


**CARLOS DANILO CARNEIRO**



**EFEITO DE FLAVONÓIDES NA OXIDAÇÃO  
DA GUANINA POR OXIGÊNIO MOLECULAR  
SINGLETE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências - Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Glaucia Regina Martinez

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Eliane Merlin Rocha

**Curitiba  
2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**CARLOS DANILO CARNEIRO**

**EFEITO DE FLAVONÓIDES NA OXIDAÇÃO  
DA GUANINA POR OXIGÊNIO MOLECULAR  
SINGLETE**

**Curitiba  
2008**



Dedico esse trabalho à minha mãe Maria José, que mesmo ausente, se faz presente em pensamento e tenho certeza que onde estiver está sempre iluminando meu caminho.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

À minha sempre orientadora e amiga Mariza Boscacci Marques, da UEPG, que foi a primeira a perceber meu potencial como pesquisador, que me ajudou nas maiores conquistas da minha vida e que principalmente despertou em mim essa paixão pela bioquímica. Pra você muito obrigado é sempre pouco.

Aos meus pais, Demeval e Eloézi, pelo carinho, dedicação, apoio em todos os momentos e principalmente por facilitarem mais essa conquista na minha vida, que era mais do que um sonho. Pra vocês o meu sempre muito obrigado.

Aos meus irmãos, Marcelo pelo orgulho, Lucas e Renata que apesar de mais novos sempre me ensinam algo pela simplicidade de um sorriso ou por um olhar carinhoso. Seremos sempre unidos, obrigado!

À Prof. Dra. Glaucia Regina Martinez, pela orientação desse trabalho e por tudo que me ensinou para que eu me tornasse um profissional melhor.

À Prof. Dra. Maria Eliane Merlin Rocha pela co-orientação, dedicação e paciência para que este trabalho fosse concluído com sucesso.

À Prof. Dra. Silvia Maria Suter Correia Cadena, que foi mais do que uma professora, obrigado por todas as conversas e apoio nos momentos mais tortuosos, principalmente na época das disciplinas.

Aos professores do laboratório de Oxidações Biológicas Guilhermina, Eva, André que estavam sempre dispostos a solucionar os problemas e auxiliar na sua solução.

Às professoras Rose Adele Monteiro e Roseli Wassem e aos amigos Anelis, Tuca e Arnaldo do Núcleo de Fixação de Nitrogênio por toda ajuda que demonstraram na realização dos meus experimentos.

Aos professores do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular que de alguma maneira trabalharam para o desenvolvimento desse estudo, seja em conhecimento teórico ou prático.

Aos amigos do laboratório de Oxidações Biológicas: Glaucio que esteve sempre presente desde a primeira aula do nivelamento até na hora da

defesa, a Carol, Rosilene e a Caro sempre prontas a ouvir minhas queixas e ajudar-me a solucionar os problemas, a Tati, o Paulo Worfel, a Amanda, a Silvia Romão e a Vivi que estavam sempre colaborando e trocando idéias para melhorar os experimentos. Galera valeu pela força!

A todos os alunos de iniciação, o Paulinho, a Dani, a Tati, a Fabi, a Juliana, a Fer, a Paty e a Liana pelo carinho e compreensão.

Aos meus amigos do mestrado, que de certa maneira a conquista de cada um tem a participação ativa de todos, obrigado.

Para minhas amigas de infância, Thalita, Cristiane e Gisele, que mesmo longe estão presentes no meu coração e sabem que essa presença é inevitável para o meu sucesso. Amo eternamente vocês.

Às especiais do mestrado: Fernanda, Larissa C., Dayane, Thaís e Márcia que foram mais do que colegas de mestrado, são amigas para a vida toda. Agradeço todos os dias por vocês fazerem parte da minha vida.

À Carol, Graci, Anelis, Tuca, Ju, Nana, Lu, que estiveram presentes também em todos os momentos, sejam eles felizes ou tristes, de angústia ou satisfação, de sofrimento ou de exaltação, quando os experimentos davam certos ou errados, enfim, as que realmente estavam do meu lado quando eu mais precisava ou quando eu não precisava mas estavam ali simplesmente pelo fato de estar perto. Obrigado pela presença e força sempre.

Aos demais amigos que conheci em Curitiba, principalmente ao Fabio e o Gercílio, que para mim é um exemplo de competência, que me incentivavam sempre quando eu chegava desanimado em casa.

Ao suporte financiamento do CNPq (bolsa), CNPq - Institutos do Milênio – Redoxoma, Fundação Araucária e L'Óreal - UNESCO - Academia Brasileira de Ciências.

*"Noventa por cento do sucesso se baseia simplesmente em insistir"*

**Woody Allen**

## RESUMO

Atualmente sabe-se que uma das principais funções dos flavonóides é seu potencial antioxidante, já evidenciado nos mais diversos sistemas, e por isso têm-se aumentado muito o interesse nos estudos com objetivo de esclarecer os mecanismos pelos quais esses compostos apresentam essa característica. Apesar do DNA apresentar uma estabilidade química considerável, a estrutura de suas bases nitrogenadas pode ser alterada pela ação de espécies reativas de oxigênio (ROS), formadas pela transferência de elétron ou energia ao oxigênio molecular. A principal modificação estudada, caracterizada e monitorada é a 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoGua), formada pela oxidação da guanina (Gua). Essa lesão é considerada um dos biomarcadores de estresse oxidativo por ser formada por diversas espécies reativas, dentre as quais, o oxigênio molecular singlete ( $^1\text{O}_2$ ). Este composto pode ser formado em sistemas biológicos de diversas maneiras, como na fotossensibilização, na lipoperoxidação e na fagocitose. No DNA, a reação do  $^1\text{O}_2$  com a Gua leva à formação de 8-oxoGua e em nucleosídeo livre, diversos produtos se formam em função do pH e solvente. Dessa forma, esse estudo teve como objetivo testar o efeito de alguns flavonóides (flavona, apigenina, quercetina, catequina e morina) frente ao dano específico pelo  $^1\text{O}_2$  na Gua em nucleosídeo livre ou no DNA. Os resultados foram analisados por HPLC para a quantificação dos produtos formados 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo) e diasterisômeros da espiroiminodihidantoína (dSp) quando a dGuo livre era oxidada pelo  $^1\text{O}_2$  formado na decomposição térmica do endoperóxido NDPO<sub>2</sub>. E na verificação da formação da forma circular aberta (CA) do plasmídeo pBluescript SK por gel de eletroforese após oxidação deste pelo  $^1\text{O}_2$  formado na decomposição térmica do endoperóxido DHPNO<sub>2</sub> e tratamento com a enzima de reparo formamidopirimidina glicosilase (FPG). Nesse estudo, verificamos que a flavona apresenta um perfil antioxidante, pois reduz a formação da 8-oxodGuo e dSp em cerca de 23 e 30%, respectivamente, sendo esse efeito mais significativo nas maiores doses (100 e 200  $\mu\text{mol/L}$ ). Nessas mesmas doses houve diminuição na formação da forma CA do plasmídeo (20%), indicando o seu potencial antioxidante também nesse sistema. Apigenina (100  $\mu\text{mol/L}$ ), quercetina (50  $\mu\text{mol/L}$ ) e catequina (100  $\mu\text{mol/L}$ ) aumentaram a formação da 8-oxodGuo em 250, 160 e 85%, respectivamente, mas ao mesmo tempo diminuíram a formação da dSp em 50, 35 e 35%, respectivamente. Catequina (100  $\mu\text{mol/L}$ ) e quercetina (50  $\mu\text{mol/L}$ ) também aumentaram a forma CA do plasmídeo pBluescript SK quando este era oxidado por  $^1\text{O}_2$  em cerca de 28 e 15%, respectivamente. A morina parece interferir no mecanismo da reação de oxidação da dGuo, pois dependendo da sua concentração ocorre o favorecimento da formação de 8-oxodGuo ou dSp. Considerando que a 8-oxodGuo formada no "pool" de nucleotídeos celulares pode ser substrato para a DNA polimerase, os resultados encontrados na presença de apigenina, catequina e quercetina para oxidação da dGuo livre somados aos efeitos diretos ao DNA são essenciais para sugerir que esses flavonóides apresentam uma atividade potencialmente genotóxica, que poderia promover mutagênese e carcinogênese. Por sua vez, dentre os flavonóides estudados, a flavona é a que apresentou o melhor potencial protetor nesse sistema.

Palavras-chave: antioxidante, danos ao DNA, flavonóides, oxigênio singlete.



## ABSTRACT

One of the main characteristics of flavonoids is their potential antioxidant, as evidenced in diverse systems, and therefore it has been increased much of interest in this topic in order to clarify the mechanisms by which these compounds exhibit this behavior. Despite of the considerable chemical stability of DNA, the structure of its bases can be changed by the action of reactive oxygen species (ROS) which can be formed by the transfer of electrons or energy to molecular oxygen. The main modification studied, characterized, and monitored is 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua), formed by the oxidation of guanine (Gua). This injury is considered one of the biomarkers of oxidative stress, since it may be generated by various reactive species, among which singlet molecular oxygen ( $^1\text{O}_2$ ). This species may be formed in biological systems in many ways, as in photosensitization, lipid peroxidation and phagocytosis. In DNA, the reaction of  $^1\text{O}_2$  with guanine leads to the formation of 8-oxoGua and in nucleoside, several products are formed depending of pH and solvent. Thus, this study aimed to test the effect of some flavonoids (flavone, apigenin, quercetin, catechin and morin) on the damage by  $^1\text{O}_2$  in the Gua nucleoside (dGuo) or DNA. The results were analyzed by HPLC for quantification of the products formed (8-oxodGuo and dSp) when dGuo was oxidized by  $^1\text{O}_2$  formed by thermal decomposition of NDPO<sub>2</sub> endoperoxide. As well, by gel electrophoresis for the evaluation of open circular (OC) form generation in pBluescript SK plasmid treated with  $^1\text{O}_2$  formed by thermal decomposition of DHPNO<sub>2</sub> endoperoxide and with the repair enzyme formamidopyrimidine glycosylase (FPG). In this study, we found that flavone presents a antioxidant profile, since it reduces the formation of 8-oxodGuo and dSp about 23 and 30%, respectively, on higher doses (100 and 200  $\mu\text{mol/L}$ ). In those same doses, the formation of OC form was decreased in 20%, indicating its antioxidant behavior also in this system. Apigenin (100  $\mu\text{mol/L}$ ), quercetin (50  $\mu\text{mol/L}$ ) and catechin (100  $\mu\text{mol/L}$ ) increased the formation of 8-oxodGuo in 250, 160 and 85%, respectively, but decreased the formation of dSp in 50, 35 and 35%, respectively. Catechin (100  $\mu\text{mol/L}$ ) and quercetin (50  $\mu\text{mol/L}$ ) also increased the OC form of pBluescript SK plasmid when it was oxidized by  $^1\text{O}_2$  around 28 and 15%, respectively. Morin seems to interfere with the mechanism of the reaction of dGuo oxidation, because the formation of 8-oxodGuo or dSp changed depending on its concentration. Considering that 8-oxodGuo formed in the pool of nucleosides can be a substrate for DNA polymerase, the results found in the presence of apigenin, catechin and quercetin for the oxidation of dGuo, besides the direct effects on the DNA, are essential to suggest that these flavonoids have a genotoxic activity which could lead to mutagenesis and carcinogenesis. Among the flavonoids studied, flavone is the one which presented the best protection for this system.

Keywords: antioxidant, damage to DNA, flavonoids, singlet oxygen

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – NÍVEIS DE ENERGIA DO OXIGÊNIO NO ESTADO FUNDAMENTAL E EXCITADO.....	18
FIGURA 2 – MECANISMO DA OXIDAÇÃO DA DGUO PELO $^1\text{O}_2$ EM MEIO AQUOSO .....	21
FIGURA 3 – PRODUTOS DE OXIDAÇÃO DA GUANINA E DA 8-OXOGUANINA QUE PODEM SER FORMADOS EM MEIO AQUOSO OU ORGÂNICO .....	22
FIGURA 4 – CONSEQUÊNCIA DO DANO EM DNA PELA OXIDAÇÃO DA DGUO PELO $^1\text{O}_2$ .....	23
FIGURA 5 – EXEMPLOS DE BASES DANIFICADAS PRESENTES NO DNA .....	24
FIGURA 6 – ESTRUTURA GENÉRICA DE UM FLAVONÓIDE COM ANEL C. ....	25
FIGURA 7 – ESTRUTURA GENÉRICA DE ALGUMAS CLASSES DOS FLAVONÓIDES .....	26
FIGURA 8 – ESTRUTURA DOS FLAVONÓIDES UTILIZADOS NESSE ESTUDO DIVIDIDOS POR CLASSES.....	30
FIGURA 9 – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DA DGUO .....	44
FIGURA 10 – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DA 8-OXODGUO .....	45
FIGURA 11 – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DA DSP.....	45
FIGURA 12 – ESPECTROS DE ABSORBÂNCIA DOS COMPOSTOS ANALISADOS.....	46
FIGURA 13 – CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DA DETECÇÃO DA DGUO .....	47
FIGURA 14 – CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DA DETECÇÃO DA 8-OXODGUO .....	48
FIGURA 15 – CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DA DETECÇÃO DA DSP.....	49
FIGURA 16 – DETECÇÃO DA 8-OXODGUO, NA INCUBAÇÃO DA DGUO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FLAVONA.....	50
FIGURA 17 – DETECÇÃO DA DSP, NA INCUBAÇÃO DA DGUO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FLAVONA.....	51
FIGURA 18 – DETECÇÃO DA 8-OXODGUO, NA INCUBAÇÃO DA DGUO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE APIGENINA.....	52
FIGURA 19 – DETECÇÃO DA DSP, NA INCUBAÇÃO DA DGUO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE APIGENINA .....	53
FIGURA 20 – DETECÇÃO DA 8-OXODGUO, NA INCUBAÇÃO DA DGUO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE QUERCETINA.....	54
FIGURA 21 – DETECÇÃO DA DSP, NA INCUBAÇÃO DA DGUO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE QUERCETINA .....	55
FIGURA 22 – DETECÇÃO DA 8-OXODGUO, NA INCUBAÇÃO DA DGUO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MORINA .....	56
FIGURA 23 – DETECÇÃO DA DSP, NA INCUBAÇÃO DA DGUO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MORINA .....	57
FIGURA 24 – DETECÇÃO DA 8-OXODGUO, NA INCUBAÇÃO DA DGUO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CATEQUINA.....	58
FIGURA 25 – DETECÇÃO DA DSP, NA INCUBAÇÃO DA DGUO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CATEQUINA.....	59
FIGURA 26 – EFEITO DA FLAVONA SOBRE O DANO NO PLASMÍDEO PBLUESCRIPT SK QUANDO INCUBADO COM DHPNO <sub>2</sub> .....	61
FIGURA 27 – EFEITO DA QUERCETINA SOBRE O DANO NO PLASMÍDEO PBLUESCRIPT SK QUANDO INCUBADO COM DHPNO <sub>2</sub> .....	62
FIGURA 28 – EFEITO DA CATEQUINA SOBRE O DANO NO PLASMÍDEO PBLUESCRIPT SK QUANDO INCUBADO COM DHPNO <sub>2</sub> .....	63
FIGURA 29 – ESQUEMA SIMPLIFICADO DA FORMAÇÃO DOS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO DA DGUO PELO $^1\text{O}_2$ .....	66

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – EXEMPLOS DE ALGUNS FLAVONÓIDES E SUAS FONTES.....	27
TABELA 2 – CONSTANTE DE REAÇÃO DOS FLAVONÓIDES COM O OXIGÊNIO SINGLETE. ....	34
TABELA 3 – ATIVIDADE DE PROTEÇÃO DO DNA E CAPACIDADE DE QUELAR FERRO DOS FLAVONÓIDES.....	35
TABELA 4 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-RADICALAR DE ALGUNS FLAVONÓIDES. ....	36
TABELA 5 – ATIVIDADE DE ALGUNS FLAVONÓIDES CONTRA A QUEBRA DO DNA E A FORMAÇÃO DA 8-NITROGUANINA.....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS

8-oxoGua – 8-oxo-7,8-dihidroguanina

8-oxodGuo – 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina

ACN – acetonitrila

AM – azul de metileno

CA – plasmídeo na forma circular aberta

dGuo – 2'-desoxiguanosina

DHPN – *N,N'*-di(2,3-dihidroxiopropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida

DHPNO<sub>2</sub> – endoperóxido da *N,N'*-di(2,3-dihidroxiopropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida

DMF - dimetilformamida

DMSO – dimetilsulfóxido

DPPH – 1,1-difenil-2-picrilhidrazila

dSp – diastereisômeros espiroiminodihidantoína desoxirribose

FapyAde – 4,6-diamino-5-formamidopirimidina

FapyGua – 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina

FPG – enzima formamidopirimidina glicosilase

GSH – glutationa

Gua – guanina

HPLC – cromatografia líquida de alta performance

MeFapyGua – 2,6-diamino-4-hidroxi-5-(*N*-metilformamido)pirimidina

NDP – 3,3'-(1,4-naftilideno) dipropanoato de sódio

NDPO<sub>2</sub> – endoperóxido da 3,3'-(1,4-naftilideno) dipropanoato de sódio

RMN – ressonância magnética nuclear

ROS – espécies reativas de oxigênio

SE – plasmídeo na forma superenovelada

TBE – tampão tris/HCl 90 mmol/L; EDTA 2,5 mmol/L; ácido bórico 90 mmol/L pH 8

# ÍNDICE

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Espécies reativas de oxigênio .....</b>	<b>17</b>
2.1.2 Oxigênio Singlete .....	17
<b>2.2 Danos ao DNA por espécies reativas de oxigênio .....</b>	<b>19</b>
<b>2.3 Flavonóides .....</b>	<b>24</b>
2.3.1 Classificação .....	25
2.3.2 Atividade biológica .....	27
2.3.2.1 Flavona .....	30
2.3.2.2 Apigenina .....	31
2.3.2.3 Quercetina.....	32
2.3.2.4 Morina .....	32
2.3.2.5 Catequina.....	33
2.3.2.6 Estudos comparativos de flavonóides sobre atividade antioxidante.....	33
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>38</b>
<b>3.1 Objetivo geral .....</b>	<b>38</b>
<b>3.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>38</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1 Materiais .....</b>	<b>39</b>
<b>4.2 Métodos .....</b>	<b>39</b>
4.2.1 Síntese dos endoperóxidos .....	39
4.2.1.1 Síntese do endoperóxido da 3,3'-(1,4-naftilideno) dipropanoato de sódio (NDPO <sub>2</sub> ).....	39
4.2.1.2 Síntese do endoperóxido da <i>N,N'</i> -di(2,3-dihidroxiopropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida (DHPNO <sub>2</sub> ).....	40
4.2.2 Avaliação do efeito dos flavonóides na oxidação da dGuo por <sup>1</sup> O <sub>2</sub> .....	40
4.2.2.1 Incubação do endoperóxido NDPO <sub>2</sub> com 2'-desoxiguanosina e flavonóides .....	40
4.2.2.2 Detecção da dGuo e da 8-oxodGuo .....	41
4.2.2.3 Detecção dos dSp .....	41
4.2.3 Avaliação do efeito dos flavonóides na oxidação do DNA por <sup>1</sup> O <sub>2</sub> .....	42
4.2.3.1 Incubação do endoperóxido com DNA plasmidial e flavonóides.....	42
4.2.3.2 Detecção da forma circular aberta do plasmídeo pBluescript SK .....	42
<b>4.3 Análise estatística.....</b>	<b>43</b>
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>44</b>
<b>5.1 Efeito da concentração de flavonóides na oxidação da 2'-desoxiguanosina por <sup>1</sup>O<sub>2</sub> .....</b>	<b>44</b>

<b>5.2 Efeito da concentração de flavonóides na oxidação do plasmídeo pBluescript SK .....</b>	<b>59</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>71</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As espécies reativas de oxigênio (ROS) podem ser formadas pela transferência de elétron ou energia ao oxigênio molecular, gerando radicais e oxigênio molecular singlete ( $^1\text{O}_2$ ), respectivamente. Em sistemas biológicos, o  $^1\text{O}_2$  pode ser formado de diversas maneiras, como na fotossensibilização, na lipoperoxidação, na fagocitose e pela radiação UVA (320-400 nm) (RYTER e TYRRELL, 1998). Seus efeitos em sistemas biológicos têm sido estudados a fim de compreender seu papel em processos fisiológicos e patológicos. O  $^1\text{O}_2$  é capaz de oxidar biomoléculas com alta densidade eletrônica como: proteínas celulares, ácidos graxos poliinsaturados e ácidos nucleicos (RAVANAT *et al.*, 2001), contribuindo para os processos de envelhecimento celular, mutagênese e carcinogênese e doenças coronárias (SCHULZ *et al.*, 1994).

O DNA é uma molécula essencial no metabolismo celular, sua integridade é mantida por sistemas de defesa e reparo. A estrutura de suas bases nitrogenadas pode ser alterada pela ação de compostos endógenos e exógenos, assim como pela radiação e ROS. Entre os componentes dos ácidos nucleicos, a guanina (Gua) é o principal alvo do  $^1\text{O}_2$  por apresentar a maior constante de reatividade com essa espécie reativa quando comparada às outras bases (PRAT *et al.*, 1997).

A 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo) é um produto de oxidação da 2'-desoxiguanosina (dGuo) formada por diversas ROS, entre elas o  $^1\text{O}_2$ , além de ser o único produto formado em DNA dupla fita por essa espécie reativa. É uma lesão mutagênica e importante biomarcador para estudos com doenças correlacionadas ao estresse oxidativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). O mecanismo de formação desse produto tem sido intensivamente estudado e informações consolidadas na literatura contribuem para um melhor entendimento quando se avalia sua formação sob condições específicas de tratamento.

Nos últimos anos vem crescendo o interesse em descobrir novos compostos capazes de inibir ou minimizar danos ao DNA. Um grupo muito estudado são os flavonóides, que são compostos fenólicos encontrados em plantas, presentes na dieta humana e com algumas propriedades já relatadas como: antioxidante, antiinflamatória, anticarcinogênica e antimicrobiano; (KAISEROVÁ *et al.*, 2007; HAVSTEEN, 2002; DUTHIE, 2000; MIDDLETON *et*

*al.*, 2000; Di CARLO, 1999). Contudo, o mecanismo de ação destes compostos ainda não é bem esclarecido.

Estudos cinéticos da supressão do  $^1\text{O}_2$  executados para vários flavonóides: flavona, flavonol, apigenina, rutina, quercetina e miricetina (NAGAI *et al.*, 2005); catequina, epicatequina, epigallocatequina e epigallocatequina galato (MUKAI *et al.*, 2005) mostraram que esses compostos apresentam constante de reatividade com o  $^1\text{O}_2$ , da ordem de  $10^6$  a  $10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , indicando que podem atuar como bons supressores de  $^1\text{O}_2$ .

Esse estudo busca contribuir no entendimento do papel desses flavonóides na possível proteção de componentes biológicos, como o DNA, da ação de espécies reativas como o  $^1\text{O}_2$ , utilizando para essa finalidade a reação de oxidação da dGuo pelo  $^1\text{O}_2$  cujo mecanismo e produtos formados são conhecidos (MARTINEZ *et al.*, 2007).



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Espécies reativas de oxigênio

O oxigênio está presente constantemente nas células e uma pequena parte pode gerar ROS. Essas espécies não são necessariamente radicais e podem ser formadas através de reações de transferência de energia ou de elétrons para o oxigênio molecular no estado fundamental.

A geração de ROS por transferência de elétrons pode conduzir a formação do ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) pela adição de um elétron e do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pela adição de mais um elétron ao  $O_2^{\bullet-}$ . Essas espécies são consideradas moderadamente reativas, mas a sua interação com outros componentes presentes no meio celular, como íons  $Fe^{2+}$ , pode levar à formação de produtos muito mais reativos como o radical hidroxila ( $HO^{\bullet}$ ). Estima-se que cerca de 1-2% do oxigênio consumido pela cadeia respiratória da mitocôndria sofre redução por um elétron pela NADH desidrogenase ou pela coenzima Q gerando  $O_2^{\bullet-}$  (KOWALTOWSKI e VERCESI, 1999)

A geração de ROS por transferência de energia leva à formação do  $^1O_2$ . Esta espécie é um forte oxidante frente a compostos que possuem alta densidade eletrônica.

Além da respiração celular, fontes ambientais como a poluição e radiação contribuem para a formação de ROS e outras espécies, como os compostos carbonílicos eletronicamente excitados ao estado triplete, que também podem participar de processos que geram danos a biomoléculas (CILENTO e ADAM, 1982).

#### 2.1.2 Oxigênio Singlete

O oxigênio molecular é encontrado naturalmente na sua forma triplete ( $^3\Sigma_g^-$ ), contendo dois elétrons desemparelhados em dois orbitais  $\pi^*$  degenerados (orbitais de mesma energia) no seu estado ocupado de mais alta energia, simbolizado por  $^3O_2$ . O  $^1O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) é o mais baixo estado excitado do oxigênio molecular (FIGURA 1), pois ele apresenta menor energia em relação ao outro estado excitado ( $^1\Sigma_g^+$ ) e por isso tem um tempo de meia vida ( $\tau$ ) maior, chegando a  $10^{-6}$  s em água. Além disso, o estudo de seu papel em

meios biológicos tem ganhado destaque, pois gera danos oxidativos em uma variedade de biomoléculas, pois reage como um eletrófilo por apresentar um orbital vazio, levando à oxidação de biomoléculas com alta densidade eletrônica.

