de caspases (HATTORI *et al.*, 2009; MATSUZAWA E ICHIJO, 2008). A quercetina também é capaz de influenciar a via PI3K/Akt induzindo a apoptose em células HeLa, podendo ser utilizada como potente agente antitumoral (XIANG *et al.*, 2014).

Outros estudos sugerem que a quercetina pode atuar em outras vias de sinalização subjacentes, como a via da PKC, observado por Pignatelli *et al.* (2006), que também demonstraram a ação da quercetina sobre a enzima NADPH oxidase. Jimenez *et al.* (2015) também demonstraram o efeito da quercetina sobre o complexo enzimático da NADPH oxidase, reduzindo sua ativação e, consequentemente diminuindo a produção de ERO.

Estudos têm demonstrado a influência da quercetina na modulação do estresse oxidativo através da via de sinalização da PKC e NADPH oxidase e, por isto, em nosso estudo, a quercetina foi utilizada como um padrão de referência (controle positivo) para os efeitos que seriam encontrados para os extratos hidroetanólico e aquoso de *B. trimera* nesta via (PIGNATELLI *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2013; JIMENEZ *et al.*, 2015).

2.3.2. Rutina

A rutina (Figura 5) está abundantemente presente em muitos alimentos, como cebola, maçã, chás e vinho tinto (HERTOG *et al.*, 1993b). É descrito que a rutina exhibe várias propriedades farmacológicas, como antitumoral, antibacteriano, antiúlcera, antidiarréico, antimutagênico, imunomodulador e atividades hepatoprotetoras. (JANBAZ *et al.*, 2003). Há descrito ainda que a rutina pode exercer efeitos em doenças crônicas como diabetes, câncer, hipertensão e hipercolesterolemia (SHARMA *et al.*, 2013). Kamalakkanan *et al.* (2006) demonstraram uma diminuição da glicemia e um aumento na insulinemia em animais diabéticos tratados com a rutina (100mg kg⁻¹), além

deste efeito antidiabético, este mesmo estudo demonstrou os efeitos na diminuição da peroxidação lipídica, mostrando o possível potencial antioxidante desta substância.

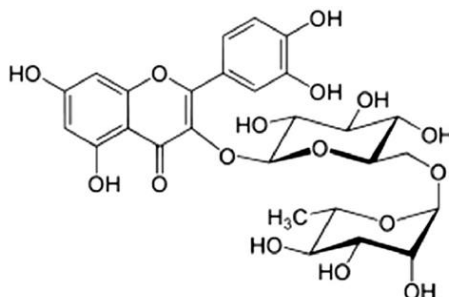


Figura 5: Rutina (5,7,3',4'-OH, 3-rutinose). Fonte: Khan *et al.*, 2012.

Estudos descrevem que a rutina é capaz de reduzir a atividade da enzima xantina oxidase (COTELLE, 2001) e estimular enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase e catalase no fígado, rins e cérebro (KAMALAKKANNAN e STANELY, 2006). Recentemente, foi demonstrado que a rutina suprimiu a indução da óxido nítrico sintase (iNOS) em rins de ratos com isquemia (KORKMAZ E KOLANKAYA, 2013), também em hepatócitos intoxicados com CCl₄ (DOMITROVIC, 2012). O pré-tratamento com rutina foi capaz de preservar a função de ATPases (Na⁺/K⁺, Mg²⁺ e Ca²⁺-ATPases) no miocárdio de ratos infartados (STANELY MAINZEN e KARTHICK, 2007).

Song *et al.* (2014) demonstraram que a rutina foi capaz de aumentar a atividade das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase em células HT22 (células neuronais do hipocampo). Este mesmo estudo evidenciou que a rutina, com posterior tratamento com etanol foi capaz de aumentar a expressão de fatores neurotróficos, que podem ser considerados como alvos para o tratamento de doenças neurodegenerativas. Entretanto o tratamento apenas com a rutina, sem a indução por etanol, não alterou os níveis desses fatores neurotróficos.

Estudos têm sido realizados a fim de investigar os efeitos antioxidantes da rutina. Nakamura *et al.* (2000) observaram uma propriedade antioxidante da rutina em ratos tratados com este flavonoide em uma alta concentração (1g kg⁻¹) durante 22 dias. Pu *et al.* (2007) demonstraram que a rutina atua como um eficiente inibidor da formação de radicais. Viskupicova *et al.* (2015) demonstraram um efeito protetor da rutina nos

danos causados por peroxinitrito nas ATPases-Ca²⁺ presentes no retículo endoplasmático.

A rutina tem sido amplamente estudada devido aos efeitos que a ela são atribuídos, principalmente no que diz respeito aos seus efeitos antioxidantes. Sendo assim, a rutina foi escolhida como um outro padrão de referência antioxidante.

2.4. Sinalização redox

Alterações na sinalização redox estão associadas ao processo de envelhecimento e a morte celular, podendo afetar a maioria dos sistemas biológicos (KRAUSE, 2007), sendo que as espécies reativas desempenham importante papel em muitas doenças como, a doença de Alzheimer (QIN *et al.*, 2006), doença de Parkinson (ZHANG *et al.*, 2000) e praticamente todas as doenças cardiovasculares (DHALLA *et al.*, 2000).

Espécies reativas são fundamentais para a sinalização de moléculas, reações de biossíntese, defesas químicas e reações de desintoxicação (JONES, 2006). Quando produzidas em condições fisiológicas desempenham importantes papéis em funções regulatórias e em processos celulares, como na defesa contra agentes infecciosos.

Embora os oxidantes possam ter como fonte vários compartimentos citoplasmáticos, as mitocôndrias figuram como a principal fonte intracelular de ERO na maioria dos tecidos (TURRENS, 2003), devido ao vazamento de elétrons da cadeia respiratória (WEI E LEE, 2002), caracterizando, de certa forma, uma “geração acidental” (HALLIWELL & CROSS, 1994). Sabe-se que o oxigênio é um aceptor final de elétrons ideal, pois possui uma alta afinidade por elétrons. A transferência de quatro elétrons leva a formação de produtos seguros (duas moléculas de água), mas a redução parcial gera compostos perigosos. Em particular, a transferência de um único elétron ao O₂ forma o anion superóxido (O₂^{•-}), enquanto a transferência de dois elétrons origina o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (BUONOCORE, *et al.*, 2010).

Três intermediários são formados na redução parcial do oxigênio: anion superóxido (O₂^{•-}), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radical hidroxila (°OH). Os radicais de oxigênio representam a classe mais importante de radicais gerados no organismo.

Além das mitocôndrias, quatro importantes fontes endógenas de oxidantes são conhecidas: a β -oxidação peroxissomal de ácidos graxos, onde há liberação de H_2O_2 como um subproduto, que é degradado por ação da enzima catalase. Evidências sugerem que, sob certas condições, peróxidos escapam dessa degradação resultando em sua liberação em outros compartimentos celulares (BECKMAN E AMES, 1998). Uma segunda fonte é a eliminação de subprodutos do metabolismo das enzimas do sistema citocromo P450. Estas enzimas previnem efeitos tóxicos agudos causados por substâncias exógenas, mas também resultam em subprodutos oxidantes (AMES *et al.*, 1993). Uma terceira fonte é a reação de Fenton, que é uma das formas mais simples de gerar o radical hidroxila a partir da decomposição do H_2O_2 catalisada pelo ferro (Fe^{+2}) presente em um meio ácido (VILLA E NOGUEIRA, 2005). Uma quarta fonte de geração de espécies reativas é o complexo enzimático da NADPH oxidase.

2.4.1 NADPH oxidase e a via de sinalização da PKC

A NADPH oxidase foi originalmente descoberta em neutrófilos, onde produz grandes quantidades de $O_2^{\cdot-}$ durante a fagocitose e em defesas não específicas. Entretanto nos últimos anos tornou-se evidente que células não-fagocíticas, como fibroblastos, células endoteliais, vasculares lisas, entre outras, também possuem uma enzima análoga à NADPH oxidase, produtora de $O_2^{\cdot-}$ (GRIENGLING *et al.*, 2000a; ZALBA *et al.*, 2001 YANG *et al.*, 2001; SHIOSE *et al.*, 2001; RADEKE *et al.*, 1991). A NADPH oxidase é formada por subunidades de membrana, como gp91^{phox}, p22^{phox}, formando o citocromo b558 e subunidades citosólicas, como p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} e GTPases Rac1 ou Rac2 (FORMAN *et al.*, 2001) – (Figura 6). A ativação desta enzima na célula conduz o transporte de GTPase Rac, p47^{phox} e p67^{phox} para a membrana plasmática, onde p67^{phox} interage através de seu domínio de ativação com as subunidades ligadas a membrana. Esta interação é requerida para a ativação da oxidase e facilita a transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio (BRANDES *et al.*, 2005). Duas proteínas adicionais têm sido demonstradas interagir com o citocromo b558: rap1a e p40^{phox}, estando envolvidas no recrutamento de p47^{phox} e p67^{phox} para a membrana (BRANDES *et al.*, 2005).

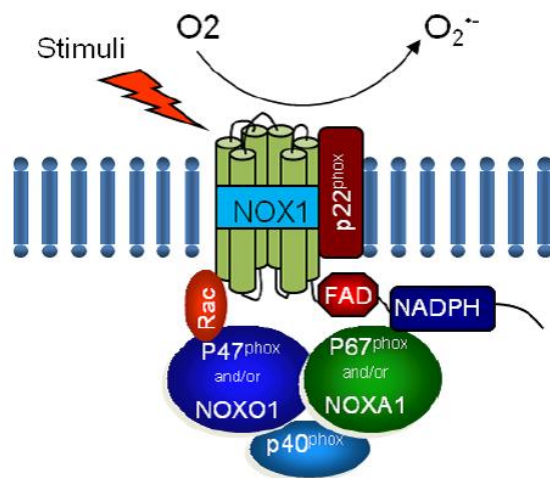


Figura 6: Estrutura da enzima NADPH Oxidase não fagocítica. NOX1, NADPH oxidase; NOXO1, NADPH oxidase organizador; NOXA1, ativador de NADPH oxidase. (Adaptado de Paik e Brenner, 2011)

Uma das particularidades atribuída à NADPH oxidase não-fagocítica é que ela não é somente constitutivamente ativa, mas responde também às ações de hormônios, citocinas, fatores de crescimento e à estresse mecânico (GRIENDLING *et al.*, 2000a; GRIENDLING e USHIO-FUKAI, 2000b; BERRY *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2002; INOBUCHI *et al.*, 2000). Os mecanismos envolvidos na ativação da NADPH oxidase são complexos e variados; no entanto, a inibição da translocação das subunidades citosólicas para a membrana pode conduzir à inibição desta enzima. Quando as células são ativadas por estímulos, como por exemplo, ésteres de forbol (PMA), alguns dos componentes citosólicos são fosforilados e migram para a membrana, onde são capazes de ativar o complexo da NADPH oxidase (BABIOR, 1999; EL BENNA *et al.*, 1994). Uma das proteínas alvo é a $p47^{phox}$, que pode ser fosforilada em diversos resíduos de serina por diferentes cinases (EL BENNA *et al.*, 1994; EL BENNA *et al.*, 1996). A resposta mais rápida da enzima é dependente da proteína cina C (PKC), que fosforila a subunidade $p47^{phox}$, que é transportada para a membrana, ativando as subunidades catalíticas da NADPH oxidase (SESHIAH *et al.*, 2002). A atividade da NADPH oxidase pode também ser inibida através da inibição da fosforilação da subunidade $p47^{phox}$ através de inibidores da PKC (MARALDI *et al.*, 2013).

O termo “PKC” representa uma família relacionada diretamente ao grupo de proteínas serina/treonina cinases e regulam uma grande variedade de eventos celulares. As isoformas de PKC podem ser ativadas por uma variedade de estímulos, dentre os quais se destacam os membros dos receptores acoplados a proteína G, os receptores de tirosinas cinases ou não receptores de tirosinas cinases. Todas as PKCs consistem em um domínio catalítico C-terminal e um domínio regulatório N-terminal. A subunidade regulatória apresenta os domínios C1, responsável pela ligação com o diacilglicerol (DAG) e com o éster de forbol (PMA), e o C2, responsável pela ligação com o cálcio (Ca^{2+}). A subunidade catalítica, altamente conservada dentre as diferentes isoformas, apresenta os domínios C3 e C4 responsáveis pela ligação do ATP e do substrato, respectivamente (MICHIE & NAKAGAWA, 2005) (Figura 7).

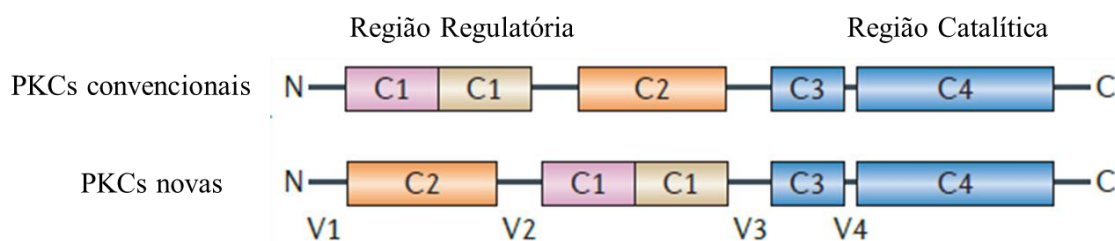


Figura 7: Esquema da estrutura das isoformas da PKC mostrando os domínios catalítico e regulatório; apresentando os domínios de ligação para o PMA/DAG (C1), de ligação ao cálcio (C2), de ligação ao ATP (C3) e de ligação ao substrato (C4). (Adaptado de Mochly-Rosen *et al.*, 2012)

A família das PKCs é dividida em três classes, dependendo da sua estrutura e dos requisitos necessários para a sua ativação.

A classe de PKCs **convencionais**, representada pelas isoenzimas PKC α , PKC β I, PKC β II e PKC γ , dependem de Ca^{2+} e diacilglicerol (DAG) para ativação. A classe de PKCs **novas**, PKC δ , PKC ϵ , PKC η e PKC θ , dependem DAG, mas não de Ca^{2+} . E a classe de PKCs **atípicas**, representada pelas isozimas PKC τ/λ e PKC ζ , que não dependem de DAG ou Ca^{2+} (OHNO e NISHIZUKA, 2002).

A ativação das isoformas de PKC se dá por uma variedade de hormônios, como adrenalina e angiotensina; fatores de crescimento, incluindo fator de crescimento epidérmico; e neurotransmissores, como a dopamina e endorfina. Estes estímulos, quando ligados aos seus respectivos receptores ativam membros da família da

fosfolipase C (PLC), gerando assim diacilglicerol (Figura 8). A classe das PKCs novas (PKC δ , PKC ϵ , PKC θ e PKC η) é ativada por diacilglicerol sozinho, enquanto que as quatro isoenzimas PKC convencionais (PKC α , PKC β I, PKC β II e PKC γ) requerem além do diacilglicerol, Ca²⁺ para a sua ativação. Os níveis celulares de Ca²⁺ são elevados juntamente com os níveis de diacilglicerol, uma vez que o diacilglicerol é coproduzido com inositol-1,4,5-trifosfato (Ins (1,4,5) P₃), a partir da hidrólise de inositol-4,5-bisfosfato (Ins (4,5) P₂), o que provoca a liberação de Ca²⁺ das reservas internas para o citosol (Figura 8) (MOCHLY-ROSEN *et al.*, 2012).

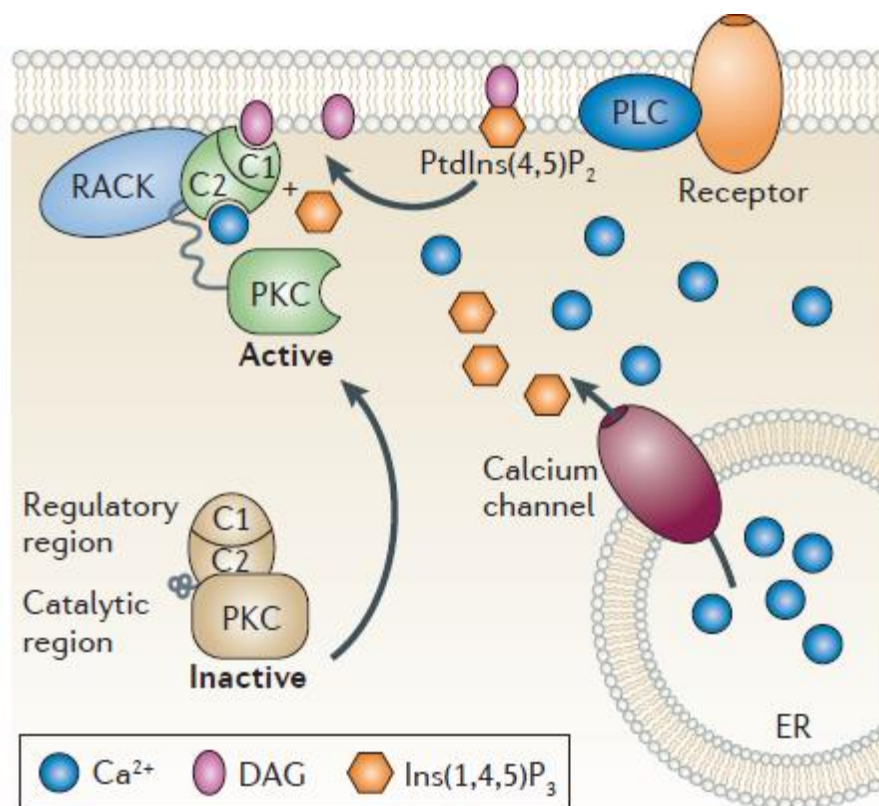


Figura 8: Processos que conduzem a ativação da enzima PKC. Todas as isozimas de proteína-quinase C (PKC) requerem a ligação de diacilglicerol (DAG) no domínio C1, a região reguladora para a ativação. PKCs convencionais também requerem a ligação do cálcio no domínio C2 da região reguladora. Esses segundos mensageiros são gerados após a ligação de determinados hormônios, neurotransmissores ou fatores de crescimento em seus receptores correspondentes. A subsequente ativação de fosfolipase C (PLC) resulta na hidrólise de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PtdIns (4,5) P₂), um fosfolípido de membrana, em DAG e inositol trifosfato -1,4,5- (Ins (1,4,5) P₃). Ins (1,4,5) P₃, por sua vez, provoca a liberação de cálcio do retículo endoplasmático (RE), provocando um aumento na concentração de cálcio citosólico. O aumento nos níveis de DAG e de cálcio leva à ativação de PKC e a sua translocação do citosol para a membrana plasmática, bem como para outras localizações subcelulares, em que cada isoenzima interage com a sua proteína de ancoragem, receptor de cinase-C ativada (RACK). PKC é ativada e fosforila vários substratos nas proximidades, levando a diversas respostas celulares. (Adaptado de Mochly-Rosen *et al.*, 2012)

A ativação da PKC pode ocorrer ainda na ausência dos mensageiros citados. Elevados níveis de cálcio citosólico pode ativar diretamente a fosfolipase C, conduzindo assim a ativação da PKC sem ativação do receptor. Várias modificações na PKC já foram relatadas, levando a ativação de suas isoformas tanto em situações fisiológicas como em doenças. A fosforilação de vários sítios da enzima é necessária para a maturação das enzimas recém-sintetizadas, assim como para a ativação das enzimas maduras. Outras modificações, como oxidação, acetilação e nitração têm sido descritas como necessárias para ativação da PKC (STEINBERG, 2008). Uma característica da ativação da PKC, descrita pela primeira vez em 1982, é que ela está sempre associada a translocação da enzima a partir da fração citosólica (solúvel) para a outras frações celulares, incluindo a membrana plasmática e outras organelas celulares (MOCHLY-ROSEN, 1995).

Alterações do ambiente celular induzidas por lesões ou exposição a oxidantes podem induzir a ativação da PKC levando a doenças como câncer e diabetes (CARTER e KANE, 2004). A PKC contém múltiplos resíduos de cisteína que podem ser oxidados e ativados por ERO. Entretanto a ativação da PKC é necessária para a formação de ERO em vários sistemas biológicos, incluindo, por exemplo, as alterações induzidas pelo diabetes, sugerindo então que ERO pode tanto ser produzido pela ativação de PKC como sustentar a atividade da mesma (Figura 9) (WU *et al.*, 2006a).

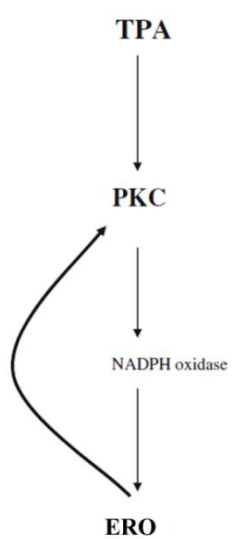


Figura 9: Sustentação da ativação da PKC por ERO. TPA (éster de forbol- ativador de PKC) (Adaptado de Wu, 2006b).

Neste contexto, entende-se por estresse oxidativo a condição na qual as defesas celulares antioxidantes não são suficientes para inativar completamente as espécies reativas. Este desequilíbrio é gerado devido à produção excessiva de ERO, pela perda de defesas antioxidantes, ou ambos, e pode causar danos à lipídios, proteínas e ao DNA (DALLE-DONE *et al.*, 2006). Alterações no estado redox podem afetar as vias de sinalização e os processos biológicos, levando a danos nas funções celulares (TOBWALA *et al.*, 2014). Entretanto, os mecanismos do estresse oxidativo não se limitam apenas aos danos macromoleculares causados por estas espécies, havendo também efeitos sobre a sinalização redox. Desta forma, o estresse oxidativo pode ser contemporaneamente definido como uma disfunção da sinalização redox e dos mecanismos de controle (JONES, 2006).

Sendo assim, um dos nossos objetivos foi verificar se os efeitos antioxidantes atribuídos à *Baccharis trimera* poderiam estar relacionados à sua atuação em vias de sinalização celulares importantes para a modulação do estresse oxidativo, como a via da PKC e NADPH oxidase.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito dos extratos hidroetanólico e aquoso de *Baccharis trimera*, quercetina e rutina na modulação de ERO em células de hepatocarcinoma (SK Hep-1) e o envolvimento da via de sinalização da PKC e da enzima NADPH oxidase.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar os espectros cromatográficos dos extratos hidroetanólico e aquoso de *Baccharis trimera*;
- Avaliar a quantidade de compostos fenólicos totais presentes nos extratos de *Baccharis trimera*;
- Avaliar a capacidade de neutralização do radical DPPH dos extratos de *Baccharis trimera* e dos compostos quercetina e rutina;
- Avaliar a viabilidade da linhagem celular SK Hep-1 expostas a diferentes concentrações dos extratos de *Baccharis trimera*, quercetina e rutina;
- Investigar a influência da enzima NADPH oxidase na produção de ERO na linhagem SK Hep-1;
- Avaliar a produção basal de ERO em células expostas aos extratos de *Baccharis trimera*, quercetina e rutina;
- Investigar a influência da via de sinalização da PKC e da enzima NADPH oxidase na produção de ERO na linhagem celular SK Hep-1 tratada com os extratos de *Baccharis trimera*, quercetina e rutina;
- Investigar a influência do extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* e quercetina na modulação da via de sinalização da PKC em células da linhagem SK Hep-1;
- Investigar a influência do extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* e quercetina na modulação da enzima NADPH oxidase em células da linhagem SK Hep-1.

4. METODOLOGIA

4.1. Reagentes

Quercetina e Rutina; dimetilsulfoxido (DMSO); Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM); Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT), Forbol 12-miristate 13-acetato (PMA), Ionomicina, Calfostim C, Difenileneiodonium cloride (DPI); anticorpo monoclonal Anti-Protein Kinase C, anticorpo anti- p47 PHOX C-terminal e anticorpo policlonal anti-phospho-p47 (pSer³⁵⁹) foram obtidos da Sigma Aldrich (St Louis, MO). Solução de Luminol Enhancer e o Hiperfilme-ECL obtidos da GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom e Carboxy-H₂DCFDA obtido da Life Technologies. A linhagem celular SK Hep-1 foi gentilmente cedida pela professora Miriam Martins Shultz da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.2. Material Botânico

As partes aéreas da *B. trimera* foram coletadas em Agosto de 2011 na cidade de Ouro Preto, Minas Gerais. A espécime, de exsicata número OUPR 22127, foi identificada pela Professora Doutora Viviane R. Scalon e em seguida depositada no Herbário José Badini da UFOP.

4.3. Preparaçã dos extratos e soluções

EXTRATO HIDROETANÓLICO E AQUOSO

Na obtenção do extrato hidroetanólico, a planta triturada (100g) foi submetida à extração com água destilada e álcool etílico a 70% na proporção de 1:1 (500mL) durante 24 horas. Para o extrato aquoso, a planta (100g) foi submetida à extração somente em água destilada (500mL) também por 24 horas. Em seguida foi realizada a filtração a vácuo e os extratos obtidos tiveram a água e o solvente evaporados em rotavapor. Obtivemos 8,15 gramas do extrato hidroetanólico e 5,59 gramas do extrato aquoso, apresentando rendimento de 8,18% e 5,5%, respectivamente. Todos os processos foram feitos sob abrigo de luz. O preparo do extrato hidroetanólico foi baseado no método descrito por Grance *et al.* (2008). Os extratos concentrados obtidos, de coloração verde escura e cheiro adocicado, forma armazenados a 4°C por 6 meses e

para cada análise foram diluídos em solução salina tamponada (PBS) (NOGUEIRA *et al.*, 2011; PÁDUA, *et al.*, 2010).

PREPARO DAS SOLUÇÕES DE QUERCETINA E RUTINA

As soluções utilizadas para os ensaios dos compostos quercetina e rutina foram preparadas no dia das análises. Foram diluídas em DMSO a 0,6%, e posteriormente diluídas em PBS para obtenção das concentrações de 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50 e 100 μM . (KIM, 2011; LEE *et al.*, 2012).

4.4. Preparação das amostras para a análise cromatográfica e espectral

O extrato hidroetanólico e o extrato aquoso de *Baccharis trimera* foram submetidos a tratamento em cartuchos de extração em fase sólida (EFS C-18) antes de serem analisados em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjos diodo e espectrometria de massas (CLAE-DAD-EM). O cartucho de EFS (3,0 mL), empacotado com sílica C-18, foi ambientado por duas vezes com MeOH/H₂O (9:1). Após esse procedimento, foram aplicados 20 mg da amostra e eluídas com 4,0 mL de MeOH/H₂O (9:1). O eluato foi seco e ressuspensionado em metanol para, em seguida, ser filtrado em filtros de seringa Chromafil® PDVF (difluoreto de polivinilideno) com volume suficiente para obter concentração de 2 mg/mL da amostra. Para a análise em CLAE-DAD-EM foram injetados 20,0 μL da amostra. As análises foram realizadas em equipamento Waters Acquity com detectores de DAD e EM utilizando coluna 1,7 mm x 50 mm x 3 mm d.i. (CHS130 100 RP-18). A fase móvel utilizada foi água (A) e acetonitrila (B) ambos com 0,1% de ácido fórmico. As amostras foram eluídas com gradiente linear de 5 a 95% de B em 11 minutos. Os parâmetros de EM foram otimizados para obtenção de melhores resultados de ionização e ficaram definidos como temperatura capilar 320°C; voltagem do capilar 3,5 kV; tensão no capilar de 3 e -47 V (para modos positivo e negativo, respectivamente); como gás de nebulização foi utilizado nitrogênio. A faixa de massa analisada foi de 100 a 1500 m/z para o modo positivo e negativo.

4.5. Avaliação de compostos fenólicos dos extratos hidroetanólico e aquoso

A quantificação desses compostos foi realizada segundo o método proposto por George *et al.* (2005). Neste método o reagente Folin-Ciocalteu se reduz ao oxidar os

compostos fenólicos, produzindo óxidos de tungstênio (W_8O_{23}) e molibideno (Mo_8O_{23}) de cor azul que absorvem no comprimento de onda de 760nm. Em suma, 500 μ L de amostra, ácido gálico (nas concentrações para a curva padrão) e água (branco) foram colocadas em tubos e foi adicionado à amostra 2,5mL do reagente de *Folin-Ciocalteu*, diluído em água destilada (1:10). Foi deixado em repouso durante 2 minutos em temperatura ambiente. Após 2 minutos, 2mL de carbonato de sódio a 7,5% foi adicionado a essa solução e misturado vigorosamente. Em seguida, as amostras foram incubadas a 50°C em banho maria por 15 minutos e posteriormente alocadas em um banho de gelo. A absorbância foi quantificada a 760nm. Água destilada foi utilizada como branco. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico/grama da amostra em base seca.

