

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
ANTIGENOTÓXICA DE EXTRATO DE BRÁCTEAS DE *Araucaria*
angustifolia (Bert.) O. Kuntze**

MÁRCIA DENIZE OLIVEIRA DE SOUZA

Caxias do Sul

2013

MÁRCIA DENIZE OLIVEIRA DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
ANTIGENOTÓXICA DE EXTRATO DE BRÁCTEAS DE *Araucaria
angustifolia* (Bert.) O. Kuntze**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Biotecnologia da Universidade de
Caxias do Sul, visando à obtenção do grau de
Mestre em Biotecnologia.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mirian Salvador

Caxias do Sul

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

S729c Souza, Márcia Denize Oliveira de
Caracterização química, atividade antioxidante e antigenotóxica de
extrato de brácteas de *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Kunzte / Márcia
Denize Oliveira de Souza. – 2013.
63 f. : il. ; 30 cm

Apresenta bibliografia.
Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2013.
Orientador: Profa. Dra. Mirian Salvador.

1. *Araucaria angustifolia*. 2. Antioxidantes. 3. Fitoquímicos. 4.
Biotecnologia. I. Título.

CDU 2.ed.: 582.473

Índice para o catálogo sistemático:

1. <i>Araucaria angustifolia</i>	582.473
2. Antioxidantes	66.094.3-097.8
3. Fitoquímicos	581.19
4. Biotecnologia	57.08

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Ana Guimarães Pereira – CRB 10/1460

MÁRCIA DENIZE OLIVEIRA DE SOUZA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
E ANTIGENOTÓXICA DE EXTRATO DE BRÁCTEAS DE
Araucária angustifolia (Bert.) O. Kuntze

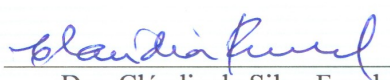
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Biotecnologia da Universidade de
Caxias do Sul, visando à obtenção do grau de
Mestre em Biotecnologia.

Dissertação aprovada em vinte de dezembro de 2013


Orientadora Dra. Mirian Salvador


Dra. Mariana Roesch Ely


Dra. Patrícia Kelly Wilmsen Dalla Santa Spada


Dra. Cláudia da Silva Funchal

*A meu esposo Yonel e a minha amada filha
Isadora.
Obrigado pelo apoio, compreensão e amor.*

AMO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof^a Dr^a Mirian Salvador, pela paciência, incentivo e principalmente pela oportunidade de realizar este trabalho.

Aos colaboradores desta pesquisa, Dr. Sidnei Moura, Dr^a Fabiana Agostini e à doutoranda Catia Branco, pela disponibilidade e auxílio prestados.

Às alunas de iniciação científica, Juliana Sene e Rafaela Dall Agnol, que prestaram grande contribuição para o sucesso deste trabalho.

Aos meus professores da banca de acompanhamento Prof. Dr. Aldo Dillon e Dr^a Mariana Roesch-Ely, pelo auxílio, suporte, amizade e disponibilidade.

Aos professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia pela contribuição no meu crescimento profissional e pessoal.

À Universidade de Caxias do Sul, pela oportunidade, e ao apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e da Coordenação de Apoio de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

À minha família, em especial ao meu esposo Yonel, por sempre acreditar em mim e por compreender minhas ausências nas várias horas em que eu me dediquei ao mestrado. Obrigado por todo o apoio e amor.

À minha amada filha Isadora, por encher meu coração de alegria e ser o combustível que me permite ir à busca do impossível.

Em fim, a Deus por me dar a força que precisei para superar todas as dificuldades e percalços, sem esmorecer.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 Espécies reativas, estresse oxidativo e antioxidantes.....	12
2.2 Metodologias para avaliação da atividade antioxidante e antigenotóxica.....	17
2.3. <i>Araucaria angustifolia</i>	22
2.3.1 Aspectos etnobotânicos da <i>Araucaria angustifolia</i>	22
2.3.2 Atividade biológica e principais compostos de <i>Araucaria angustifolia</i>	25
3. OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo geral.....	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4. RESULTADOS.....	30
5. DISCUSSÃO GERAL.....	49
6. CONCLUSÃO.....	53
7. PERSPECTIVAS.....	54
8. REFERÊNCIAS.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reações de Haber-Weiss e Fenton e produção de radical hidroxila por essas reações (Adaptado de Valko <i>et al.</i> , 2005).....	12
Figura 2. Núcleo fundamental e classificação dos flavonóides.....	16
Figura 3. Imagens das classes 0-4 de danos no DNA analisados visualmente pelo ensaio cometa.....	20
Figura 4. <i>Araucaria angustifolia</i>	22
Figura 5. Pinha (A) sementes (B), brácteas (C) e eixo central (D) de <i>Araucaria angustifolia</i>	24

LISTA DE ABREVIATURAS E FÓRMULAS

CAT	Catalase
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNPB	Dinitrofenilhidrazina
DTNB	5,5-ditiobis- ácido 2-nitrobenzóico
ENDO	Endonuclease III
ER	Espécies reativas
FPG	Formamidopiridina DNA glicosilase
GPx	Glutationa peroxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HO•	Radical hidroxila
MDA	Malondialdeído
MRC5	Fibroblasto de pulmão humano
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol 2-il)-2,5difetil brometo de tetrazolina
NO•	Oxido Nítrico
O ₂ ^{•-}	Anion superóxido
ONOO•	Peroxinitrito
ROO•	Radical peroxil
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Produtos reativos ao ácido tiobarbitúrico
HPLC	High performance liquid chromatography

RESUMO

Araucaria angustifolia (Bert.) O. Kuntze é uma espécie dioica, isto é, flores masculinas e femininas originam-se em árvores separadas. As flores femininas apresentam-se como estróbilo, mais conhecido como pinha. A pinha é constituída por sementes (pinhões) e brácteas (sementes não desenvolvidas), as quais apresentam elevada concentração de compostos fenólicos. Esses compostos são conhecidos por reduzir danos oxidativos a lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, contribuindo para minimizar a incidência de doenças relacionadas com o estresse oxidativo, tais como doenças cardiovasculares, neurológicas e câncer. O objetivo deste estudo foi caracterizar quimicamente, avaliar a atividade antioxidante e antígeno-tóxica do extrato aquoso de brácteas de *A. angustifolia*. Neste trabalho, os polifenóis totais do extrato de *A. angustifolia* foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu e sua composição química foi confirmada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O potencial do extrato para neutralizar espécies reativas foi avaliado através do ensaio com 2,2-difenil 1-picrilhidrazil (DPPH[•]) e pelas atividades *like* das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Em linhagem celular de fibroblasto de pulmão humano (MRC5), avaliou-se o efeito protetor do extrato na viabilidade celular através da redução de 3-(4,5-dimetiltiazol 2-il)-2,5difenil brometo de tetrazolina (MTT), na atividade das enzimas SOD e CAT, nos danos oxidativos a lípidos, proteínas e ácido desoxirribonucléico (DNA) (ensaio cometa alcalino e enzimático) induzidos pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O teor de fenólicos totais do extrato de *A. angustifolia* foi de 670,93 ± 17,79 mg catequina /100 g de brácteas, sendo a catequina, epicatequina, quercetina e apigenina os principais polifenóis encontrados. O extrato de *A. angustifolia* foi capaz de reduzir o radical DPPH[•] e apresentou atividade SOD e CAT-like. Além disso, o extrato de *A. angustifolia* nas concentrações estudadas (25 e 50 µg/mL) reduziu a mortalidade celular, danos oxidativos a lipídios, proteínas e DNA, e diminuiu a depleção das enzimas antioxidantes SOD e CAT induzida pelo H₂O₂ em células MRC5. Apesar de não ter sido observado correlação entre os polifenóis e marcadores de danos oxidativos, verificou-se uma correlação negativa entre danos a lipídios, proteínas e ácidos nucleicos e a atividade das enzimas SOD e CAT, sugerindo que essas enzimas desempenham um importante papel na prevenção de danos às biomoléculas. Esses resultados mostram que a *A. angustifolia* apresenta potencial como fonte de compostos fitoquímicos com atividade biológica relevante.

Palavras-chaves: *Araucaria angustifolia*, antioxidante, antígeno-tóxico, polifenóis.

ABSTRACT

Araucaria angustifolia (Bert.) O. Kuntze is a dioecious species, with male and female flowers found on separate trees. The *A. angustifolia* female cone consists of fully developed edible seeds and non-developed seeds called bracts. These bracts have high concentration of phenolic compounds, which have the potential to prevent oxidative damage to lipids, proteins and nucleic acids, and decreasing the incidence of diseases related to oxidative stress, such as cardiovascular and neurological diseases, and cancer. The aim of the present study was to evaluate the chemical characterization and antioxidant and antigenotoxic activities of the extract of *A. angustifolia* bracts. In this work the polyphenols total of *A. angustifolia* extract was determinate by Folin-Ciocalteu reagent and its chemical composition was confirmed by high performance liquid chromatography (HPLC). The extract potential to neutralize reactive species was evaluated by 2,2- diphenyl 1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) method and by the ability to mimic the activities of superoxide antioxidants *like* dismutase (SOD) and catalase (CAT). In human cell line of lung fibroblast (MRC5), we evaluated the protective effect of the extract on cell viability by reduction of 3 - (4,5 dimethylthiazol - 2 - yl) -2,5 diphenyl tetrazolina bromide (MTT), in the activity of SOD and CAT enzymes in oxidative damage to lipids, proteins and the deoxyribonucleic acid (DNA) (enzymatic and alkaline comet assay) induced by hydrogen peroxide (H₂O₂). The total phenolic content of the *A. angustifolia* extract was 670.93 ± 17.79 mg catechin / 100 g bracts, and catechin, epicatechin, quercetin and apigenin the main polyphenol found. The *A. angustifolia* extract was able to reduce DPPH[•] and presented like activity of SOD and CAT enzymes. Furthermore, the *A. angustifolia* extract at the concentrations studied (25 and 50 mg/mL) reduced cell death , oxidative damage to lipids, proteins and DNA, and decreased depletion of antioxidant enzymes SOD and CAT induced by H₂O₂ in MRC5 cells . Although, no correlation between polyphenols and bookmarks of oxidative injury have been observed. There was a negative correlation between damage to lipids, proteins and DNA with enzymes SOD and CAT, suggesting that these enzymes play a role in the regulation of cellular redox metabolism. These results showed that the *A. angustifolia* has potential as a source of phytochemical compounds with relevant bioactivities.