Estado	Orbitais $\pi^*$	Energia (kcal/mol)	Tempo de meia vida $\tau$ (s)
$1\Sigma_g^+$	$\uparrow \quad \downarrow$	37,5	$10^{-11}$
$1\Delta_g$	$\downarrow\uparrow \quad \text{—}$	22,5	$10^{-6}$
$3\Sigma_g^-$	$\uparrow \quad \uparrow$		

FIGURA 1 – NÍVEIS DE ENERGIA DO OXIGÊNIO NO ESTADO FUNDAMENTAL E EXCITADO

FONTE: DI MASCIO *et al.*, 1995.

NOTA:  $\tau$  é o tempo de meia vida em água;

O  $^1O_2$  tem um tempo de meia vida muito maior na maioria dos solventes orgânicos do que em água. Em particular, solventes que têm ligações C-H e O-H favorecem sua desativação para o estado fundamental. Quando os átomos de hidrogênio são substituídos por átomos de deutério, o tempo de vida do  $^1O_2$  é significativamente aumentado (MOROE, 1985). Esse efeito foi observado pela primeira vez por Kearns (KAJIWARA e KEARNS, 1973) e pode ser usado para evidenciar a participação do  $^1O_2$  em sistemas em que supostamente estaria presente.

O  $^1O_2$  pode ser formado a partir de uma reação de fotossensibilização do tipo II, envolvendo transferência de energia para o estado tripleto (FOOTE, 1991). Também pode ser gerado por outros processos químicos que incluem reações de peróxido de hidrogênio com hipoclorito (HELD *et al.*, 1978) ou ONOO<sup>-</sup> (DI MASCIO *et al.*, 1994), ou ainda termodecomposição de dioxetanos e endoperóxidos (BRIVIBA *et al.*, 1996; PIERLOT *et al.*, 2000).

Entre os endoperóxidos hidrofílicos utilizados para geração limpa do  $^1\text{O}_2$  estão aqueles formados a partir do 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato (NDP) e da *N,N'*-di(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida (DHPN). Ambos quando colocados em temperatura de 37°C liberam o  $^1\text{O}_2$  com rendimento de cerca de 50% e depois de aproximadamente 2 h, a termólise é completa (PIERLOT *et al.*, 2000).

O  $^1\text{O}_2$  pode interagir com outras moléculas de duas maneiras: através de reações químicas ou transferindo sua energia de excitação para estas moléculas e retornando ao estado fundamental. O primeiro processo é conhecido como supressão química e o último como supressão física do  $^1\text{O}_2$ . Muitas vezes a determinação desses dois processos é feita em conjunto e os valores são expressos como constantes de desativação total do  $^1\text{O}_2$  ( $k_t$ ).

Algumas reações químicas do  $^1\text{O}_2$  podem ser destacadas: adição a dienos conjugados (cicloadição do tipo Diels-Alder, 2+4); adição 1,3 a uma dupla ligação, formando hidroperóxidos e, com alcenos substituídos por grupos contendo átomos de nitrogênio ou enxofre, formando 1,2-dioxetanos.

Entre todas as biomoléculas susceptíveis a danos pela ação do  $^1\text{O}_2$ , o DNA tem particular importância devido ao seu papel fundamental no metabolismo celular e hereditariedade. Evidências têm sido acumuladas a respeito dos seus efeitos genotóxicos e carcinogênicos (FLOYD, 1990; HELBOCK *et al.*, 1999).

## 2.2 Danos ao DNA por espécies reativas de oxigênio

Dentre as bases constituintes dos ácidos nucleicos, a Gua por apresentar o mais baixo potencial de redução, é o principal alvo de agentes oxidantes de um elétron (CADET *et al.*, 2003). Sabe-se que o principal produto de oxidação da Gua, segundo os mais diversos mecanismos é a 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoGua) (CADET *et al.*, 2003). Por esse motivo, essa lesão tem sido extensamente utilizada como um indicador dos danos oxidativos ao DNA e como um biomarcador do estresse oxidativo (KASAI, 1997; HELBOCK *et al.*, 1999; MALAYAPPAN *et al.*, 2007).

A ordem de reatividade das bases frente ao  $^1\text{O}_2$  é guanina >> citosina > adenina > uracila > timina. Isso pôde ser evidenciado comparando-se os

valores da constante total de desativação do  $^1\text{O}_2$  ( $k_t$ ) pelos componentes dos ácidos nucleicos (PRAT *et al.*, 1997).

A reação do  $^1\text{O}_2$  com nucleosídeos livres de Gua ou quando inseridos em pequenos oligonucleotídeos simples fita foi bastante estudado durante as últimas décadas (CADET *et al.*, 2003). A Gua, em nucleosídeos e nucleotídeos, é altamente susceptível à reação com  $^1\text{O}_2$  gerado por fotossensibilização do tipo II e uma série de produtos diferentes são formados (RAVANAT *et al.*, 2004; ADAM *et al.*, 2002).

Estudos de fotossensibilização em solução aquosa da dGuo mostraram a formação de dois produtos principais: os diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína (dSp) e em quantidade bem menor, a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo) (FIGURA 2). O mecanismo mais provável dessa reação envolveria a formação de um endoperóxido via cicloadição [4+2] tipo Diels-Alder do  $^1\text{O}_2$  no anel purínico e num passo subsequente ocorreria a clivagem e formação dos produtos mencionados anteriormente (RAVANAT e CADET, 1995; NILES *et al.*, 2001).

A confirmação estrutural da dSp (NILES *et al.*, 2001) foi conseguida pela comparação das características de espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) com aqueles das amostras originais de dSp obtidas pela oxidação do tipo um-elétron da 8-oxoGua (LUO *et al.*, 2000) e pela determinação das conectividades do carbono pela técnica SELINQUATE (do inglês SElective INadeQUATE), que permitiu a verificação definitiva da estrutura através de características de acoplamento padrão dos grupos vizinhos do anel espirocíclico (ADAM *et al.*, 2002). O mecanismo de formação dos dois diastereoisômeros da Sp foram inferidas com estudos usando  $^{18}\text{O}$  (MARTINEZ *et al.*, 2007; YE *et al.*, 2003) e experimentos de RMN de  $^{13}\text{C}$  a baixa temperatura (McCALLUM *et al.*, 2004).

Foi mostrado que a 8-oxodGuo é altamente reativa frente ao  $^1\text{O}_2$  (SHEU E FOOTE, 1995a). A oxidação da 8-oxodGuo em dSp por  $^1\text{O}_2$  formada no sistema a partir da oxidação da dGuo por  $^1\text{O}_2$  foi confirmada pela utilização de um endoperóxido isotopicamente marcado com oxigênio-18 e análises por espectrometria de massas (MARTINEZ *et al.*, 2007).

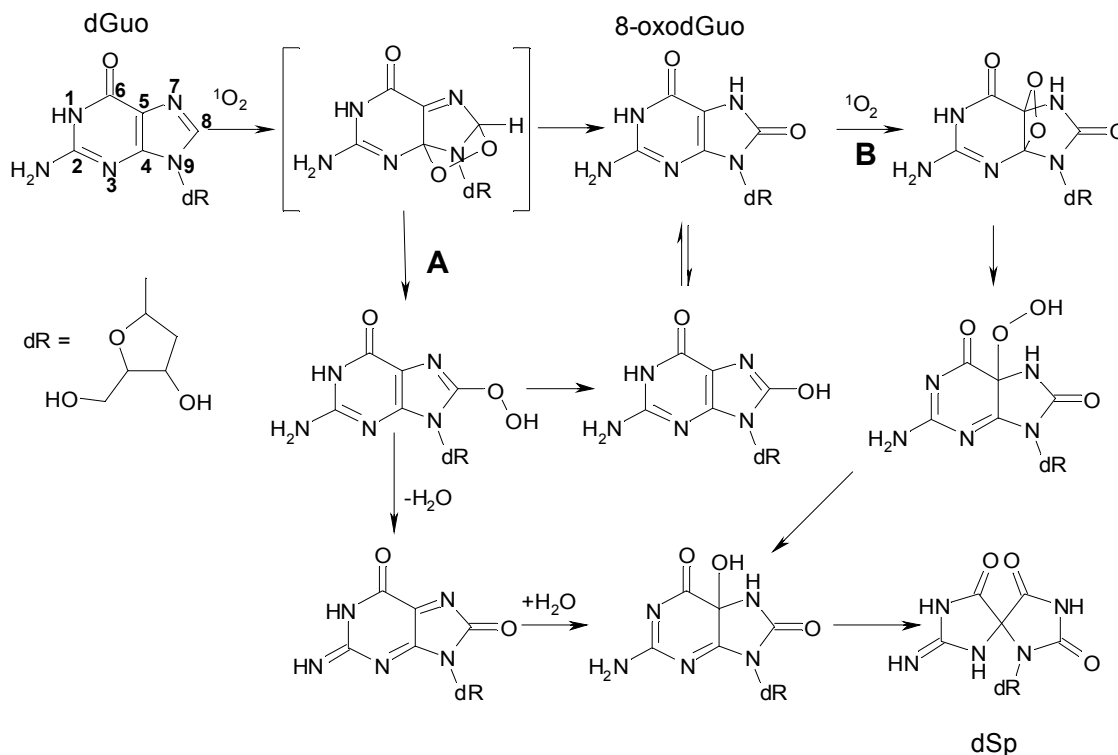


FIGURA 2 – MECANISMO DA OXIDAÇÃO DA dGUO PELO  $^1\text{O}_2$  EM MEIO AQUOSO  
 FONTE: MARTINEZ *et al.*, 2007.

NOTA: dGuo (2'-desoxiguanosina); 8-oxodGuo (8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina); dSp (diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína); **A** indica a via de formação da dSp que utiliza apenas uma molécula de  $^1\text{O}_2$  na oxidação da dGuo e **B** indica a via de formação da dSp que utiliza uma molécula de  $^1\text{O}_2$  para formação de 8-oxodGuo e uma segunda molécula de  $^1\text{O}_2$  na oxidação da 8-oxodGuo.

A reação da 8-oxodGuo com  $^1\text{O}_2$  gerado por termólise de endoperoxídeo em solução aquosa forma como produtos principais, além dos diastereoisômeros da dSp, a 2,2-diamino-4-[-(2-desoxi- $\beta$ -D-eritropentafuranosil)amina]-5-(2H)-oxazolona (dOz), sua precursora, a 2-amino-5-[(2-desoxi- $\beta$ -D-eritropentafuranosil)-amino]-4H-imidazol-4-ona (dlz) e guanidinhidantoína oxidada (dGh<sup>ox</sup>) (FIGURA 3) (MARTINEZ *et al.*, 2002). Estudos sobre a subsequente oxidação da 8-oxodGuo por  $^1\text{O}_2$  em oligonucleotídeos mostraram que, ao contrário do que é observado para a 8-oxodGuo em solução, não há formação de dSp, nem ácido cianúrico. Nesse caso, o ácido oxalúrico (Oxa) é o principal produto formado (DUARTE *et al.*, 2000).

A reação do  $^1\text{O}_2$  com o anel heterocíclico da guanina resulta numa diversidade de produtos e possíveis mecanismos dependendo das condições de reação e contexto estrutural (YE *et al.*, 2003). Como é mostrado na FIGURA

3, a fotossensibilização a baixa temperatura usando um derivado da guanosina solúvel em solventes orgânicos, a 2'-3'-5'-O-(terc-butildimetilsilil)guanossina, foi identificado um produto majoritário final que apresenta o anel imidazol aberto e pequena quantidade de 8-oxodGuo (SHEU *et al.*, 2002), além disso foram detectados dois intermediários transientes por RMN de  $^{13}\text{C}$  e assinalados como estruturas do ácido carbâmico (KANG e FOOTE, 2002). Na oxidação mediada por  $^1\text{O}_2$  do derivado sililado da 8-oxodGuo em solvente orgânico observou-se a formação do ácido parabâmico (SHEU e FOOTE, 1995b).

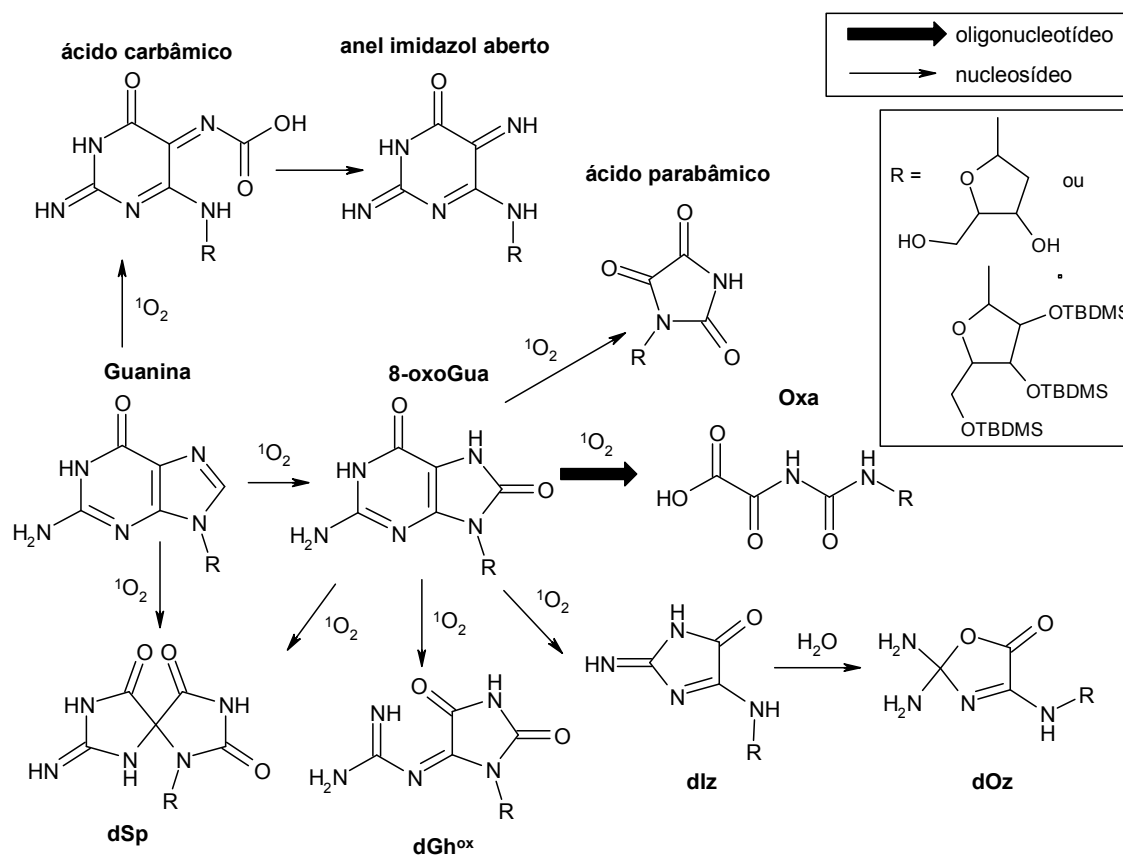


FIGURA 3 – PRODUTOS DE OXIDAÇÃO DA GUANINA E DA 8-OXOGUANINA QUE PODEM SER FORMADOS EM MEIO AQUOSO OU ORGÂNICO

FONTE: Adaptado de KANG e FOOTE 2002 e MARTINEZ *et al.*, 2002.

Por sua vez, a principal lesão formada no DNA pela ação de ROS, incluindo o  $^1\text{O}_2$ , é a 8-oxodGuo (CADET *et al.*, 2003). Essa lesão tem um alto potencial mutagênico, uma vez que é capaz de parear com adenina levando a uma transversão G para T (BOITEUX *et al.*, 1990; KROKAN *et al.*, 1997) (FIGURA 4).

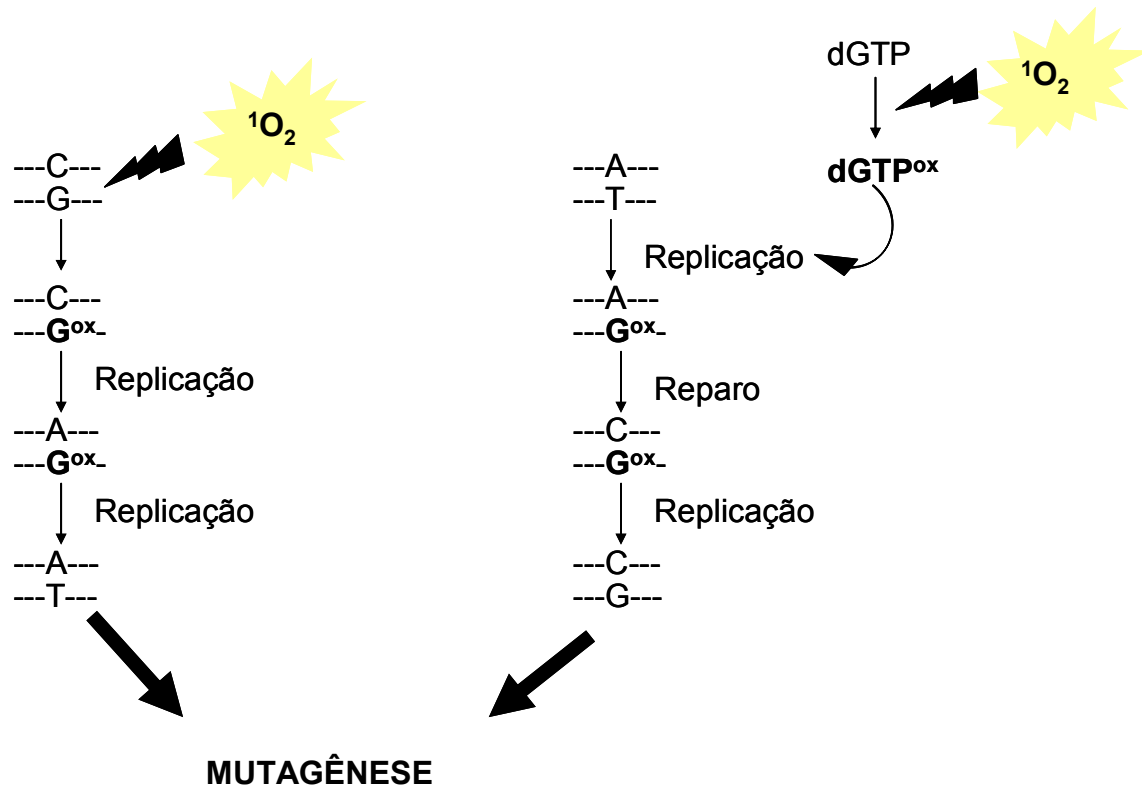


FIGURA 4 – CONSEQUÊNCIA DO DANO EM DNA PELA OXIDAÇÃO DA dGUO PELO  $^1O_2$

FONTE: Esquema adaptado de LOFT AND MØLLER, 2006

NOTA:  $G^{ox}$  é a representação da 8-oxodGuo.

Essa lesão é alvo de enzimas de reparo como a formamidopirimidina glicosilase de *Escherichia coli* (enzima FPG), que retira principalmente bases oxidadas do DNA (MICHAELS *et al.*, 1992). A FPG apresenta atividade de *N*-glicosilase e de liase do sítio AP, ou seja, hidrolisa a ligação *N*-glicosídica entre a base danificada e a desoxirribose (TCHOU e GROLLMAN, 1995) e cliva o DNA no sítio abásico resultante por uma  $\beta$ - $\delta$  eliminação (BHAGWAT e GERLT, 1996), criando uma única abertura do nucleotídeo que posteriormente é preenchida *in vivo* pela DNA polimerase  $\beta$ . A clivagem pela FPG gera *in vitro* os fragmentos 5' e 3' fosforilados. Embora a 8-oxodGuo seja considerada o alvo fisiológico preferencial para a FPG (TCHOU *et al.*, 1991; BOITEUX *et al.*, 1992), a enzima atua também sobre outros substratos, incluindo as purinas com anel imidazol aberto: 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FapyGua), 4,6-diamino-5-formamidopirimidina (FapyAde) (LAVAL, 1996; BOITEUX *et al.*, 1992), pirimidinas oxidadas: 5-hidroxicitosina, 5 hidroxiuracila,

e 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrotimina (timina glicol) (HATAHET *et al.*, 1994), e sítios abásicos (BOITEUX *et al.*, 1990; BHAGWAT e GERLT, 1996). As estruturas desses compostos são mostradas na FIGURA 5.

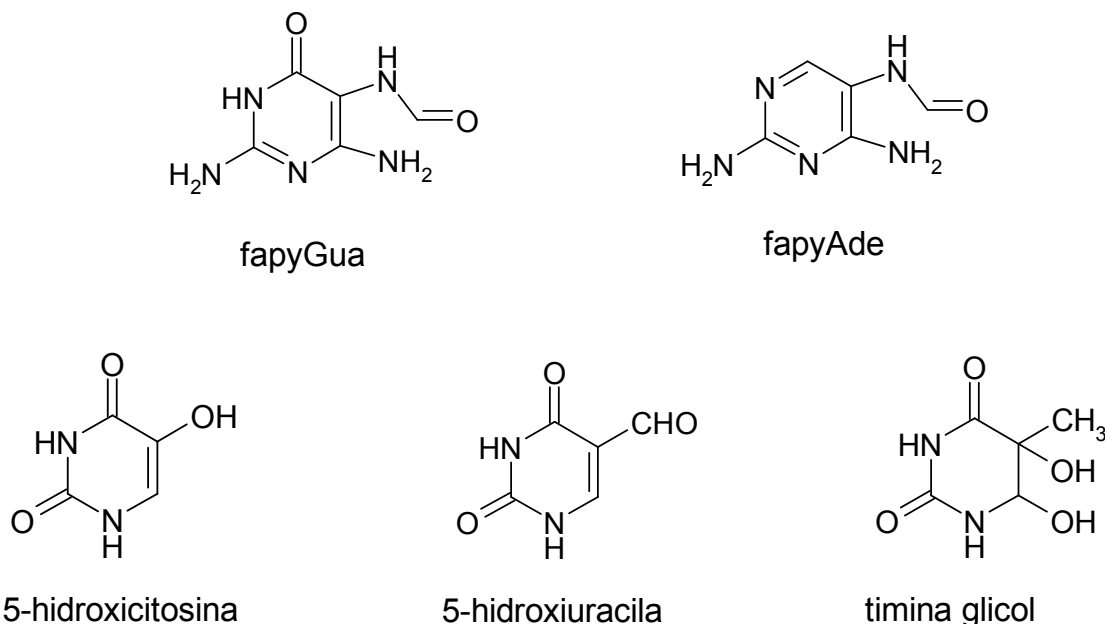


FIGURA 5 – EXEMPLOS DE BASES DANIFICADAS PRESENTES NO DNA

### 2.3 Flavonóides

Os flavonóides são compostos fenólicos de baixo peso molecular, derivados de benzo- $\gamma$ -pironas e são subdivididos em várias classes (HEIM *et al.*, 2002). Estão distribuídos na natureza em plantas angiospermas e gimnospermas, e atualmente são conhecidas cerca de 9000 estruturas destes compostos (MARTENS E MITHÖFER, 2005). Muitas vezes excedem a concentração de 1 mM nessas plantas (HERTOG, 1992).

Estima-se que os flavonóides ingeridos em nossa dieta diária variam de 23-1000 mg/dia aproximadamente (HAVSTEEN, 2002; KUHNAU, 1976). Eles são encontrados principalmente em frutas, verduras e em bebidas como vinho e chá (BRAVO, 1998).

A metabolização desses compostos no organismo é complexa e ocorre no intestino e fígado e os metabólitos formados são excretados pela urina e fezes. Exemplos como a epicatequina e quercetina são conhecidas por serem metiladas, glicosiladas e sulfatas durante o transporte pelo epitélio intestinal e posterior passagem através do fígado (ABRAHAMSE *et al.*, 2005).



### 2.3.1 Classificação

São conhecidas 10 classes de flavonóides de acordo com seus substituintes, sendo que em cada subgrupo as propriedades químicas e biológicas destes podem diferir consideravelmente. A estrutura da maioria dos flavonóides consiste de dois anéis benzênicos (A e B), os quais estão conectados por um terceiro anel pirano contendo oxigênio (C). Na FIGURA 6 é mostrado uma estrutura genérica de flavonóide com anel C (ERLUND, 2004).

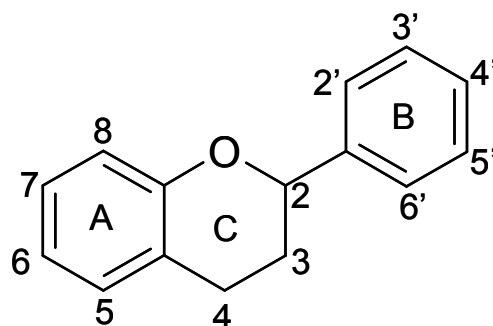


FIGURA 6 – ESTRUTURA GENÉRICA DE UM FLAVONÓIDE COM ANEL C.