4.6. Análise da capacidade antioxidante *in vitro* por DPPH•

O método DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para o radical DPPH• em solução de metanol. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH• remanescente no meio reacional (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

A capacidade dos extratos hidroetanólico e aquoso de *Baccharis trimera* e os compostos quercetina e rutina em sequestrar o radical DPPH• foi medida de acordo com o procedimento descrito por BRAND-WILLIAMS *et al.* (1995), com as devidas adequações. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Os extratos hidroetanólico e aquoso foram diluídos em metanol 80% para obtermos as concentrações de 500, 250, 100, 50 e 25 μ g mL⁻¹. Os compostos quercetina e rutina foram diluídos também em metanol 80% nas concentrações 500, 250, 100, 50 e 25 μ M. Em seguida 100 μ L das diluições de cada extrato e compostos foram colocados em tubos de ensaio e adicionados aos tubos 3,9 mL da solução do radical DPPH a 60 μ M dissolvido em metanol a 80%.

A curva padrão foi realizada com o antioxidante de referência Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrameticromo-2-ácido carboxílico). Primeiramente foi preparada uma solução estoque de Trolox a 1000 μ M em metanol a 80%. Foram realizadas sucessivas diluições a partir dessa solução, obtendo soluções com as seguintes concentrações: 100 μ mol L⁻¹,

200 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 700 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Em tubos de ensaio foram colocados 100 μL de cada solução (nas diferentes concentrações) e 3,9 mL da solução de DPPH a 60 μM . A amostra controle foi preparada com 100 μL de água destilada e 3,9 mL de solução de DPPH a 60 μM . Os tubos (amostras, controle e padrões) foram homogeneizados e armazenados no escuro por 30 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo de incubação, a leitura das absorvâncias foi realizada no espectrofotômetro a 515 nm, calibrado com metanol 80% (“branco”). A atividade de sequestro do radical DPPH• foi avaliada pela diminuição da absorvância do DPPH• e a porcentagem de inibição foi calculada usando a seguinte equação:

$$\% \text{ Atividade Antioxidante} = \frac{\text{A controle (515nm)} - \text{A amostra (515nm)}}{\text{A Controle (515nm)}} \times 100$$

Onde A controle (515nm) é a absorvância da solução da amostra controle e A amostra (515 nm) é a absorvância final da mistura reacional com a amostra ou antioxidante de referência.

4.7. Cultivo celular

A linhagem celular SK Hep-1 é uma linhagem celular humana permanente derivado do fluido ascítico de um paciente com uma história de adenocarcinoma do fígado. Esta linhagem celular foi criada em 1971 e relatada como de origem de carcinoma hepatocelular, mas com características epiteliais. Para o cultivo, as células SK Hep-1 foram colocadas em frascos estéreis de crescimento de 75cm² contendo o meio de cultura DMEM e 10% (v/v) de soro fetal bovino. As garrafas foram incubadas em estufa a 37°C umidificadas com 5% de dióxido de carbono (CO₂). O meio foi substituído a cada dois ou três dias, de acordo com a confluência da monocamada celular, que era diariamente observada em microscópio invertido. Os subcultivos eram realizados quando as células apresentavam 100% de confluência para a manutenção da linhagem. As células eram utilizadas para os ensaios quando a confluência atingia em torno de 80%, assim o meio era aspirado e a monocamada lavada com solução salina tamponada (PBS). Após a lavagem para o descolamento da monocamada utilizou-se 4 mL de solução de Tripsina e EDTA (0,20% e 0,02% respectivamente). Posteriormente, as células foram retiradas do frasco, colocadas em tubos Falcon estéreis, completando-

se o volume para 10mL com meio DMEM. O tubo contendo as células foram centrifugados e após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuspensão em 1mL de meio DMEM. Em seguida, foi realizada a contagem das células com Azul de Trypan 0,3% em Câmara de Neubauer.

Para manter as células em estoque, periodicamente foi realizado um congelamento. As células ($1,0 \times 10^6$ células/mL) foram armazenadas em criotubos de 2 mL contendo 950 μ L de Soro Fetal Bovino e 50 μ L de DMSO. Estes criotubos foram identificados e armazenados no freezer a -80 °C por 24 horas. Após as 24 horas os criotubos foram transferidos para nitrogênio líquido. Para o descongelamento, retirou-se o criotubo do nitrogênio líquido e transferiu-se todo o conteúdo do criotubo para uma garrafa de 75 cm², contendo meio de cultura suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino.

4.8. Ensaio de viabilidade celular (MTT)

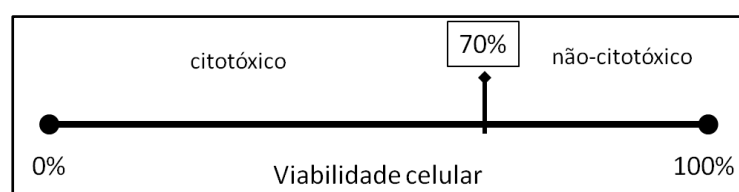
O teste MTT (3-(4,5 dimetiazol-2yl)-2,5 difeniltetrazolio bromide) constitui-se em um modelo para avaliar a viabilidade celular, de forma rápida e objetiva, com base em uma reação colorimétrica (MOSMANN, 1983).

A mitocôndria é a maior fonte de ERO através da cadeia transportadora de elétrons. O MTT reage com as enzimas mitocondriais indicando a atividade da cadeia transportadora de elétrons e, conseqüentemente, a viabilidade das células. O MTT quando incubado com células vivas, tem o seu substrato clivado por enzimas mitocondriais como a succinato-desidrogenase, transformando um composto amarelo em um composto violeta (Formazan). A quantidade de cristais de Formazan formados é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Assim, quanto mais escura a coloração, ao final da reação, maior a viabilidade celular e a atividade da cadeia respiratória. Para a realização do procedimento experimental, as células foram colocadas em placas de cultura celular de 96 poços na concentração de 5×10^3 células em cada poço em presença de meio DMEM e 10% de soro fetal bovino, perfazendo um volume final de 200 μ L. As placas foram então incubadas em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas para a aderência das células e formação da monocamada celular. Decorrido este tempo, o sobrenadante foi retirado, e adicionaram-se 180 μ L de meio DMEM, e 20 μ L das soluções preparadas dos extratos hidroetanólico e aquoso de

Baccharis trimera nas concentrações 0,5; 1,0; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100µg/mL, e as soluções de quercetina e rutina nas concentrações 0,5; 1,0; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100µM. As placas foram então incubadas novamente em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO₂ por 12, 24 e 48 horas. Decorrido o tempo de incubação, o sobrenadante foi retirado e os poços lavados com PBS. Foi adicionado 200 µL/poço de uma solução contendo 5,0 mg/mL de MTT em DMEM e incubadas por 4 h a 37 °C. A solução de MTT foi então removida e 100 µL de DMSO foram adicionados a cada poço. A absorbância foi lida a 570 nm. O cálculo utilizado para avaliar a porcentagem de viabilidade celular foi: absorbância das células tratadas/ absorbância do controle x 100.

Para cada tempo avaliado foi realizado um controle somente com os extratos, hidroetanólico e aquoso, para verificar se estes influenciariam na análise do MTT. Foi realizado um controle com DMSO para cada tempo analisado para avaliar a viabilidade das células expostas somente a este composto e não foi observada nenhuma diferença significativa (resultados não mostrados).

Para cada tempo de incubação foi realizado um controle (células não tratadas). Ao controle atribuiu-se 100% de viabilidade (0% de citotoxicidade). De acordo com a ISO2009 - 10993-5, um extrato é considerado citotóxico quando a viabilidade celular é menor ou igual a 70%. Sendo assim, os resultados obtidos no teste de MTT foram comparados de acordo com a ISO.



4.9. Tratamentos

Após a confirmação de que os extratos hidroetanólico e aquoso de *Baccharis trimera*, quercetina e rutina nas concentrações avaliadas não foram citotóxicos para células SK Hep-1 em 12 horas de incubação, foram realizados os tratamentos para as análises subseqüentes. As células SK Hep-1 foram pré-incubadas a 37°C 5% CO₂ durante dois tempos distintos (30 minutos ou 6 horas), utilizando três concentrações

diferentes de *Baccharis trimera* (10, 25 e 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$), rutina ou quercetina (10, 25 e 50 μM). Após a pré-incubação, as células não estimuladas foram lavadas e utilizadas para os ensaios. Para a análise da influência da PKC na modulação de ERO, após a lavagem, as células foram incubadas durante 30 minutos com PMA (50 nM), um análogo de diacilglicerol e potente ativador da PKC, e ionomicina (100 nM), que é responsável pelo aumento da liberação de cálcio. Subsequentemente, as células foram lavadas em solução de Hanks e usadas nos ensaios.

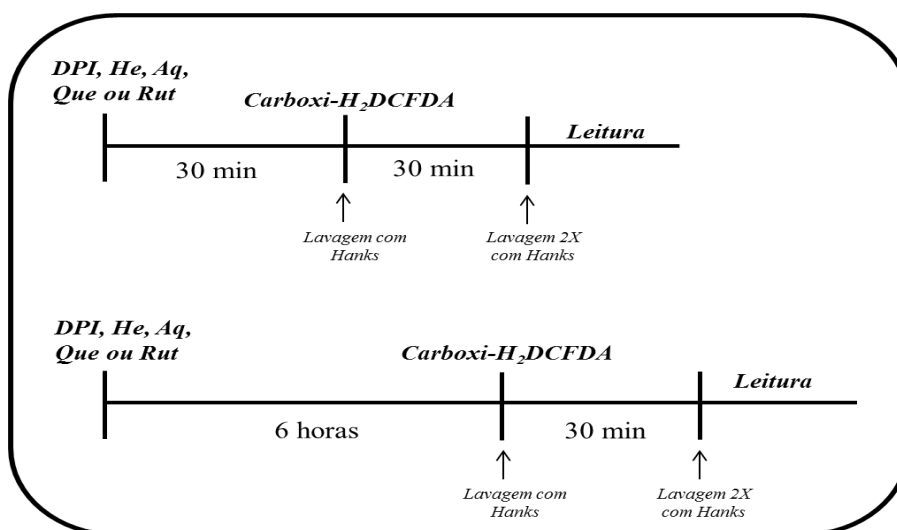
4.10. Análise da produção de Espécies Reativas de Oxigênio por citometria de fluxo

Para avaliação da produção de ERO em células da linhagem hepática SK Hep-1 foi utilizado o Kit Image-iT™ LIVE Green Reactive Oxygen Species (Invitrogen®) que permite a detecção de ERO intracelular por citometria de fluxo. A técnica utiliza um marcador fluorogênico não fluorescente (5-ou-6)-carboxy-2',7' diclorodihidro fluoresceína diacetate (carboxy- H_2DCFDA), que quando quebrado por esterases intracelulares não específicas, gera a molécula carboxy-DCFH que reage com as ERO tornando-se fluorescente. Os ensaios foram feitos após o descolamento das células nas garrafas com solução de tripsina/EDTA.

O delineamento experimental foi realizado conforme ilustrado na figura 10. Para tal, as células (5×10^5 /ensaio) foram ressuspensas em meio DMEM e tratadas com os extratos ou compostos como descrito no item 4.8. Cloreto de difenileneiodonio (DPI) (20 μM), um inibidor da NADPH oxidase, foi utilizado como um controle negativo, durante a primeira incubação (30 min ou 6 horas). De acordo com o tratamento das amostras, estas foram estimuladas ou não com PMA e ionomicina, e todas foram incubadas com o marcador carboxi- H_2DCFDA (10 μM) para avaliar a produção de ERO. Estas amostras foram incubadas a 37°C, 5% CO_2 durante 30 minutos, sob o abrigo de luz. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes em solução de Hanks (pH 7.4). Na lavagem final, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200 μl de solução de fixação. A aquisição de dados foi realizada utilizando citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ e software CellQuest™. Para as análises foi utilizado o software FlowJow versão 7.6.5.

As imagens de fluorescência foram obtidas para ilustrar a produção de ERO em células da linhagem SK Hep-1. Para tal, as células foram tratadas como descrito acima, fixadas com paraformaldeído e analisadas utilizando microscopia de fluorescência (Axio Observer, Carl Zeiss. Objetiva EC Plan-Neofluar 63x/1,25 imersão a óleo).

(A) Tratamento sem estímulo



(B) Tratamento com estímulo

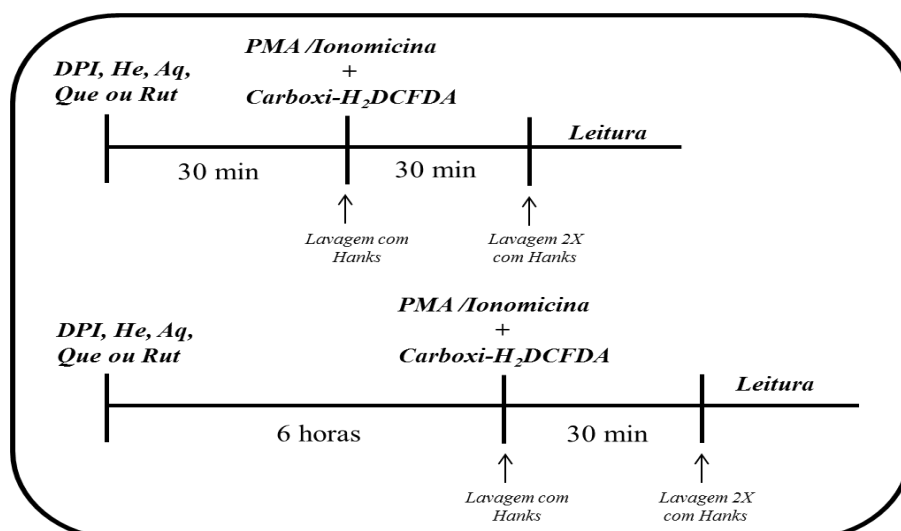


Figura 10: Delineamento experimental dos diferentes tratamentos. (A) Tratamento sem estímulo para avaliação basal de ERO. (B) Tratamento com estímulo (PMA/ionomicina) para avaliação da via da PKC na modulação de ERO. DPI: inibidor da NADPH oxidase, He: extrato hidroetanólico de *B. trimera*, Aq: extrato aquoso de *B. trimera*, Que: quercetina, Rut: rutina, PMA: ester de forbol.

4.11. Western Blotting

4.11.1. Preparação do Homogenato celular

O ensaio de *western blotting* foi realizado para analisar a expressão proteica da PKC, a expressão da subunidade p47^{phox} da NADPH oxidase bem como o nível de fosforilação desta subunidade.

O efeito do extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* (50 µg mL⁻¹) e quercetina (50 µM) foram analisados. Um total de 5x10⁶ células foi incubado com o extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* e quercetina durante 6 horas, conforme descrito anteriormente. Calfoestim C (100 nM), um inibidor da proteína cinase C, foi usado como um controle negativo do ensaio de expressão proteica da PKC. Já o DPI (20µM), um inibidor da NADPH oxidase foi usado como controle negativo do ensaio de expressão da subunidade p47^{phox}. Após a pré-incubação, as células foram estimuladas com PMA e ionomicina durante 30 minutos. As células foram lisadas em 500 µL de tampão de lise contendo 1,0 mM de Tris-HCl; EDTA 0,5 M; 5,0 M NaCl; DTT; Nonidet P40; e coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA - Sigma®). As amostras foram sonicadas, e posteriormente centrifugadas a 15.6 xg por 3 horas. O sobrenadante foi removido e utilizado para a dosagem de proteínas e preparação para do gel de eletroforese.

4.11.2. Dosagem de proteínas

A dosagem de proteína foi realizada segundo método de Lowry através do KIT BCA (QUANTIPRO- SIGMA). Para isso, primeiramente foi realizada a diluição das amostras que foram diluídas 400X. Uma curva padrão, utilizando albumina sérica bovina (BSA) foi realizada nas concentrações de 0 a 30 µg mL⁻¹. Foi preparado um mix de BCA, fornecido pelo kit que foi adicionado as amostra e a curva padrão. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente *overnight* e posteriormente verificou-se a absorbância a 562 nm no espectrofotômetro (Espectrofotômetro cuvette digital – Biosystems). A concentração proteica da amostra foi quantificada fazendo-se a equação da curva padrão e utilizada no gel de eletroforese.

4.11.3. Eletroforese, transferência e revelação

Foram utilizadas 50 µg de proteínas por canaleta do gel e esta foi separada por eletroforese usando um gel de poliacrilamida a 10 % para a análise da PKC e a 12%

para a análise da subunidade p47^{phox}. Em seguida, foi feita transferência das proteínas para uma membrana de Nitrocelulose 0,45 µm (BioRad, Hercules, CA) durante 2 horas e 30 minutos em sistema semi seco (BioRad, Hercules, CA) sob voltagem de 20 Volts e corrente de 200 mA (SAMBROOK *et al.*, 1989). Então, a membrana foi bloqueada usando-se TBST (Tris HCl pH 7,6 (1 mM), NaCl (5 M) e (Tween 20) contendo 7.5% de leite desnatado para análise da PKC e 7.5% de BSA para análise da subunidade p47^{phox} por 2 horas. O *western blotting* para PKC foi realizado, utilizando-se o anticorpo primário anti-PKC com especificidade para humanos, produzido em camundongo (Monoclonal Anti-Protein Kinase C antibody - Sigma) em um fator de diluição de 1:1000. Para a subunidade p47^{phox} total, utilizamos o anticorpo primário anti- p47^{phox} com especificidade para humanos, produzido em coelho (Anti- p47 PHOX C-terminal antibody produced in rabbit - Sigma), na concentração de 1:1000. Para o *western blotting* da subunidade p47^{phox} fosforilada utilizamos o anticorpo primário policlonal anti-phospho-p47 (pSer³⁵⁹) com especificidade para humanos (Anti-phospho-p47 phox (pSer³⁵⁹) antibody produced in rabbit - Sigma) em um fator de diluição de 1:1000. A incubação com o anticorpo primário foi feita *overnight* a 5 °C. Após três lavagens com TBST, a membrana foi incubada com os anticorpos secundários. Para a análise da PKC foi utilizado anti-mouse conjugado com peroxidase (Anti-mouse IgG – Peroxidase antibody produced in rabbit - Sigma) (1:2000) por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação. Para análise da subunidade p47^{phox} e p47^{phox} fosforilada utilizamos o anticorpo anti-rabbit conjugado a peroxidase (Anti-Rabbit IgG Peroxidase antibody produced in goat - Sigma) (1:2000) por 1 hora sob agitação. Para visualizar as bandas, a membrana foi exposta a solução de Luminol Enhancer (GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom) por 1 minuto seguido pela exposição de 30 segundos em hiperfilme-ECL (GE Healthcare). A intensidade das bandas foi quantificada utilizando Quantity One Software (Bio-Rad).

4.11.4 Método de coloração utilizando Azul de Comassie

Para a coloração do gel utilizamos o método de coloração por Azul de Comassie. Após a migração do gel, este foi embebido durante 2 horas a temperatura ambiente em solução corante (azul de comassie, etanol P.A., ácido acético P.A.). Em seguida, essa solução foi descartada e uma solução descolorante (metanol: ácido acético 9:1) foi

adicionada por 40 minutos. Decorrido este tempo, a solução foi descartada e lavou-se o gel com água destilada e as bandas foram observadas para verificar a integridade proteica.

4.12. Atividade da PKC

A atividade da PKC foi analisada utilizando o kit de atividade da proteína cinase C- PKC (Enzo Life Sciences-Adi-EKS 420A). As células foram tratadas como descrito anteriormente e, após a centrifugação, o tampão de lise (Tris-HCl 1,0 mM; EDTA 0,5 M; NaCl 5,0 M; DTT; Nonidet P40; cocktail inibidor de protease; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA - Sigma®) foi adicionado a cada amostra, seguido por sonicação . As amostras foram centrifugadas durante 3 horas a 15.6 xg. O sobrenadante foi removido e as proteínas foram quantificadas utilizando o método de BCA, como descrito anteriormente. As amostras (30 µL) foram adicionadas a cada poço de uma placa de microtitulação de substrato da PKC, e a reação foi iniciada após a adição de 10 µL de ATP diluído em cada poço. A placa foi incubada durante 90 minutos a 30° C. O anticorpo fosfoespecífico foi adicionado aos poços, e a placa foi incubada novamente durante 60 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, os poços foram lavados 4 vezes com 100 µL de tampão de lavagem, e o anticorpo anti-IgG de coelho, anticorpo secundário, foi adicionado a cada poço, seguido de incubação à temperatura ambiente durante 30 minutos. A placa foi lavada quatro vezes, e foi adicionado substrato tetrametilbenzidina (TMB), seguido de incubação durante 30 minutos. Cerca de 20 µL de solução ácida de parada foi adicionado, e a absorbância foi medida a 450 nm utilizando um leitor de microplacas (Biotek EL 808).

4.13. Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão. Todos os dados foram analisados pelo teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov*. Para o ensaio de compostos fenólicos os dados foram analisados pelo teste-t de *Student*. Para os demais ensaios foi utilizada a análise de variância univariada (ANOVA *one-way*) seguida pelo teste de Dunnett, quando as amostras apresentavam distribuição normal, e o teste de Dunns quando não seguiam a distribuição normal. Diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism* versão 5.0 para Windows (San Diego, California, USA).

5. RESULTADOS

5.1. Análise cromatográfica e espectral dos extratos hidroetanólico e aquoso de *Baccharis trimera*

No extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* foram identificados nove ácidos fenólicos e cinco flavonoides, como mostrado na Tabela 1 e Figuras 11 e 12. Os espectros de massas obtidos foram comparados com os resultados descritos na literatura. As buscas foram realizadas nas bases de dados disponíveis pela razão massa/carga (m/z) obtida nos espectros.

Tabela 1: Compostos identificados no extrato hidroetanólico de *B. trimera*

Pico	Compostos	RT (min)	UV (nm)	LC-MS [M - H] ⁻ (m/z) (Fragmentação m/m)
1	Ácido Cumaroilquinico	1.39	315	337.51 (191.3; 173.1; 163.3; 118.9)
2	Ácido Cumaroilquinico	1.41	316	337.82 (191.2; 173.2; 136.8; 118.9)
3	5- <i>O</i> -Ácido feruloilquinico	1.95	322	367.37 (192.9; 173.4; 149.3; 133.9; 117.1)
4	3- <i>O</i> -Ácido Isoferuloilquinico	2.03	323	367.42 (193.1; 173.1; 136.8; 133.9)
5	Ácido Cumaroilquinico	2.04	314	337.56 (191.1; 173.2; 163.1; 118.9)
6	5- <i>O</i> -Ácido Isoferuloilquinico	2.43	321	367.52 (191.3; 176.5; 155.4; 133.5; 127.2)
7	6(8)- <i>C</i> -furanosil-8(6)- <i>C</i> -hexosil-flavona	2.60	274; 331	563.37 (545.0; 503.0; 472.9; 453.9; 383.2; 359.9; 323.3; 295.9)
8	6(8)- <i>C</i> -hexosil-8(6)- <i>C</i> -furanosil-flavona	2.74	273; 326	563.31 (473.1; 442.7; 383.2; 353.1; 325.0; 282.0)
9	3,4-di- <i>O</i> -Ácido cafeoilquinico	2.81	324	515.26 (353.2; 191.1; 178.9; 172.8; 161.1; 154.8; 136.0)
10	3,5-di- <i>O</i> -Ácido cafeoilquinico	2.93	323	515.0 (323.2; 190.7; 178.6; 172.8; 161.1; 154.7; 135.0)
11	4,5-di- <i>O</i> -Ácido cafeoilquinico	3.20	325	515.07 (352.9; 191.1; 178.8; 173.1; 135.1)
12	Quercetina	3.82	255; 369	301.23 (283.0; 255.3; 227.3; 191.4; 183.3; 181.1; 174.2; 150.7; 143.0; 120.8)
13	3',5-dihidroxi-4',7-dimetoxiflavona	5.32	282; 329	313.09 (298.0; 282.7; 270.6; 254.7; 183.0; 129.1; 99.2)
14	3',5-dihidroxi-4',6,7-trimetoxiflavona	5.50	275; 340	343.31 (328.1; 313.2; 297.9; 285.0; 269.8; 255.0)

TR (min): tempo de retenção em minutos, UV (nm): ultra violeta em nanômetros, LC-MS [M-H]⁻(m/z): cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em modo negativo, razão massa/carga.

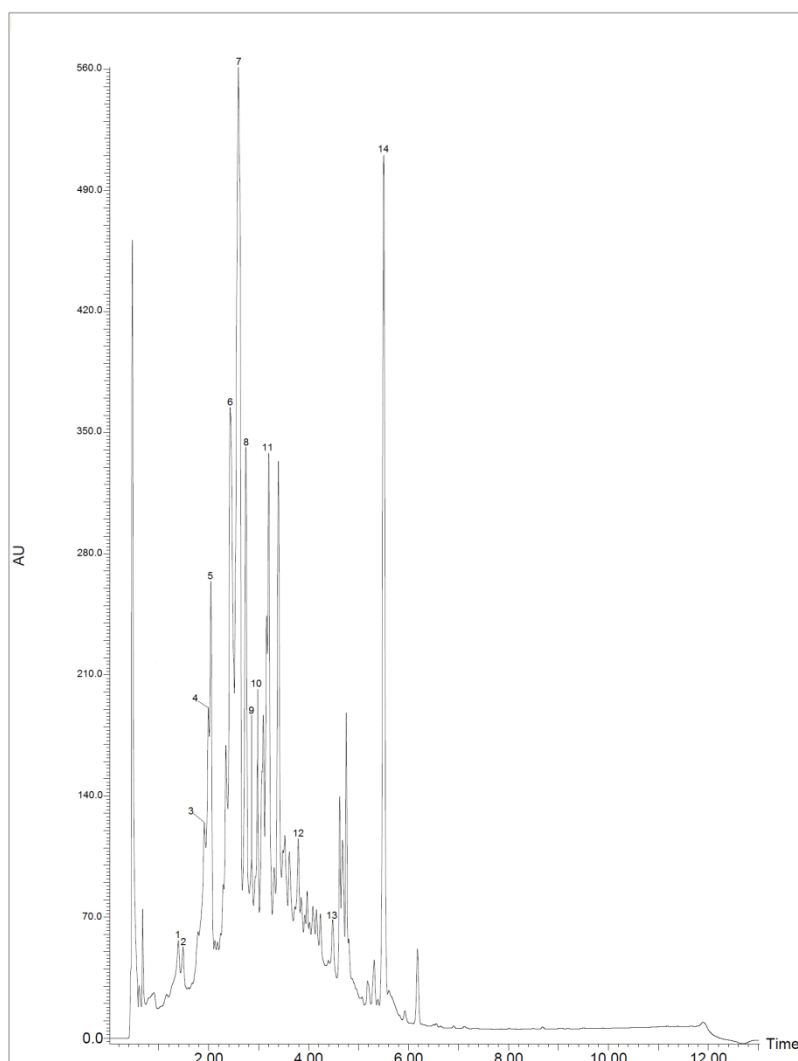


Figura 11: Perfil do extrato hidroetanólico de *B. trimera*. Condições: CHS130 100 RP-18 de coluna (1,7 mm, 50 x 3 mm) id. A eluição foi realizada com um gradiente linear de água 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrilo 0,1% de ácido fórmico (B) (a partir de 5% a 95% de B, em 11 min) e as impressões digitais UPLC foram registradas em um aparelho Waters Acquity com um detector UV-DAD (Waters 2996). Parâmetros de funcionamento do espectrômetro de massa foram: temperatura capilar 320°C; voltagem da agulha de spray fixada em 3.50kV; ES tensão capilar 3 e - 47V para polaridade positiva e negativa, respectivamente; e lente do tubo deslocamento 0 e -25V para polaridade positiva e negativa, respectivamente. Usou-se nitrogênio como gás de bainha com um fluxo de 50 unidades arbitrárias. Análise de massa foi realizada no modo de varrimento total 100-1,500 amu, tanto no modo positivo e negativo.