Keywords: *Araucaria angustifolia*, antioxidant, antigenotoxic, polyphenols.

1. INTRODUÇÃO

A espécie *A. angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, pertencente à família das *Araucariaceae*, conhecida popularmente como pinheiro-do-paraná ou pinheiro-brasileiro; é uma conífera nativa do sul do Brasil (Freitas *et al.*, 2009). *A. angustifolia* é uma espécie dioica, isto é, flores masculinas e femininas originam-se em árvores separadas. As flores femininas apresentam-se como estróbilo, mais conhecido como pinha (Retiz *et al.*, 1983). A pinha é formada pelas sementes (pinhões), eixo central e brácteas (sementes não desenvolvidas). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2013), foram produzidos no Rio Grande do Sul, no ano de 2011, aproximadamente 806 toneladas de pinhão. Tendo em vista que uma pinha de Araucária apresenta em torno de 80% de brácteas (Michelon *et al.*, 2012), estima-se que foram geradas mais de 4.000 toneladas de brácteas naquele ano. Estas brácteas não têm utilidade definida e são, normalmente, descartadas no meio ambiente.

As brácteas de Araucaria apresentam significativo teor de compostos fenólicos (Michelon *et al.*, 2012). Estes compostos são conhecidos pela sua atividade antioxidante, protegendo lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (DNA) dos danos oxidativos e minimizando o risco da ocorrência de inúmeras doenças associadas ao estresse oxidativo, tais como doenças cardiovasculares, neurológicas e câncer (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Popularmente, diversas partes de *A. angustifolia* como as folhas, o nó-de-pinho e a casca do caule têm sido utilizadas na medicina popular como antisséptico e para o tratamento de diversas doenças, como infecções respiratórias, reumatismo, controle da pirose e no tratamento da anemia (Marquesini, 1995; Franco, 1997). Nos poucos estudos científicos realizados com *A. angustifolia*, demonstrou-se que a casca da árvore apresenta alta concentração de flavonoides e atividade antioxidante em microsomas e fibroblastos de ratos (Seccon *et al.*, 2010). Além disso, as folhas dessa árvore contêm proantocianidinas e

biflavonoides e apresentaram atividade anti-herpes (Freitas *et al.*,2009). As folhas da *A. angustifolia* foram capazes de reduzir danos oxidativos a lipídios e DNA em diferentes sistemas *in vitro* (Yamaguchi *et al.*,2005; 2009).

Diante da potencialidade dessa planta, este trabalho teve como objetivo caracterizar, quimicamente e avaliar a atividade antioxidante e antígeno-tóxica de extrato de brácteas de *A. angustifolia*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Espécies reativas, estresse oxidativo e antioxidantes

O termo espécies reativas (ER) é um termo coletivo, frequentemente utilizado para incluir não apenas radicais livres (RL), mas também alguns compostos não radicalares capazes de gerar RL, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio (Halliwell & Gutteridge, 2007). Entre as principais ER, destacam-se o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (HO^{\bullet}). O $O_2^{\bullet-}$ é o mais comum e abundante na célula, podendo reagir com centros ferro-enxofre de enzimas, danificando-as e diminuindo sua função. Além disso, é capaz de reagir rapidamente com o óxido nítrico, produzindo o ânion peroxinitrito ($ONOO^-$) que, apesar de sua meia-vida curta, pode atravessar membranas e reagir com biomoléculas, danificando-as (Denicola & Radi, 2005).

O H_2O_2 é formado, principalmente, na matriz mitocondrial durante o processo de redução do oxigênio, ou pela dismutação do $O_2^{\bullet-}$ pela enzima superóxido dismutase (SOD) (Fridovich, 1998). O H_2O_2 tem tempo de meia vida longo e pode atravessar facilmente membranas reagindo com proteínas ligadas ao ferro. Além disso, se esta ER não for decomposta por sistemas enzimáticos de defesa, poderá produzir o radical HO^{\bullet} que, embora possua meia vida curta, é altamente reativo às proteínas, aos lipídios e ao DNA (Halliwell & Gutteridge, 2007). O radical HO^{\bullet} é formado a partir do H_2O_2 através das reações de Fenton e Haber-Weiss, que requerem ferro ou cobre (Figura 1).

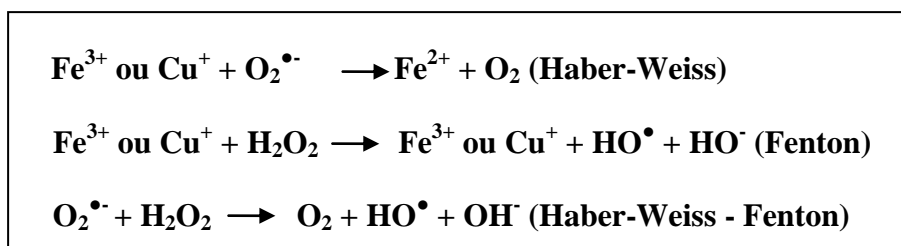


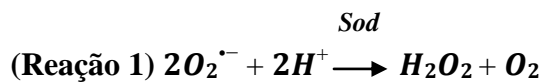
Figura 1. Reações de Haber-Weiss e Fenton e produção de radical hidroxila por essas reações. (Adaptado de Valko *et al.*, 2005).

As ER podem ser produzidas por fontes exógenas ou endógenas. A exposição à radiação, fumo, estresse, a administração de alguns medicamentos e compostos xenobióticos são alguns exemplos de fontes exógenas. Por outro lado, as fontes endógenas incluem a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, a enzima NADPH oxidase nos fagócitos e a atividade combinada da xantina oxidase e xantina desidrogenase, as quais produzem $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , respectivamente (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Em condições fisiológicas, as ER se formam em proporções que são facilmente controladas pelos mecanismos de defesas das células. Por outro lado, em situações patológicas, essa produção pode aumentar exacerbadamente e causar danos às células. Assim, a produção elevada de ER e/ou a deficiência nos sistemas de defesa antioxidantes resultam em uma condição conhecida como estresse oxidativo, caracterizado por danos a lipídios, proteínas e a ácidos nucleicos. Quantidades aumentadas desses danos têm sido detectadas em pacientes com várias doenças, tais como Parkinson, mal de Alzheimer, esclerose múltipla, câncer, diabetes *mellitus*, aterosclerose e cirrose (Halliwell & Gutteridge, 2007; Carocho & Ferreira, 2013).

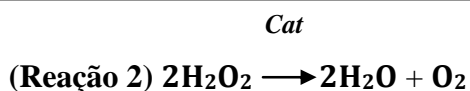
Os efeitos biológicos das ER são minimizados *in vivo* pelos sistemas antioxidantes (Tomé *et al.*, 2010). Antioxidantes são compostos que reduzem a concentração de ER, e reparam danos oxidativos, minimizando os efeitos biológicos nocivos às células, podendo ser classificados como enzimáticos ou não enzimáticos (Halliwell & Gutteridge, 2007).

O sistema de defesa antioxidante enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), as quais constituem uma importante linha de proteção contra danos oxidativos, exercendo papel crucial na manutenção do equilíbrio redox celular. A SOD dismuta o $O_2^{\cdot-}$, formando H_2O_2 (Reação 1), o qual é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, tais como a catalase ou a glutathione peroxidase (GPx) (Fridovich, 1998).



Em células eucariotas, há várias isoformas do tipo SOD, geralmente responsáveis por compartimentos celulares distintos. A SOD1 ou SODCuZn se encontra quase que exclusivamente no espaço citoplasmático intracelular. A SOD2 ou SODMn pode ser encontrada na mitocôndria da maioria dos animais, enquanto que a SOD3 ou ECSOD possui um peptídeo sinalizador que a direciona exclusivamente para o espaço extracelular (Fridovich, 1998; Zelko *et al.*, 2002).

A enzima catalase, codificada por um gene presente no cromossomo 11, é uma ferrilhemoenzima cuja função principal é dismutar o H_2O_2 , formando água e oxigênio molecular (Reação 2) (Ursini *et al.*, 1997) e apresenta uma das maiores taxas de rotatividade conhecida pelo homem, permitindo que uma molécula de catalase converta $6 \cdot 10^{10}$ moléculas de peróxido de hidrogênio (Rahman, 2007).



A CAT é um tetrâmero formado por unidades idênticas, sendo que cada monômero contém um grupo prostético heme no centro catalítico. Em animais, a catalase está presente, praticamente, em todos os órgãos do corpo (Inoue, 1994). Esta é uma enzima altamente específica porque possui atividade apenas sobre o H_2O_2 , hidroperóxidos de metila e etila (Halliwell & Gutteridge, 2007). A dosagem experimental da atividade da CAT baseia-se na medida da velocidade de consumo do H_2O_2 na amostra estudada. Esta determinação é diretamente proporcional à atividade enzimática e obedece a uma cinética que mede a velocidade de decomposição de H_2O_2 em diferentes intervalos de tempo (Aebi, 1984).

O sistema de defesa não enzimático é formado pelas vitaminas (em especial as vitaminas A, C e E), os carotenoides e os compostos fenólicos, entre outros (Halliwell & Gutteridge, 2007; Singh *et al.*, 2008; Tsao, 2010).