Na FIGURA 7, mostramos que quando o anel de seis membros (C) com uma carbonila na posição 4, está condensado com o anel benzênico (A) temos uma  $\gamma$ -pirona, presente nos flavonóis e flavononas, ou um hidroderivado, sem a carbonila, presente nos flavanóis e flavanonas. A posição do anel (B) divide os flavonóides em dois grupos: flavonóides, quando este está ligado na posição 2 e isoflavonóides, quando ligado na posição 3 (HAVSTEEN, 1983).

Os flavonóides com um grupo hidroxila ligado na posição C-3 do anel C são classificados como 3-hidroxiflavonóides, e são exemplos os flavonols, antocianidinas, leucoantocianidinas e catequinas. Já aqueles que não apresentam hidroxila na posição C-3 do anel C são classificados em 3-desoxiflavonóides e dividem-se em flavanonas e flavonas (KUHNAU, 1976). Nessas duas classificações os compostos são diferenciados por grupos hidroxila e metoxi que estão ligados em posições diferentes na molécula. Ainda, os flavonóides podem ser encontrados sem grupamentos açúcar (agliconas) e como moléculas glicosiladas (KAZUNO, 2005).

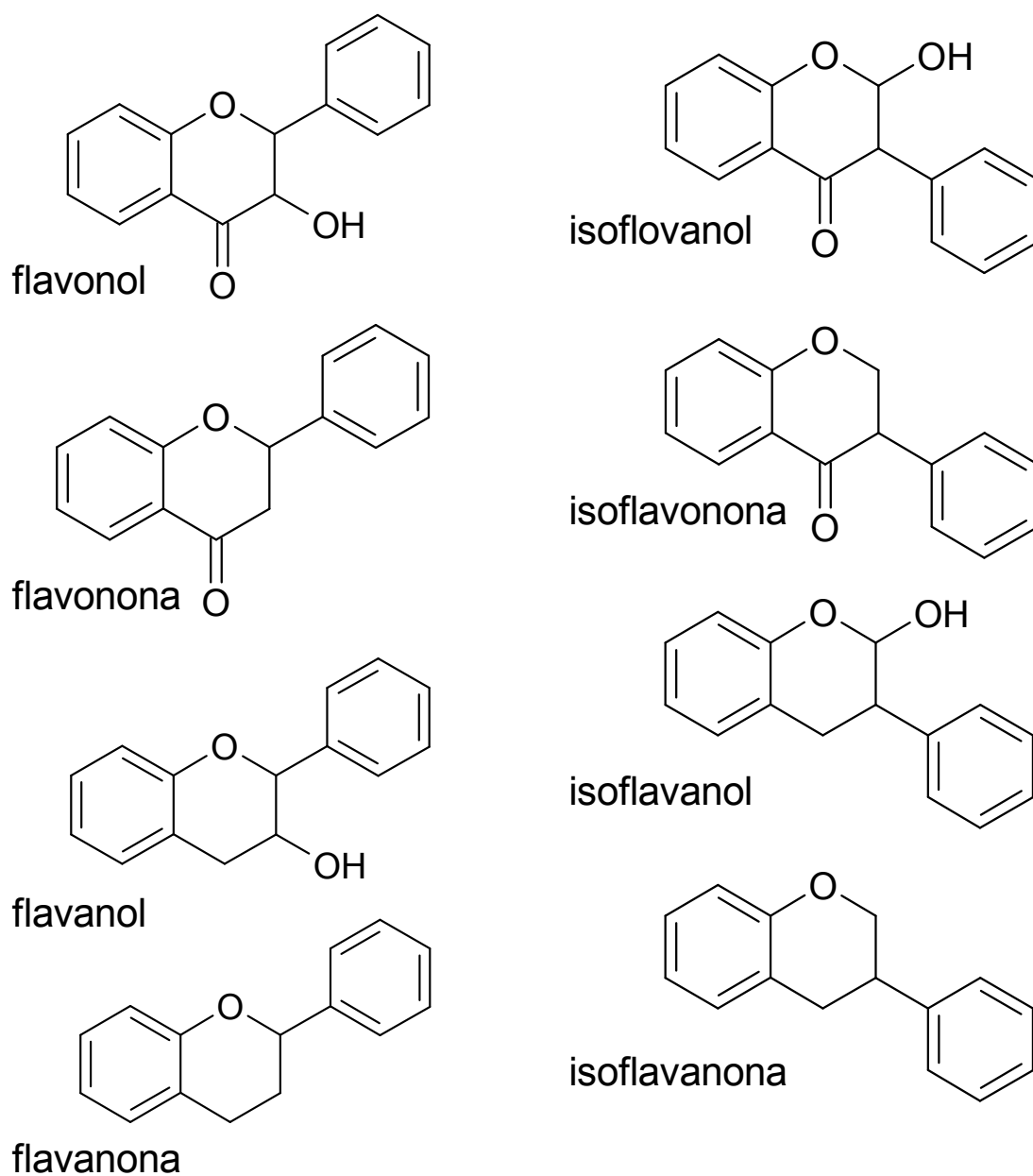


FIGURA 7 – ESTRUTURA GENÉRICA DE ALGUMAS CLASSES DOS FLAVONÓIDES

Na TABELA 1 estão citados alguns exemplos de flavonóides, a classe a que pertencem e onde são encontrados.

TABELA 1 – EXEMPLOS DE ALGUNS FLAVONÓIDES E SUAS FONTES

CLASSES	EXEMPLOS	FONTES
Antocianinas	cianidina, delphinidina, peonidina	Ocorre predominantemente em frutas e flores.
Flavanol (mono, bi e tri)	catequina, epicatequina, procianidina, luteoforol, teaflavina	São encontrados em frutas e chás (verde e preto). São responsáveis pelo sabor adstringente de algumas bebidas, frutas, chás, sucos e vinhos.
Flavanonas	esperidina, naringina, neoespiridina	São encontradas quase que exclusivamente em frutas cítricas.
Flavonas	Flavona, Apigenina, diosmetina, neodiosmina, tricinasinensetina, luteolina, nobiletina, tangeritina,	São encontradas principalmente em ervas, mas também em cereais, frutas, vegetais e flores. As mais comuns são apigenina e luteolina.
Flavonols	isorhamnetina, kaempferol, mirecítina, quercetina, morina	São predominantes em frutas e vegetais sendo o mais abundante a quercetina.
Isoflavonóides	daidzeina, genisteina	São achados quase que exclusivamente em legumes.

FONTE: Modificado de PETERSON e DWYER (1998).

### 2.3.2 Atividade biológica

Os flavonóides têm sido investigados por apresentarem importantes efeitos biológicos. Dentre os quais: antioxidante, antiinflamatório, anticarcinogênico, antimicrobiano e anti-hepatotóxico (HAVSTEEN, 2002, KAISEROVÁ *et al.*, 2007; DUTHIE, 2000; MIDDLETON *et al.*, 2000; Di CARLO, 1999).

Alguns flavonóides da dieta têm sido considerados agentes anticancerígenos (ELANGO VAN *et al.*, 1994, HERTOOG *et al.*, 1992, e KANDASWAMI *et al.*, 1991), como quercetina, flavona, apigenina e catequina (HIRANO *et al.*, 1994). Os flavonóides exercem seus efeitos anticancerígenos através de diversos mecanismos ainda não totalmente elucidados (MANTHEY *et al.*, 2002). Entre as possibilidades, está a atividade pró-oxidante, um exemplo é a quercetina, que em altas concentrações e na presença de  $Fe^{3+}$ , aumenta a formação de  $H_2O_2$  (LAUGHTON, 1989). Esta atividade contribui para citotoxicidade e danos à integridade celular, podendo também induzir a morte celular por apoptose (BESTWICK, 2005).

Há também relatos de flavonóides inibindo as atividades de uma variedade de enzimas. Utilizando leucócitos peritoniais de fêmeas de ratos

Wistar, foi avaliada a capacidade de inibição da 5-lipoxigenase e da ciclooxigenase por uma série de flavonóides, sendo que a quercetina apresentou uma inibição de 50% nas concentrações de 3,5 e 16  $\mu\text{mol/L}$ , respectivamente (HOULT *et al.*, 1994). Outro trabalho avaliou a capacidade inibitória de flavonas sobre a xantina oxidase, foi mostrado que as 7-hidroxi-flavonas são inibidores competitivos potentes (COTELLE *et al.*, 1996), alguns flavonóides também inibem a atividade da succinato oxidase e da NADH-oxidase de mitocôndrias de fígado de rato, sendo que para alguns deles os efeitos foram mais intensos para a NADH-oxidase (HODNICK *et al.*, 1994).

A primeira atividade dos flavonóides a ter seu mecanismo de ação estudado foi sua ação antioxidante. Essa função aparece em algumas classes e depende do número e posições dos grupos hidroxila, de outros substituintes e ainda da presença de glicosilação. Geralmente as agliconas têm maior atividade antioxidante quando comparado com moléculas glicosiladas (CAI, 2005). Em alguns flavonóides, que não possuem hidroxilas na sua estrutura, não foi evidenciada atividade seqüestradora de radicais, ao contrário de flavonóides que apresentam anel catecol (estrutura orto-diidroxi), os quais possuem alta capacidade antioxidante. Esta atividade aumenta nas seguintes classes: isoflavonas < flavanonas < flavonas < chalconas < flavonols, porém, individualmente alguns compostos destas classes não seguem esta ordem (CAI, 2005). Algumas substituições no anel A e B, assim como na dupla ligação em C<sub>2,3</sub> podem também afetar a atividade antioxidante frente a radicais livres.

Segundo MIRA e colaboradores (2002) a presença do grupo catecol no anel B e o grupo hidroxila na posição 3 do anel C mostraram ser importantes para quelar metais como ferro e cobre. A atividade quelante de metais dos flavonóides pode tornar esses íons inativos para a geração de radicais livres.

Nesse mesmo aspecto, outra função conhecida dos flavonóides é a inibição da lipoperoxidação através de reações envolvendo a doação de átomos de hidrogênio para os radicais peróxil (ROO<sup>•</sup>), inativando-os e promovendo a terminação das reações de peroxidação dos ácidos graxos (ARORA *et al.*, 1998).

A atividade anti-radicalar de vários flavonóides, em relação ao ânion superóxido, foi estudada utilizando vários métodos, como espectroscopia de

ressonância paramagnética (SICHEL *et al.*, 1991) e pela inibição da enzima xantina oxidase (FURUNO *et al.*, 2002). Esta atividade é aumentada com incrementos na concentração do flavonóide na reação, uma atividade anti-radical mais expressiva é observada quando a concentração é superior a 100  $\mu\text{mol/L}$ . O elemento estrutural comum é a configuração do anel C com o grupo hidroxila na posição 3 que ativa a dupla ligação na posição 2,3 e grupos hidroxila no anel B.

A ausência do grupo hidroxila na posição 3 em flavanonas e flavanas diminui sua capacidade antioxidante frente ao radical superóxido, isso também ocorre com a ausência da estrutura catecol no anel B (SICHEL *et al.*, 1991).

De acordo com outros estudos (KAISEROVA, *et al.*, 2007; MIN e EBELER, 2008), flavonóides são excelentes seqüestradores do radical hidroxila; eles parecem também ter uma atividade que depende da sua estrutura. É com base na sua capacidade de seqüestrar os radicais hidroxila que se destaca a importância de substituições na estrutura, ou também quando os grupos hidroxila dão lugar a grupos metóxi.

A atividade antioxidante dos flavonóides também pode estar relacionada com a interação com espécies reativas não-radicalares como o  $^1\text{O}_2$ . Uma fração de biflavonóides obtidos da acícula de *Araucaria angustifolia* se mostrou mais efetiva na proteção contra a quebra da fita de DNA plasmidial pelo  $^1\text{O}_2$  quando comparada com os efeitos da quercetina, ginkgetina, amentoflavona,  $\alpha$ -tocoferol e trolox. Essa fração de biflavonóides também apresentou uma constante de supressão do  $^1\text{O}_2$  maior que a da quercetina, ginkgetina e amentoflavona (YAMAGUCHI *et al.*, 2005).

Foi mostrado que o polifenol (-)-epigallocatequina galato aumenta cerca de 20x a formação de 8-oxodGuo na reação da dGuo com HOCl, mas inibe a oxidação da 8-oxodGuo a dSp. Além disso, este composto inibiu a formação de 8-oxodGuo em DNA (SUZUKI *et al.*, 2004).

A seguir são descritos atividades biológicas e estruturas dos flavonóides utilizados nesse estudo. Esses flavonóides foram escolhidos por pertencerem a três subclasses diferentes (flavona, flavonol e flavanol) (FIGURA 8). As flavonas, flavona e apigenina apresentam uma carbonila em C<sub>4</sub>, uma dupla ligação em C<sub>2,3</sub>, e ausência de hidroxila em C<sub>3</sub>, sendo que a flavona não apresenta nenhuma hidroxila na sua estrutura e a apigenina apresenta duas no

anel A e uma no anel B. Os flavonóis, quercetina e morina apresentam a carbonila em C<sub>4</sub>, uma dupla ligação em C<sub>2,3</sub> e hidroxila em C<sub>3</sub> do anel C, sendo que a diferença entre elas é que as duas hidroxilas do anel B na quercetina formam o grupo catecol. E a flavanol, catequina apresenta a mesma estrutura da quercetina, mas sem a carbonila em C<sub>4</sub> e a dupla ligação em C<sub>2,3</sub>, no anel C, mas foi escolhida por apresentar as hidroxilas na mesma posição que a quercetina.

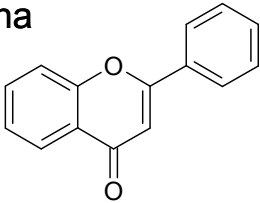
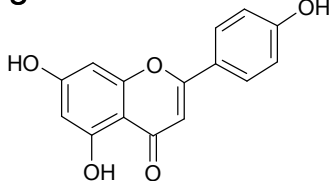
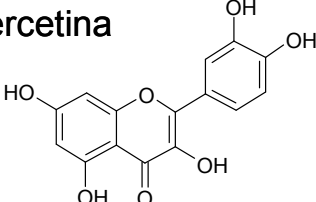
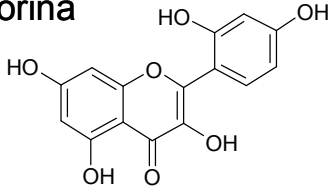
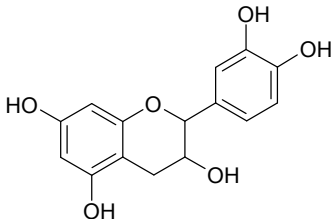
Flavona	<b>Flavona</b> 	<b>Apigenina</b> 
Flavonol	<b>Quercetina</b> 	<b>Morina</b> 
Flavanol	<b>Catequina</b> 	

FIGURA 8 – ESTRUTURA DOS FLAVONÓIDES UTILIZADOS NESSE ESTUDO DIVIDIDOS POR CLASSES

### 2.3.2.1 Flavona

Um dos compostos de grande interesse é a flavona (2-fenil-4H-1-benzopirano-4-ona). A flavona pode ser encontrada em todas as partes das plantas gimnospermas e angiospermas: tronco, folhas, brotos, cascas, cerne, espinhos, rizomas, flores, frutos, sementes, e também na raiz (MARTENS e MITHÖFER, 2005).

Ela afeta a expressão de uma variedade de genes que regulam a proliferação celular e a resposta a danos ao DNA, como a apoptose. Em contraste com os seus efeitos em células malignas, flavona não induz apoptose em células não-malignas, sugerindo que essas células podem ser capazes de recuperar sua capacidade proliferativa. Esses resultados obtidos

com linhagens celulares derivadas de tumores de mama sugerem a possibilidade de que a administração desse flavonóide, isoladamente ou em combinação com a DNA metiltransferase e inibidores de histonas desacetilases, poderia ser uma forma eficaz de quimioterapia (ULLMANNOVA e POPESCU, 2007).

A flavona afeta algumas enzimas responsáveis pela biotransformação de xenobióticos, e já foram relatados efeitos indutores sobre as enzimas glutathione S-transferase, UDP-glicuroniltransferase 1 e isoformas 1A e 2B do citocromo P450 (CANIVENC-LAVIER *et al.*, 1996). O potencial terapêutico da flavona faz deste composto possível alvo para aplicação na área farmacêutica (MARTENS e MITHÖFER, 2005). Estudos epidemiológicos sugeriram que uma alta ingestão de flavona pode estar associada a uma redução de alguns tipos de câncer como, por exemplo, câncer do pulmão e do cólon, além de inflamação crônica, e osteoporose (MIDDLETON *et al.*, 2000; KROMHOUT, 2001; ARTS *et al.*, 2001).

#### 2.3.2.2 Apigenina

A apigenina (4',5,7-trihidroxi-flavona) é uma flavona, e está distribuída nas folhas e caules dos vegetais e das frutas tropicais comuns na dieta, tais como pimenta, aipo, repolho chinês, ervilhas francesas, goiaba, alho-poró, cebolas, tomate, e abóbora (MIEAN e MOHAMED, 2001). A apigenina é encontrada também em bebidas derivadas de plantas tais como o chá e o vinho (F'GUYER *et al.*, 2003).

Assim como com outros flavonóides, a apigenina possui capacidade antitumorigênica, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Estudos realizados por ZHENG e colaboradores (2005) verificaram que a apigenina inibiu o crescimento de células de carcinoma cervical humano (HeLa). Embora estes estudos forneçam evidências para efeitos protetores da apigenina, os mecanismos exatos para a atividade anticarcinogênica desse composto ainda permanece desconhecida.

Alguns efeitos já relatados podem estar relacionados com seus efeitos antitumorais. O tratamento de células de câncer de próstata humana com apigenina resultou na parada da progressão do ciclo celular em G1 que foi associada por uma diminuição na expressão das ciclinas D1, D2 e E. O tratamento também resultou na indução da apoptose determinada pela

fragmentação do DNA, clivagem do PARP e uma alteração na razão Bax/Bcl-2 (GUPTA *et al.*, 2002).

#### 2.3.2.3 Quercetina

A quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxi flavona) é um flavonol e está presente em vários vegetais, frutas, sementes, nozes, chá e vinho tinto (BEECHER *et al.*, 1999; HERTOOG *et al.*, 1992). A eficiente atividade antioxidante dessa molécula está supostamente relacionada com a presença dos grupos 3',4'-dihidroxi (anel catecol), o grupo carbonila em C<sub>4</sub>, o substituinte hidroxila em C<sub>3</sub> e a dupla ligação entre C<sub>2,3</sub>, presentes em sua estrutura.

As propriedades antioxidantes podem estar associadas aos efeitos protetores referentes ao estresse oxidativo, como foi observado em timócitos de ratos pela provável supressão de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e  $\cdot$ OH formado na presença de Fe<sup>2+</sup> (OYAMA *et al.*, 1999).

Numerosos experimentos têm mostrado seu efeito protetor sobre danos em DNA induzidos por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e  $\cdot$ OH, mas, ao mesmo tempo, o radical semiquinona formado pela quercetina quando inativa uma espécie reativa apresenta grande reatividade com grupos tióis, que podem levar a perda de função de proteínas ou mesmo a uma redução dos níveis de glutathiona (GSH) (BOOTS *et al.*, 2007).

A quercetina apresenta atividade pró-oxidante quando em concentrações maiores que 100  $\mu$ mol/L e na presença de Fe<sup>3+</sup>, ela aumenta a formação de  $\cdot$ OH e gera quebras no DNA (LAUGHTON, 1989).

#### 2.3.2.4 Morina

A morina (3,5,7,2',4'-pentahidroxi flavona) é um flavonol encontrado em muitas ervas e frutas. Apresenta-se como um pigmento amarelado claro encontrado na madeira do *Chlorophora tinctori* (MIDDLETON *et al.*, 2000).

A morina é um conservante de alimento (SMITH e HALLIWELL, 1992), inibe a peroxidação lipídica nas micelas e nos microssomas do fígado de rato (CHOLBI *et al.*, 1991). Ela é antimutagênica (KAWABATA *et al.*, 1999) e inibe a produção de NO $\cdot$  em astrócitos-C6 (KIM *et al.*, 1999; RASO *et al.*, 2001), é capaz de sequestrar  $\cdot$ OH (MAKRIS e ROSSITER, 2002).



Quando complexada com  $\text{Cu}^{2+}$ , a morina apresenta uma ligação efetiva com o DNA de maneira intercalada (SONG *et al.*, 2002). A morina também pode alterar a replicação e o reparo do DNA interagindo com a topoisomerase I (BOEGE *et al.*, 1996).

#### 2.3.2.5 Catequina

A catequina (3',4',3,5,7-pentahidroxi-flavona), é um flavanol monomérico, apresenta atividade seqüestradora de  $\cdot\text{OH}$  (BORS e MICHEL, 1999) e  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (FUKUMOTO e MAZZA, 2000). A catequina tem uma atividade seqüestradora do  $\text{ROO}^{\cdot}$  dez vezes maior do que o L-ascorbato e o  $\beta$ -caroteno quando testado em bactérias (NAKAO *et al.*, 1998). Além disso, pode quelar o ferro (MOREL *et al.*, 1993).

Diversos estudos epidemiológicos e outros *in vitro* sugerem que a catequina tem efeitos benéficos na saúde humana, na proteção de doenças cardíacas e na inibição da oxidação de lipoproteína de baixa densidade (ISHIKAWA *et al.*, 1997; YAMANAKA *et al.*, 1997) e isquemia miocárdial (ARTS *et al.*, 2001).

Por outro lado, SCOTT *et al.*, (1993) relataram que as catequinas exercem uma ação pró-oxidante acelerando os danos em DNA na presença do complexo bleomicina-ferro.

#### 2.3.2.6 Estudos comparativos de flavonóides sobre atividade antioxidante

Os flavonóides podem gerar seus efeitos protetores contra radicais livres em sistemas biológicos através de suas habilidades antioxidantes e quelantes de metais (HEIM *et al.*, 2002). Os flavonóides interferem tanto nas reações de propagação de radicais livres, quanto na formação destes (VAN ACKER *et al.*, 1996). Certos flavonóides são capazes de inibir enzimas mitocondriais, o que contribui para sua atividade antineoplásica e sua citotoxicidade (HODNICK *et al.*, 1994).

Alguns trabalhos recentes destacam importantes propriedades dos flavonóides nos mais diversos sistemas. MUKAI *et al.* (2005) e NAGAI *et al.* (2005) determinaram as constantes de reação de alguns flavonóides na supressão de  $^1\text{O}_2$  em solução de etanol. Foi observado que a flavona apresenta o menor valor ( $< 3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) como mostrado na TABELA 2. Isso

pode indicar que a flavona é, entre os flavonóides estudados, a que apresenta a menor atividade de supressão de  $^1\text{O}_2$ , deixando-o livre para reagir com outras biomoléculas quando está presente no sistema. Por sua vez, a quercetina mostrou a maior constante de reação, implicando que baixas concentrações desse composto já poderiam exercer um efeito protetor ao ataque do  $^1\text{O}_2$ .

TABELA 2 – CONSTANTE DE REAÇÃO DOS FLAVONÓIDES COM O OXIGÊNIO SINGLETE.

FLAVONÓIDES	CONSTANTE DE REAÇÃO $k_q$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )
Flavona	$< 3 \times 10^5$
Apigenina	$2,84 \times 10^7$
Quercetina	$4,57 \times 10^8$
Catequina	$1,09 \times 10^7$

FONTE: adaptado de MUKAI *et al.* (2005); NAGAI *et al.* (2005)

MELIDOU *et al.* (2005) fizeram um tratamento de células JURKAT com  $\text{H}_2\text{O}_2$  na presença de diferentes flavonóides, medindo quebras no DNA celular por ensaio cometa, avaliaram também a capacidade dos flavonóides em quelar ferro (TABELA 3). Nesse trabalho, os autores concluíram que todos os flavonóides que apresentavam o grupo dihidróxi (exceto a catequina) tinham grande atividade de proteger a quebra do DNA exposto ao  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A presença do grupo hidroxila na posição 3 do anel C e a função carbonila na posição 4 contribuía efetivamente para a capacidade dos flavonóides em proteger o DNA, assim como a presença da dupla ligação em  $\text{C}_{2-3}$  aumentava essa capacidade. A flavona, apigenina e catequina não apresentaram atividade até a dose de  $500 \mu\text{mol/L}$ . Os autores também testaram a capacidade de quelar ferro e a quercetina foi também mais efetiva do que a morina e isso foi atribuído ao grupo catecol no anel B, que, entre esses dois compostos, somente a quercetina apresenta.

TABELA 3 – ATIVIDADE DE PROTEÇÃO DO DNA E CAPACIDADE DE QUELAR FERRO DOS FLAVONÓIDES.

FLAVONÓIDE	IC <sub>50</sub>	EC <sub>50</sub>
Flavona	Não exhibe	Não exhibe
Apigenina	Não exhibe	Não exhibe
Quercetina	5,4 ± 1,2	13
Morina	496,2 ± 5,2	398
Catequina	Não exhibe	Não exhibe

FONTE: adaptado de MELIDOU *et al.* (2005).