ARAÚJO, G. R.

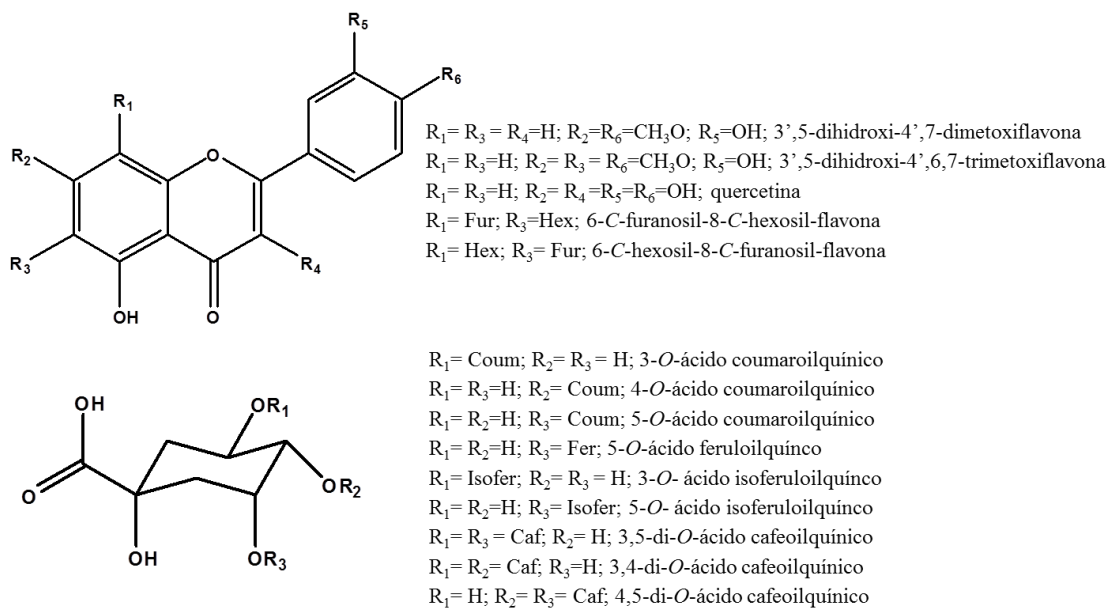


Figura 12: Estruturas químicas dos compostos encontrados na composição do extrato hidroetanólico de *B. trimera*

ARAÚJO, G. R.

No extrato aquoso foram identificados 12 ácidos fenólicos e três flavonoides, por CLAE-EM (Tabela 2 – Figuras 13 e 14).

Tabela 2: Compostos identificados no extrato aquoso de *B. trimera*

Pico	Compostos	RT (min)	UV (nm)	LC-MS [M - H] ⁻ (m/z) (Fragmentação m/m)
1	3- <i>O</i> -Ácido feruloilquinico	1.73	321.1	367.29 (193.0; 155.2; 148.9; 134.0)
2	4- <i>O</i> -Ácido cafeoilquinico	1.74	320.1	353.38 (191.0; 178.9; 135.1)
3	5- <i>O</i> -Ácido cafeoilquinico	1.75	323.1	353.38 (191.2; 179.1; 135.1)
4	3- <i>O</i> -Ácido cafeoilquinico	1.86	323.1	353.38 (190.8; 179.0; 137.0)
5	4- <i>O</i> -Ácido feruloilquinico	1.88	323.1	367.36 (193.2; 172.8; 149.1; 134.0)
6	5- <i>O</i> -Ácido feruloilquinico	1.96	320.1	367.38 (192.7; 172.7; 149.2; 134.2)
7	Apigenina-6,8-di- <i>C</i> -glucopiranosidio	2.12	269.1; 321.0	593.42 (547.1; 503.0; 472.9; 431.1)
8	3- <i>O</i> -Ácido Isoferuloilquinico	2.25	318.1	367.59 (193.1; 172.8; 149.1; 133.8)
9	5- <i>O</i> -Ácido Isoferuloilquinico	2.47	323.1	367.17 (191.2; 172.8; 149.1; 134.1)
10	6(8)- <i>C</i> -furanosil-8(6)- <i>C</i> -hexosil-flavona	2.36	271.1; 331.1	563.48 (515.1; 473.1; 443.0; 383.1)
11	6(8)- <i>C</i> -hexosyl-8(6)- <i>C</i> -furanosil-flavona	2.50	271.3; 333.2	563.20 (515.1; 472.9; 442.9; 383.2)
12	3,4-di- <i>O</i> -Ácido cafeoilquinico	2.81	282.1; 320.5	515.20 (190.0; 162.9; 134.7)
13	3,5-di- <i>O</i> -Ácido cafeoilquinico	2.93	283.1; 321.2	515.17 (191.0; 163.0; 135.0)
14	4,5-di- <i>O</i> -Ácido cafeoilquinico	2.95	286.1; 320.3	515.40 (190.7; 163.0; 143.2; 127.0)
15	4- <i>O</i> -Ácido Isoferuloilquinico	3.46	322.1	367.22 (190.6; 163.0; 148.0)

TR (min): tempo de retenção em minutos, UV (nm): ultra violeta em nanômetros, LC-MS [M-H]⁻(m/z): cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em modo negativo, razão massa/carga.

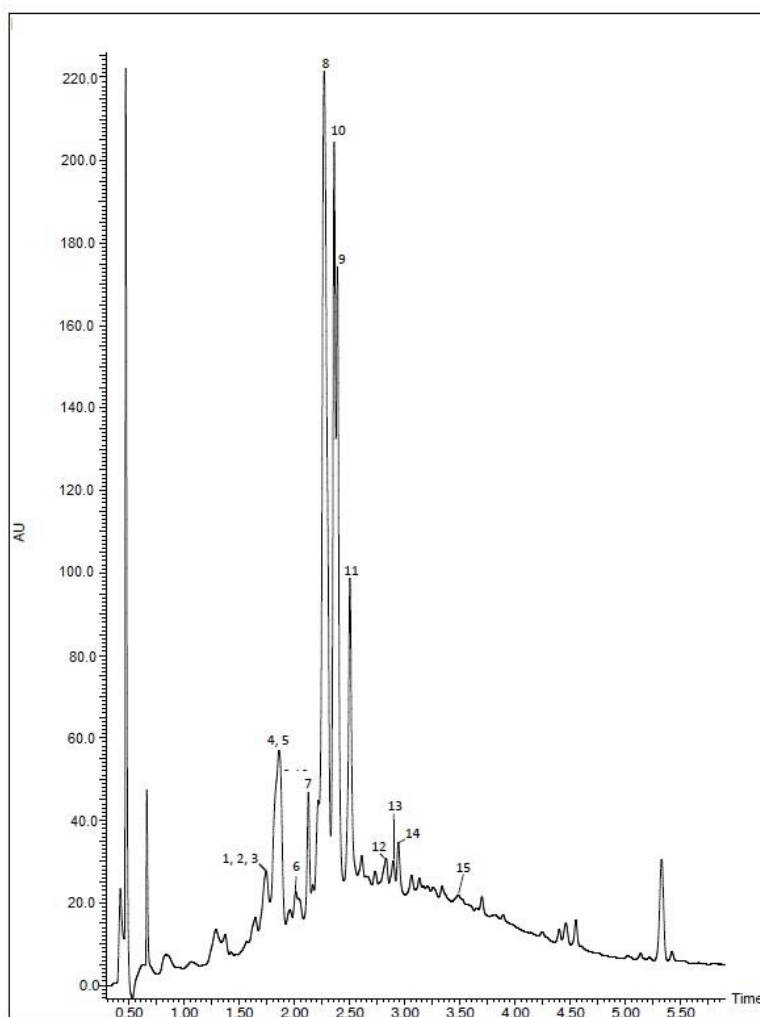
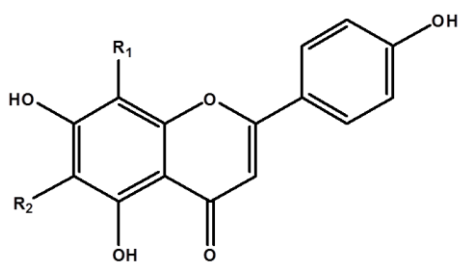
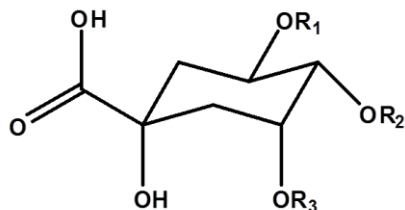


Figura 13: Perfil do extrato aquoso de *B. trimera*. Condições: CHS130 100 RP-18 de coluna (1,7 mm, 50 x 3 mm) id. A eluição foi realizada com um gradiente linear de água 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrilo 0,1% de ácido fórmico (B) (a partir de 5% a 95% de B, em 11 min) e as impressões digitais UPLC foram registradas em um aparelho Waters Acquity com um detector UV-DAD (Waters 2996). Parâmetros de funcionamento do espectrômetro de massa foram: temperatura capilar 320°C; voltagem da agulha de spray fixada em 3.50kV; ES tensão capilar 3 e - 47V para polaridade positiva e negativa, respectivamente; e lente do tubo deslocamento 0 e -25V para polaridade positiva e negativa, respectivamente. Usou-se nitrogênio como gás de bainha com um fluxo de 50 unidades arbitrárias. Análise de massa foi realizada no modo de varrimento total 100-1,500 amu, tanto no modo positivo e negativo.

ARAÚJO, G. R.



$R_1 = R_2 = \text{Glu}$; Apigenina-6,8-di-*C*-glicopiranosil-flavona
 $R_1 = \text{Fur}$; $R_2 = \text{Hex}$; Apigenina 6-*C*-furanosil-8-*C*-hexosil-flavona
 $R_1 = \text{Hex}$; $R_2 = \text{Fur}$; Apigenina-6-*C*-hexosil-8-*C*-furanosil-flavona



$R_1 = \text{Caf}$; $R_2 = R_3 = \text{H}$; 3-*O*-ácido cafeoilquinico
 $R_1 = R_3 = \text{H}$; $R_2 = \text{Caf}$; 4-*O*-ácido cafeoilquinico
 $R_1 = R_2 = \text{H}$; $R_3 = \text{Caf}$; 5-*O*-ácido cafeoilquinico
 $R_1 = \text{Fer}$; $R_2 = R_3 = \text{H}$; 3-*O*-ácido feruloilquinico
 $R_1 = R_3 = \text{H}$; $R_2 = \text{Fer}$; 4-*O*-ácido feruloilquinico
 $R_1 = R_2 = \text{H}$; $R_3 = \text{Fer}$; 5-*O*-ácido feruloilquinico
 $R_1 = \text{Isofer}$; $R_2 = R_3 = \text{H}$; 3-*O*-ácido isoferuloilquinico
 $R_1 = R_3 = \text{H}$; $R_2 = \text{Isofer}$; 4-*O*-ácido isoferuloilquinico
 $R_1 = R_2 = \text{H}$; $R_3 = \text{Isofer}$; 5-*O*-ácido isoferuloilquinico
 $R_1 = R_3 = \text{Caf}$; $R_2 = \text{H}$; 3,5-di-*O*-ácido cafeoilquinico
 $R_1 = R_2 = \text{Caf}$; $R_3 = \text{H}$; 3,4-di-*O*-ácido cafeoilquinico
 $R_1 = \text{H}$; $R_2 = R_3 = \text{Caf}$; 4,5-di-*O*-ácido cafeoilquinico

Figura 14: Estruturas químicas dos compostos encontrados na composição do extrato aquoso de *B. Trimera*.

5.2. Análise dos compostos fenólicos totais

Na figura 15 observamos que o extrato hidroetanólico de *B. trimera* possui quantidades significativamente maiores de compostos fenólicos em relação ao extrato aquoso, sugerindo diferença entre os compostos que são extraídos durante a obtenção dos extratos.

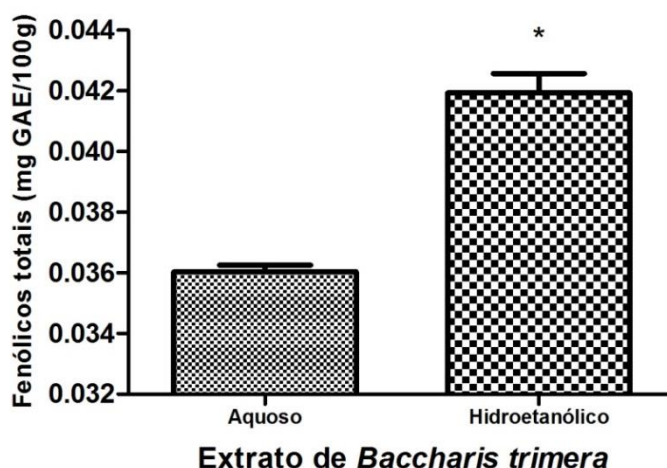


Figura 15: Avaliação de compostos fenólicos totais. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão, $p < 0.0010$ comparando os dois grupos entre si. O total de compostos fenólicos é expresso como equivalente de ácido gálico (mg) por 100 g dos extratos de *B. trimera*.

5.3. Avaliação do poder antioxidante *in vitro* por DPPH

Em nosso estudo determinamos a atividade antioxidante *in vitro* de cinco concentrações dos extratos hidroetanólico e aquoso de *Baccharis trimera*, bem como dos compostos quercetina e rutina, pelo método de DPPH. A capacidade de uma amostra em reduzir a absorvância do DPPH indica a capacidade da mesma em neutralizar radicais livres. Observamos que o extrato hidroetanólico tem o poder de inibir o radical DPPH em até 90% na concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, semelhante a maior concentração do padrão utilizado Trolox ($800 \mu\text{M}$ – 95,9%). Todas as outras concentrações (250 a $25 \mu\text{g mL}^{-1}$) também apresentaram poder em neutralizar o radical DPPH, embora em menores porcentagens. O extrato aquoso de *Baccharis trimera* também apresentou capacidade antioxidante *in vitro*, entretanto a capacidade em neutralizar o radical DPPH na maior concentração do extrato ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi de 68,1%. Os compostos quercetina e rutina ($500 \mu\text{M}$) apresentaram capacidade em neutralizar o radical DPPH em 86 e 83%, respectivamente. Observamos assim que os

ARAÚJO, G. R.

extratos de *Baccharis trimera* e os compostos quercetina e rutina apresentaram diferentes porcentagens de inibição de acordo com a concentração avaliada, porém em concentrações mais elevadas observamos que a capacidade de neutralização de radicais foi semelhante ao antioxidante de referência Trolox, utilizado nas concentrações de 100 a 800 μM .

Tabela 3: Atividade antioxidante dos extratos hidroetanólico e aquoso de *Baccharis trimera* e dos compostos quercetina e rutina por DPPH.

Atividade antioxidante por DPPH		% Inibição	
Trolox (μM)			
800		95,9 \pm 0,19	
700		83,3 \pm 3,05	
600		72,0 \pm 2,82	
500		60,4 \pm 4,79	
400		47,3 \pm 1,24	
300		32,9 \pm 1,53	
200		22,0 \pm 0,77	
100		10,5 \pm 1,06	
Extrato Hidroetanólico ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Extrato Aquoso ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
500	90,4 \pm 0,22	500	68,1 \pm 11,1
250	57,6 \pm 4,03	250	30,5 \pm 1,38
100	14,9 \pm 3,51	100	8,10 \pm 0,90
50	4,53 \pm 0,98	50	3,30 \pm 0,88
25	2,53 \pm 0,83	25	0,59 \pm 0,27
Quercetina (μM)		Rutina (μM)	
500	86,1 \pm 0,11	500	83,5 \pm 0,86
250	68,7 \pm 8,65	250	40,5 \pm 2,03
100	20,1 \pm 1,27	100	29,0 \pm 4,47
50	2,93 \pm 0,61	50	8,14 \pm 0,67
25	1,07 \pm 0,71	25	0,44 \pm 0,12

DPPH (2,2-difenil-1- picril-hidrazil); Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8 – tetrametilcromo – 2 ácido carboxílico). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão. Os ensaios foram realizados em triplicata num tempo de incubação de 30 minutos.

5.4. Avaliação da Viabilidade Celular através do teste de MTT

Extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera*

Na figura 16 – painel A podemos observar que células da linhagem SK Hep-1 incubadas durante 12 horas com o extrato hidroetanólico de *B. trimera* apresentaram diminuição significativa na viabilidade celular nas concentrações de 5; 10; 25; 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, quando comparados com as células controle (C). No tempo de 24 horas (painel B), observamos uma redução significativa na viabilidade dessas células nas concentrações de 0.5, 2.5, 5, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e quando incubadas por 48 horas (painel C) observamos também redução significativa da viabilidade nas concentrações acima de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Como mencionado anteriormente, segundo a ISO2009-10993-5, um composto é considerado citotóxico quando a viabilidade celular atinge valores menores que 70%. Assim podemos inferir que, apesar de ter sido observado uma diminuição significativa da viabilidade em 12 horas de incubação a partir da concentração de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sugere-se que o extrato hidroetanólico não foi citotóxico neste tempo, pois em todas as concentrações avaliadas a viabilidade foi mantida acima de 70%. Entretanto em 24 horas de exposição houve uma redução na viabilidade em todas as concentrações avaliadas, e nas concentrações mais elevadas (25, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) a viabilidade foi menor que 70% (63%, 45%, 25% respectivamente). Em 48 horas de exposição também houve redução da viabilidade na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (45%). Esses resultados, portanto, sugerem que o extrato hidroetanólico de *B. trimera* é citotóxico para a linhagem SK Hep-1 em altas concentrações e tempos elevados de exposição.

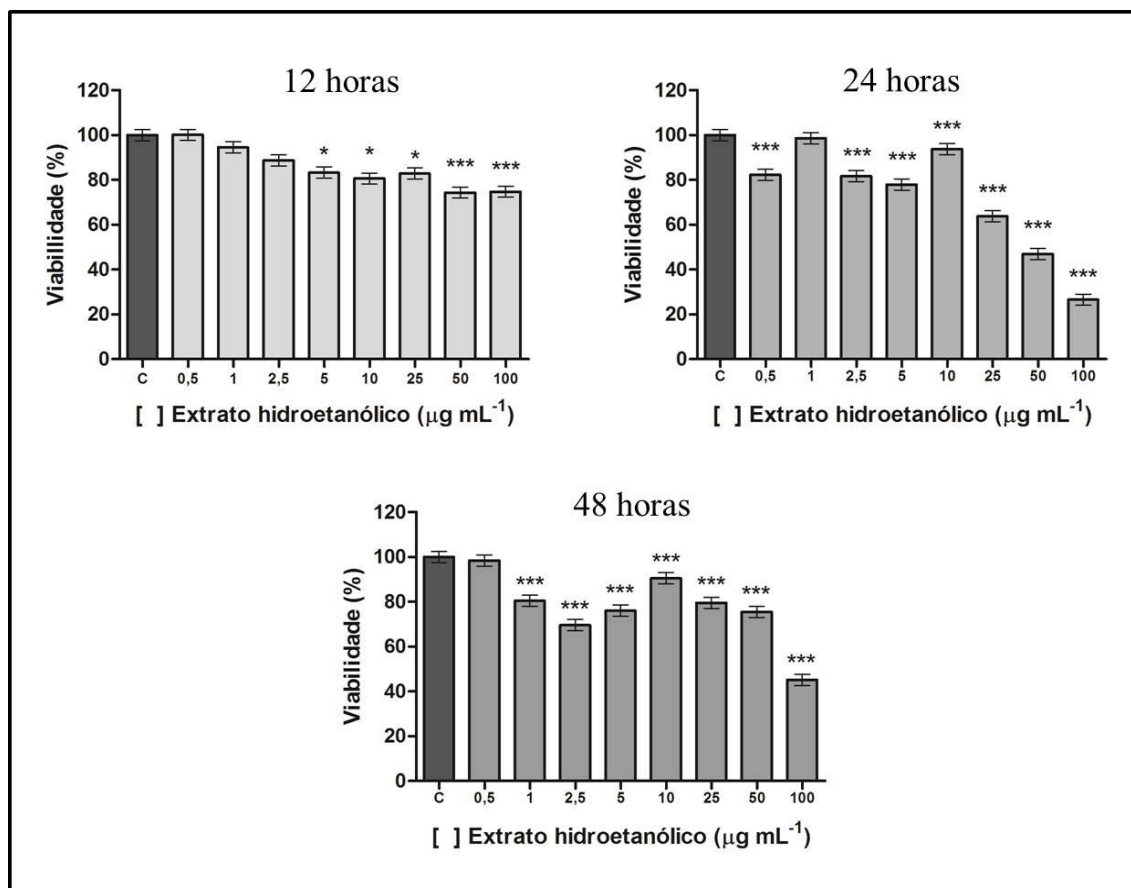


Figura 16: Viabilidade na linhagem celular SK Hep-1 incubada com o extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera*. Células foram incubadas por 12 (painel A), 24 (painel B) e 48 horas (painel C) com 8 concentrações do extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* (0,5; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50 e 100 µg/mL). Os ensaios foram realizados em sextuplicata, sendo que para cada tempo de incubação foi realizado um controle -C- (células não tratadas) e para este consideramos 100% de viabilidade celular. Foi realizado teste ANOVA-one way, seguido do pós-teste de Dunnet. (*) p < 0.05; (***) p < 0.0001.

Extrato Aquoso de *Baccharis trimera*.

A figura 17 representa o teste de viabilidade realizado com o extrato aquoso de *Baccharis trimera*. Nossos resultados mostram que células SK Hep-1 apresentaram uma diminuição significativa na viabilidade celular nas concentrações de 0,5, 2,5; 5; 10; 25; 50 e 100 µg mL⁻¹, no período de 12 horas de incubação (painel A) quando comparados com as células controle (C). Em 24 horas (painel B), observamos uma diminuição significativa na viabilidade dessas células nas concentrações de 2,5, 5, 10 e 100 µg mL⁻¹. Quando incubadas por 48 horas (painel C) observamos redução da viabilidade apenas na concentração de 1 µg mL⁻¹. Assim como o ocorrido no extrato hidroetanólico, apesar da diminuição significativa da porcentagem de células viáveis nos tempos estudados, o extrato aquoso não foi citotóxico em nenhum dos tempos e concentrações avaliadas,

ARAÚJO, G. R.

pois a viabilidade celular foi acima de 70% em todas as análises, sendo estes resultados de acordo com o padrão definido pela ISO2009-10993-5.

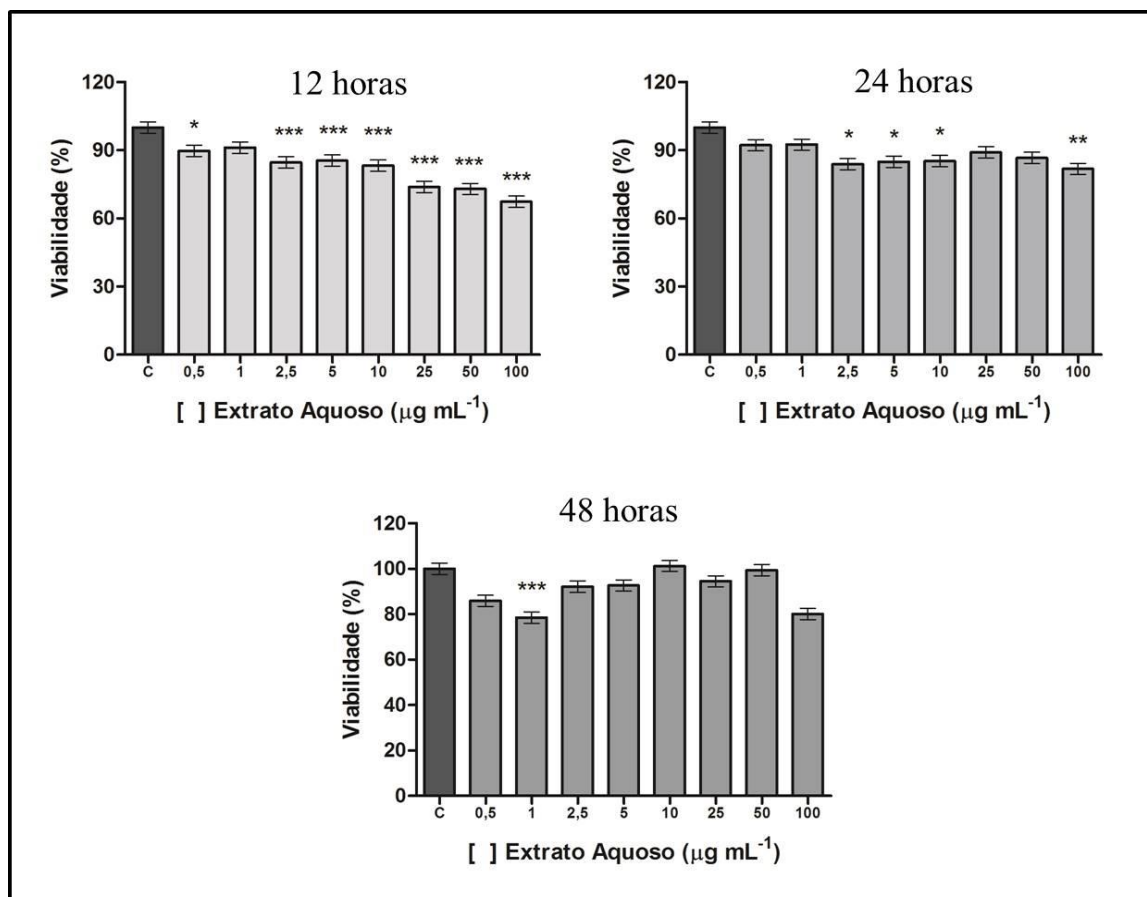


Figura 17: Viabilidade na linhagem celular SK Hep-1 incubada com o extrato aquoso de *Baccharis trimera*. Células foram incubadas por 12 (painel A), 24 (painel B) e 48 horas (painel C) com 8 concentrações do extrato (0,5; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50 e 100 µg/mL). Os ensaios foram realizados em sextuplicata, sendo que para cada tempo de incubação foi realizado um controle - C- (células não tratadas) e para este consideramos 100% de viabilidade celular. Foi realizado teste ANOVA-oneway, seguido pelo pós-teste de Dunnet. (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.001$; (***) $p < 0.0002$.

Quercetina

Na figura 18 (painel A) podemos observar que células incubadas durante 12 horas com quercetina não apresentaram diferença significativa na viabilidade celular em nenhuma das concentrações avaliadas quando comparados às células controle (C). Entretanto, no tempo de 24 horas (painel B), observamos uma diminuição significativa na viabilidade dessas células nas concentrações de 5, 50 e 100 µM. Quando incubadas por 48 horas (painel C) também observamos uma redução na viabilidade celular nas

ARAÚJO, G. R.

concentrações 25, 50 e 100 μM . Analisando estes resultados em conjunto podemos observar que a quercetina não apresentou citotoxicidade nos tempos de 12 e 24 horas de incubação, pois a viabilidade das células foi acima de 75% em todas as análises, conforme o padrão definido pela ISO2009-10993-5. Entretanto no tempo de 48 horas observamos que a porcentagem de células viáveis nas concentrações 50 e 100 μM foi menor que 70%, indicando citotoxicidade da quercetina nestas concentrações no tratamento por 48 horas.