Os compostos fenólicos são amplamente distribuídos no reino vegetal e podem ser classificados em flavonoides e não flavonoides. Os flavonoides apresentam estrutura hidrocarbonada do tipo C6-C3-C6 (difetilpropano), derivada do ácido chiquímico e de três resíduos de acetato (Trueba & Sánchez, 2001; Aron & Kennedy, 2008; Tsao, 2010); eles podem ser divididos em diversas subclasses (flavan-3-ol, flavona, flavonol, flavanona, flavononol, antocianidina, chalcona, aurona), de acordo com o grau de oxidação do oxigênio heterocíclico (Figura 2) (Trueba & Sánchez, 2001).

Os flavonoides têm sido descritos como importantes varredores de ER e quelantes de íons metálicos, principalmente ferro e cobre, os quais são os de maior relevância para as reações iniciais de formação ER (Halliwell & Gutteridge, 2007). Além disso, os flavonoides podem inibir as enzimas NADPH oxidase, xantina oxidase e xantina desidrogenase envolvidas na geração de ER protegendo, dessa forma, as células contra os danos oxidativos (Schaffer & Halliwell, 2012). Os compostos não-flavonoides são derivados de estruturas químicas específicas, como derivados do ácido benzoico (C6-C1), (Ex.: ácidos gálico e vanílico) e os derivados do ácido cinâmico (C6-C3), (Ex.: ácidos cafeico e p-cumárico) (Trueba & Sanchez, 2001).

O conteúdo polifenólico total de um extrato/produto pode ser avaliado através de diferentes metodologias. Uma das mais utilizadas é a técnica espectrofotométrica de Folin Ciocalteau (Singleton *et al.*, 1999). Além da metodologia para quantificação de polifenóis totais, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é outra ferramenta bastante útil para acessar o perfil fitoquímico de amostras, permitindo a identificação de cada composto isoladamente. Nesta técnica utiliza-se, como fase móvel, um líquido e, como fase estacionária,

partículas sólidas empacotadas em uma coluna. A separação dos compostos resulta das diferentes velocidades dos componentes arrastados pela fase móvel devido às distintas interações com a fase estacionária. Os compostos podem ser identificados através do tempo de retenção na fase estacionária, comparados com os padrões (Falkenberg *et al.*, 2001).

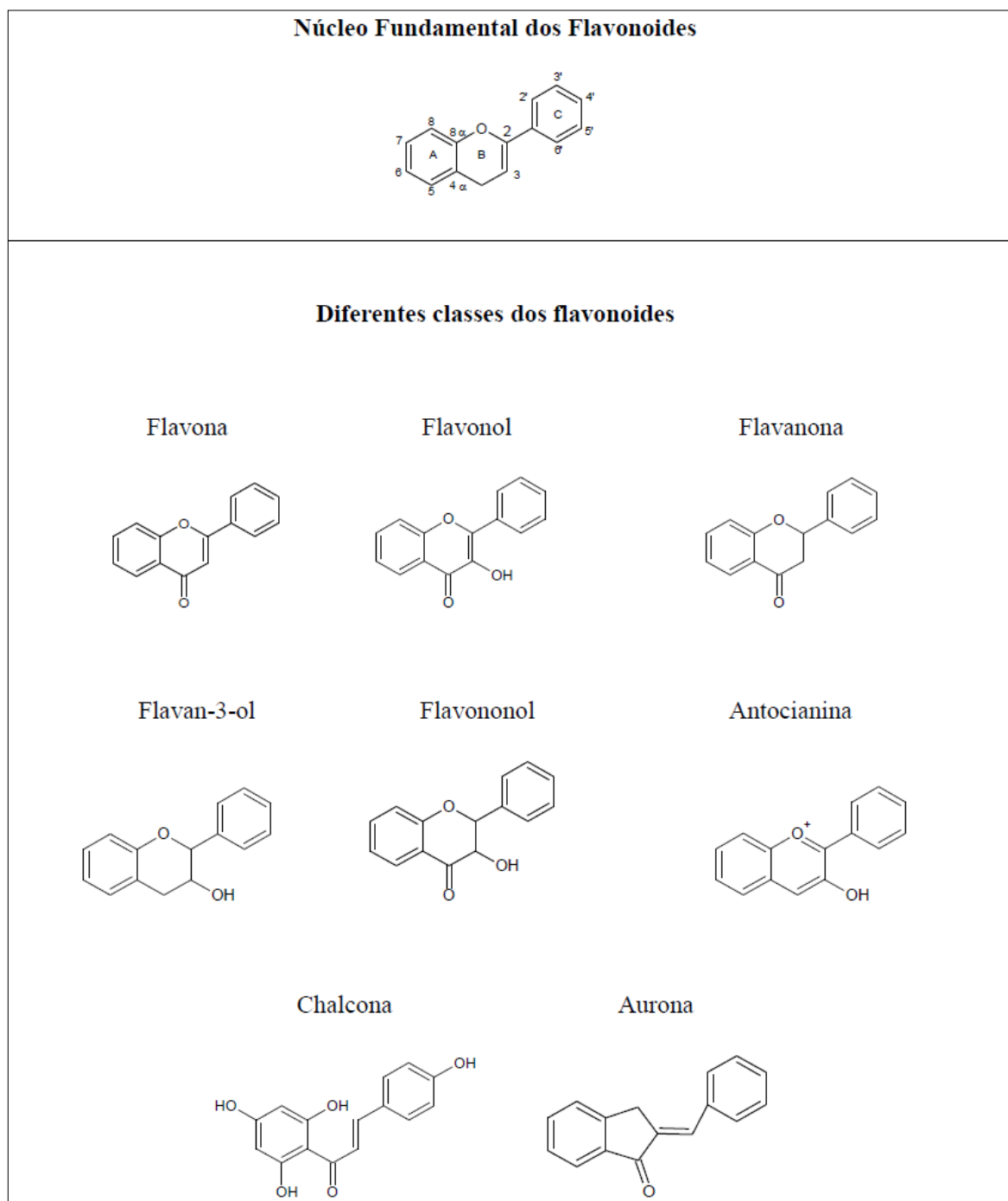


Figura 2. Núcleo fundamental e classificação dos flavonoides (Adaptado de Aron & Kennedy, 2008).

2.2 Metodologias para avaliação da atividade antioxidante e antígenotóxica

A determinação da atividade antioxidante *in vitro* de um composto pode ser realizada de diversas maneiras, entre elas, destaca-se a capacidade de varredura do radical livre 2,2-difenil 1-picrilhidrazil (DPPH[•]). Esse ensaio é amplamente utilizado por ser um método rápido que determina a habilidade de um composto antioxidante transferir um átomo de hidrogênio para o radical DPPH[•] (Rice-Evans *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 2006). Destaca-se, ainda, a determinação da atividade SOD-like, que determina a presença ou a ausência na amostra de substâncias que mimetizem a ação da enzima superóxido dismutase. A atividade CAT-like, por sua vez, verifica a presença ou não de compostos que atuem de maneira semelhante à ação da enzima catalase (Dani *et al.*, 2007; Spada *et al.*, 2008).

Considerando que a atividade antioxidante de um composto é influenciada pelo modelo de estudo, costuma-se empregar mais de um tipo de teste (Halliwell & Gutteridge, 2007). O cultivo de células de mamíferos se caracteriza por apresentar um valor significativo nesses estudos, facilitando a análise de propriedades e processos que não seriam facilmente realizados em nível de organismo intacto. Devido a essa praticidade e efetividade de ensaios, diversos trabalhos utilizam esses sistemas experimentais (Zucco *et al.*, 2004; Doyle & Griffiths, 1999).

As células de fibroblastos de pulmão humano (MRC5) são uma linhagem de fácil cultivo e manutenção, pois apresentam um rápido crescimento em um curto período de adaptação. As células MRC5 têm sido amplamente empregadas em estudos de diversas áreas, como estresse oxidativo (Maziere *et al.*, 2000; Kong *et al.*, 2012), mutagênese e reparação de DNA (Bourton *et al.*, 2012; Capella *et al.*, 2012).

Para determinar a proliferação celular e citotoxicidade de compostos, um método colorimétrico rápido utilizado é a redução do 3-(4,5-dimetiltiazol 2-il)-2,5difenil brometo de tetrazolina (MTT). O MTT, quando incubado com células metabolicamente ativas, é reduzido

por enzimas mitocondriais, transformando-se de um composto amarelo em um composto azul escuro (formazan). A produção dos cristais de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória (Denizot *et al.*, 1986).

Os principais alvos das ER são proteínas, lipídios, ácido desoxirribonucléico (DNA) e ácido ribonucléico (RNA) (Lu *et al.*, 2010; Craft *et al.*, 2012). O dano aos lipídios ocorre através de reações em cadeia, iniciando com ataque de uma ER, provocando um aumento da permeabilidade da membrana celular para substâncias que normalmente não cruzam a bicamada lipídica (cálcio, por exemplo), levando a inúmeros eventos intracelulares. Entre os produtos finais da peroxidação lipídica estão os compostos de baixo peso molecular, como hidrocarbonetos (etano e pentano) e aldeídos, principalmente o malondialdeído (MDA). A determinação desses compostos de baixo peso molecular pelo método que mensura os produtos capazes de reagir com o ácido tiobarbitúrico (TBA) é um importante indicativo dos níveis de dano oxidativo nos lipídios (Halliwell & Gutteridge, 2007).

A quantificação de proteínas carboniladas também pode ser considerada um importante e sensível marcador de estresse oxidativo. As proteínas oxidadas podem afetar a função de receptores, enzimas, anticorpos e proteínas de transporte. O processo de carbonilação proteica pode ocorrer através da oxidação direta dos aminoácidos, pela interação das proteínas com produtos finais da peroxidação lipídica como 4-hidroxinonal e o MDA e, também, através de reações de glicação (Chakravarti & Chakravarti, 2007). A técnica que tem como princípio a reação dos grupos carbonílicos com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) formando 2,4-dinitrofenilhidrazona tem sido bastante utilizada como método de avaliação do conteúdo de proteínas carboniladas (Levine *et al.*, 1990).