NOTA: IC<sub>50</sub> são valores que representam a concentração de flavonóide que oferece 50% de proteção contra dano ao DNA celular induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. EC<sub>50</sub> são valores que representam a concentração de flavonóides capaz de abstrair 50% de ferro intracelular ligado à calceína.

BURDA e OLESZEK (2001) determinaram a atividade antioxidante de alguns flavonóides com relação à proteção da oxidação do β-caroteno em soluções aquosas e também a atividade anti-radicalar em estudos com 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH), que é um radical muito utilizado nesse tipo de estudo (TABELA 4). O grupo de flavonóides que apresentou a maior atividade antioxidante foi aquele que apresentava uma hidroxila livre em C<sub>3</sub> do anel C. Isso sugere, segundo os autores, que esse grupo é o responsável pela inibição da oxidação do β-caroteno e no seqüestro do radical DPPH. Ficou evidenciado também, principalmente na quercetina, que os flavonóides perdem essa capacidade antioxidante quando essa hidroxila é metilada ou glicosilada. Outra parte importante na estrutura dos flavonóides que apresentaram essa atividade é a presença da dupla ligação entre C<sub>2-3</sub>. Os flavonóides que não apresentam na sua estrutura nenhum grupo hidroxila livre ou com esse grupo nas posições 5 e/ou 7 não apresentaram atividade antioxidante nem anti-radicalar. Todos os flavonóides que tiveram uma resposta anti-radicalar positiva apresentavam uma hidroxila livre na posição 4', sugerindo que esse grupo é essencial para essa atividade. Dentre os flavonóides com essa característica, apenas a apigenina não apresentou um resultado satisfatório.

TABELA 4 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-RADICALAR DE ALGUNS FLAVONÓIDES.

FLAVONÓIDE	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (%) <sup>a</sup>	ATIVIDADE ANTI-RADICALAR (%) <sup>b</sup>
Flavona	- 1,5	1,5
Apigenina	- 78,8	0,7
Quercetina	63,6	89,8
Morina	63,5	96,5

FONTE: adaptado de BURDA e OLESZEK (2001)

NOTA: **a** Valores baseados na percentagem de proteção do  $\beta$ -caroteno em emulsões aquosas; **b** Valores correspondentes a atividade anti-radical em estudos com DPPH

OHSHIMA *et al.* (1998), mediram a ação de alguns flavonóides em relação à formação de 8-nitroguanina e à quebra do DNA quando este era exposto a peroxinitrito. Os resultados desse estudo são apresentados na TABELA 5. Para observar a inibição da quebra do DNA simples fita foi incubado o DNA com peroxinitrito (0,5 mmol/L) na presença de 0,1 % de dimetilformamida (DMF) na presença de duas concentrações diferentes dos flavonóides testados (0,05 e 0,5 mmol/L). Todos os flavonóides testados promoveram eficiente proteção nesse estudo, sendo que a catequina foi a que apresentou a atividade mais efetiva. No mesmo estudo foi medida também a formação da 8-nitroguanina, na presença de três concentrações diferentes dos flavonóides (0,01, 0,1 e 1 mmol/L). Nessas condições, catequina, morina e quercetina apresentaram uma inibição de 100 % na maior dose testada. A apigenina também apresentou uma boa inibição (77 %), mas menos efetiva quando comparada com os outros flavonóides desse estudo. Esses dados são importantes, pois deixa-nos claro que os flavonóides testados são capazes de proteger o DNA simples fita impedindo a sua quebra quando está na presença de um forte oxidante, como o peroxinitrito, assim como protegem efetivamente a Gua, impedindo a formação da 8-nitroguanina.

MIN e EBELER (2008) mediram atividade de alguns flavonóides contra a formação da 8-oxodGuo em DNA na presença de  $H_2O_2$  e  $Fe^{2+}$ . Nesse trabalho a quercetina promoveu uma diminuição significativa nas concentrações de 0,1 a 100  $\mu$ mol/L, mas de forma dose independente. A

morina promoveu um aumento na formação de 8-oxodGuo na dose 100  $\mu\text{mol/L}$  e a catequina protegeu até a dose de 10  $\mu\text{mol/L}$ .

TABELA 5 – ATIVIDADE DE ALGUNS FLAVONÓIDES CONTRA A QUEBRA DO DNA E A FORMAÇÃO DA 8-NITROGUANINA.

Flavonóide	Inibição (%) do dano mediado por peroxinitrito				
	Quebra da fita do DNA <sup>a</sup>		8-nitroguanina <sup>b</sup>		
	50 $\mu\text{mol/L}$	500 $\mu\text{mol/L}$	10 $\mu\text{mol/L}$	100 $\mu\text{mol/L}$	1000 $\mu\text{mol/L}$
Apigenina	54	55	8	36	77
Quercetina	42	73	24	95	100
Morina	4	57	21	74	100
Catequina	85	97	33	92	100

FONTE: adaptado de OHSHIMA *et al.*, (1998)

NOTA: **a** Peroxinitrito 0,5mM induz a formação de 3,69 quebra da fita do DNA por 104 bp na presença de 0,1% de DMF. **b** DNA de timo de bezerro (1 mg) incubado com 0,1 mmol/L de peroxinitrito em 0,1 mol/L de tampão fosfato de sódio, pH 7, contendo 100  $\mu\text{mol/L}$  de DTPA, 0,1 % DMF e 0-1 mmol/L do flavonóide (pH<sub>final</sub> 7,5).

DEVASAGAYAM *et al.*, (1995) verificaram a atividade de alguns flavonóides (catequina, apigenina e quercetina) frente à quebra do plasmídeo pBR322 pelo  $^1\text{O}_2$  quando incubado com NDPO<sub>2</sub>. Eles testaram uma concentração fixa (100  $\mu\text{mol/L}$ ) dos flavonóides e como resultado eles verificaram que a catequina inibe até 30,3%, a apigenina até 7,9% e a quercetina não apresenta inibição.

Na maioria dos estudos descritos na literatura destacados nessa revisão, os efeitos dos flavonóides são verificados principalmente frente a espécies radiculares, entretanto muito pouco foi mostrado quando a espécie reativa é o  $^1\text{O}_2$  (não-radicalar). Destaca-se ainda que oxidação da dGuo pelo  $^1\text{O}_2$  já está bem estabelecida quanto ao seu mecanismo de reação e produtos formados em solução aquosa ou em DNA, além disso, existe uma importância biológica associada ao estudo desse sistema. Dada a complexidade dos sistemas celulares, este trabalho propõe em estudar os efeitos de alguns flavonóides frente a oxidação da guanina pelo  $^1\text{O}_2$  em sistemas controlados, visando um entendimento mais direto da ação desses compostos na reação.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Determinar o efeito de diferentes flavonóides na oxidação da guanina como nucleosídeo (2'-desoxiguanosina) e no DNA pelo  $^1\text{O}_2$  em solução aquosa.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Preparação dos endoperóxidos DHPNO<sub>2</sub> e NDPO<sub>2</sub> geradores de  $^1\text{O}_2$ .
- Oxidação da dGuo em solução aquosa pelo  $^1\text{O}_2$  gerado pela termodecomposição do endoperóxido NDPO<sub>2</sub> na presença de diferentes concentrações de flavonóides e detecção dos diferentes produtos formados (8-oxodGuo e dSp) pela técnica de HPLC.
- Oxidação de DNA do plasmídeo pBluescript SK pelo  $^1\text{O}_2$  gerado pela termodecomposição de endoperóxido DHPNO<sub>2</sub> na presença de diferentes concentrações de flavonóides e detecção da forma circular aberta (CA) e superenovelada (SE) por gel de agarose.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

Os reagentes NDP e DHPN foram sintetizados anteriormente como descrito em DI MASCIO e SIES (1989) e MARTINEZ *et al.* (2000b) e foram disponibilizados para utilização nesse estudo. A dGuo, a 8-oxodGuo, o DMSO e os flavonóides (flavona, apigenina, quercetina, morina e catequina) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O plasmídeo pBluescript SK foi cedido gentilmente pelo Prof. Paolo Di Mascio (USP). A enzima formamidopirimidina glicosilase de *Escherichia coli* (enzima FPG) foi adquirida de New England BioLabs. Os solventes acetonitrila e metanol, usados nas análises de HPLC foram adquiridos da J.T Backer. Os demais sais utilizados nos experimentos eram de alta pureza comercialmente disponível.

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Síntese dos endoperóxidos

##### 4.2.1.1 Síntese do endoperóxido da 3,3'-(1,4-naftilideno) dipropanoato de sódio (NDPO<sub>2</sub>)

Em um tubo para centrífuga contendo um agitador magnético foram colocados 10 mL de uma solução de 0,5 M de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> em tampão 0,1 M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> / NaHCO<sub>3</sub> pH 10-11. Em seguida, foi acrescentado 1 g do NDP. O tubo permaneceu em banho de água com temperatura de 20 °C durante todo o processo.

Sob agitação contínua, acrescentou-se 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35 % comercial) na solução, a qual ficou marrom avermelhada com liberação intensa de O<sub>2</sub>. Após 14 min, aproximadamente, a solução ficava amarelo-ouro e, então, acrescentou-se mais 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Essa operação foi repetida por mais quatro vezes, sendo que ao final da última adição a solução permaneceu agitando por 20 min, ao invés de 14 min como feito anteriormente.

Após o término dos 20 minutos finais, o tubo foi resfriado em um banho de água e gelo, e 10 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2 M foram acrescentados lentamente e sob agitação para precipitar a forma diácido do endoperóxido.

Em seguida, o sistema foi centrifugado a 7000 rpm, 4 °C, por 2 min. O sobrenadante, de coloração amarela, foi descartado. Acrescentou-se 20 mL de água fria ao sólido, agitou-se e centrifugou-se nas mesmas condições citadas anteriormente, descartando novamente o sobrenadante obtido. Seguiu-se o mesmo procedimento para lavar mais duas vezes o sólido com 20 mL de água fria.

O tubo, contendo o sólido obtido após todas as lavagens, foi colocado no gelo. Acrescentou-se lentamente e sob agitação NaOH 2 M até completa solubilização do precipitado. A solução obtida foi separada em frações que foram congeladas imediatamente a -80 °C.

#### 4.2.1.2 Síntese do endoperóxido da *N,N'*-di(2,3-dihidroxiopropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida (DHPNO<sub>2</sub>)

Para preparação do endoperóxido da DHPN foi utilizado o método fotoquímico convencional. Em 2 mL de água deuterada foram dissolvidos sob leve aquecimento 200 mg de DHPN. A reação se processou a 4 °C. Foram acrescentados 10 µL de uma solução de azul de metileno (5 mg/mL) e a solução foi irradiada com uma lâmpada de 500 W sob borbulho de oxigênio constante por 5 h. Resina Chelex<sup>®</sup> 100 foi acrescentada e a solução foi agitada por 20 min a 4 °C até completa fixação do azul de metileno. A solução foi filtrada em uma membrana polimérica (0.45 µm) e estocada a -80 °C.

#### 4.2.2 Avaliação do efeito dos flavonóides na oxidação da dGuo por <sup>1</sup>O<sub>2</sub>

##### 4.2.2.1 Incubação do endoperóxido NDPO<sub>2</sub> com 2'-desoxiguanosina e flavonóides

Para quantificação dos produtos de oxidação da dGuo foram preparadas soluções contendo 1 mmol/L de dGuo, 5 mmol/L do endoperóxido NDPO<sub>2</sub> e diferentes concentrações dos flavonóides escolhidos dissolvidos em DMSO (1-200 µmol/L), utilizando um tampão fosfato de sódio 60 mmol/L, pH 7. Todas soluções foram incubadas a 37 °C por 2,5 h, tendo em vista que esse é o tempo necessário para que a termólise do endoperóxido seja completa (PIERLOT *et al.*, 2000).



#### 4.2.2.2 Detecção da dGuo e da 8-oxodGuo

A detecção e quantificação da 8-oxodGuo foram feitas por HPLC como descrito por SHIGENAGA *et al.*, (1990), usando o detector eletroquímico ESA Colouchem III, com potenciais 130 e 380 mV para 8-oxodGuo e detector UV programado em 254 nm para detecção da dGuo. A coluna utilizada foi a LC-18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m) da Metachem mantida à temperatura de 30°C. A separação dos produtos foi feita com fluxo de 0,8 mL/min de forma isocrática para os padrões (tempo total de corrida de 15 min) com fase móvel constituída por 10 % MeOH em solução 4 mmol/L de ácido cítrico e 8 mmol/L de acetato de amônio com 20 mg/L de EDTA em pH 4,0. Para as amostras da incubação, a separação foi feita de maneira isocrática, como a utilizada nos padrões e a limpeza da coluna para retirar o NDP foi feita usando um gradiente da percentagem de MeOH que chega até 70% no tempo máximo de 25 min a cada quatro amostras injetadas.

As soluções de 8-oxodGuo e dGuo tiveram suas concentrações aferidas por medida no espectrofotômetro ( $\epsilon$  da 8-oxodGuo em  $\lambda = 293$  nm:  $9700 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$  e  $\epsilon$  da dGuo em  $\lambda = 254$  nm:  $13000 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ ) para o preparo das soluções que foram utilizadas na elaboração da curva de calibração. Foram injetadas amostras de 60  $\mu$ L de cada solução da incubação de dGuo com os endoperóxidos, num “loop” de 20  $\mu$ L do HPLC.

#### 4.2.2.3 Detecção dos dSp

A detecção e quantificação dos diastereoisômeros da dSp foram feitas por HPLC como descrito por MARTINEZ *et al.* (2002) usando o equipamento de HPLC e detector UV programado para detecção em comprimento de onda de 230 nm para a dSp e 254 nm para a dGuo. A coluna usada foi a LC-NH<sub>2</sub> (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m) da Phenomenex. A separação foi feita de forma isocrática com fluxo de 0,8 mL/min, sendo a fase móvel constituída por 85 % de ACN em uma solução 25 mM de formiato de amônio.

A solução padrão dos diastereoisômeros da dSp foi obtida pela fotossensibilização da dGuo com azul de metileno (RAVANAT e CADET, 1995; NILES *et al.*, 2001). A reação foi processada a temperatura a 15 °C. Nesse frasco, 5 mL de solução 10 mmol/L de dGuo contendo 10  $\mu$ L de uma solução 5

mg/mL de azul de metileno (AM) é irradiada com uma lâmpada de 500 W com filtro “cut-off” 590 nm, sob borbulho de oxigênio constante por 2 h.

As frações coletadas, correspondentes aos diastereoisômeros da dSp, foram reunidas, liofilizadas e dissolvidas na fase móvel usada para sua separação. A concentração foi aferida por medida no espectrofotômetro usando, nesse caso, o coeficiente de extinção em  $\lambda = 230$  nm ( $5240 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ ) publicado para os diastereoisômeros da dSp (RAVANAT e CADET, 1995). Foram injetadas amostras de 60  $\mu\text{L}$  de cada solução num “loop” de 20  $\mu\text{L}$  do HPLC.

#### 4.2.3 Avaliação do efeito dos flavonóides na oxidação do DNA por $^1\text{O}_2$

##### 4.2.3.1 Incubação do endoperóxido com DNA plasmidial e flavonóides

Foram preparadas soluções contendo 10 ng/ $\mu\text{L}$  de plasmídeo pBluescript SK, 20 mmol/L do endoperóxido DHPNO<sub>2</sub> e diferentes concentrações dos flavonóides escolhidos (50-200  $\mu\text{mol/L}$ ) dissolvidos em DMSO. Em todas as soluções foram adicionados 2  $\mu\text{L}$  de ácido fosfórico 2 mmol/L, 1  $\mu\text{L}$  de ácido acético 10% e 2  $\mu\text{L}$  de hidróxido de sódio 2 mmol/L para acertar o pH em 7. As soluções foram incubadas a 37 °C por 2,5 h, tendo em vista que esse é o tempo necessário para que a termólise do endoperóxido seja completa (PIERLOT *et al.*, 2000). Em seguida as amostras foram divididas em duas alíquotas e metade foi incubada (1:1) com a enzima FPG diluída 1:1000 no tampão (40 mmol/L Tris-HCl; 2 mmol/L EDTA; 100 mmol/L KCl; pH 8) e a outra metade das alíquotas foi incubada na presença desse tampão sem a enzima a 37°C por 30 minutos. As amostras foram comparadas com um controle negativo (somente o plasmídeo) e um controle positivo (plasmídeo + endoperóxido).

##### 4.2.3.2 Detecção da forma circular aberta do plasmídeo pBluescript SK

Às amostras foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  do corante (Solução de Ficoll 25%, EDTA 1 mmol/L, tris/HCl 10 mmol/L pH 8 e azul de bromofenol 0,01%) e através de uma eletroforese contendo gel 1% w/v de agarose dissolvido no tampão TBE (tris/HCl 90 mmol/L; EDTA 2,5 mmol/L; ácido bórico 90 mmol/L

pH 8) foi separado a forma circular aberta (CA) da forma super enovelada (SE) do plasmídeo, numa cuba eletroforética conectada a uma fonte de 60 V por aproximadamente 3 h. Depois de terminada a corrida, transferiu-se o gel para uma cuba que continha o revelador brometo de etídeo (1 mg/mL) e após 15min o gel foi visualizado sob luz ultravioleta (312 nm) em transiluminador EC<sub>3</sub> System – UVP BioImaging System (UVP, Inc. Upland, CAUSA).

#### **4.3 Análise estatística**

Os dados experimentais foram expressos como sendo a média  $\pm$  desvio padrão (média  $\pm$  DP), submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados diferentes estatisticamente significativos.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeito da concentração de flavonóides na oxidação da 2'-desoxiguanosina por $^1\text{O}_2$

A quantificação dos produtos formados foi feita com base nas curvas de calibração, geradas a partir de injeções de quantidades conhecidas dos compostos analisados como é mostrado na FIGURA 9 para a dGuo, na FIGURA 10 para a 8-oxodGuo e na FIGURA 11 para a dSp.

Os resultados da incubação da dGuo livre com o endoperóxido e diferentes concentrações de flavonóides foram apresentados pela percentagem da razão [produto formado]/[dGuo] em relação ao controle.

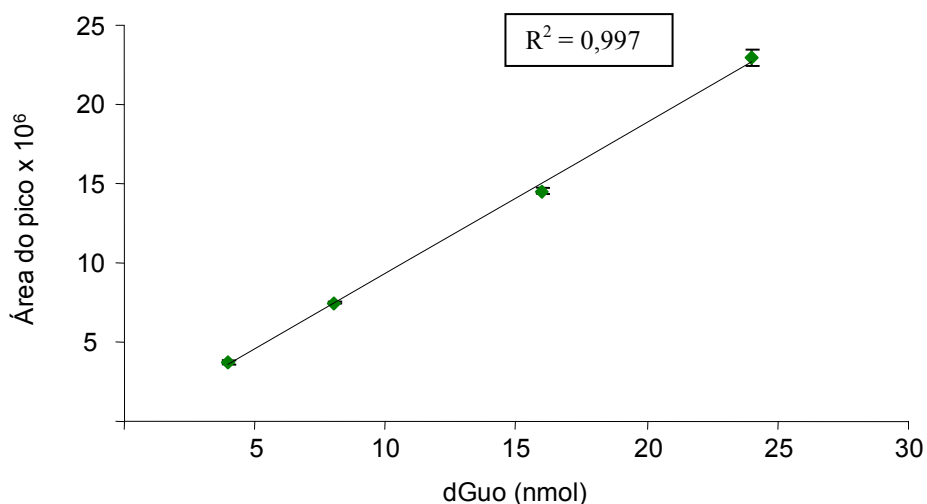


FIGURA 9 – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DA dGUO

FONTE: o autor (2008)

NOTA: Curva de calibração da dGuo. Foram injetadas no HPLC concentrações conhecidas do composto em triplicata e os resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Condições de análise conforme item 4.2.2.2

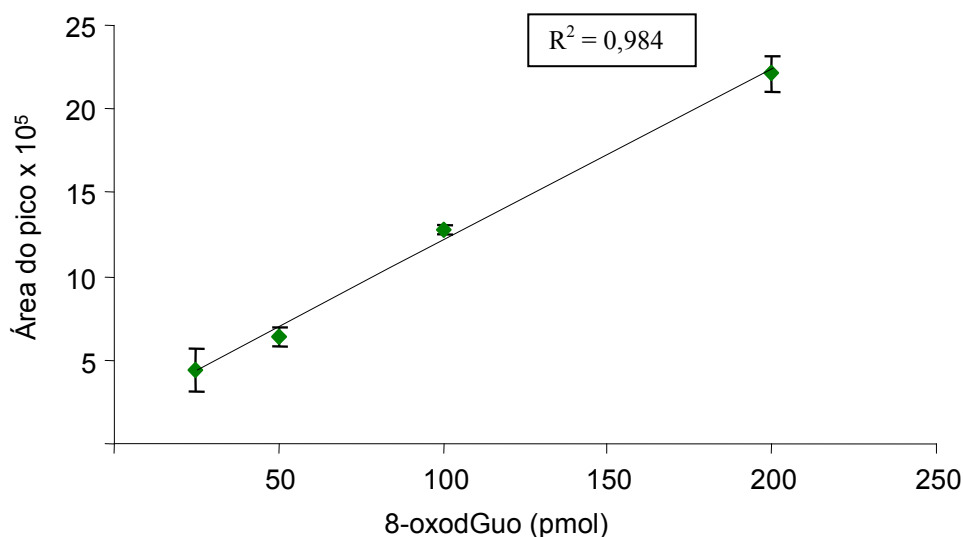


FIGURA 10 – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DA 8-OXODGUO

FONTE: o autor (2008)

NOTA: Curva de calibração da 8oxo-dGuo. Foram injetadas no HPLC concentrações conhecidas do composto em triplicata e os resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Condições de análise conforme item 4.2.2.2

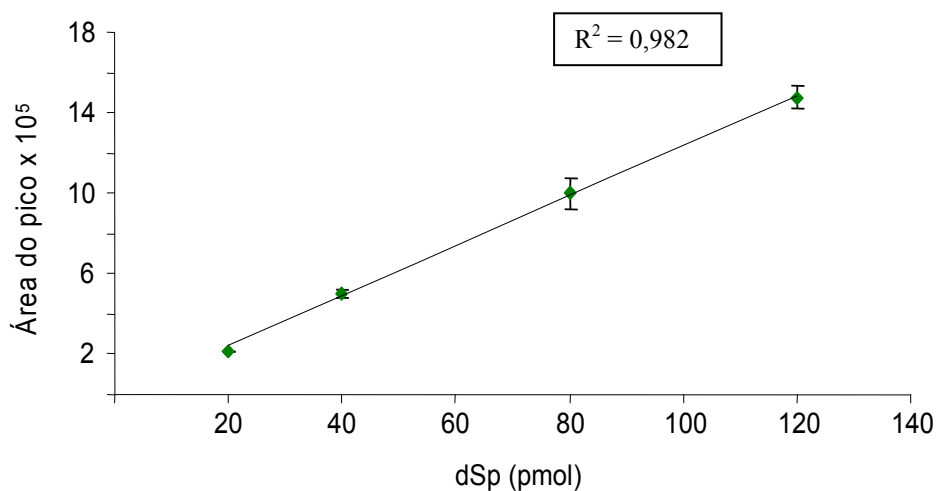


FIGURA 11 – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DA dSp

FONTE: o autor (2008)

NOTA: Curva de calibração da dSp. Foram injetadas no HPLC concentrações conhecidas do composto em triplicata e os resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Condições de análise conforme item 4.2.2.3

Os compostos foram analisados através de seus cromatogramas e confirmados pelos seus espectros de absorbância já relatados na literatura como nos mostra a FIGURA 12.

