

SAMUEL RICARDO COMAR

**AÇÃO DE QUERCETINA, RUTINA E EXTRATO HIDROALCOÓLICO  
DE *Vitis vinifera* EM ERITRÓCITOS HUMANOS SUBMETIDOS  
À SOBRECARGA OXIDATIVA, *IN VITRO*.**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
à obtenção do grau de Mestre em Ciências  
Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências  
da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora:  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Suely Soares Leonart

Co-orientadores:  
Prof. Dr. Aguinaldo José do Nascimento  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tomoe Nakashima

CURITIBA

2002

## PARECER

A Comissão Examinadora indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas para julgar e avaliar a dissertação de mestrado "Ação de quercetina, rutina e extrato hidroalcoólico de *vitis vinifera* em eritrócitos humanos submetidos a sobrecarga oxidativa *in vitro*", de autoria do pós-graduando **Samuel Ricardo Comar**, composta pelas Professoras: Dr<sup>a</sup> Maria Sueily Soares Leonart (Orientadora/Presidente) Dr<sup>a</sup> Dulcinéia Saes Parra Abdalla (USP) e Dr<sup>a</sup> Maria Eliane Merlin Rocha (UFPR).

A Comissão Examinadora aprova a dissertação com nota 9,0, conceito A e recomenda sua publicação após as correções sugeridas, que serão conferidas pelo orientador.

Curitiba, 01 de novembro de 2002.



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Sueily Soares Leonart



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Dulcinéia Saes Parra Abdalla



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Eliane Merlin Rocha

*Aos meus queridos pais, Mercil e Cida, pela motivação e consciência de que nunca se deve deixar de estudar. A Elaine, pelo amor, pelo carinho e companheirismo nos momentos mais importantes.*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Maria Suely Soares Leonart, a mais sincera gratidão pelo grande apoio, motivação, pelo exemplo de sensibilidade e de honestidade, pelos conhecimentos transmitidos, pela qualidade deste trabalho e, acima de tudo, pela sua amizade.

Ao meu co-orientador Professor Aguinaldo José do Nascimento, pelo companheirismo, prestação, dedicação e pelos conhecimentos em informática e estatística, imprescindíveis na realização deste trabalho.

À minha co-orientadora Professora Tomoe Nakashima, pelo apoio, sugestões e pela generosidade em ceder a quercetina e a rotina, assim como os aparelhos do Laboratório de Fitoquímica, fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Professor Obdúlio Gomes Miguel, cuja dedicação ao trabalho em laboratório possibilitaram a realização de parte deste trabalho. Agradeço também pelo aprendizado em fitoquímica.

Ao colega João Luiz de Souza Carvalho os mais sinceros agradecimentos pelo apoio e competência com que conduziu as análises de cromatografia líquida de alta eficiência, deste trabalho.

A todos os professores deste Curso de Pós-Graduação que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

À grande amiga Ligia Maria Claro, o meu agradecimento pelo incentivo, companheirismo e amizade, que sempre marcaram a nossa convivência ao longo desses três anos de pesquisa.

Aos alunos e funcionários do Laboratório de Citologia Clínica A, em especial a Daniel Krukroski e Caroline Luise Prochaska, pelo auxílio prestado em alguns experimentos deste trabalho e a Irene Ermelino Santos, pela colaboração na lavagem do material, bem como pela sua presteza e bom humor.

Aos alunos e professores do Laboratório de Farmacognosia I e II, na figura do professor Cid Aimbiré de Moraes Santos, pelo acesso irrestrito ao espectrofotômetro durante a realização deste trabalho.

À professora Miriam Blumel Chociai por ter despertado o meu interesse em estudar polifenóis.

Aos professores e funcionários responsáveis pelos Laboratórios de Bioquímica Clínica I e II e de Controle de Qualidade I, pelo empréstimo de reagentes.

Ao Departamento de Bioquímica, pelo empréstimo do liofilizador.

Aos meus amigos Alexandre (Cari), Jean Patrick, Marcão e Wesley pelo incentivo e momentos de descontração.

Aos meus irmãos Léio, Deisi e Paulo, pelo carinho, afeto e união.

Aos meus primos Danilo, Diego, Diogo, Rafael e Vinícius, que me apoiaram ao longo desses anos e dos quais guardarei sempre boas e divertidas recordações.

Ao meu tio Manoel Peres Bazan (tio Manéco) por ceder seu apartamento, onde morei ao longo de minha graduação e maior da parte da Pós-Graduação.

Àqueles que gentilmente doaram seu sangue para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE TABELAS .....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	x
RESUMO .....	xii
ABSTRACT .....	xiii
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
1.1 O ERITRÓCITO HUMANO .....	02
1.1.1 Membrana Eritrocitária .....	03
1.1.2 A molécula de Hemoglobina .....	04
1.1.3 Metabolismo Eritrocitário .....	05
1.1.4 Envelhecimento do Eritrócito .....	08
1.2 RADICAIS LIVRES E SOBRECARGA OXIDATIVA EM ERITRÓCITOS HUMANOS .....	10
1.3 DOENÇAS HEMOLÍTICAS CORRELACIONADAS COM A SOBRECARGA OXIDATIVA .....	15
1.4 SUBSTÂNCIAS OXIDANTES E ANTIOXIDANTES EMPREGADAS EM ESTUDOS ENVOLVENDO ESTRESSE OXIDATIVO .....	17
1.4.1 Compostos Polifenólicos .....	18
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
3.1 COLETA .....	29
3.2 PREPARO DAS SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS .....	29
3.3 TRATAMENTO DAS SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS COM FLAVONÓIDES30	
3.3.1 Incubação com Quercetina e/ou Rutina .....	30
3.4 TRATAMENTO DAS SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS COM MESILATO DE DEFEROXAMINA .....	30
3.5 TRATAMENTO DAS SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS COM MESILATO DE DEFEROXAMINA E FLAVONÓIDES .....	31
3.5.1 Incubação com Quercetina ou Rutina e Mesilato de Deferoxamina .....	31
3.6 TRATAMENTO DAS SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS COM EXTRATO DE <i>Vitis vinifera</i> .....	31
3.7 TRATAMENTO DAS SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS COM OXIDANTES ...	31
3.7.1 Incubação com <i>tert</i> -Butilhidroperóxido .....	31
3.7.2 Incubação com Cloridrato de Fenil-hidrazina .....	32
3.8 PREPARO DO EXTRATO DE <i>Vitis vinifera</i> .....	32
3.9 ANÁLISE FITOQUÍMICA DE <i>Vitis vinifera</i> .....	34
3.9.1 Reação de Shinoda .....	34
3.9.2 Reconhecimento de Antocianinas .....	34
3.9.3 Pesquisa de Taninos .....	34
3.9.3.1 Reação com cloreto férrico 1 % (m/v) .....	34
3.9.3.2 Reação com acetato de chumbo 10 % (m/v) .....	34
3.10 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA E ESPECTROMETRIA DO EXTRATO DE <i>Vitis</i> <i>vinifera</i> .....	35
3.10.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	35
3.10.2 Espectrometria Uv-Visível do Extrato de <i>Vitis vinifera</i> .....	37
3.11 DETERMINAÇÕES REALIZADAS NAS AMOSTRAS DE SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS COM OXIDANTES E/OU ANTIOXIDANTES PARA AVALIAÇÃO DO METABOLISMO OXIDATIVO .....	38
3.11.1 Determinação Espectrofotométrica da Glutathiona Reduzida (GSH) .....	38
3.11.1.1 Preparo do hemolisado .....	38
3.11.1.2 Determinação da concentração de hemoglobina .....	38

3.11.1.3	Determinação da concentração de GSH .....	38
3.11.1.4	Cálculos e valores de referência .....	39
3.11.2	Determinação da Formação de Metahemoglobina .....	40
3.11.3	Contagem de Corpos de Heinz .....	42
3.12	<b>COMPORTAMENTO DOS FLAVONÓIDES EM TAMPÃO FOSFATO SALINA</b>	<b>42</b>
3.13	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	<b>44</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>81</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>100</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA GLICÓLISE, DA VIA DAS PENTOSE E DO CICLO DE LUEBERING-RAPOPORT EM ERITRÓCITOS HUMANOS.....	08
FIGURA 2 - OXIDAÇÃO ERITROCITÁRIA .....	14
FIGURA 3 - ESTRUTURA DA MOLÉCULA DE MESILATO DE DEFEROXAMINA .....	18
FIGURA 4 - CLASSIFICAÇÃO DOS FLAVONÓIDES .....	20
FIGURA 5 - ESTRUTURA BÁSICA E SISTEMA DE NUMERAÇÃO DOS ANEIS DOS FLAVONÓIDES .....	21
FIGURA 6 - REAÇÕES QUÍMICAS DA QUERCETINA COM ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO .....	23
FIGURA 7- ESTRUTURA DOS FLAVONÓIDES QUERCETINA E RUTINA .....	24
FIGURA 8 - ESTRUTURA BÁSICA DE ANTOCIANIDINAS .....	25
FIGURA 9 - ROTEIRO DE PREPARO DE EXTRATO DE <i>Vitis vinifera</i> .....	33
FIGURA 10 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE <i>Vitis vinifera</i> E PADRÃO DE ANTOCIANIDINAS, OBTIDO POR CLAE, COLUNA X-TERRA FASE MÓVEL: H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> :MEOH:ACN-55:39:6.....	36
FIGURA 11 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO UV-VIS (250-650nm) DO COMPOSTO COM TEMPO DE RETENÇÃO DE 27,03 MINUTOS DO EXTRATO DE <i>Vitis vinifera</i> .....	37
FIGURA 12 - ESPECTRO ULTRA VIOLETA DE QUERCETINA E DE RUTINA EM METANOL E EM TAMPÃO FOSFATO SALINO pH 7,4 .....	43
FIGURA 13 - CONCENTRAÇÕES DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) EM SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS HUMANOS, SUBMETIDOS À AÇÃO DE <i>tert</i> -BUTILHIDROPERÓXIDO 0,5 A 5 mM .....	49
FIGURA 14 - FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS HUMANOS SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE <i>tert</i> -BUTILHIDROPERÓXIDO 0,5 A 5 mM .....	50
FIGURA 15 - AÇÃO DE <i>tert</i> -BUTILHIDROPERÓXIDO 1 A 5 mM NA FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ EM SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS HUMANOS .....	51
FIGURA 16 - AÇÃO DA QUERCETINA SOBRE A FORMAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH), EM SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS HUMANOS, SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE <i>tert</i> -BUTILHIDROPERÓXIDO 1 mM, EM FUNÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO .....	52
FIGURA 17 - AÇÃO DA QUERCETINA SOBRE A FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA, EM SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS HUMANOS, SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE <i>tert</i> -BUTILHIDROPERÓXIDO 2 mM EM FUNÇÃO DO TEMPO.53	



FIGURA 18 - AÇÃO DE QUERCETINA SOBRE A FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ, EM SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS HUMANOS SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE <i>terc</i> -BUTILHIDROPERÓXIDO 3 mM .....	54
FIGURA 19 - AÇÃO DE QUERCETINA SOBRE A FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA, EM SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS HUMANOS, SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE CLORIDRATO DE FENILHIDRAZINA 0,5 mM .....	55
FIGURA 20 - AÇÃO DA RUTINA SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH), EM SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS HUMANOS SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE <i>terc</i> -BUTILHIDROPERÓXIDO 0,5 A 2,0 mM .....	56
FIGURA 21 - AÇÃO DE RUTINA SOBRE A FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ, EM SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS HUMANOS SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE <i>terc</i> -BUTILHIDROPERÓXIDO 3 mM .....	57
FIGURA 22 - AÇÃO DE EXTRATO DE <i>Vitis Vinifera</i> 0,01 A 1 mg/ml, SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) EM SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS HUMANOS OXIDADOS POR <i>terc</i> -BUTILHIDROPERÓXIDO 0,5 mM .....	58
FIGURA 23 - AÇÃO DE EXTRATO DE <i>Vitis Vinifera</i> SOBRE A FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ, EM SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS HUMANOS SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE <i>terc</i> -BUTILHIDROPERÓXIDO 3 mM .....	59
FIGURA 24 - AÇÃO DE MESILATO DE DEFEROXAMINA SOBRE A FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ, EM SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS HUMANOS SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE <i>terc</i> -BUTILHIDROPERÓXIDO 3 mM.	60
FIGURA 25 - AÇÃO DA QUERCETINA, RUTINA E MESILATO DE DEFEROXAMINA SOBRE A FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA, EM SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS HUMANOS SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE <i>terc</i> -BUTILHIDROPERÓXIDO 2 A 5 mM .....	61

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1- TESTE DE COMPARAÇÃO DE MÉDIAS PELO MÉTODO DE TUKEY PARA A AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA EM ERITRÓCITOS HUMANOS SOB A AÇÃO DE *terc*-BUTILHIDROPERÓXIDO EM RELAÇÃO AO CONTROLE COM ERITRÓCITOS NÃO TRATADOS COM *terc*-BUTILHIDROPERÓXIDO ..... 49
- TABELA 2- TESTE DE COMPARAÇÃO DE MÉDIAS PELO MÉTODO DE TUKEY PARA A AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS SOB A AÇÃO DE *terc*-BUTILHIDROPERÓXIDO EM RELAÇÃO AO CONTROLE COM ERITRÓCITOS NÃO TRATADOS COM *terc*-BUTILHIDROPERÓXIDO ..... 50
- TABELA 3- TESTE DE COMPARAÇÃO DE MÉDIAS PELO MÉTODO DE TUKEY PARA A AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO CORPOS DE HEINZ EM ERITRÓCITOS HUMANOS SOB A AÇÃO DE *terc*-BUTILHIDROPERÓXIDO EM RELAÇÃO AO CONTROLE COM ERITRÓCITOS NÃO TRATADOS COM *terc*-BUTILHIDROPERÓXIDO ..... 51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP – Adenosina 5' Trifosfato

ADP – Adenosina 5' Difosfato

AMP – Adenosina 5' Monofosfato

2,3-BPG – 2,3-Bisfosfoglicerato

2,3-BPGM - 2,3-Bisfosfoglicerato mutase

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DFO – Mesilato de Deferoxamina

DPGM – Bisfosgliceromutase

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DTNB – 5, 5'-Ditiobis(Ácido 2-Nitrobenzóico)

EDTAK<sub>3</sub> – Etileno Diamino Tretracetato Tripotássico

EHV – Extrato hidroalcoólico de uva (*Vitis vinifera*)

FAD – Flavina Adenina Dinucleotídeo

FADH - Flavina Adenina Dinucleotídeo Reduzido

G6-PD – Glicose 6-Fosfato Desidrogenase

GR – Glutathiona Redutase

GSH – Glutathiona Reduzida

GSH-Px – Glutathiona Peroxidase

GSSG – Glutathiona Oxidada

Hb – Hemoglobina

Hx – Hexoquinase

MDA – Malonildialdeído

NADP – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzido

NAD - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzido

PFK – Fosfofrutoquinase

6PGD – 6-Fosfogliconato desidrogenase

PGI – Fosfoglicoisomerase

PK – Piruvato quinase

TBH – *terc*-butilhidroperóxido

## RESUMO

O eritrócito humano maduro, quando submetido à sobrecarga oxidativa por condições patológicas do eritrócito ou por agentes oxidantes pode apresentar: depleção de glutathiona reduzida (GSH), um dos responsáveis pelo sistema de defesa antioxidante do eritrócito; oxidação da molécula de hemoglobina; e agregação de complexos de ferro junto à membrana. Tais conseqüências podem ocasionar anormalidades na membrana eritrocitária e hemólise. Este trabalho tem por objetivo, estudar a ação antioxidante dos flavonóides quercetina e rutina, e de extrato hidroalcoólico de *Vitis vinifera* (EHV), em eritrócitos humanos normais, submetidos à sobrecarga oxidativa, *in vitro*, induzida por agentes oxidantes como *tert*-butilhidroperóxido (TBH) ou cloridrato de fenil-hidrazina (CF). Coletou-se sangue venoso de 12 indivíduos com idades entre 18 e 40 anos e considerados saudáveis, em EDTAK<sub>3</sub>. Lavou-se os eritrócitos em tampão fosfato 28 mM, NaCl 123 mM, pH 7,4 três vezes por centrifugação a 1220 x g, ressuspensando-os até volume globular de cerca de 40 %. Submeteu-se os eritrócitos, pré incubados ou não com quercetina 100 µM, à ação oxidante de CF 0,5 mM durante 15 minutos e; pré-incubados ou não com quercetina, rutina ou extrato hidroalcoólico de *Vitis vinifera*, à ação oxidante de TBH (0,5 - 5 mM), durante 0 a 30 minutos. Realizou-se a determinação da concentração de GSH [BEUTLER, Red cell metabolism, 1984], da formação de metahemoglobina (MetHb) [EVELYN; MALLOY, J.Biol.Chem., 126: 655, 1938], modificado por BEUTLER (1995) e realizou-se a contagem de corpos de Heinz (CH) segundo técnica preconizada por BEUTLER *et al.* [J.Lab.&Clin.Méd., 45: 40, 1955], modificado por CLARO (2002). Observou-se uma diminuição da concentração de GSH (4,0-0,1 µmoles/ g Hb) proporcional ao aumento da concentração de TBH (0,5 - 1,0 mM). A formação de MetHb aumentou (8 - 35 %) assim como a de CH (2 -16 %), em função da concentração de TBH (0,5 - 5 mM). A incubação com quercetina 100 µM (10 - 30 minutos) preveniu parcialmente a formação de GSH (0,25 -1,3 µmoles/g Hb) induzida por TBH 1 mM. Quercetina (2 - 20 µM) preveniu parcialmente a formação de CH (7,5 - 6,7 %) induzida por TBH 3 mM. Em amostras oxidadas por CF 0,5 mM, a quercetina 10 - 120 µM preveniu parcialmente a formação de MetHb (4 - 3,6 %). A rutina 100 µM preveniu parcialmente a depleção de GSH (0,4 µmoles/g Hb) por TBH (0 µmoles/g Hb). A rutina (40 - 140 µM) preveniu parcialmente a formação de CH (7,6 - 4,9 %) induzida por TBH 3 mM (9,0 %). O EHV (0,1 mg/ml) preveniu parcialmente a depleção de GSH (4,4 ± 0,1 µmoles/g Hb) induzida por TBH 0,5 mM enquanto que EHV (0,5 - 1,0 mg/ml) preveniu quase que na totalidade a depleção de GSH (7,4 ± 0,4 e 7,3 ± 0,1 µmoles/ g Hb, respectivamente) induzida por TBH 0,5 mM. O EHV (1,0 - 5,0 mg/ml) preveniu parcialmente a formação de CH (6,4 - 4,0 %) induzida por TBH 3 mM. A associação entre quercetina 100 µM e mesilato de desferrioxamina 4 mM, inibiu parcialmente a formação de MetHb (30 ± 1,2 %) induzida por TBH 5 mM. Os resultados sugerem que, nas concentrações testadas, a quercetina é parcialmente eficaz contra a sobrecarga oxidativa promovida por CF. O estresse oxidativo promovido por TBH foi parcialmente prevenido na presença de quercetina, rutina ou EHV.

## ABSTRACT

The mature human erythrocytes, submitted to oxidative stress under pathological conditions or by oxidizer agents can present: depletion of reduced glutathione (GSH), responsible for the antioxidant defense system of the erythrocytes, oxidation of the hemoglobin molecule, or aggregation of complexes of iron close to the membrane. These can cause abnormalities in the membrane and hemolysis. The aim of this work was to study the antioxidative action of the flavonoids quercetin and rutin, and of hydroalcoholic extract of *Vitis vinifera* (HEV), in human erythrocytes submitted to the oxidative stress, induced by oxidizer agents *tert*-butylhydroperoxide (TBH) or phenylhydrazine hydrochloride (PH), *in vitro*. Venous blood was collected in EDTA<sub>K<sub>3</sub></sub> from 12 healthy individuals with ages between 18 and 40 years. The erythrocytes was washed three times under centrifugation at 1220 x g, in 28 mM phosphate buffer, pH 7.4, and 123 mM NaCl, and resuspended at a final globular volume of 40%. The erythrocytes was then preincubated with 100 µM quercetin and then submitted to the oxidizer action of 0.5 mM PH for 15 min and, preincubated with quercetin, rutin and hydroalcoholic extract of *Vitis vinifera*, to the oxidizer action of TBH (0.5 – 5 mM), for up to 30 min. The concentration of GSH was determinate [BEUTLER, **Red cell metabolism**, 1984], the methemoglobin (MetHb) was monitored [EVELYN; MALLOY, **J.Biol.Chem.**, 126: 655, 1938], modified by BEUTLER *et al.* (1995) and the Heinz bodies (HB) was evaluated according to BEUTLER *et al.* [**J.Lab.&Clin.Méd.**, 45: 40, 1955], modified by CLARO (2002). A concentration decrease of GSH was observed (4.0 - 0.1 µmoles/g Hb) as a function of the increase of the concentration of TBH (0.5 - 1.0 mM). The formation of MetHb (8 - 35 %) and HB (2 -16 %), increased as a function of the TBH concentration (0.5 – 5 mM). The incubation with 100 µM quercetin (10 – 30 min) partially prevented the GSH formation (0.25 - 1.3 µmoles/g Hb) induced by 1 mM TBH. Quercetin (2 – 20 µM) partially prevented HB formation (7.5 - 6.7 %) induced by 3 mM TBH. Erythrocyte samples oxidized by 0.5 mM PH and treated with 10 - 120 µM quercetin had the formation of MetHb (4 - 3.6 %) partially prevented. The 100 µM rutin partially prevented the depletion of GSH (0.4 µmoles/g Hb) in the absence of TBH. The rutin (40 - 140 µM) partially prevented the formation of HB (7.6 - 4.9 %) induced by 3 mM TBH (9.0 %). HEV (0.1 mg/ml) partially prevented the depletion of GSH (4.4 ± 0.1 µmoles/g Hb) induced by 0.5 mM TBH while HEV (0.5 - 1.0 mg/ml) almost prevented the totally depletion of GSH (7.4 ± 0.4 and 7.3 ± 0.1 µmoles/g Hb, respectively) induced by 0.5 mM TBH. HEV (1.0 - 5.0 mg/ml) partially prevented the formation of HB (6.4 - 4.0 %) induced by 3 mM TBH. The association of 100 µM quercetin and 4 mM deferoxamine mesilate, partially inhibited the formation of MetHb (30 ± 1.2 %) induced by 5 mM TBH. The results suggest that quercetin, at the used concentrations was partially effective against the oxidative stress promoted by PH. The erythrocyte oxidative stress promoted by TBH was partially prevented in the presence of quercetin, rutin and HEV.

# **1 INTRODUÇÃO**

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O ERITRÓCITO HUMANO

O eritrócito humano, antes de tornar-se uma célula madura, passa por vários estágios de desenvolvimento. À medida em que vai ocorrendo tal maturação, antes de sua liberação da medula óssea para o sangue circulante, o eritrócito passa por alguns eventos, como a perda do núcleo e de organelas e a diminuição de seu tamanho em relação a seus precursores mais jovens. Todos estes acontecimentos fisiológicos se realizam a fim de tornar esta célula cada vez mais hábil para exercer sua principal função no organismo, o transporte de gases (LEE *et al.*, 1999). Os eritrócitos realizam de forma brilhante esta função na circulação, por cerca de 120 dias (DACIE; LEWIS, 1995).

O papel fisiológico que o eritrócito apresenta no organismo depende de suas características morfológicas, reológicas e de uma relação perfeita entre superfície e volume, que o tornam ideal para manter a vida através do transporte de oxigênio (O<sub>2</sub>) aos tecidos (HANDIN *et al.*, 1995). Esta importância, juntamente com o estudo da patologia eritrocitária, da preservação de eritrócitos *in vitro* e a facilidade de obtenção dos mesmos, estimula a sua utilização como modelo experimental para vários estudos, e tem despertado o interesse de um grande número de pesquisadores (SILVEIRA, 1992; LEONART, 1994; FERRALI *et al.*, 1997; CICCOLI *et al.*, 1999).

A morfologia, fisiologia e metabolismo eritrocitários têm sido estudados por diversas áreas do conhecimento, com vários fins, em campos como a hemoterapia, o controle de qualidade em hematologia, a farmacologia, a bioquímica, a imunologia e a patologia clínica (BEUTLER, 1984; OLIVIERI *et al.*, 1990; KNIGHT *et al.*, 1992; LIU *et al.*, 1992; SIGNORINI *et al.*, 1995; SILVA *et al.*, 2000).

A compreensão dos mecanismos que levam ao estresse oxidativo, bem como de suas possíveis conseqüências para o organismo, têm esclarecido muitos dos processos que levam à lesão e morte celular (GRIMES, 1980), o que justifica os



investimentos feitos nesta área no intuito de esclarecer os mecanismos responsáveis por doenças genéticas eritrocitárias, como as hemoglobinopatias e as eritroenzimopatias (JANDL, 1996; NAOUM, 1997; LEE *et al.*, 1999).

### 1.1.1 Membrana Eritrocitária

A membrana eritrocitária é constituída por uma bicamada lipídica, na qual estão imersas proteínas chamadas de integrais, de diferentes tamanhos, formas e propriedades funcionais. Subjacentes à superfície interna da bicamada lipídica e ligadas à mesma, encontram-se as proteínas ditas periféricas, que formam o citoesqueleto do eritrócito, fundamental para manutenção da estabilidade da membrana e da forma do eritrócito (SINGER; NICOLSON, 1972; BENNETT; STENBUCK, 1980).

Na estrutura da membrana eritrocitária encontra-se uma bicamada de fosfolipídeos, que apresenta cerca de 40 % de lipídeos, entre fosfolipídeos e colesterol; 52 % de proteínas; e 8 % de carboidratos (DODGE *et al.*, 1963), sendo que sua porção externa é composta, principalmente, por fosfatidilcolina e esfingomiéline, e a interna, por fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina. As moléculas lipídicas na bicamada são orientadas de forma que os grupos apolares ficam voltados para o interior da bicamada, enquanto os polares ficam voltados para o exterior da mesma, interagindo assim com o meio aquoso, tanto intra como extracelular (HARRIS, 1991).

As ligações hidrofóbicas fracas, que se estabelecem pela proximidade entre cadeias de ácidos graxos, permitem maior fluidez na região, com uma maior mobilidade lateral entre as duas camadas. Pode haver troca espontânea de posição entre fosfolipídeos internos e externos da bicamada, processo chamado de *flip-flop*. A mobilidade lateral da bicamada lipídica é limitada pela interposição de moléculas de colesterol entre as ligações apolares, que restringe a mobilidade dos fosfolipídeos (CATANIA; CAIMI, 1992).

As proteínas da membrana eritrocitária podem ser identificadas por números, em ordem crescente, de acordo com a sua mobilidade em eletroforese em gel de poliacrilamida com sulfato de duodecil sódico (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970; HARRIS, 1991). As proteínas periféricas formam uma rede de estruturas filamentosas e globosas, subjacentes à superfície interna da bicamada lipídica, sendo classificadas em  $\alpha$ -espectrina (banda 1),  $\beta$ -espectrina (banda 2), anquirina (banda 2.1), banda 4.1, banda 4.9, actina (banda 5), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (banda 6) e banda 7 (LAEMMLI, 1970). Essas proteínas, juntamente com a bicamada lipídica e com as proteínas integrais, são fundamentais na deformabilidade da célula (MOHANDAS *et al.*, 1983, VIVES CORRONS; BESSON, 2001).

As proteínas integrais são representadas pela proteína banda 3, glicoforinas A, B, C e D e proteína 4.5, as quais são blocos protéicos imersos na bicamada lipídica. Estas proteínas promovem interações entre a bicamada lipídica e o citoesqueleto (LAEMMLI, 1970). A proteína banda 3 é a proteína integral majoritária, também denominada canal aniônico, por regular as trocas de íons e de água entre o exterior e o interior da célula, promovendo a troca rápida de ânions inorgânicos, principalmente  $\text{Cl}^-$  e  $\text{HCO}_3^-$  (ROTHSTEIN *et al.*, 1976). O seu segmento citoplasmático é importante como sítio de ligação com enzimas glicolíticas, a catalase e a aldolase, bem como com a hemoglobina e com os hemicromos (KLIMAN; STECK, 1980; TSAI *et al.*, 1982; HANDIN *et al.*, 1995; LEE *et al.*, 1999).