O sistema de defesa antioxidante enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas SOD e CAT, as quais constituem uma importante linha de proteção contra danos oxidativos, exercendo papel crucial na manutenção do equilíbrio redox celular. A atividade da

enzima SOD pode ser determinada espectrofotometricamente, através da formação de adrenocromo, resultante da auto-oxidação da adrenalina. Quanto mais adrenocromo, maior será a absorbância e, conseqüentemente, menor será a atividade enzimática (Bannister & Calabrese, 1987). A dosagem experimental da atividade da CAT baseia-se na medida da velocidade de consumo do H₂O₂ na amostra estudada. Essa determinação é diretamente proporcional à atividade enzimática e obedece a uma cinética que mede a velocidade de decomposição de H₂O₂ em diferentes intervalos de tempo (Aebi, 1984).

Além disso, as ER produzem uma ampla variedade de danos ao DNA. As lesões genotóxicas são caracterizadas por uma alteração química e/ou física em um ácido nucleico que leva ao prejuízo de funções, como a replicação e a transcrição, processos que necessitam que o DNA esteja intacto. As lesões genotóxicas podem ser quebras simples, quebras duplas na cadeia do DNA, reparo por excisão incompleta, pontes intercadeia de DNA (crosslinks) e danos alcalilábeis (Singh *et al.* 1988; Collins *et al.* 2008), danos oxidativos das bases nitrogenadas entre outras (Collins *et al.* 2008).

A determinação das lesões ao DNA pode ser medida pelo ensaio cometa ou *Single Cell Gel Electrophoresis*. Por necessitar de um pequeno número de células, sem que elas estejam necessariamente em divisão, essa técnica se torna vantajosa diante de outras metodologias bioquímicas e citogenéticas (Hartmann & Speit, 1994). As células em gel e dispostas sobre lâminas são submetidas a uma corrente elétrica que propicia a migração dos fragmentos de DNA para fora do núcleo na presença de dano. Após a eletroforese, as células que apresentam um núcleo redondo são identificadas como normais, sem dano perceptível ao DNA. As células que apresentam qualquer tipo de lesão são identificadas visualmente por uma espécie de cauda formada pelos fragmentos de DNA, similar a de um cometa. A identificação do dano no DNA pode ser feita de diferentes maneiras como, por exemplo, pela medição do comprimento do DNA migrante com a ajuda de uma ocular de medidas, ou,

ainda, mediante uma classificação visual realizada após a coloração com nitrato de prata ou microscópio de fluorescência, efetivada após coloração com brometo de etídio, laranja de acridina ou iodeto de propídio. As células são classificadas de acordo com o tamanho da cauda formada. Assim, tem-se que a classe 0 corresponde a uma célula sem cauda, ou seja, sem dano; na classe 1, a cauda é menor que o diâmetro do núcleo; na classe 2, a cauda se apresenta com comprimento entre uma a duas vezes o diâmetro do núcleo; na classe 3, a cauda é longa, apresentando comprimento superior a duas vezes o diâmetro do núcleo; e, na classe 4, a cauda é longa e bastante espalhada (Olive & Banáth, 2006) (Figura 3).

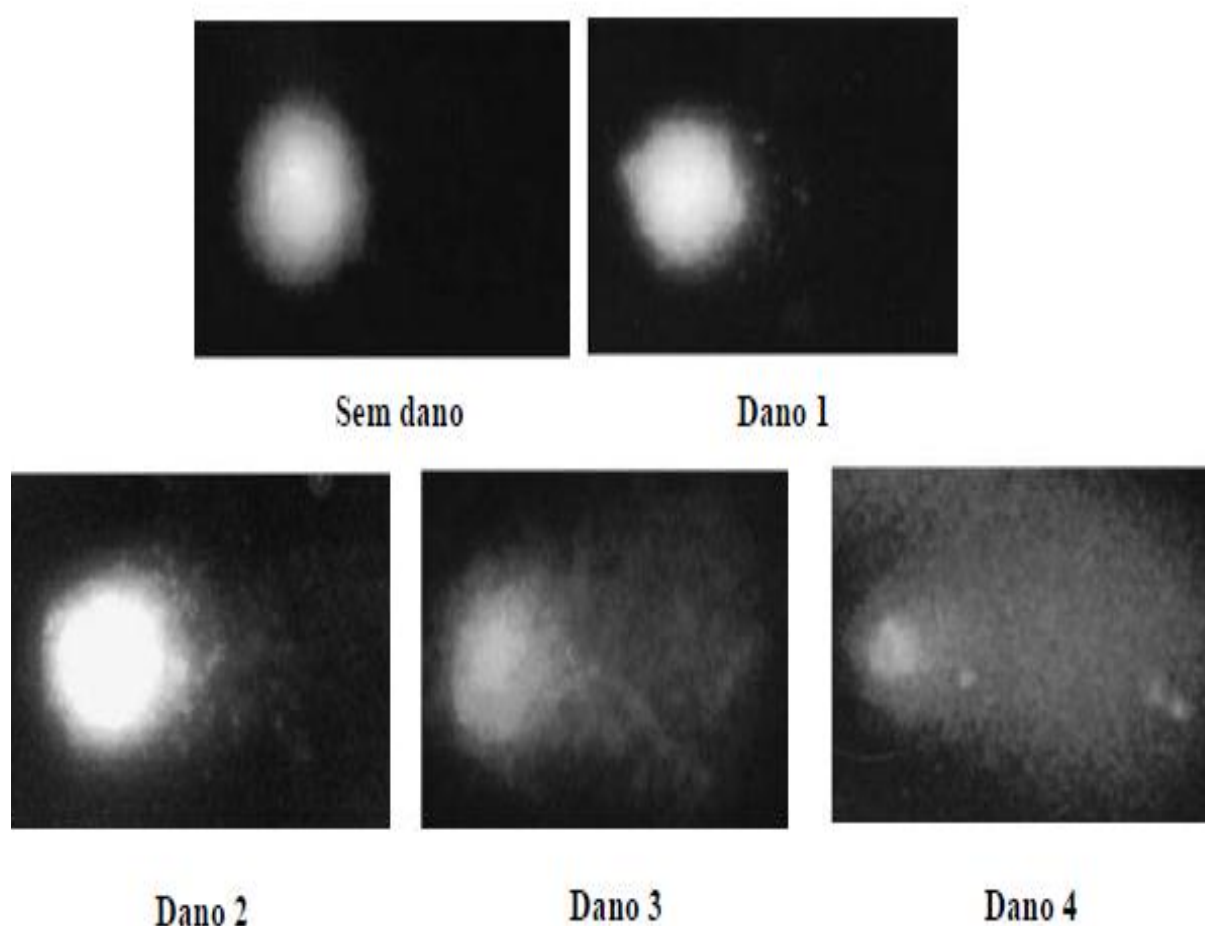


Figura 3. Imagens das classes 0-4 de danos no DNA analisados visualmente pelo ensaio cometa (Adaptado de Heuser *et al.*, 2007).

O ensaio cometa é utilizado amplamente na genética médica, na genética toxicológica, ecotoxicológica, em diagnóstico e em tratamentos médicos, na medicina ambiental, na ocupacional, no biomonitoramento ambiental, além de outras aplicações (Azqueta *et al.*, 2009).

Existem dois protocolos principais para a realização desse teste, de acordo com o pH do tampão a ser utilizado: a versão neutra (pH 7-8), conforme o método original de Östling e Johanson (1984), que utiliza a eletroforese em tampão com pH neutro, que possibilita detectar quebras duplas nas moléculas de DNA. A versão alcalina (pH >13), desenvolvida por Singh *et al.* (1988) a partir do método original, que realiza a eletroforese em tampão alcalino produzindo, assim, desnaturação do DNA, detectando quebras de fita simples e dupla na cadeia do DNA, reparo por excisão, pontes intercadeia de DNA (crosslinks) e danos alcalilábeis.

O ensaio cometa permite o reconhecimento de lesões que se manifestam somente como quebras de cadeia, tornando-se um pouco limitado, uma vez que não detecta danos oxidativos gerados pelas oxidações das bases nitrogenadas. Uma alternativa para essa limitação é o emprego de endonucleases de reparação do DNA antes da eletroforese. As endonucleases são capazes de reconhecer sítios de lesões específicos gerando uma quebra de cadeia de DNA que pode, então, ser detectada pelo ensaio cometa. Assim, a diferença entre o índice de dano de uma amostra tratada com a enzima de reparação de DNA para um dano específico e a mesma amostra não tratada fornece a quantificação da lesão em análise. Essa adaptação torna o ensaio cometa uma ótima ferramenta para a elucidação dos mecanismos genotóxicos (Azqueta *et al.*, 2009). As enzimas mais empregadas, e que estão envolvidas na remoção de danos oxidativos são endonuclease III (ENDO) e a formamidopiridina DNA glicosilase (FPG), as quais são capazes de detectar pirimidinas e purinas oxidadas, respectivamente (Collins *et al.*, 2008).

2.3. *Araucaria angustifolia*

2.3.1 Aspectos etnobotânicos da *Araucaria angustifolia*

A espécie *A. angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Figura 4), pertencente à família das *Araucariaceae*, é uma conífera nativa do sul do Brasil, conhecida popularmente como pinheiro-do-paraná ou pinheiro-brasileiro (Freitas *et al.*, 2009).



Figura 4. *Araucaria angustifolia* (<http://teresasilvestri.blogspot.com>)

A araucária é a única espécie de seu gênero com ocorrência natural no Brasil. Originalmente, as florestas de araucária cobriam uma área estimada de 200 mil km², distribuídas nos estados do Paraná (40%), Santa Catarina (31%), Rio Grande do Sul (25%) e sul de São Paulo (3%), internando-se até o sul de Minas Gerais e Rio de Janeiro, em áreas de

altitude elevada (1%) (Mattos, 1994). No entanto, o intenso processo de exploração predatória da Araucária no início do século XX fez com que as reservas naturais dessa espécie estejam limitadas a valores estimados entre 2% e 4% da área original (Simões & Lino, 2002), sendo essa a estimativa mais recente realizada.