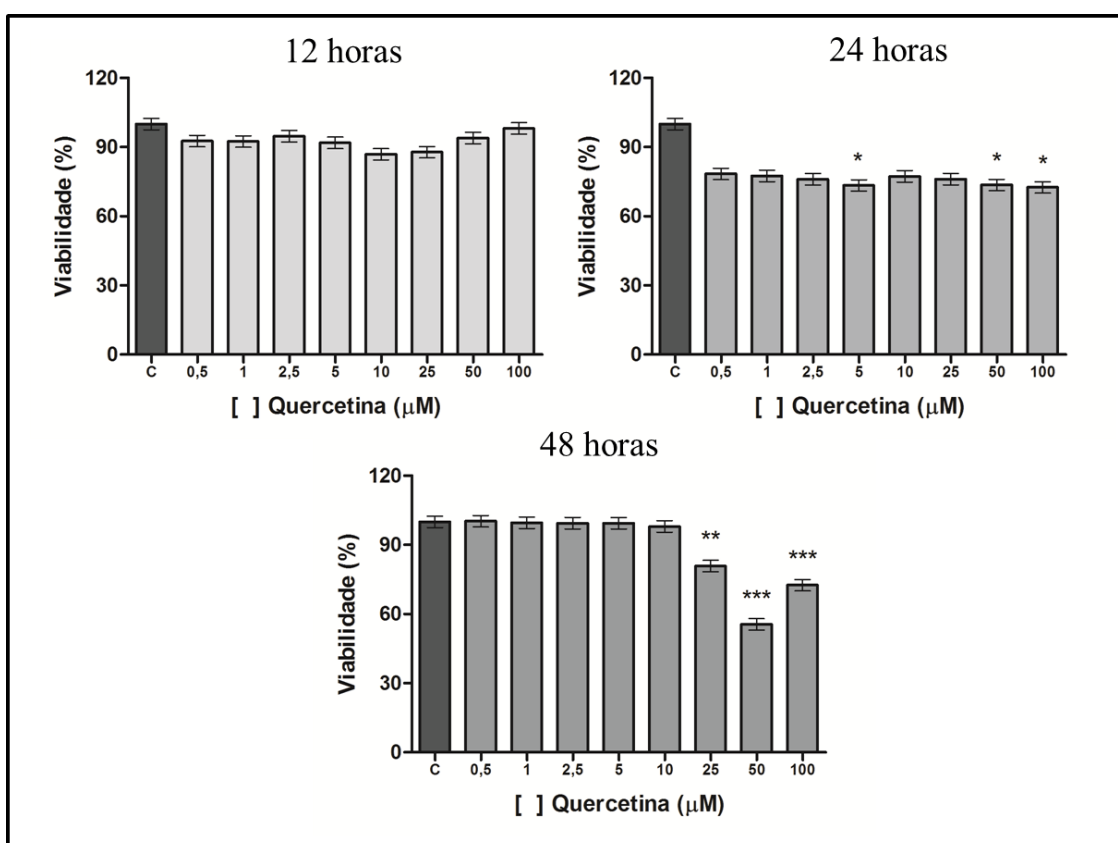


Figura 18: Viabilidade na linhagem celular SK Hep-1 incubadas com quercetina utilizando o teste de MTT. Células foram incubadas por 12 (painel A), 24 (painel B) e 48 horas (painel C) com 8 concentrações do composto (0.5; 1; 2.5; 5; 10; 25; 50 e 100 μM). Os ensaios foram realizados em sextuplicata, sendo que para cada tempo de incubação foi realizado um controle - C- (células não tratadas) e para este consideramos 100% de viabilidade celular. Foi realizado teste ANOVA-oneway, seguido do pós-teste de Dunnet. (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.001$, (***) $p < 0.0001$.

Rutina

Os resultados da figura 19 mostram que as células SK Hep-1 incubadas por 12 horas (painel A) com rutina não apresentaram alteração significativa na viabilidade celular em nenhuma das concentrações utilizadas. Entretanto, no tempo de 24 horas (painel B), observamos uma diminuição na viabilidade dessas células na concentração de 100 μM . Quando as células foram incubadas por 48 horas (painel C) com rutina também observamos uma redução significativa da viabilidade celular, porém em todas as concentrações estudadas (0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50 e 100 μM). Vale ressaltar que a rutina não apresentou citotoxicidade nos tempos de 12 e 24 horas de incubação, pois a porcentagem de células viáveis foi maior que 70% em todas as análises. Entretanto no tempo de 48 horas observamos que a porcentagem de células viáveis nas concentrações 50 e 100 μM foi menor que 70%, e na concentração 25 μM foi de 70%, indicando uma citotoxicidade da rutina nestas concentrações no tratamento por 48 horas.

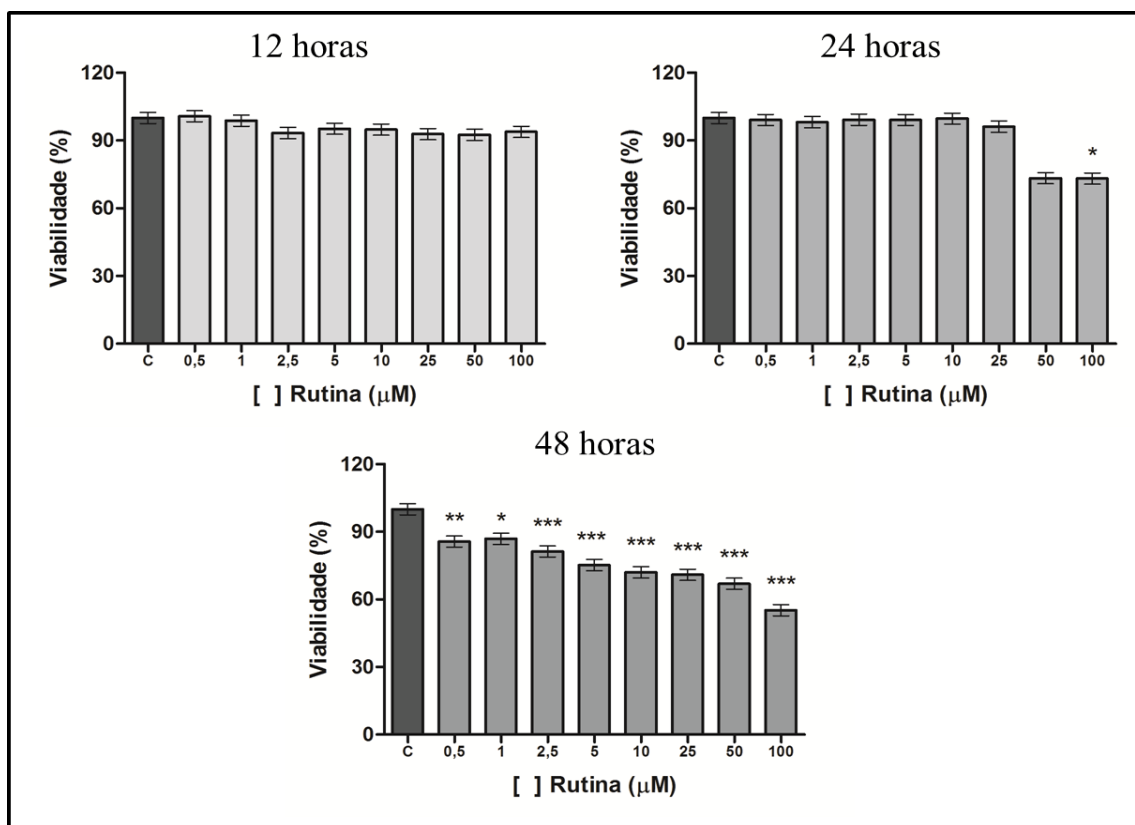


Figura 19: Viabilidade na linhagem celular SK Hep-1 incubadas com rutina utilizando MTT. Células foram incubadas por 12, 24 e 48 horas com 8 concentrações do composto (0.5; 1; 2.5; 5; 10; 25; 50 e 100 μM). Os ensaios foram realizados em sextuplicata, sendo que para cada tempo de incubação foi realizado um controle -C- (células não tratadas) e para este consideramos 100% de viabilidade celular. Foi realizado teste ANOVA-owney, seguido pelo pós-teste de Dunnet. (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.001$, (***) $p < 0.0001$.

5.5. Análise quantitativa da produção de ERO por citometria de fluxo

5.5.1. Influência da via de sinalização de PKC e da NADPH oxidase na produção de ERO em células SK Hep-1

Para avaliarmos a influência da via da PKC na produção de ERO em células da linhagem SK Hep-1, as mesmas foram incubadas durante 30 minutos (Figura 20, painel A) ou 6 horas (Figura 20, painel B) com os ativadores da PKC, PMA (50nM) e ionomicina (100nM). Os resultados ilustrados na figura mostram que células incubadas com PMA e ionomicina apresentaram um aumento significativo na produção de ERO quando comparadas às células controle (células não estimuladas) (Figura 20). Para avaliar a influência da enzima NADPH oxidase na produção de ERO, as células foram pré-incubadas com DPI (20 μ M), um inibidor da NADPH oxidase, durante 30 minutos (Painel A) ou 6 horas (Painel B). Os resultados mostram uma redução significativa na produção de ERO nas células quando comparadas com as células estimuladas (PMA + iono), sugerindo a importância da NADPH oxidase na produção de ERO através da via de sinalização da PKC em células desta linhagem.

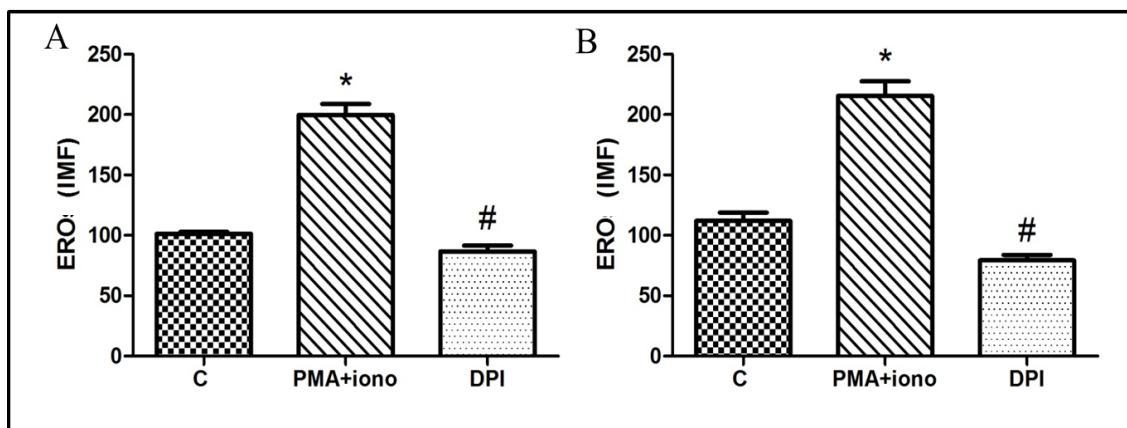


Figura 20: Produção de ERO em células SK Hep-1 e a influência da via PKC/NADPH oxidase. **Painel A:** 30 minutos de incubação; **Painel B:** 6 horas de incubação. Carboxy - H₂DCFDA foi utilizada para quantificar a produção de ERO. C: Células controle incubadas somente com Carboxy - H₂DCFDA. PMA+Iono: células estimuladas com os ativadores de PKC (PMA +iono). DPI: células pré-tratadas com o inibidor da NADPH oxidase (30 minutos-Painel A ou 6 horas- Painel B) e posteriormente estimuladas com PMA+iono. Os resultados são expressos como média±erro padrão. Para a análise estatística foi realizado o teste ANOVA one-way, seguido do pós-teste de Dunns. Este experimento foi realizado em duplicata em três experimentos independentes. *p<0.05 comparando-se Controle versus PMA+iono. #p<0.05 comparando-se PMA+iono versus DPI.

5.5.2. Avaliação da produção de ERO em células incubadas com os extratos hidroetanólico ou aquoso de *B. trimera*, quercetina e rutina

Avaliamos a produção de ERO nas células de linhagem SK Hep-1 através do marcador carboxy- H_2DCFDA por citometria de fluxo. As células foram incubadas com os extratos hidroetanólico ou aquoso de *B. trimera*, quercetina ou rutina em dois tempos distintos (30 minutos – painel A e 6 horas – painel B). Os resultados da Figura 21 – Painéis A e B demonstram que não há diferença na produção de ERO em células incubadas com $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos extratos hidroetanólico (He) ou aquoso (Aq) de *B. trimera*. O mesmo perfil foi observado para a quercetina (Que) e rutina (Rut) na concentração de $10 \mu\text{M}$. Para avaliar o efeito dos extratos de *B. trimera* na modulação da produção de ERO através da via da PKC, as células foram pré-incubadas com os extratos hidroetanólico ou aquoso de *B. trimera* ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), quercetina ou rutina (controles positivos; $10 \mu\text{M}$), seguidos de uma incubação com PMA+ionomicina. Observamos também que nestas concentrações, os extratos de *B. trimera*, quercetina e rutina não foram capazes de alterar a produção de ERO em nenhum dos tempos avaliados.

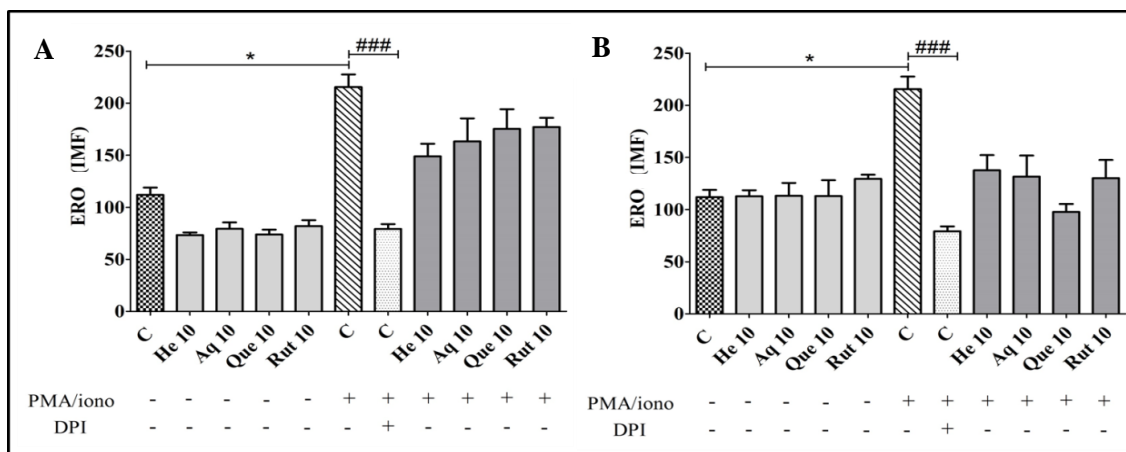


Figura 21: Produção de ERO em células SK Hep-1 expostas aos extratos hidroetanólico e aquoso ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) de *B. trimera* e aos compostos quercetina e rutina ($10 \mu\text{M}$). **Painel A:** As células foram expostas aos tratamentos com $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos extratos hidroetanólico (He) ou aquoso (Aq) de *Baccharis trimera*, $10 \mu\text{M}$ de quercetina ou rutina, ou $20 \mu\text{M}$ de DPI por 30 minutos, e os grupos estimulados foram posteriormente incubados com PMA+Iono. **Painel B:** As células foram tratadas com as mesmas concentrações dos extratos de *B. trimera* ou os compostos quercetina, rutina ou DPI por 6 horas, e os grupos estimulados tratados posteriormente por 30 minutos com PMA+iono. Os resultados são expressos como média±erro padrão. Para a análise estatística foi realizado o teste ANOVA one-way, seguido do pós-teste de Dunns. Este experimento foi realizado em duplicata em três experimentos independentes. * $p < 0.05$, para valores significativamente diferentes do grupo controle. ### $p < 0.0001$ para valores significativamente diferentes do grupo controle estimulado.

A Figura 22 mostra os resultados obtidos com as células expostas às concentrações de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos extratos hidroetanólico (He) ou aquoso (Aq) de *B. trimera* e $25 \mu\text{M}$ dos compostos quercetina e rutina durante 30 minutos (painel A) ou 6 horas (painel B), seguidas ou não pela incubação com os ativadores da PKC. Podemos observar que na concentração de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$, os extratos hidroetanólico e aquoso foram capazes de modular a produção de ERO em células não estimuladas (basal) no tempo de exposição de 30 minutos (Painel A). Assim como os extratos de *B. trimera*, a quercetina na concentração de $25 \mu\text{M}$ também foi capaz de reduzir significativamente a produção de ERO nas células SK Hep-1, entretanto não foi observado nenhum efeito da rutina. Observamos ainda que nas células previamente expostas aos extratos de *B. trimera*, quercetina e rutina, durante 30 minutos e posteriormente estimuladas (PMA+iono), não observamos nenhuma diferença em relação à produção de ERO quando comparadas às células estimuladas (PMA+iono) (Painel A). No Painel B observamos que apenas o extrato hidroetanólico de *B. trimera* foi capaz de diminuir a produção de ERO quando comparado com as células controles (não estimuladas). Já nas células expostas com os extratos hidroetanólico e aquoso, quercetina ou rutina por 6 horas, observamos uma redução significativa na produção de ERO apenas em células pré-incubadas com $25 \mu\text{M}$ de quercetina e posteriormente estimuladas com PMA+iono.

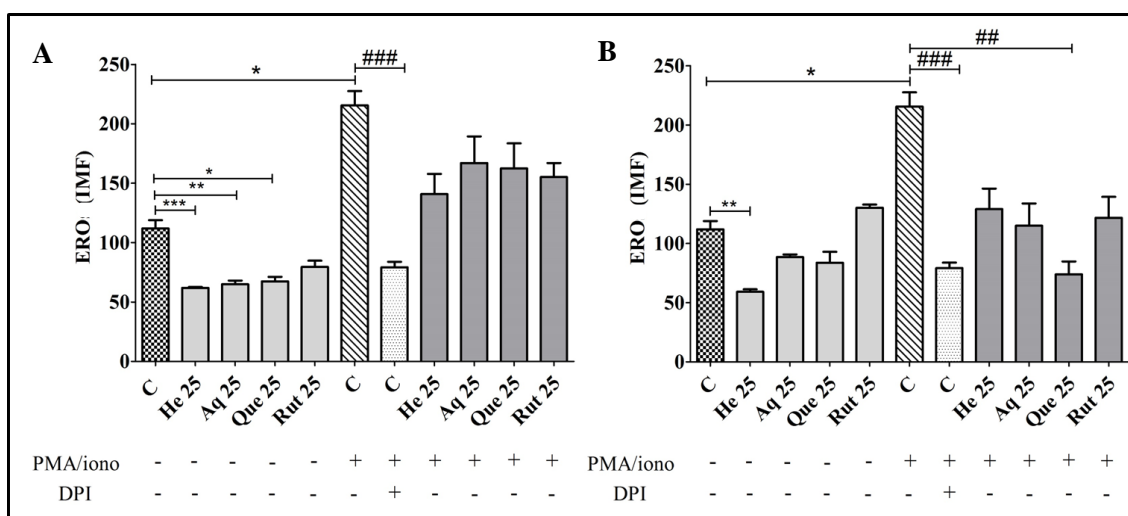


Figura 22: Produção de ERO em células SK Hep-1 expostas aos extratos hidroetanólico e aquoso ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) de *B. trimera* e aos compostos quercetina e rutina ($25 \mu\text{M}$). **Painel A:** As células foram expostas aos tratamentos com $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos extratos hidroetanólico (He) ou aquoso (Aq) de *Baccharis trimera*, $25 \mu\text{M}$ de quercetina ou rutina, ou $20 \mu\text{M}$ de DPI por 30 minutos, e os grupos estimulados foram posteriormente incubados com PMA+Iono. **Painel B:** As células foram tratadas com as mesmas concentrações dos extratos de *B. trimera* ou os compostos quercetina, rutina ou DPI por 6 horas, e os grupos estimulados tratados posteriormente por 30 minutos com PMA+iono. Carboxy - H_2DCFDA foi utilizada para marcar a produção de ERO, e para a análise foi utilizado citômetro de fluxo FACSCalibur. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão. Para a análise estatística foi realizado o teste ANOVA one-way, seguido do pós-teste de Dunns. Este experimento foi realizado em duplicata em três experimentos independentes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ para valores significativamente diferentes do grupo controle (células controle, sem estímulo). ## $p < 0.001$, ### $p < 0.0001$ para valores significativamente diferentes do grupo controle estimulado (C/PMA+iono).

Na Figura 23 – Painéis A e B podemos observar o efeito da incubação das células SK Hep-1 com os extratos hidroetanólico ou aquoso de *B. trimera* na concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e com os compostos quercetina ou rutina na concentração de $50 \mu\text{M}$. Em 30 minutos de incubação (painel A) podemos observar que os extratos hidroetanólico e aquoso de *B. trimera*, quercetina e rutina foram capazes de diminuir significativamente a produção de ERO em relação às células não estimuladas (basal). No painel A também podemos observar que a pré-incubação das células com os extratos de *B. trimera*, quercetina ou rutina durante 30 minutos e posteriormente estimuladas com PMA+iono não foi capaz de alterar a produção de ERO. No Painel B, observamos que os extratos hidroetanólico e aquoso, assim como a quercetina foram capazes de reduzir a produção de ERO em células SK Hep-1 comparadas às células sem estímulo. Ainda no Painel B, observamos que houve uma diminuição na produção de ERO em

células pré-tratadas com extrato hidroetanólico e quercetina e posteriormente estimuladas com PMA+Iono.

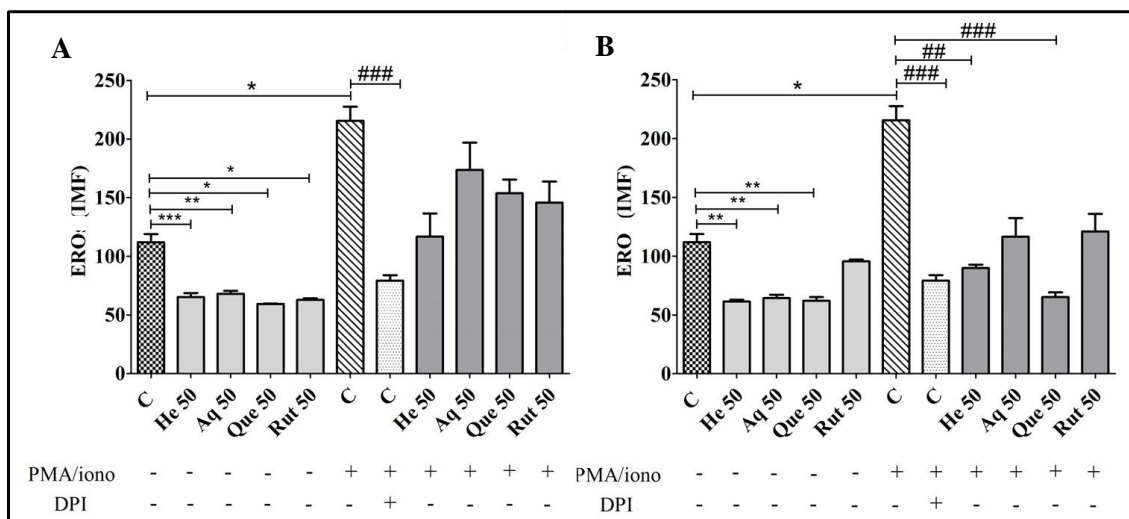


Figura 23: Produção de ERO em células SK Hep-1 expostas aos extratos hidroetanólico e aquoso ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) de *B. trimera* e aos compostos quercetina e rutina ($50 \mu\text{M}$). **Painel A:** As células foram expostas aos tratamentos com $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos extratos hidroetanólico (He) ou aquoso (Aq) de *Baccharis trimera*, $50 \mu\text{M}$ de quercetina ou rutina, ou $20 \mu\text{M}$ de DPI por 30 minutos, e os grupos estimulados foram posteriormente incubados com PMA+Iono por mais 30 minutos. **Painel B:** As células foram tratadas com as mesmas concentrações dos extratos de *B. trimera* ou os compostos quercetina, rutina ou DPI por 6 horas, e os grupos estimulados tratados posteriormente por 30 minutos com PMA+iono. Carboxy - H_2DCFDA foi utilizada para marcar a produção de ERO, e para a análise foi utilizado citômetro de fluxo FACSCalibur. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão. Para a análise estatística foi realizado o teste ANOVA one-way, seguido do pós-teste de Dunns. Este experimento foi realizado em duplicata em três experimentos independentes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ para valores significativamente diferentes do grupo controle (células controle, sem estímulo). # $p < 0.001$, ### $p < 0.0001$ para valores significativamente diferentes do grupo controle estimulado (C/PMA+iono).

Ao final de todos os experimentos realizados avaliamos porcentagem de células viáveis pelo método de exclusão com azul de trypan (resultado não mostrado). A viabilidade das células em todos os experimentos foi maior que 85%. A figura 24 é a representação das imagens obtidas por citometria de fluxo, coluna 1 representa o tamanho por granulosidade da célula, coluna 2- representa o canal que identifica a fluorescência, coluna 3- representa o histograma que quantifica a quantidade de ERO formada e marcada nas células.

ARAÚJO, G. R.

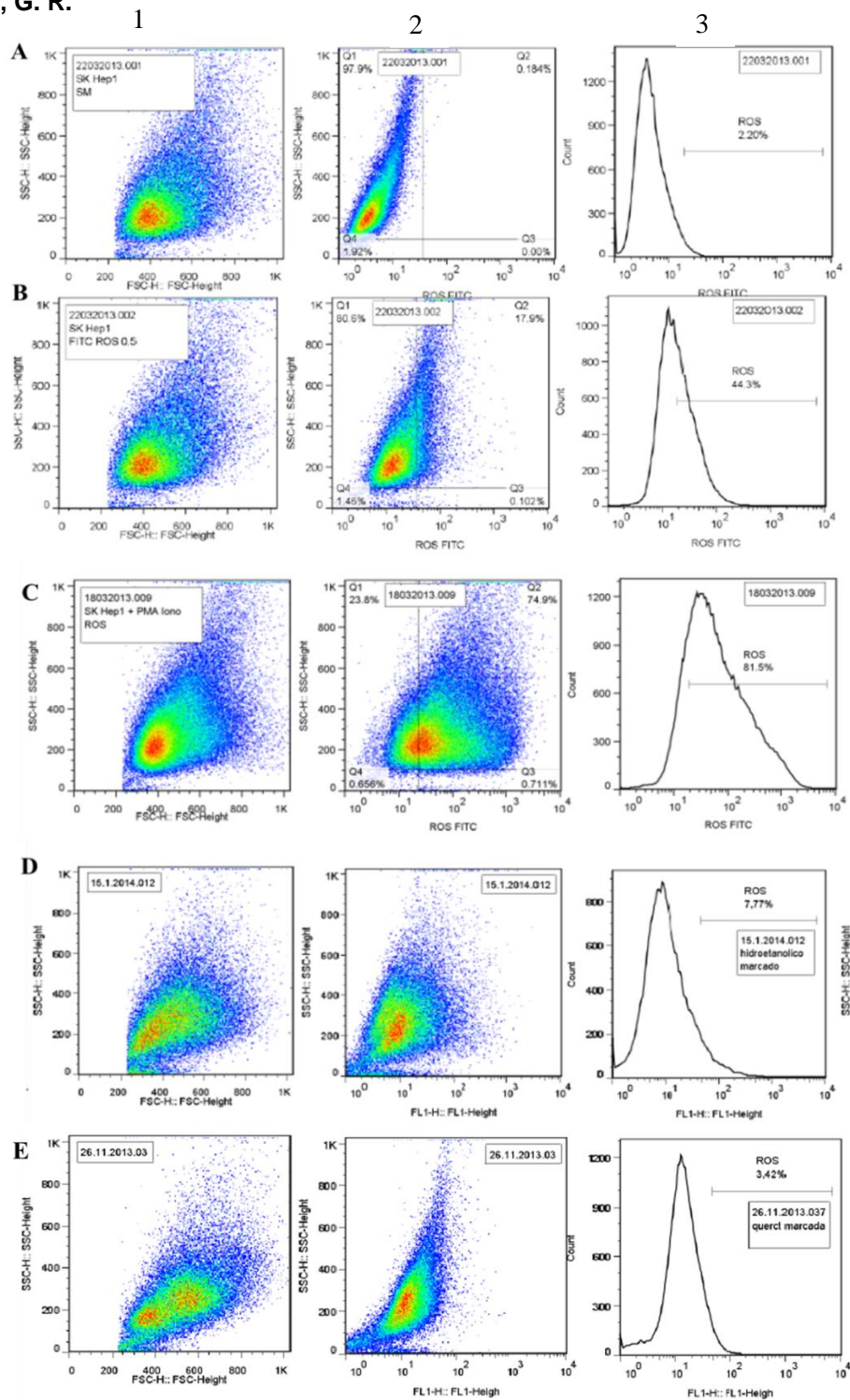


Figura 24: Gráficos representativos da análise de ERO por citometria de fluxo. 1-representa o tamanho da célula por sua granulosidade. 2-representa o canal que identifica a fluorescência no citômetro por granulosidade. 3- representa o histograma da quantidade de ERO observada. **Painel A:** células SK Hep-1 sem o marcador Carboxy - H₂DCFDA. **Painel B:** Células SK Hep-1 com o marcador Carboxy - H₂DCFDA. **Painel C:** células estimuladas com PMA/iono e incubadas com marcador Carboxy - H₂DCFDA. **Painel D:** Células pré-tratadas com o extrato hidroetanólico (50µg mL⁻¹) de *B. trimera* e posteriormente incubadas com o marcador Carboxy - H₂DCFDA. **Painel E:** Células pré-tratadas com quercetina (50µM) e posteriormente incubadas com o marcador Carboxy - H₂DCFDA.