### 1.1.2 A Molécula de Hemoglobina

A hemoglobina, proteína transportadora de  $\text{O}_2$ , íons hidrogênio ( $\text{H}^+$ ) e outros gases, como dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), constitui cerca de 95% das proteínas presentes no citoplasma do eritrócito. As outras proteínas são enzimas requeridas para a produção de energia e para a manutenção da hemoglobina na forma reduzida, seu estado funcional (LEE *et al.*, 1999).

A molécula de hemoglobina é composta por quatro cadeias polipeptídicas, chamadas de globinas, que se arranjam na forma de tetrâmeros. A hemoglobina A, presente em maior quantidade no adulto, é constituída por cadeias do tipo  $\alpha$  e  $\beta$ . Cada uma dessas quatro cadeias contém um grupo prostético, o heme, que está localizado em fendas apolares próximas da face externa da molécula, uma em cada subunidade. O grupamento heme é constituído de um átomo de ferro (Fe) e de um anel tetrapirrólico, a protoporfirina. O ferro, na sua forma ferrosa ( $\text{Fe}^{+2}$ ), é capaz de ligar-se a uma molécula de  $\text{O}_2$  e de liberá-lo aos tecidos quando há aumento do pH, da temperatura e da concentração de 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG). Este último é um fosfato orgânico produzido no ciclo de Luebering-Rapoport, um desvio da via glicolítica exclusivo do eritrócito (STRYER, 1995; LEE *et al.*, 1999).

### 1.1.3 Metabolismo do Eritrócito

Uma vez que o eritrócito é o suporte físico que envolve as moléculas de hemoglobina, através de sua membrana lipídica, o mesmo tem papel vital para que ocorra o metabolismo aeróbico nos outros tecidos. Sendo o transportador da hemoglobina, deve propiciar as melhores condições para que esta proteína chegue aos tecidos e desempenhe seu papel fisiológico, protegendo-a de agentes que possam alterá-la, ou contribuindo para que a mesma volte ao normal, quando alterada (WINTERBOURN; CARREL, 1977; GRIMES, 1980, BEUTLER, 1984, WINTERBOURN, 1990; COLEMAN, 2000).

Os precursores nucleados dos eritrócitos apresentam metabolismo aeróbico e anaeróbico. O eritroblasto ortocromático, em seu processo de maturação, expulsa o núcleo, ainda na medula óssea. Além de expulsar o núcleo, ocorre também a saída de todo o retículo endoplasmático, do aparelho de Golgi, dos centríolos, das mitocôndrias, e dos ribossomos, provavelmente por uma fenda na membrana (JANDL, 1996, LEE *et al.*, 1999; COLEMAN, 2000). Desta forma, quando o eritrócito fica desprovido de suas organelas citoplasmáticas, passa a apresentar modificações no seu comportamento metabólico, pois a ausência de determinadas

organelas implica na inexistência de certas vias do metabolismo celular normal. Assim, o eritrócito maduro não dispõe do ciclo de Krebs e de citocromos, e nem de energia advinda de suas atividades (LEE *et al.*, 1999). Para sobreviver durante em média 120 dias, o eritrócito passa a utilizar fontes de energia anaeróbicas, como a via glicolítica ou via de Embden-Meyerhof. Acrescenta-se que esta via possui um desvio, chamado de ciclo aeróbio das pentoses fosfato ou via das hexose monofosfato, no qual ocorre a geração de coenzimas redutores, como por exemplo, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH), de fundamental importância para a manutenção dos níveis de glutathiona reduzida (GSH), a qual, por sua vez, é capaz de impedir a oxidação de lipídeos e de proteínas (SHVIRO; SHAKLAI, 1987; JANDL, 1996, HARRIS, 1991). A glicólise ou via glicolítica, também conhecida como via de Embden-Meyerhof, ocorre no citoplasma e gera duas moléculas de adenosina-5'-trifosfato (ATP) para cada molécula de glicose que é degradada a lactato.

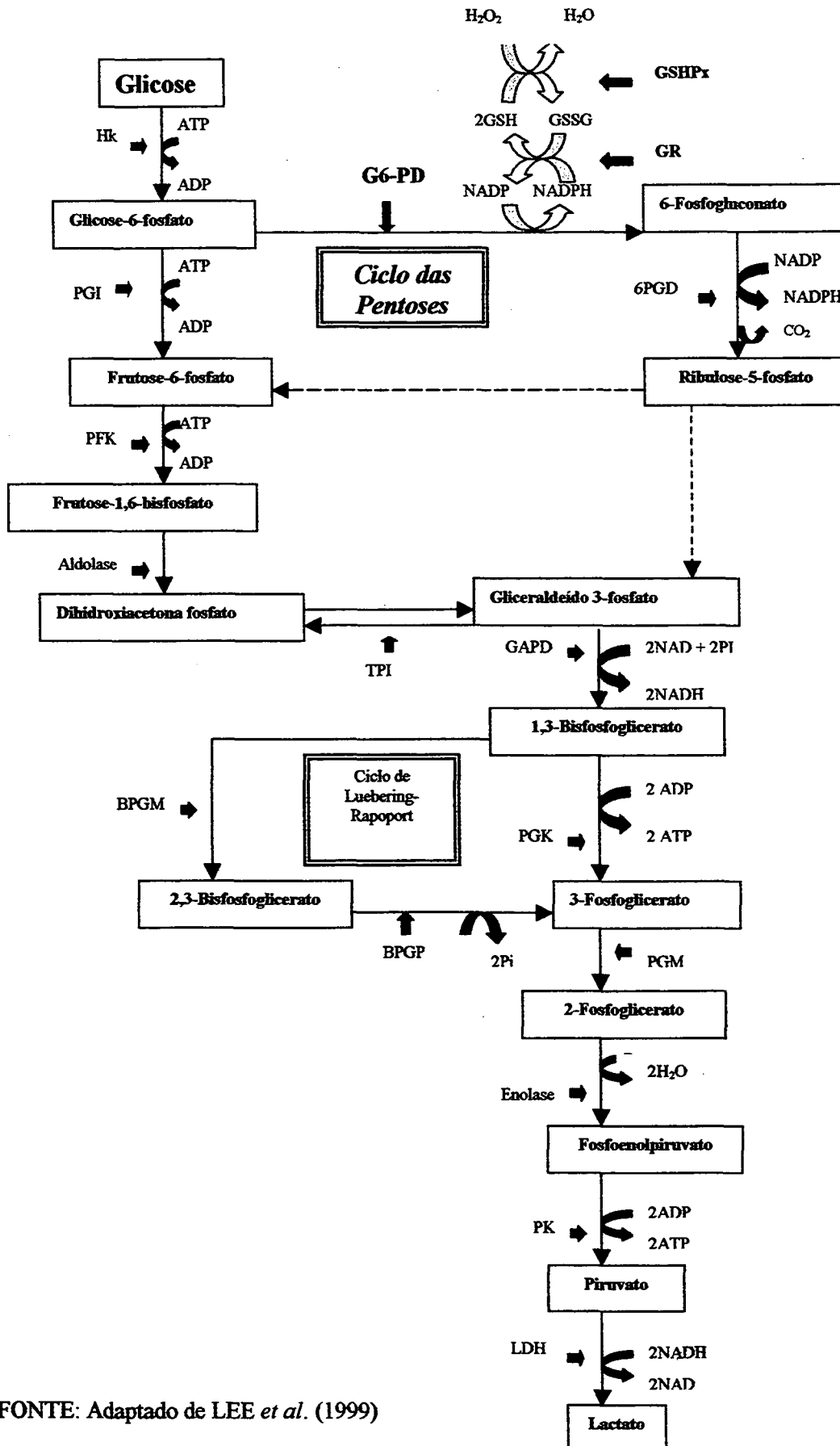
Estas duas moléculas de ATP representam o ganho energético da molécula de glicose, visto que este composto armazena grande quantidade de energia química nas ligações de fosfato. Quando a célula necessita de energia, a molécula de ATP é degradada pela ação de ATPases, formando-se adenosina-5'-difosfato (ADP) e a adenosina-5'-monofosfato (AMP). A energia é utilizada para manter o eritrócito em sua forma bicôncava, para a fosforilação de proteínas de membrana e para o bombeamento de íons através da mesma (STRYER, 1995; HOGSTRAND *et al.*, 1999). Na Figura 1 estão representados a glicólise, a via das pentoses fosfato, o ciclo de Luebering-Rapoport e suas inter relações.

No eritrócito, a via glicolítica apresenta um desvio metabólico conhecido como ciclo de Luebering-Rapoport, uma ramificação na utilização de 1,3-bisfosfoglicerato (1,3-BPG) por ação da 2,3-bisfosfoglicerato mutase (2,3-BPGM), formando-se o 2,3-BPG. O 2,3 BPG é um fosfato orgânico aniônico, presente nos eritrócitos humanos em concentração molar próxima à da hemoglobina. O 2,3-BPG, em altas concentrações no eritrócito normal, liga-se à desoxi-hemoglobina e diminui a sua afinidade pelo O<sub>2</sub>, o qual pode então ser liberado aos tecidos. A diminuição

dos níveis de 2,3-BPG, ao contrário, leva a um aumento da força de ligação da molécula de oxigênio à hemoglobina (OSKI; PAPADOPOULOS, 1970; STRYER, 1995; FANG *et al.*, 1999). Ainda na via glicolítica, ocorre a formação de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH), o qual pode atuar na reação da metemoglobina redutase (LEE *et al.*, 1999).

A via das pentoses fosfato consome cerca de 10% da glicose eritrocitária e promove a manutenção dos níveis normais de NADPH, através da oxidação da glicose 6-fosfato a ribose 5-fosfato, reação catalisada pelas enzimas glicose 6-fosfato desidrogenase (G6-PD) e 6-fosfogliconato desidrogenase (6-PGD), e também os níveis adequados de GSH, o qual é um tripeptídeo com uma sulfidril livre, que serve como um tampão de sulfidrilas para manter os radicais de cisteína da hemoglobina e de componentes da membrana celular no estado reduzido, protegendo-os, assim, contra a oxidação (TROTТА *et al.*, 1982; STRYER, 1995).

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA GLICÓLISE, DO CICLO DAS PENTOSSES E DO CICLO DE LUEBERING-RAPOPORT EM ERITRÓCITOS HUMANOS



FONTE: Adaptado de LEE *et al.* (1999)

O coenzima redutor NADPH fornece elétrons para que se proceda a redução da glutathiona oxidada (GSSG) pela ação da glutathiona redutase (GR). A peroxidação lipídica inicia-se pela ação de espécies reativas de  $O_2$ , resultando na formação de dienos conjugados a partir de ácidos graxos poliinsaturados, por rearranjos de duplas ligações. Os lipídeos da membrana citoplasmática, que sofrem a ação destes radicais, perdem suas insaturações, fazendo, desta forma, com que a mesma se torne mais rígida devido a uma maior aproximação entre esses fosfolipídeos, resultando em uma perda da deformabilidade e da fluidez (GRIMES, 1980; STRYER, 1995).

A superóxido dismutase (SOD) catalisa a reação de dismutação do radical superóxido, formando peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O ânion superóxido ( $O_2^-$ ), assim como o  $H_2O_2$ , o íon hidroxila ( $OH^-$ ) e radical hidroxil ( $OH^\cdot$ ), oxidam grupos sulfidríla de enzimas e de proteínas da membrana e peroxidam ácidos graxos insaturados (GRIMES, 1980).

#### 1.1.4 Envelhecimento do Eritrócito

À medida em que o eritrócito envelhece, ocorre uma diminuição de sua funcionabilidade, devido à perda de funções críticas do metabolismo, como por exemplo a diminuição da metabolização da glicose pela via glicolítica, que tem como consequência a diminuição de intermediários de alta energia e atividades enzimáticas (SEAMAN, 1980).

A queda da formação de energia na forma de ATP faz com que ocorra um aumento da permeabilidade ao íon  $K^+$  assim como da peroxidação lipídica, que provoca desnaturação das proteínas da membrana eritrocitária. Também ocorrem interações entre estas proteínas, as quais dão origem a oligômeros de alto peso molecular, que resultam em uma redução da fluidez da membrana (JAIN; HOCHSTEIN, 1980; BEPPU *et al.*, 1990).

Ainda durante o processo de senescência dos eritrócitos, observa-se uma diminuição na concentração de colesterol e de fosfolipídeos de cerca de 25 a 30%, fato que pode ter algum efeito sobre a deformabilidade da membrana, provocando

aumento da rigidez e diminuição da filtrabilidade, podendo levar o eritrócito a ser destruído no baço, o que enfatiza o papel da deformabilidade na sobrevivência da célula (WESTERMAN, 1963; CHAPMAN; SCHAUMBURG, 1967, SEAMAN *et al.*, 1980).

## 1.2 RADICAIS LIVRES E SOBRECARGA OXIDATIVA EM ERITRÓCITOS HUMANOS

Denomina-se radical livre qualquer espécie química capaz de existência independente que contenha um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital externo. A estrutura do átomo se caracteriza por um núcleo formado por igual número de prótons e nêutrons, de massas semelhantes, circundados por elétrons que se agrupam aos pares, em órbitas perinucleares. Assim, quando dois radicais livres se encontram, seus elétrons desemparelhados formam par e ambos os radicais se consomem. Entretanto, alguns radicais buscam o seu equilíbrio tomando elétrons de agentes químicos estabilizados e ao se estabilizarem eletricamente, formam outros radicais livres, dando início a reações em cadeia (DAS; ESSMAN, 1990; CHEESEMAN; SLATER, 1996; PUNCHARD; KELLY, 1996).

As espécies reativas de  $O_2$  podem ser produzidas em seres vivos pela redução parcial do  $O_2$  molecular, tanto em condições patológicas como fisiológicas, sendo que estas espécies formadas podem reagir com um grande número de moléculas, tais como lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos, dentre outros (CHEN *et al.*, 2000).

As espécies reativas de  $O_2$  formadas em maiores quantidades no organismo são  $O_2^-$ , OH,  $H_2O_2$ , peróxidos lipídicos e espécies relacionadas. Estes compostos têm uma meia vida muito curta mas, mesmo assim, podem causar graus variados de toxicidade nas células, levando a lesões transitórias ou permanentes (SALTMAN, 1989).

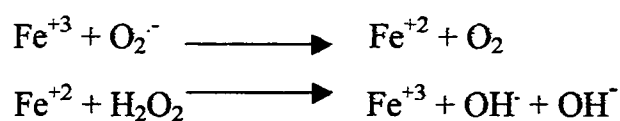
Os radicais livres podem ser produzidos pelo próprio metabolismo celular, sendo que é observada a sua produção nas membranas mitocondriais, no retículo endoplasmático e pelas enzimas citoplasmáticas, xantina oxidase e aldeído oxidase.



Por outro lado, a agressão tóxica externa, proveniente de agentes oxidantes, também é fonte abrangente de agressão celular devido à promoção de um desequilíbrio bioquímico com produção de radicais livres (NAOUM, 1996).

Um conjunto crescente de evidências indica que metais de transição também atuam como catalisadores na deterioração oxidativa de macromoléculas biológicas e, portanto, a toxicidade associada com estes metais pode ser devida, em parte, ao dano oxidativo tissular (STOHS; BAGCHI, 1995; BARBOUTI *et al.*, 2001). Estudos recentes têm mostrado que metais como ferro, cobre, cádmio, cromo, chumbo, mercúrio, níquel e vanádio exibem habilidade para produzir espécies reativas de  $O_2$ , resultando em peroxidação lipídica, danos ao ácido desoxirribonucléico (DNA), depleção de grupos sulfidril e alterações no transporte de cálcio (STOHS; BAGCHI, 1995).

Evidências indicam que o íon férrico ( $Fe^{+3}$ ) atua como catalisador para a reação de Fenton, facilitando a conversão do ânion  $O_2^-$  e de  $H_2O_2$  a espécies freqüentemente envolvidas nas reações que iniciam a peroxidação lipídica (IMLAY *et al.*, 1988; STOHS; BAGCHI, 1995). De acordo com a reação de Fenton, observa-se a formação de espécies reativas de  $O_2$ , como ilustrado abaixo:



Muitos autores têm proposto o envolvimento de radicais livres no processo de lesão a componentes celulares (COMBS *et al.*, 1975, DEUTICKE *et al.*, 1986; 1987; FERRALI *et al.*, 1992). Os radicais livres podem ser tóxicos para vários componentes celulares, incluindo o material genético (FUCHS, 1997).

Dentre as classes de moléculas que podem ser lesadas pelas espécies reativas de  $O_2$ , os lipídios estão entre as mais susceptíveis à oxidação. A peroxidação lipídica, que é a destruição oxidativa dos ácidos graxos poliinsaturados, pela inserção de  $O_2$  nas moléculas dos dienos, subprodutos da oxidação dos lipídeos da membrana, resulta em uma quebra que leva à formação de lipoperóxidos,

malonildialdeído (MDA) e outros aldeídos como produtos finais (SCOTT *et al.*, 1991). A peroxidação lipídica, por ser uma reação em cadeia, pode progredir, lesionar canais iônicos e inativar enzimas e proteínas de transporte (LII; HUNG, 1997).

O MDA tem tendência a se envolver em processos de polimerização das proteínas da membrana, com conseqüências deletérias às propriedades mecânicas da célula, além de torná-la rígida (SCOTT *et al.*, 1991; LII; HUNG, 1997).

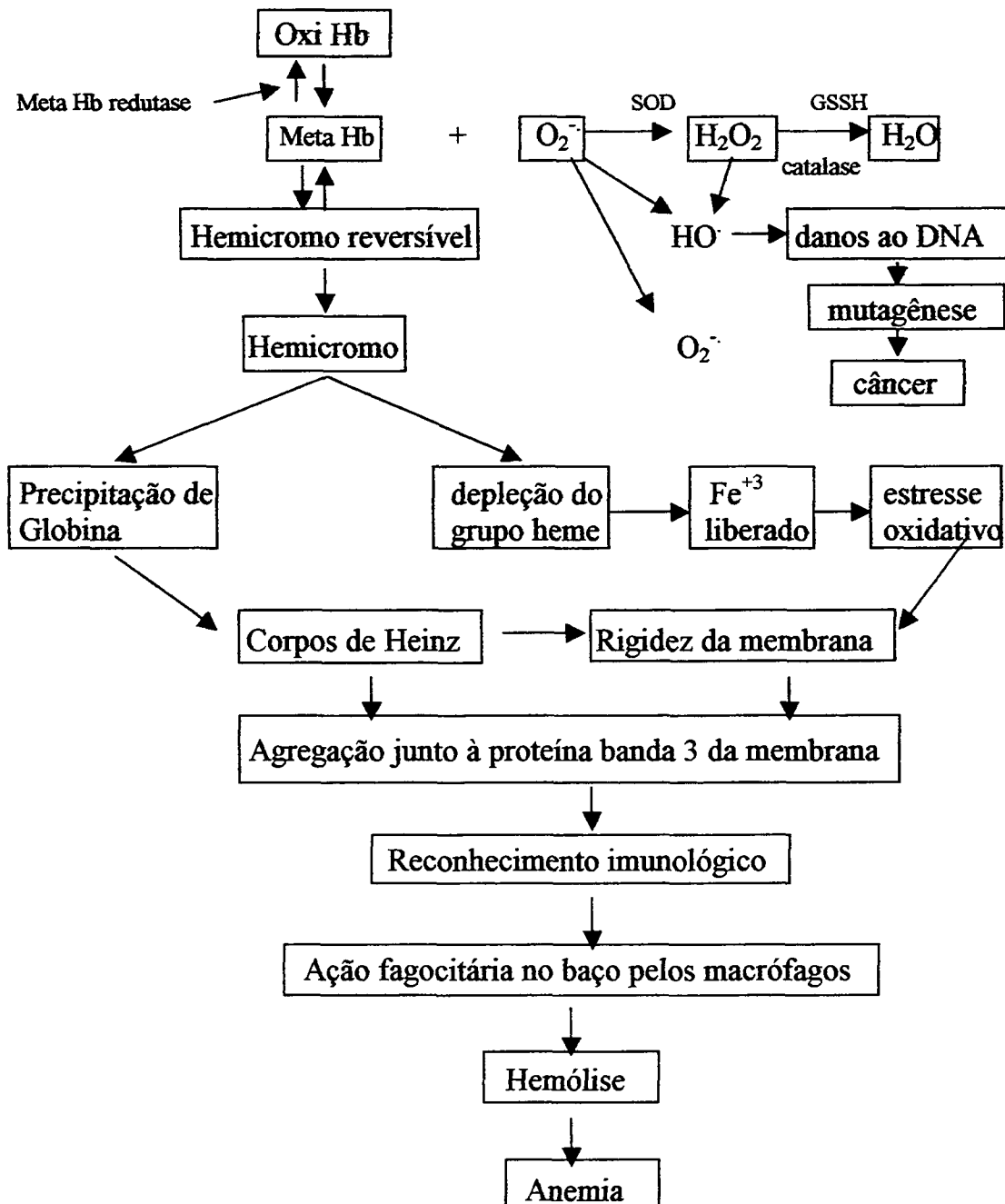
Os eritrócitos humanos normais apresentam cerca de 1% de metahemoglobina, que é a hemoglobina em sua forma oxidada, onde o íon  $Fe^{+2}$  do grupamento heme passou para o  $Fe^{+3}$ . A metahemoglobina é reduzida constantemente por ação das metahemoglobina-redutases dependentes de NADH e de NADPH, ácido ascórbico e GSH (COLEMAN, 2000; FERNANDES *et al.*, 2000).

Quando o eritrócito é submetido a estresse oxidativo, pode ocorrer a formação de metahemoglobina e a formação de hemicromos, que são os primeiros produtos de desnaturação progressiva da hemoglobina e são gerados quando o heme é dissociado do seu local. Os hemicromos derivam de formas de hemoglobina férrica de baixo *spin*, que possui a 6<sup>a</sup> coordenação ocupada por um ligante proveniente da globina: um grupo hidroxil- ou histidil- protonado (hemicromos reversíveis) ou um histidil- não protonado (hemicromos irreversíveis). Os hemicromos irreversíveis não podem ser reconstituídos para a hemoglobina funcional e precipitam junto com a globina e a hemina, formando os corpos de Heinz (HEINZ, 1890; RACHMILEWITZ *et al.*, 1971; PEISACH *et al.*, 1975; HANDIN *et al.*, 1995). Estes acontecimentos, possivelmente, levam a anormalidades da membrana eritrocitária, devido a um reconhecimento imunológico, contribuindo para a destruição prematura do eritrócito por ação fagocitária dos macrófagos do sistema fagocitário mononuclear (SHINAR; RACHMILEWITZ, 1990; RICE-EVANS, 1991, TAKASU *et al.*, 2002).

A ação de radicais livres, com a subsequente deterioração oxidativa de macromoléculas biológicas, muitas vezes está associada com metais de transição.

Alguns autores têm mostrado que metais, incluindo ferro, cobre, cromo e vanádio interferem no ciclo de redução de moléculas que estão sob sobrecarga oxidativa, enquanto que, cádmio, mercúrio e níquel, assim como o chumbo, depletam GSH e quebram ligações entre grupos sulfidril e as proteínas, resultando na produção de espécies reativas de  $O_2$ , como  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  e radical  $OH^\cdot$ . Como consequência, ocorre aumento da peroxidação lipídica e danos ao DNA (IMLAY *et al.*, 1988; RYAN; AUST, 1992; STOHS; BAGCHI, 1995). Na Figura 2 estão representados os passos da oxidação eritrocitária.

FIGURA 2 - OXIDAÇÃO ERITROCITÁRIA



FONTE: Adaptado de NAOUM (1996)

### 1.3 DOENÇAS HEMOLÍTICAS CORRELACIONADAS COM A SOBRECARGA OXIDATIVA

Existem condições patológicas eritrocitárias de origem genética que causam a formação de radicais livres, como a anemia falciforme, as talassemias, a deficiência de G6-PD e outras condições que levam a metahemoglobinemia (CHAN *et al.*, 1999).

A anemia falciforme é uma doença hereditária, que tem como uma das principais características, um quadro de anemia hemolítica. Nesta alteração, observa-se a presença de moléculas de hemoglobina anormal, conhecida como hemoglobina S, que pode representar até mais de 90 % do conteúdo total de hemoglobina dos eritrócitos. A hemoglobina S é uma variante da hemoglobina A, predominante em adultos normais, derivada de uma mutação ocorrida no gene responsável pela síntese da globina beta. Esta mutação resulta na inserção do aminoácido valina no lugar do ácido glutâmico, na posição 6 da globina beta. Essa troca modifica a estrutura da molécula de hemoglobina, fazendo que a mesma polimerize em baixas tensões de O<sub>2</sub>, dando origem à formação de longos polímeros que alteram a morfologia eritrocitária, tornando a célula falcizada. Devido a essas anormalidades, os eritrócitos com hemoglobina S perdem K<sup>+</sup> e água, tornando-se mais densos e menos maleáveis (FRANCK *et al.*, 1985; WAUGH *et al.*, 1987).

Os eritrócitos falcizados estão sob constante estresse oxidativo e, assim, liberam produtos de degradação da hemoglobina S, como complexos de Fe<sup>+2</sup> e Fe<sup>+3</sup>, que atacam a membrana eritrocitária e catalizam a destruição de hidroperóxidos lipídicos, com formação de radicais alcóxil e peróxil. A liberação desses radicais amplifica as lesões, devido aos processos contínuos de novos ciclos de peroxidação lipídica, que resultam na liberação de MDA e outros aldeídos. As lesões causadas pela geração de radicais livres na anemia falciforme dependem da proporção de células falciformes encontrada (FRANCK *et al.*, 1985; WAUGH *et al.*, 1987).

As talassemias constituem um grupo de anemias hemolíticas hereditárias, cuja principal causa deve-se a defeitos genéticos, que determinam a inibição da

síntese de globinas alfa ( $\alpha$ ) ou beta ( $\beta$ ). Na  $\beta$ -talassemia há supressão parcial ou total da produção de cadeias  $\beta$ , enquanto na  $\alpha$ -talassemia, o mesmo ocorre em relação às cadeias  $\alpha$ . A autooxidação da hemoglobina, com geração de íon  $O_2^-$  aumenta proporcionalmente à quantidade de globinas alfa ou beta despareadas. As globinas despareadas sofrem ações oxidativas, nas células imaturas e nos eritrócitos circulantes, que promovem a geração de radicais livres, enquanto o não aproveitamento do grupo heme faz com que o mesmo se decomponha, formando a hemina e derivados, bem como os hemicromos, compostos por globinas desnaturadas, que precipitam no interior das células, causando alterações morfológicas e funcionais (LEE *et al.*, 1999).

Observa-se a diminuição da produção da moléculas de hemoglobina em portadores de talassemias, assim como uma sobrecarga de ferro, secundária às repetidas transfusões sanguíneas a que estão submetidos, que contribui para o processo oxidativo, através da geração de radicais livres com subsequente lesão celular. O ferro ainda pode se depositar no fígado, baço, glândulas endócrinas, pele, gônadas e miocárdio. A lesão tecidual nesses órgãos pode induzir à cirrose, a vários estados de deficiência endócrina, incluindo o *diabetes mellitus* e o hipogonadismo, e à morte cardíaca devida à insuficiência cardíaca progressiva ou arritmia (SMITH; THIER, 1990). O ferro intracelular dá origem aos hemicromos, produtos de oxidação da hemoglobina, que se ligam à membrana, contribuindo assim, para a desestabilização da mesma. Alguns estudos mostram que pode ocorrer diminuição da concentração de vitamina E no plasma e nos eritrócitos de indivíduos talassêmicos, sugerindo que, problemas com os mecanismos antioxidantes podem ser responsáveis, em parte, pela susceptibilidade ao estresse oxidativo (RICE-EVANS; BAYSAL, 1987; CHAN *et al.*, 1999).

A deficiência de G6-PD é uma eritroenzimopatia causada por uma mutação no gene que codifica a síntese de G6-PD, levando à diminuição da atividade desta enzima. O eritrócito possui limitado poder redutor e, devido à ausência de organelas, depende da via das pentoses fosfato para produzir NADPH. Quando há ausência ou diminuição de G6-PD, ocorre produção insuficiente de NADPH e

diminuição da concentração de GSH, levando ao aumento da sobrecarga oxidativa dentro do eritrócito, que ocorre especialmente quando  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  são formados por fatores exógenos como, drogas, infecções e em consequência das reações de oxidação entre a hemoglobina e o  $O_2$ . Quando estes oxidantes se acumulam dentro do eritrócito, pode ocorrer oxidação de proteínas de membrana e da hemoglobina, com formação de metahemoglobina e de corpos de Heinz e, conseqüentemente, hemólise (CHAN *et al.*, 1999).