A *A. angustifolia* se destaca dentre as demais espécies arbóreas por apresentar sua copa em um formato peculiar, grande porte, podendo atingir de 20 a 25 metros de altura, tronco geralmente cilíndrico reto, raras vezes ramificado, casca grossa e resinosa. As árvores adultas apresentam seus ramos dispostos em 8 a 15 verticilos, onde cada verticilo possui de 6 a 10 ramos. O afastamento dos verticilos se reduz gradativamente até o ápice, restando, nas árvores velhas, uma umbela terminal, também chamada de candelabro. As árvores jovens possuem copa cônica com os ramos primários cilíndricos, curvados para cima, e os ramos secundários, também conhecidos por grimpas, alternos, agrupados no ápice dos ramos primários. As folhas possuem de três a seis centímetros de comprimento, são simples, agudíssimo-pungentes de coloração verde-escuro (Reitz *et al*, 1979; Lorenzi, 1992; Carvalho, 1994). A idade da Araucária é calculada com base nos anéis de crescimento que são formados no tronco, podendo viver entre 200 e 300 anos (Carvalho, 1994).

As árvores dessa espécie são dioicas. Os cones masculinos (flores masculinas) são cilíndricos e alongados, medindo de 10 a 22 cm de comprimento, por 2 a 5 cm de diâmetro, sendo compostos por escamas. As escamas arranjam-se na inflorescência masculina, em espiral. As escamas da base se abrem primeiro, deixando o pólen livre e à disposição do vento para ser transportado ao estróbilo feminino (Reitz & Klein, 1966).

As flores femininas em estróbilo, chamado de pinha, ficam protegidas no ápice de um ramo por numerosas folhas (Reitz & Klein, 1966), com várias brácteas escamiformes, inseridas sobre um eixo central e cônico. Uma pinha, quando fecundada, pode apresentar entre 10 e 25 cm e, é composta por pinhões (sementes), eixo central cônico e brácteas

(sementes não desenvolvidas), podendo pesar entre 0,61 a 4,7 kg (Mattos, 1994; Michelon *et al.*, 2012) (Figura 5).

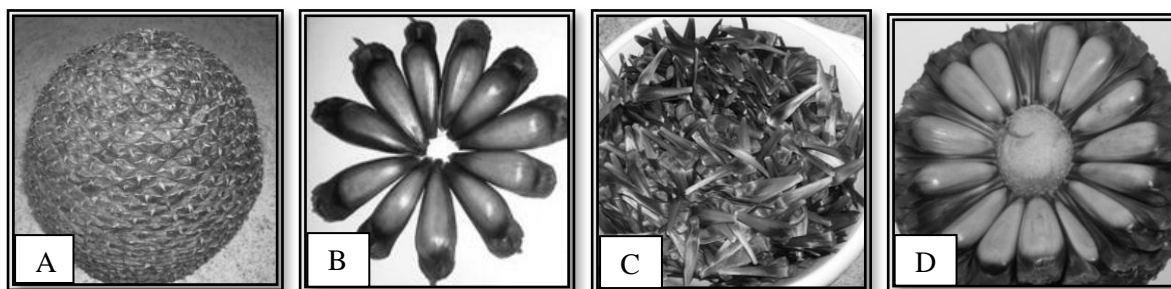


Figura 5. Pinha (A), sementes (B), brácteas (C) e eixo central (D) de *Araucaria angustifolia* (Adaptado de Michelon *et al.*, 2012).

De acordo com Mattos (1994), a polinização, que ocorre nos meses de outubro a dezembro, é realizada predominantemente pelo vento, sendo que dois anos após esse evento, as pinhas amadurecem, desenvolvem somente o óvulo fecundado (o pinhão) e comprimem as brácteas (sementes que não se desenvolveram) conforme o pinhão vai se desenvolvendo (Retiz *et al.*, 1983). Os pinhões possuem forma cônica-arredondada, são carnosos e bastante apreciados na culinária do sul do País (Cordenunsi *et al.*, 2004).

Nas populações naturais, a produção de sementes (pinhão) normalmente ocorre após 15 a 20 anos de idade e, quando plantadas, as árvores isoladas iniciam a produção de sementes entre 10 e 15 anos (Sanquetta & Netto, 2000). Uma árvore feminina produz, anualmente, uma média de 80 pinhas (Thomé, 1995).

Os pinhões são encontrados em maior quantidade nos meses de abril a junho, porém o maior volume de comercialização ocorre nos meses de junho e julho. Embora sua comercialização seja disciplinada pela Portaria Normativa DC nº 20, grande parte da venda ainda é clandestina (sem emissão de notas fiscais), o que dificulta a mensuração da magnitude deste mercado (BRDE, 2005). Segundo dados do IBGE, a quantidade de pinhão produzido no Rio Grande do Sul, em 2011, foi de 806 toneladas, sendo a região dos campos de cima da

Serra, principalmente as cidades São Francisco de Paula e Cambará do Sul, as maiores produtoras.

O pinhão apresenta grande importância como alimento, podendo ser consumido cru, cozido em água ou diretamente no fogo, e também é usado como farinha para pratos regionais (Cordenunsi *et al.*, 2004; Leite *et al.*, 2008), sendo uma ótima fonte de amido (Cordenunsi *et al.*, 2004) e fibras dietéticas (Cordenunsi *et al.*, 2004; Capella *et al.*, 2009).

2.3.2 Atividade biológica e principais compostos de *Araucaria angustifolia*

Popularmente, diferentes partes da árvore de *A. angustifolia* têm sido empregadas na medicina popular brasileira. Infusões de cascas são usadas para tratar as tensões musculares e varizes, e o xarope produzido com a resina é utilizado para o tratamento de infecções do trato respiratório. A infusão de folhas é usada para tratar escrofulose, fadiga e anemia (Marquesini, 1995; Franco, 1997).

Apesar do uso tradicional, existem poucos estudos científicos acerca do efeito farmacológico e compostos majoritários de *A. angustifolia* (Quadro 1). Extratos obtidos a partir da casca da árvore foram capazes de varrer o radical livre DPPH[•], prevenir a citotoxicidade induzida por H₂O₂ em células de fibroblasto de ratos e inibir a lipoperoxidação induzida por radicais ascorbil e radiação UV em lipossomos de fosfatidilcolina de soja e microsossomos de rato (Seccon *et al.*, 2010). As folhas de *A. angustifolia* mostraram atividade anti-herpes em células de macaco africano (Freitas *et al.*, 2009) e evitaram danos oxidativos a lipídios de membranas lipossômicas (Yamaguchi *et al.*, 2005) e ao DNA de células de timo de bezerro (Yamaguchi *et al.*, 2009).

Diferentes classes de compostos químicos foram descritos em *A. angustifolia*. A resina apresenta ácidos fenólicos, hidroquinona e ferruginol (Yamamoto *et al.*, 2004). O extrato hidroalcoólico da casca da árvore exhibe uma alta concentração de flavonoides, como ácido

benzoico, p-ácido hidroxibenzoico, ácido protocateico, quercetina, epiafzelequina protocatetuato e epiafzelequina p-hidroxibenzoato. Em estudos realizados a partir de extratos etanólicos das folhas de *A. angustifolia* foram identificadas proantocianidinas e os biflavanoides bilobetina, II-7-O-metil-robustaflavona e cupressuflavona (Freitas *et al.*, 2009). Extratos metanólicos da folha contêm os biflavanoides amantoflavona, mono, di, tri e tetra-*O*-metilamentoflavona e ginkgetina (Yamaguchi *et al.*, 2005). Em extratos metanólicos obtidos a partir da semente (pinhão) da araucária, identificou-se catequina e epicatequina (Cordenunsi *et al.*, 2004). Catequina, epicatequina e rutina também foram identificados em extrato aquoso de brácteas de *A. angustifolia* (Michelon *et al.*, 2012).

Com o objetivo de elucidar melhor a atividade biológica do extrato de brácteas de *A. angustifolia*, este trabalho utilizou células de fibroblasto de pulmão humano como sistema de estudo. Para a avaliação da atividade antioxidante e antígenotóxica as células foram pré-tratadas com o extrato e submetidas a estresse gerado por H₂O₂. Paralelamente, estudou-se a atividade antioxidante *in vitro* e o perfil fenólico do extrato.

Quadro 1. Compostos majoritários e efeito biológico de extratos de diferentes partes de *Araucaria angustifolia*

Parte da planta	Solvente	Composição química	Efeito biológico	Sistema utilizado	Referência
Bráctea	Água	Catequina, epicatequina e rutina	Antioxidante	Varredura do radical DPPH [•]	Michelon <i>et al.</i> , 2012
			Antimutagênica	Leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Folha	Etanol: Água	Proantocianidinas e biflavanoides bilobetina, II-7-O-metil-robustaflavona e cupressuflavona	Anti-herpes	Células de rim de macaco africano (VERO)	Freitas <i>et al.</i> , 2009
	Metanol	Biflavonoides amantoflavona, mono, di, tri e tetra- <i>O</i> -metilamentoflavona e ginkgetina	Antigenotóxico	Plasmídeo de <i>Escherichia coli</i>	Yamaguchi <i>et al.</i> , 2005
			Antioxidante	Lipossomos de fosfatidilcolina	
			Antigenotóxico	DNA de timo de bezerro	Yamaguchi <i>et al.</i> , 2009
Casca da árvore	Etanol: Água	Quercetina, catequina, epicatequina ácido benzoico, p-ácido hidroxibenzoico, ácido protocateico, epiafzelechina protocatetuato e epiafzelechina p-hidroxibenzoato	Antioxidante	Ensaio DPPH [•]	Seccon <i>et al.</i> , 2010
			Citoprotetor	Células de fibroblastode ratos	
			Antioxidante	Lipossomos de fosfatidilcolina de soja e microsossomos de rato	
Semente	Metanol	Catequina e quercitina	NE	-	Cordenunsi <i>et al.</i> , 2004
Resina	Diclorometano:	Lignanais, ácido 4-hidroxibenzaldeído, hidroquinona e ácido p-cumárico eferruginol	NE	-	Yamamoto <i>et al.</i> , 2004
	Metanol				

Nota: NE: Não estudado, DPPH[•]: capacidade de varedura do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- ✓ Estudar o perfil fenólico, a atividade antioxidante e antígenotóxica do extrato aquoso de brácteas de *A. angustifolia*.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Quantificar o teor de polifenóis totais e os compostos fenólicos majoritários do extrato de *A. angustifolia*;
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato de *A. angustifolia* através da capacidade de varredura do radical DPPH[•] e da atividade-*like* das enzimas superóxido dismutase e catalase;
- ✓ Avaliar o possível efeito protetor do extrato de *A. angustifolia* sobre a mortalidade celular (MTT), danos a lipídeos (TBARS) e proteínas (proteínas carboniladas) induzidos por peróxido de hidrogênio em células MRC5;
- ✓ Avaliar a atividade das enzimas SOD e CAT em células MRC5 tratadas com extrato de *A. angustifolia* em presença e ausência de peróxido de hidrogênio;
- ✓ Avaliar a atividade antígenotóxica (ensaio Cometa) do extrato de *A. angustifolia* em células MRC5 tratadas com peróxido de hidrogênio;
- ✓ Correlacionar estatisticamente os efeitos biológicos observados com os compostos detectados no extrato de *A. angustifolia*.