ARAÚJO, G. R.

5.5.3. Representação qualitativa da produção de ERO por microscopia de fluorescência.

A Figura 25 mostra a representação por microscopia de fluorescência do efeito do extrato hidroetanólico de *B. trimera* na diminuição da produção de ERO em células SK Hep-1. Podemos observar que houve um aumento na fluorescência em células estimuladas com PMA+ionomicina em relação às células controle (não estimuladas). Quando as células foram pré-incubadas com DPI observamos uma diminuição da fluorescência comparada ao grupo estimulado. O mesmo efeito foi observado em relação ao extrato hidroetanólico ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) de *B. trimera* e ao composto quercetina ($50\mu\text{M}$), confirmando assim o efeito destes compostos na modulação de ERO via PKC.

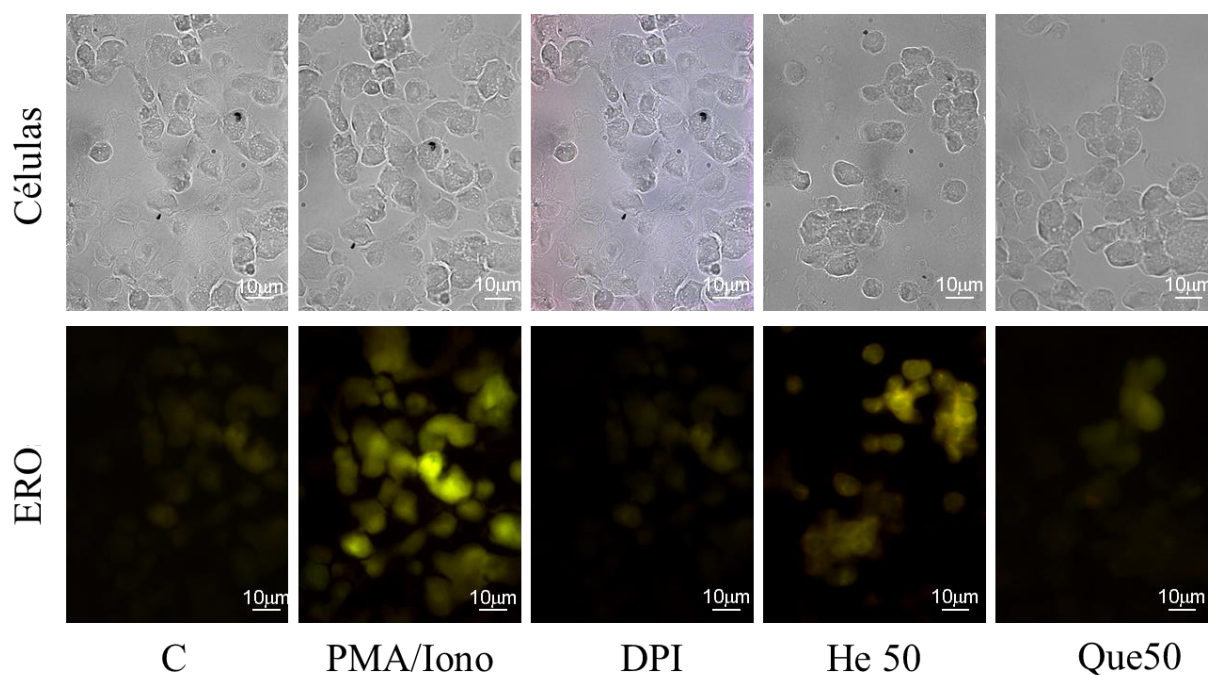


Figura 25: Representação qualitativa da produção de ERO: As amostras foram marcadas com Carboxy- H_2DCFDA e visualizadas através de microscopia de fluorescência. Células: SK Hep-1 sem fluorescência. ERO – células com marcador Carboxy- H_2DCFDA analisadas por fluorescência. C: Células controle; PMA/Iono: células controle estimuladas com PMA+ionomicina; DPI: Células pré-tratadas com DPI e estimuladas com PMA/Iono; He50: Células pré-tratadas com $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de extrato hidroetanólico de *B. trimera* e posteriormente estimuladas com PMA/Iono; Que50: Células pré-tratadas com quercetina $50 \mu\text{M}$ e estimuladas com PMA/iono.

Como demonstrado pelas análises por citometria de fluxo, o extrato hidroetanólico de *B. trimera* ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e a quercetina (25 e $50 \mu\text{M}$) podem inibir a produção de ERO através da via de PKC em células SK Hep-1 expostas a estes compostos por 6 horas. Para comprovar essa hipótese mais quatro experimentos foram realizados, a expressão proteica e a atividade da PKC bem como a expressão da subunidade p47^{phox} na forma fosforilada e não fosforilada da NADPH oxidase.

5.6. Análise da expressão proteica da PKC através de Western Blotting

A PKC é responsável pela fosforilação da p47^{phox} e conseqüentemente ativação da NADPH oxidase, gerando assim um aumento na produção de ERO. Na figura 26, demonstramos que células SK Hep-1 incubadas com PMA+iono (ativadores convencionais de PKC) mostraram um aumento na expressão proteica da PKC, embora não estatisticamente significativo, já as células incubadas com calfoestim C (inibidor da PKC) mostrou uma diminuição significativa na expressão proteica desta cinase. Podemos observar ainda que a incubação de células SK Hep-1 com o extrato hidroetanólico de *B. trimera* ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e quercetina ($50 \mu\text{M}$) por 6 horas foi responsável pela diminuição significativa da expressão proteica da PKC aos níveis similares daqueles observados no controle negativo (calfoestim C).

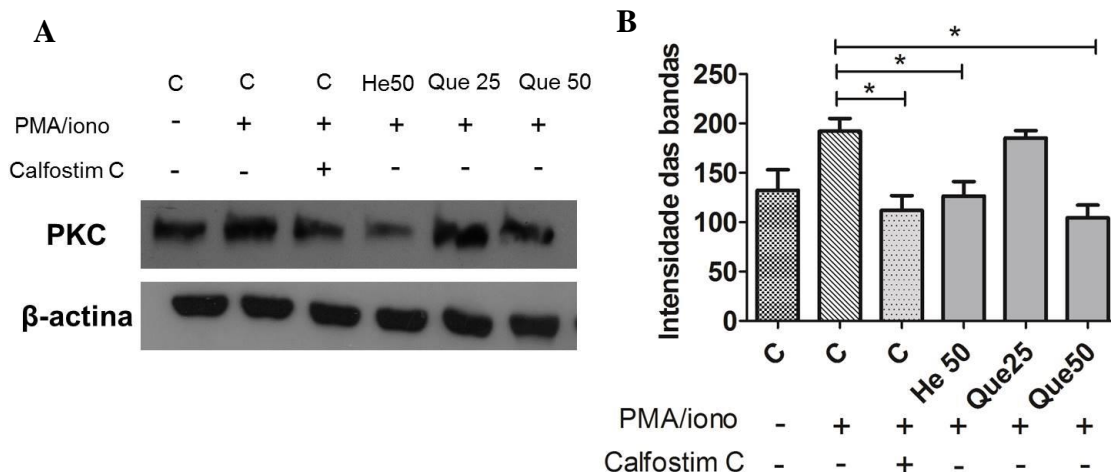


Figura 26: Avaliação da expressão proteica da PKC em células SK Hep-1 incubadas com o extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* e quercetina. **Painel A:** Imagem representativa das bandas da PKC e β -actina em filme de raio X. **Painel B:** Análise quantitativa por densitometria dos níveis proteicos da PKC em células SK Hep-1. Os resultados do ensaio de Western Blot mostraram um aumento na expressão proteica da PKC através do estímulo com PMA+Ionomicina em células SK Hep-1 e o efeito do extrato hidroetanólico de *B. trimera* e da quercetina nesta proteína. β -actina foi utilizada como padrão de expressão proteica endógena. * $p < 0.05$ para valores significativamente diferentes do grupo controle estimulado (C+PMA/Iono). As análises foram realizadas utilizando o software Quantity one (Bio Rad). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão. Diferenças estatísticas significativas foram determinadas utilizando ANOVA one-way, seguido do pós-teste de Dunnet. Esta análise foi realizada em triplicata.

5.7. Atividade da PKC

Como podemos observar na Figura 27, a atividade da PKC no grupo controle estimulado (PMA+iono) foi significativamente maior que no grupo controle sem estímulo (somente células). Observamos ainda que quando as células foram incubadas com calfoestim C houve uma redução significativa na atividade desta proteína cinase em relação ao grupo estimulado (PMA+iono). O extrato hidroetanólico de *B. trimera* na concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e a quercetina na concentração de $50 \mu\text{M}$ também foram capazes de reduzir significativamente a atividade da PKC nas células SK Hep-1 expostas a esses compostos durante 6 horas e posteriormente estimuladas com PMA+Iono. O controle positivo (PKC) foi fornecido pelo kit para verificar a acurácia do mesmo. Podemos observar que a atividade da enzima purificada é 250 vezes maior do que a atividade da PKC em células controles.

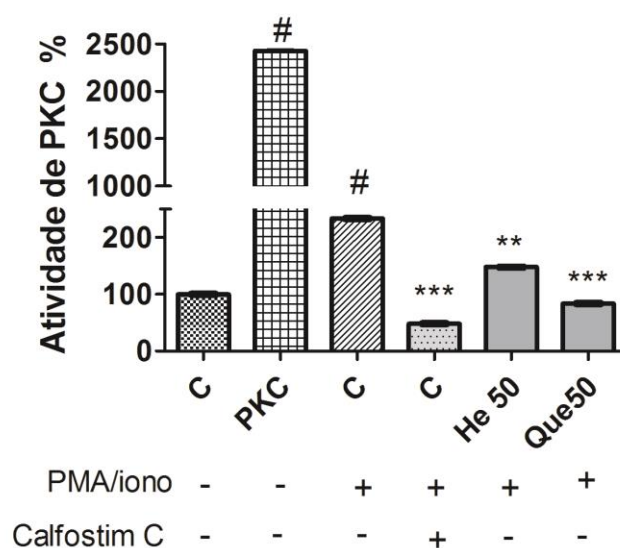


Figura 27: Avaliação da atividade de PKC em células SK Hep-1 incubadas com o extrato hidroetanólico de *B. trimera* e da quercetina. A atividade de PKC nas células expostas ao extrato de *B. trimera* e quercetina seguido do estímulo com PMA+ionomicina foi avaliada utilizando um kit comercial da Enzo Life Sciences. Como controle positivo, a PKC purificada foi fornecida pelo kit. # $p < 0.0001$ para valores significativamente diferentes do grupo C (células controles sem estímulo); ** $p < 0.001$ and *** $p < 0.0001$ para valores significativamente diferentes do grupo controle estimulado (C+PMA/Iono). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão. Diferenças significativas foram determinadas através do teste ANOVA one-way, seguido do pós-teste de Dunns. Esta análise foi realizada em triplicata em dois experimentos independentes ($n=6$).

5.8. Análise da expressão da subunidade $p47^{phox}$ e $p47^{phox}$ fosforilada

Como mencionado anteriormente, a expressão de $p47^{phox}$ é um evento necessário para a formação do complexo da NADPH oxidase, uma das maiores fontes de ERO nas células. Na Figura 28 avaliamos o nível de expressão proteica da subunidade $p47^{phox}$ em células tratadas com o extrato hidroetanólico de *B. trimera* e quercetina. No painel A temos a foto representativa dos filmes do *western blotting*, mostrando a subunidade $p47^{phox}$ e a β -actina, que foi utilizada como normalizador endógeno. No painel B avaliamos quantitativamente a expressão proteica da subunidade $p47^{phox}$ e nenhuma diferença significativa foi observada quando comparamos os grupos experimentais.

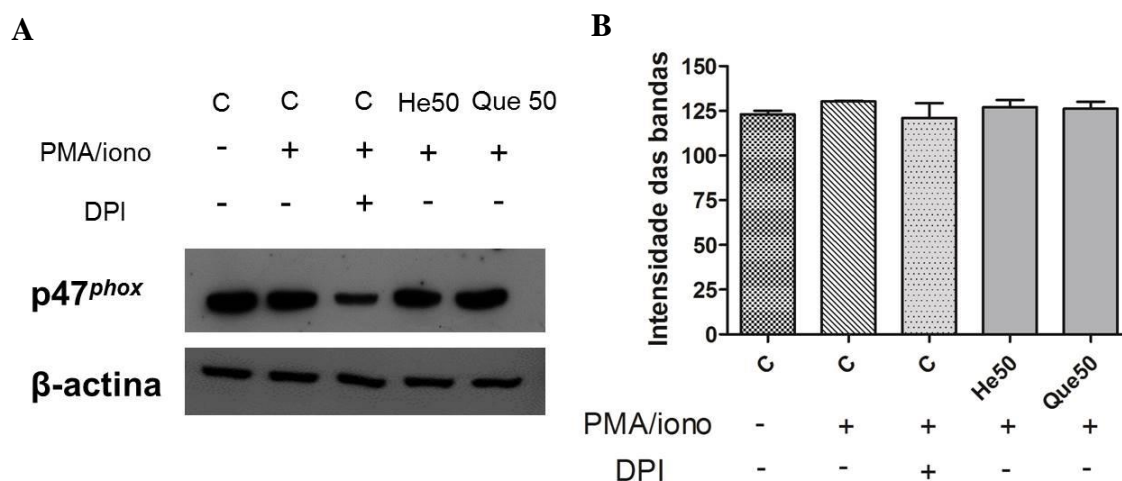


Figura 28: Avaliação da expressão proteica de $p47^{phox}$ em células SK Hep-1 incubadas com o extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* e quercetina. . **Painel A:** Imagem representativa das bandas de $p47^{phox}$ e β -actina em filme de raio X. **Painel B:** Análise quantitativa por densitometria dos níveis proteicos da subunidade $p47^{phox}$ em células SK Hep-1. Os resultados do ensaio de Western Blot não mostraram diferença na expressão proteica da subunidade em nenhum dos grupos avaliados. As análises foram realizadas utilizando o software Quantity one (Bio Rad). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão. Diferenças estatísticas significativas foram determinadas utilizando ANOVA one-way, seguido do pós-teste de Dunnet. Esta análise foi realizada em triplicata.

Uma vez que não observamos diferenças no nível de expressão proteica da subunidade $p47^{phox}$, nosso próximo passo foi verificar se o tratamento com *B. trimera* e quercetina poderiam alterar o nível de fosforilação desta subunidade, visto que a fosforilação é um evento responsável pela ativação da enzima NADPH oxidase (Figura 29). Observamos que nas células expostas ao PMA e ionomicina houve um aumento na expressão proteica de $p47^{phox}$ fosforilada, e que o tratamento com DPI (inibidor da NADPH oxidase) reduziu a expressão desta subunidade em sua forma fosforilada, embora os resultados não tenham sido significativos. Observamos ainda que nas células tratadas por 6 horas com o extrato hidroetanólico de *B. trimera* ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) ou quercetina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) houve redução nos níveis proteicos de $p47^{phox}$ fosforilada. Ao analisarmos os resultados das figuras 28 e 29 em conjunto podemos sugerir que o extrato hidroetanólico de *B. trimera* e quercetina podem modular os níveis de fosforilação da proteína, sem alterar sua expressão constitutiva, evidenciando a ação destes compostos em mecanismos de modificação covalente.

ARAÚJO, G. R.

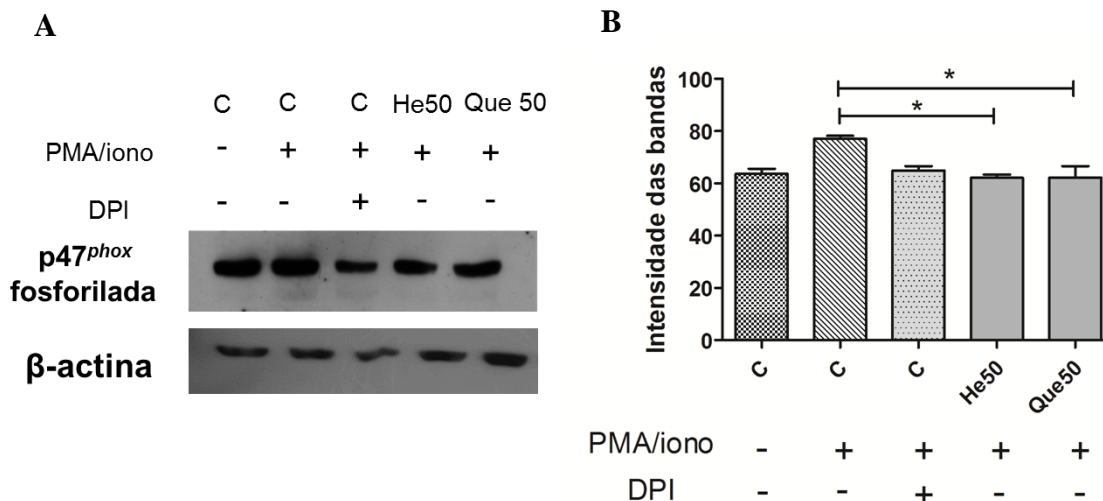


Figura 29: Avaliação da expressão proteica da subunidade p47^{phox} fosforilada em células SK Hep-1 incubadas com o extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* e quercetina. **Painel A:** Imagem representativa das bandas de p47^{phox} fosforilada e β-actina em filme de raio X. **Painel B:** Análise quantitativa por densitometria dos níveis proteicos da subunidade p47^{phox} fosforilada em células SK Hep-1. Os resultados do ensaio de Western Blotting mostraram uma redução na expressão proteica de p47^{phox} em células SK Hep-1 tratadas com extrato hidroetanólico de *B. trimera* e da quercetina. * $p < 0.05$ para valores significativamente diferentes do grupo controle estimulado (C+ PMA/Iono). As análises foram realizadas utilizando o software Quantity one (Bio Rad). Os resultados são expressos como média ± erro padrão. Diferenças estatísticas significativas foram determinadas utilizando ANOVA one-way, seguido do pós-teste de Dunnet. Esta análise foi realizada em triplicata.

ARAÚJO, G. R.

O quadro sumariza os resultados encontrados neste trabalho no que diz respeito aos efeitos observados dos extratos hidroetanólico e aquoso de *B. trimera*.

Quadro 1: Análise comparativa dos extratos hidroetanólico e aquoso de *B. trimera*.

	Extrato hidroetanólico <i>B. trimera</i>			Extrato aquoso <i>B. trimera</i>		
Caracterização fitoquímica	09 ácidos fenólicos 05 flavonoides			12 ácidos fenólicos 03 flavonoides		
Capacidade antioxidante <i>in vitro</i>	>			<		
Compostos fenólicos	>			<		
Porcentagem de células viáveis (ISO2009 - 10993-5)	Tempo de incubação			Tempo de incubação		
	12 horas	24 horas	48 horas	12 horas	24 horas	48 horas
	> 70%	< 70% (a partir de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)	< 70% (100 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)	> 70%	> 70%	> 70%
Dosagem de ERO (tempo de incubação)	Concentração do extrato			Concentração do extrato		
	10 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$	25 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$	50 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$	10 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$	25 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$	50 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$
30 minutos	(-) basal (-) estímulo	(↓) basal (-) estímulo	(↓) basal (-) estímulo	(-) basal (-) estímulo	(↓) basal (-) estímulo	(↓) basal (-) estímulo
6 horas	(-) basal (-) estímulo	(↓) basal (-) estímulo	(↓) basal (↓) estímulo	(-) basal (-) estímulo	(-) basal (-) estímulo	(↓) basal (-) estímulo
Expressão PKC			↓			
Atividade da PKC			↓			
Expressão p47^{phox}			-			
Fosforilação p47^{phox}			↓			

(<) menor do que no extrato hidroetanólico de *B. trimera*, (>) maior do que no extrato aquoso de *B. trimera*, comparação feita entre os extratos. (↑) representa aumento do parâmetro avaliado; (↓) representa diminuição do parâmetro avaliado; (-) representa não alteração do parâmetro avaliado.

6. DISCUSSÃO

Muitos indivíduos utilizam plantas medicinais como alternativa terapêutica para diversas doenças, pois acreditam que por serem utilizadas há centenas de anos são mais eficazes e seguras, uma visão incentivada nos depoimentos e *feedbacks* positivos presentes na Internet. Infelizmente, muitos dos usuários das plantas medicinais são relutantes em informar aos médicos o uso de alguma delas (SEEFF *et al.*, 2015).

Desde os tempos mais remotos até os nossos dias, as plantas têm sido empregadas por diferentes civilizações para aliviar os males da humanidade. A utilização de plantas com fins medicinais teve influência da cultura indígena, oriental, africana e europeia, constituindo a base da medicina popular que vem sendo retomada nos dias atuais. Fatores econômicos e sociais também têm contribuído para o uso de chás de ervas, popularmente conhecidas por seus efeitos curativos (ERAS *et al.*, 1998). Diversos estudos têm buscado identificar compostos naturais como os presentes em alimentos e plantas medicinais. Segundo o formulário de fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2010), plantas medicinais são espécies vegetais utilizadas com finalidade terapêutica. A ampliação das opções terapêuticas ofertadas aos indivíduos com garantia de acesso a plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia, com segurança, eficácia e qualidade, na perspectiva da integralidade da atenção à saúde, é uma importante estratégia com vistas à melhoria da atenção à saúde da população e à inclusão social.

As potencialidades de uso das plantas medicinais encontram-se longe de estarem esgotadas, afirmação endossada pelos novos paradigmas de desenvolvimento social e econômico baseados nos recursos renováveis. Novos conhecimentos e necessidades certamente encontrarão no reino vegetal soluções, por meio da descoberta e do desenvolvimento de novas moléculas com atividade terapêutica ou com aplicações tanto na tecnologia farmacêutica quanto no desenvolvimento de fitoterápicos com maior eficiência de ação (SCHENKEL *et al.*, 2004).

Os compostos fenólicos são fitoquímicos presentes em alimentos de origem vegetal, com várias atividades biológicas, incluindo propriedades antioxidantes. Eles

exercem tais propriedades através da eliminação de radicais livres, inibindo a geração de espécies reativas (GÜLÇIN, 2006; ZHANG *et al.*, 2008). Os compostos fenólicos são um grupo de metabolitos secundários que é bastante difundido na natureza com várias propriedades terapêuticas (GILIOLI *et al.*, 2007; GÜLÇIN, 2006). Sua atividade antioxidante é principalmente devido às suas propriedades redox, que lhes permitem agir como agentes redutores, doadores de hidrogênio, neutralizadores de radicais livres, e quelantes de metais (GILIOLI *et al.*, 2007).

Em nosso trabalho foi realizada a identificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos hidroetanólico e aquoso de *B. trimera* através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detectores de ultravioleta e espectrometria de massa, assim diferentes flavonoides foram encontrados para cada extrato. No extrato hidroetanólico foram identificados 5 flavonoides (6(8)-C-furanosil-8(6)-C-hexosil-flavona; 6(8)-C-hexosil-8(6)-C-furanosil-flavona; Quercetina; 3',5-dihidroxi-4',7-dimetoxiflavona; 3',5-dihidroxi-4',6,7-trimetoxyflavona), a maioria deles como agliconas de flavonoides, ou seja, sem a presença de açúcares na molécula. Já para o extrato aquoso foram identificados 3 flavonoides (Apigenina-6,8-di-C-glucopiranosídeo; 6(8)-C-furanosil-8(6)-C-hexosil-flavona; 6(8)-C-hexosyl-8(6)-C-furanosil-flavona), ligados a moléculas de açúcares, ou seja, heterosídeos flavônicos, o que lhes conferem maior polaridade. A diferença dos compostos encontrados em cada extrato poderia explicar os diferentes efeitos biológicos encontrados neste estudo. Noroozi *et al.* (1998) demonstraram que agliconas de flavonoides, como os encontrados em nosso estudo no extrato hidroetanólico, podem ter um efeito antioxidante maior que seus heterosídeos, como os encontrados em nosso extrato aquoso de *B. trimera*. Simões-Pires *et al.* (2005), analisaram o perfil fitoquímico de três espécies de *Baccharis*, dentre elas o extrato aquoso de *B. trimera* e identificaram ácido quínico e quercetina neste extrato paralelamente ao poder antioxidante *in vitro* dos extratos; observou-se ainda que tanto o ácido quínico quanto a quercetina possuíam atividade antioxidante semelhante, portanto, o ácido quínico também poderia ser considerado um dos reponsáveis pela atividade antioxidante encontrada nos extratos das espécies de *Baccharis*.

Na literatura científica encontra-se descrito que *Baccharis trimera* é uma espécie vegetal rica em compostos fenólicos, como a quercetina e rutina (SOICKE e LENG-PESCHLOW, 1987). Em nosso estudo quantificamos os compostos fenólicos totais

presente nos dois extratos utilizados nos ensaios biológicos, e foi observado que a concentração de compostos fenólicos totais no extrato hidroetanólico foi significativamente maior do que a quantidade encontrada no extrato aquoso. Ou seja, a água não foi capaz de extrair compostos fenólicos como o etanol foi capaz. Ainda observamos que a capacidade em neutralizar o radical DPPH do extrato hidroetanólico foi maior do que a encontrada no extrato aquoso, sugerindo então que a quantidade de compostos fenólicos encontrada no extrato hidroetanólico, a qual foi significativamente maior do que o encontrado no extrato aquoso, pode ter influenciado na sua capacidade antioxidante *in vitro*. Predes *et al.* (2011), observaram que a quantidade de compostos fenólicos no extrato hidroetanólico de *Arctium lappa* foi significativamente maior do que a quantidade extraída no extrato aquoso, e a capacidade antioxidante do extrato hidroetanólico também foi consideravelmente maior em relação ao extrato aquoso. Pádua *et al.* (2013) também observaram que o extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* tem capacidade de neutralizar o radical DPPH de maneira dose dependente. Guimarães *et al.* (2012) também observaram que o extrato de *Baccharis dracunculifolia* também foi capaz de neutralizar o radical DPPH.

Atualmente, apesar da crescente importância dos medicamentos fitoterápicos, relativamente poucos estudos foram realizados a fim de comprovar sua eficácia e segurança, sendo que muitas plantas ainda são utilizadas com base somente no seu uso popular bem estabelecido. O uso tradicional de diversas plantas medicinais baseado em conhecimentos populares, aliado à crença de que, por ser natural não causa reações adversas, fez com que poucas plantas medicinais fossem avaliadas a fim de comprovar sua eficácia e segurança (NEGRI *et al.*, 2005). Além disto, sabe-se que muitas plantas medicinais apresentam substâncias que podem desencadear reações adversas, seja por seus próprios componentes, seja pela presença de contaminantes ou adulterantes presentes nas preparações fitoterápicas, exigindo um rigoroso controle de qualidade desde o cultivo, coleta da planta, extração de seus constituintes, até a elaboração do medicamento final (TUROLLA *et al.*, 2006)

Segundo Cesar Paulo Simionatto, que atua com fitoterapia na Unidade de Saúde do Rio Tavares e é responsável pelo Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Santa Catarina “a avaliação da toxicidade deve ser a prioridade dos estudos fitoterápicos”. O conhecimento das plantas, geralmente transmitido pela cultura oral,

corre o risco de se perder caso não for sistematizado em estudos acadêmicos. A importância desses estudos justificaria uma maior dedicação acadêmica, e não uma exposição que afaste as pessoas do uso de fitoterápicos. Há sim, risco pelo uso incorreto de plantas, assim como há também com o uso de remédios sintéticos.