Situações patológicas que diminuam as defesas antioxidantes da célula, podem provocar um desequilíbrio entre as moléculas presentes no meio intracelular, com elevação da formação de espécies reativas de oxigênio representadas por  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  e OH. Situações adquiridas induzidas por drogas oxidantes como acetaminofeno, primaquinas, fenacetina, sulfas e derivados da acetilfenilhidrazina etc., ou deficiência de vitaminas redutoras como vitaminas C e E, também podem levar a um estresse oxidativo com formação de radicais livres (JANDL, 1996, LEE *et al.*, 1999).

#### 1.4 SUBSTÂNCIAS OXIDANTES E ANTIOXIDANTES EMPREGADAS EM ESTUDOS ENVOLVENDO ESTRESSE OXIDATIVO

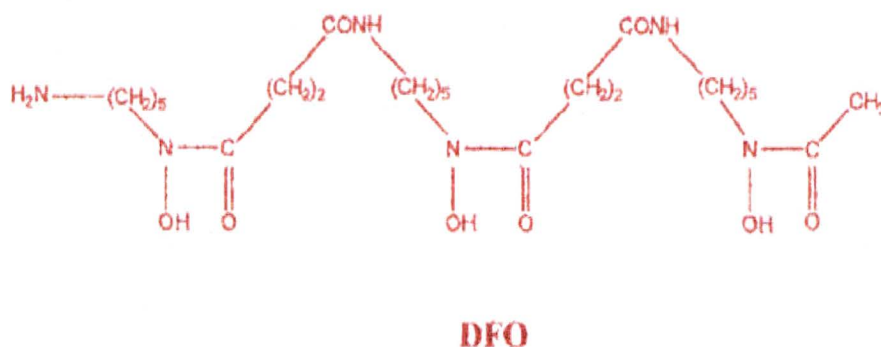
Substâncias oxidantes, como álcool alílico, cloridrato de fenil-hidrazina (CF), *tert*-butil hidroperóxido (TBH), acroleína, isouramil e acetaminofeno, geram corpos de Heinz e espécies reativas de  $O_2$  no interior dos eritrócitos e, desta forma, causam oxidação de lipídeos, de proteínas de membrana e grupos sulfidril de proteínas (JAIN; HOCHSTEIN, 1979; FERRALI *et al.*, 1990; CICCOLI *et al.*, 1994; FERRALI *et al.*, 1997).

O emprego de vitamina C e de vitamina E, além de outros antioxidantes, pode inibir a hemólise oxidativa em eritrócitos (AFANAS'EV *et al.*, 1989; VAN ACKER *et al.*, 1998; RAKBA *et al.*, 1998; CHATTOPADHYAY *et al.*, 2000; CHOPRA *et al.*, 2000; CLARO, 2002). A vitamina E é conhecida como o

antioxidante mais potente da membrana eritrocitária, capaz de proteger ácidos graxos poliinsaturados contra o dano oxidativo (COMBS *et al.*, 1975).

Uma das formas de impedir o estresse oxidativo em eritrócitos é promover a quelação do Fe, visto que a liberação desse metal, através da reação de Fenton, inicia uma reação em cadeia que conduz à formação de radicais livres com subsequente peroxidação lipídica e hemólise (BEZWODA *et al.*, 1985; FERRALI *et al.*, 1997; ANGHILERI; THOUVENOT, 2000). Dentre as substâncias capazes de exercer efeito quelante de ferro e inibidor de radicais livres, estão os polifenóis (LIU *et al.*, 1992; TERAO *et al.*, 1994; ZHANG *et al.*, 1997; FACINO *et al.*, 1999; VAN ACKER *et al.*, 1998; KONDO *et al.*, 1999; ROIG *et al.*, 1999; WU *et al.*, 2001; ROYCHOWDHURY *et al.*, 2001; TAPIERO *et al.*, 2002). Outro quelante de Fe é o mesilato de deferoxamina (DFO), utilizado na terapêutica para o tratamento de doenças envolvendo excesso de ferro descompartmentalizado (RICE-EVANS *et al.*, 1989). A estrutura de mesilato de deferoxamina, um dos compostos utilizados neste trabalho, está representada na Figura 3.

FIGURA 3 – ESTRUTURA DA MOLÉCULA DE MESILATO DE DEFEROXAMINA.



FONTE: BARBOUTI *et al.* (2001)



### 1.4.1 Compostos Polifenólicos

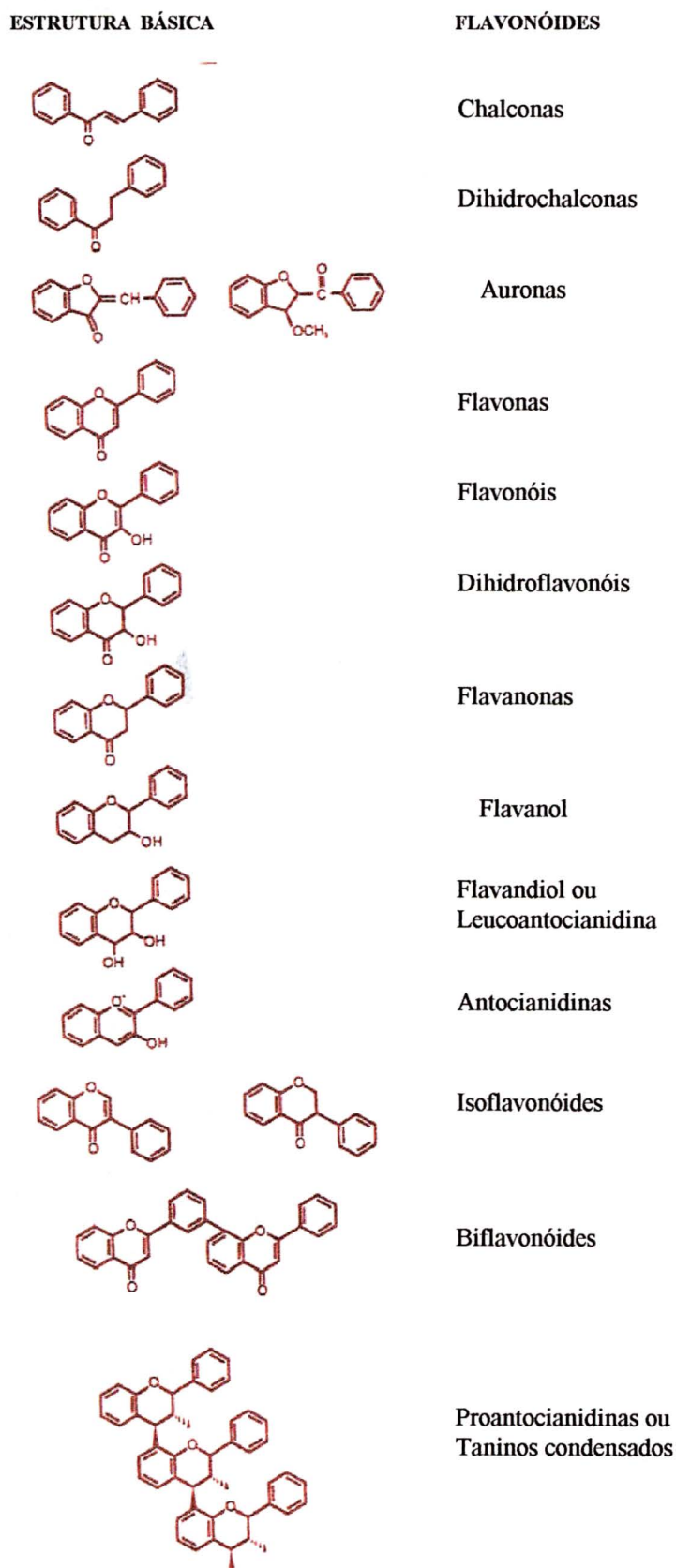
Os polifenóis são compostos naturais que estão amplamente distribuídos na natureza, tanto na composição de vegetais e de frutas como de bebidas, tais como chá e vinho tinto. Eles constituem um dos mais numerosos grupos de metabólitos de plantas e constituem parte importante da dieta de humanos e de animais, além de possuírem uma grande influência sobre a cor e o sabor destes produtos e de serem detentores de uma ampla atividade farmacológica (BRAVO, 1998; VAN ACKER *et al.*, 1998).

Alguns polifenóis tradicionalmente têm sido considerados como antinutrientes pelos nutricionistas, como os taninos, os quais provocam efeitos adversos sobre a digestibilidade e a absorção das proteínas. Entretanto, o interesse em alimentos e plantas que contenham compostos polifenólicos vem crescendo enormemente, devido à sua capacidade antioxidante por quelação de metais e seqüestro de radicais livres e a seus possíveis efeitos benéficos na saúde humana (FERRALI *et al.*, 1997; BRAVO, 1998; VAN ACKER *et al.*, 1998; ANDERSON; PHILLIPS, 1999; FACINO *et al.*, 1999).

Os compostos polifenólicos possuem o esqueleto difenilpropano ( $C_6C_3C_6$ ) e em sua família estão incluídos os flavanóides, as flavanonas, as antocianidinas, as flavonas e os flavonóis, dentre outros. Os flavonóis e as flavonas são encontrados em quase todos os tipos de plantas. As flavanonas e as flavonas são freqüentemente encontradas juntas na natureza como, por exemplo, em frutas cítricas, sendo mantidas juntas, por enzimas específicas. Ocorre uma exclusão mútua entre a ocorrência de flavonas e flavanóides em várias famílias de plantas. As antocianidinas são quase ausentes em plantas ricas em flavanonas (RICE-EVANS *et al.*, 1996).

Diferenças individuais dentro de cada grupo de polifenóis resultam da variação em número e arranjo dos grupamentos hidroxila, assim como da natureza e extensão da alquilação e/ou glicosilação nestes. A classificação dos flavonóides está representada na Figura 4.

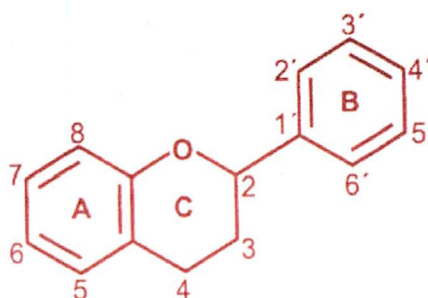
FIGURA 4 – CLASSIFICAÇÃO DOS FLAVONÓIDES.



FONTE: Adaptado de BRAVO (1998)

Os polifenóis mais comumente encontrados nas plantas, flavonóis e flavonas, possuem, freqüentemente, dihidroxilações nas posições 3' e 4' no anel B e, mais raramente, ausência de grupamento hidroxila na posição 4'. O principal sítio de glicosilação nos flavonóides situa-se na posição 3 e, menos freqüentemente, na posição 7, sendo que a glicose é o resíduo de açúcar mais comumente ligado a este sítio. Porém, outros açúcares, incluindo galactose, ramnose e xilose, também podem estar ligados (FORMICA; REGELSON, 1995). Na Figura 5 estão representados a estrutura básica e o sistema de numeração dos anéis dos flavonóides.

FIGURA 5 – ESTRUTURA BÁSICA E SISTEMA DE NUMERAÇÃO DOS ANÉIS DOS FLAVONÓIDES



FONTE: BRAVO (1998)

Sabe-se que dietas ricas em frutas e vegetais apresentam ação protetora contra doenças cardiovasculares e certas formas de câncer (BLOCK, 1992) e, possivelmente, contra outras doenças também. Estes efeitos protetores têm sido atribuídos, em grande parte, aos antioxidantes presentes nas dietas, incluindo nutrientes antioxidantes como vitamina C e  $\beta$ -caroteno, e compostos polifenólicos tais como flavonóides e fenilpropanóides, os quais podem ter papel fundamental para que esta proteção ocorra. Os componentes polifenólicos de plantas superiores podem agir como antioxidantes ou como agentes indutores de outros mecanismos, contribuindo para ações anticarcinogênica e cardioprotetora, dentre outras (RICE-EVANS *et al.*, 1996).

Os polifenóis de plantas possuem várias funções e podem agir como agentes redutores, seqüestradores de radicais hidroxil e peroxil, além de reagir com  $O_2^{\cdot -}$

através de transferência de elétrons, presentes em suas hidroxilas (HUSAIN *et al.*, 1987; WANG *et al.*, 1997; AHERNE; O'BRIEN, 2000; FIORANI *et al.*, 2002; HEIJNEN *et al.*, 2001; PANNALA *et al.*, 2001).

Os flavonóides têm a capacidade de penetrar nas células e, assim, ligar-se ao ferro. A rutina penetra nas células menos facilmente que a quercetina, devido à sua maior hidrofília e conseqüente baixa solubilidade em membranas celulares (FERRALI *et al.*, 1997; ANGHILERI; THOUVENOT, 2000).

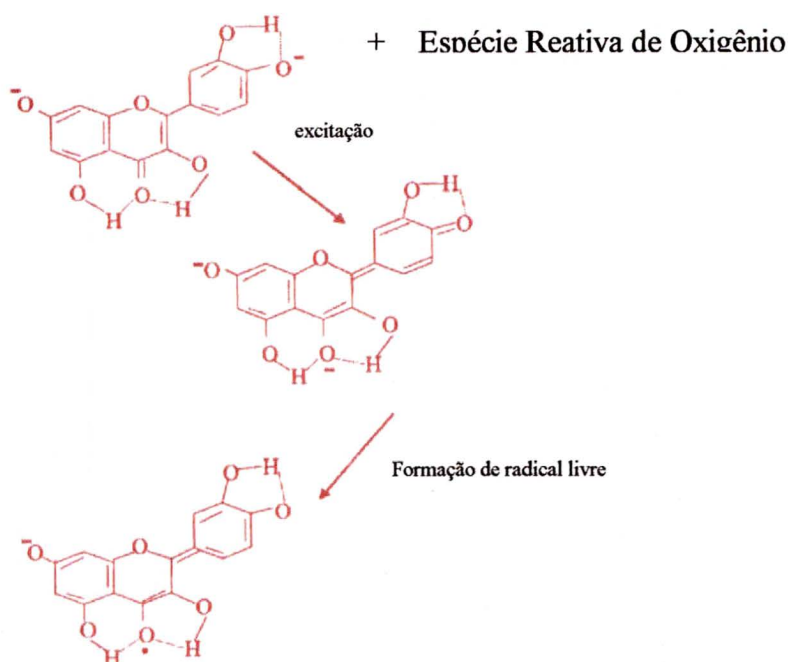
Estima-se que o consumo diário de flavonóides situa-se entre 20 mg a 1 g (HERTOG *et al.*, 1993). Os polifenóis, do grupo das catequinas e flavonóis, como quercetina, kaempferol e seus glicosídeos, são constituintes de bebidas, chá preto e verde e vinho tinto (SOUZA NETO *et al.*, 1994). A quercetina é também um dos componentes predominantes de cebolas e maçãs, sendo que tanto a myricetina quanto a quercetina são componentes de frutas em geral (RICE-EVANS *et al.*, 1996).

As propriedades químicas dos polifenóis, relativas à capacidade dos hidrogênios fenólicos em seqüestrar radicais livres, mostram sua atividade antioxidante. Para estes compostos serem definidos como antioxidantes, devem satisfazer duas condições básicas: primeiro devem prevenir a autooxidação ou a oxidação gerada por radicais livres, quando presentes em baixa concentração relativa ao substrato a ser oxidado. Segundo, o radical formado após a ligação deve ser mais estável (RICE-EVANS *et al.*, 1996). As características antioxidantes destes flavonóides são determinadas por múltiplos fatores, dentre eles o número e a posição dos grupamentos hidroxila nos anéis aromáticos (CHEN *et al.*, 1996).

Na Figura 6 estão representadas as reações químicas e o tráfego de elétrons da quercetina relacionados aos determinantes estruturais envolvidos no seqüestro de radicais livres. Acrescenta-se que o radical formado pela quercetina é uma molécula grande, que não tem a mesma capacidade de reagir como outros radicais livres, que são moléculas menores. Os flavonóides parecem dever sua atividade de seqüestrar radicais livres ao fato de que os potenciais de oxi-redução dos radicais flavonoídicos formados nestas reações, são menores que os de radicais alquoxil,

peroxil e  $O_2^-$ , o que significa que os flavonóides podem inativar estas espécies e prevenir as conseqüências deletérias de suas reações (RICE-EVANS *et al.*, 1996; HARBONE; WILLIAMS, 2000).

FIGURA 6 – REAÇÕES QUÍMICAS DA QUERCETINA COM ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO



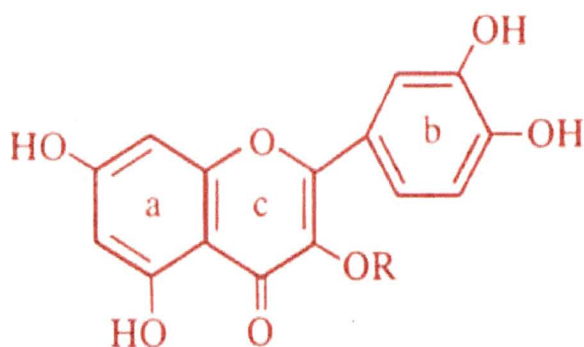
FONTE: Adaptado de MOVILEANU *et al.* (2000)

Estes compostos fenólicos, de forma geral, exercem diversos efeitos benéficos à saúde, como proteção contra doenças cardiovasculares (BURNS *et al.*, 2000; CERIELLO *et al.*, 2001), melhoramento da função de células endoteliais (AGEWALL *et al.*, 2000), resistência ao estresse oxidativo (YOUUDIM *et al.*, 2000), proteção do DNA de células da mucosa intestinal de ratos (GIOVANNELLI *et al.*, 2000), prevenção da agregação plaquetária (HALPERN *et al.*, 1998), e inibição de crescimento de cultura de células cancerosas *in vitro* (ELATTAR; VIRJI, 2000). Os seus efeitos benéficos têm sido descritos em estudos envolvendo pacientes com *diabetes mellitus*, processos alérgicos, câncer, infecções virais, enxaqueca, úlcera

estomacal e duodenal, doenças cardiovasculares, distúrbios estrogênicos e processos inflamatórios (HAVSTEEN, 1983; SAIJA *et al.*, 1995; RICE-EVANS *et al.*, 1996; BRAVO, 1998; VAN ACKER *et al.*, 1998).

Muitos estudos *in vitro* têm definido que o potencial antioxidante dos polifenóis pode ser devido ao seqüestro de radicais e ao aumento da resistência à oxidação das lipoproteínas de baixa densidade, implicadas na patogênese de doenças coronárias (FACINO *et al.*, 1999; CHOPRA *et al.*, 2000; LEAKE, 2001). Entre os principais constituintes polifenólicos de alimentos, flavonóis tais como quercetina, kaempferol e rutina, flavonas como luteonina, flavanóis incluindo catequinas, e antocianidinas como, por exemplo, cianidina e malvidina e seus glicosídeos, mostram grande eficácia como antioxidantes, podendo ser maior até que nutrientes antioxidantes como as vitaminas C e E, e  $\beta$ -caroteno (RICE-EVANS *et al.*, 1995). Na Figura 7 estão representadas a quercetina e a rutina e na Figura 8, a estrutura básica das antocianidinas e padrões de substituições para alguns compostos comuns.

FIGURA 7- ESTRUTURA DOS FLAVONÓIDES QUERCETINA E RUTINA.

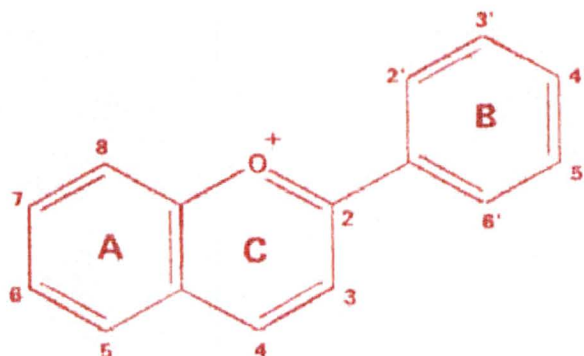


Quercetina: R = H

Rutina: R = D-Glucose-L-ramnose

FONTE: Adaptado de AFANAS'EV *et al.* (1989)

FIGURA 8 – ESTRUTURA BÁSICA DE ANTOCIANIDINAS.



AGLICONA	3	5	7	3'	4'	5'
Delfinidina	OH	OH	OH	OH	OH	OH
Cianidina	OH	OH	OH	OH	OH	H
Pelargonina	OH	OH	OH	H	OH	H
Malvidina	OH	OH	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
Peonidina	OH	OH	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	H

FONTE: Adaptado de WANG *et al.* (1997)

Dentre vários compostos químicos que exercem ação antioxidante, seja por quelação de metais ou por seqüestro de radicais livres, destacam-se no presente trabalho, os flavonóides, mais especificamente os flavonóis quercetina e rutina, bem como substâncias presentes no extrato de *Vitis vinifera*, dentre as quais, as antocianidinas, flavonóis, taninos e fenilpropanóides.

A relevância da compreensão dos mecanismos envolvidos em condições patológicas nas quais haja sobrecarga oxidativa, bem como do estudo da ação de substâncias oxidantes e antioxidantes em tais situações, justificam a investigação de polifenóis em eritrócitos humanos como modelo celular experimental.

## **2 OBJETIVOS**



## 2 OBJETIVOS

Estudar a ação antioxidante dos flavonóides quercetina e rutina, e de extrato hidroalcoólico de *Vitis vinifera*, em eritrócitos humanos normais submetidos a sobrecarga oxidativa *in vitro*, através da determinação dos níveis de GSH e de metahemoglobina e da formação dos corpos de Heinz.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 COLETA

Coletou-se 20 ml de sangue venoso humano, em EDTAK<sub>3</sub> (1 mg/ml), de 12 indivíduos adultos, sendo 8 do sexo masculino e 4 do sexo feminino, com idades entre 18 e 40 anos, considerados saudáveis, por não apresentarem sinais ou sintomas de doença, e que não haviam feito uso de medicamentos durante a semana anterior à coleta. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Hospital de Clínicas da UFPR (Anexo I), obtendo-se o consentimento informado por parte dos doadores voluntários, de acordo com o modelo da declaração do Anexo II.

#### 3.2 PREPARO DAS SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS

Após a coleta da amostra, centrifugou-se o sangue total obtido durante 25 minutos a 800 x g e, em seguida, retirou-se as camadas de plasma e de leucócitos. Executou-se a lavagem dos eritrócitos com tampão fosfato 28 mM, NaCl 123 mM, pH 7,4, por três vezes, através de centrifugações a 1200 x g durante 5 minutos, procurando-se retirar o restante do creme leucocitário a cada lavagem (CICOLLI *et al.*, 1994; FERRALI *et al.*, 1997). Ressuspendeu-se os eritrócitos no mesmo tampão, ajustando-se o volume globular a cerca de 40%, através do método do microhematócrito (DACIE; LEWIS, 1995). Transferiu-se alíquotas de 2 ml de suspensão de eritrócitos para tubos de hemólise, centrifugando-as por 5 minutos a 1200 x g. Na seqüência, retirou-se um volume de sobrenadante correspondente ao de cada solução reagente a ser acrescentada, não se alterando, desta forma, o volume globular final.

### 3.3 TRATAMENTO DAS SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS COM FLAVONÓIDES

#### 3.3.1 Incubação com Quercetina e/ou Rutina

Dissolveu-se cada flavonóide, ou seja, quercetina (Merck, Art. 7546) ou rutina (Merck, Art. 7631), em solução de tampão fosfato 28 mM, NaCl 123 mM, pH 9,0 e, em seguida, reduziu-se lentamente o pH até 7,4, de acordo com FERRALI *et al.* (1997). Obteve-se, como concentrações finais das soluções estoque de quercetina e rutina, 3,3 e 15 mM, respectivamente

A alíquotas de 2 ml de suspensão de eritrócitos, adicionou-se soluções de quercetina para concentrações finais entre 2 e 140  $\mu$ M, de rutina para concentrações finais entre 40 e 140  $\mu$ M e de quercetina e de rutina, para a concentração final de 50  $\mu$ M de ambas.

Incubou-se as amostras, por 30 minutos, à temperatura ambiente, homogeneizando-as em aparelho PHOENIX HS 22.

### 3.4 TRATAMENTO DAS SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS COM MESILATO DE DEFEROXAMINA

Preparou-se uma solução estoque de mesilato de deferoxamina (Desferal<sup>®</sup>, Ciba-Geigy) com concentração de 19 mM em água destilada. Adicionou-se DFO a 2 ml de suspensão de eritrócitos para as concentrações finais entre 1 e 5 mM. Incubou-se as amostras, por 30 minutos, à temperatura ambiente, homogeneizando-as em aparelho PHOENIX HS 22.

### 3.5 TRATAMENTO DAS SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS COM MESILATO DE DEFEROXAMINA E FLAVONÓIDES

#### 3.5.1 Incubação com Quercetina ou Rutina e Mesilato de Deferoxamina

Adicionou-se a 2 ml de suspensão de eritrócitos, solução de quercetina ou de rutina, para a concentração final de 50  $\mu$ M de ambas, como no item 3.3.1, e mesilato de deferoxamina, como no item 3.4, para a concentração final de 4 mM. Incubou-se as amostras, por 30 minutos, à temperatura ambiente, homogeneizando-as em aparelho PHOENIX HS 22.

### 3.6 TRATAMENTO DAS SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS COM EXTRATO DE *Vitis vinifera*

Adicionou-se a 2 ml de suspensão de eritrócitos, solução preparada a partir de extrato hidroalcoólico de *Vitis vinifera*, 70 mg/ml, em tampão fosfato 28 mM, NaCl 123 mM, pH 7,4, preparado de acordo com descrição no item 3.8. As concentrações finais foram de 0,01 e 5 mg/ml de extrato. Incubou-se as amostras, por 30 minutos, à temperatura ambiente, homogeneizando-as em aparelho PHOENIX HS 22.

### 3.7 TRATAMENTO DAS SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS COM OXIDANTES

#### 3.7.1 Incubação com *terc*-Butilhidroperóxido

Adicionou-se a 2 ml de suspensão de eritrócitos incubados anteriormente ou não com quercetina e/ou rutina ou extrato de *Vitis vinifera*, TBH (Sigma Chemical Co. B-2633), para as concentrações finais entre 0,5 e 5 mM, de acordo com o item 3.2. Preparou-se uma solução estoque de TBH com concentração de 300 mM em água destilada. Homogeneizou-se as amostras por rotação em aparelho PHOENIX HS 22 por tempos que variaram entre 0 e 30 minutos.

### 3.7.2 Incubação com Cloridrato de Fenil-hidrazina

Adicionou-se a 2 ml de suspensão de eritrócitos incubados anteriormente ou não com quercetina, CF (Sigma Chemical Co. P-6926) para a concentração final de 0,5 mM. Preparou-se uma solução estoque de CF 6,9 mM em tampão fosfato 28 mM, NaCl 123 mM, pH 7,4. Homogeneizou-se as amostras por rotação em aparelho PHOENIX HS 22, por 30 minutos, à temperatura ambiente.