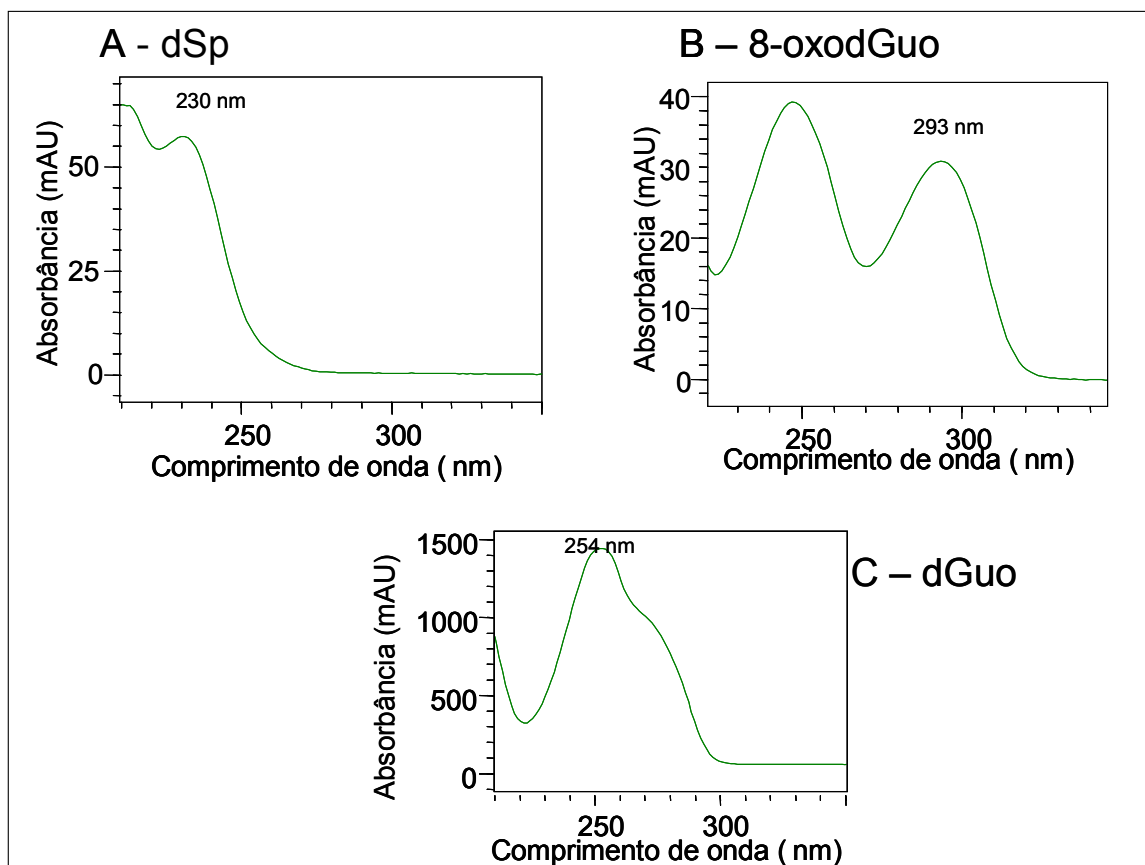


FIGURA 12 – ESPECTROS DE ABSORBÂNCIA DOS COMPOSTOS ANALISADOS

FONTE: o autor (2008)

NOTA: Espectros de absorção dos compostos. (A) dSp; (B) 8-oxodGuo; (C) dGuo.

Nas figuras subseqüentes são apresentados exemplos dos cromatogramas que foram utilizados para a detecção dos produtos formados após a oxidação da dGuo.

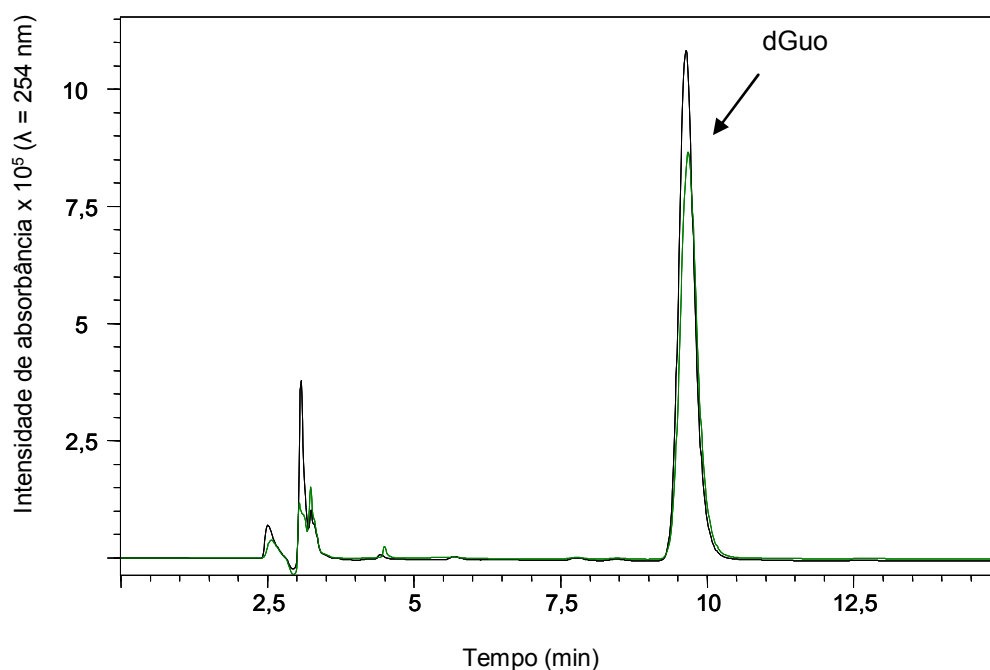


FIGURA 13 – CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DA DETECÇÃO DA dGUO

FONTE: o autor (2008)

NOTA: Cromatograma representativo para a detecção UV em 254nm, condições de análise conforme item 4.2.2.2. Em preto está representado a dGuo (1 mmol/L) incubada por 2,5 h com o NDPO<sub>2</sub> (5 mmol/L). Em verde, dGuo (1 mmol/L) incubada por 2,5 h com o NDPO<sub>2</sub> (5 mmol/L) e apigenina (200 μmol/L).

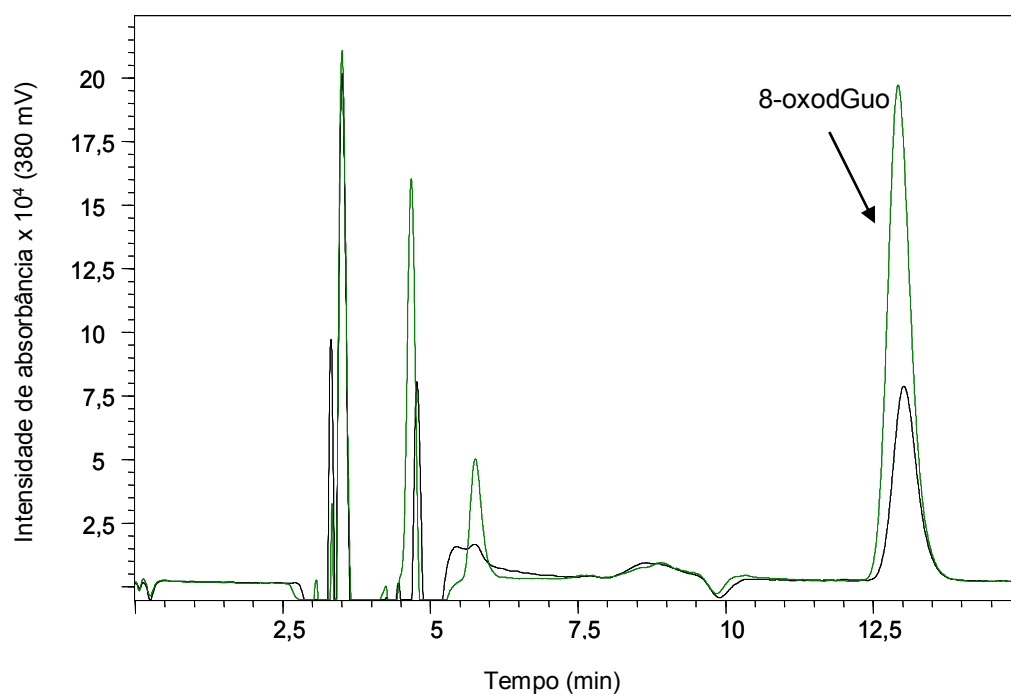


FIGURA 14 – CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DA DETECÇÃO DA 8-oxodGUO

FONTE: o autor (2008)

NOTA: Cromatograma representativo para a detecção eletroquímica em 380 mV, condições de análise conforme item 4.2.2.2. Em preto está representado a 8-oxodGuo formada a partir da dGuo (1 mmol/L) incubada por 2,5 h com o NDPO<sub>2</sub> (5 mmol/L). Em verde, dGuo (1 mmol/L) incubada por 2,5 h com o NDPO<sub>2</sub> (5 mmol/L) e apigenina (200 μmol/L).



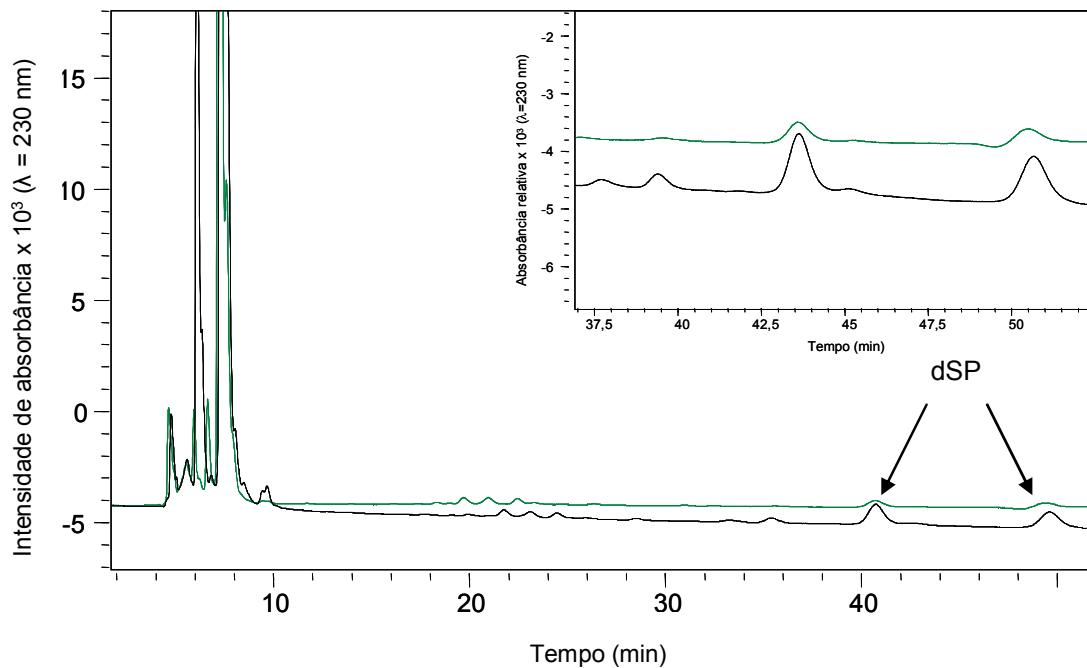


FIGURA 15 – CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DA DETECÇÃO DA dSP

FONTE: o autor (2008)

NOTA: Cromatograma representativo para a detecção UV em 230 nm, condições de análise conforme item 4.2.2.3. Em preto está representado a dGuo (1 mmol/L) incubada por 2,5 h com o NDPO<sub>2</sub> (5 mmol/L). Em verde temos a dGuo (1 mmol/L) incubada por 2,5 h com o NDPO<sub>2</sub> (5 mmol/L) mais apigenina (25 µmol/L). Em destaque está a região do cromatograma em que são visualizados os picos dos diastereoisômeros da dSp.

A seguir serão apresentados os resultados obtidos na presença dos flavonóides.

A FIGURA 16 mostra que quando a dGuo foi incubada com o endoperóxido na presença de flavona, percebe-se que houve uma diminuição na formação da 8-oxodGuo em torno de 25% em relação ao controle nas concentrações de 100 e 200  $\mu\text{mol/L}$ .

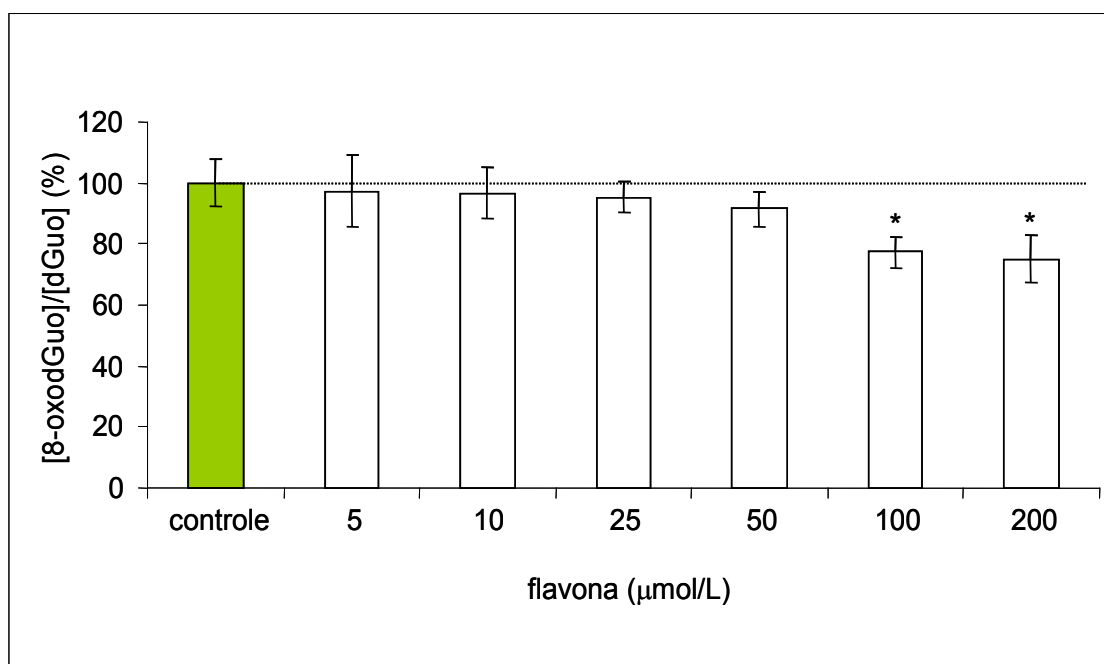


FIGURA 16 – DETECÇÃO DA 8-OXODGUO, NA INCUBAÇÃO DA dGUO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FLAVONA

FONTE: o autor (2008)

NOTA: Quantidades de 8-oxodGuo formada na presença de diferentes concentrações de flavona na reação de dGuo (1 mmol/L) com NDPO<sub>2</sub> (5 mmol/L) detectadas pelo detector eletroquímico (380 mV) no HPLC com condições de análise conforme item 4.2.2.2. Controle: dGuo (1 mmol/L) + NDPO<sub>2</sub> (5 mmol/L) + DMSO 0,05 %. Os resultados são média  $\pm$  desvio padrão do experimento em triplicata. (\*) Valores diferentes significativamente em relação ao controle com  $n = 3$  e  $p < 0,05$ .

Na FIGURA 17 percebe-se que quando a dGuo foi incubada com o endoperóxido na presença de flavona, houve uma diminuição de cerca de 30% na formação da dSp em todas as doses testadas.

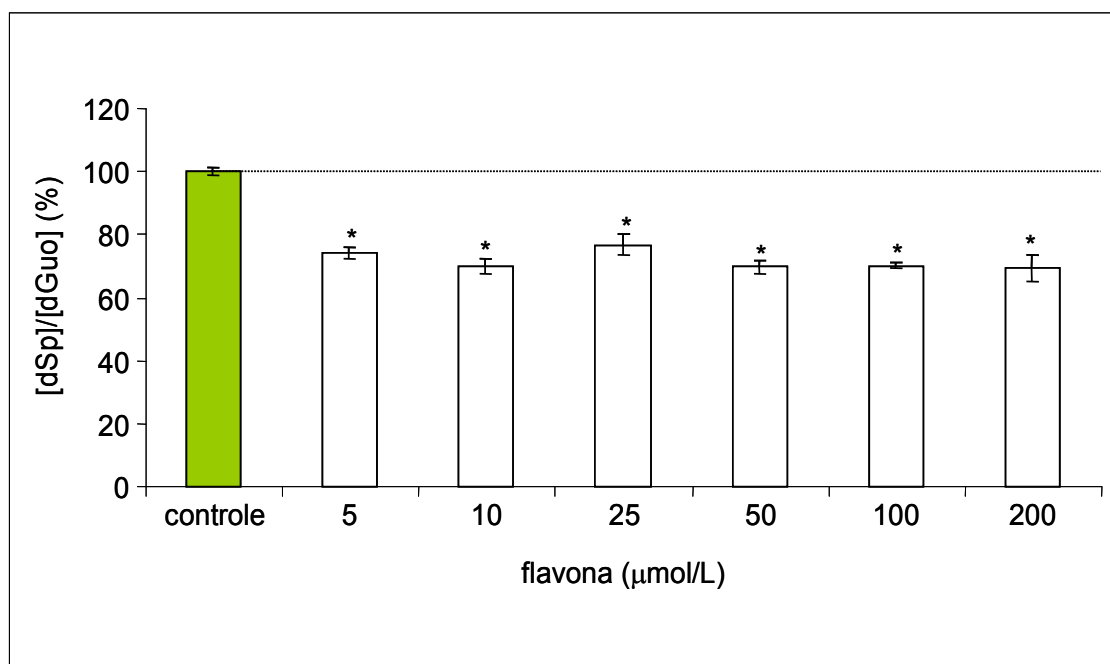


FIGURA 17 – DETECÇÃO DA dSp, NA INCUBAÇÃO DA dGUO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FLAVONA

FONTE: o autor (2008)

NOTA: Quantidades de dSp formada na presença de diferentes concentrações de flavona na reação de dGuo (1 mmol/L) com NDPO<sub>2</sub> (5 mmol/L) detectadas pelo detector UV (230 nm) no HPLC com condições de análise conforme item 4.2.2.3. Controle: dGuo (1 mmol/L) + NDPO<sub>2</sub> (5 mmol/L) + DMSO 0,05 %. Os resultados são média  $\pm$  desvio padrão do experimento em triplicata. (\*) Valores diferentes significativamente em relação ao controle com n = 3 e p < 0,05.

A FIGURA 18 mostra que, quando a dGuo foi incubada com o endoperóxido na presença de apigenina, não houve diferença na formação da 8-oxodGuo em relação ao controle nas doses de até 50  $\mu\text{mol/L}$ , porém, nas doses maiores houve um aumento significativo na formação desse produto, passando dos 250% na concentração de 100  $\mu\text{mol/L}$  e mais de 600% na dose de 200  $\mu\text{mol/L}$ .

A FIGURA 19 mostra que quando a dGuo foi incubada com o endoperóxido na presença de apigenina, houve uma diminuição significativa na formação da dSp variando de 18 a 70% em todas as doses testadas, de maneira independente da concentração.

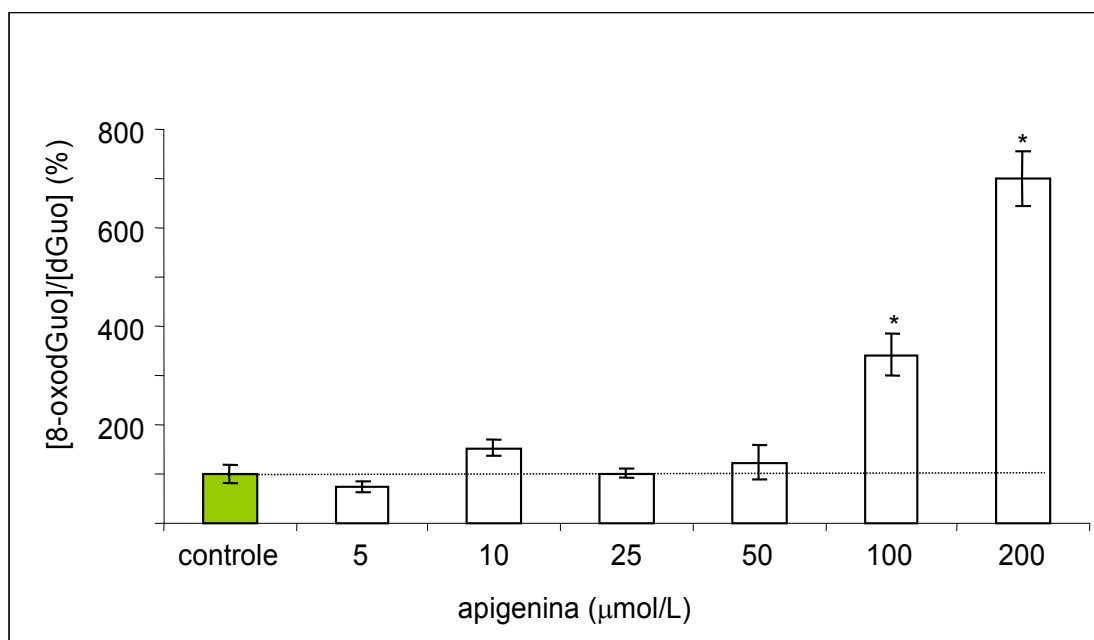


FIGURA 18 – DETECÇÃO DA 8-OXOdGUO, NA INCUBAÇÃO DA dGUO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE APIGENINA

FONTE: o autor (2008)

NOTA: Quantidades de 8-oxodGuo formada na presença de diferentes concentrações de apigenina na reação de dGuo (1 mmol/L) com NDPO<sub>2</sub> (5 mmol/L) detectadas pelo detector eletroquímico (380 mV) no HPLC com condições de análise conforme item 4.2.2.2. Controle: dGuo (1 mmol/L) + NDPO<sub>2</sub> (5 mmol/L) + DMSO 0,05 %. Os resultados são média ± desvio padrão do experimento em triplicata. (\*) Valores diferentes significativamente em relação ao controle com n = 3 e p < 0,05.

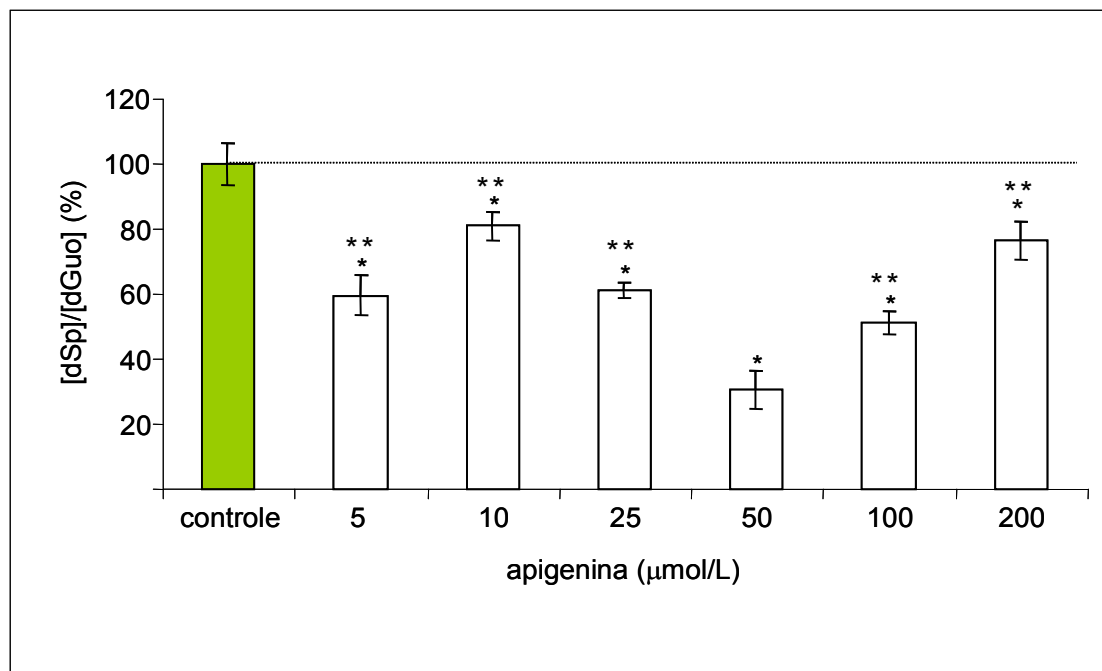


FIGURA 19 – DETECÇÃO DA dSP, NA INCUBAÇÃO DA dGUO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE APIGENINA

FONTE: o autor (2008)

NOTA: Quantidades de dSp formada na presença de diferentes concentrações de apigenina na reação de dGuo (1 mmol/L) com NDPO<sub>2</sub> (5 mmol/L) detectadas pelo detector UV (230 nm) no HPLC com condições de análise conforme item 4.2.2.3. Controle: dGuo (1 mmol/L) + NDPO<sub>2</sub> (5 mmol/L) + DMSO 0,05 %. Os resultados são média ± desvio padrão do experimento em triplicata. (\*) Valores diferentes significativamente em relação ao controle com n = 3 e p < 0,05. (\*\*) Valores diferentes significativamente em relação a amostra contendo 50 µmol/L de apigenina com n = 3 e p < 0,05.

Quando a dGuo foi incubada com o endoperóxido na presença de quercetina, observa-se que a formação da 8-oxodGuo é aumentada significativamente, variando de 70 a 160% com as doses de 5 a 50  $\mu\text{mol/L}$ , e nas doses de 100 e 200  $\mu\text{mol/L}$  observa-se um aumento menor da produção de 8-oxodGuo em relação ao controle (120 e 60%, respectivamente), como é mostrado na FIGURA 20.

A FIGURA 21 mostra que quando a dGuo foi incubada com o endoperóxido na presença de quercetina, houve uma diminuição na formação da dSp em todas as doses testadas, variando numa proteção de 18 a 50% de maneira independente da concentração, sendo significativamente diferente do controle nas doses de 10, 25, 50 e 200  $\mu\text{mol/L}$ .