4. RESULTADOS

Os resultados desta dissertação estão apresentados na forma de um artigo científico, intitulado **Antioxidant and Antigenotoxic Activities of the Brazilian Pine *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze.**

Article

Antioxidant and Antigenotoxic Activities of the Brazilian Pine *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze

Márcia O. Souza¹, Cátia S. Branco¹, Juliane Sene¹, Rafaela Dallagnol¹, Fabiana Agostini², Sidnei Moura² and Mirian Salvador¹*

¹ Laboratory of Oxidative Stress and Antioxidants; Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul, RS 95070560, Brazil; E-Mails: marciadenizesouza@gmail.com (M.O.S.); csbranc1@ucs.br (C.S.B); jssene@ucs.br (J.S.); rdallagnol@ucs.br (R.D.)

² Laboratory of Biotechnology of Natural and Synthetics Products, Technology Department, Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul, RS 95070560, Brazil; E-Mails: fagosti1@ucs.br (F.A.); smsilva11@ucs.br (S.M.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: msalvado@ucs.br; Tel.: +55-54-3218-2105; Fax: +55-54-3218-2664.

Received: 12 November 2013; in revised form: 18 December 2013 / Accepted: 30 December 2013 /

Published:

Abstract: Polyphenols are natural products with recognized potential in drug discovery and development. We aimed to evaluate the polyphenolic profile of *Araucaria angustifolia* bracts, and their ability to scavenge reactive species. The antioxidant and antigenotoxic effects of *A. angustifolia* polyphenols in MRC5 human lung fibroblast cells were also explored. The total polyphenol extract of *A. angustifolia* was determined by the Folin–Ciocalteu reagent and the chemical composition was confirmed by HPLC. Reactive oxygen species' scavenging ability was investigated by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method and superoxide dismutase- and catalase-like activities. The protective effect of the extract in MRC5 cells was carried out by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide method and the determination of oxidative lipids, protein, and DNA (alkaline and enzymatic comet assay) damage. Total phenolic content of the *A. angustifolia* extract was 1586 ± 14.53 mg gallic acid equivalents/100 g of bracts. Catechin, epicatechin, quercetin, and apigenin were the major polyphenols. The extract was able to scavenge DPPH radicals and exhibited potent superoxide dismutase and catalase-like activities. Moreover, *A. angustifolia* extract significantly protected MRC5 cells against H₂O₂-induced mortality and oxidative damage to lipids, proteins, and DNA. Therefore, *A. angustifolia* has potential as a source of bioactive chemical compounds.

Keywords: *Araucaria angustifolia*; polyphenols; antioxidant; antigenotoxicity; MRC5

1. Introduction

Plant secondary metabolites have contributed to the development of new active molecules used in therapeutics. The diversity of the plant kingdom represents an immense reservoir of structures with potential pharmacological value. *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Araucariaceae) is a native conifer of Southern Brazil, which is popularly known as “pinheiro-do-paraná” or “pinheiro-brasileiro”. It is a dioecious species, which means it features male and female specimens that have their own distinct strobilus. The female strobilus consists of seeds (the edible part of *A. angustifolia*) and bracts, which are undeveloped seeds commonly discarded into the environment.

Different parts of *A. angustifolia* are used in Brazilian folk medicine. Infusions of bark are used to treat muscle strains and varices and the syrup produced from resin is used to treat respiratory tract infections. Moreover, infusions of leaves (needles) are used to treat scrofula, fatigue, and anemia [1,2].

Despite its traditional uses, few phytochemical and pharmacological studies have been performed from *A. angustifolia*. The dead bark of the tree has a high concentration of anthocyanins and proanthocyanidins, and presents antioxidant effects on liposomes and rat microsomes[3]. *A. angustifolia* needles contain proanthocyanidins and biflavonoids such as amentoflavone, mono-*O*-methylamentoflavone, di-*O*-methylamentoflavone, ginkgetin, tri-*O*-methylamentoflavone and tetra-*O*-methylamentoflavone [4,5]. It was shown that biflavonoids exhibit minor antiherpes activity and the proanthocyanidins seem to be mainly responsible for the antiviral activity of *A. angustifolia* needles [6]. The needles can also reduce lipoperoxidation and DNA damage in liposomal membranes [4] and in calf thymus cells [5]. The resin from *A. angustifolia* is rich in lignans and phenolic compounds, such as 4-hydroxybenzaldehyde, hydroquinone and *p*-coumaric acid [7]. The seed of this tree, named *pinhão*, is rich in lectins with anti-inflammatory and antibacterial activities [8].

In our previous study [9], we found that the aqueous extract of bracts from *A. angustifolia* presents antimutagenic activity and high levels of polyphenols. These bioactive compounds can act as reducing and/or scavengers agents, minimizing the generation of reactive species (RS) [10] implicated in protein, lipid, and nucleic acid damage [9]. Therefore, polyphenols

could reduce the occurrence of several diseases associated with oxidative stress, such as cancer and cardiovascular and neurological diseases [11].

The present study aimed to evaluate the polyphenolic profile of *A. angustifolia* bracts and the ability of this extract to scavenge reactive species. In addition, the effects of *A. angustifolia* in human lung fibroblast cells (MRC5) were also studied.

2. Experimental Section

2.1. Chemicals

Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA and penicillin-streptomycin were purchased from Gibco BRL (Grand Island, NY, USA). Thiobarbituric acid (TBA), trichloroacetic acid (TCA), dinitrophenylhydrazine (DNPH), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), hydrolyzed 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP), catechin, epicatechin, quercetin, apigenin, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer, and hydrogen peroxide (H₂O₂) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Low-melting point agarose and normal agarose were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG, 8.000 U/mL) and endonuclease (Endo) III (10.000 U/mL) were purchased from New England BioLabs (Ipswich, MA, USA). HPLC solvents were from Mallinckrodt Baker Inc. (Phillipsburg, NJ, USA).

2.2. Plant Material and Preparation of the Extract

Pines of *A. angustifolia* were collected in Caxias do Sul, Rio Grande do Sul (latitude $-29^{\circ}10'05''$, longitude $-51^{\circ}10'46''$), Brazil, in 2011. Voucher specimens were identified by the herbarium of the University of Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil (HUCS36536). Bracts were manually separated and mixed to obtain a pool, which was used to prepare the extract. Bracts were dried in incubator air oven at 37 °C, milled (Tecnal model Willye TE-650) and mixed with distilled water (5%, w/v). Extraction was done under reflux (100 °C) for 15 min, as described by Michelon *et al.* [9]. After cooling to 25 °C, the *A. angustifolia* extract (AAE) was filtered in Millipore equipment (pore size, 0.45 μm; catalog number SFGS 047LS, Millipore Corp., São Paulo, Brazil), lyophilized (LIOBRAS model L-101), and stored in the dark. Before each assay, the lyophilized powder was resuspended in water.

2.3. Determination of Total Phenolic Content and Major Compounds

Total phenolic content of the extract was measured by using the Folin–Ciocalteu colorimetric method, according to Singleton and Rossi [12], with modifications. Briefly, the lyophilized extract (5%, w/v) was mixed with 400 μ L of sodium carbonate (7.5%, w/v) and 500 μ L of Folin–Ciocalteu reagent. After 30 min in the dark, the absorbance was measured at 765 nm in a spectrophotometer (UV-1700 spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japan). Phenolic content of the extract was expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE) per 100 g of bracts.

Identification and quantification of the major compounds in AAE was performed by HPLC analysis, using an HP 1100 system equipped with a UV/VIS detector (Santa Clara, CA, USA). Compound separation was performed with a 5 μ m Li-Chrospher RP18 column (250 mm \times 4 mm) at a flow rate of 1 mL/min. The extract was filtered on a Millipore membrane (0.45 μ m) and 20 μ L injected into the device. Analysis of flavonoids was performed using a binary solvent system consisting of methanol (solvent A) and a water/acetic acid mixture (100/2) (solvent B) as the mobile phase unit. Gradient conditions were: 15% solvent A and 85% B (0–30 min), 40% solvent A and 60% B (30–40 min), 75% solvent A and 25% B (40–45 min), and 85% solvent A and 15% B (45–50 min). Flavonoids were monitored by UV absorbance at 350 nm. All chromatographic procedures were performed at 25 °C. To quantify the main tannins, the extract was eluted at 1 mL/min (20 μ L injection volume) using an isocratic mobile phase 90% acidic water (5% acetic acid) and 10% acidic methanol (5% acetic acid). The tannins were monitored by UV absorbance at 280 nm at 45 min. The concentrations of flavonoids (quercetin and apigenin) and tannins (catechin and epicatechin) were estimated from standard curves obtained by the analysis of various doses of standard compounds (all from Sigma-Aldrich). Results are expressed in mg/100 g bracts.