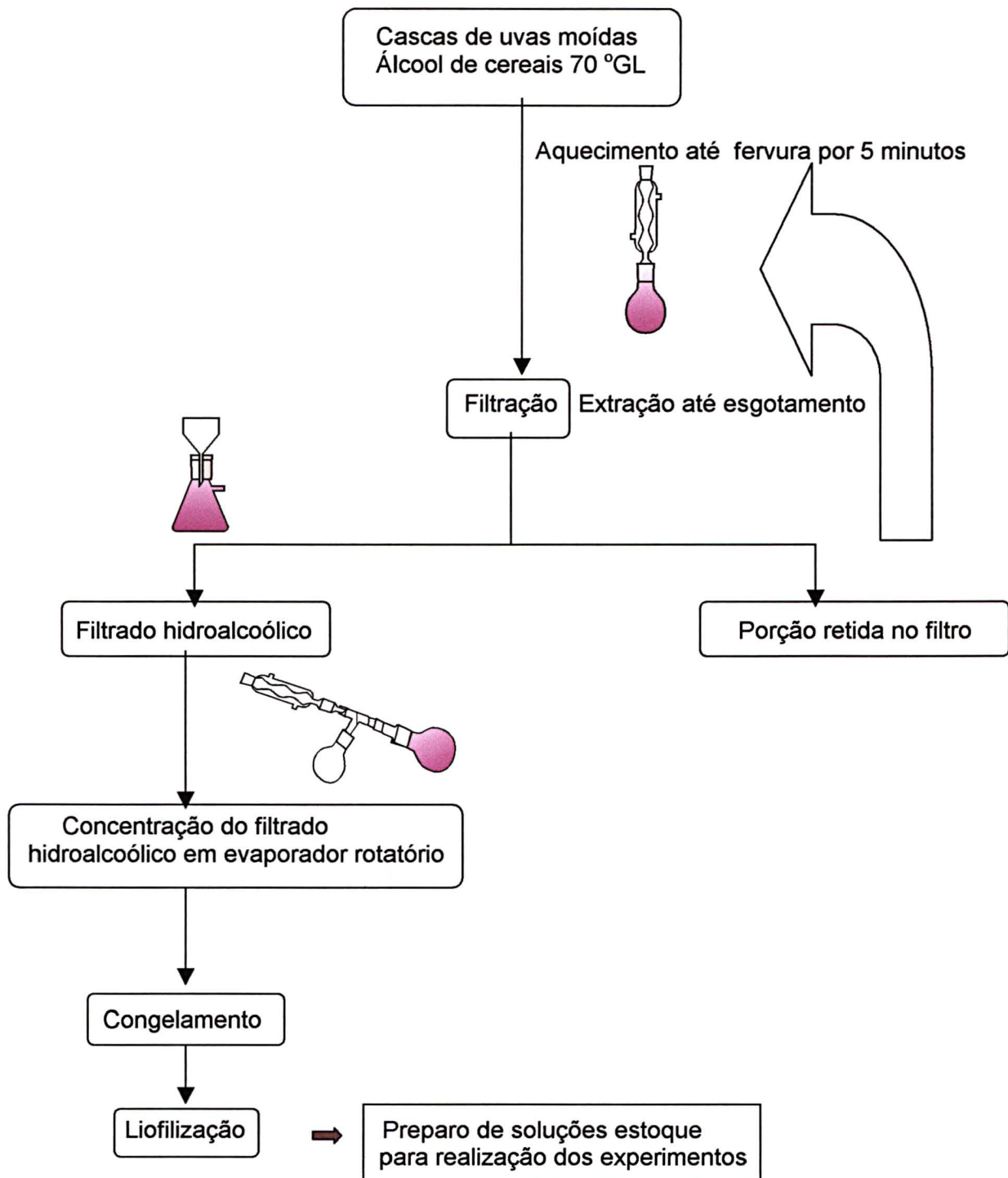
### 3.8 PREPARO DO EXTRATO DE *Vitis vinifera*

A 350 g de cascas de uva (*Vitis vinifera*), obtidas através de expressão manual seguida de trituração, adicionou-se 700 ml de álcool etílico a 70 °GL. Levou-se a mistura ao aquecimento até a fervura em condensador de refluxo durante 5 minutos, para extração de metabólitos secundários. Em seguida, filtrou-se a mistura através de papel de filtro qualitativo, recolhendo-a em frasco Erlenmeyer. Procedeu-se a extração, até o esgotamento total dos pigmentos solúveis e visíveis no solvente. Em seguida, concentrou-se o filtrado hidroalcoólico a nona parte em evaporador rotatório (IKAN, 1991).

Congelou-se o extrato concentrado, liofilizando-o em seguida. Obteve-se um rendimento de 18,71 g de extrato liofilizado, ou seja, 5,34 % do peso inicial.

Fracionou-se o liofilizado em alíquotas para experimentos posteriores, as quais foram solubilizadas em tampão fosfato 28 mM, NaCl 123 mM, pH 7,4.

O esquema empregado no preparo do extrato está representado na Figura 9.

FIGURA 9 - ROTEIRO DE PREPARO DE EXTRATO DE *Vitis vinifera*.

### 3.9 ANÁLISE FITOQUÍMICA DE *Vitis vinifera*

Para a análise fitoquímica, preparou-se um extrato com 20 g/dl de cascas trituradas de *Vitis vinifera* em álcool etílico a 70 °GL.

#### 3.9.1 Reação de Shinoda

Evaporou-se 3 ml do extrato hidroalcoólico até a secura. Dissolveu-se o resíduo em 1,5 ml de metanol e transferiu-se para tubo de ensaio, onde se adicionou 50 mg de limalha de magnésio e 0,5 ml de ácido clorídrico concentrado.

#### 3.9.2 Reconhecimento de Antocianinas

Adicionou-se a cerca de 1 ml de extrato hidroalcoólico, 0,5 ml de hidróxido de sódio a 10 %.

#### 3.9.3 Pesquisa de Taninos

##### 3.9.3.1 Reação com cloreto férrico 1 % (m/v)

A 3 ml do extrato hidroalcoólico adicionou-se 5 gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 1 %.

##### 3.9.3.2 Reação com acetato de chumbo 10 % (m/v)

A 3 ml do extrato hidroalcoólico, foram adicionados 5 ml de ácido acético a 10 % e, gota a gota, 5 ml de acetato de chumbo em solução aquosa a 10 %.



### 3.10 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA E ESPECTROMETRIA DO EXTRATO DE *Vitis vinifera*

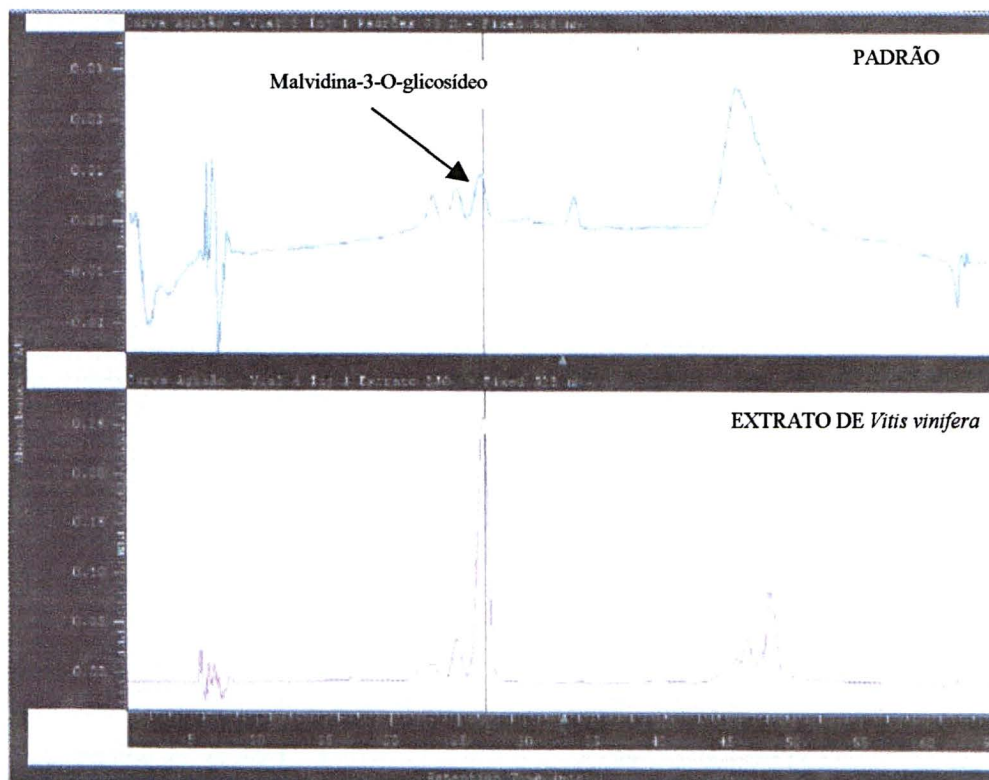
#### 3.10.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises foram realizadas em aparelho Merck-Hitashi, composto de bomba L7100, degaseificador de solventes L7812, válvula de injeção Rheodyne 7725i, detector DAD L7450, interface L7000 conectada ao sistema operacional Windows NT. Utilizou-se a coluna Water x-terra 5  $\mu\text{m}$  (250 mm X 4 mm d.i.) a temperatura de 25 °C com fluxo de 0,7 ml por minuto em sistemas isocrático e gradiente com os seguintes patamares: de 0 a 5 minutos utilizando acetonitrila, metanol, ácido fosfórico 0,2 % (1:1:98 isocrático), de 5 a 10 minutos (2:18:80), de 10 a 15 minutos utilizando acetonitrila, metanol, ácido fosfórico 0,2 % (3:27:70 gradiente), de 15 a 37 minutos utilizando acetonitrila, metanol, ácido fosfórico 0,2 % (10:50:40 gradiente), de 37 a 41 minutos, utilizando acetonitrila, metanol, ácido fosfórico 0,2 % (30:50:20 gradiente) e de 41 a 50 minutos, utilizando acetonitrila, metanol, ácido fosfórico 0,2 % (30:5:90 isocrático), de 50 a 52 minutos utilizando acetonitrila, metanol, ácido fosfórico 0,2 % (1:1:98 gradiente) e de 52 a 58 minutos permaneceu nessas condições a 5 minutos utilizando acetonitrila, metanol, ácido fosfórico 0,2 % (1:1:98 isocrático), (SILVERSTEIN *et al.*, 1994; TREASE; EVANS, 1992)

Analisou-se o extrato de *Vitis vinifera*, nas condições descritas acima, a fim de se visualizar que grupo de compostos se encontrava em maior quantidade no mesmo. Comparou-se o cromatograma do extrato com o de um padrão de antocianidinas conhecidas.

O cromatograma obtido do extrato de *Vitis vinifera* está ilustrado na Figura 10.

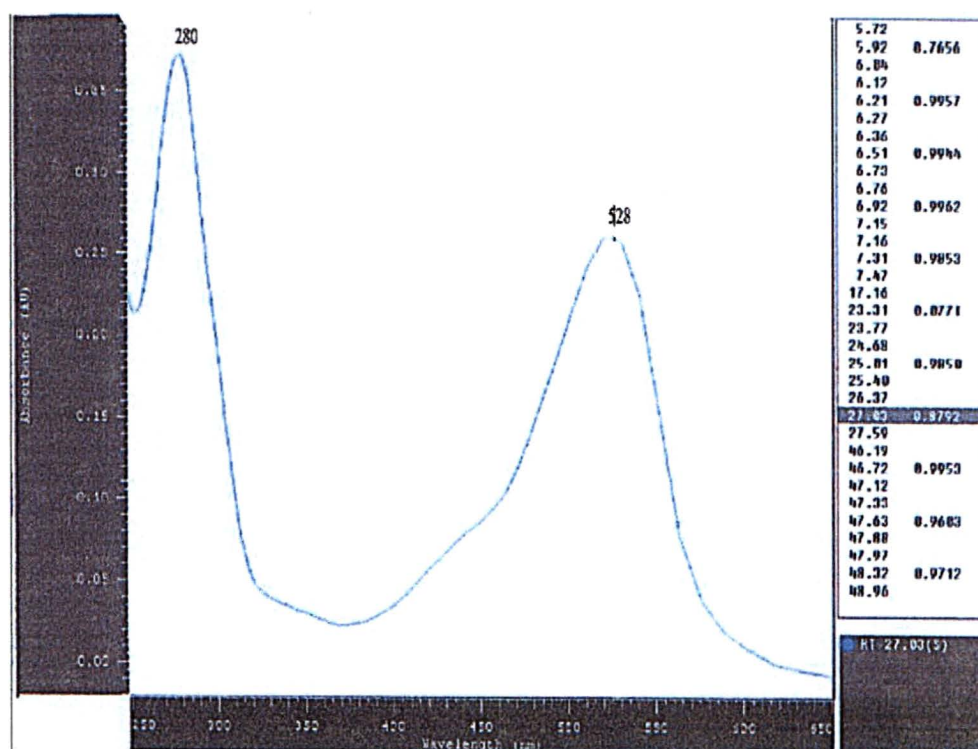
FIGURA 10 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Vitis vinifera* E PADRÃO DE ANTOCIANIDINAS, OBTIDO POR CLAE, COLUNA =X-TERRA FASE MÓVEL: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:MEOH:ACN-55:39:6.



### 3.10.2 Espectrometria UV-Visível do extrato de *Vitis vinifera*

Para determinação do espectro UV-Visível do extrato de *Vitis vinifera*, utilizou-se o espectrofotômetro acoplado ao aparelho de CLAE. Na Figura 11 está representado o espectro de absorção UV-Visível para o composto com maior área relativa, conforme Figura 10.

FIGURA 11 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO UV-VIS (250-650nm) DO COMPOSTO COM TEMPO DE RETENÇÃO DE 27,03 MINUTOS DO EXTRATO DE *Vitis vinifera*.



### 3.11 DETERMINAÇÕES REALIZADAS NAS AMOSTRAS DE SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS COM OXIDANTES E/OU ANTIOXIDANTES PARA AVALIAÇÃO DO METABOLISMO OXIDATIVO

#### 3.11.1 Determinação Espectrofotométrica da Glutathiona Reduzida

A determinação da GSH foi realizada segundo a técnica de BEUTLER *et al.* (1963). Analisou-se a reprodutibilidade do método, utilizando-se uma amostra de suspensão de eritrócitos preparada a partir de sangue de indivíduos considerados saudáveis, conforme item 3.2. Após dez determinações, obteve-se valores médios de  $6,3 \pm 0,3$   $\mu$ moles/g de Hb, com coeficiente de variação de 4,7 %.

##### 3.11.1.1 Preparo do hemolisado

Em um tubo de ensaio, colocou-se 200  $\mu$ l de suspensão de eritrócitos, tratados ou não com antioxidante(s) e/ou oxidante, a 2 ml de água destilada.

##### 3.11.1.2 Determinação da concentração de hemoglobina

Adicionou-se 200  $\mu$ l do hemolisado a 10 ml de reativo de Drabkin (DACIE; LEWIS, 1995) para a estimacão da hemoglobina da amostra, utilizando-se como padrão um sangue com a concentração de hemoglobina conhecida, na diluição usual de 1:251. Procedeu-se a leitura a 540 nm, em espectrofotômetro SHIMADZU UV 1601.

##### 3.11.1.3 Determinação da concentração de GSH

Adicionou-se 3 ml de solução precipitante (1,67 g de ácido metafosfórico glacial, 0,2 g de EDTANa<sub>2</sub> e 30 g de NaCl em 100 ml) a 2 ml do hemolisado. Após 5 minutos, filtrou-se em papel de filtro qualitativo.

Adicionou-se 1 ml do filtrado a 4 ml de solução de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  300 mM. Preparou-se o branco adicionando-se 2 ml de solução precipitante diluída 2:5 em água destilada a 8 ml de solução  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  300 mM. Após a homogeneização, procedeu-se a leitura ( $A_1$ ) a 412 nm em espectrofotômetro SHIMADZU UV 1601.

Adicionou-se 1 ml de uma solução de 20 mg de 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) (Sigma Co. D-8130) em 100 ml de solução de ácido cítrico 1 g/dl ao tubo com a amostra e ao branco. Após homogeneização, procedeu-se a leitura ( $A_2$ ) em 412 nm.

#### 3.11.1.4 Cálculos e valores de referência

A concentração (C) de GSH é expressa em  $\mu\text{moles/g}$  de hemoglobina (Hb), segundo a fórmula:

$$\frac{C}{1000} = \frac{(A_2 - A_1) \times E_1}{13,6} \times \frac{11}{2} \times \frac{5}{2} \times \frac{100}{\text{Hb}}$$

Para simplificar a fórmula acima, obteve-se o valor numérico 101 através de cálculos entre os valores de diluições da amostra e o coeficiente de extinção molar ( $13,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ):

$$C = \frac{(A_2 - A_1) \times E_1 \times 101}{\text{Hb}}$$

Onde,

Hb = concentração de hemoglobina da amostra

$E_1$  = fator de correção para o coeficiente de extinção molar ( $13,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) do ânion amarelo produzido quando a GSH interage com o DTNB.

O fator de correção é usado quando o espectrofotômetro possui uma amplitude de onda maior que 6 nm, o que acarreta uma diminuição no coeficiente de extinção molar. O espectrofotômetro pode ser calibrado por comparação do valor de extinção

no sistema teste ( $D_2$ ) com aquele obtido no espectrofotômetro com amplitude de onda menor que 6 nm a 412 nm ( $D_1$ ). O fator de correção derivado,  $E_1$ , é dado por  $D_1 / D_2$  e é constante para o espectrofotômetro utilizado.

No caso do espectrofotômetro SHIMADZU UV 1601, não houve a necessidade de calcular o fator de correção, pois o aparelho não possui amplitude de onda maior que 6 nm. O valor usado para  $E_1$ , então, foi igual a 1.

Valores de referência em adultos:  $6,57 \pm 1,04$   $\mu$ moles/g de Hb.

### 3.11.2 Determinação da Formação de Metahemoglobina

A determinação da formação de metahemoglobina foi realizada segundo o método de EVELYN e MALLOY (1938), modificado por BEUTLER *et al.* (1995).

Analizou-se a reprodutibilidade do método utilizando-se uma amostra de sangue tratada como no item 3.7.1, com TBH 3 mM. Após dez determinações, obteve-se valores médios de  $22,7 \pm 1,2$  %, com coeficiente de variação de 5,2 %.

Em tubo de ensaio, colocou-se 10 ml de tampão fosfato 16 mM e 100  $\mu$ l de suspensão de eritrócitos, tratados ou não com antioxidante(s) e/ou oxidante. Homogeneizou-se as amostras e, após 5 minutos, fez-se a leitura da metahemoglobina em 630 nm (A) (espectrofotômetro SHIMADZU UV 1601), usando-se água destilada como branco.

Em seguida, adicionou-se 50  $\mu$ l de cianeto neutralizado (NaCN 10 g/dl e ácido acético 12 g/dl na proporção 1:1) às misturas reativas. Após cinco minutos, fez-se a leitura em 630 nm (B), usando-se água destilada como branco. Nesta etapa, a metahemoglobina desaparece.

Em outro tubo, colocou-se 8 ml de tampão fosfato 66 mM pH 6,6 ( $K_2HPO_4$  e  $KH_2PO_4$ ) e 2 ml das soluções anteriores, adicionando-se 50  $\mu$ l de NaCN 10 g/dl e 50  $\mu$ l de  $K_3[Fe(CN)_6]$  20 g/dl. Após homogeneização, fez-se a leitura em 540 nm (D). Usou-se como branco uma mistura de 10 ml de tampão fosfato 66 mM e 50  $\mu$ l de NaCN 10 g/dl e 50  $\mu$ l de  $K_3[Fe(CN)_6]$  20 g/dl.

A concentração de metahemoglobina foi expressa como porcentagem em relação à hemoglobina total, de acordo com a fórmula abaixo:

$$\% \text{ MetaHb} = \frac{(A - B)}{D} \times \text{FB}$$

Onde:

MetaHb = metahemoglobina em %;

Valores de referência < 1%.

O fator FB foi calculado utilizando-se sangue de 5 indivíduos considerados saudáveis. Adicionou-se 100 µl de sangue total a um tubo de ensaio contendo 10 ml de tampão fosfato 16 mM, juntou-se 50 µl de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  20 g/dl. Homogeneizou-se as amostras e, após 5 minutos, fez-se a leitura em 630 nm (A) (espectrofotômetro SHIMADZU UV 1601), utilizando-se água destilada como branco.

Em seguida, adicionou-se 50 µl de cianeto neutralizado. Homogeneizou-se as amostras e, após 5 minutos, fez-se a leitura em 630 nm (B), usando-se água destilada como branco.

Em outro tubo, contendo 8 ml de tampão fosfato 66 mM, adicionou-se 2 ml da mistura reativa anterior, 50 µl de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  20 g/dl e 50 µl de NaCN 10 g/dl. Homogeneizou-se as amostras e, após 5 minutos, fez-se a leitura em 540 nm (D), usando-se como branco uma mistura de 10 ml de tampão fosfato 66 mM e 50 µl de NaCN 10 g/dl e 50 µl de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  20 g/dl.

Calculou-se o fator para cada amostra, usando-se a fórmula abaixo:

$$\text{FB} = 100 \times \frac{D}{A - B}$$

O FB, que varia para cada espectrofotômetro utilizado, é a média dos fatores obtidos para as 5 amostras de sangue utilizadas. Neste trabalho, o valor de FB utilizado foi de 95,19.

### 3.11.3 Contagem de Corpos de Heinz

Realizou-se a contagem de corpos de Heinz segundo o método de BEUTLER *et al.* (1955), modificado por CLARO (2002).

Analisou-se a reprodutibilidade do método utilizando-se uma amostra de sangue tratada como no item 3.7.1. Após dez determinações, obteve-se valores médios de 9,4 ± 0,4 %, com coeficiente de variação de 5,1 %.

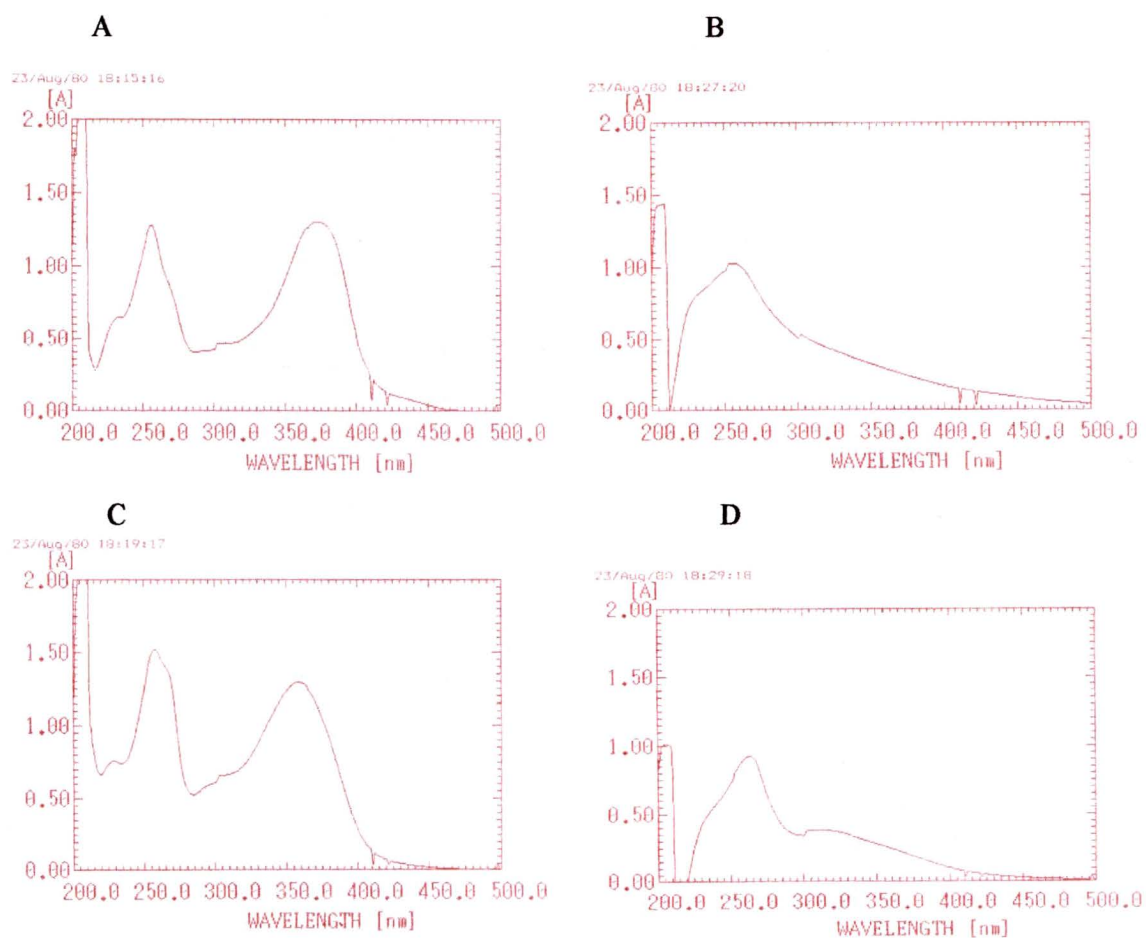
Adicionou-se 25 µl das amostras tratadas, como descrito no item 3.2, a 0,5 ml de tampão fosfato  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  67 mM pH 7,4 com glicose 200 mg/dl. Homogeneizou-se por aeração, com o auxílio de pipeta micrométrica. Sobre uma lâmina de microscopia, adicionou-se 20 µl da mistura a 50 µl de corante metil violeta (2 g de cristal violeta, marca Reagen, em 100 ml de solução de NaCl 0,73 g/dl), cobrindo o material com lamínula. Após 5 minutos, observou-se a formação dos corpos de Heinz ao microscópio de luz, considerando-se como positivos, eritrócitos que apresentassem mais de uma inclusão próximas à membrana ou livres no citoplasma. Segundo DACIE; LEWIS (1995), os corpos de Heinz são arredondados e, se corados por cristal violeta, apresentam coloração azul violeta, medindo cerca de 1 a 3 µm. Após a contagem de 1000 células, estabeleceu-se a porcentagem de eritrócitos contendo corpos de Heinz.

### 3.12 COMPORTAMENTO DOS FLAVONÓIDES EM TAMPÃO FOSFATO SALINA

Realizou-se o espectro de varredura, para quercetina e rutina, em metanol e em tampão fosfato 28 mM, NaCl 123 mM, pH 7,4, em espectrofotômetro SHIMADZU UV 1601. Para as análises feitas em metanol, adicionou-se alguns cristais dos flavonóides em questão, na cubeta do espectrofotômetro, enquanto para as análises feitas em tampão fosfato salino, pH 7,4, adicionou-se algumas gotas de solução de quercetina ou rutina, 3,3 e 15 mM, respectivamente, na cubeta do espectrofotômetro, com o referido tampão.



**FIGURA 12 – ESPECTRO ULTRA VIOLETA DE QUERCETINA E DE RUTINA EM METANOL E EM TAMPÃO FOSFATO SALINO pH 7,4**



**NOTAS:** A = Quercetina P.A., em metanol.

B = Quercetina P.A., em tampão fosfato 28 mM, NaCl 123 mM, pH 7,4.

C = Rutina P.A., em metanol.

D = Rutina P.A., em tampão fosfato 28 mM, NaCl 123 mM, pH 7,4.

### 3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância seguida do teste de Tukey para a comparação de pares de médias e teste t. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para  $p \leq 0,05$ . Os dados experimentais foram apresentados na forma de gráficos de caixa e delimitadores e de colunas, com os valores médios e respectivos desvios padrão para cada determinação. A medida de dispersão expressa como  $\pm 1,96$  x desvio padrão representa 95 % da área sob a curva normal, para a distribuição teórica de frequência.

## **4 RESULTADOS**

## 4 RESULTADOS

Na Figura 13 observa-se a ação do *terc*-butilhidroperóxido (TBH), em concentrações de 0,5 a 5 mM, sobre os níveis de glutathiona reduzida, em eritrócitos humanos saudáveis.

A Tabela 1 mostra os resultados da comparação de médias, pelo teste de Tukey, para a determinação de GSH em eritrócitos sob a ação de TBH 0,5 a 5 mM em relação ao controle, com eritrócitos não tratados com TBH. Os resultados indicam que o efeito do TBH foi estatisticamente significativo a partir de 0,5 mM.

A Figura 14 mostra a ação do TBH, nas concentrações finais de 0,5 a 5 mM, sobre a formação de metahemoglobina em eritrócitos humanos saudáveis.

Na Tabela 2 estão os resultados da comparação de médias, pelo teste de Tukey, para a formação de metahemoglobina em eritrócitos sob a ação de TBH 0,5 a 5 mM em relação ao controle com eritrócitos não tratados com TBH. Os resultados indicam que o efeito do TBH foi estatisticamente significativo a partir de 2 mM.

A Figura 15 apresenta as porcentagens médias de formação de corpos Heinz em eritrócitos de indivíduos saudáveis sob a ação de TBH nas concentrações finais de 1 a 5 mM.

A Tabela 3 mostra os resultados da comparação de médias, pelo teste de Tukey, para formação de corpos de Heinz em eritrócitos sob a ação de TBH 1 a 5 mM em relação ao controle com eritrócitos não tratados com TBH. Os resultados indicam que o efeito do TBH foi estatisticamente significativo a partir de 1 mM.