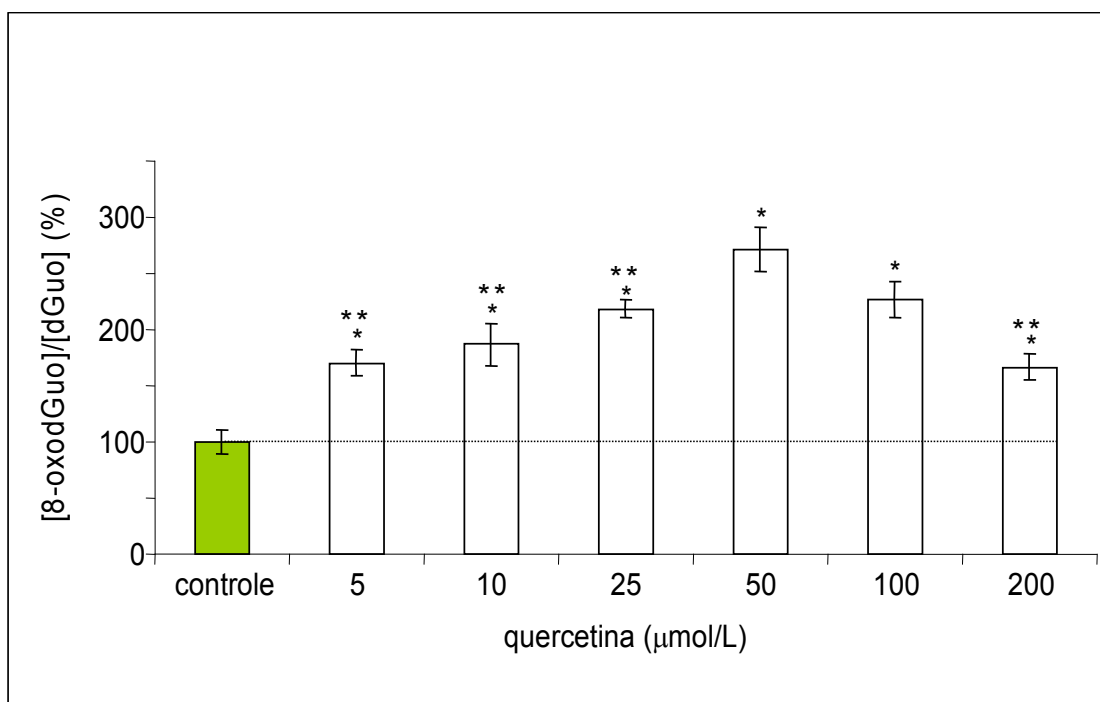


FIGURA 20 – DETECÇÃO DA 8-OXODGUO, NA INCUBAÇÃO DA dGUO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE QUERCETINA

FONTE: o autor (2008)

NOTA: Quantidades de 8-oxodGuo formada na presença de diferentes concentrações de quercetina na reação de dGuo (1 mmol/L) com NDPO<sub>2</sub> (5 mmol/L) detectadas pelo detector eletroquímico (380 mV) no HPLC com condições de análise conforme item 4.2.2.2. Controle: dGuo (1 mmol/L) + NDPO<sub>2</sub> (5 mmol/L) + DMSO 0,05 %. Os resultados são média  $\pm$  desvio padrão do experimento em triplicata. (\*) Valores diferentes significativamente em relação ao controle com  $n = 3$  e  $p < 0,05$ . (\*\*) Valores diferentes significativamente em relação a amostra contendo 50  $\mu\text{mol/L}$  de apigenina com  $n = 3$  e  $p < 0,05$ .

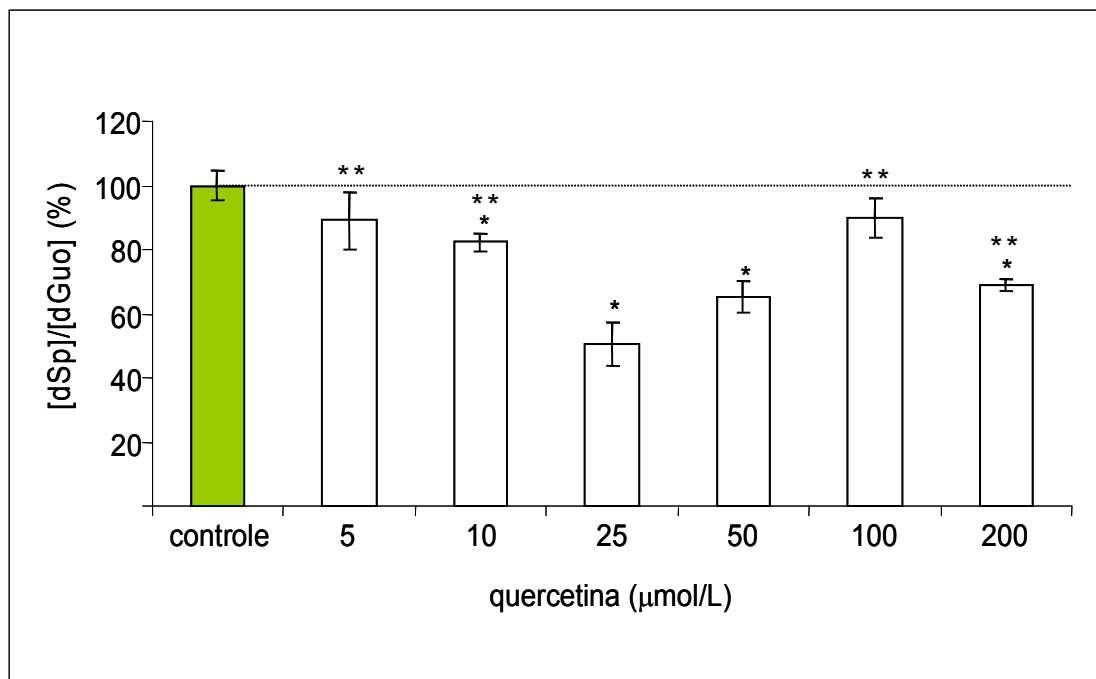


FIGURA 21 – DETECÇÃO DA dSP, NA INCUBAÇÃO DA dGUO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE QUERCETINA

FONTE: o autor (2008)

NOTA: Quantidades de dSp formada na presença de diferentes concentrações de quercetina na reação de dGuo (1 mmol/L) com NDPO<sub>2</sub> (5 mmol/L) detectadas pelo detector UV (230 nm) no HPLC com condições de análise conforme item 4.2.2.3. Controle: dGuo (1 mmol/L) + NDPO<sub>2</sub> (5 mmol/L) + DMSO 0,05 %. Os resultados são média ± desvio padrão do experimento em triplicata. (\*) Valores diferentes significativamente em relação ao controle com n = 3 e p < 0,05. (\*\*) Valores diferentes significativamente em relação a amostra contendo 25 µmol/L de quercetina com n = 3 e p < 0,05.

A FIGURA 22 nos mostra que quando a dGuo foi incubada com o endoperóxido na presença de morina, houve uma diminuição de 75 e 45% em relação ao controle na formação da 8-oxodGuo nas menores doses (5 e 10  $\mu\text{mol/L}$ , respectivamente), não houve alteração nas doses intermediárias (25 e 50  $\mu\text{mol/L}$ ) e houve um aumento de cerca de 50 e 100% em relação ao controle nas maiores doses (100 e 200  $\mu\text{mol/L}$ , respectivamente).

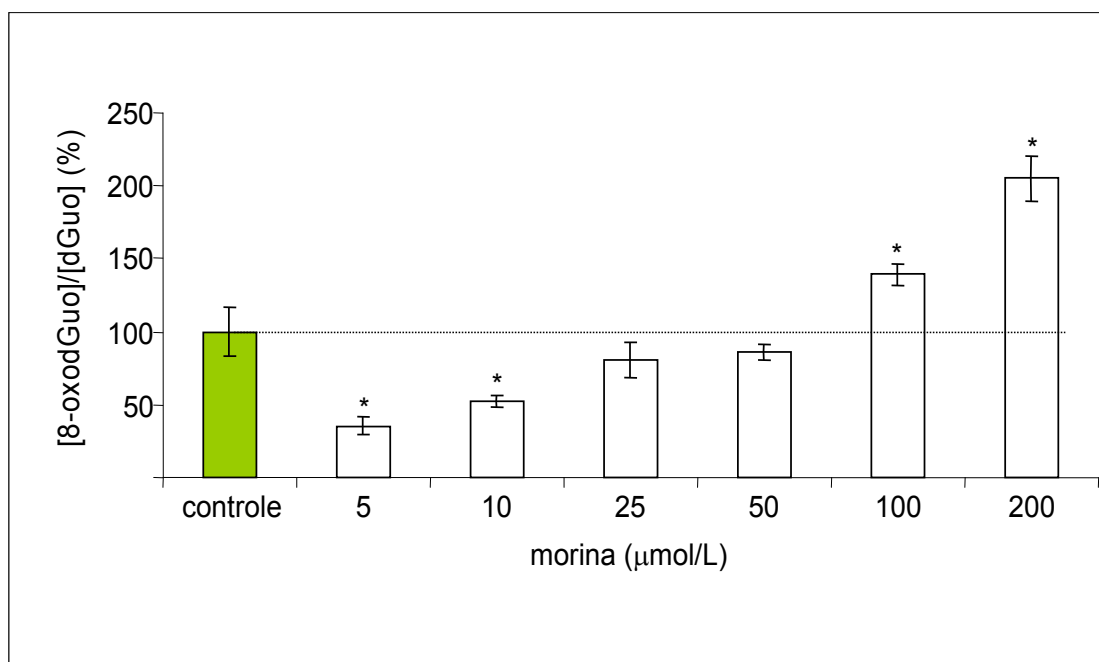


FIGURA 22 – DETECÇÃO DA 8-OXODGUO, NA INCUBAÇÃO DA dGUO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MORINA

FONTE: o autor (2008)

NOTA: Quantidades de 8-oxodGuo formada na presença de diferentes concentrações de morina na reação de dGuo (1 mmol/L) com NDPO<sub>2</sub> (5 mmol/L) detectadas pelo detector eletroquímico (380 mV) no HPLC com condições de análise conforme item 4.2.2.2. Controle: dGuo (1 mmol/L) + NDPO<sub>2</sub> (5 mmol/L) + DMSO 0,05 %. Os resultados são média  $\pm$  desvio padrão do experimento em triplicata. (\*) Valores diferentes significativamente em relação ao controle com n = 3 e p < 0,05.



A FIGURA 23 mostra que quando a dGuo foi incubada com o endoperóxido na presença de morina, este flavonóide não interferiu na formação da dSp nas menores doses (5 e 10  $\mu\text{mol/L}$ ), aumentou cerca de 25% em relação ao controle nas doses intermediárias (25 e 50  $\mu\text{mol/L}$ ) e diminuiu cerca de 20% em relação ao controle nas maiores doses (100 e 200  $\mu\text{mol/L}$ ).

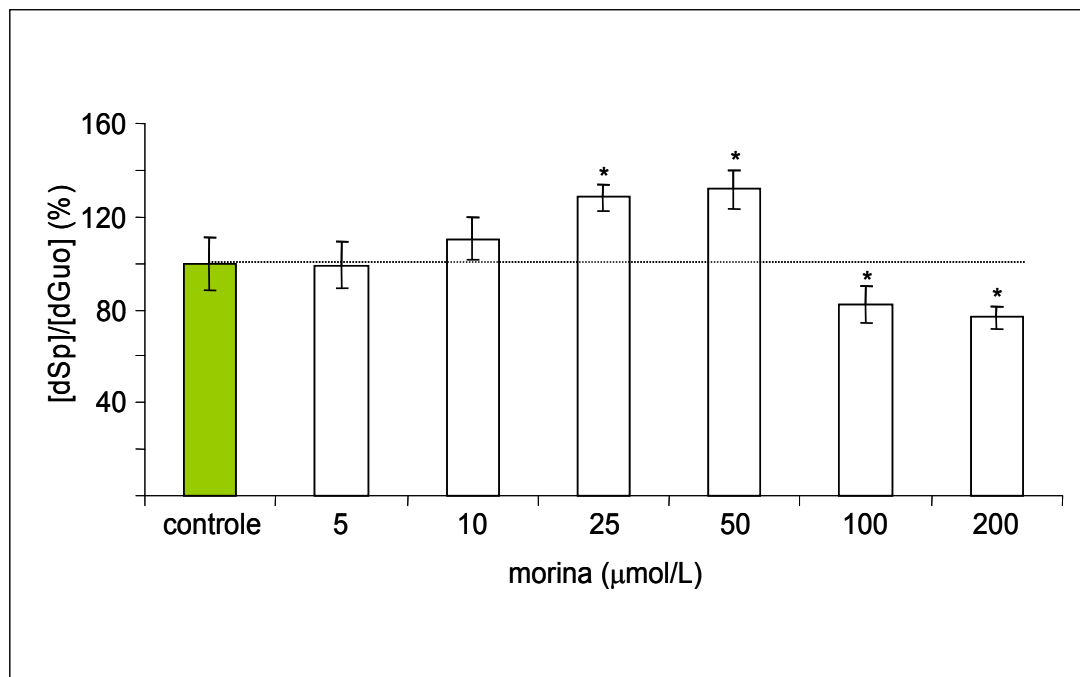


FIGURA 23 – DETECÇÃO DA dSP, NA INCUBAÇÃO DA dGUO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MORINA

FONTE: o autor (2008)

NOTA: Quantidades de dSp formada na presença de diferentes concentrações de morina na reação de dGuo (1 mmol/L) com NDPO<sub>2</sub> (5 mmol/L) detectadas pelo detector UV (230 nm) no HPLC com condições de análise conforme item 4.2.2.3. Controle: dGuo (1 mmol/L) + NDPO<sub>2</sub> (5 mmol/L) + DMSO 0,05 %. Os resultados são média  $\pm$  desvio padrão do experimento em triplicata. (\*) Valores diferentes significativamente em relação ao controle com n = 3 e p < 0,05.

A FIGURA 24 nos mostra que quando a dGuo foi incubada com o endoperóxido na presença de catequina, não houve diferença na formação da 8-oxodGuo em relação ao controle nas doses de até 25  $\mu\text{mol/L}$ , porém nas doses maiores houve um aumento significativo na formação desse produto, chegando a 85% em relação ao controle na dose de 100  $\mu\text{mol/L}$ .

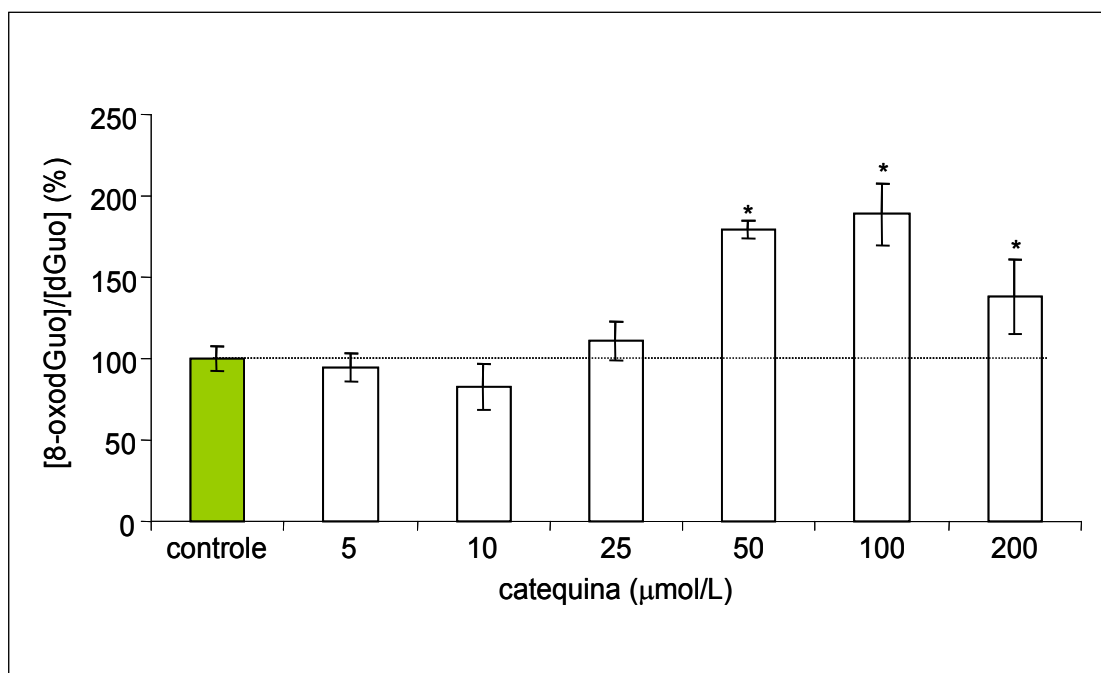


FIGURA 24 – DETECÇÃO DA 8-OXODGUO, NA INCUBAÇÃO DA dGUO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CATEQUINA

FONTE: o autor (2008)

NOTA: Quantidades de 8-oxodGuo formada na presença de diferentes concentrações de catequina na reação de dGuo (1 mmol/L) com NDPO<sub>2</sub> (5 mmol/L) detectadas pelo detector eletroquímico (380 mV) no HPLC com condições de análise conforme item 4.2.2.2. Controle: dGuo (1 mmol/L) + NDPO<sub>2</sub> (5 mmol/L) + DMSO 0,05 %. Os resultados são média  $\pm$  desvio padrão do experimento em triplicata. (\*) Valores diferentes significativamente em relação ao controle com  $n = 3$  e  $p < 0,05$ .

A FIGURA 25 mostra que quando a dGuo foi incubada com o endoperóxido na presença de catequina, houve uma diminuição de até 40% na formação da dSp nas doses de 100 e 200  $\mu\text{mol/L}$ .

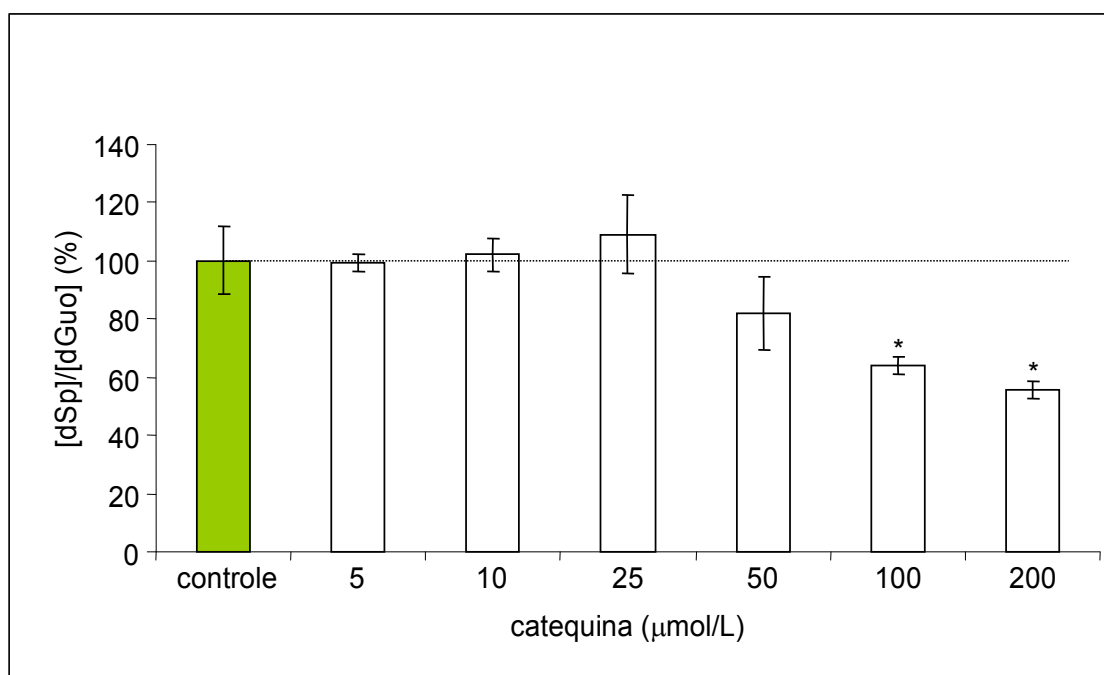


FIGURA 25 – DETECÇÃO DA dSP, NA INCUBAÇÃO DA dGUO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CATEQUINA

FONTE: o autor (2008)

NOTA: Quantidades de dSp formada na presença de diferentes concentrações de catequina na reação de dGuo (1 mmol/L) com NDPO<sub>2</sub> (5 mmol/L) detectadas pelo detector UV (230 nm) no HPLC com condições de análise conforme item 4.2.2.3. Controle: dGuo (1 mmol/L) + NDPO<sub>2</sub> (5 mmol/L) + DMSO 0,05 %. Os resultados são média  $\pm$  desvio padrão do experimento em triplicata. (\*) Valores diferentes significativamente em relação ao controle com  $n = 3$  e  $p < 0,05$ .

## 5.2 Efeito da concentração de flavonóides na oxidação do plasmídeo pBluescript SK

A 8-oxodGuo é o produto formado quando o plasmídeo é oxidado pelo <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (PRAT *et al.*, 1997). Em DNA esse é o único produto que se forma a partir da oxidação da dGuo (CADET *et al.*, 2003). Quando se faz o tratamento com a enzima de reparo FPG, que tem uma atividade de *N*-glicosilase e de liase do sítio AP, ou seja, hidrolisa a ligação *N*-glicosídica entre a base danificada e a desoxirribose e cliva o DNA no sítio abásico resultante por uma  $\beta$ - $\delta$  eliminação, gera o plasmídeo na forma circular aberta (CA).

Os resultados dos flavonóides foram apresentados em percentagem da forma CA formada em cada tratamento, tendo sempre um controle negativo que é o plasmídeo mais DMSO e um controle positivo que tem o DHPNO<sub>2</sub> (20 mmol/L) e as amostras com a variação da concentração dos flavonóides (50, 100 e 200 µmol/L).

A FIGURA 26 mostra o gel de agarose e a relação entre a forma CA formada durante a reação do plasmídeo com <sup>1</sup>O<sub>2</sub> na presença de diferentes concentrações de flavona. Pode-se perceber que, assim como com a dGuo livre, no plasmídeo houve uma diminuição de cerca de 20% da formação de danos em todas as doses de flavona testadas.

Na FIGURA 27 visualizamos o gel de agarose e a relação entre a forma CA formada durante a reação do plasmídeo com <sup>1</sup>O<sub>2</sub> em diferentes concentrações de quercetina. Percebe-se que nas amostras sem o tratamento com FPG há uma diminuição significativa da formação de danos quando comparada ao controle com DHPNO<sub>2</sub>, como já havia sido relatado por YAMAGUCHI *et al.*, (2005). Porém, quando se trata com essa enzima vemos que, na realidade, a quercetina apresenta uma atividade pró-oxidante, como visto em nosso estudo também para a dGuo livre, já que aumenta significativamente a formação da forma circular aberta em todas as concentrações testadas em cerca de 15%.

A FIGURA 28 mostra o gel de agarose e a relação entre a forma CA formada durante a reação do plasmídeo com <sup>1</sup>O<sub>2</sub> em diferentes concentrações de catequina. Nas amostras não tratadas com FPG há uma diminuição de cerca de 18% na maior dose testada (200 µmol/L), de fato, DEVASAGAYAM e colaboradores (1995) observaram um efeito protetor de cerca de 30% da catequina (100 µmol/L) na oxidação do plasmídeo pBR322 por <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Porém, nas amostras tratadas com FPG vemos que, na realidade, a catequina apresenta uma atividade pró-oxidante, como visto em nosso estudo também para a dGuo livre, já que aumenta significativamente a formação do dano ao plasmídeo em todas as concentrações testadas em cerca de 30%.