Baseado nestas informações nosso próximo passo foi avaliar se *Baccharis trimera* possuía algum efeito citotóxico em células da linhagem SK Hep-1. Para tal, avaliamos a viabilidade destas células expostas por 12, 24 e 48 horas a oito concentrações dos extratos aquoso e hidroetanólico. Nossos resultados demonstraram que o extrato hidroetanólico em altas concentrações ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) no tempo de 12 horas de incubação foi capaz de reduzir a viabilidade celular, entretanto a porcentagem de células viáveis se manteve acima de 80%. Observamos ainda que o extrato hidroetanólico quando exposto às células por 24 horas em altas concentrações (acima de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi capaz de reduzir a viabilidade das células SK Hep-1 para valores abaixo de 65%, e em 48 horas de exposição ao extrato hidroetanólico foi observado redução da viabilidade nas concentrações acima de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, entretanto somente na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ a viabilidade foi abaixo de 70%. O extrato aquoso também foi capaz de reduzir a viabilidade celular nos tempos de 12 e 24 horas, entretanto a viabilidade permaneceu acima de 70%, o que não indica citotoxicidade, pois para um extrato ser considerado citotóxico a porcentagem de células viáveis deve ser menor que 70%. Nogueira *et al.* (2011) também não observaram efeito citotóxico em hepatócitos de ratos, incubados de 24 a 96 horas com até $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato hidroetanólico de *B. trimera*. Entretanto foi observado uma redução da viabilidade em células epiteliais renais expostas a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato hidroetanólico de *B. trimera*, indicando que a toxicidade do extrato pode ser tecido-específica. O extrato aquoso, neste mesmo estudo, demonstrou ser citotóxico em altas concentrações ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) nas duas linhagens celulares avaliadas. Pádua *et al.* (2014) também não observaram redução da viabilidade em células HepG2 incubadas por 24 horas com o extrato hidroetanólico de *B. trimera*. Cariddi *et al.* (2012) demonstraram um efeito mutagênico do extrato aquoso de *Baccharis articulata* em células de medula óssea de ratos. Este mesmo grupo em 2010 demonstrou um aumento em eritrócitos micronucleados e que este aumento está diretamente ligado ao tempo de exposição das células ao extrato (CARIDDI *et al.*, 2010). Rodrigues *et al.* (2009a) demonstraram que o extrato aquoso de *B. trimera* não

foi citotóxico para células da medula óssea, mesmo em altas concentrações (até 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Assim, como encontrado em nosso estudo, altas concentrações dos extratos avaliados demonstraram que são capazes de reduzir a quantidade de células viáveis.

Outros estudos demonstram efeitos citotóxicos de extratos de *Baccharis*. Grance *et al.* (2008) encontraram baixo efeito citotóxico do extrato hidroetanólico de *B. trimera* em células renais e hepáticas de animais tratados com 8.4 mg kg^{-1} do extrato. Monks *et al.* (2002) também encontraram uma baixa citotoxicidade do extrato de *B. trimera* (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em células HT29 – adenocarcinoma de útero. As diferenças encontradas em muitos estudos relacionadas à citotoxicidade de extratos de plantas se devem em grande parte à diferença na preparação dos extratos, a região em que a planta foi coletada, o tipo de solo, água, temperatura e condições em que a planta se encontra. As diferenças ainda podem ser devido ao tipo celular estudado e as condições experimentais, como tempo de incubação e concentrações avaliadas.

Assim como observado para os extratos de *B. trimera*, observamos que em células SK Hep-1 expostas aos compostos quercetina e rutina por 12 horas, a viabilidade se manteve maior que 80% em todas as concentrações avaliadas. Entretanto, foi observado que quando estas células foram incubadas por um maior período de tempo (24 e 48 horas), observamos uma redução da viabilidade das células quando expostas a altas concentrações destes compostos. Yang *et al.* (2014) também observaram uma redução da viabilidade em células endoteliais de cérebro de ratos expostos à altas concentrações de quercetina (500 μM) e rutina (750 μM) no tempo de 48 horas. Células de glioma, SHG44 e U251, também apresentaram viabilidade reduzida quando expostas por 48 e 72 horas a quercetina (50, 100 e 200 μM), e este efeito foi dose dependente (PAN *et al.*, 2015). Heeba e Mahmoud (2014) demonstraram que células PC3, HELA, MCF7 e HepG2 apresentaram viabilidade diminuída em aproximadamente 20% ao serem tratadas com quercetina nas concentrações de 5 a 50 μM . Xiang *et al.* (2014) também observaram que o tratamento com o composto quercetina a 200 μM diminuiu a viabilidade de células HeLA tratadas por 24, 48 e 72h.

Estudos de Alinejad *et al.* (2013) demonstraram que células PC12 (feocromocintoma da medula adrenal de ratos) pré-tratadas com rutina (50 a 400 μM) e posteriormente submetidas a concentrações elevadas de etanol apresentaram uma menor citotoxicidade comparadas às células somente tratadas com etanol. Marcarani *et al.*

ARAÚJO, G. R.

(2011) não observaram nenhum efeito citotóxico em células hepáticas HTC expostas à diferentes concentrações de rutina por 24 e 48 horas, entretanto no tempo de 72 horas e na concentração de 810 μ M foi observado uma redução da viabilidade celular. Lee *et al.* (2004), assim como em nosso estudo, observou que a rutina, na concentração de 50 μ M em 24 horas, mostrou um efeito citotóxico em células NCI-H889 (células de câncer de pulmão humano).

A viabilidade dos extratos de *B. trimera* e dos flavonoides quercetina e rutina pelo ensaio de MTT foi realizada para melhor determinar a concentração ideal destes compostos para a utilização nos ensaios subsequentes. Sendo assim, podemos observar que os extratos hidroetanólico e aquoso bem como os compostos quercetina e rutina apresentaram uma viabilidade celular acima de 70% em todas as concentrações avaliadas durante 12 horas de incubação. Baseado nesta informação, decidimos utilizar o tempo máximo de incubação de 6 horas e as concentrações máximas de 50 μ g mL⁻¹ para os extratos hidroetanólico e aquoso de *B. trimera*, e 50 μ M dos compostos quercetina e rutina para a realização dos ensaios posteriores.

Espécies reativas são continuamente produzidas como um subproduto do metabolismo, que exerce um papel importante na sinalização celular e na homeostase (KIM *et al.*, 2013). No entanto, em excesso, a produção de ERO pode apresentar efeitos nocivos sobre as células através de interações diretas com o DNA, RNA, proteínas e lipídios, e este dano está associado com a etiologia de diversas doenças (LEE e KANG, 2013; RAHMAN *et al.*, 2012).

Tem sido demonstrado que alguns flavonoides apresentam uma proeminente capacidade antioxidante, mas que em doses elevadas podem ser pró-oxidantes (DECKER, 1997; PAN *et al.*, 2015; LOPEZ-REVUELTA *et al.*, 2006). Em nosso estudo avaliamos o efeito da *Baccharis trimera* na modulação da produção de espécies reativas de oxigênio. O extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* foi capaz de reduzir a produção de ERO em células SK Hep-1 expostas por 30 minutos e 6 horas nas concentrações de 25 e 50 μ g mL⁻¹. Já o extrato aquoso reduziu a produção de ERO na concentração de 25 μ g mL⁻¹ somente quando as células foram expostas por 30 minutos, entretanto na concentração de 50 μ g mL⁻¹, o extrato aquoso reduziu a produção de ERO nos dois tempos avaliados (30 minutos e 6 horas).

Os compostos utilizados como controles positivos, quercetina e rutina, também foram capazes de reduzir a produção de ERO. A exposição das células a quercetina (25 e 50 μM) por 30 minutos reduziu a produção de ERO nas células SK Hep-1. Já a exposição por 6 horas somente a concentração de 50 μM foi efetiva na redução da produção de ERO. O mesmo foi observado para a rutina, que só foi capaz de reduzir a produção de ERO nas células, na concentração de 50 μM por um período de 30 minutos.

Os extratos de *Baccharis trimera* exibiram um maior potencial na modulação de espécies reativas de oxigênio comparado com os compostos quercetina e rutina. Estes resultados sugerem que este efeito inibitório na produção de ERO pode estar associado com o efeito sinérgico dos compostos presentes nos extratos. Algumas atividades antioxidantes das plantas têm sido atribuídas a outros compostos não identificados ou a efeitos sinérgicos entre os componentes dos extratos das plantas (KOMOLAFE *et al.*, 2014). Além disso, a modulação da produção de ERO em células não estimuladas poderia refletir mecanismos de neutralização direta. De fato, os flavonóides são conhecidos pela sua capacidade de doar um hidrogênio aos radicais livres, neutralizando-os, impedindo a produção do radical hidroxila (JOVANOVIC *et al.*, 1998; BURDA e OLESZEK, 2001).

Muitos estudos demonstram a atividade antioxidante do gênero *Baccharis*, tanto em animais como em culturas celulares. Estudos prévios do nosso laboratório demonstraram que o extrato hidroetanólico de *B. trimera* foi capaz de reduzir a produção de ERO em neutrófilos de ratos (PÁDUA *et al.*, 2010) e ainda capaz de aumentar a atividade de enzimas antioxidantes, como SOD e catalase (PÁDUA *et al.*, 2014). Os resultados obtidos por Vieira, *et al.* (2011) mostraram que os extratos (aquoso e hidroetanólico) de *B. trimera* tem uma atividade antioxidante, como o potencial sequestrador de ERO, protegendo a oxidação de biomoléculas. Oliveira, *et al.* (2012) observou que o extrato fenólico de *B. trimera* apresentou efeito antioxidante e anti-inflamatório.

Em relação aos compostos quercetina e rutina, muitos estudos têm resultados semelhantes aos encontrados em nosso estudo. Chen *et al.* (2006) observaram que a quercetina (25 e 50 μM) foi capaz de reduzir a produção de ERO em células tratadas com o composto por 1 hora e posteriormente estimuladas com H_2O_2 . Entretanto não

ARAÚJO, G. R.

observaram nenhum efeito do composto rutina (25 e 50 μM) nessas mesmas condições. Jeong *et al.* (2005) também reportaram que quercetina e rutina inibem a peroxidação lipídica induzida por cobre em HUVEC's (células endoteliais de cordão umbilical humano). Em células SH-SY5Y (neuroblastoma humano) que foram tratadas com altas concentrações de rutina houve redução significativa na produção de ERO de maneira dose dependente: 0.8mM e 8mM diminuíram a produção de ERO em 70 e 90%, respectivamente (WANG *et al.*, 2012). Já Chow *et al.* (2005) sugeriram que a rutina não seria capaz de reduzir a produção de ERO em células RAW264.7, diferentemente do efeito encontrado nas células tratadas com quercetina. Este fato corrobora os dados encontrados em nosso estudo, onde a quercetina tem um maior poder de reduzir ERO quando comparado a rutina.

Além disso, observamos que o extrato hidroetanólico é mais efetivo no combate à produção de ERO, pois em menores concentrações também apresentou este efeito. Já o extrato aquoso foi eficaz em concentrações mais elevadas e tempos menores de exposição. Provavelmente a maior quantidade de compostos fenólicos totais que foram extraídos no extrato hidroetanólico poderia justificar a diferença encontrada na avaliação da produção de ERO. Em todos os ensaios para avaliação da produção de ERO foi realizada a análise de viabilidade celular pelo teste de exclusão com azul de trypan, para confirmar a viabilidade das células expostas aos extratos. Não houve redução significativa da viabilidade nos ensaios realizados: 30 minutos – viabilidade acima de 90% e 6 horas – viabilidade acima de 87% (resultados não mostrados).

Demonstrado então que *Baccharis trimera* é capaz de reduzir a produção de ERO em células SK Hep-1, o objetivo central deste estudo foi elucidar se o extrato de *B. trimera* poderia modular a produção de ERO através da via de sinalização da PKC e NADPH oxidase.

Muitos estudos indicam que a eliminação de ERO por vitaminas e compostos naturais não é efetiva e pode ser perigosa, pois as altas doses necessárias para esta eliminação direta podem ser tóxicas ao organismo. Assim a prevenção da formação de ERO através de suas fontes específicas pode revelar um grande benefício na prevenção de diversas doenças crônicas. Várias fontes são responsáveis pela produção de espécies reativas, como a óxido nítrico sintase, xantina oxidase, citocromo P450 reductase, oxidases mitocondriais (JIMENEZ *et al.*, 2015). Entretanto, para todos estes sistemas a

produção de ERO ocorre como um subproduto da principal ação catalítica da enzima/sistema ou a partir de uma disfunção deste sistema. Em contraste, o complexo da enzima NADPH oxidase é o único sistema cuja função principal é gerar ERO em células (COSO *et al.*, 2012). Particularmente, em condições patológicas, esta enzima é responsável pelo aumento na produção de ERO (INOBUCHI e NAWATA, 2005; CHIASSON *et al.*, 2003).

A enzima NADPH oxidase pode ter muitos ativadores, sendo um dos mais importantes, a proteína cinase C (PKC), um membro da família serina / treonina cinase, que é responsável pela fosforilação da subunidade p47^{phox} desta enzima (INOBUCHI e NAWATA, 2005). A família da PKC pode ser dividida em três classes (convencional, novas e atípicas). As PKCs convencionais exigem diacilglicerol (DAG) e Ca²⁺ para a sua ativação. A atividade da PKC pode ser modulada utilizando componentes farmacológicos exógenos (ABRIAL, *et al.*, 2011). Ésteres de forbol, como o PMA, são miméticos ao diacilglicerol e ativadores da PKC (MACRAE *et al.*, 2013); ionomicina é um ionóforo de Ca²⁺ (DANG *et al.*, 2011) e, em conjunto com o PMA, este composto atua como um ativador da PKC convencional, consequentemente ativando a NADPH oxidase. De maneira oposta, calfoestim C atua seletivamente sobre o domínio de regulação da PKC, inibindo assim a atividade desta enzima (HOFMANN, 1997).

Com base nessas informações, os resultados do presente estudo sugerem que células SK Hep-1 incubadas com PMA / iono (ativadores da PKC) apresentaram maior produção de ERO através da via de sinalização da PKC, que uma vez ativada, poderia promover a ativação da NADPH oxidase. Para confirmar a hipótese de que a maior parte da produção de ERO em células SK Hep-1 é dependente da NADPH oxidase, as células foram incubadas com DPI, um inibidor desta enzima. Os resultados mostraram uma diminuição significativa na produção de ERO, e estes valores são semelhantes aos observados em células não estimuladas (basal), sugerindo a importância do complexo enzimático da NADPH oxidase na geração de ERO em células da linhagem SK Hep-1.

O pré-tratamento com o extrato hidroetanólico de *B. trimera* (50 µg mL⁻¹) e quercetina (25 e 50 µM) por 6 horas foi eficaz para modular a produção de ERO em células tratadas com PMA/iono. O extrato aquoso, bem como a rutina não foram capazes de alterar a produção de ERO em células estimuladas em nenhuma das concentrações e tempos avaliados. Este resultado sugere a influência do extrato

hidroetanólico de *B. trimera* e quercetina na via de sinalização da PKC e NADPH oxidase. Assim, nosso próximo passo foi elucidar os efeitos do extrato hidroetanólico e da quercetina sobre a expressão proteica e atividade da PKC, bem como na expressão da subunidade p47^{phox} não-fosforilada e fosforilada.

Resultados de alguns experimentos mostraram que os flavonoides influenciam na expressão e atividade de enzimas de fase I, II e III do sistema de detoxificação, no metabolismo xenobiótico (MORRIS e ZHANG, 2006; ZHANG e GORDON, 2004). No citoplasma, compostos fenólicos podem causar a dissociação do fator nuclear Nrf2 do seu inibidor Keap-1. Assim Nrf2 é transferido para o núcleo onde interage com o DNA na região conhecida como elemento de resposta antioxidante (ARE) (LEWANDOWSKA *et al.*, 2013). Outros estudos têm mostrado que os polifenóis possuem efeito antioxidante, incluindo a inibição da ativação da NADPH oxidase (AL-AWWADI *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2005; MIURA *et al.*, 2003), que é o mais importante produtor celular de O₂⁻ (PIGNATELLI *et al.*, 2004). De acordo com Pignatelli *et al.* (2003), a ativação da PKC desempenha um papel crucial na indução da ativação da NADPH oxidase mediada pelo ácido araquidônico, sendo que a adição de quercetina e catequina, à amostras de plaquetas, inibiu a formação de O₂⁻, o que sugere que polifenóis reduzem a ativação da NADPH oxidase. Jimenez *et al.* (2015) também observaram uma inibição da enzima NADPH oxidase em células musculares lisas vasculares (VSMCs) tratadas com baixas concentrações de quercetina (4µM). Steffen *et al.* (2008) demonstraram que a quercetina pode inibir a atividade de algumas enzimas, como ciclooxigenase e lipoxigenases.

Neste contexto, e para melhor avaliarmos a influência da via de sinalização da PKC na redução da produção de ERO nas células tratadas com o extrato hidroetanólico de *B. trimera* e quercetina, avaliamos a expressão proteica desta enzima. Observamos que houve um aumento na expressão proteica da PKC nas células estimuladas com PMA/ionomicina em relação às células controle. Éster de forbol (PMA) é um análogo de DAG e, por conseguinte, pode ativar duas classes de isoformas da PKC, as convencionais e as novas PKCs (HOROWITZ *et al.*, 1996). Além disso, o pré-tratamento com calfoestim C inibiu a expressão da PKC nas células. Calfoestim C é amplamente utilizado como inibidor desta cinase e ainda em estudos que avaliam a fosforilação de p47^{phox}, a subunidade que é fosforilada pela PKC, tornando a enzima

ARAÚJO, G. R.

NADPH oxidase inativa (BEY *et al.*, 2004). Nosso estudo demonstrou que a pré-exposição das células SK Hep-1 ao extrato hidroetanólico de *B. trimera* (50 µg mL⁻¹) ou à quercetina (50 µM), também reduziram os níveis proteicos de PKC em relação ao grupo estimulado (PMA/iono). Na literatura há diversos trabalhos demonstrando que a quercetina é um potente inibidor tanto da expressão quanto da atividade de PKCs. Maurya e Vinayak (2015a) demonstraram que a quercetina foi capaz de reduzir ERO em células do fluido ascético de camundongos com linfoma de Dalton e que essa redução foi devido à redução na atividade e expressão da PKC. Esse mesmo grupo observou que a quercetina foi capaz de reduzir a expressão proteica de PKC α em células HepG2 e que este efeito foi dose-dependente (MAURYA E VINAYAK, 2015b). Baseado nas informações disponíveis na literatura no que diz respeito à sinalização da quercetina, em nosso estudo, este composto foi utilizado como uma referência de mecanismo de sinalização induzido por flavonóide.

Na superfície celular, a ligação de hormônios, fatores de crescimento e neurotransmissores à tirosina cinase ou receptores acoplados a proteína G levam à produção de DAG e Ca²⁺, os segundos mensageiros necessários para ativação das PKCs convencionais. Em nosso estudo observamos que em células SK Hep-1 incubadas com PMA e ionomicina, ativador da PKC e ionóforo de cálcio respectivamente, a atividade de PKC aumentou em relação ao grupo controle (somente células) e que Calfoestim C (inibidor da PKC) foi capaz de reduzir a atividade da enzima, assim como o extrato hidroetanólico de *B. trimera* e a quercetina. Estudos demonstraram que a quercetina diminuiu a ativação da PKC em células de linhagem de mastócitos-RBL-2H3 (KIM *et al.*, 2014). Outro estudo de Pignatelli *et al.* (2006) sugeriram que polifenóis (quercetina e catequina) exercem um efeito inibitório sobre a ativação de PKC e consequentemente a ativação da NADPH oxidase, reduzindo a produção de ERO. Maurya e Vinayak (2015b) também avaliaram a atividade da PKC em células HepG2 tratadas com quercetina e observaram redução na atividade enzimática nas células tratadas com este flavonoide nas concentrações de 20, 40 e 80 µM, com consequente redução de ERO. Por outro lado, Kim *et al.* (2013), demonstraram que o tratamento com quercetina em células RAW264.7 estimuladas com zimosan diminuiu os níveis de p47^{phox}, sem alterar a atividade da PKC, o que sugere que a atividade antioxidante da quercetina está relacionada à regulação da NADPH oxidase.

Como podemos observar os nossos resultados mostraram que o extrato hidroetanólico de *B. trimera* bem como a quercetina influenciaram a via de sinalização da PKC, pois a expressão e a atividade desta proteína foram reduzidas após o tratamento com estes compostos, corroborando os estudos que demonstram que compostos fenólicos, como a quercetina, são capazes de modular essa via de sinalização e, consequentemente reduzir a produção de ERO em diferentes modelos experimentais. Vale ressaltar que este é o primeiro estudo que evidencia um mecanismo de sinalização associado a um extrato de planta medicinal, assim, analisando os resultados obtidos até o momento, podemos inferir que o extrato hidroetanólico de *B. trimera* foi capaz de inibir a geração de ERO através da inibição da expressão e atividade da PKC e, isto por si só, já seria um evento essencial para a inibição da NADPH oxidase, o que consequentemente explicaria a redução de ERO observada em nosso estudo.

Sabe-se que a ativação da NADPH oxidase pode ser diminuída através do bloqueio do transporte das subunidades citosólicas para a membrana, e ainda através do bloqueio da fosforilação de p47^{phox} com inibidores de PKC e sua ligação a outras subunidades (MARALDI, 2013). Assim, o nosso próximo passo foi verificar se o extrato hidroetanólico de *B. trimera* seria capaz de alterar a expressão e o nível de fosforilação da subunidade p47^{phox} da enzima NADPH oxidase. Como descrito anteriormente não houve diferença nos níveis proteicos da subunidade não fosforilada, entretanto, em relação à proteína fosforilada observamos uma redução na expressão de p47^{phox} fosforilada em células pré-tratadas com extrato hidroetanólico de *B. trimera* (50 µg mL⁻¹) e quercetina (50 µg mL⁻¹) e posteriormente estimuladas com PMA/ionomicina. A influência da quercetina na via de sinalização da NADPH oxidase, inibindo a fosforilação de p47^{phox} ou mesmo inibindo o transporte de p47^{phox} para a membrana já é bem estabelecido na literatura. O estudo de Jiang *et al.* (2008) também não observaram alteração nos níveis proteicos de p47^{phox} na fração membranar de células HL-60 estimuladas com PMA. Sánchez *et al.* (2006) avaliaram os níveis proteicos de p47^{phox} em aortas de ratos hipertensos tratados com quercetina e observaram uma redução na expressão dessa proteína, reduzindo assim a atividade da NADPH oxidase. Wang *et al.* (2014b) avaliaram o efeito da quercetina na aorta de animais aneurisma-induzidos e observaram que este composto foi capaz de reduzir a produção de ERO através da diminuição dos níveis proteicos de p47^{phox}. Como

ARAÚJO, G. R.

observado no presente estudo, os níveis proteicos de p47^{phox} não foram alterados com os tratamentos de *B. trimera* e quercetina, entretanto o nível de proteína fosforilada foi alterado (reduzido nos tratamentos e aumentado no controle estimulado – PMA/iono). De fato, a PKC é responsável pela fosforilação de p47^{phox}, sugerindo que o extrato e a quercetina atuam nesta proteína cinase, inibindo-a e conseqüentemente reduzindo a fosforilação de p47^{phox}, o que justificaria a redução de ERO observada em nosso estudo. Em conjunto, podemos também inferir que o extrato de *B. trimera* e a quercetina podem atuar diretamente impedindo a fosforilação da subunidade p47^{phox} da NADPH oxidase.

Como discutido anteriormente foi observado a presença de 5 flavonoides no extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera*, dentre eles a quercetina, sugerindo assim que este composto foi um importante controle positivo utilizado, apresentando efeitos semelhantes ao extrato, como a redução na produção de ERO, na expressão e atividade da PKC e ainda diminuindo o nível de fosforilação da subunidade p47^{phox}.

Assim, os resultados do presente estudo fornecem a primeira evidência de que o extrato hidroetanólico de *B. trimera* diminui a expressão proteica e a atividade enzimática da PKC bem como inibe a fosforilação da subunidade p47^{phox} como um mecanismo potencial para a inibição da atividade da NADPH oxidase e, conseqüentemente, a inibição de ERO. Estudos anteriores mostraram o efeito antioxidante de *B. trimera*, no entanto, o presente estudo é o primeiro a sugerir um potencial mecanismo de *Baccharis trimera* para a modulação de ERO associado à inibição da via da PKC e NADPH oxidase, sugerindo um efeito modulatório deste extrato em vias de sinalização relacionadas ao estresse oxidativo.

7. CONCLUSÃO

Observamos neste estudo que o extrato hidroetanólico tem maior poder antioxidante que o extrato aquoso, provavelmente devido à extração de compostos fenólicos ser maior no extrato hidroetanólico em comparação ao extrato aquoso. Este estudo ainda fornece a primeira evidência de um mecanismo de sinalização desencadeado por *B. trimera* para modular a produção de ERO. O efeito inibitório de *B. trimera* em ERO pode ser explicado por três mecanismos distintos, que podem ou não gerar efeitos sinérgicos. O primeiro mecanismo proposto envolve a inibição da expressão da proteína PKC, o segundo mecanismo está associada com a inibição da atividade enzimática desta cinase e o terceiro mecanismo seria através da inibição da fosforilação de $p47^{phox}$, inibindo a enzima NADPH oxidase (Figura 30).

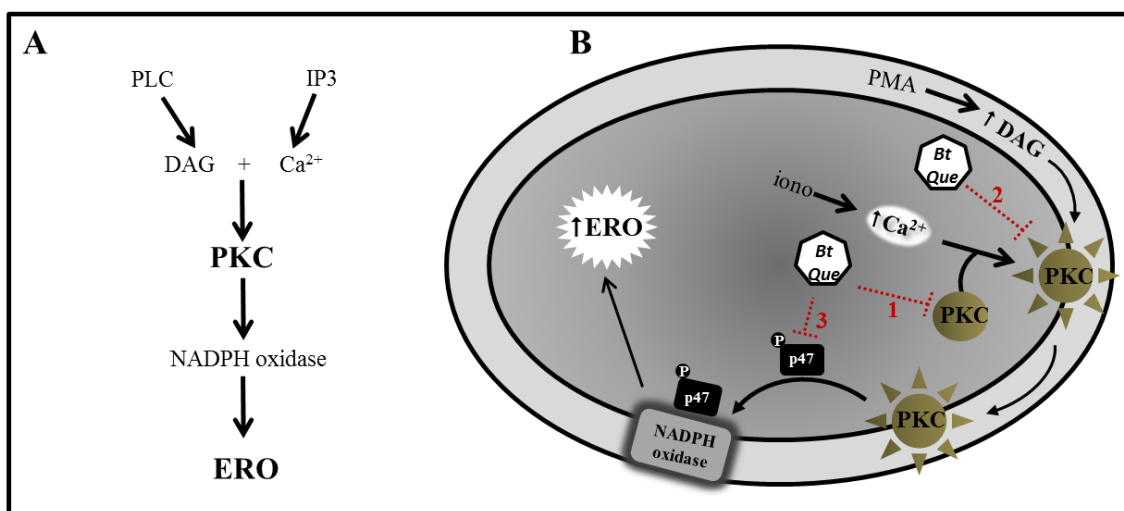


Figura 30: Proposta de mecanismos para o efeito antioxidante do extrato hidroetanólico de *B. trimera*. O painel A representa a produção de ERO, através da via de sinalização da PKC. O painel B representa a hipótese mecanística para a redução de ERO mediada por *B. trimera*: (1) representa a inibição da expressão da proteína PKC; (2) representa a inibição da atividade da enzima; e (3) a inibição da fosforilação da subunidade $p47^{phox}$. PLC: fosfolipase C; IP3: inositol-1,4,5-trifosfato; DAG: diacilglicerol; PKC: proteína cinase C; Bt: *Baccharis trimera*; Que: quercetina; iono: ionomicina; PMA: éster de forbol. Setas vermelhas pontilhadas indicam inibição da via.

8. REFERÊNCIAS

ABAD, M.J.; BERMEJO, P.; *Baccharis* (Compositae): a review update. *Issue in Honor of Prof. Atta-ur-Rahman, ARKIVOC* (vii) 76-96, 2007.

ABAD, M.J.; BERMEJO, P.; GONZALES, E.; IGLESIAS, I.; IRURZUN, A.; CARRASCO, L. Antiviral activity of Bolivian plant extracts. *General Pharmacology*, v. 32, p. 499-503, 1999.