A Figura 16 apresenta a ação da quercetina sobre a concentração de GSH, em eritrócitos humanos saudáveis, submetidos à ação oxidante de TBH na concentração final de 1 mM, em função do tempo de incubação, entre 0 e 30 minutos.

Na Figura 17 pode-se observar a ação da quercetina sobre a formação de metahemoglobina, em eritrócitos humanos saudáveis, submetidos à ação oxidante de TBH, na concentração final de 2 mM, em função do tempo de incubação de 0 a 30 minutos. Os resultados obtidos mostram que a quercetina, na concentração empregada, não foi eficiente para inibir a formação de metahemoglobina após a ação de TBH.

Observa-se na Figura 18 a ação de quercetina sobre a formação de corpos de Heinz, em eritrócitos humanos, submetidos à ação oxidante de TBH 3 mM por 15 minutos. As suspensões de eritrócitos foram pré-incubadas com quercetina 2 a 20  $\mu\text{M}$  durante 30 minutos, sob constante homogeneização. Estes resultados indicam uma inibição parcial da formação de corpos de Heinz pela quercetina a partir de 2  $\mu\text{M}$ .

A Figura 19 mostra a ação da quercetina, nas concentrações de 2 a 120  $\mu\text{M}$ , em relação à formação de metahemoglobina, em eritrócitos humanos, submetidos à oxidação por cloridrato de fenil-hidrazina (CF) na concentração final de 0,5 mM. Pode-se observar que houve inibição parcial da formação de metahemoglobina a partir de 20  $\mu\text{M}$ .

Na Figura 20, observa-se a ação da rutina 100  $\mu\text{M}$  sobre a concentração de glutathiona reduzida, em eritrócitos humanos saudáveis, submetidos à ação oxidante de TBH, nas concentrações finais entre 0,5 e 2,0 mM, com tempo de incubação de 30 minutos. As suspensões de eritrócitos foram pré-incubadas com rutina 100  $\mu\text{M}$  durante 30 minutos. Os resultados obtidos mostram que houve pequena recuperação da GSH pela rutina apenas para a concentração de 2 mM de TBH.

A Figura 21 apresenta a ação da rutina sobre a formação de corpos de Heinz, em eritrócitos humanos, submetidos à ação oxidante de TBH 3 mM durante 15 minutos. As suspensões de eritrócitos foram pré-incubadas com rutina 40 a 140  $\mu\text{M}$  durante 30 minutos. Estes resultados indicam inibição parcial, porém significativa da formação de corpos de Heinz por ação de rutina nas concentrações utilizadas.

A Figura 22 apresenta o efeito da incubação prévia com extrato hidroalcoólico de *Vitis vinifera*, 0,01 a 1 mg/ml, em tampão fosfato 28 mM, NaCl 123 mM, pH 7,4, sobre a concentração de glutathiona reduzida, em eritrócitos humanos incubados com TBH 0,5 mM durante 30 minutos. Os resultados obtidos indicam que, concentrações de 0,1 a 1 mg/ml de extrato recuperaram de forma significativa os níveis de GSH dos eritrócitos.

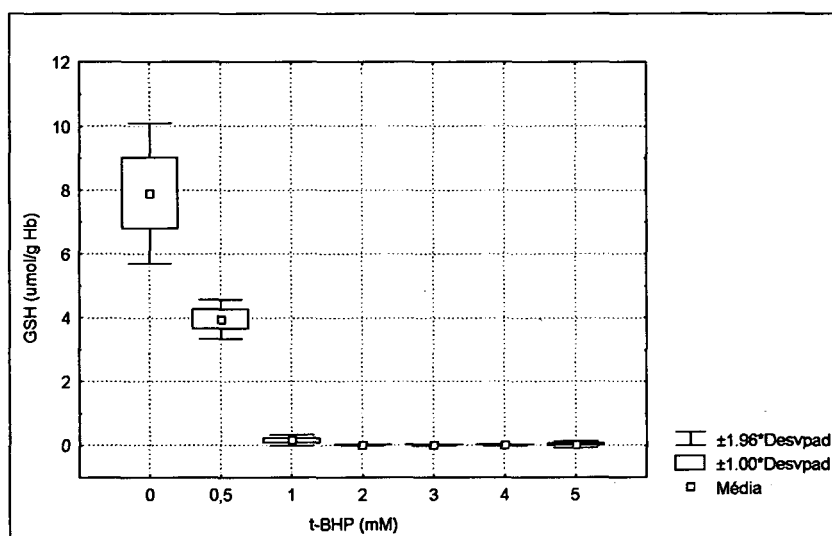
A Figura 23 apresenta a ação de extrato de *Vitis vinifera* sobre a formação de corpos de Heinz, em eritrócitos humanos, submetidos à ação oxidante de TBH 3 mM durante 15 minutos. As suspensões de eritrócitos foram pré-incubadas com extrato de

*Vitis vinifera* nas concentrações de 0,1 a 5 mg/ml em tampão fosfato 28 mM, NaCl 123 mM, pH 7,4, durante 30 minutos. Observa-se uma inibição parcial da formação de corpos de Heinz por ação de extrato de *Vitis vinifera*.

A Figura 24 apresenta a ação de mesilato de deferoxamina sobre a formação de corpos de Heinz, em eritrócitos humanos, submetidos à ação oxidante de TBH 3 mM durante 15 minutos. As suspensões de eritrócitos foram pré-incubadas com mesilato de deferoxamina 1 a 5 mM durante 30 minutos. Os resultados obtidos indicaram uma ação de inibição da formação de corpos de Heinz, pelo mesilato de deferoxamina, proporcional à sua concentração.

Observa-se na Figura 25 a ação de quercetina, rutina e mesilato de deferoxamina, bem como de suas associações, sobre a formação de metahemoglobina, em eritrócitos humanos, submetidos à ação oxidante de TBH, nas concentrações finais de 2, 3, 4 e 5 mM, durante 15 minutos. As suspensões de eritrócitos foram pré-incubadas com mesilato de deferoxamina 4 mM, rutina 100  $\mu$ M, rutina 50  $\mu$ M juntamente com quercetina 50  $\mu$ M, rutina 100  $\mu$ M com mesilato de deferoxamina 4 mM e quercetina 50  $\mu$ M com mesilato de deferoxamina 4 mM, por 30 minutos. Os resultados obtidos indicam que houve redução da formação de metahemoglobina apenas nas amostras pré-incubadas com Q100+DF e submetidas à ação oxidante de TBH.

FIGURA 13 – CONCENTRAÇÕES DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) EM SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS HUMANOS, SUBMETIDOS À AÇÃO DE *terc*-BUTILHIDROPERÓXIDO 0,5 A 5 mM.



NOTAS: Os eritrócitos foram submetidos à ação oxidante de *terc*-butilhidroperóxido, durante 15 minutos.

$n = 9$ , sendo 3 amostras com 3 repetições independentes.

Os resultados expressam média, um desvio padrão e 1,96 desvios padrões (aproximadamente 95% dos valores amostrais).

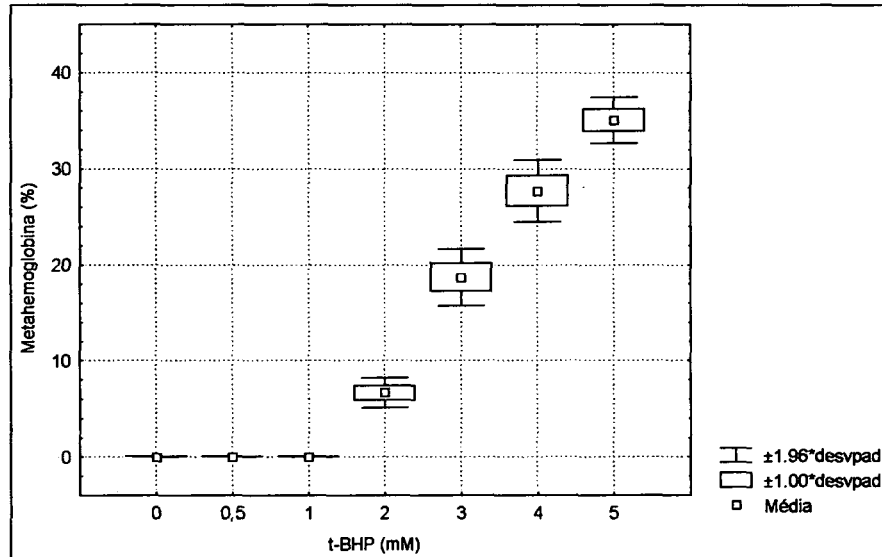
Utilizou-se suspensões de eritrócitos aproximadamente 40 % (v/v) em tampão fosfato 28 mM, NaCl 123 mM, pH 7,4.

TABELA 1 - TESTE DE COMPARAÇÃO DE MÉDIAS PELO MÉTODO DE TUKEY PARA A AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA EM ERITRÓCITOS HUMANOS SOB A AÇÃO DE *terc*-BUTILHIDROPERÓXIDO EM RELAÇÃO AO CONTROLE COM ERITRÓCITOS NÃO TRATADOS COM *terc*-BUTILHIDROPERÓXIDO.

<i>terc</i> -BUTILHIDROPERÓXIDO (mM)	P
0,5	0,000174
1,0	0,000174
2,0	0,000174
3,0	0,000174
4,0	0,000174
5,0	0,000174

NOTAS: Diferença estatística significativa para  $p \leq 0,05$ .

FIGURA 14 - FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS HUMANOS, SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE *terc*-BUTILHIDROPERÓXIDO 0,5 A 5 mM.



NOTAS: Os eritrócitos foram submetidos à ação oxidante de *terc*-butilhidroperóxido, durante 15 minutos.

n = 9, sendo 3 amostras com 3 repetições independentes.

Os resultados expressam média, desvio padrão e 1,96 desvios padrões (aproximadamente 95% dos valores amostrais).

Utilizou-se suspensões de eritrócitos aproximadamente 40 % (v/v) em tampão fosfato 28 mM, NaCl 123 mM, pH 7,4.

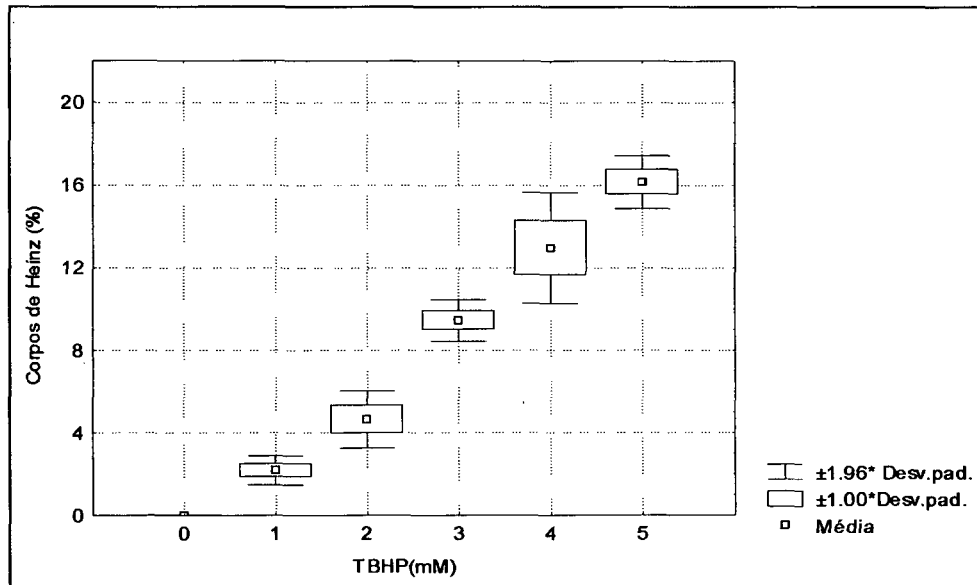
TABELA 2 - TESTE DE COMPARAÇÃO DE MÉDIAS PELO MÉTODO DE TUKEY PARA A AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS SOB A AÇÃO DE *terc*-BUTILHIDROPERÓXIDO EM RELAÇÃO AO CONTROLE COM ERITRÓCITOS NÃO TRATADOS COM *terc*-BUTILHIDROPERÓXIDO.

<i>terc</i> -BUTILHIDROPERÓXIDO (mM)	P
0,5	1
1,0	1
2,0	0,000182
3,0	0,000174
4,0	0,000174
5,0	0,000174

NOTAS: Diferença estatística significativa para  $p \leq 0,05$ .



FIGURA 15 - AÇÃO DE *terc*-BUTILHIDROPERÓXIDO 1 A 5 mM NA FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ EM SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS HUMANOS.



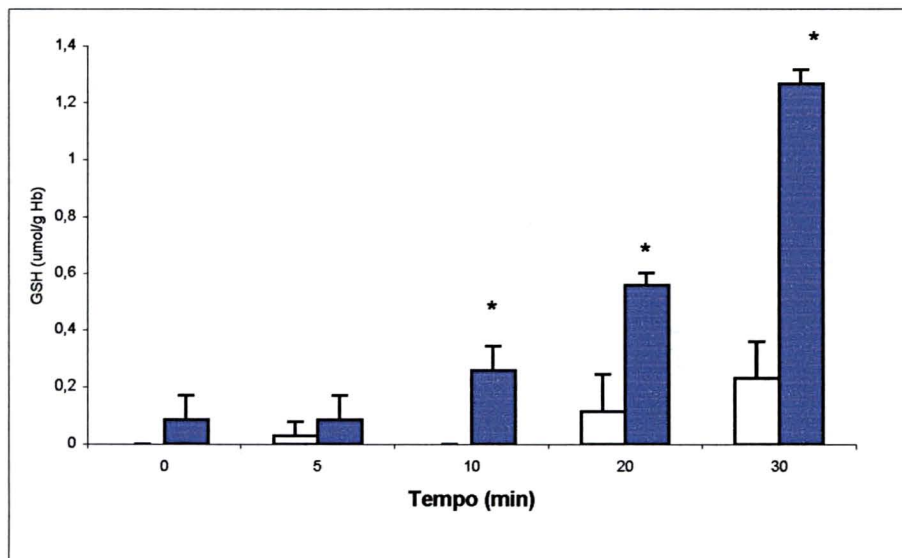
NOTAS: Os eritrócitos foram submetidos à ação oxidante de *terc*-butilhidroperóxido, durante 15 minutos.  
 n = 15, sendo 5 amostras com 3 repetições independentes.  
 Os resultados expressam média e desvio padrão.  
 Utilizou-se suspensões de eritrócitos aproximadamente 40 % (v/v) em tampão fosfato 28 mM, NaCl 123 mM, pH 7,4.

TABELA 3 - TESTE DE COMPARAÇÃO DE MÉDIAS PELO MÉTODO DE TUKEY PARA A AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO CORPOS DE HEINZ EM ERITRÓCITOS HUMANOS SOB A AÇÃO DE *terc*-BUTILHIDROPERÓXIDO EM RELAÇÃO AO CONTROLE COM ERITRÓCITOS NÃO TRATADOS COM *terc*-BUTILHIDROPERÓXIDO.

<i>terc</i> -BUTILHIDROPERÓXIDO	P
1,0	0,0001
2,0	0,0001
3,0	0,0001
4,0	0,0001
5,0	0,0001

NOTAS: Diferença estatística significativa para  $p \leq 0,05$ .

FIGURA 16 - AÇÃO DA QUERCETINA SOBRE A FORMAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH), EM SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS HUMANOS, SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE *tert*-BUTILHIDROPERÓXIDO 1 mM, EM FUNÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO.



NOTAS: □ *tert*-butilhidroperóxido 1 mM, nos tempos de incubação indicados.  
 ■ quercetina 100 µM, pré-incubação durante 30 minutos + *tert*-butilhidroperóxido 1 mM, nos tempos de incubação indicados.

n = 9, sendo 3 amostras com 3 repetições independentes.

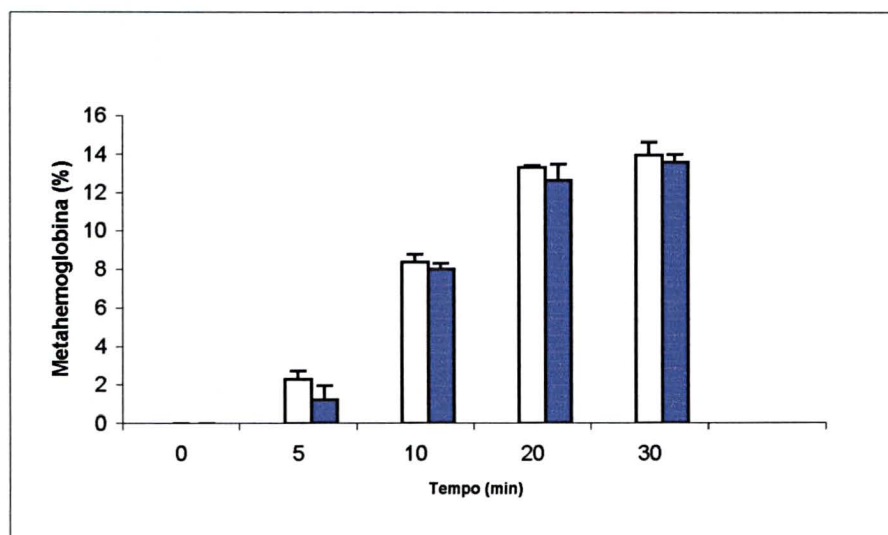
Amostras de eritrócitos não tratados com o oxidante e tratados somente com quercetina 100 µM apresentaram GSH de  $5,95 \pm 0,5$  µmol/g Hb e  $5,92 \pm 0,4$  µmol/g Hb, respectivamente, como média de todos os tempos de incubação.

Os resultados expressam média e desvio padrão.

Utilizou-se suspensões de eritrócitos aproximadamente 40 % (v/v) em tampão fosfato 28 mM, NaCl 123 mM, pH 7,4.

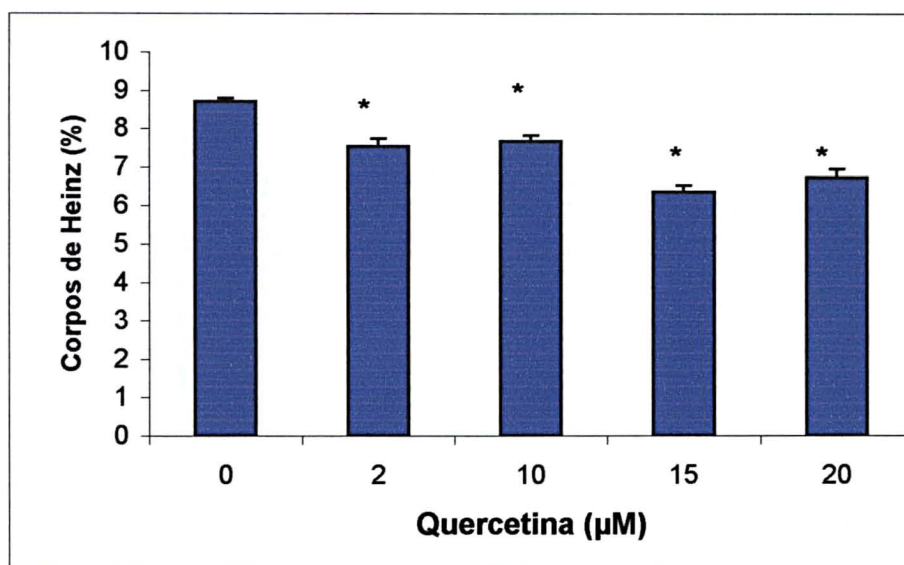
\* Diferença estatística em relação ao respectivo controle com *tert*-butilhidroperóxido 1 mM (teste t).

FIGURA 17 - AÇÃO DA QUERCETINA SOBRE A FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA, EM SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS HUMANOS, SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE *terc*-BUTILHIDROPERÓXIDO 2 mM EM FUNÇÃO DO TEMPO.



- NOTAS: □ *terc*-butilhidroperóxido 2 mM, nos tempos de incubação indicados.  
 ■ quercetina 100 μM, pré-incubação durante 30 minutos + *terc*-butilhidroperóxido 2 mM, nos tempos de incubação indicados.  
 n = 9, sendo 3 amostras com 3 repetições independentes.  
 Amostras de eritrócitos não tratados com o oxidante e tratados somente com quercetina 100 μM apresentaram zero (0 %) de metahemoglobina em todos os tempos de incubação.  
 Os resultados expressam média e desvio padrão.  
 Utilizou-se suspensões de eritrócitos aproximadamente 40 % (v/v) em tampão fosfato 28 mM, NaCl 123 mM, pH 7,4.

FIGURA 18 - AÇÃO DE QUERCETINA SOBRE A FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ, EM SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS HUMANOS SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE *tert*-BUTILHIDROPERÓXIDO 3 mM.



NOTAS: Os eritrócitos foram submetidos à ação de quercetina (0 a 20 µM) durante 30 minutos + *tert*-butilhidroperóxido 3 mM durante 15 minutos.

n = 9, sendo 3 amostras com 3 repetições independentes.

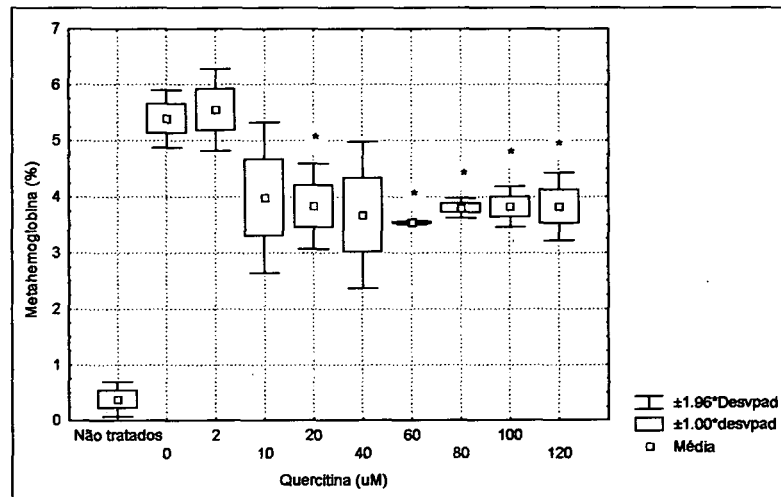
Amostras de eritrócitos não tratados com o oxidante e tratados somente com quercetina 2 a 20 µM apresentaram 0 % para formação de corpos de Heinz.

Os resultados expressam média e desvio padrão.

Utilizou-se suspensões de eritrócitos aproximadamente 40 % (v/v) em tampão fosfato 28 mM, NaCl 123 mM, pH 7,4.

\* Diferença estatística em relação ao controle (com t-BHP e sem quercetina).

**FIGURA 19 - AÇÃO DE QUERCETINA SOBRE A FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA, EM SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS HUMANOS, SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA 0,5 mM.**

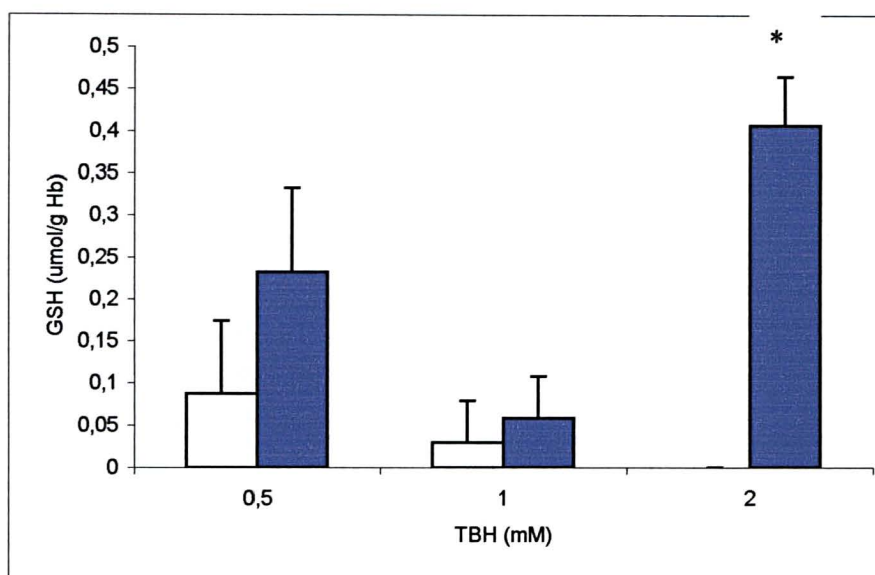


**NOTAS:** Os eritrócitos foram submetidos à ação de quercetina (0 a 120µM), durante 30 minutos + fenil-hidrazina 0,5 mM, durante 15 minutos.  
 n = 18, sendo 6 amostras com 3 repetições independentes.  
 Os resultados expressam média, desvio padrão e 1,96 desvios padrões (aproximadamente 95% dos valores amostrais).

Utilizou-se suspensões de eritrócitos aproximadamente 40 % (v/v) em tampão fosfato 28 mM, NaCl 123 mM, pH 7,4.

\* Diferença estatística em relação a ausência de quercetina.

FIGURA 20 - AÇÃO DA RUTINA SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH), EM SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS HUMANOS SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE *tert*-BUTILHIDROPERÓXIDO 0,5 A 2,0 mM.



NOTAS: □ controle: amostras incubadas com *tert*-butilhidroperóxido 0,5, 1 e 2 mM durante 30 minutos.

■ Amostras pré-incubadas com rutina 100 µM durante 30 minutos e incubadas com *tert*-butilhidroperóxido TBH 0,5, 1,0 e 2,0 mM durante 30 minutos.

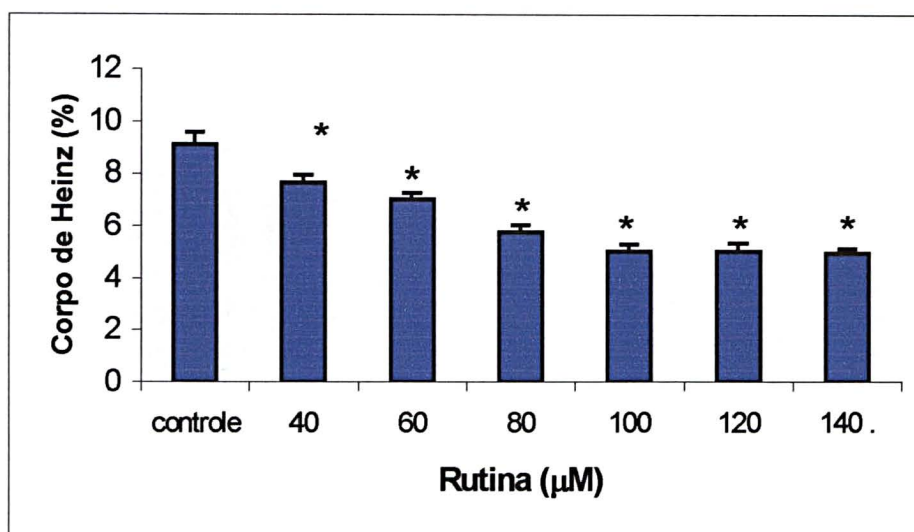
n = 9, sendo 3 amostras com 3 repetições independentes.

Amostras de eritrócitos não tratados com TBH e tratados somente com rutina 100 µM apresentaram concentração de GSH de  $5,95 \pm 0,5$  e  $5,99 \pm 0,3$  µmol/g Hb, respectivamente. Os resultados expressam média e desvio padrão.

Utilizou-se suspensões de eritrócitos aproximadamente 40 % (v/v) em tampão fosfato 28 mM, NaCl 123 mM, pH 7,4.

\* Diferença estatística em relação ao controle com *tert*-butilhidroperóxido na concentração indicada (teste t).

FIGURA 21 – AÇÃO DE RUTINA SOBRE A FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ, EM SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS HUMANOS SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE *terc*-BUTILHIDROPERÓXIDO 3 mM.