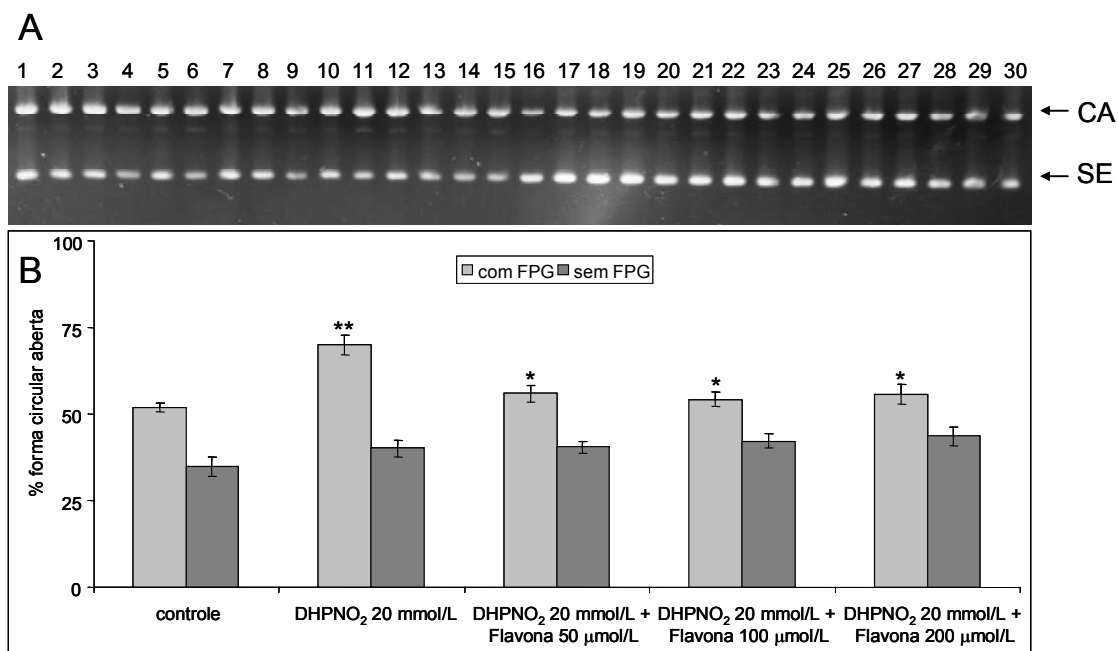


FIGURA 26 – EFEITO DA FLAVONA SOBRE O DANO NO PLASMÍDEO PBLUESCRIPT SK QUANDO INCUBADO COM DHPNO<sub>2</sub>

FONTE: o autor (2008)

NOTA: **(A)** Gel de agarose 1% em TBE, mostrando a as duas formas do plasmídeo (CA e SE) que estão presentes depois da incubação deste com DHPNO<sub>2</sub> (20 mmol/L) na presença de flavona. Bandas 1-3 e 16-18 (plasmídeo + DMSO 2%); 4-6 e 19-21 (plasmídeo + DMSO 2%+ DHPNO<sub>2</sub>); 7-9 e 22-24 (plasmídeo + DMSO 2% + DHPNO<sub>2</sub> + flavona 50 µmol/L); 10-12 e 25-27 (plasmídeo + DMSO 2% + DHPNO<sub>2</sub> + flavona 100 µmol/L); 13-15 e 28-30 (plasmídeo + DMSO 2% + DHPNO<sub>2</sub> + flavona 200 µmol/L); 1-15 (tratadas com FPG); 16-30 (não tratadas com FPG); (CA) forma circular aberta do plasmídeo; (SE) forma superenovelada do plasmídeo;

**(B)** Percentagem da forma CA do plasmídeo formada durante a reação. Controle (plasmídeo + DMSO 2%); \* Significativamente diferente da amostra com DHPNO<sub>2</sub> e sem flavona. \*\* Significativamente diferente do respectivo controle.

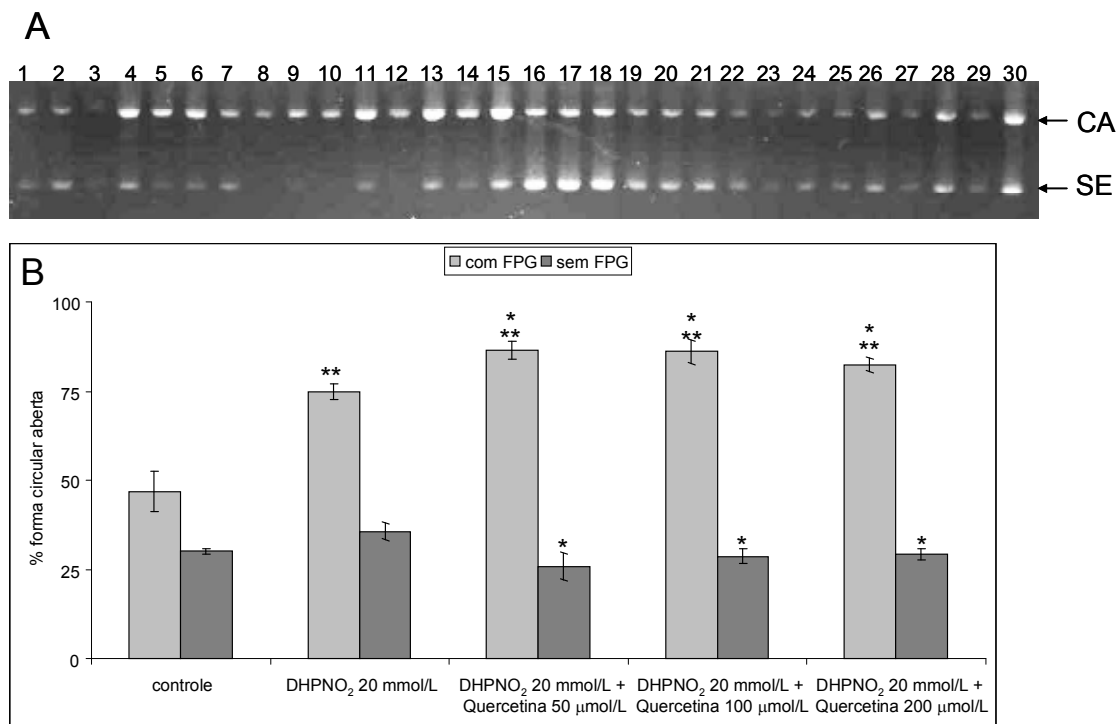


FIGURA 27 – EFEITO DA QUERCETINA SOBRE O DANO NO PLASMÍDEO PBLUESCRIPT SK QUANDO INCUBADO COM DHPNO<sub>2</sub>

FONTE: o autor (2008)

NOTA: **(A)** Gel de agarose 1% em TBE, mostrando a as duas formas do plasmídeo (CA e SE) que estão presentes depois da incubação deste com DHPNO<sub>2</sub> (20 mmol/L) na presença de quercetina. Bandas 1-3 e 16-18 (plasmídeo + DMSO 2%); 4-6 e 19-21 (plasmídeo + DMSO 2%+ DHPNO<sub>2</sub>); 7-9 e 22-24 (plasmídeo + DMSO 2% + DHPNO<sub>2</sub> + quercetina 50 µmol/L); 10-12 e 25-27 (plasmídeo + DMSO 2% +DHPNO<sub>2</sub> + quercetina 100 µmol/L); 13-15 e 28-30 (plasmídeo + DMSO 2% + DHPNO<sub>2</sub> + quercetina 200 µmol/L); 1-15 (tratadas com FPG); 16-30 (não tratadas com FPG); (CA) forma circular aberta do plasmídeo; (SE) forma superenovelada do plasmídeo;

**(B)** Percentagem da forma CA do plasmídeo formada durante a reação. Controle (plasmídeo + DMSO 2%); \* Significativamente diferente da respectiva amostra com DHPNO<sub>2</sub> e sem quercetina. \*\* Significativamente diferente do respectivo controle.

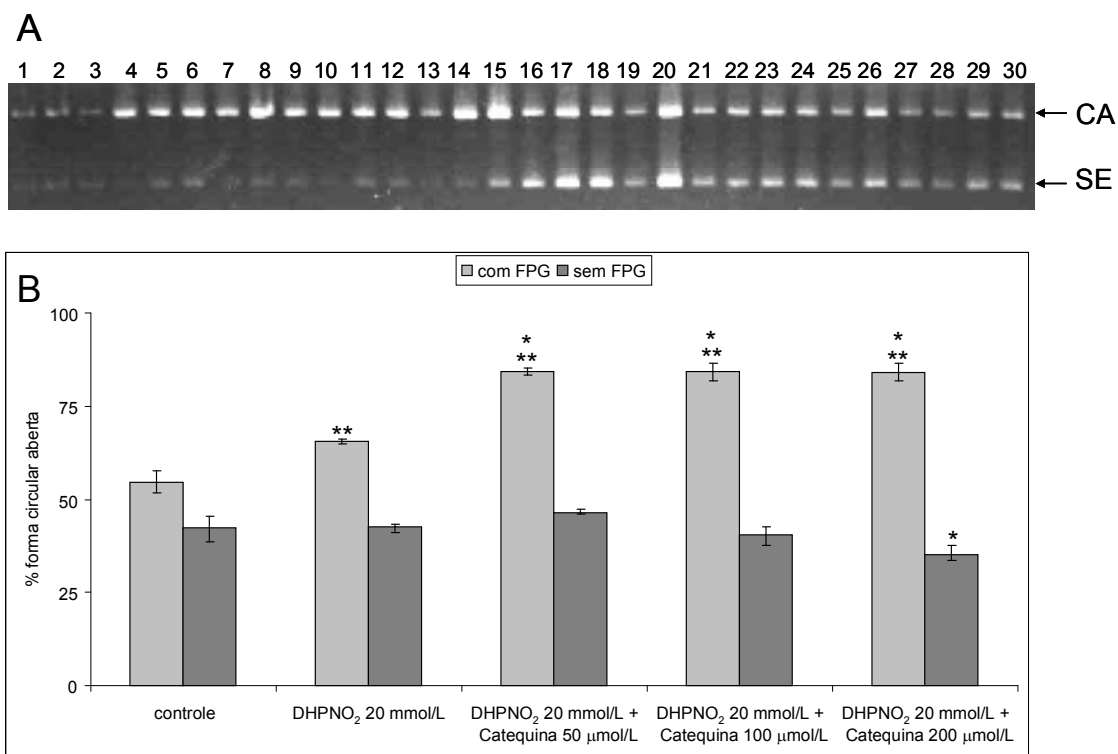


FIGURA 28 – EFEITO DA CATEQUINA SOBRE O DANO NO PLASMÍDEO PBLUESCRIPT SK QUANDO INCUBADO COM DHPNO<sub>2</sub>

FONTE: o autor (2008)

NOTA: **(A)** Gel de agarose 1% em TBE, mostrando a as duas formas do plasmídeo (CA e SE) que estão presentes depois da incubação deste com DHPNO<sub>2</sub> (20 mmol/L) na presença de catequina. Bandas 1-3 e 16-18 (plasmídeo + DMSO 2%); 4-6 e 19-21 (plasmídeo + DMSO 2%+ DHPNO<sub>2</sub>); 7-9 e 22-24 (plasmídeo + DMSO 2% + DHPNO<sub>2</sub> + catequina 50 μmol/L); 10-12 e 25-27 (plasmídeo + DMSO 2% + DHPNO<sub>2</sub> + catequina 100 μmol/L); 13-15 e 28-30 (plasmídeo + DMSO 2% + DHPNO<sub>2</sub> + catequina 200 μmol/L); 1-15 (tratadas com FPG); 16-30 (não tratadas com FPG); (CA) forma circular aberta do plasmídeo; (SE) forma superenovelada do plasmídeo;

**(B)** Percentagem da forma CA do plasmídeo formada durante a reação. Controle (plasmídeo + DMSO 2%); \* Significativamente diferente da respectiva amostra com DHPNO<sub>2</sub> e sem catequina. \*\* Significativamente diferente do respectivo controle.

## 6 DISCUSSÃO

O termo "antioxidante" tem sido empregado com certa freqüência nos meios de comunicação, entretanto, nem sempre fica claro o significado que lhe é atribuído. De fato, conforme discutido por HALLIWELL e GUTTERIDGE, (2007), técnicos em alimentação utilizam o termo antioxidante para compostos que inibem a peroxidação lipídica e conseqüentemente o ranço nos alimentos. Cientistas de polímeros utilizam o termo antioxidante para substâncias que controlam a polimerização na fabricação da borracha, plásticos e tintas e para a proteção de plásticos claros contra luz ultravioleta. Uma definição mais relacionada ao contexto biológico é de "substâncias orgânicas, que são capazes de minimizar os efeitos nocivos da oxidação nos tecidos animais" (HUANG, *et al.*, 2005). Ainda, o dicionário traz uma definição mais geral como sendo "substância que previne a oxidação, ou inibe reações causadas por oxigênio ou peróxidos" (Dicionário Michaelis da Língua Portuguesa Moderna). Dessa forma, fica claro que os cientistas terão seus próprios pontos de vista sobre o significado de antioxidante dentro de sua área específica de atuação.

Sendo assim, o termo antioxidante e pró-oxidante deve ser empregado com muito cuidado, pois ao se investigar a atividade antioxidante, os seguintes fatores devem ser considerados:

- (a) o produto final estudado;
- (b) o composto que está sendo testado;
- (c) a molécula alvo;
- (d) o ambiente onde está ocorrendo a reação.

Este estudo gerou um conjunto de dados que podem contribuir para a um melhor entendimento sobre a ação de compostos que podem ter uma atividade biológica importante, usando uma reação já bem estudada, que é a reação de oxidação da dGuo que forma os produtos 8-oxodGuo e dSp. Sabe-se que nessa reação a formação da dSp é 10 vezes maior do que a 8-oxodGuo (MARTINEZ *et al.*, 2007) e que até hoje, sabe-se que somente a 8-oxodGTP é substrato para a DNA polimerase (SHIMIZU *et al.*, 2007).

Lembrando que o mecanismo descrito por MARTINEZ *et al.* (2007) mostra que a 8-oxodGuo é formada à partir da oxidação da dGuo por uma molécula de  $^1\text{O}_2$ , e a dSp pode ser formada diretamente à partir da dGuo pelo uso também de uma molécula de  $^1\text{O}_2$  ou através da oxidação da 8-oxodGuo



com a utilização de uma segunda molécula de  $^1\text{O}_2$ , devemos analisar os resultados em conjunto para determinar se o flavonóide em questão pode ser considerado antioxidante ou pró-oxidante.

Portanto, os resultados apresentados nesse trabalho são específicos para esse sistema, ou seja, o comportamento desses flavonóides na oxidação da dGuo pelo  $^1\text{O}_2$  em solução aquosa.

Quando foi feito o ensaio com a flavona, esta apresentou uma atividade antioxidante, diminuindo a formação dos produtos de oxidação da dGuo frente ao  $^1\text{O}_2$ , sendo mais significativo nas maiores doses, já que nelas diminuem tanto a formação da 8-oxodGuo quanto da dSp e nas menores doses apenas a formação da dSp. Essas mesmas maiores doses foram utilizadas na oxidação do plasmídeo e o resultado foi semelhante, diminuindo a formação da forma CA, indicando o seu potencial antioxidante também nesse sistema.

A apigenina não interfere na formação da 8-oxodGuo nas menores concentrações, mas apresenta um aumento significativo na formação desse produto nas concentrações de 100 e 200  $\mu\text{mol/L}$ , apresentando portanto uma atividade pró-oxidante. Quando se trata da formação da dSp, a apigenina apresenta uma atividade antioxidante, diminuindo a formação desse produto em todas as doses testadas mesmo que independente da concentração.

Os resultados da quercetina sugerem que ela apresenta uma atividade pró-oxidante quando se está medindo a formação da 8-oxodGuo, já que aumentou significativamente em relação ao controle sua formação em todas as doses testadas, tanto quando se está trabalhando com a dGuo livre ou no plasmídeo. Quando se trata da formação da dSp, a quercetina apresenta uma atividade antioxidante, diminuindo a formação desse produto em todas as doses testadas de maneira independente da concentração, sendo significativamente diferente do controle em quatro das seis doses testadas.

Observando os resultados mostrados nas figuras 23 e 24, pode-se sugerir que a morina interfere no mecanismo da reação de oxidação da dGuo (FIGURA 29), pois dependendo da sua concentração ocorre o favorecimento de uma via em relação a outra, pois as menores doses diminui a formação da 8-oxodGuo e não interfere na formação da dSp, as doses intermediárias não interferem na formação da 8-oxodGuo e aumentam a formação da dSp e nas

maiores doses aumentam a formação da 8-oxodGuo e diminuem a formação da dSp.

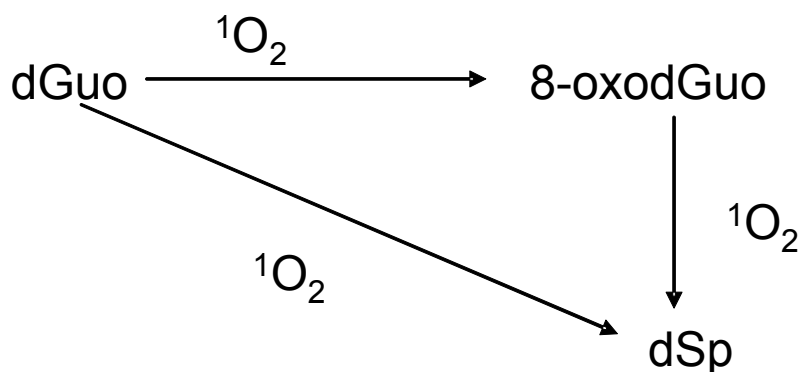


FIGURA 29 – ESQUEMA SIMPLIFICADO DA FORMAÇÃO DOS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO DA DGUO PELO  $^1\text{O}_2$

A catequina apresenta uma atividade pró-oxidante nas doses de 100 e 200  $\mu\text{mol/L}$  quando se está medindo a formação da 8-oxodGuo, já que aumentou significativamente em relação ao controle sua formação nessas doses. Quando se trata da formação da dSp, a catequina apresenta uma atividade antioxidante nas doses de 50, 100 e 200  $\mu\text{mol/L}$ , diminuindo significativamente a formação desse produto nessas doses em relação ao controle. No tratamento do plasmídeo, a catequina apresentou uma atividade pró-oxidante em todas as doses testadas, aumentando significativamente a formação da forma CA, sugerindo o aumento de danos causados pela oxidação do mesmo.

A célula é um sistema bem mais complexo que o sistema *in vitro* utilizado, entretanto, algumas considerações podem ser feitas:

A 8-oxodGTP é formada no “pool” de nucleosídeos celulares a partir da oxidação da dGTP e é substrato para a DNA polimerase, os resultados encontrados na presença de apigenina, catequina e quercetina são essenciais para sugerir que esses flavonóides apresentam uma atividade potencialmente genotóxica, pois aumentando a formação desse composto na célula pode gerar mutagênese e carcinogênese (SUZUKI *et al.*, 2007; SHIMIZU *et al.*, 2007).

Como ainda não foi relatado na literatura se a base espiroiminodihidantoína formada pela oxidação da dGTP seria substrato para a

DNA polimerase, os resultados aqui apresentados podem seguir dois caminhos:

- (1) Se ela for substrato, a flavona apresenta uma atividade antioxidante importante já que diminui a sua formação significativamente. Assim como a quercetina, apigenina e catequina que apesar de aumentar a formação de 8-oxodGuo, diminuem a formação de dSp, que como já foi dito, é formada em maior quantidade e portanto determinante para dizer que a atividade antioxidante desses flavonóides é mais efetiva.
- (2) Se ela não for substrato, os efeitos obtidos com a quercetina, apigenina e catequina podem ser considerados pró-oxidantes, pois mesmo que diminuindo a formação desse produto, esses flavonóides aumentam a formação da 8-oxodGuo, que seria então substrato para a DNA polimerase.

A relação entre a estrutura e a atividade antioxidante dos flavonóides foi considerada referente aos danos ao DNA causados por  $H_2O_2$  (MIN e EBELER, 2008). Os autores discutiram os resultados considerando: (1) grau de conjugação no anel C, (2) presença de uma hidroxila livre na posição 3 do anel C e (3) número e posição de hidroxilas no anel B do flavonóide. Comparando-se a atividade da flavona luteolina com a quercetina, o grupo hidroxila na posição 3 parece influenciar fortemente na atividade antioxidante, possivelmente através de efeitos sobre planaridade, que está associada com o aumento da estabilidade do radical fenoxil do flavonóide que é formado (VAN ACKER *et al.*, 1996). A hidroxila na posição 3 da quercetina permite a formação de um radical mais estável do flavonóide e resulta em uma maior atividade (MIN e EBELER, 2008). A quercetina que tem um grupo catecol no anel B mostrou maior atividade antioxidante frente aos danos ao DNA causados por  $H_2O_2$  que miricetina e morina que têm diferentes números de grupos hidroxila em diferentes posições no anel B (MIN e EBELER, 2008). Os resultados foram consistentes com outros estudos que indicam que o grupo catecol está associado a uma forte atividade antioxidante (MELIDOU *et al.*, 2005; RICE-EVANS *et al.*, 1996). Compostos galatos (com três hidroxilas conjugadas), tais como epigallocatequina gallato, podem mostrar um potencial antioxidante frente ao superóxido superior ao do catecol, mesmo quando a

estrutura galato está presente no anel A, como na baicaleína (FURUNO *et al.*, 2002).

Esses dados não vão de acordo com o que observamos em nossos estudos. Aqui observamos que o flavonóide com maior atividade antioxidante é a flavona, que não apresenta nenhuma hidroxila na sua estrutura. E os outros flavonóides que apresentam esse grupo na sua estrutura exibiram um perfil pró-oxidante e a quercetina e a catequina que tem o grupo catecol presente no anel B foram os que apresentaram maior aumento na oxidação da dGuo livre e no plasmídeo. Isso pode ser devido ao fato de que o anel catecol pode se auto-oxidar e gerar espécies radicalares (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007), por isso os danos aumentaram quando se utilizou os flavonóides que apresentam esse grupo (catequina e quercetina).

De acordo com os resultados obtidos em nosso estudo, observamos que não ocorre uma dependência da concentração do flavonóide com o efeito observado. Isso também é observado em outros estudos, como por exemplo, na ação da quercetina e morina na formação da 8-oxodGuo em DNA na presença de  $H_2O_2$  e  $Fe^{2+}$  (MIN e EBELER 2008).

Não podemos esquecer que no nosso trabalho o agente oxidante não é um radical livre, e sim uma espécie reativa não radicalar e por isso o flavonóide não reage da mesma maneira como em outros sistemas onde se utiliza radicais, como:  $O_2^{\bullet-}$  e  $HO^{\bullet}$ .

Mesmo que os flavonóides sejam considerados fortes antioxidantes, vários estudos têm também indicado sua atividade pró-oxidante e a relação estrutura-atividade têm sido de interesse. Como resultado, a relação antioxidante/pró-oxidante dos flavonóides depende da concentração, o tempo de administração e potenciais redox. Dessa forma, torna-se importante a avaliação da sua ação em diferentes sistemas e condições bem controladas com objetivo de melhor esclarecer seu papel biológico.

## 7 CONCLUSÕES

A complexidade do tema antioxidante, somado aos diferentes métodos utilizados para avaliar o efeito de compostos com potencial antioxidante pode conduzir a interpretações equivocadas (HUANG, *et al.*, 2005). Devido à falta de um ensaio padrão único, é difícil comparar os resultados relatados a partir de diferentes grupos de pesquisa, com consequências inclusive para a indústria de alimentos e cosméticos.

Pelos dados obtidos nesse trabalho para o sistema estudado, ou seja, a oxidação da dGuo livre pelo  $^1\text{O}_2$  gerado pela decomposição química de endoperóxidos, é difícil estabelecer uma relação estrutura/atividade antioxidante dos flavonóides.

O único flavonóide que apresentou uma atividade antioxidante satisfatória, ou seja, diminuiu a formação de ambos os produtos de oxidação da dGuo, foi a flavona que não apresenta nenhuma hidroxila na sua estrutura. Já a apigenina que pertence a mesma subclasse da flavona, apresentou um aumento de quase 600% na formação da 8-oxodGuo, porém diminuiu a formação da dSp em todas as doses testadas.

A quercetina e catequina apresentaram um perfil semelhante, aumentando a formação da 8-oxodGuo quando oxida tanto a dGuo livre, quanto o plasmídeo e diminuindo a formação da dSp na oxidação da dGuo livre. A diferença estrutural entre elas é a dupla  $\text{C}_{2,3}$  e a carbonila  $\text{C}_4$  do anel C tão evidenciada nos mais diferentes estudos. Sugerimos então, que no sistema aplicado nesse trabalho, essas características não foram decisivas no efeito antioxidante destes flavonóides. E a semelhança entre elas, as cinco hidroxilas nas mesmas posições de suas estruturas, inclusive o anel catecol em B, justifica a possibilidade de que, nesse sistema, esse anel sofra uma auto-oxidação gerando mais espécies reativas que seriam as responsáveis pelo aumento do dano (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Os resultados apresentados pela morina sugerem uma interferência no mecanismo de reação da oxidação da dGuo pelo  $^1\text{O}_2$  e análises adicionais são necessárias para a confirmação deste mecanismo. Uma possibilidade seriam estudos com marcação isotópica usando o endoperóxido  $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$  (MARTINEZ *et al.*, 2000b) para acompanhar a incorporação dos átomos de oxigênio nos produtos formados.