ABRIAL, E.; LUCAS, G.; SCARNA, H.; HADDJERI, N.; LAMBÁS-SEÑAS, L. A Role for the PKC Signaling System in the Pathophysiology and Treatment of Mood Disorders: Involvement of a Functional Imbalance? *Mol Neurobiol.*, v. 44, p. 407–419, 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA “Farmacopeia Homeopática Brasileira, 5ª edição Brasília. 2010. 546 p.

AL-AWWADI, N.A.; ARAIZ, C.; BORNET, A.; DELBOSC, S.; CRISTOL, J. P.; LINCK, N.; AZAY, J.; TEISSEDE, P. L.; CROS, G. Extracts enriched in different polyphenolic families normalize increased cardiac NADPH oxidase expression while having differential effects on insulin resistance, hypertension, and cardiac hypertrophy in high-fructose-fed rats. *J. Agr. Food Chem.*, v. 53, p. 151–157, 2005.

ALINEJAD, B.; GHORBANI, A.; SADEGHNIA, H.R. Effects of combinations of curcumin, linalool, rutin, safranal, and thymoquinone on glucose/serum deprivation-induced cell death. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. v. 3, n. 4, p. 321-328, 2013.

ALMAGHRABI, O.A. Molecular and biochemical investigations on the effect of quercetin on oxidative stress induced by cisplatin in rat kidney. *Saudi J Biol Sci.*, v. 22, n. 2, p. 227-31, 2015.

AMES, B.N.; SHIGENAGA, M.K.; HAGEN, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 90, p. 7915-7922, 1993.

AQUINO, R.; MORELLI S.; TOMAINO, A.; PELLEGRINO, M.; SAIJA, H.; GRUMETTO, L.; PUGLIA, C.; VENTURA, D.; BONINA, F. Antioxidant and photoprotective activity of a crude extract of *Culcitium reflexum* H.B.K. leaves and their major flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 79, n. 2, p. 183-191, 2002.

ASCHWANDEN, C. Herbs for health, but how safe are they? *Bull. W. H. O.*, Geneva, v. 79, n. 7, p. 691-692, 2001.

AUGUSTYNIAK, A.; BARTOSZ, G.; CIPAK, A.; DUBURS, G.; HORÁKOVÁ, L.; LUCZAJ, W.; MAJEKOVA, M.; ODYSSEOS, A.D.; RACKOVA, L.; SKRZYDLEWSKA, E.; STEFEK, M.; STROSOVÁ, M.; TIRZITIS, G.; VENSKUTONIS, P.R.; VISKUPICOVA, J.; VRAKA, P.S.; ZARKOVIĆ, N. Natural and synthetic antioxidants: an updated overview. *Free Radic Res.*, v. 44, n. 10, p. 1216-62, 2010.

BABIOR, B. M. NADPH oxidase: an update. *Blood*, v. 93, p. 1464-1476, 1999.

ARAÚJO, G. R.

BECKMAN, K.B.; AMES, B.N. The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiological reviews*, v. 78, n. 2, p. 547-581, 1998.

BERRY, C.; HAMILTON, C.A.; BROSNAN, J.; MAGILL, F.G.; BERG, G.A.; MC-MURRAY, J.J.V.; DOMINICZAK, A.F. Investigation into the sources of superoxide in human blood vessels. *Circulation*, v. 101, p. 2206– 2212, 2000.

BETONI, J.E.; MANTOVANI, R.P.; BARBOSA, L.N.; DI STASI, L.C.; FERNANDES JUNIOR, A. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 101(4), p. 387-90, 2006.

BEY, E.A.; XU, B.; BHATTACHARJEE, A.; OLDFIELD, C.M.; ZHAO, X.; LI, Q.; SUBBULAKSHMI, V.; FELDMAN, G.M.; WIENTJES, F.B.; CATHCART, M.K. Protein kinase C delta is required for p47phox phosphorylation and translocation in activated human monocytes. *J Immunol.*, v. 173(9), p. :5730-8, 2004.

BIONDO, T.M.A.; TANAE, M.M.; COLETTA, E.D.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; LAPA, A.J.; SOUCCAR, C. Antisecretory actions of *Baccharis trimera* (Less.) DC aqueous extract and isolated compounds: Analysis of underlying mechanisms. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 136, p. 368–373, 2011.

BOADI, W. Y.; IYERE, P. A.; ADUNYAH, S. E. Effect of quercetin and genistein on copper-and iron-induced pEROxidation in methyl linolenate. *J. Appl. Toxicol.*, v. 23, p. 363-369, 2003.

BOCCI V, VALACCHI G. Nrf2 activation as target to implement therapeutic treatments. *Front Chem.*, v. 2, p. 3:4, 2015.

BOECHAT, C.L.; PISTÓIA, V.C.; GIANELO, C.; CAMARGO, F.A. Accumulation and translocation of heavy metal by spontaneous plants growing on multi-metal-contaminated site in the Southeast of Rio Grande do Sul state, Brazil. *Environ Sci Pollut Res Int.*, Sep 28, 2015.

BRANDES, R.; KREUZER, J. Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovascular Research*, v. 65, p. 16-27, 2005.

BRANDE-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT- Food Science Technol.*, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr Rev*, v. 56, p. 317-33, 1998.

BUONOCORE G.; PERRONE S.; TATARANNO M .L. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, v. 15, p. 186 – 190, 2010.

BURDA S.; OLESZEK W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J Agric Food Chem.*, v. 49, p. 2774–2779, 2001.

ARAÚJO, G. R.

CAI, K.; BENNICK, A. Effect of salivary proteins on the transport of tannin and quercetin across intestinal epithelial cells in culture. *Biochem. Pharmacol.*, v. 72, p. 974–980, 2006.

CALIXTO, J. B. Fitofármacos no Brasil: agora ou nunca! *Ciência hoje*, [S.l.], v. 21, n. 1.234, p. 26-30, 1997

CARIDDI L.; ESCOBAR F.; SABINI C.; TORRES C.; REINOSO E.; CRISTOFOLINI A.; COMINI L.; MONTROYA S. N.; SABINI L. Apoptosis and mutagenicity induction by a characterized aqueous extract of *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) on normal cells. *Food and Chem. Toxicol.*, v. 50, n. 2, p. 156-161, 2012.

CARIDDI, L.N.; ESCOBAR, F.M.; SABINI, M.C.; TORRES, C.V.; ZYGADLO, J.A.; SABINI, L.I. First approaches in the study of cytotoxic and mutagenic damage induced by cold aqueous extract of *Baccharis articulata* on normal cells. *Mol. Med. Chem.*, v. 21, p. 4–7, 2010.

CARLUCCIO, M.A.; SICULELLA, L.; ANCORA, M.A.; MASSARO, M.; SCODITTI, E.; STORELLI, C.; VISIOLI, F.; DISTANTE, A.; DE CATERINA, R. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: Antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 23, p. 622–629, 2003.

CARTER, C. A.; KANE, C. J. Therapeutic potential of natural compounds that regulate the activity of protein kinase C. *Current Medicinal Chemistry*, v. 11, p. 2883–2902, 2004.

CASTRO, H.G.; FERREIRA, F.A. Contribuição ao estudo das plantas medicinais carqueja (*Baccharis genistelloides*). Viçosa: Suprema Gráfica e Editora Ltda, p. 102 2000.

CERMAK, R.; FÖLMEER, U.; WOLFFRAM, S. Dietary flavonol quercetin induces chloride secretion in rat colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*, v. 275, p. 1166-1172, 1998.

CHEN, T. J.; JENG, J.Y.; LIN, C.W.; WU, C.Y.; CHEN Y.C. Quercetin inhibition of ROS-dependent and –independent apoptosis in rat glioma C6 cells. *Toxicology*, v. 223, p. 113-126, 2006.

CHEYNIER, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *J. Clin. Nutr.* V. 81, p. 223–229, 2005.

CHIASSON, J.L.; JOSSE, R.G.; GOMIS, R.; HANEFELD, M.; KARASIK, A.; LAAKSO, M. STOP-NIDDM Trial Research Group. Acarbose treatment and the risk of cardiovascular disease and hypertension in patients with impaired glucose tolerance: the STOP-NIDDM trial. *JAMA*, p. 290, 486, 2003.

CHOW, J.M.; SHEN, S.C.; HUAN, S.K.; LIN, H.Y.; CHEN, Y.C. Quercetin, but not rutin and quercitrin, prevention of H₂O₂-induced apoptosis via anti-oxidant activity and heme oxygenase 1 gene expression in macrophages. *Biochem Pharmacol.*, v. 69, n. 12, p. 1839-51, 2005.

ARAÚJO, G. R.

COELHO, M.G.P.; REIS, P.A.; GAVA, V.B.; MARQUES, P.R.; GAYER, C.R.; LARANJA, G.A.T.; FELZENSVALB, I.; SABINO, K.C.C. Anti-arthritic effect and subacute toxicological evaluation of *Baccharis genistelloides* aqueous extract. *Toxicology Letters*, v. 154, p. 69-80, 2004.

COOK, N.C.; SAMMAN, S. Flavonoids- chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutritional Biochemistry*, v. 7, p. 66- 76, 1996.

CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas, Imprensa Nacional, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro. v. 1, p. 74, 1984.

COSO, S.; HARRISON, I.; HARRISON, C. B. *et al.*, NADPH oxidases as regulators of tumor angiogenesis: current and emerging concepts. *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 16, n. 11, p. 1229–1247, 2012.

COTELLE, N. Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem.*, v. 1, p. 569–590, 2001.

CRESPY, V. *et al.* Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *Am. J. Physiol. Bethesda*, v. 277, p. 120-126, 1999.

CZECZOT, H.; PODSIAD, M. Antioxidant status of quercetin. *Brom Chem Toks*, v. 38, n. 4, p. 329-334, 2005.

D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; VARI, R.; SCAZZOCCHIO, B.; MASELLA, R. Bioavailability of the polyphenols: Status and controversies. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 11, p. 1321–1342, 2010.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; COLOMBO, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin. Chem.*, v. 54, n. 4, p. 601-23, 2006.

DANG, M.; DUBBIN, K.; D'AIELLO, A.; HARTMANN, M.; LODISH, H.; HERRLICH, A. Epidermal growth factor (EGF) ligand release by substrate specific a disintegrin and metalloproteases (ADAMs) involves different protein kinase C (PKC) isoenzymes depending on the stimulus. *J Biol Chem.*, v. 286, n. 20, p. 17704-13, 2011.

DE OLIVEIRA, R.N.; REHDER, V.L.; SANTOS OLIVEIRA, A.S.; JÚNIOR, Í.M.; DE CARVALHO, J.E.; DE RUIZ, A.L.; JERALDO, V.L.; LINHARES, A.X.; ALLEGRETTI, S.M. Schistosoma mansoni: in vitro schistosomicidal activity of essential oil of *Baccharis trimera* (less) DC. *Exp Parasitol.*, v. 132(2), p. 135-43, 2012.

DE SOUZA, K.C.B.; SHAPOVAL, E.E.S.; BASSANI, V.L. LC determination of flavonoids: separation of quercetin, luteonin and 3-O-methylquercetin in *Achyrocline satureioides* preparation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analyses*, v. 28 p. 771-777, 2002.

DECKER, E.A. Phenolics: Prooxidants or Antioxidants? *Nutr Rev.*, v. 55, n. 11, p. 396-8, 1997.

ARAÚJO, G. R.

DHALLA, N.S.; TEMSAH, R.M.; NETTICADAN, T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Journal of Hypertension*, v. 18, n. 6, p. 655–73, 2000.

DICKEL, M.L.; RATES, S.M.; RITTER, M.R. Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. *J Ethnopharmacol.* v. 109(1), p. 60-71, 2007.

DIXON, R.A.; HARRISON, M.J. Activation, structure, and organization of genes involved in microbial defense in plants. *Adv Genet*, v. 28, p. 165-234, 1990.

DOMITROVIC, R.; JAKOVAC, H.; VASILJEV MARCHESI, V. *et al.* Differential hepatoprotective mechanisms of rutin and quercetin in CCl₄-intoxicated BALB/cN mice. *Acta Pharmacol Sin.*, v. 33, p. 1260–1270, 2012.

DUTHIE, G.; MORRICE, P. Antioxidant capacity of flavonoids in hepatic microsomes is not reflected by antioxidant effects in vivo. *Oxid Med Cell Longev.*; v. 2012, p. 1-6, 2012.

EISENBERG, D.M.; DAVIS, R.B.; ETTNER, S.L. *et al.* Trends in alternative medicine use in the United State, 1990-1997: results of a follow-up national study. *JAMA*, v. 280, p. 1569-1575, 1998.

EISENBERG, D.M.; KESSLER, R.C.; FOSTER, C. *et al.* Unconventional medicine in the United States: prevalence, costs, and patterns of use. *NEJM*, v. 328, p. 246- 252, 1993.

EL BENNA, J.; HAN, J.; PARK, J.W.; SCHMID, E.; ULEVITCH, R.J.; BABIOR, B.M. Activation of p38 in stimulated human neutrophils: phosphorylation of the oxidase component p47phox by p38 and ERK but not by JNK. *Arch Biochem Biophys.*, v. 15;334(2), p. 395-400, 1996.

EL BENNA, J.; RUEDI, J. M.; BABIOR, B. M. Cytosolic guanine nucleotide-binding protein Rac2 operates in vivo as a component of the neutrophil respiratory burst oxidase. Transfer of Rac2 and the cytosolic oxidase components p47phox and p67phox to the submembranous actin cytoskeleton during oxidase activation. *J. Biol. Chem.* v. 269, p. 6729-6734, 1994.

ENIO, C.V. Alimentos funcionais. *Rev Med Minas Gerais*, v. 13, n. 4, p. 260-262, 2003.

ERAS, B.; SLOWING, K.; TOLEDO, C.; IGLESIAS, I.; VILLAR, A.; CHIRIBOGA, X. Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in tradicional medicine in Ecuador. *J Ethnopharm*, v. 61, p. 161-166, 1998.

FELDMANN, K.A. Cytochrome P450s as genes for crop improvement. *Curr Opin Plant Biol*, v. 4, p. 162-167, 2001.

FENNEMA, O.R. Química de los alimentos. Zaragoza, Acribia, v. 2, p.1096, 1992.

FORMAN, H. J.; TORRES, M. Redox signaling in macrophages. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 22, p. 189-216, 2001.

FORMICA, J. V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Fd. Chem. Toxic*, v. 33, p. 1061-1080, 1995.

ARAÚJO, G. R.

GARCIA, F.A.; TANAE, M.M.; TORRES, L.M.; LAPA, A.J.; DE LIMA-LANDMAN, M.T.; SOUCCAR, C. A comparative study of two clerodane diterpenes from *Baccharis trimera* (Less.) DC. on the influx and mobilization of intracellular calcium in rat cardiomyocytes. *Phytomedicine*, v. 21(8-9), p. 1021-5, 2014.

GENÉ, R.M.; CARTAÑÁ, C.; ADZET, T.; MARIN, E.; PARELLA, T.; CAÑIGUERAL, S. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: Identification of active constituents. *Planta Med*, v. 62, p. 232–235, 1996.

GEORGE, S.; BRAT, P.; ALTER, P.; AMIOT, M. J. Rapid determination of Polyphenols and Vitamin C in plant-derived products. *J Agric Food Chem.*, v. 53, n. 5, p. 1370 – 1373, 2005.

GERALDES, P.; KING, G.L. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res.*, v. 106, n. 8, p. 1319-31, 2010.

GILIOLI, A.M.H.H.; MISSAU, F.C.; BRIGHENTE, I.M.C.; MARQUES, M.C.A.; PIZZOLATTI, M.G. Avaliação do teor de fenólicos e flavonóides em extratos de *Arctium lappa*. *30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, v. 177, 2007.

GRANCE, S.R.M.; TEIXEIRA, M.A.; LEITE, R.S.; GUIMARÃES, E.B.; SIQUEIRA, J.M.; FILIU, W.F.O.; VASCONCELOS, S.B.S.; VIEIRA, M.C. *Baccharis trimera*: effect on hematological and biochemical parameters and hepatorenal evaluation in pregnant rats. *J. Ethnopharmacol.*, v. 117, p. 28–33, 2008.

GRIENDLING K.K.; SORESCU D.; USHIO-FUKAI M. NAD(P)H oxidase: Role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.*, v. 86, p. 494– 501, 2000.

GRIENDLING K.K.; USHIO-FUKAI M. Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Cardiovasc Res.*, v. 91, p. 21–27, 2000.

GUARDIA, T.; ROTELLI A. E.; JUAREZ A. O.; PELZER L. E. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Farmaco*, v. 56, n. 9, p. 683-7, 2001.

GUERRA, P. M.; NODARI, O. R. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, M. O. *et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, p.15, 2001.

GUIMARAES, N.S.S.; MELLO, J.C.; PAIVA, J.S.; BUENO, P.C.P.; BERRETTA, A.A.; TORQUATO, R.J.; NANTES, I.L.; RODRIGUES, T. *Baccharis dracunculifolia*, the main source of green propolis, exhibits potent antioxidant activity and prevents oxidative mitochondrial damage. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, p. 1091–1097, 2012.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, v. 217, n. 2-3, p. 213-220, 2006.

HALBWIRTH, H. The creation and physiological relevance of divergent hydroxylation patterns in the flavonoid pathway. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 11, p. 595–621, 2010.

ARAÚJO, G. R.

HALLIWELL, B.; CROSS, C.E. Oxygen-derived Species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ. Health Perspect.*, v. 102, n. 10, p. 5-12, 1994.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, v. 55, p. 481-504, 2000.

HATTORI, K.; NAGURO, I.; RUNCHEL, C.; ICHIJO, H. The roles of ASK family proteins in stress responses and diseases. *Cell Commun. Signal.*, v. 7, p. 9, 2009.

HEEBA, G.H.; MAHMOUD, M.E. Dual Effects of Quercetin in Doxorubicin-Induced Nephrotoxicity in Rats and its Modulation of the Cytotoxic Activity of Doxorubicin on Human Carcinoma Cells. *Environmental Toxicology*. v. .22075, 2014.

HERTOG, M.G.; HOLLMAN P. C.; KATAN M. B.; KROMHOUT D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr. Cancer*, v. 20, p. 21–29, 1993b.

HERTOG, M.G.; FESKENS, E.J.; HOLLMAN, P.C.; KATAN, M.B.; KROMHOUT, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet.*, v. 342, n. 8878, p. 1007-11, 1993a.

HERZ, W.; PILOTTI, A.M.; SÖDERHOLM, A.C.; SHUHAMA, I.K.; VICHNEWSKI, W. New ent-clerodane-type diterpenoids from *Baccharis trimera*. *J Org Chem.*, v.42(24), p.3913-7, 1977.

HNATYSZYN, O.; MOSCATELLI, V.; GARCIA, J.; RONDINA, R.; COSTA, M.; ARRANZ, C.; BALASZCZUK, A.; FERRARO, G.; COUSSIO, J.D. Argentinian plant extracts with relaxant effect on the smooth muscle of the corpus cavernosum of guinea pig. *Phytomedicine*. v. 10(8), p. 669-74, 2003.

HODEK, P.; TREFIL, P.; STIBOROVÁ, M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem. Biol. Interact.*, v. 139, p. 1–21, 2002.

HOFMANN, J. The potential for isoenzyme-selective modulation of protein kinase C. *FASEB J.*, v. 11(8), p. :649-69, 1997.

HOLST B.; WILLIAMSON G. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Curr Opin Biotechnol*, v. 19, n. 2, p. 73-82, 2008.

HOROWITZ, A.; MENICE, C. B.; LAPORTE, R.; MORGAN, K. G. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol. Rev.*, v. 76, p. 967–1003, 1996.

INOBUCHI, T.; LI, P.; UMEDA, F.; YU, H.Y.; KAKIMOTO, M.; IMAMURA, M.; AOKI, T.; ETOH, T.; HASHIMOTO, T.; NARUSE, M.; SANO, H.; UTSUMI, H.; NAWATA, H. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C- dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*, v. 49, p. 1939–1945, 2000.

INOBUCHI, T.; NAWATA, H. NAD(P)H oxidase activation: a potential target mechanism for diabetic vascular complications, progressive beta-cell dysfunction and metabolic syndrome. *Curr Drug Targets*, v. 6, n. 4, p. 495-501, 2005.

ARAÚJO, G. R.

JAKUPOVIC, J.; SCHUSTER, A.; GANZER, U.; BOHLMANN, F.; BOLDT, P. E. Sesqui- and diterpenes from *Baccharis* species. *Phytochemistry*, v. 29, p. 2217, 1990.

JANBAZ, K. H.; SAEED, S. A.; GILANI A. H. Protective effect of rutin on paracetamol- and CCl₄-induced hepatotoxicity in rodents. *Fitoterapia*, v. 73, p. 557–563, 2003.

JANUÁRIO, A.H.; SANTOS, S.L.; MARCUSSI, S.; MAZZI, M.V.; PIETRO, R.C.; SATO, D.N.; ELLENA, J.; SAMPAIO, S.V.; FRANÇA, S.C.; SOARES, A.M. Neoclerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera*(Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. *Chem Biol Interact.* v. 150(3), p. 243-51. 2004.

JEONG, Y.J.; CHOI, Y.J.; KWON, H.M.; KANG, S.W.; PARK, H.S.; LEE, M.; KANG, Y.H. Differential inhibition of oxidized LDL-induced apoptosis in human endothelial cells treated with different flavonoids. *Br J Nutr.*, v. 93, n. 5, p.581-91, 2005.

JIANG, F.; GUO, N.; DUSTING, G.J. Modulation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase expression and function by 3',4'-dihydroxyflavonol in phagocytic and vascular cells. *J Pharmacol Exp Ther.*, v. 324, n. 1, p.261-9, 2008.

JIMENEZ, R.; LOPEZ-SEPULVEDA, R.; ROMERO, M.; TORALM.; COGOLLUDO, A.; PEREZ-VIZCAINO, F.; DUARTE, J. Quercetin and its metabolites inhibit the membrane NADPH oxidase activity in vascular smooth muscle cells from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Food and Function.* v. 6, n. 2, p. 409-14, 2015.

JONES, D. P. Redefining Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 8, n. 9/10, p. 1865-1879, 2006.

JOVANOVIC, S.V.; STEENKEN, S.; SIMIC, M.G.; HARA, Y. Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reaction of flavonoid radicals. In: Rice Evans, C., Parcker, L. (Eds.), *Flavonoid in Health and Disease*. MarcelDekker, p. 137–161, 1998.

KHAN, R.A.; KHAN, M.R.; SAHREEN, S. Protective effects of rutin against potassium bromate induced nephrotoxicity in rats. *BMC Complement Altern Med.* v. 12, p. 204, 2012.

KAMALAKKANNAN, N.; PRINCE, P.S. Antihyperglycaemic and antioxidant effect of rutin, a polyphenolic flavonoid, in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, v. 98, n. 1, p. 97-103, 2006.

KAMALAKKANNAN, N.; STANELY MAINZEN PRINCE, P. Rutin improves the antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. *Mol Cell Biochem.*, v. 293, p. 211–219, 2006.

KESSLER, M.; UBEAUD, G.; JUNG L. Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 55, n. 1, p. 131-142, 2003.

KIM, B.H.; CHOI, J.S.; YI, E.H.; LEE, J.K.; WON, C.; YE, S.K.; KIM, M.H. Relative antioxidant activities of quercetin and its structurally related substances and their effects on NF- κ B/CRE/AP-1 signaling in murine macrophages. *Mol Cells*, v. 35, n. 5, p. 410-20, 2013.

ARAÚJO, G. R.

KIM, M.; LIM, S.J.; KANG, S.W.; UM, B.H.; NHO, C.W. Aceriphyllum rossii extract and its active compounds, quercetin and kaempferol inhibit IgE-mediated mast cell activation and passive cutaneous anaphylaxis. *J Agric Food Chem.*, v. 62, n. 17, p. 3750-8, 2014.

KIM, Y.; KIM, W.J.; CHA, E.J. Quercetin-induced Growth Inhibition in Human Bladder Cancer Cells Is Associated with an Increase in Ca-activated K Channels. *Korean J Physiol Pharmacol.*, v. 15(5), p. 279-83. 2011.

KOMOLAFE, K.; OLALEYE, T.M.; OMOTUYI, O.I.; BOLIGON, A.A.; ATHAYDE, M.L.; AKINDAHUNSI, A.A.; TEIXEIRA DA ROCHA, J.B. In vitro antioxidant activity and effect of Parkia biglobosa bark extract on mitochondrial redox status. *J Acupunct Meridian Stud.*, v. 7, n. 4, p. 202-10, 2014.

KORKMAZ, A.; KOLANKAYA, D. Inhibiting inducible nitric oxide synthase with rutin reduces renal ischemia/reperfusion injury. *Can J Surg.*, v. 56 p. 6–14, 2013.

KOZŁOWSKA, A; SZOSTAK-WEGIEREK D. Flavonoids--food sources and health benefits. *Rocz Panstw Zakl Hig.*, v. 65(2) p. 79-85, 2014.

KRAUSE, K.H. Aging: a revisited theory based on free radicals generated by NOX family NADPH oxidases. *Exp Gerontol.*, v. 42, n. 4, p. 256–62, 2007.

KRINSKY, N. I. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med.*, v. 200, p. 248–254, 1992.

LÁZARO, S.F.; FONSECA, L.D.; MARTINS, E.R.; DE OLIVEIRA, N.J.; DUARTE, E.R.; Effect of aqueous extracts of *Baccharis trimera* on development and hatching of Rhipicephalus microplus (Acaridae) eggs. *Vet Parasitol.*, v. 194(1), p. 79-82, 2013.

LEE D.J.; KANG S.W. Reactive oxygen species and tumor metastasis. *Mol. Cells*, v. 35, p. 93-98, 2013.

LEE, C.S.; PARK, S.Y.; KO, H.H.; HAN, E.S. Effect of change in cellular GSH levels on mitochondrial damage and cell viability loss due to mitomycin c in small cell lung cancer cells. *Biochem Pharm.*, v. 68, p. 1857–67, 2004.

LEE, W.; KU, S.K.; BAE, J.S. Barrier protective effects of rutin in LPS-induced inflammation in vitro and in vivo. *Food Chem Toxicol.*, v. 50(9), p. 3048-55, 2012.

LEE, Y.K.; HWANG, J.T.; KWON, D.Y.; SURH, Y.J.; Park, O.J. Induction of apoptosis by quercetin is mediated through AMPK α 1/ASK1/p38 pathway. *Cancer Lett.* v. 292, p. 228–236, 2010.

LEUNG, P.S.; CHAN, Y.C. Role of oxidative stress in pancreatic inflammation. *Antioxid Redox Signal.*, v. 11, p. 135–165, 2009.

LEWANDOWSKA, U.; SZEWCZYK, K.; HRABEC, E.; JANECKA, A.; GORLACH, S. Overview of Metabolism and Bioavailability Enhancement of Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, p. 12183–12199, 2013.

LI, A. N.; LI, S.; ZHANG, Y. J.; XU, X. R.; CHEN, Y. M.; LI, H. B. Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. *Nutrients*, v. 6, p. 6020-6047, 2014.

ARAÚJO, G. R.