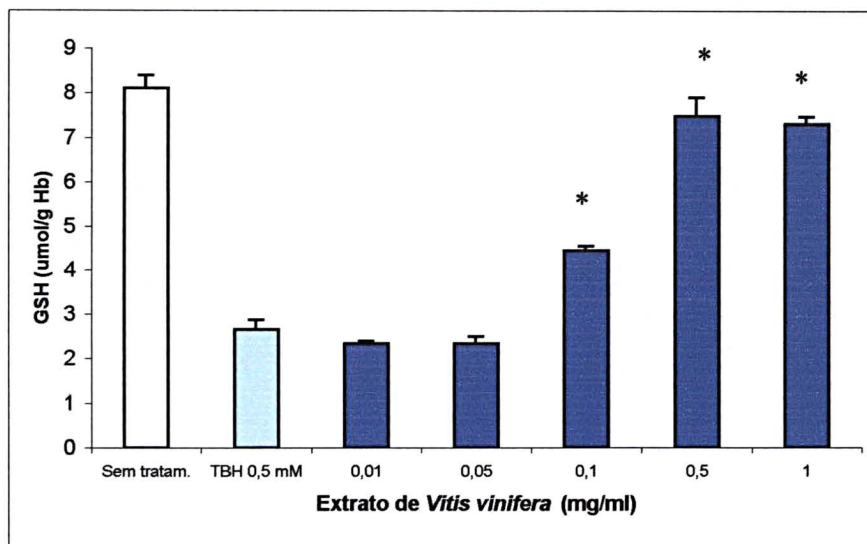


NOTAS: Os eritrócitos foram submetidos à ação de rutina (40 – 140  $\mu\text{M}$ ) com tempo de pré-incubação de 30 minutos + *terc*-butilhidroperóxido 3 mM durante 30 minutos.  $n = 9$ , sendo 3 amostras com 3 repetições independentes. Amostras de eritrócitos não tratados com o oxidante e tratados somente com rutina 40 a 140  $\mu\text{M}$  apresentaram zero (0 %), para formação de corpos de Heinz. Os resultados expressam média e desvio padrão.

Utilizou-se suspensões de eritrócitos de aproximadamente 40 % (v/v) em tampão fosfato 28 mM, NaCl 123 mM, pH 7,4.

\* Diferença estatística em relação aos controle com TBH e sem rutina.

FIGURA 22 - AÇÃO DE EXTRATO DE *Vitis Vinifera* 0,01 A 1 mg/ml, SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) EM SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS HUMANOS INCUBADOS COM *terc*-BUTILHIDROPERÓXIDO 0,5 mM.



NOTAS: Os eritrócitos foram pré-incubados com extrato de *Vitis vinifera* (0,01 a 1 mg/ml) durante 30 minutos, e tratados com *terc*-butilhidroperóxido 0,5 mM, durante 30 minutos.

n = 12, sendo 4 amostras com 3 repetições independentes.

Os controles com eritrócitos tratados e não tratados com extrato de *Vitis vinifera* apresentaram concentrações de GSH,  $6,25 \pm 0,3 \mu\text{mol/g Hb}$  e  $6,21 \pm 0,4 \mu\text{mol/g Hb}$ , respectivamente.

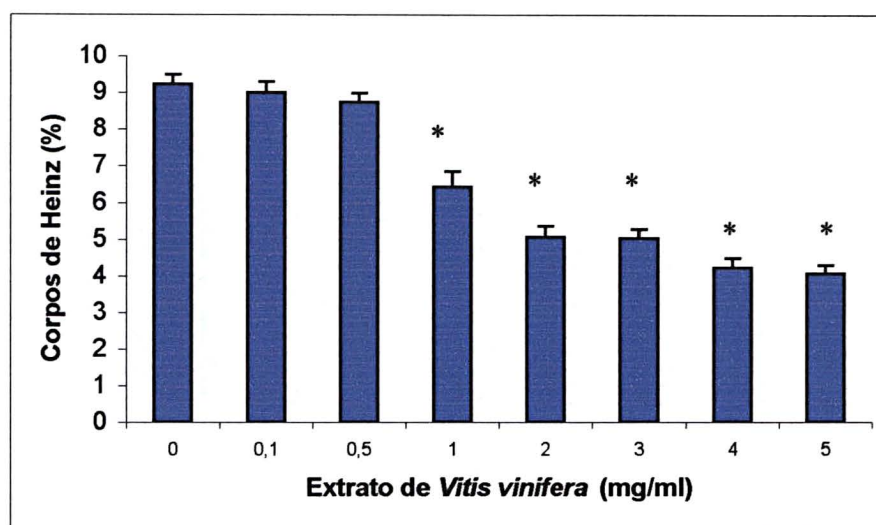
Os resultados expressam média e desvio padrão.

Utilizou-se suspensões de eritrócitos aproximadamente 40 % (v/v) em tampão fosfato 28 mM, NaCl 123 mM, pH 7,4.

\* Diferença estatística em relação ao controle (ausência de extrato e com *terc*-butilhidroperóxido 0,5 mM).



FIGURA 23 - AÇÃO DE EXTRATO DE *Vitis Vinifera* SOBRE A FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ, EM SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS HUMANOS SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE *terc*-BUTILHIDROPERÓXIDO 3 mM.



NOTAS: Os eritrócitos foram pré-incubados com 0 a 5 mg/ml de extrato de *Vitis vinifera* com tempo de pré-incubação de 30 minutos + *terc*-butilhidroperóxido 3 mM durante 15 minutos.

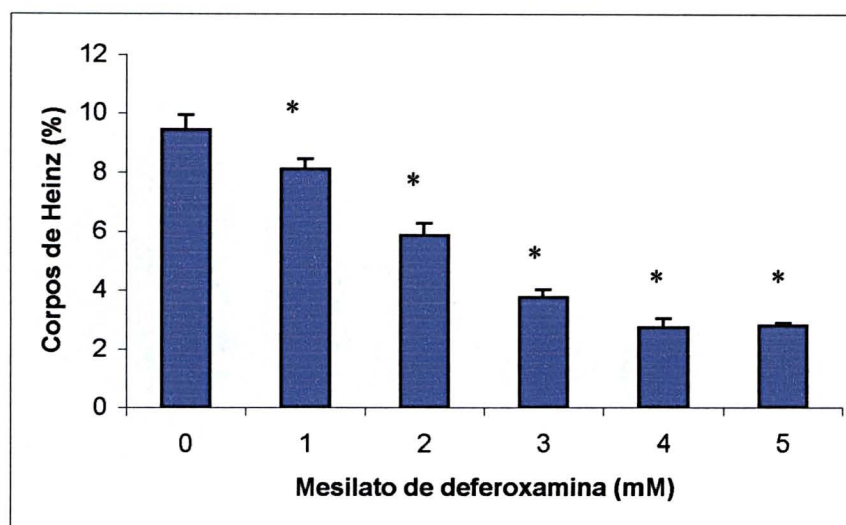
n = 9, sendo 3 amostras com 3 repetições independentes.

Em amostras de eritrócitos não tratados com o oxidante e tratados somente com extrato de *Vitis vinifera* 0,1 a 5 mg/ml não houve formação de corpos de Heinz. Os resultados expressam média e desvio padrão.

Utilizou-se suspensões de eritrócitos aproximadamente 40 % (v/v) em tampão fosfato 28 mM, NaCl 123 mM, pH 7,4.

\* Diferença estatística em relação ao controle.

FIGURA 24 - AÇÃO DE MESILATO DE DEFEROXAMINA SOBRE A FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ, EM SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS HUMANOS SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE *terc*-BUTILHIDROPERÓXIDO 3 mM.



NOTAS: Os eritrócitos foram pré-incubados com 0 a 5 mM de mesilato de deferoxamina com tempo de pré-incubação de 30 minutos + *terc*-butilhidroperóxido 3 mM durante 15 minutos.

n = 9, sendo 3 amostras com 3 repetições independentes.

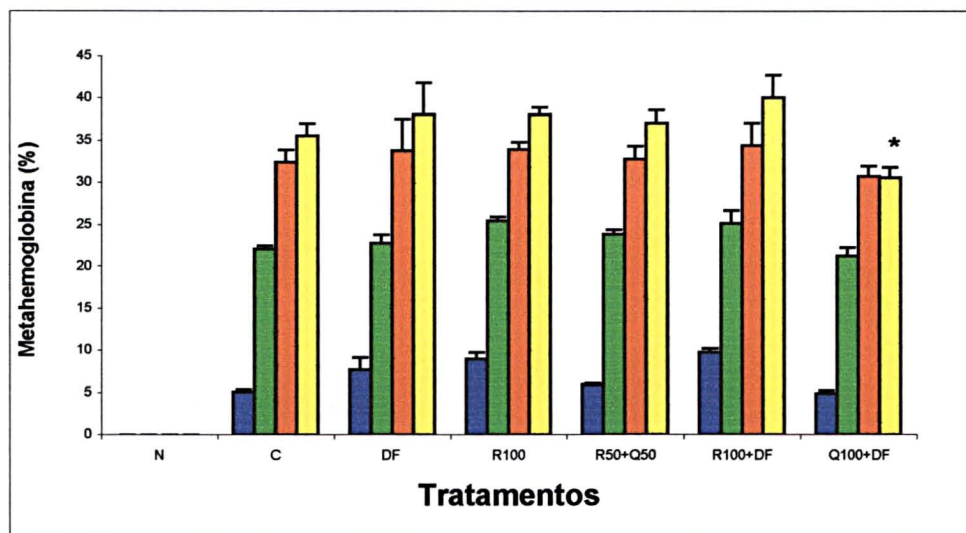
Em amostras de eritrócitos não tratados com o oxidante e tratados somente com mesilato de deferoxamina 1 a 5 mM não houve formação de corpos de Heinz.

Os resultados expressam média e desvio padrão.

Utilizou-se suspensões de eritrócitos aproximadamente 40 % (v/v) em tampão fosfato 28 mM, NaCl 123 mM, pH 7,4.

\* Diferença estatística em relação ao controle (ausência de extrato e presença de *terc*-butilhidroperóxido).

FIGURA 25 - AÇÃO DA QUERCETINA, RUTINA E MESILATO DE DEFEROXAMINA SOBRE A FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA, EM SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS HUMANOS SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE *terc*-BUTILHIDROPERÓXIDO 2 A 5 mM.



N OTAS: Os eritrócitos foram tratados durante 15 min com *terc*-butilhidroperóxido (2 a 5 mM), durante 15 min após a pré incubação com polifenóis.

■ *terc*-butilhidroperóxido 2 mM.      ■ *terc*-butilhidroperóxido 3 mM.  
 ■ *terc*-butilhidroperóxido 4 mM.      ■ *terc*-butilhidroperóxido 5 mM.

Os eritrócitos foram previamente incubados com:

DF = mesilato de deferoxamina 4 mM<sup>#</sup>.

R100 = rutina 100 μM<sup>#</sup>.

R50 + Q50 = rutina 50 μM + quercetina 50 μM<sup>#</sup>.

R100 + DF = rutina 100 μM + mesilato de deferoxamina 4 mM<sup>#</sup>.

Q100 + DF = quercetina 100 μM + mesilato de deferoxamina 4 mM<sup>#</sup>.

<sup>#</sup> Tempo de pré-incubação = 30 minutos.

N = eritrócitos de indivíduos considerados saudáveis, não tratados.

C - controle = eritrócitos tratados apenas com *terc*-butilhidroperóxido nas concentrações indicadas acima.

n = 6, sendo 2 amostras com 3 repetições independentes.

Os resultados expressam média e desvio padrão.

Utilizou-se suspensões de eritrócitos aproximadamente 40 % (v/v) em tampão fosfato 28 mM, NaCl 123 mM, pH 7,4.

\* Diferença estatística em relação ao controle.

## **5 DISCUSSÃO**

## 5 DISCUSSÃO

Preparou-se o extrato hidroalcoólico de *Vitis vinifera* e realizou-se a sua caracterização fitoquímica. Entre os vários processos e solventes empregados para extração de compostos polifenólicos em vegetais, optou-se por utilizar etanol 70 °GL. O etanol é um solvente com grande poder extrator que, quando comparado com outros solventes como, por exemplo, o metanol, mostra-se menos tóxico. Os polifenóis são em geral solúveis em etanol, e o processo extrator, dependendo da temperatura utilizada, pode levar a um maior rendimento. Utilizou-se a temperatura de 60 °C durante a extração, uma vez que o emprego de temperaturas mais elevadas poderia resultar na ocorrência de hidrólise dos compostos a serem extraídos (IKAN, 1991).

As soluções aquosas são mais eficientes na extração de compostos polifenólicos, em relação às não aquosas. Entretanto, naquelas, o fenômeno de hidratação se estabelece rapidamente e de forma completa, convertendo, em extratos vegetais que contenham compostos polifenólicos, a espécie cátion flavilium, responsável pela coloração avermelhada, em sua pseudo-base, carbinol, incolor, o que explica as reações de degradação de cor observadas em soluções aquosas (BROUILLARD, 1982). Muitos autores utilizam a extração de polifenóis, através de soluções aquosas (LABARBE *et al.*, 1999; LAZARUS *et al.*, 1999; SOUQUET *et al.*, 2000; KENNEDY; JONES, 2001; TORRES; BOBET, 2001; YAMAKOSHI *et al.*, 2002).

Na caracterização fitoquímica do extrato hidroalcoólico de *Vitis vinifera*, verificou-se que o mesmo apresentava reação fortemente positiva em diversos testes para polifenóis, confirmando as expectativas em relação à sua composição. Na reação de Shinoda, observou-se o surgimento de coloração vermelho sangue, sugerindo a presença de derivados flavonoídicos reduzidos.

Na pesquisa de antocianidinas, as quais se comportam como indicadores ácido-base, ou seja, em pH ácido apresentam colorações entre vermelho e violeta, enquanto que em pH alcalino, coloração verde a azul, observou-se o aparecimento de coloração azul.

Para a pesquisa de taninos, realizou-se a reação com cloreto férrico 1 % e a reação com acetato de chumbo 10 %, sendo que a formação de precipitado ou desenvolvimento de coloração verde a azul, cinza ou marron, indica a presença de taninos (COSTA, 2001). Nesta reação, observou-se a formação de precipitado e aparecimento de coloração azul esverdeada.

Pode-se observar na Figura 10, representativa de CLAE, o perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico de *Vitis vinifera*, que mostrou o maior pico para o composto com tempo de retenção de 27,03 minutos, sugerindo que o mesmo, na fase móvel empregada, esteja em maior quantidade relativa no extrato. Ao se comparar o extrato de *Vitis vinifera* com uma mistura padrão de antocianidinas conhecidas, previamente identificadas por KUSKOSKI (2000), através de CLAE, observou-se uma sobreposição de um dos picos presentes, tanto no extrato de uva como na mistura padrão. O referido pico corresponde ao composto Malvidina 3-O-glucosídeo, sugerindo que o composto presente em maior quantidade no extrato hidroalcoólico, na fase móvel empregada, seja esta antocianidina.

Verifica-se, conforme espectro UV-Visível (Figura 11) do composto com tempo de retenção 27,03 minutos, a presença de um pico de absorção em 280 nm e outro em 528 nm, sendo que as antocianidinas possuem absorbância intensa entre os comprimentos de onda de 465 a 550 nm (Banda I) e de 270 a 280 nm (Banda II). Os espectros foram, portanto, bastante característicos para a identificação de antocianidinas (JACKMAN; SMITH, 1992), sugerindo, desta forma, a sua presença no extrato estudado.

A confirmação da presença ou ausência de ácidos aromáticos ou de componentes acil na molécula de antocianidina pode ser realizada por medidas espectrais (HARBONE, 1958). A posição do pico de absorção entre 310 e 335 nm indica a natureza e a intensidade do ácido presente. Entretanto, como não se verificou pico de absorção nesta faixa, no espectro UV-visível do extrato de *Vitis vinifera*, pode-se sugerir que as antocianidinas presentes no extrato estão livres de acilação por ácidos aromáticos.

Para a realização deste trabalho, escolheu-se como substâncias polifenólicas puras a serem utilizadas, a quercetina e a rutina, ambas da classe dos flavonóides, mais especificamente da família dos flavonóis. Como se pode observar na Figura 7, a quercetina encontra-se na forma de aglicona, enquanto a rutina está ligada ao açúcar rutinose como um 3-O-glicosídeo (AFANAS'EV *et al.*, 1989; FORMICA; REGELSON, 1995; RICE-EVANS *et al.*, 1996; VAN ACKER *et al.*, 2000; BRAVO, 1998; BURNS *et al.*, 2000). Estes compostos estão amplamente distribuídos nos alimentos, bem como em alguns medicamentos e nutracêuticos, apresentando grande número de efeitos benéficos ao organismo, ressaltando-se a atividade antioxidante. Desta forma, são freqüentemente utilizados como modelos de estudo. Tais compostos atuam benéficamente contra várias condições patológicas em que ocorre a sobrecarga oxidativa, como, por exemplo, estados inflamatórios, infecções e neoplasias (FORMICA; REGELSON, 1995; HARBONE; WILLIAMS, 2000; LEAKE, 2001).

Realizou-se experimentos no intuito de verificar se as moléculas dos flavonóides quercetina e rutina, quando solubilizadas no tampão de trabalho, sofriam alguma forma de modificação estrutural que pudesse comprometer sua possível ação antioxidante.

Observa-se na Figura 12, os espectros ultra violeta para quercetina e rutina, em metanol e tampão fosfato 28 mM, NaCl 123 mM, pH 7,4. Os espectros em metanol, para quercetina e rutina, exibiram dois picos de absorção maiores, na região de 240-400 nm, concordando com MABRY *et al.* (1970). Quando se adicionou os flavonóides em tampão fosfato salino, pH 7,4, ocorreu o desaparecimento do pico na região de 355-360 nm, possivelmente devido ao pH alcalino do tampão. MABRY *et al.* (1970), demonstraram que ocorre desaparecimento do pico de absorção 355-360 nm, no espectro ultravioleta de quercetina em metanol, juntamente com metóxido de sódio, composto este, com características básicas. Sugere-se, desta forma, que o desaparecimento destes picos de absorção ocorreu em virtude da mudança de pH do meio, mas acrescenta-se que, mesmo com tais modificações, os compostos em questão continuam presentes no tampão, tornando, assim, válidos os experimentos a serem realizados.

O emprego de extrato hidroalcoólico de *Vitis vinifera*, que segundo a literatura e as análises realizadas neste trabalho, contém compostos polifenólicos tais como flavonóides, antocianidinas e taninos, se baseou no fato de que produtos a base de uva como, por exemplo, o vinho tinto, apresentam efeitos antioxidantes e, têm sido freqüentes modelos de estudo (FACINO *et al.*, 1999; ROIG *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 1999; BALTENWECK-GUYOT *et al.*, 2000; CARINI *et al.*, 2000; GIOVANNELLI *et al.*, 2000; TEDESCO *et al.*, 2000; 2001; TAPIERO *et al.*, 2002).

A título de comparação, empregou-se ainda o mesilato de deferoxamina, quelante de Fe utilizado na terapêutica para o tratamento de doenças que envolvem o excesso de Fe e a descompartimentalização do mesmo. O DFO é relevante especialmente no tratamento de pacientes talassêmicos, os quais apresentam acúmulo de Fe no organismo, devido à falta de aproveitamento do mesmo para a síntese de hemoglobina, bem como a sucessivas transfusões sanguíneas, às quais tais pacientes são submetidos (HUSSAIN *et al.*, 1976; OLIVIERI *et al.*, 1990; KONTOGUIORGHES, 1993; CIANCIULLI *et al.*, 1994). O envolvimento do íon  $Fe^{++}$  na reação de Fenton gera como produtos, além do íon  $Fe^{+3}$ , diversos radicais livres como, por exemplo, o íon  $OH^-$ , que ocasionam danos aos tecidos. Alguns autores afirmam que, no mecanismo de ação de compostos polifenólicos, está envolvida a quelação do ferro, o que impede o desdobramento da reação de Fenton e, desta forma, a geração de íon  $OH^-$  (DEUTICKE *et al.*, 1987; MORAZZONI; MALANDRINO, 1988; RICE-EVANS *et al.*, 1989; RICE-EVANS *et al.*, 1995; SAJA *et al.*, 1995; STOHS; BAGCHI, 1995; VAN ACKER *et al.*, 1998; KONDO *et al.*, 1999; FERNANDES *et al.*, 2000), semelhantemente ao que ocorre por ação de mesilato de deferoxamina (CIANCIULLI *et al.*, 1994).

Dentre as várias substâncias capazes de causar danos oxidativos em eritrócitos, optou-se por trabalhar com o TBH, um hidroperóxido orgânico com potente ação oxidante e amplamente utilizado como modelo para estudo dos mecanismos de dano oxidativo celular. Em laboratórios de síntese orgânica, hidroperóxidos, como o TBH podem se formar como resultado da adição de oxigênio a radicais alquil (CAPRARI *et al.*, 1995; AHERNE; O'BRIEN, 2000). Muitos dos efeitos oxidantes de TBH sobre



eritrócitos podem ser explicados com base na sua habilidade de reagir com a hemoglobina e outros derivados do heme, lipídeos da membrana e grupamentos tióis de proteínas plasmáticas. As mudanças provocadas nas células, devido ao processo oxidativo induzido por TBH, são de grande interesse como um modelo para mudanças na membrana e proteínas de eritrócitos nas doenças hematológicas (DEUTICKE *et al.*, 1987). Apesar de se ter preparado a solução estoque de TBH em água destilada para evitar a precipitação de alguns dos sais do tampão fosfato, pH 7,4, não se verificou hemólise, nas suspensões de eritrócitos incubadas, uma vez que se empregou volumes desta solução, da ordem de microlitros.

Na Figura 13 e Tabela 1 observa-se que a concentração de GSH diminuiu de acordo com o aumento da concentração de TBH entre 0,5 e 1 mM, com depleção completa entre 1 e 5 mM. Assim, a diminuição de GSH foi de 50 % com 0,5 mM de TBH e de 100 % a partir de 1 mM de TBH, para tempo de incubação de 15 minutos.

Este fato pode ser explicado por ser o TBH um oxidante orgânico que, quando atravessa a membrana eritrocitária, encontra a enzima GSH-peroxidase, na qual se liga para ser metabolizado, simultaneamente com a oxidação da GSH à sua forma de dissulfeto, a GSSG. A GSSG resultante é reduzida a GSH pela GR, com o consumo de NADPH. Quando este sistema de defesa é devastado, o TBH produz radicais livres e, assim, iniciam-se as reações oxidativas em cadeia (CHEN *et al.*, 2000). Além disso, a presença deste hidróperóxido pode provocar uma reação que inibe a enzima G6-PD, e desta forma, contribuir para a redução dos níveis de GSH (VAN DER ZEE *et al.*, 1989). A reação de TBH com heme-proteínas pode resultar na formação dos radicais alcoxil e peroxil, enfatizando-se que a geração destes radicais pode levar à geração de outros radicais através de reações secundárias (VAN DER ZEE *et al.*, 1989).

Os experimentos realizados neste trabalho demonstraram que, após 30 minutos de incubação com TBH, a concentração de GSH mostrou pequena elevação em função do tempo de incubação, de acordo com a Figura 16. Observa-se que a concentração de GSH em suspensões de eritrócitos incubados com TBH 1 mM foi totalmente depletada até os 10 primeiros minutos de incubação e que, a partir de 20 minutos, ocorreu

pequena elevação, em torno de 0,1 e 0,2  $\mu\text{moles/g Hb}$ , para 20 e 30 minutos, respectivamente.

MAWATARI e MEURAKAMI (2001) observaram exaustão da GSH de eritrócitos tratados com TBH em apenas 1 minuto. Também observaram uma lenta recuperação de GSH, após 15 minutos de exposição ao oxidante, a qual se manteve em baixas concentrações durante 60 minutos de incubação.

CHEN *et al.* (2000) demonstraram uma regeneração de GSH, em hepatócitos de ratos, em torno de 10 nmol/mg proteína, a partir de 15 até 30 minutos de incubação, com TBH 0,5 mM. Já com hepatócitos tratados com 2 mM de TBH, os níveis de GSH caíram de aproximadamente 60 nmol/mg, até a depleção total, no decorrer de 30 minutos de incubação.

Ainda de acordo com a Figura 16, observa-se aumento da concentração de GSH, em comparação com o controle com TBH 1 mM, em função do tempo de incubação a partir de 10 minutos até 30 minutos nas amostras pré-incubadas com quercetina 100  $\mu\text{M}$ . Esta regeneração de GSH variou de 5 a 21 %, em relação ao controle normal, para 10 e 30 minutos de incubação, respectivamente.

Na Figura 20, observa-se a concentração de GSH em suspensões de eritrócitos pré-incubados com rutina 100  $\mu\text{M}$  e, em seguida, com TBH 0,5, 1 e 2 mM. Os resultados indicam que a rutina exerceu uma pequena proteção, em relação à depleção de GSH, quando comparada com as amostras incubadas somente com TBH. Obteve-se os valores de GSH, de aproximadamente 0,09, 0,03 e 0  $\mu\text{moles/g Hb}$  para TBH 0,5, 1 e 2 mM, respectivamente; e 0,23, 0,05 e 0,41, para as amostras pré-incubados com rutina 100  $\mu\text{M}$  e, incubadas com TBH 0,5, 1 e 2 mM.

Sugere-se que o efeito protetor da rutina pode ser devido à sua capacidade de quelar o Fe (AFANAS'EV *et al.*, 1989), impedindo assim, o desenvolvimento da reação de Fenton (FIORANI *et al.*, 2002); e de reagir com radicais livres via transferência de elétrons (FERRALI *et al.*, 1997).

Observa-se, na Figura 14, que o TBH promoveu aumento da formação de metahemoglobina, de acordo com o aumento de sua concentração. Para concentrações entre 0,5 e 1 mM de TBH, não se verificou formação de metahemoglobina

significativa. Para concentrações entre 2 e 5 mM, entretanto, observou-se aumento significativo da concentração de metahemoglobina, de 8 a 38%, proporcional ao aumento da concentração de TBH.

TROTTA *et al.* (1981) demonstraram que, em suspensões 1% (v/v) de eritrócitos humanos expostas a 0,1 mM de TBH por 1 hora, houve formação de metahemoglobina de cerca de 50%.

Como se pode observar na Figura 17, o TBH 2 mM exerceu efeito oxidante, mensurado através da formação de metahemoglobina em eritrócitos humanos, proporcional ao tempo de exposição. Observou-se que, entre 5 e 20 minutos de exposição, ocorreu um aumento da concentração de metahemoglobina, de 3 para 15%. Entretanto, entre 20 e 30 minutos de incubação, os valores se mantiveram em cerca de 15%.

LII e HUNG (1997) demonstraram aumento na formação de metahemoglobina, em suspensões de eritrócitos 10% (v/v) em tampão PBS, em função do tempo de incubação entre 0 e 60 minutos com TBH 1,5 mM. Os valores encontrados foram de  $0,15 \pm 0,3$ ,  $36,8 \pm 7,4$  e  $33,6 \pm 6,5$  %, para os tempos de 0, 30 e 60 minutos, respectivamente. Comparativamente, para incubação durante 30 minutos, com TBH 2 mM, neste trabalho, encontrou-se o valor aproximado de 15% para a formação de metahemoglobina, enquanto aqueles autores encontraram  $36,8 \pm 7,4$  %, com TBH 1,5 mM. No entanto, deve-se considerar que, as suspensões de eritrócitos, de aproximadamente 40% (v/v) em tampão fosfato salina, pH 7,4, eram 4 vezes mais concentradas que as usadas por LII e HUNG (1997), necessitam de maiores concentrações de TBH para provocar a formação de maiores concentrações de metahemoglobina.

Observa-se ainda, na Figura 17, que nas suspensões de eritrócitos pré-incubadas com quercetina 100  $\mu$ M, não houve redução da formação de metahemoglobina, em comparação com as amostras incubadas apenas com TBH 2 mM. O mesmo pode ser observado na Figura 25, para amostras pré-incubadas com mesilato de deferoxamina 4 mM, rutina 100  $\mu$ M, associações entre rutina 50  $\mu$ M e quercetina 50  $\mu$ M, rutina 100  $\mu$ M e mesilato de deferoxamina 4 mM, e incubadas com *terc*-butilhidroperóxido

2, 3, 4 e 5 mM. Nas amostras pré-incubadas com a associação entre quercetina 100  $\mu$ M e mesilato de deferoxamina 4 mM, ocorreu uma diminuição da formação de metahemoglobina, em relação às amostras incubadas apenas com TBH 5mM. Este achado poderia ser explicado por uma possível ação sinérgica entre estes compostos, visto que, quando usados de forma isolada, não provocaram efeito inibidor da oxidação por TBH. O mesilato de deferoxamina exerce efeito quelante sobre o ferro, o que poderia impedir a formação de radicais livres pela reação de Fenton. RICE-EVANS *et al.* (1989) demonstraram que o mesilato de deferoxamina diminui a formação de espécies de ferrilmioglobina devido à sua capacidade de doar elétrons e, assim, neutralizar radicais peroxil.