2.4. Radical Scavenging Activity, Superoxide Dismutase-, and Catalase-Like Activities

Antioxidant activity of the AAE was measured through the ability of the extract to donate electrons to the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) [13]. Briefly, the lyophilized powder was diluted to different concentrations (0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 and 0.3 mg/mL) and added to a Tris-HCl buffer (100 mM, pH 7.0) and 250 μ M DPPH dissolved in ethanol. The tubes were kept in the dark for 20 min, and absorbance was measured at 517 nm (UV-1700 spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japan). The results are represented as IC₅₀ (amount of extract necessary to scavenge 50% of the DPPH radical). To evaluate the

antioxidant enzyme-like activities, the lyophilized powder was diluted at a concentration of 5% (w/v). The superoxide dismutase (SOD)-like assay was conducted by measuring the inhibition of the rate of self-catalytic adrenochrome formation at 480 nm, in a reaction medium containing 1 mmol/L adrenaline (pH 2.0) and 50 mmol/L glycine (pH 10.2). This reaction was performed at 30 °C for 3 min [14]. Results are expressed as IC₅₀ (μL from AAE needed to reduce the adrenochrome formation by 50%). The catalase (CAT)-like assay was performed by determining the decomposition rate of hydrogen peroxide at 240 nm [15]. Results are expressed as mmol H₂O₂ decomposed/minute. Catechin (0.1%, w/v) was used as a standard.

2.5. MRC5 Cell Culture and Treatments

MRC5 cells were cultivated under standard conditions in DMEM, supplemented with 10% heat-inactivated FBS and 1% penicillin-streptomycin. Cells were maintained in humidified atmosphere at 37 °C with 5% CO₂. Studies were conducted when the cells reached 70%–80% confluence. AAE was added to FBS-free medium to reach the non-cytotoxic concentrations of 25 and 50 μg/mL, and incubated at 37 °C for 1 h. After this, the oxidative challenge with H₂O₂ (900 or 150 μM) was performed for 1 h, in the dark, in FBS-free medium. For the comet assay (alkaline and enzymatic), the treatments were performed with H₂O₂ at 150 μM, because 900 μM was very toxic to the DNA.

2.6. Cellular Viability Assay

Cell viability was measured using the MTT assay, which is based on the conversion of MTT to formazan crystals by mitochondrial dehydrogenases [16]. Cells were seeded into 96-well plates at a density of 1.0×10^5 cells/mL in DMEM complete medium. After 24 h, cells were treated with AAE and H₂O₂ (900 μM) and then incubated at 37 °C with 5% CO₂ for 1 h. The medium was removed and 1 mg/mL MTT dye in serum-free medium was added to the wells. Plates were incubated at 37 °C for 3 h. Subsequently, the MTT solution was removed and the obtained formazan violet product was dissolved in 100 μL dimethylsulfoxide (DMSO), stirred for 15 min and the absorbance was measured using a microplate reader (Victor-X3, multilabel counter, Perkin Elmer, Finland) at 570 nm. The absorbance of control cells was set as 100% viability and the valued of treated cells were calculated as percentage of control.

2.7. Determination of Oxidative Damage to Lipids and Proteins

Oxidative damage to lipids and proteins was assessed in the cells after incubation with RIPA lysis buffer for 30 min, and centrifugation at 1500× g at 4 °C for 5 min. The supernatant was used in both assays. Lipid damage was monitored by the formation of TBA reactive species (TBARS) during an acid-heating reaction, which has been widely adapted as a sensitive method for evaluating lipid peroxidation. Assays were performed according to Salgo and Pryor [17] with minor modifications. Briefly, 400 µL of supernatant was combined with 600 µL of 15% TCA and 0.67% TBA. The mixture was heated at 100 °C for 20 min. After cooling to room temperature, the samples were centrifuged at 1300× g for 10 min. The supernatant was isolated, and its absorbance was measured at 532 nm. TMP was used as a standard, and the results are expressed as nmol of TMP/mg of protein. Oxidative damage in proteins was measured by determining the carbonyl group based on the reaction with DNPH [18]. Two hundred µL of DNPH (10 mM) or 200 µL of HCl (2 M) for control were added to 50 µL of supernatants. The reaction mixture was incubated in the dark for 30 min, and vortexed every 10 min. After, 250 µL of 20% TCA were added and centrifuged at 1500× g for 8 min. The supernatant was discarded and the pellet was washed 3 times with ethanol-ethyl acetate (1:1) to remove free reagent. Samples were centrifuged and pellets were redissolved in 1000 µL of urea solution (8 M) at 37 °C for 15 min. Absorbance was read at 365 nm, and results are expressed as nmol DNPH/mg protein.

2.8. Antioxidant Activity of Superoxide Dismutase and Catalase Enzymes

After treatments, cells were incubated with lysis buffer (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, EDTA 5 mM, dithiothreitol (DTT) 1 mM) for 30 min, then scraped and centrifuged at 5000× g at 4 °C for 15 min. The supernatant was used in both assays. SOD activity was found by measuring the inhibition of self-catalytic adrenochrome formation rate at 480 nm, in a reaction medium containing 1 mmol/L adrenaline (pH 2.0) and 50 mmol/L glycine (pH 10.2). This reaction was performed at 30 °C for 3 min [14]. Results are expressed as USOD (units of enzyme activity)/mg protein. One unit is defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of adrenochrome formation in 50%. CAT activity was measured according to the methods described by Aebi [15]. The assay determines the rate of H₂O₂ decomposition at 240 nm. The reaction was conducted at 30 °C for 1 min. Results are expressed as mmol H₂O₂/min/mg protein. All absorbances were measured in spectrophotometer model UV-1700.

2.9. Protein Content Determination

Cell protein concentration was determined by the Lowry method using bovine serum albumin (BSA) as a standard, according to Lowry *et al.* [19].

2.10. Antigenotoxicity Assay

Single cell gel electrophoresis (comet assay) was performed as described by Singh *et al.* [20]. In addition, the enzymatic comet assay was carried out to assess DNA oxidative damage. For these assays, cells were washed with ice-cold PBS, trypsinized, and resuspended in a complete medium. Then, 20 μ L of cell suspension was dissolved in 0.75% low-melting point agarose and spread onto a glass microscope slide that was pre-coated with a layer of 1.5% normal melting point agarose. The slides were then incubated overnight in ice-cold lysis solution (2.5 M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM EDTA, 1% triton X-100, and 10% DMSO, pH 10.0) to remove cellular proteins and membranes. In the enzymatic comet assay, the slides were removed from the lysing solution, washed 3 times in an enzyme buffer (40 mM HEPES, 100 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 0.2 mg/mL BSA, pH 8.0) and incubated with 60 μ L of FPG (100 mUnits per gel; 45 min at 37 °C) or Endo III (100 m units per gel; 30 min at 37 °C). These enzymes recognize purine and pyrimidine oxidized bases, respectively [21]. Slides were placed on a horizontal electrophoresis unit and incubated in fresh buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13). Enough buffer was used to cover the slides for 20 min at 4 °C and to allow for DNA unwinding and the expression of alkali-labile sites. Electrophoresis was conducted for 20 min at 25 V and 300 mA. All of the above steps were performed in the dark to prevent additional DNA damage. Slides were then neutralized (0.4 M Tris, pH 7.5), stained with silver nitrate and analyzed with an optical microscope. Two hundred cells (100 cells from each of the two replicate slides) per concentration of each test were analyzed. Cells were visually scored according to tail length in five classes: (1) class 0: undamaged with no tail, (2) class 1: with tail shorter than the diameter of the head (nucleus), (3) class 2: with tail as long as 1–2 times the diameter of the head, (4) class 3: with tail more than 2 times the diameter of the head, and (5) class 4: comets with no heads. The damage index (DI) is an arbitrary score calculated for each sample, which ranges from 0 (no tail: 100 cells \times 0) to 400 (with maximum migration: 100 cells \times 4). In the enzymatic version of the comet assay, the damage index is the result of the subtraction of the DI of the alkaline assay of DI enzymatic assay. In both assays, the frequency (%) of the different classes of DNA damage was also evaluated.

2.11. Statistical Analysis

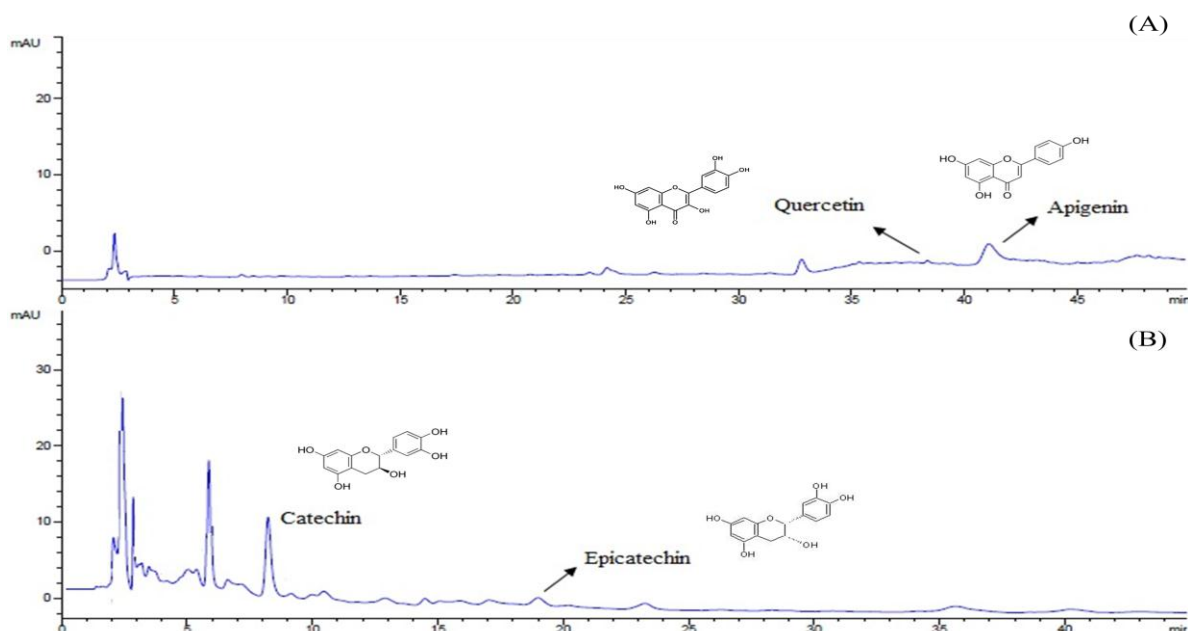
Results are expressed as mean \pm standard deviation obtained from three independent experiments. Statistical significance was evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA) with post-hoc multiple comparisons procedure (Tukey's test). The relationships between the variables were assessed with Pearson's product-moment correlation coefficient. Significance was accepted at P lower than 0.05 or 0.01. The Statistical Package for Social Sciences (SPSS, version 19.0, Armonk, NY, United States) for Windows was used for analysis.