Finalmente, vale ressaltar a importância da estratégia experimental aplicado neste trabalho para avaliação do potencial antioxidante de um composto, pois como podemos perceber, certos flavonóides apresentam uma função antioxidante, como a quercetina e catequina, nos mais diversos sistemas quando se usa um radical livre como oxidante, mas em nosso caso, onde utilizamos uma espécie não-radicalar eles apresentaram um perfil pró-oxidante. O mesmo acontecendo com a flavona, que não apresentava proteção frente a radicais, aqui se mostrou eficiente quando trabalhamos com uma espécie não-radicalar.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSE, S. L.; KLOOTS, W. J.; VAN AMELSVOORT, J. M. M. Absorption, distribution, and secretion of epicatechin and quercetin in the rat. **Nutrition Research**, New York. v. 25, p. 305-317, 2005.
- ADAM, W.; ARNOLD, M. A.; GRUNE, M.; NAU, W. M.; PISCHEL, U.; SAHA-MOLLER, C. R. Spiroiminodihydantoin is a major product in the photooxidation of 2'-deoxyguanosine by the triplet states and oxyl radicals generated from hydroxyacetophenone photolysis and dioxetane thermolysis. **Organic Letters**, Bethesda. v. 4, p. 537-540, 2002.
- ARORA, A.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a serie of flavonoids in a liposomal system. **Free Radicals in Biology & Medicine**, New York, v. 24, p. 1355-1363, 1998.
- ARTS, I.; HOLLMAN, P. C.; FESKENS, E. J.; BUENO DE MESQUITA, H. B.; KROMHOUT, D. Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: the Zutphen Elderly Study. **American Society for Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 74, p. 227-232, 2001.
- BEECHER, G. R.; WARDEN, B. A.; MERKEN, H. Analysis of tea polyphenols. **Proceedings of the Society for Analytical Chemistry**, Washington. v. 220, p. 267-270, 1999.
- BESTWICK, S. C. The effect of short-term kaempferol exposure on reactive oxygen levels and integrity of human (HL-60) leukaemic cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1740, p. 340-349, 2005.
- BHAGWAT, M., GERLT, J. A. 3' and 5' strand cleavage reactions catalyzed by the FPG protein from *Escherichia coli* occur via successive  $\beta$ - and  $\delta$ -elimination mechanisms, respectively. **Biochemistry**, Washington. v. 35, p. 659-665, 1996.
- BOEGE, F.; STRAUB, T.; KEHR, A.; BOESENBERG, C.; CHRISTIANSEN, K.; ANDERSEN, A.; JAKOB, F.; KOHRLE, J. Selected novel flavones inhibit the DNA binding or the DNA religation step of eukaryotic topoisomerase I, **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 271, p. 2262-2270, 1996.
- BOITEUX, S.; O'CONNOR, T. R.; LEDERER, F.; GOUYETTE, A.; LAVAL, J. Homogeneous *Escherichia coli* FPG protein. A DNA glycosylase which exercises imidazole ring-opened purines and nicks DNA at apurinic/apyrimidinic sites. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda. v. 265, p. 3916-3922, 1990.
- BOITEUX, S.; GAJEWSKI, E.; LAVAL, J.; DIZDAROGLU, M. Substrate Specificity of the *Escherichia coli* FPG protein (Formamidopyrimidine-DNA glycosilase): Excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. **Biochemistry**, Washington, v. 31, p. 106-111, 1992.
- BOOTS, A. W.; LI, H.; SCHINS, R. P. F.; DUFFIN, R.; HEEMSKERK, J. W. M.; BAST, A.; HAENEN, G. R. M. M. The quercetin paradox. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Washington. v. 222, p. 89-96, 2007.
- BORS, W.; MICHEL, C. Antioxidant capacity of flavanols and gallate esters: Pulse radiolysis studies. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 27, p. 1413-1426, 1999.
- BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, Bethesda. v. 56, p. 317-333, 1998.
- BRIVIBA, K.; SAHA-MÖLLER, C. R.; ADAM, W.; SIES, H. Formation of singlet oxygen

- in the thermal decomposition of 3-hydroxymethyl-3,4,4-trimethyl-1,2-dioxetane: a chemical source of triplet excited ketones. **Biochemical and molecular Medicine**, Orlando, v. 38, p. 647-651, 1996.
- BURDA, S.; OLESZEK, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, p. 2774–2779, 2001.
- CADET, J.; DOUKI, T.; FRELON, S.; GASPARUTTO, D.; RAVANAT, J.-L.; SAUVAIGO, S.; MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H. G.; DI MASCIO, P. Oxidative Damage to DNA: formation and measurement and biochemical features. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 531, p. 5-23, 2003.
- CAI, Y-Z. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. **Life Sciences**, New York, v. 78, p. 2872-2888, 2005.
- CANIVENC-LAVIER, M-C.; VERNEVAUT, M-R.; TOTIS, M.; SIESS, M-H.; MAGDALOU, J.; SUSCHETET, M. Comparative effects of flavonoids and model inducers on drug-metabolizing enzymes in rat liver. **Toxicology**, Shannon, v. 114, p. 19-27, 1996.
- CASTELLANI, M. L.; SHAIK, Y. B.; SHANMUGHAM, L. N.; FRYDAS, S.; MADHAPPAN, B. Role of flavonoids and vitamins in cancer. **Rivista di Biologia**, Genova, v.100, p. 39-54, 2007.
- CHOLBI, M. R.; PAYA, M.; ALCARAZ, M. J. Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl<sub>4</sub>-induced microsomal lipid peroxidation, **Experientia**, Basel, v. 47, p. 195–199, 1991.
- CILENTO, G.; ADAM, W. **In Chemical and biological generation of excited states**. New York: Eds. Academic Press, 1982.
- CILLARD, J. & CILLARD, P. Composés phénoliques et radicaux libres. **STP Pharma**, New York, v. 4, p. 592-596, 1988.
- COTELLE, N.; BERNIER, J. L.; CATTEAU, J. P.; POMMERY, J.; WALLET, J. C.; GAYDOU, E. M. Antioxidant properties of hydroxyl-flavones. **Free Radicals in Biology & Medicine**, New York, v. 20, p.35-43, 1996.
- DEVASAGAYAM, T. P. A.; SUBRAMANIAN, M.; SINGH, B. B.; RAMANATHAN, R.; DAS, N. P. Protection of plasmid pBR322 DNA by flavonoids against single-strand breaks induced by singlet molecular oxygen. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, New York, v. 30, p. 97-103, 1995.
- DI CARLO, G. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, New York, v. 65, p. 337-353, 1999.
- DI MASCIO, P.; SIES, H. Quantification of singlet oxygen generated by thermolysis of 3,3'-(1,4-Naphthylidene)dipropionate. Monomol and dimol photoemission and the effects of 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane. **American Chemical Society**, Washington v.111, p. 2909-2915, 1989.
- DI MASCIO, P.; BECHARA, E. J. H.; MEDEIROS, M. H. G.; BRIVIBA, K.; SIES, H. Singlet molecular oxygen production in the reaction of peroxynitrite with hydrogen peroxide. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 355, p. 287-289, 1994.
- DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M. H. G.; BECHARA, E. J. H.; CATALANI, L. H. Singlet molecular oxygen: generation, reactivity, identification and biological effects. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 47, p. 297-311, 1995.
- DUARTE, V.; GASPARUTTO, D.; YAMAGUCHI, L. F. Oxaluric acid as the major product of singlet oxygen-mediated oxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA.



- Journal of the American Chemical Society**, Washington. v. 122, p. 12622-12628, 2000.
- DUARTE, V.; GASPARUTTO, D.; JAQUINO, M.; RAVANAT, J-L.; CADET, J. Repair and mutagenic potential of oxaluric acid, a major product of singlet oxygen-mediated oxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanine. **Chemical Research Toxicology**, Washington. v. 14, p. 46-53, 2001.
- DUTHIE, G. G. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. **Nutrition Research**, New York, v. 13, p. 79-106, 2000.
- ELANGOVAN, V.; SEKAR, N.; GOVINDASAMY, S. Chemopreventive potential of dietary bioflavonoids against 20-methylcholanthrene-induced tumorigenesis. **Cancer Letters**, Shannon, v. 87, p. 107-113, 1994.
- ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperitin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutrition Research**, New York, v. 24, p. 851-874, 2004.
- F'GUYER, S.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine**, Copenhagen, v. 19, p. 56-72, 2003.
- FLOYD, R. A. The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. **Carcinogenesis**, Berlet, v. 11, p. 1447-1450, 1990.
- FOOTE, C. S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. **Photochemistry and Photobiology**, Augusta, v. 54, p. 659, 1991.
- FUKUMOTO, L. R.; MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, p. 3597-3604, 2000.
- FURUNO, K.; AKASAKO, T; SUGIHARA, N. The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids. **Biological Pharmacology Bulletin**, v. 25, p. 19-23, 2002.
- GUPTA, S.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Involvement of nuclear factor-kappa B, Bax and Bcl-2 in induction of cell cycle arrest and apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma cells, **Oncogene**, Basingstoke, v. 21, p. 3727-3738, 2002.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3. ed. New York: Oxford University Press, 2007
- HATAHET, Z.; KOW, Y. W.; PURMAL, A. A.; CUNNINGHAM, R. P.; WALLACE, S. S. New substrate for old enzymes: 5-hydroxy-2'-deoxycytidine and 5-hydroxy-2'-deoxyuridine are substrates for Escherichia coli endonucleases III and formamidopyrimidine DNA N-glycosylase, while 5-hydroxy-2'-deoxyuridine is a substrate for uracil DNA N-glycosylase. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 269, p.18814-18820, 1994.
- HAVSTEEN B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 32, p.1141-1148,1983.
- HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**. Amsterdam. v. 96, p. 67-202, 2002.
- HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoids antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v. 13, p. 572-584, 2002.

- HELBOCK, H. J.; BECKMAN, K. AMES, B. N. 8-hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 300, p. 156-166, 1999.
- HELD, A. M.; HALKO, D. J.; HURST, J. K. Mechanism of chlorine oxidation of hydrogen peroxide. **American Chemical Society**, Washington, v. 100, p. 5732-5741, 1978.
- HERTOG, M. G. L.; HOLLMAN, P. C. H.; KATTAN, M. B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in Netherlands. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 40, p. 2379-2383, 1992.
- HIRANO, T.; GOTOH, M.; OKA, K. Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemia HL-60 cells. **Life Science**, New York, v. 55, p. 1061-1069, 1994.
- HODNICK, W. F.; DUVAL, D. L.; PARDINI, R. S. Inhibition of mitochondrial respiration and cyanide-stimulated generation of reactive oxygen species by selected flavonoids. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 47, p. 573-580, 1994.
- HOULT, J. R. S.; MORONEY, M. A.; PAYÁ, M. Action of flavonoids and coumarins on lipoxygenase and cyclooxygenase. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 234, p. 443-455, 1994.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, p. 1841-1856, 2005.
- ISHIKAWA, T.; SUZUKAWA, M.; ITO, T.; YOSHIDA, H.; AYAORI, M.; NISHIWAKI, M.; YONEMURA, A.; HARA Y.; NAKAMURA, H. Effect of tea flavonoid supplementation on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification. **Journal of American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 66, p. 261-266, 1997.
- KAISEROVÁ, H.; SIMŮNEK, T.; VAN DER VIJGH, W. J.; BAST, A.; KVASNIČKOVÁ, E. Flavonoids as protectors against doxorubicin cardiotoxicity: Role of iron chelation, antioxidant activity and inhibition of carbonyl reductase. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1772, p. 1065-1074, 2007.
- KAJIWARA, T.; KEARNS, D. R. Direct spectroscopic evidence for a deuterium solvent effect on the lifetime of singlet oxygen in water. **American Chemical Society**, Washington, v. 95, p. 5886-5890, 1973.
- KANDASWAMI, C.; PERKINS, E.; SOLONIUK, D. S.; DRZEWIECKI, G.; MIDDLETON, E. Antiproliferative effects of citrus flavonoids on a human squamous cell carcinoma in vitro. **Cancer Letters**, Shannon, v. 56, p. 147-152, 1991.
- KANG, P.; FOOTE, C. S.; Formation and transient intermediates in low temperature photosensitized oxidation of an 8-(13)C-guanosine. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 124, p. 9629-9638, 2002.
- KASAI, H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. **Mutation Research**, Amsterdam, v.387, p. 147-163, 1997.
- KAWABATA, A.; KURODA, R.; NISHIKAWA H.; KAWAI, K. Modulation by protease-activated receptors of the rat duodenal motility in vitro: possible mechanisms underlying the evoked contraction and relaxation, **British Journal of Pharmacology**, Houndmills, v. 126, p. 1856-1862, 1999.

- KIM, H. K.; CHEON, B. S.; KIM, Y. H.; KIM S. Y.; KIM, H. P. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships, **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 58, p. 759–765, 1999.
- KOWALTOWSKI, A. J; VERCESI, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radicals in Biology & Medicine**, New York ,v.26, p.463-471, 1999.
- KROKAN, H. E.; STANDAL, R.; SLUPPHAUG, G. DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. **Journal of Biochemistry**, Bunkyo-ku, v. 325, p. 1-16, 1997.
- KROMHOUT, D. Diet and cardiovascular diseases. **Journal of Nutrition, Health and Aging**, London v. 5, p. 144-149, 2001.
- KUHNAU, J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. **World Review of Nutrition and Dietetics**, Basel, v. 24, p. 117-91, 1976.
- LAUGHTON, M. J. Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myrecetin. Effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA.. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 38, p. 2859-2865, 1989.
- LAVAL, J. Role of DNA repair enzymes in the cellular resistance to oxidative stress. **Pathologie et Biologie**, Paris, v. 44, p.14-24, 1996.
- LUO W.; MULLER, J. G.; RACHLIN, E. M.; BURROWUS, C. J. Characterization of spiroiminodihydantoin as a product of one-electron oxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanosine. **Organic Letters**, Bethesda. v. 2, p. 613-616, 2000.
- MAKRIS, D. P.; ROSSITER, J. T.; Hydroxyl free radical-mediated oxidative degradation of quercetin and morin: a preliminary investigation, **Journal of Food Composition and Analysis**, Orlando, v. 15, p. 103–113, 2002.
- MALAYAPPAN, B.; GARRETT, T. J; SEGAL, M.; LEEUWENBURGH. C. Urinary analysis of 8-oxoguanine, fapy-guanine and 8-oxo-2'-deoxyguanosine by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry as a measure of oxidative stress. **Journal of Chromatography A**, Tokio v. 1167, p. 54-62, 2007.
- MANTHEY, J. A.; GROHMANN, K.; MONTANARI, A.; ASH, K.; MANTHEY, C. L. Antiproliferative activities of citrus flavonoids against six human cancer cell lines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, p. 5837-5843, 2002.
- MARTENS, S.; MITHÖFER, A. Flavones and flavone synthases. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 66, p. 2399-2407, 2005.
- MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H. G.; DI MASCIO, P. Utilização de endoperóxidos de derivados de naftaleno como fontes químicas de  $^1\text{O}_2$  em sistemas biológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, p. 686-689, 2000a.
- MARTINEZ, G.R.; RAVANAT; J.-L.; MEDEIROS, M.H.G.; CADET, J.; DI MASCIO, P. J. Synthesis of a naththalene endoperoxide as a source of  $^{18}\text{O}$ -labeled singlet oxygen for mechanistic. **American Chemical Society**, Washington, v. 122, p. 10212-10213, 2000b.
- MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H. G.; RAVANAT, J.-L.; CADET, J.; DI MASCIO, P.; [ $^{18}\text{O}$ ]- labeled singlet oxygen as a tool for mechanistic studies of 8-oxo-7,8-dihydroguanine oxidative damage: detection of spiroiminodihydantoin, imidazolone

- and oxazolone derivatives. **Biological Chemistry**, Berlin. v. 383, p. 607-617, 2002.
- MARTINEZ, G. R.; RAVANAT, J.-L.; CADET, J.; MEDEIROS, M. H. G. ; Di MASCIO, P. J. Spiroiminodihydantoin nucleoside formation from 2'-desoxyguanosine oxidation by <sup>18</sup>O-labeled singlet molecular oxygen in aqueous solution. **Mass Spectrometry Reviews**, New York, v. 42, p. 1326-1332, 2007.
- McCALLUM, J. E. B.; KUNIYOSHI, C. Y.; FOOTE, C. S.; Characterization of 5-hydroxy-8-oxo-7,8-dihydroguanosine in the photosensitized oxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanosine and its rearrangement to spiroiminodihydantoin. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 126, p. 16777-16782, 2004.
- MELIDOU, M.; RIGANAKOS, K.; GALARIS, D. Protection against nuclear DNA damage offered by flavonoids in cells exposed to hydrogen peroxide: The role of iron chelation. **Free Radicals Biology & Medicine**. New York. v. 39, p. 1591-1600, 2005.
- MICHAELS, M. L.; TCHOU, J.; GROLLMAN, A. P.; MILLER, J. H. A repair system for 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanine. **Biochemistry**, Washington, v. 31, p. 10964-10965, 1992.
- MIDDLETON, J.; KANDASWAMI, E.; THEOHARIDES, C. T. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, Bethesda, v. 52, p. 673-751, 2000.
- MIEAN, K. H.; MOHAMED, S. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, p. 3106-3112, 2001.
- MIN, K.; EBELER, S. E. Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. **Food and Chemical Toxicology**. New York. v. 46, p. 96-104, 2008.
- MIRA, L.; FERNANDEZ, M. T.; SANTOS, M.; ROCHA, R.; FLORÊNCIO, M. H.; JENNINGS, K. R. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. **Free Radicals Research**, New York. v. 36, p. 1199-1208, 2002.
- MOROE, B. M. **Singlet oxygen in solution: lifetimes and reaction rate constants**. In singlet O<sub>2</sub>. Frimer, A.A.; Boca Raton: Ed CRC Press., 1985.
- MOREL, I.; LESCOAT, G.; COGREL, P.; SERGENT, O.; PASDELOUP, N.; BRISSOT, P. Antioxidant and iron chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 45, p. 13-19, 1993.
- MUKAI, K.; NAGAI, S.; OHARA, K. Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by tea catechins in ethanol solution. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 39, p. 752-761, 2005.
- NAGAI, S.; OHARA, K. MUKAI, K. Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by flavonoids in ethanol solution. **Journal of Physiology and Biochemistry**, Pamplona, v. 109, p. 4234-4240, 2005.
- NAKAO, M.; TAKIO, S.; ONO, K. Alkyl peroxy radical-scavenging activity of catechins. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 49, p. 2379-2382, 1998.
- NILES, J. C.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S.R. Spiroiminodihydantoin is the major product of 8-oxo-7,8-dihydroguanosine reaction with peroxynitrite in the presence of thiols and guanosine photooxidation by methylene blue. **Organic Letters** Bethesda. v. 3, p. 963-966, 2001.

- OHSHIMA, H.; YOSHIE, Y.; AURIOL, S.; GILIBERT, I. Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: Effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitroxyl anion. **Free Radicals Biology & Medicine**. New York. v. 25, p. 1057-1065, 1998.
- OYAMA, Y.; NOGUCHI, S.; NAKATA, M.; OKADA, Y.; YAMAZAKI, Y.; FUNAI, M.; CHIKAHISA, L.; KANEMARU, K. Exposure of rat thymocytes to hydrogen peroxide increases annexin V binding to membranes: inhibitory actions of deferoxamine and quercetin. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 384, p. 47-52, 1999.
- PETERSON, J.; DWYER J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, New York, v. 18, p. 1995-2018, 1998.
- PIERLOT, C.; AUBRY, J. M.; BRIVIBA, K.; SIES, H.; DI MASCIO, P. Naphthalene endoperoxides as generators of singlet oxygen in biological media. **Methods in Enzymology**, New York. v. 319, p. 3-20, 2000.
- PRAT, F.; HOUK. N.; FOOTE. C. S. J.; Determination of the quenching rate constants of singlet oxygen by derivatized nucleosides in nonaqueous solution. **American Chemical Society**, Washington, v. 119, p. 5051-5052, 1997.
- RASO, G. M.; MELI, R.; DI CARLO, G.; PACILIO, M.; DI CARLO, R. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expressions by flavonoids in macrophage J774A.1, **Life Science**, New York, v. 68, p. 921-931, 2001.
- RAVANAT, J.-L.; CADET, J. Reaction of singlet oxygen with 2'-deoxyguanosine and DNA. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 8, p. 379-388, 1995.
- RAVANAT, J.-L.; SAINT-PIERRE, C.; DI MASCIO, P.; MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H. G.; CADET, J. Damage to isolated DNA mediated by singlet oxygen. **Helvetica Chimica Acta**, Basel, v. 84, p. 3702-3709, 2001.
- RAVANAT, J.-L.; MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H. G.; DI MASCIO, P.; CADET, J. Mechanistic aspects of the oxidation of DNA constituents mediated by singlet molecular oxygen. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Orlando. v. 423, p. 23-30, 2004.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, New York. v. 20, p. 933-956, 1996.
- RYTER, S.W.; TYRRELL, R.M. Singlet Molecular Oxygen ( $^1\text{O}_2$ ): a possible effector of eukaryotic gene expression. **Free Radical Biology & Medicine**, New York v. 24, p. 1520-1534, 1998.
- SCOTT, B. C. BUTLER, J.; HALLIWELL B.; ARUOMA, O. I. Evaluation of the antioxidant actions of ferulic acid and catechins. **Free Radical Research Communications**, v. 19, p. 241-253, 1993.
- SCHULZ, W. A.; BENDORF, M. S. W.; SIES, H. Localization of strand breaks in plasmid DNA treated with reactive oxygen species. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 234, p. 45-51, 1994.
- SHEU, C.; FOOTE, C. S. Reactivity toward singlet oxygen of a 7,8-dihydro-8-oxoguanosine ("8-hydroxyguanosine") formed by photooxidation of a guanosine derivative. **Journal of the American Chemical Society**. Washington. v. 117, p. 6439-6442, 1995a.
- SHEU, C.; FOOTE, C. S. Photosensitized oxygenation of a 7,8-dihydro-8-oxoguanosine derivative. Formation of dioxetane and hydroperoxide intermediates, **Journal of the American Chemical Society**. Washington. V.117, p.474-477, 1995b.

- SHEU, C.; KANG, P.; KHAN, S.; FOOTE, C. S. Low-temperature photosensitized oxidation of a guanosine derivative and formation of a imidazole ring-opened product. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 124, p. 3905-3913, 2002.
- SHIGENAGA, M. K.; PARK, J.-W.; CUNDY, K. C.; GIMENO, C. J.; AMES, B. N. *In vivo* oxidative DNA damage: measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA and urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 186, p. 521-530, 1990.
- SHIMIZU, M.; GRUZ, P.; KAMIYA, H.; MASUTANI, C.; XU, Y.; USUI, Y.; SUGIYAMA, H.; HARASHIMA, H.; HANAOKA, F.; NOHMI, T. Efficient and erroneous incorporation of oxidized DNA precursors by human DNA polymerase  $\eta$ . **Biochemistry**, New York, v. 46, p. 5515-5522, 2007.
- SICHEL, G.; CORSARO, C.; SCALIA, M.; DI BILIO, A. J.; BONOMO, R. *In vitro* scavenger activity of some flavonoids and melanins against  $O_2^-$ . **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 11, p. 1-8, 1991.
- SMITH, C.; HALLIWELL, B. Protection by albumin against the pro-oxidant actions of phenolic dietary components, **Food Chemical Toxicology**, Bethesda, v.30, p. 483-489, 1992.
- SONG, Y.; KANG, J.; WANG, Z.; LU, X.; GAO, J.; WANG, L. Study on the interactions between  $CuL_2$  and morin with DNA. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 91, p. 470-474, 2002.
- SUZUKI, T.; NAKANO, T.; MASUDA, M.; OHSHIMA, H. Epigallocatechin gallate markedly enhances formation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in the reaction of the 2'-deoxyguanosine with hypochlorous acid. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 36, p. 1087-1093, 2004.
- SUZUKI, T.; YAMAMOTO, K.; HARASHIMA, H.; KAMIYA, H. Base excision repair system suppresses mutagenesis caused by 8-hydroxy-dGTP in *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Symposium Series**, Berlin, v. 51, p. 51-52, 2007.
- TCHOU, J.; KASAI, H.; SHIBUTANI, S.; CHUNG, M. H.; LAVAL, J.; GROLLMAN, A. P.; NISHIMURA, S. 8-oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 88, p. 4690-4694, 1991.
- TCHOU, J.; GROLLMAN, A. P. The catalytic mechanism of FPG protein: evidence for a Schiff base intermediate and amino terminal localization of the catalytic site. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 270, p.11671-11677, 1995.
- ULLMANNOVA, V.; POPESCU, N. C. Inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis, reactivation of DLC1, and modulation of other gene expression by dietary flavone in breast cancer cell lines. **Cancer Detection and Prevention**, Malden, v. 31, p. 110-118, 2007.
- VAN ACKER, S. A.; GROOT, M. J.; VAN DER BERG, D. J.; TROMP, M. N.; DONNEOP, G.; VAN DER VITGH, W. J.; BAST, A. A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids. **Chemical Research Toxicology**, Washington, v. 9, p. 1305-1312 1996.
- YAMAGUCHI, L. F.; VASSÃO, D. G.; KATO, M. J.; DI MASCIO, P. Biflavonoids from Brazilian pine *Araucaria angustifolia* as potential protective agents against DNA damage and lipoperoxidation. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 66, p. 2238-2247, 2005.

- YAMANAKA, N.; ODA, O.; NAGAO, S. Green tea catechins such as (-)-epicatechin and (-)-epigallocatechin accelerate Cu<sup>2+</sup>-induced low-density lipoprotein oxidation in propagation phase. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 401, p. 230–234, 1997.
- YE, Y.; MULLER, J. G.; LUO, W.; MAYNE, C. L.; SHALOPP, A. J.; JONES, R. A.; BURROWS, C. J.; Formation of <sup>13</sup>C-, <sup>15</sup>N-, and <sup>18</sup>O-labeled guanidinohydantoin from guanosine oxidation with singlet oxygen. Implications for structure and mechanism. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 125, p. 13926-13927, 2003.
- ZHENG, P. W.; CHIANG, L. C.; LIN, C. C. Apigenin induced apoptosis through p53-dependent pathway in human cervical carcinoma cells. **Life Sciences**, New York, v. 76, p. 1367-1379, 2005.