FERNANDES *et al.* (2000), demonstraram que, em suspensões de eritrócitos humanos pré-incubadas com mesilato de deferoxamina 4 mM, houve a pontencialização da citotoxicidade provocada por dicromato de sódio 4 mM, demonstrando um efeito pró-oxidante. Estes autores consideraram que os mecanismos estimulantes ou protetores exercidos pelo mesilato de deferoxamina ainda não estão bem elucidados. HALLIWELL (1985) demonstrou que o mesilato de deferoxamina pode interagir com radicais superóxido, resultando em um aumento da formação de metahemoglobina. Não foram encontrados resultados concordantes com tais autores, neste trabalho, para a concentração de 4 mM de mesilato de deferoxamina, com a qual não se conseguiu sugerir nem efeito pró-oxidante e nem antioxidante.

Observa-se, na Figura 15, a ação de TBH 1 a 5 mM sobre a formação de corpos de Heinz em suspensões de eritrócitos humanos, com um aumento da formação de corpos de Heinz, proporcional à concentração de TBH, com valores médios de 2 a 17 %. Os corpos de Heinz formados apareceram corados em azul violeta, numerosos, possivelmente ligados à membrana do eritrócito, alguns despigmentados e, em sua maioria, pequenos em tamanho. Esta descrição é concordante com a de JANDL (1996) que afirma que, quando a atividade redutora da célula é diminuída, como em deficiência de G6-PD, se a concentração da droga oxidante for excessiva, os corpos de Heinz aparecerão em número elevado e pequenos e o eritrócito, às vezes, despigmentado.

Um grande número de produtos químicos e drogas pode causar precipitação intracelular de produtos da oxidação da hemoglobina na forma de corpos de Heinz, entre elas o CF (FERRALI *et al.*, 1992; CLARO, 2002). Como o TBH é um forte agente oxidante, sugere-se que sua ação sobre a formação de corpos de Heinz ocorra da mesma forma que a de outras drogas oxidantes citadas na literatura. O tamanho e o número de corpos de Heinz formados dependem das reações cíclicas do O<sub>2</sub> e da droga catalítica empregada, bem como da concentração de intermediários redutores na célula e da capacidade do eritrócito em regenerar o NADPH (CLARO, 2002).

A quercetina, nas concentrações de 2 a 20 µM, promoveu redução parcial, porém significativa da porcentagem de formação de corpos de Heinz promovida por *terc*-butilhidroperóxido 3 mM (Figura 18). A porcentagem de formação de corpos de Heinz diminuiu de 8,7 ± 0,1 % para o controle com *terc*-butilhidroperóxido, para 7,5 ± 0,2, 7,6 ± 0,2, 6,3 ± 0,1 e 6,7 ± 0,2 % nas amostras pré-incubadas com quercetina 2, 10, 15 e 20 µM, respectivamente. Este fato poderia ser explicado pela capacidade da quercetina de interagir com a bicamada lipídica da membrana eritrocitária (MOVILEANU *et al.*, 2000) e, assim, promover proteção contra a agregação de corpos de Heinz junto à mesma, além de exercer outros mecanismos de ação, que serão ainda discutidos, contra a sobrecarga oxidativa promovida por drogas oxidantes. Não se pode deixar de comentar que a formação de corpos de Heinz com *terc*-butilhidroperóxido foi de baixa porcentagem, e que o efeito da quercetina não foi tão eficiente na inibição da formação dos mesmos. Talvez se devesse ainda, testar concentrações maiores de quercetina. CLARO (2002) observou que, eritrócitos humanos incubados com CF 0,3 a 5 mM, apresentaram um aumento relevante na formação de corpos de Heinz, proporcional à concentração do oxidante, chegando a quase 100 %. Quando tais amostras foram tratadas com vitamina C 10 a 90 mM, previamente à oxidação por CF 1 mM, houve redução na formação de corpos de Heinz, de cerca de 21,6 % para 8,4 %. Ainda no mesmo trabalho, observou-se que, nas mesmas condições citadas anteriormente, a vitamina E fez com que diminuísse a formação de corpos de Heinz de cerca de 21,6 % para cerca de 7,5 %. As concentrações de vitamina C e E empregadas foram da ordem de 2 a 20 milimoles/l,

enquanto que neste trabalho, tanto a quercetina como rutina, empregadas, utilizaram concentrações da ordem de 100  $\mu\text{M}$ /l, sugerindo, desta forma, uma explicação para a menor ação antioxidante destes compostos.

Observa-se, na Figura 21, que em suspensões de eritrócitos pré-incubadas com rutina 40 a 140  $\mu\text{M}$ , ocorreu inibição parcial da formação de corpos de Heinz por TBH 3 mM. A porcentagem de formação de corpos de Heinz foi de  $7,6 \pm 0,3$ ,  $7,0 \pm 0,3$  e  $5,7 \pm 0,2\%$  para rutina 40, 60 e 80  $\mu\text{M}$  e a partir de 100  $\mu\text{M}$  de rutina, estabilizou-se em valores médios de aproximadamente 5 %, cerca de 45 % mais baixos que os obtidos com *tert*-butilhidroperóxido 3 mM, de  $9,1 \pm 0,4$  %. A ação da rutina poderia ser explicada da mesma forma que a da quercetina. No entanto, parece que a rutina necessita de concentrações maiores para exercer o mesmo efeito que a quercetina, possivelmente devido a rutina não penetrar nos eritrócitos tão eficientemente quanto sua aglicona, não interagindo assim, da mesma forma, com os lipídeos de membrana (FERRALI *et al.*, 1997). A concentração mínima de rutina empregada, não mostrada na Figura 21, foi de 20  $\mu\text{M}$ , e não inibiu a formação de corpos de Heinz ao passo que a mesma concentração de quercetina fez com que a formação dos mesmos diminuísse em cerca de 23 % em relação a TBH 3 mM, sugerindo maior eficiência da quercetina em relação à rutina, em inibir a formação de corpos de Heinz.

Os experimentos de FERRALI *et al.* (1997) demonstraram que a quercetina 100  $\mu\text{M}$  em 1 ml de suspensão de eritrócitos foi capaz de penetrar nos eritrócitos quase totalmente, fato comprovado através de medição de espectro de absorvância (375-380 nm) do sobrenadante da suspensão de eritrócitos, no momento da adição de quercetina e após 1 hora de incubação. Por outro lado, a rutina não foi capaz de penetrar nos eritrócitos da mesma forma que a quercetina, visto que, em experimentos semelhantes ao anterior, a absorvância inicial se manteve após o período de incubação. Isto poderia ser explicado, possivelmente, pela maior hidrofília da molécula de rutina em relação à de quercetina, por ter um resíduo do açúcar rutinose ligado ao grupo hidroxil em C<sub>3</sub> (AFANAS'EV *et al.*, 1989; FIORANI *et al.*, 2002).

Observa-se na Figura 24 que, em suspensões de eritrócitos pré-incubados com mesilato de deferoxamina 1 a 5 mM, ocorreu diminuição parcial da formação de

corpos de Heinz por TBH 3 mM, acrescentando-se que a mesma foi proporcional à concentração de mesilato de deferoxamina. A redução da formação de corpos de Heinz, em relação ao controle com TBH, foi de cerca de 14, 39 e 61 % para mesilato de deferoxamina 1, 2 e 3 mM, respectivamente, estabilizando-se em cerca de 72 e 71 % para mesilato de deferoxamina 4 e 5 mM, respectivamente. RICE-EVANS *et al.* (1989) demonstraram que mesilato de deferoxamina possui a habilidade de penetrar nos eritrócitos e exercer quelatação do ferro e, assim, diminuir a oxidação da hemoglobina em sistemas experimentais com sobrecarga oxidativa induzida pelo ferro. Acrescenta-se que as concentrações de mesilato de deferoxamina empregadas e necessárias para que ocorresse a diminuição da formação de corpos de Heinz, foram da ordem de milimoles/l, enquanto que, comparativamente, às de quercetina e rutina, de micromoles/l, sugerindo-se assim, que as mesmas venham a ter maior efeito para prevenir a formação de corpos de Heinz induzida por TBH 3 mM.

Observa-se na Figura 22 que, em suspensões de eritrócitos pré-incubados com extrato de *Vitis vinifera*, ocorreu recuperação dos níveis de GSH, depletados por TBH 3 mM. Nas amostras incubadas com 0,1 mg/ml do extrato, observou-se recuperação parcial de GSH, que ficou em torno de 50 % em relação ao controle, enquanto que em concentrações a partir de 0,5 mg/ml do extrato, a recuperação dos níveis de GSH foi total. Demonstrou-se que o extrato de *Vitis vinifera* utilizado neste trabalho apresentava em sua composição, flavonóides, taninos e antocianidinas, fato este também comprovado por SILVA *et al.* (1991); SOUQUET *et al.* (1996); SARNI-MANCHADO *et al.* (1999); BALTENWECK-GUYOT *et al.* (2000); SOUQUET *et al.* (2000); TORRES e BOBET (2001), dentre outros.

Os polifenóis presentes no extrato de *Vitis vinifera* podem ser responsáveis pelos efeitos observados na Figura 22, em virtude de possuírem atividade antioxidante, tanto pela quelatação do íon férrico quanto pelo compartilhamento de elétrons, das hidroxilas presentes em suas estruturas, com espécies reativas de oxigênio. Acrescenta-se que as antocianidinas não possuem grupos hidroxil nas posições 3 e 5 nos anéis A e C e insaturação entre C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub>, próximos ao grupo 4-oxo. Assim, por este

critério, poderiam ser menos efetivas em sua atividade antioxidante que quercetina, a qual possui estas características estruturais em sua molécula (BORS *et al.*, 1990).

KONDO *et al.* (1999), demonstraram que o efeito de catequinas, com estruturas relacionadas com flavonóides, contra radicais peroxil foram semelhantes aos de quercetina, em lipossomos. HALDER e BHADURI, (1998) demonstraram que extrato de chá preto, rico em polifenóis, mostrou uma eficiente ação contra várias espécies reativas de O<sub>2</sub>, protegendo completamente, eritrócitos humanos, contra o dano oxidativo devido à peroxidação lipídica, degradação de proteínas do citoesqueleto e desorganização da estrutura da membrana eritrocitária.

O vinho tinto, também rico em polifenóis, mostra grande efeito protetor contra o dano oxidativo (GHISELLI *et al.*, 1998; ROIG *et al.*, 1999; BURNS *et al.*, 2000; CHOPRA *et al.*, 2000; TEDESCO *et al.*, 2000; 2001).

Estudos posteriores devem ser realizados para determinar se seus componentes agem se ligando diretamente a radicais livres, fazendo quelação do ferro ou se eles podem induzir enzimas antioxidantes via receptor fenólico específico ou ainda por outros mecanismos.

A Figura 23 mostra a ação de extrato de *Vitis vinifera* sobre a formação de corpos de Heinz em eritrócitos expostos a TBH 3 mM. Percebe-se uma diminuição significativa da formação dos corpos de Heinz a partir de 1 mg/ml de extrato, proporcional à concentração do mesmo, mas que se estabiliza a partir de 4 mg/ml, sugerindo o efeito antioxidante do extrato de *Vitis vinifera*, como descrito para outros extratos com compostos polifenólicos.

TAKASU *et al.* (2002) demonstraram que a formação de corpos de Heinz, em indivíduos portadores de anemia falciforme, diminuiu de 58,9±20,0 % para 29,8±15,3 %, após a ingestão de 5 ml/dia de extrato de alho envelhecido, ao longo de 4 semanas. Os extratos empregados continham 305 g/l de sólidos extraídos, dentre eles, vários polifenóis.

Realizou-se experimentos também, com um outro agente oxidante, o cloridrato de fenilhidrazina. Os derivados de hidrazina são usados principalmente em indústrias como combustíveis, pesticidas e explosivos. Estes derivados já foram usados no



tratamento de tuberculose e de hipertensão, porém seu uso foi abandonado por se ter constatado que induz hemólise, entre outros efeitos (VALENZUELA *et al.*, 1985). Estes compostos podem causar dano oxidativo devido à formação de radicais reativos como  $O_2^-$  e  $H_2O_2$ , que podem reagir com a molécula de hemoglobina, contribuindo para a formação de metahemoglobina, corpos de Heinz e hemólise (FERRALI *et al.*, 1992).

Na Figura 19 observa-se que, os valores médios de formação de metahemoglobina, quando se utilizou amostras incubadas com quercetina nas concentrações de 20 a 120  $\mu M$ , apresentaram decréscimo em relação ao controle, tratado somente com cloridrato de fenilhidrazina 0,5 mM. Este decréscimo foi de aproximadamente 30 % nas amostras incubadas com quercetina 10 e 20  $\mu M$ , e de 35 % nas amostras com quercetina 40  $\mu M$  ou mais. A estabilização da formação de metahemoglobina para concentrações de quercetina a partir de 40  $\mu M$ , poderia ser explicada pelos experimentos de FERRALI *et al.* (1997). Estes autores demonstraram que a proteção conferida pela quercetina à sobrecarga oxidativa por fenilhidrazina 1 mM, em eritrócitos de rato, pré-incubados com dietilmaleato, um depletor de glutathiona reduzida, pode ser devido à quelação do íon ferro, obedecendo uma relação semi-estequiométrica, a qual impediria a propagação da reação de Fenton.

Para testar a capacidade da quercetina de quelar o ferro, FERRALI *et al.* (1997) adicionaram  $FeSO_4$  5, 10, 25 e 50  $\mu M$  a quercetina 50  $\mu M$  em tampão fosfato pH 7,4, obtendo uma progressiva mudança do pico de absorção máxima de 377 para 420-425 nm, de acordo com o aumento da concentração  $FeSO_4$  até 25  $\mu M$ , sugerindo que se forma um complexo, com proporção molar quercetina:ferro de 2:1. A mesma relação molar foi obtida para o complexo rutina:ferro, em tampão fosfato pH 7,4 (AFANAS'EV *et al.*, 1989).

Nos experimentos de FERRALI *et al.* (1997), a quantidade de ferro liberada da célula, por exposição ao efeito oxidante de fenilhidrazina 1 mM, foi de cerca de 20 nmol/ml, o que sugere que, a partir de 40  $\mu M$  de quercetina, não se teria mais um aumento do efeito quelante de ferro e, desta forma, não se poderia reduzir mais a formação de metahemoglobina. Estes autores obtiveram redução da concentração de

metahemoglobina de cerca de 26 e 36 %, promovida por cloridrato de fenilhidrazina 1 mM, para concentrações de quercetina de 15 e 50  $\mu$ M, respectivamente, em eritrócitos de ratos pré-incubados com dietilmaleato. Tais resultados não foram reproduzidos com eritrócitos humanos.

Neste trabalho, com o emprego de fenilhidrazina 0,5 mM, com concentrações a partir de 40  $\mu$ M de quercetina, obteve-se as maiores reduções da formação de metahemoglobina, podendo-se levantar a hipótese de que a quantidade de ferro liberada das células poderia ser de cerca de 20 nmol/ml, (2:1).

O efeito antioxidante da quercetina parece ser devido à quelação intracelular do ferro, com a formação de um complexo de ferro inerte e incapaz de iniciar a peroxidação lipídica e a oxidação da hemoglobina (AFANAS'EV *et al.*, 1989; DAS; RAY, 1988; FERRALI *et al.*, 1997; VAN ACKER *et al.*, 1998 PANNALA *et al.*, 2001). Esta atividade antioxidante também pode ocorrer por seqüestro de radicais hidroxil e peroxil via transferência de elétrons (TOREL *et al.*, 1986; HUSAIN *et al.*, 1987; CHEN *et al.*, 1996; RICE-EVANS *et al.*, 1996; FERRALI *et al.*, 1997; HEIJNEN *et al.*, 2001).

A habilidade de flavonóides, como quercetina e rutina, em compartilhar elétrons com espécies reativas de oxigênio, depende da posição e do grau de hidroxilação destes compostos, sendo que esta atividade redutora é acentuada de acordo com os seguintes aspectos estruturais: presença de grupos hidroxil nas posições 3 e 5; insaturação entre C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub>, próximos ao grupo 4-oxo e presença de grupos hidroxil nos carbonos 3' e 4' do anel B (MOVILEANU *et al.*, 2000; FIORANI *et al.*, 2002).

Cabe salientar que a possibilidade de a quercetina promover efeito protetor sobre eritrócitos incubados com oxidantes, também se refere ao fato de sua ação antioxidante já ter sido amplamente documentada (FERRALI *et al.*, 1997; LIU *et al.*, 1992; RICE-EVANS *et al.*, 1996; TERAQ *et al.*, 1994).

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o TBH é um agente oxidante que possui a capacidade de lesar os mecanismos de defesa dos eritrócitos contra a oxidação da molécula de hemoglobina. Também sugerem que os flavonóides

quercetina e rutina, assim como o extrato hidroalcoólico de *Vitis vinifera*, podem inibir, em parte, este processo. Acrescenta-se ainda que o CF, outro potente agente oxidante, teve sua ação parcialmente reduzida pela presença de quercetina. O mesilato de deferoxamina, usado neste trabalho, como modelo de quelante de ferro, para comparações com os objetos de estudo, inibiu parcialmente alguns efeitos provocados por TBH, no processo de oxidação da hemoglobina.

Para fins de aprofundamento do tema abordado neste trabalho, seria interessante o estudo de outros parâmetros, para mensurar de forma mais ampla, o resultado da sobrecarga oxidativa em eritrócitos humanos. Dentre várias técnicas utilizadas para tal fim, cita-se a dosagem de MDA, que mede peroxidação lipídica, determinações das atividades de enzimas eritrocitárias responsáveis pelo metabolismo energético e redutor e verificação das proteínas da membrana eritrocitária através da técnica de SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). CLARO, 2002, demonstrou que a vitamina C e a vitamina E possuem relativa ação antioxidante em eritrócitos humanos submetidos à sobrecarga oxidativa. O emprego de compostos polifenólicos, em associações com vitaminas C e E, bem como com outros antioxidantes, poderiam contribuir ainda mais para o estudo dos processos oxidativos bem como, a prevenção desse eventos no eritrócito humano.

Em relação ao extrato de *Vitis vinifera* estudado, cabe salientar a importância de se aprofundar o estudo de sua composição e de seu efeito antioxidante, tanto *in natura*, quanto de seus componentes isolados.

## **6 CONCLUSÕES**

## 6 CONCLUSÕES

No estudo da ação de quercetina, de rutina, e de extrato hidroalcoólico de *Vitis vinifera*, em eritrócitos humanos submetidos à sobrecarga oxidativa com *tert*-butilhidroperóxido ou cloridrato de fenil-hidrazina, observou-se que:

- a) A concentração de GSH diminuiu proporcionalmente ao aumento da concentração de TBH entre 0,5 e 1,0 mM, com valores médios de 4 a 0,1  $\mu\text{moles/ g Hb}$ , mantendo-se totalmente depletada para concentrações maiores;
- b) A formação de metahemoglobina aumentou proporcionalmente ao aumento da concentração de TBH entre 2 e 5 mM, com valores médios de 8 a 35 %;
- c) A formação de corpos de Heinz aumentou com o aumento da concentração de TBH entre 1 e 5 mM, com valores médios de 2 a 16 %;
- d) A quercetina 100  $\mu\text{M}$ , após 10 e 30 minutos de incubação, preveniu parcialmente, a depleção de GSH, por TBH 1 mM, com valores médios de 0,25 a 1,3  $\mu\text{moles/ g Hb}$ ;
- e) A quercetina 100  $\mu\text{M}$ , não preveniu a formação de metahemoglobina, promovida por TBH 2 mM;
- f) A quercetina 2 a 20  $\mu\text{M}$ , preveniu parcialmente a formação de corpos de Heinz, promovida por TBH 3 mM, com valores médios de 7,5 a 6,7 %;
- g) A quercetina 10 a 120  $\mu\text{M}$ , preveniu parcialmente a formação de metahemoglobina, promovida por CF 0,5 mM, com valores médios de 4 a 3,6 %;
- h) A rutina 100  $\mu\text{M}$ , preveniu parcialmente a depleção de GSH, promovida por TBH 2 mM, com o valor médio de 0,4  $\mu\text{moles/ g Hb}$  em relação a zero, quando se empregou apenas o oxidante;
- i) A rutina 40 a 140  $\mu\text{M}$ , preveniu parcialmente a formação de corpos de Heinz, promovida por TBH 3 mM, com valores médios de 7,6 a 4,9 %;
- j) O extrato hidroalcoólico de *Vitis vinifera*, na concentração de 0,1 mg/ml, preveniu parcialmente, a depleção de GSH, por TBH 0,5 mM, obtendo-se valores médios de  $4,4 \pm 0,1 \mu\text{moles/ g Hb}$ . Quando em concentrações de 0,5 e 1,0 mg/ml, preveniu

totalmente a depleção de GSH pelo mesmo oxidante, com valores médios de  $7,4 \pm 0,4$  e  $7,3 \pm 0,1$   $\mu\text{moles/ g Hb}$ , respectivamente;

- k) O extrato hidroalcoólico de *Vitis vinifera*, nas concentrações entre 1 e 5,0 mg/ml, preveniu parcialmente a formação de corpos de Heinz, promovida por TBH 3 mM, com valores médios de 6,4 a 4,0 %, respectivamente;
- l) A associação entre quercetina 100  $\mu\text{M}$  e mesilato de deferoxamina 4 mM, inibiu parcialmente a formação de metahemoglobina, em eritrócitos incubados com TBH 5 mM, com valores médios de  $30 \pm 1,2$  %;

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que, nas concentrações testadas, a quercetina é parcialmente eficaz contra a sobrecarga oxidativa promovida por cloridrato de fenilhidrazina. Igualmente sugerem que a sobrecarga oxidativa promovida pelo TBH é parcialmente prevenida por quercetina e rutina. Foi relevante ainda, a capacidade observada para o extrato hidroalcoólico de *Vitis vinifera*, de prevenir quase que totalmente a depleção de GSH em eritrócitos incubados com TBH.

## **7 REFERÊNCIAS**

## 7 REFERÊNCIAS

AFANAS'EV, I. B.; DOROZHKO, A. I.; BRODSKII, A. V.; KOSTYUK, V. A.; POTAPOVITCH, A. I. Chelating and free radical scavenging mechanism of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 38(11), p. 1763-1769, 1989.

AGEWALL, S.; WRIGHT, S.; DOUGHTY, R. N.; WHALLEY, G. A.; DUXBURY, M.; SHARPE, N. Does a glass of red wine improve endothelial function? **European Heart Journal**, London, v. 21(1), p. 74-78, 2000.

AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Mechanism of protection by the flavonoids, quercetin and rutin, against *tert*-butylhydroperoxide- and menadione- induced DNA single strand breaks in caco-2 cells. **Free Radical Biology & Medicine**. Oxford, v. 29(6), p. 507-514, 2000.

ANDERSON, D.; PHILLIPS, B. J. Comparative *in vitro* and *in vivo* effects of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, Elmsford, v. 37, p. 1015-1025, 1999.

ANGHILERI, L. J.; THOUVENOT, P. Natural polyphenols-iron interaction: its biological importance. **Biological Trace Element Research**, Clifton, v. 73(3), p. 251-258, 2000.

BALTENWECK-GUYOT, R.; TRENDEL, J. M.; ALBRECHT, P.; SCHAEFFER, A. Glycosides and phenylpropanoid glycerol in *Vitis vinifera* Cv. Gewurztraminer wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, p. 6178-6182, 2000.

BARBOUTI, A.; DOULIAS, P. T.; ZHU, B. Z.; FREI, B.; GALARIS, D. Intracellular iron, but not copper, plays a critical role in hydrogen peroxide-induced DNA damage. **Free Radical Biology & Medicine**, Oxford, v. 31(4), p. 490-498, 2001.

BENNETT, V.; STENBUCK, P. J. Association between ankyrin and the cytoplasmic domain of band 3 isolated from the human erythrocyte membrane. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 255, p. 6424-6432, 1980.



BEPPU, M.; TAKANASHI, M.; MURAKAMI, K.; KATO, T.; KIKUGAWA, K.. Modification of glycophorin A during oxidation of erythrocyte membrane. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1023, p. 413-420, 1990.

BEUTLER, E. **Red Cell Metabolism: a manual of biochemical methods**. 3. ed. Orlando: Grune & Stratton, 1984, 131p.

BEUTLER, E.; DERN, R. J.; ALVING, A. S. The hemolytic effect of primaquine. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Sant Louis, v. 45, p. 40-45, 1955.

BEUTLER, E.; DUROM, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Sant Louis, v. 61, p. 882-890, 1963.

BEZWODA, W. K.; TORRANCE, J. D.; BOTHWELL, T. H.; MACPHAIL, A. P.; GRAHAM, B.; MILLS, W. Iron absorption from red and white wines. **Scandinavian Journal of Haematology**, Copenhagen, v. 34(2), p. 121-127, 1985.

BLOCK, G. The data support a role for antioxidants in reducing cancer risk. **Nutrition Reviews**, New York, v. 50(7), p. 207-213, 1992.

BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. **Methods in Enzymology**, New York, v. 186, p. 343-355, 1990.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, New York, v. 56(11), p. 317-333, 1998.

BROUILLARD, R. Chemical structure of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. **Anthocyanins as Food Colors**. London: Academic Press, 1982. p. 1-40.

BURNS, J.; GARDNER, P. T.; O'NEIL, J.; CRAWFORD, S.; MORECROFT, I.; McPHAIL, D. B.; LISTER, C.; MATTHEWS, D.; MACLEAN, M. R.; LEAN, M. E. J.; DUTHIE, G. G.; CROZIER, A. Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48(2), p. 220-230, 2000.

CAPRARI, P.; BOZZI, A.; MALORNI, W.; BOTTINI, A.; IOSI, F.; SANTINI, M. T.; SALVATI, A. M. Junctional sites of erythrocyte skeletal proteins are specific targets of *tert*-butylhydroperoxide oxidative damage. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 94, p. 243-258, 1995.

CARINI, M.; ALDINI, G.; BOMBARDELLI, E.; MORAZZONI, P.; FACINO, M. R. UVB-induced hemolysis of rat erythrocytes: Protective effect of procyanidins from grape seeds. **Life Sciences**, Elmsford, v. 67, p. 1799-1814, 2000.

CATANIA, A.; CAIMI, G. Membrana eritrocitaria: interrelazioni fra lipid, protidi, e proprietà dinamiche. **Minerva Medica**, Torino, v. 83, p. 187-192, 1992.

CERIELLO, A.; BORTOLOTTI, N.; MOTZ, E.; LIZZIO, S.; CATONE, B.; ASSALONI, R.; TONUTTI, M.; TABOGA, C. Red wine protects diabetic patients from meal-induced oxidative stress and thrombosis activation: a pleasant approach to the prevention of cardiovascular disease in diabetes. **European Journal of Clinical Investigation**, Oxford, v. 31(4), p. 322-328, 2001.

CHAN, A.; CHOW, C.; CHIU, D. Interaction of antioxidants and their implication in genetic anemia. **Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 222, p. 274-282, 1999.

CHAPMAN, R. G.; SCHAUMBURG, L. Glycolysis and glycolitic enzyme activity of ageing red cells in man. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 13, p. 665-678, 1967.

CHATTOPADHYAY, A.; CHODHURY, T. D.; BANDYOPADHYAY, D.; DATTA, A. G. Protective effect of erythropoietin on the oxidative damage of erythrocyte membrane by hydroxyl radical. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 59, p. 419-425, 2000.

CHEESEMAN, K. H.; SLATER, T. F. **Radicais livres em medicina**. Rio de Janeiro: Ed. Interlivros, 1996. p. 4-5.

CHEN, H. W.; CHIANG, M. T.; WANG, C. Y.; LIU, C. K. Inhibition of *tert*-butyl hydroperoxide-induced by  $\alpha$ -tocopherol and glutathione. **Food and Chemical Toxicology**, Elmsford, v. 38, p. 1089-1096, 2000.

CHEN, Z. Y.; CHAN, P. T.; HO, K. Y.; FUNG, K. P.; WANG, J. Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. **Chemistry and Physics of Lipids**, Limerick, v. 79(2), p. 157-163, 1996.

CHOPRA, M.; FITZSIMONS, P. E. E.; STRAIN, J. J.; TRURNHAM, D. I.; HOWARD, A. N. Nonalcoholic red wine extract and quercetin inhibit LDL oxidation without affecting plasma antioxidant vitamin and carotenoid concentrations. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 46(8), p. 1162-1170, 2000.