- LI, J.-M.; MULLEN, A.M.; YUN, S.; WIENTJES, F.; BROUNS, G.Y.; THRASHER, A.J.; SHAH, A.M. Essential role of the NADPH oxidase subunit p47phox in endothelial cell superoxide production in response to phorbol ester and tumor necrosis factor- α . *Circ Res.*, v. 90, p. 143–150, 2002.
- LIMA, C.S.A.; BIEBER, L.W.; MELLO, J.F. Constituintes antimicrobianos de *Achyrocline satureioides*, DC., In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 11., 1990. João Pessoa. *Anais...* João Pessoa, 1990. p. 205.
- LIMA, V. L. A. G.; MELO, E. A.; LIMA, D. E. S. Nota prévia: teor de compostos fenólicos totais em chás brasileiros. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 7, n. 2, p. 187-190, 2004.
- LINDSTROM, A.; OUYEN, C.; LYNCH, E.L.; BLUMENTHAL, M. Herb supplement sales increase 5.5% in 2012; herbal supplement sales rise for the 9th consecutive year; turmeric sales jump 40% in natural channel. *HerbalGram.*, v. 99, p. 60-65, 2013.
- LOPEZ-REVUELTA, A.; SANCHEZ-GALLEGO, J.I.; HERNANDEZ-HERNANDEZ, A.; SANCHEZ-YAGUE, J.; LLANILLO, M. Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress. *Chem Biol Interact*, v. 161, n. 1, p. 79-91, 2006.
- MACRAE, K.; STRETTON, C.; LIPINA, C.; BLACHNIO-ZABIELSKA, A.; BARANOWSKI, M.; GORSKI, J.; MARLEY, A.; HUNDAL, H.S. Defining the role of DAG, mitochondrial function, and lipid deposition in palmitate-induced proinflammatory signaling and its counter-modulation by palmitoleate. *J Lipid Res.*, v. 54, n. 9, p. 2366-78, 2013.
- MAJEWSKA-WIERZBICKA, M.; CZECZOT, H. Flavonoids in the prevention and treatment of cardiovascular diseases. *Pol Merk Lek.*, v. 32, p. 50-54, 2012.
- MARALDI, T. Natural compounds as modulators of NADPH oxidases. *Oxid Med Cell Longev.*, ID271602, 2013.
- MARCARINI, J. C.; TSUBOY, M. S. F.; LUIZ, R. C.; RIBEIRO, L. R.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MANTOVANI, M. S. Investigation of cytotoxic, apoptosis-inducing, genotoxic and protective effects of the flavonoid rutin in HTC hepatic cells. *Exper. Toxicol Pathology*, v. 63, p. 459–465, 2011.
- MATSUZAWA, A.; ICHIJO, H. Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1780, p. 1325–1336, 2008.
- MAURYA, A.K.; VINAYAK, M. Anticarcinogenic action of quercetin by downregulation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and protein kinase C (PKC) via induction of p53 in hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line. *Mol Biol Rep.*, v. 42(9), p. 1419-29, 2015b.
- MAURYA, A.K.; VINAYAK, M. Modulation of PKC signaling and induction of apoptosis through suppression of reactive oxygen species and tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1): key role of quercetin in cancer prevention. *Tumour Biol.*, v. Jun 16, 2015a.

ARAÚJO, G. R.

MCCORD, J.M. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.*, v. 108, p. 652–659, 2000.

MEIER, B.; CROSS, A.R.; HANCOCK, J.T.; KAUP, F.J.; JONES, O.T. Identification of a superoxide-generating NADPH oxidase system in human fibroblasts. *Biochem J.*, v. 275, p. 241–245, 1991.

MENDES, F.R.; TABACH, R.; CARLINI, E.A. Evaluation of *Baccharis trimera* and *Davilla rugosa* in tests for adaptogen activity. *Phytother Res.* v. 21(6), p. 517-22, 2007.

MENEZES, A.P.; DA SILVA, J.; ROLOFF, J.; REYES, J.; DEBASTIANI, R.; DIAS, J.F.; ROHR, P.; DE BARROS FALCÃO FERRAZ, A. *Baccharis trimera* (Less.) DC as genotoxicity indicator of exposure to coal and emissions from a thermal power plant. *Arch Environ Contam Toxicol.*, v. 65(3), p. 434-41, 2013.

MENEZES, A.P.; DA SILVA, J.; ROSSATO, R.R.; SANTOS, M.S.; DECKER, N.; DA SILVA, F.R.; CRUZ, C.; DIHL, R.R.; LEHMANN, M.; FERRAZ, A.B. Genotoxic and biochemical changes in *Baccharis trimera* induced by coal contamination. *Ecotoxicol Environ Saf.*, v. 114, p. 9-16, 2015.

MICHIE, A. M.; NAKAGAWA, R. The link between PKC alpha regulation and cellular transformation. *Immunol. Lett.*, v. 2, n. 96, p. 155-62, 2005.

MIDDLETON, E.J.R.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*, v. 52, p. 673-751, 2000.

MILES, S.L.; MCFARLAND, M.; NILES, R.M. Molecular and physiological actions of quercetin: need for clinical trials to assess its benefits in human disease. *Nutr Rev*, v. 72(11), p. 720-34, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. 2006.

MINTEGUIAGA, M.; UMPIÉRREZ, N.; XAVIER, V.; LUCAS, A.; MONDIN, C.; FARIÑA, L.; CASSEL, E.; DELLACASSA, E. Recent Findings in the Chemistry of Odorants from Four *Baccharis* Species and Their Impact as Chemical Markers. *Chem Biodivers.*, v. 12(9), p. 1339-48. 2015.

MIRABALLES, M.; GÁMBARO, A.; ARES, G. Sensory characteristics of antioxidant extracts from Uruguayan native plants: influence of deodorization by steam distillation. *Food Sci Technol Int.*, v. 19, n. 6, p. 485-92, 2013.

MIURA, T.; MURAOKA, S.; FUJIMOTO, Y. Inactivation of creatine kinase induced by quercetin with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. pro-oxidative and anti-oxidative actions of quercetin. *Food Chem. Toxicol.*, v. 41, p. 759–765, 2003.

MOCHLY-ROSEN, D. Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science*, v. 268, p. 247–251, 1995.

MOCHLY-ROSEN, D.; DAS, K.; GRIMES, K.V. Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nat Rev Drug Discov.*, v. 11(12), p. 937-57, 2012.

ARAÚJO, G. R.

MONKS, N.R.; BORDIGNON, S.A.L.; FERRAZ, A.; MACHADO, K.R.; FARIA, D.H.; LOPES, R.M.; MONDIN, C.A.; SOUZA, I.C.C.; LIMA, M.F.S.; ROCHA, A.B.; SCHWARTSMANN, G. Anti-tumour screening of Brazilian plants. *Pharmaceutical Biology*, v. 40, p. 494–500, 2002.

MORIKAWA, K.; NONAKA, M.; NARAHARA M.; TORII, I.; KAWAGUCHI K.; YOSHIKAWA T.; KUMAZAWA Y.; MORIKAWA S. Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. *Life Sci.*, v. 74, n. 6, p. 709–21, 2003.

MORRIS, M. E.; ZHANG, S. Flavonoid–drug interactions: Effects of flavonoids on ABC transporters. *Life Sci.*, v. 78, p. 2116–2130, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, v. 6, p. 55–63, 1983.

MOTL, O.; TRKA, A. Zusammensetzung des brasilianischen vassoura-oils (aus *Baccharis dracunculifolia*). *Parfum. Kosmet.*, v. 64, p. 488–491, 1983.

NAKAMURA, Y.; ISHIMITSU S.; TONOGAI, Y. Effects of quercetin and rutin on serum and hepatic lipid concentrations, fecal stEROSid ex- cretion and serum antioxidant properties. *J. Health Sci*, v. 46, p. 229–240, 2000.

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.*, v. 41, n. 2, p. 121–141, 2005.

NOGUEIRA, N.P.; REIS, P.A.; LARANJA, G.A.; PINTO, A.C.; AIUB, C.A.; FELZENSZWALB, I.; PAES, M.C.; BASTOS, F.F.; BASTOS, V.L.; SABINO, K.C.; COELHO, M.G. In vitro and in vivo toxicological evaluation of extract and fractions from *Baccharis trimera* with anti-inflammatory activity. *J Ethnopharmacol.* v. 138(2), p. 513–22, 2011.

NOROOZI, M.; ANGERSON, W.J.; LEAN, M.E. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am J Clin Nutr.*, v. 67, n. 6, p.1210–8. 1998

OHNISHI, F.; NANNAI, H. Quercetin potentiates TNF-induced antiviral activity. *Antiviral research*, v. 22, n.4, p. 327–331, 1993.

OHNO, S.; NISHIZUKA, Y. Protein kinase C isotypes and their specific functions: prologue. *J Biochem.*, v. 132, p. 509–511, 2002.

OLIVEIRA, A.C.; ENDRINGER, D.C.; AMORIM, L.A.; DAS GRAÇAS, L.; BRANDÃO, M.; COELHO, M.M. Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. *J Ethnopharmacol.* v. 102(3), p.465–9, 2005.

OLIVEIRA, C. B.; COMUNELLO, L. N.; LUNARDELLI, N.; AMARAL, R. H.; PIRES, M. G. S.; SILVA, G. L.; MANFREDINI, V.; VARGAS, C. R.; GNOATTO, S. C. B.; OLIVEIRA, J. R.; GOSMANN, G. Phenolic Enriched Extract of *Baccharis trimera* Presents Anti-inflammatory and Antioxidant Activities. *Molecules*, v. 17, n. 1, p. 1113–1123, 2012.

ARAÚJO, G. R.

OLIVEIRA, C.B.; COMUNELLO, L.N.; MACIEL, E.S.; GIUBEL, S.R.; BRUNO, A.N.; CHIELA, E.C.; LENZ, G.; GNOATTO, S.C.; BUFFON, A.; GOSMANN, G. The inhibitory effects of phenolic and terpenoid compounds from *Baccharis trimera* in Siha cells: differences in their activity and mechanism of action. *Molecules*, v. 18(9), p. 11022-32, 2013.

OLIVEIRA, R.N.; REHDER, V.L.; OLIVEIRA, A.S.; JERALDO, VDE. L.; LINHARES, A.X.; ALLEGRETTI, S.M. Anthelmintic activity in vitro and in vivo of *Baccharis trimera* (Less) DC against immature and adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Exp Parasitol.*, v. 139, p. 63-72, 2014.

PÁDUA, B. C.; ROSSONI JUNIOR, J.V.; DE BRITO MAGALHAES, C.L.; SEIBERF, J.B.; ARAUJO, C.M.; BIANCO DE SOUZA, G.H.; CHAVES, M.M.; SILVA, M.E.; PEDROSA, M.L.; COSTA, D.C. *Baccharis trimera* improves the antioxidant defense system and inhibits iNOS and NADPH oxidase expression in a rat model of inflammation. *Curr Pharm Biotechnol.*, v. 14(11), p. 975-84, 2013.

PÁDUA, B. C.; ROSSONI-JUNIOR, J. V.; DE BRITO MAGALHÃES, C.L.; CHAVES, M.M.; SILVA, M.E.; PEDROSA, M.L.; DE SOUZA, G.H.; BRANDÃO, G.C.; RODRIGUES, I.V.; LIMA, W.G.; COSTA, D.C. Protective Effect of *Baccharis trimera* Extract on Acute Hepatic Injury in a Model of Inflammation Induced by Acetaminophen. *Mediators of Inflammation*. 2014: ID 196598, 2014.

PÁDUA, B. C.; SILVA, L. D.; ROSSONI JR, J. V.; HUMBERTO, J. L.; CHAVES, M. M.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L.; COSTA, D. C. Antioxidant properties of *Baccharis trimera* in the neutrophils of Fisher rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 129, p. 381-386, 2010.

PAIK, Y.H., BRENNER, D.A. NADPH oxidase mediated oxidative stress in hepatic fibrogenesis. *Korean J Hepatol.*, v. 17(4), p. 251-7, 2011.

PAIVA, F.A.; BONOMO, L.DE F.; BOASQUIVIS, P.F.; DE PAULA, I.T.; GUERRA, J.F.; LEAL, W.M.; SILVA, M.E.; PEDROSA, M.L.; OLIVEIRA, R.DE P. Carqueja (*Baccharis trimera*) Protects against Oxidative Stress and β -Amyloid-Induced Toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Oxid Med Cell Longev.*, v. 2015, p. 740162, 2015.

PAN, H.C.; JIANG, Q.; YU, Y.; MEI, J.P.; CUI, Y. K.; ZHAO, W. Quercetin promotes cell apoptosis and inhibits the expression of MMP-9 and fibronectin via the AKT and ERK signalling pathways in human glioma cells. *Neurochemistry International*. v. 80, p. 60–71, 2015.

PAPAS, A. M. Diet and antioxidant status. *Food Chem Toxicol* , v. 37, p. 999-1007, 1999.

PAUL, E.L.; LUNARDELLI, A.; CABERLON, E.; OLIVEIRA, C.B.; SANTOS, R.C.V.; BIOLCHI, V.; BASTOS, C.M.A.; MOREIRA, K.B.; NUNES, F.B.; GOSMANN, G. *et al.* Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Baccharis trimera* aqueous extract on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation *in vitro*. *Inflammation*, v. 32, p. 419–425, 2009.

ARAÚJO, G. R.

PEČIVOVÁ, J.; MAČIČKOVÁ, T.; SVITEKOVÁ, K.; NOSÁL, R. Quercetin inhibits degranulation and superoxide generation in PMA stimulated neutrophils. *Interdiscip Toxicol.*, v. 5(2), p. 81-3, 2012.

PERON A.P.; FELIPES J.; MATTGE G.I.; CANTAGALLI L.B.; MARIUCCI R.G.; VICENTINI V.E.P. Avaliação mutagênica das plantas medicinais *Baccharis trimera Less. e Solanum melongena L.* em células de medula óssea de ratos Wistar. *Rev Bras Biocien*, v. 6, p. 127-130, 2008.

PIETTA, G. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*, v. 63, p. 1035-42, 2000.

PIGNATELLI, P.; DI SANTO, S.; BUCHETTI, B.; SANGUIGNI, V.; BRUNELLI, A.; VIOLI, F. Polyphenols enhance platelet nitric oxide by inhibiting protein kinase C-dependent NADPH oxidase activation: effect on platelet recruitment. *FASEB J.*, v. 20(8), p. 1082-9, 2006.

PIGNATELLI, P.; LENTI, L.; SANGUIGNI, V.; FRATI, G.; SIMEONI, I.; GAZZANIGA, P.P.; PULCINELLI, F. M.; VIOLI, F. Carnitine inhibits arachidonic acid accumulation into platelet phospholipids. Effects on platelet function and oxidative stress. *Am. J. Physiol.*, v. 284, p. H41-H48, 2003.

PIGNATELLI, P.; SANGUIGNI, V.; LENTI, L.; FERRO, D.; FINOCCHI, A.; ROSSI, P.; VIOLI, F. gp91phox-dependent expression of platelet CD40 ligand. *Circulation.*, v. 110, p. 1326-1329, 2004.

PRANCE, G. T. Floristic inventory of the tropics: where do we stand?. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, [S.l.], v. 64, p. 559-684, 1977.

PREDES, F.S.; RUIZ, A.L.; CARVALHO, J.E.; FOGLIO, M.A.; DOLDER, H. Antioxidative and in vitro antiproliferative activity of *Arctium lappa* root extracts. *BMC Complement Altern Med.*, v. 23, p. 11- 25, 2011.

PU, F.; MISHIMA K.; IRIE, K.; TANAKA Y.; ORITO K.; *et al.* Neuroprotective effects of quercetin and rutin on spatial memory impairment in an 8-arm radial maze task and neuronal death induced by repeated cerebral ischemia in rats. *J Pharmacol Sci*, v. 104, p. 329-34, 2007.

QIN, B.; CARTIER, L.; DUBOIS-DAUPHIN, M.; LI, B.; SERRANDER, L.; KRAUSE K.H. A key role for the microglial NADPH oxidase in APP-dependent killing of neurons. *Neurobiol Aging*, v. 27, n. 11, p. 1577-87, 2006.

RADEKE, H.H.; CROSS, A.R.; HANCOCK, J.T.; JONES, O.T.G.; NAKAMURA, M.; KAEVER, V.; RESCH, K. Functional expression of NADPH oxidase components (- and -subunits of cytochrome b558 and 45-kDa flavoprotein) by intrinsic human glomerular mesangial cells. *J Biol Chem.*, v. 266, p. 21025-21029, 1991.

RAHMAN, T.; HOSEN, I.; ISLAM, M.; SHEKHAR, H. Oxidative stress and human health. *Adv Biosci Biotechnol.*, v. 3, p. 997-1019, 2012.

RICE-EVANS, C. Flavonoid antioxidants. *Curr Med Chem.*, v. 8, p. 797-807, 2001.

ARAÚJO, G. R.

RODRIGUES, C.R.F.; DIAS, J.H.; DE MELLO, R.N.; RICHTER, M.F.; PICADA, J.N.; FERRAZ, A.B.F. Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in mice. *J. Ethnopharmacol.*, v. 125, p. 97–101, 2009.

RODRIGUES, C.R.F.; DIAS, J.H.; SEMEDO, J.G.; DA SILVA, J.; FERRAZ, A.B.F.; PICADA, J.N. Mutagenic and genotoxic effects of *Baccharis dracunculifolia* (D.C.). *J. Ethnopharmacol.*, v. 124, p. 321–324, 2009.

ROTELLI, A.E.; GUARDIA T.; JUÁREZ, A. O.; DE LA ROCHA, N.E.; PELZER, L.E. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacol Res*, v. 48, n. 6, p. 601-6, 2003.

SAK, K. Dependence of DPPH radical scavenging activity of dietary flavonoid quercetin on reaction environment. *Mini Rev Med Chem.*, v. 14, n. 6, p. 494-504, 2014.

SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Laboratory Press, 1989. Cold Spring Harbor.

SAMPSON, L.; RIMM, E.; HOLLMAN, P.C.; DE VRIES, J.H.; KATAN, M.B. Flavonol and flavone intakes in US health professionals. *J Am Diet Assoc.*, v. 102, n. 10, p. 1414-20, 2002.

SÁNCHEZ, M.; GALISTEO, M.; VERA, R.; VILLAR, I.C.; ZARZUELO, A.; TAMARGO, J.; PÉREZ-VIZCAÍNO, F.; DUARTE J. Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.*, v. 24(1), p. 75-84, 2006.

SCHENKEL, G.P. Cuidados com os medicamentos. Santa Catarina: UFSC, 2004. 4 ed.

SCHRAMM, A.; MATUSIK, P.; OSMENDA, G.; GUZIK, T.J. Targeting NADPH oxidases in vascular pharmacology. *Vascular Pharmacology*, v. 56, n. 5-6, p. 216–231, 2012.

SEEFF, L. B.; BONKOVSKY, H. L.; NAVARRO, V. J.; WANG, G. Herbals and the Liver: A Review of Adverse Effects and Mechanisms. *Gastroenterology*, doi: 10.1053/j.gastro.2014.12.004. 2015

SEERAM, N.P.; HEBER, D. Impact of berry phytochemicals on human health: Effects beyond antioxidation. In *Lipid Oxidation and Antioxidants: chemistry, Methodologies and Health Effects*; ACS Symposium Series 956; Ho, C T., Shahidi, F S. Eds. Oxford University Press: New York, 2006, Chapter 21. 2006.

SESHIAH, P.N.; WEBER, D.S.; ROCIC, P.; VALPPU, L.; TANIYAMA, Y.; GRIENDLING, K.K. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res.*, v. 91, p. 406-413, 2002.

SHARMA, S.; ALI, A.; ALI, J.; SAHNI, J.K.; BABOOTA, S. Rutin therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expert Opin Investig Drugs*, v. 22(8), p. 1063-79, 2013.

ARAÚJO, G. R.

SHIOSE, A.; KURODA, J.; TSURUYA, K.; HIRAI, M.; HIRAKATA, H.; NAITO, S.; HATTORI, M.; SAKAKI, Y.; SUMIMOTO, H. A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. *J Biol Chem.*, v. 276, p. 1417–1423, 2001.

SIMÕES, C.M. *Étude de l'activité antivirale et des relation structure-activité de substances d'origine naturelle: plantes utilisées em médecine traditionnelle au sud Du Brésil, saponénines et saponosides triterpeniques.* 1992. Tese doutorado. Unité de Formation et Recherche de pharmacie, université de Rennes I, Rennes. 1992.

SIMÕES-PIRES, C. S.; QUEIROZ, E. F.; HENRIQUESA, T.; HOSTETTMANN, K. Isolation and On-line Identification of Antioxidant Compounds from Three *Baccharis Species* by HPLC-UV-MS/MS with Post-column Derivatisation. *Phytochem. Anal.*, v. 16, p. 307–314, 2005.

SOICKE, H.; LENG-PESCHLOW, E. Characterization of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. *Planta Med*, v. 53, p. 37–39, 1987.

SONG, K.; NA, J.Y.; KIM, S.; KWON, J. Rutin upregulates neurotrophic factors resulting in attenuation of ethanol-induced oxidative stress in HT22 hippocampal neuronal cells. *J Sci Food Agric.*, v. Sep 23, 2014.

SPENCER, J.P. Beyond antioxidants: the cellular and molecular interactions of flavonoids and how these underpin their actions on the brain. *Proc Nutr Soc*; v. 6, n.2, p. 244-60, 2010.

STANELY MAINZEN PRINCE, P.; KARTHICK, M. Preventive effect of rutin on lipids, lipoproteins, and ATPases in normal and isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *J Biochem Mol Toxicol.*, v. 21, p. 1–6, 2007.

STEFFEN, Y.; GRUBER, C.; SCHEWE, T.; SIES, H. Mono-O-methylated flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys.*, v. 469, p. 209–19, 2008.

STEINBERG, S. F. Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol. Rev.* v. 88, p. 1341–1378, 2008.

TAGHVAEI, M.; JAFARI, S. M. Application and stability of natural antioxidants in edible oils in order to substitute synthetic additives. *J Food Sci Technol.*, v. 52, n. 3, p. 1272-82, 2015.

TARKO, T.; DUDA-CHODAK, A.; ZAJĄC, N. Digestion and absorption of phenolic compounds assessed by in vitro simulation methods. A review. *Rocz Panstw Zakl Hig.*, v. 64, n. 2, p. 79-84, 2013.

TIAN, F.; MCLAUGHLIN, J.L. Bioactive flavonoids from the black locust tree, *Robinia pseudoacacia*. *Pharm Biol*, v. 38, p. 229–234, 2000.

TOBWALA, S.; FAN, W.; HINES, C.J.; FOLK, W.R.; ERCAL, N. Antioxidant potential of *Sutherlandia frutescens* and its protective effects against oxidative stress in various cell cultures. *BMC Complement Altern Med.*, v. 29, n. 14, p. 271, 2014.

ARAÚJO, G. R.

TROJAN-RODRIGUES, M.; ALVES, T.L.; SOARES, G.L.; RITTER, M.R. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *J Ethnopharmacol.* v. 139(1), p. 155-63, 2012.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 42, n. 2, 2006.

TURRENS, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.*, v. 522, n. 2, p. 335-344, 2003.

VERDI L. G.; BRIGHENTE I. M. C.; MOACIR GERALDO PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Quím. Nova*, v.28, n.1, São Paulo, 2005

VIEIRA, M.L.; JOHANN, S.; HUGHES, F.M.; ROSA, C.A.; ROSA, L.H. The diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi associated with medicinal plant *Baccharis trimera* (Asteraceae) from the Brazilian savannah. *Can J Microbiol.*,v. 60(12), p. 847-56, 2014.

VIEIRA, T. O.; SEIFRIZ, I.; CHARÃO, C. C. T.; DE OLIVEIRA, S. Q.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Antioxidant effects of crude extracts from *Baccharis* species: inhibition of myeloperoxidase activity, protection against lipid peroxidation, and action as oxidative species scavenger. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 21, p. 4, 2011.

VILLA, R.D.; NOGUEIRA, R.F.P. O uso de reações de fenton na remediação de solo contaminado com p, p' DDT. *Eclética Química*, v. 30, n. 2, p. 69-75, 2005.

VIRGILI, F.; MARINO, M. Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity. *Free Radic Biol Med.*, v. 45, n. 9, p. 1205-16, 2008.

VISKUPICOVA, J.; STROSOVA, M.K.; ZIZKOVA, P.; MAJEKOVA, M.; HORAKOVA, L. Rutin stimulates sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase activity (SERCA1) and protects SERCA1 from peroxynitrite mediated injury. *Mol Cell Biochem.*, v. 402(1-2), p. 51-62, 2015.

WANG, L.; CHENG, X.; LI, H.; QIU, F.; YANG, N.; WANG, B.; LU, H.; WU, H.; SHEN, Y.; WANG, Y.; JING, H. Quercetin reduces oxidative stress and inhibits activation of c-Jun N-terminal kinase/activator protein-1 signaling in an experimental mouse model of abdominal aortic aneurysm. *Mol Med Rep.*, v. 9(2), p. 435-42, 2014.

WANG, S. WANG, Y.; SU, Y.; ZHOU, W.; YANG, S.; ZHANG, R.; ZHAO, M.; LI, Y.; ZHANG, Z.; ZHAN, D.; LIU, R. Rutin inhibits b-amyloid aggregation and cytotoxicity, attenuates oxidative stress, and decreases the production of nitric oxide and proinflammatory cytokines. *NeuroToxicology*, v. 33, p. 482-490, 2012.

WANG, X.; OUYANG, Y.Y.; LIU, J.; ZHAO, G. Flavonoid intake and risk of CVD: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Br J Nutr.* v. 111, n. 1, 1-11, 2014.

ARAÚJO, G. R.

WANG, Y.; WANG, L.; LIU, Z.; ZHANG, D.; ZHANG, O. In vivo evaluation of silibin nanosuspensions targeting liver. *J Biomed Nanotechnology*, v. 8, p. 760-769, 2012.

WEI, Y.H.; LEE, H.C. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 227, p. 671-682, 2002.

WILLIAMS M.T.; HORD N.G. The role of dietary factors in cancer prevention: beyond fruits and vegetables. *Nutr Clin Pract*, v. 20, p. 451-9, 2005.

WILLIAMS, R.J.; SPENCER, J.P.E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med.*, v. 36, p. 838-849, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants*. Geneve, 2003. v 1.

WU, W. S.; TSAI, R. K.; CHANG, C. H.; WANG, S.; WU, J. R.; CHANG, Y. X. Reactive oxygen species mediated sustained activation of protein kinase C α and ERK for migration of human hepatoma cell HepG2. *Molecular Cancer Research*, v. 4, n. 10, p. 747- 758, 2006.

WU, W-S. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.*, v. 25, p. 695-705, 2006.

XIA, E.Q.; DENG, G.F.; GUO, Y.J.; LI, H.B. Biological activities of polyphenols from grapes. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 11, p. 622-646, 2010.

XIANG T.; FANG Y.; WANG S. Quercetin Suppresses HeLa Cells by Blocking PI3K/Akt Pathway. *J Huazhong Univ Sci Technol.*, v. 34, n. 5, p. 740-744, 2014.

XU, J. W.; IKEDA, K.; KOBAYAKAWA, A.; IKAMI, T.; KAYANO, Y.; MITANI, T.; YAMORI, Y. Downregulation of Rac1 activation by caffeic acid in aortic smooth muscle cells. *Life Sci.*, v. 76, p. 2861-2872, 2005.

XU, L.; SUN, L.; LU, L.; ZHONG, X.; MA, Y.; QIN, J. Effects of quercetin on CYP450 and cytokines in Aroclor 1254 injured endometrial cells of the pregnant rats. *Biomed Res Int.*, v. 2014, p. 497- 508, 2014.

YAMAMOTO, N.; MOON, J. H.; TSUSHIDA, T. *et al.* Inhibitory effect of quercetin metabolites and their related derivatives on copper ion-induced lipid peroxidation in human low-density lipoprotein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 372, n. 15, p. 347-354, 1999.

YANG, S.; MADYASTHA, P.; BINGEL, S.; RIES, W.; KEY, L. A new super-oxide-generating oxidase in murine osteoclasts. *J Biol Chem.*, v. 276, p. 5452-5458, 2001.

YANG, Y.; BAI, L.; LI, X.; XIONG, J.; XU, P.; GUO, C.; XUE, M. Transport of active flavonoids, based on cytotoxicity and lipophilicity: an evaluation using the blood-brain barrier cell and Caco-2 cell models. *Toxicol In Vitro.*, v, 28(3), p. 388-96, 2014.

ZALBA, G.; JOSE MONT, F.J.; DI, G.S.; MORENO, M.U.; FORTUÑO, M.A.; FORTUÑO, A.; BEAU-TEZ, J. Oxidative stress in arterial hypertension. Role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension*, v. 38, p. 1395-1399, 2001.

ARAÚJO, G. R.

ZHANG, Y.; DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, v. 7, n. 4, p. 240–50, 2000.

ZHANG, Y.; GORDON, G. B. A strategy for cancer prevention: Stimulation of the Nrf2-ARE signaling pathway. *Mol. Cancer Ther.*, v. 3, p. 885–893, 2004.

ZHANG, Y.; SEERAM, N.; LEE, R.; FENG, L.; HEBER, D. Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. *J Agric Food Chem.*, v. 56, n. 3, p. 670-675, 2008.