CIANCIULLI, P.; SOLLECITO, D.; SORRENTINO, F.; FORTE, L.; GILARDI, E.; MASSA, A.; CARTA, S. Early detection of nephrotoxic effects in thalassemic patients receiving desferrioxamine therapy. **Kidney International**, New York, v. 46(2), p. 467-470, 1994.

CICCOLI, L.; SIGNORINI, C.; ALESSANDRINI, C.; FERRALI, M.; COMPORTI, M. Iron release, lipid peroxidation, and morphological alterations of erythrocytes exposed to acrolein and phenylhydrazine. **Experimental and Molecular Pathology**, San Diego, v. 60, p. 108-118, 1994.

CICCOLI, L.; SIGNORINI, C.; SCARANO, C.; ROSSI, V.; BAMBAGIONI, S.; FERRALI, M.; COMPORTI, M. Iron release in erythrocytes from patients with beta-thalassemia. **Free Radical Research**, London, v. 30(5), p. 407-413, 1999.

CLARO, L. M. *Ação in vitro das vitaminas C e E em eritrócitos humanos submetidos à sobrecarga oxidativa induzida pelo cloridrato de fenil-hidrazina*. Curitiba, 2002. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná.

COLEMAN, M. D. Use of *in vitro* methaemoglobin generation to study antioxidant status in the diabetic erythrocytes. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 60, p. 1409-1416, 2000.

COMBS, G. F.; NOGUCHI, T.; SCOTT, M. L.. Mechanism action of selenium and vitamin E in protection of biological membranes. **Federation Proceedings**, Bethesda, v. 34(11), p. 2090-2095, 1975.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3. ed., Rio de Janeiro: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. 992 p.

DACIE, J.; LEWIS, S. M. **Practical Haematology**. 8. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995, 453p.

DAS, M.; RAY, P. K. Lipid antioxidant properties of quercetin in vitro. **Biochemistry International**, Marrickville, v.17(2), p.203-209, 1988.

DAS, D. K.; ESSMAN, W. B. **Oxygen radicals: systemic events and disease processes**. Basel: Karges Publ., 1990, 196 p.

DEUTICKE, B.; HELLER, K. B.; HAEST, C. W. M. Leak formation in human erythrocytes by the radical-forming oxidant *t*-butylhydroperoxide. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 854, p. 169-183, 1986.

DEUTICKE, B.; HELLER, K. B.; HAEST, C. W. M. Progressive oxidative membrane damage in erythrocytes after pulse treatment with *t*-butylhydroperoxide. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 899, p. 113-124, 1987.

DODGE, J. T.; MITCHELL, C.; HANAHAN, D. J. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin free ghosts of human erythrocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York : v. 100, p. 119-130, 1963.

ELATTAR, T. M.; VIRJI, A. S. The inhibitory effect of curcumin, genistein, quercetin and cisplatin on the growth of oral cancer cells in vitro. **Anticancer Research**, v. 20(3A), p. 1733-1738, 2000.

EVELYN, K. A.; MALLOY, H. T.. Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin and sulfhemoglobin in single sample of blood. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v 126, p. 655-662, 1938.

FACINO, R. M.; CARINI, M.; ALDINI, G.; BERTI, F.; ROSSONI, G.; BOMBARDELLI, E.; MORAZZONI, P. Diet enriched with procyanidins enhances antioxidant activity and reduces myocardial post-ischaemic damage in rats. **Life Sciences**, Elmsford, v. 64(8), p. 627-642, 1999.

FANG, T. Y.; ZOU, M.; SIMPLACEANU, V.; HO, N. T.; HO, C. Assessment of roles of surface histidyl residues in the molecular basis of the Bohr effect and of beta 143 histidine in the binding of 2,3-bisphosphoglycerate in human normal adult hemoglobin. **Biochemistry**, Washington, v. 38(40), p. 13423-13432, 1999.

FERNANDES, M. A. S.; GERALDES, C. F. G. C.; OLIVEIRA, C. R.; ALPOIM, M. C. Chromate-induced human erythrocytes haemoglobin oxidation and peroxidation: influence of vitamin E, vitamin C, salicylate, deferoxamine, and N-ethylmaleimide. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 114, p. 237-243, 2000.

FERRALI, M.; CICCOLI, L.; SIGNORINI, C.; COMPORTI, M. Iron release and erythrocyte damage in allyl alcohol intoxication in mice. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 40(7), p. 1485-1490, 1990.

FERRALI, M.; SIGNORINI, C.; CICCOLI, L.; COMPORTI, M. Iron release and membrane damage in erythrocytes exposed to oxidizing agents, phenylhydrazine, divicine, and isouramil. **The Biochemical Journal**, London, v.285, p. 295-301, 1992.

FERRALI, M.; SIGNORINI, C.; CACIOTTI, B.; SUGHERINI, L.; CICCOLI, L.; GIACHETTI, D.; COMPORTI, M. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 416, p. 123-129, 1997.

FIORANI, M.; DE SANCTIS, R.; DE BELLIS, R.; DACHA, M. Intracellular flavonoids as electron donors for extracellular ferricyanide reduction in human erythrocytes. **Free Radical Biology & Medicine**, Oxford, v. 32(1), p. 64-72, 2002.

FORMICA, J. V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food and Chemical Toxicology/British Industrial Biological Research Association**, Elmsford, v. 33, p. 1061-1080, 1995.

FRANCK, P. F.; BEVERS, E. M.; LUBIN, B. H.; COMFURIUS, P.; CHIU, D. T.; OP DEN KAMP, J. A.; ZWAAL, R. F.; VAN DEENEN, L. L.; ROELOFSEN, B. Uncoupling of the membrane skeleton from the lipid bilayer. The cause of accelerated phospholipid flip-flop leading to an enhanced procoagulant activity of sickled cells. **The Journal Of Clinical Investigation**, New York, v. 75(1), p. 183-190, 1985.

FUCHS, O. Effects of intracellular chelatable iron and oxidative stress on transcription of classical cellular glutathione peroxidase gene in murine erythroleukemia cells. *Neoplasma*, Bratislava, v. 44(3), p. 184-191, 1997.

GHISELLI, A.; NARDINI, M.; BALDI, A.; SCACCINI, C. Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, v. 46, p. 361-367, 1998.

GIOVANNELLI, L.; TESTA, G.; DE FILIPPO, C.; CHEYNIER, V.; CLIFFORD, M. N.; DOLARA, P. Effect of complex polyphenols and tannins from red wine on DNA oxidative damage of rat colon mucosa in vivo. *European Journal of Clinical Nutrition*, London, v. 39(5), p. 207-212, 2000.

GRIMES, A T. *Human red cell metabolism*. Oxford: Blackwell, 1980, 384p.

HALDER, J.; BHADURI, A. N. Protective role of black tea against oxidative damage of human red blood cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, Orlando, v. 244(3), p. 903-907, 1998.

HALLIWELL, B. Use of desferrioxamine as a 'probe' for iron-dependent formation of hydroxyl radicals. Evidence for a direct reaction between desferal and the superoxide radical. *Biochemical Pharmacology*, New York, v. 34(2), p. 229-233, 1985.

HALPERN, M. J.; DAHLGREN, A. L.; LAAKSO, I.; SEPPANEN-LAAKSO, T.; DAHLGREN, J.; MCANULTY. Red-wine polyphenols and inhibition of platelet aggregation: possible mechanisms, and potential use in health promotion and disease prevention. *Journal Of International Medical Research*, Liverpool, v. 26(4), p. 171-180, 1998.

HANDIN, R. I.; LUX, S. E.; STOSSEL, T. P. *Blood: Principles and practice of hematology*. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, p. 76-174, 1995.

HARBORNE, J. B. Spectral methods of characterizing anthocyanins. *The Journal of Biochemistry*, Tokyo, v. 70, p. 22-28, 1958.

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

HARRIS, J. R. **Blood cell biochemistry**. London: Plenum Press, 1991. v. 3: Erythroid Cells, cap. 7.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 32(7), p. 1141-1148, 1983.

HEIJNEN, C. G. M.; HAENEN, G. R. M. M.; VAN ACKER, F. A. A.; VAN DER VIJGH, W. J. F.; BAST, A. Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 15, p. 3-6, 2001.

HEINZ, R. Morphologische veränderungen der rother blutkörperchen durch gifte. **Virchows Archiv**, Secaucus, v. 122, p. 112-115, 1890.

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. **The Lancet**, London, v. 342(8878), p. 1007-1011, 1993.

HOGSTRAND, C.; VERBOST, P. M.; BONGA, S. E. W. Inhibition of human erythrocyte  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase by  $\text{Zn}^{2+}$ . **Toxicology**, Limerick, v. 133(2-3), p. 139-145, 1999.

HUSAIN, S. R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**, New York, v. 26(9), p. 2489-2491, 1987.

HUSSAIN, M. A.; GREEN, N.; FLYNN, D. M.; HUSSEIN, S.; HOFFBRAND, A. V. Subcutaneous infusion and intramuscular injection of desferrioxamine in patients with transfusional iron overload. **The Lancet**, London, v. 2(7998), p. 1278-1280, 1976.

IKAN, R. **Natural Products. A Laboratory guide**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1991. p. 1-23.

IMLAY, J. A.; CHIN, S. M.; LINN, S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction *in vivo* and *in vitro*. **Science**, Washington, v. 240, p. 640-642, 1988.

JACKMAN, R. L.; SMITH, J. L. Anthocyanins and betalains. In: HENDRY, G. A. F.; HOUGHTON, J. D. **Natural Food Colorants**. London: Blackie Academic. 1992. p. 183-241.

JAIN, S. K.; HOCHSTEIN, P. Generation of superoxide radicals by hidrazine. Its role in phenylhydrazine-induced hemolytic anemia. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 586, p. 128-136, 1979.

JAIN, S. K.; HOCHSTEIN, P. Polymerization of membrane components in ageing red blood cells. **Biochemical and Biophysics Research Communication**, New York, v. 92, p. 247-254, 1980

JANDL, J. H. **Blood: textbook of hematology**. 2. ed. Boston: Brown and Company, p. 505-506, 1996.

KENNEDY, J. A.; JONES, G. P. Analysis of proanthocyanidins cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, p. 1740-1746, 2001.

KLIMAN, H. J.; STECK, T. L. Association of gliceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with the human red cell membrane. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 255, p. 6314-6321, 1980.

KNIGHT, J. A.; VOORHESS, A. P.; MARTIN, L.; ANSTALL, H. Lipid peroxidation in stored red cells. **Transfusion**, Philadelphia, v. 32, p. 354-357, 1992.

KONDO, K.; KURIHARA, M.; MIYATA, N.; SUZUKI, T.; TOYODA, M. Mechanistic studies of catechins as antioxidants against radical oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 362(1), p. 79-86, 1999.



KONTOGHIORGHES, G. J. Present status and future prospects of oral iron chelation therapy of thalassemia and other diseases. **Indian Journal of Pediatrics**, New Delhi, v. 60(4), p. 485-507, 1993.

KUSKOSKI, E. M. **Extração e identificação de pigmentos dos frutos de baguaçu (*Eugenia umbelliflora*, Berg)**. Florianópolis, 2000. 113 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina.

LABARBE, B.; CHEYNIER, V.; BROSSAUD, F.; SOUQUET, J. M.; MOUTOUNET, M. Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, p. 2719-2723, 1999.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227(259), p.680-685, 1970.

LAZARUS, S. A.; ADAMSON, G. E.; HAMMERSTONE, J. F.; SCHMITZ, H. H. High-performance liquid chromatography/mass spectrometry analysis of proanthocyanidins in foods and beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, p. 3693-3701, 1999.

LEAKE, D. S. Flavonoids and the oxidation of low-density lipoprotein. **Nutrition**, New York, v. 17(1), p. 63-65, 2001.

LEE, R.; FOERSTER, J.; LUKENS, J.; PARASKEVAS, F.; GREER, J.; RODGERS, G. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 10. ed., Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1999, p. 196-217.

LEONART, M. S. S. **Estudos sobre a preservação de eritrócitos**. São Paulo, 1994. 131p. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo].

LII, C. K.; HUNG, C. N. Protein thiol modifications of human red blood cells treated with *t*-butyl hydroperoxide. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1336(2), p. 147-156, 1997.

LIU, G. T.; ZHANG, T. M.; WANG, B. E.; WANG, Y. W. Protective action of seven natural phenolic compounds against peroxidative damage to biomembranes. **Biochemical Pharmacology**, New York, v.43(2), p. 147-152, 1992.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The Systematic identification of Flavonoids**. 1. ed., New York: Heidelberg, 1970, 354p.

MAWATARI, S.; MEURAKAMI, K. Effects of ascorbate on membrane phospholipids and tocopherols of intact erythrocytes during peroxidation by t-butylhydroperoxide: comparison with effects of dithiothreitol. **Lipids**, Champaign, v. 36(1), p. 57-65, 2001.

MOHANDAS, N.; CHASIS, J. A.; SHOHET, S. B. The influence of membrane skeleton on red cell deformability, membrane material properties and shape. **Seminars in Hematology**, Orlando, v. 20, p. 225-242, 1983.

MORAZZONI, P.; MALANDRINO, S. Anthocyanins and their aglycons as scavengers of free radicals and antilipoperoxidant agents. **Pharmacological Research Communications**, London, v. 20(2), p. 254, 1988.

MOVILEANU, L.; NEOGOE, I.; FLONTA, M. L. Interaction of the antioxidant flavonoid quercetin with planar lipid bilayers. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 205, p. 135-146, 2000.

NAOUM, P. C. **Hemoglobinopatias e Talassemias**. São Paulo: Sarvier, 1997, 171p.

NAOUM, P. C. Radicais livres em eritrócitos falcêmicos e talassêmicos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Santos, v. 18(173), p. 75-81, 1996.

OLIVIERI, N. F.; KOREN, G.; HERMANN, C.; BENTUR, Y.; CHUNG, D.; KLEIN, J.; FREEDMAN, M. H.; McCLELLAND, R. A.; TEMPLETON, D. M. Comparison of oral chelator L1 and desferrioxamine in iron loaded patients. **The Lancet**, London, v. 336, p. 1275-1279, 1990.

OSKI, F. A.; PAPADOULOS, D. M. The red cell, 2,3-diphosphoglycerate, and tissue oxygen release. **Journal of Pediatrics**, St. Louis : v. 77, p. 941-956, 1970.

PANNALA, A. S.; CHAN, T. S.; O'BRIEN, P. J.; RICE-EVANS, C. A. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 282, p. 1161-1168, 2001.

PEISACH, J.; BLUMBERG, W. E.; RACHMILEWITZ, E. A. Demonstration of ferrihemochrome intermediates in Heinz bodies formation following the reduction of oxyhemoglobin A by acetylphenylhydrazine. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 393, p. 404-418, 1975.

PUNCHARD, N. A.; KELLY, F. J. **Free radicals: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1996, 310 p.

RACHMILEWITZ, E. A.; PEISACH, J.; BLUMBERG, W. E. Studies on the stability of oxyhaemoglobin A and its constituent chains and their derivatives. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 246, p. 3356-3366, 1971.

RAKBA, N.; AOUAD, F.; HENRY, C.; CARIS, C.; MOREL, I.; BARET, P.; PIERRE, J. L.; BRISSOT, P.; WARD, R. J.; LESCOAT, G.; CRICHTON, R. R. Iron mobilisation and cellular protection by a new synthetic chelator O-Trensox. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 55, p. 1797-1806, 1998.

RICE-EVANS, C. A. Iron-mediated oxidative stress in erythrocytes. In: HARRIS; J. R. **Blood cell biochemistry**. New York: Plenum Press, 1991.

RICE-EVANS, C. A.; BAYSAL, E. Iron-mediated oxidative stress in erythrocytes. **Biochemical Journal**, London, v. 244, p. 191-196, 1987.

RICE-EVANS, C. A.; BAYSAL, E.; SINGH, S.; JONES, S. A.; JONES, J. G. The interactions of desferrioxamine and hidroxypyridone compounds with haemoglobin and erythrocytes. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 256 (1-2), p. 17-20, 1989.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; BOLWELL, P. G.; BRAMLEY, P. M.; PRIDHAM, J. B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Research**, London, v. 22(4), p. 375-383, 1995.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, Oxford, v. 20(7), p. 933-956, 1996.

ROIG, R.; CASCÓN, E.; AROLA, L.; BLADÉ, C.; SALVADÓ, J. Moderate red wine consumption protects the rat against oxidation in vivo. **Life Sciences**, Elmsford, v. 64(17), p. 1517-1524, 1999.

ROTHSTEIN, A.; CABANTCHIK, Z. I.; KNAUF, P. Mechanism of anion transport in red blood cells: role of membrane proteins. **Federation Proceedings**, Bethesda, v. 35, p. 3-10, 1976.

ROYCHOWDHURY, S.; WOLF, G.; KEILHOFF, G.; BAGCHI, D.; HORN, T. Protection of primary glial cells by grape seed proanthocyanidin extract against nitrosative/oxidative stress. **Nitric oxide**, Orlando, v. 5(2), p. 137-149, 2001.

RYAN, T. P.; AUST, S. D. The role of iron in oxygen-mediated toxicities. **Critical Reviews In Toxicology**, Boca Raton, v. 22(2), p. 119-141, 1992.

SAIJA, A.; SCALESE, M.; LANZA, M.; MARZULLO, D.; BONINA, F.; CASTELLI, F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. **Free Radical Biology & Medicine**, Oxford, v. 19(4), p. 481-486, 1995.

SALTMAN, P. Oxidative stress: a radical view. **Seminars in Hematology**, Orlando, v. 26(4), p. 249-256, 1989

SARNI-MANCHADO, P.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. Interactions of grape seed tannins with salivary proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, p. 42-47, 1999.

SCOTT, M. D.; LUBIN, B. H.; ZUO, L.; KUYPERS, F. A. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, St Louis, v. 118(1), p. 7-16, 1991.

SEAMAN, C.; WYSS, S.; PIOMELLIS, S. The decline in energetic metabolism with aging in the erythrocyte and its relationship to cell death. **American Journal of Hematology**, New York, v. 8(1), p. 31-42, 1980.

SHINAR, E.; RACHMILEWITZ, E. A. Oxidative denaturation of red blood cells in thalassemia. **Seminars in Hematology**, Orlando, v. 27(1), p. 70-82, 1990.

SHVIRO, Y.; SHAKLAI, N. Glutathione as a scavenger of free hemin. A mechanism of preventing red cell membrane damage. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 36(22), p. 3801-3807, 1987.

SIGNORINI, C.; FERRALI, M.; CICCOLI, L.; SUGHERINI, L.; MAGNANI, A.; COMPORTI, M. Iron release, membrane protein oxidation and erythrocytes ageing. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 362, p. 165-170, 1995.

SILVA, J. M. R.; RIGAUD, J.; CHEYNIER, V.; CHEMINAT, A.; MOUTOUNET, M. Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. **Phytochemistry**, New York, v. 30(4), p. 1259-1264, 1991.

SILVA, P. H.; ZARONI, M.; COMAR, S. R.; ALVES, H. B. Estabelecimento dos valores normais do RDW para a população de Curitiba. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 32(3), p. 233-235, 2000.

SILVEIRA, P. A. A. **Contribuição ao estudo das anemias por defeito protéico da membrana eritrocitária com o uso da eletroforese em gel de poliacrilamida**. São Paulo, 1992. 94 p. Tese (Doutorado em Hematologia) Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 5. ed., Rio de Janeiro: Ed. Guanabara S. A., 1994. 387 p.

SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membrane. *Science*, Washington, v. 175, p. 720-731, 1972.

SMITH, L. H.; THIER, S. O. **Fisiopatologia. Os princípios biológicos da doença.** 2. ed., São Paulo: Panamericana, 1990, 1260 p.

SOUQUET, J. M.; CHEYNIER, V.; BROSSAUD, F.; MOUTOUNET, M. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry*, New York, v. 43(2), p. 509-512, 1996.

SOUQUET, J. M.; LABARBE, B.; LE GUERNEVÉ, C.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. Phenolic composition of grape stems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, v. 48, p. 1076-1080, 2000.

SOUZA NETO, J. A.; COSENZA, R. M. Efeitos do vinho no sistema cardiovascular. *Revista Médica de Minas Gerais*, Belo Horizonte, v.4(3), p.27-32, 1994.

STOHS, S. J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology & Medicine*, Oxford, v. 18(2), p. 321-336, 1995.

STRYER, L. **Biochemistry.** 4. ed., New York: W. H. Freeman and Company, 1995. p. 131-135.

TAKASU, J.; UYKIMPANG, R.; SUNGA, M. A.; AMAGASE, H.; NIIHARA, Y. Aged garlic extract therapy for sickle cell anemia patients. *BioMed Central Blood Disorders*, v. 2(3), 11 pars., 2002. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2326/2/3> Acesso em ago. 2002

TAPIERO, H.; TEW, K. D.; NGUYEN BA, G.; MATHÉ, G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Paris, v. 56, p. 200-207, 2002.

TEDESCO, I.; RUSSO, G. L.; NAZZARO, F.; RUSSO, M.; PALUMBO, R. Antioxidant effect of red wine anthocyanins in normal and catalase-inactive human erythrocytes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, Stoneham, v. 12, p. 505-511, 2001.

TEDESCO, I.; RUSSO, M.; RUSSO, P.; IACOMINO, G.; RUSSO, G. P.; CARRATURO, A.; FARUOLO, C.; MOIO, L.; PALUMBO, R. Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 11, p. 114-119, 2000.

TERAO, J.; PISKULA, M.; YAO, Q. Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 308(1), p. 278-284, 1994.

TOREL, J.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. **Phytochemistry**, New York, v. 25(2), p. 383-385, 1986.

TORRES, J. L.; BOBET, R. New flavanol derivatives from grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant aminoethylthio-flavan-3-ol conjugates from a polymeric waste fraction used as a source of flavanols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, p. 4627-4634, 2001.

TREASE, G. E.; EVANS, W. C. **Pharmacognosy**. London: Bailliere Tindall, 1992, p. 245-311.

TROTТА, R. J.; SULLIVAN, S. G.; STERN, A. Lipid peroxidation and hemoglobin degradation in red blood cells exposed to *t*-Butyl hydroperoxide. Dependence on glucose metabolism and hemoglobin status. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 679, p. 230-237, 1981.

TROTТА, R. J.; SULLIVAN, S. G.; STERN, A. Lipid peroxidation and hemoglobin degradation in red blood cells exposed to *t*-Butyl hydroperoxide. Effects of the hexose monophosphate shunt as mediated by glutathione and ascorbate. **Biochemical Journal**, London, v. 204, p. 405-415, 1982.

TSAI, I.; MURTHY, S. N. P.; STECK, T. L. Effect of red cell membrane binding on the catalytic activity of glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 257, p. 1438-1442, 1982.

VALENZUELA, A.; BARRÍA, T.; GUERRA, R.; GARRIDO, A. Inhibitory effect of the flavonoid simylerin on the erythrocyte hemolysis induced by phenylhydrazine.

**Biochemical Biophysical Research Communication**, Orlando, v. 126(2), p. 712-718, 1985.

VAN ACKER, F. A. A.; SCHOUTEN, O.; HAENEN, G. R. M. M.; VAN DER VIJGH, W. J. F.; BAST, A. Flavonoids can replace  $\alpha$ -tocopherol as an antioxidant. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 473, p. 145-148, 2000.

VAN ACKER, S. A. B. E.; VAN BALEN, G. P.; VAN DER BERG, D. J.; BAST, A.; VAN DER VIJGH, W. J. F. Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. **Biochemical Pharmacology**, New York, v.56, p. 935-943, 1998.

VAN DER ZEE, J.; VAN STEVENINCK, J.; KOSTER, J. F.; DUBBELMAN, T. M. A. R. Inhibition of enzymes and oxidative damage of red blood cells induced by *t*-butylhydroperoxide-derived radicals. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 980, p. 175-180, 1989.

VIVES CORRONS, J. L.; BESSON, I. Red cell membrane  $\text{Na}^+$  transport systems in hereditary spherocytosis: relevance to understanding the increased  $\text{Na}^+$  permeability. **Annals of Hematology**, New York, v. 80(9), p. 535-539, 2001.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, p. 304-309, 1997.

WANG, H.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. M.; CHANG, Y. C.; BOOREN, A. M.; GRAY, J. I.; DEWITT, D. L. Antioxidant and anti-inflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyaniding, from tart cherries. **Journal of Natural Products**, Columbus, v. 62, p. 294-296, 1999.

WAUGH, S. M.; WALDER, J. A.; LOW, P. S. Partial characterization of the copolymerization reaction of erythrocytes membrane band 3 with hemichromes. **Biochemistry**, Washington, v. 26(6), p. 1777-1783, 1987.

WESTERNAN, M. P. Erythrocytes lipids: a comparison of normal young and normal old populations. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, St. Louis, v. 62, p. 394-400, 1963.



WINTERBOURN, C. C.; CARRELL, R. W. Oxidation of human hemoglobin by copper. Mechanism and suggested role of the thiol group of residue beta 93. **Biochemical Journal**, London, v. 165(1), p. 141-148, 1977.

WINTERBOURN, C. C. Oxidative reactions of hemoglobin. **Methods in Enzymology**, New York, v. 186, p. 265-272, 1990

WU, C. C.; SHEEN, L. Y.; CHEN, H. W.; TSAI, S. J.; LI, C. K. Effects of organosulfur compounds from garlic oil on the antioxidation system in rat liver and red blood cells. **Food and Chemical Toxicology**, Elmsford, v. 39, p. 563-569, 2001.

YAMAKOSHI, J.; SAITO, M.; KATAOKA, S.; KIKUCHI, M. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. **Food and Chemical Toxicology**, Elmsford, v. 40, p. 599-607, 2002

YOU DIM, K. A.; SHUKITT-HALE, B. MACKINNON, S.; KALT, W.; JOSEPH, J. A. Polyphenolics enhance red blood cell resistance to oxidative stress: in vitro and in vivo. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1519(1), p. 117-122, 2000.

ZHANG, A.; ZHU, Q. Y.; LUK, Y. S.; HO, K. Y.; FUNG, K. P.; CHEN, Z. Y. Inhibitory effects of jasmine green tea epicatechin isomers on free radical-induced lysis of red blood cells. **Life Sciences**, Elmsford, v. 61(4), p. 383-394, 1997.

**ANEXOS**

# **ANEXO I**

Curitiba, 09 de abril de 2.001.

Ilmo (a) (s) Sr. (a)( s)  
Dr. Samuel Ricardo Comar

Nesta

Prezado(a) Senhor(a):

Comunicamos que o Projeto de " **ESTUDO DA AÇÃO DO FLAVONÓIDE QUERCETINA SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO EM ERITRÓCITOS HUMANOS**", está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução nº 196/96 do Ministério da Saúde.  
**Protocolo CEP-HC nº 023.EXT.005/2001-03**

O referido projeto foi apresentado ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, em reunião realizada no dia 27 de março de 2.001.

Sendo o que se apresenta para o momento, subscrevo-me,

Atenciosamente



**Prof. Dr. Renato Tambara Filho**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em  
Serres Humanos do Hospital de Clinicas – UFPR

## **ANEXO II**

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

a) O objetivo desta pesquisa é:

Estudar a ação de quercetina, rutina e extrato hidroalcoólico de *Vitis vinifera*, em eritrócitos humanos submetidos a sobrecarga oxidativa, *in vitro*.

b) Caso você participe da pesquisa, será necessário fazer exames, onde serão coletadas amostras de sangue para realizar os objetivos citados acima.

c) Como em qualquer diagnóstico clínico-laboratorial você poderá experimentar alguns desconfortos, principalmente relacionados a coleta de sangue, por punção venosa.

d) Contudo os benefícios esperados são: melhor compreensão dos mecanismos de hemólise e estresse oxidativo que levam a doenças hemolíticas e ação controladora do processo oxidativo por parte dos antioxidantes a serem empregados.

e) Estão garantidas todas as informações que você queira, antes durante e depois do estudo.

f) A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar participar do estudo, ou se aceitar a participar, retirar seu consentimento a qualquer momento.

g) As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos profissionais que executam a pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que seja mantido o caráter confidencial.

h) Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames, etc) não são da responsabilidade do paciente.

i) Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro.

j) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Eu, \_\_\_\_\_ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente

\_\_\_\_\_  
Data  
\_ / \_ / \_

\_\_\_\_\_  
Nome do pesquisador

\_\_\_\_\_  
Data  
\_ / \_ / \_