3. Results and Discussion

Bioactive compounds found in plants have gained attention mainly because of their healthy benefits. Brazil is rich in biodiversity and presents six main biomes, including the Atlantic Forest biome in the south of the country. In this biome, the *A. angustifolia* is the main native species. In this study, we investigated chemical and biological effects of *A. angustifolia* bracts, a non-edible part of the plant. The results showed that AAE presents high levels of phenolic compounds (1586 ± 14.53 mg GAE/100 g of bracts). This data is in agreement with the results found for cooked seeds of *A. angustifolia* [22]. The polyphenol content of AAE was higher than that reported for other rich phenolic products, such as red wine (200.40 mg/100 mL) [23], fresh plums (366 mg/100 g) [24], and blackberries (486.53 mg/100 g) [25], showing that AAE could be a good source of polyphenols.

HPLC analysis (Figure 1) demonstrated that the major compounds of the extract were catechin (140.6 ± 2.86 mg/100 g bracts), epicatechin (41.3 ± 2.73 mg/100 g bracts), quercetin (23.2 ± 0.06 mg/100 g bracts) and apigenin (0.6 ± 0.06 mg/100 g bracts), being these last two compounds identified for the first time in *A. angustifolia* bracts.

Figure 1. Chromatograms (HPLC) for flavonoids (A) at 350 nm and tannins (B) at 280 nm of *A. angustifolia* aqueous extract.



Polyphenols are secondary metabolites characterized by the presence of two or more phenol units. According to their chemical structure, polyphenols can be divided in flavonoids and non-flavonoids [26]. Flavonoids are the most important group and present beneficial effects in cancer, cardiovascular and neurodegenerative diseases [27,28]. In general, high phenol content correlates with high antioxidant activity. Due to the presence of high amounts of polyphenols in the AAE, we evaluated the ability of the extract to scavenge the stable DPPH radical. Additionally, the capability of AAE to act as the antioxidant enzymes SOD and CAT was evaluated. SOD catalyzes the dismutation of superoxide by the production of H_2O_2 , which can be eliminated by the action of catalase [29]. *A. angustifolia* extract showed important radical scavenging activity (IC_{50} : 0.146 ± 0.14 mg/mL), measured by DPPH method. Moreover, SOD- and CAT-like activities were higher than those presented by standard catechin (Table 1). This indicates that AAE is able to reduce the DPPH radical and scavenge the superoxide anion and H_2O_2 , two RS that can damage cells. Polyphenols such as catechin and quercetin have previously been reported to scavenge the superoxide radical and H_2O_2 [30,31]. The ability of AAE to act as an antioxidant enzyme plays an important role in maintaining the redox balance of the cells.

Table 1. *In vitro* antioxidant activity of the *Araucaria angustifolia* extract (AAE).

Samples	DPPH (IC ₅₀) [#]	SOD-like activity (IC ₅₀) [§]	CAT-like activity (mmol H ₂ O ₂ /min)
AAE	0.146 ± 0.14 ^{a,*}	5.73 ± 1.40 ^a	225.00 ± 43.30 ^a
Catechin	0.104 ± 0.01 ^b	13.53 ± 0.037 ^b	7.50 ± 0.02 ^b

[#] IC₅₀ (concentration of AAE (mg/mL) needed to scavenge 50% of DPPH, *i.e.*, 125 µM); [§] IC₅₀ (µL of AAE needed to reduce 50% of the adrenochrome formation). Data are mean ± SD values. * Different letters indicate a significant difference according to analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post-hoc test ($p \leq 0.05$) for each evaluated parameter.

To study the effect of AAE in mammalian cells, MRC5 cells were treated with AAE and challenged with H₂O₂. The results showed that the non-cytotoxic concentrations of AAE (25 and 50 µg/mL) were able to reduce (25 µg/mL) or completely avoid (50 µg/mL) the mortality induced by H₂O₂ (Figure 2). In addition, AAE minimizes (25 µg/mL) or avoids (50 µg/mL) oxidative lipid and protein damage induced by H₂O₂. AAE also diminished (25 µg/mL) or avoided (50 µg/mL) the SOD and CAT depletion observed after H₂O₂ treatment (Table 2). H₂O₂ is generated from a variety of sources under oxidative stress and can diffuse freely in and out of cells and tissues [32] inducing cell damage. Several biomolecules can be damaged under oxidative stress and lipids are easy targets for RS. Proteins can also be damaged. The oxidation of cell membranes and amino acid side chains may lead to a loss of cell integrity and cell death [33]. To counteract RS, antioxidant enzymes, such as SOD and CAT, are the first line of defense against oxidative injury [29]. In this study, it was shown that AAE significantly protected MRC5 cells against the H₂O₂-induced mortality. This effect was accomplished by a reduction in oxidative damage to lipids, oxidative damage to proteins, and depletion of SOD and CAT activities induced by H₂O₂. These data corroborate models of similar studies, where treatment with polyphenols inhibited lipid oxidation and the decrease in SOD and CAT activities induced by H₂O₂ [34,35].

Figure 2. Cell viability of human lung fibroblast cells (MRC5). MRC5 cells were treated for 1 h with *Araucaria angustifolia* extract (AAE) in FBS-free medium and subsequently administered H₂O₂ (900 µM) for 1 h. Data are mean ± SD values. * Different letters indicate significant difference according to analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post-hoc test ($p \leq 0.05$).

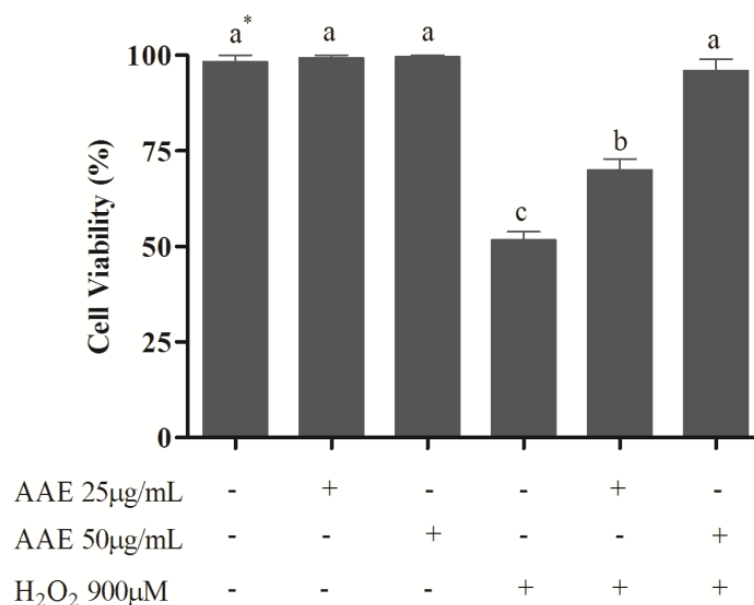


Table 2. Determination of the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), carbonyl protein, superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT) activities in the MRC5 cells pretreated with the extract of bracts of *A. angustifolia* and H₂O₂.

Treatments	TBARS (nmol TMP/mg of protein)	Carbonyl protein (nmol DNPH/mg of protein)	SOD (U SOD/mg of protein)	CAT (mmol H ₂ O ₂ /min/mg of protein)
Cell Control	0.57 ± 0.08 ^a	1.85 ± 0.08 ^a	19.40 ± 0.49 ^b	15.19 ± 0.56 ^a
H ₂ O ₂ 900 µM	2.21 ± 0.06 ^c	4.51 ± 0.15 ^c	9.32 ± 0.13 ^d	9.75 ± 0.08 ^c
AAE 25 µg/mL	0.54 ± 0.01 ^a	1.94 ± 0.10 ^a	19.00 ± 0.34 ^b	14.25 ± 0.65 ^a
AAE 50 µg/mL	0.51 ± 0.15 ^a	1.88 ± 0.06 ^a	23.81 ± 0.01 ^a	14.63 ± 0.06 ^a
AAE 25 µg/mL + H ₂ O ₂	0.86 ± 0.03 ^b	3.09 ± 0.51 ^b	13.46 ± 0.02 ^c	12.38 ± 0.01 ^b
AAE 50 µg/mL + H ₂ O ₂	0.52 ± 0.16 ^a	2.24 ± 0.16 ^a	19.51 ± 0.22 ^b	14.07 ± 0.05 ^a

Data are mean ± SD values. Different letters indicate significant differences according to analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post-hoc test ($p \leq 0.05$) in each assay.

Many methods are currently used for detecting the biological effects of DNA-damaging agents. The single cell gel electrophoresis or comet assay has been shown to be a sensitive method for investigating DNA damage. The alkaline version of this assay detects DNA strand breaks, alkali-labile sites, DNA crosslinking, and incomplete excision repair [20,21]. To verify if DNA damage is due to oxidative lesions, it is possible to use the enzymatic version of the test, performed with Endo III and FPG [21].

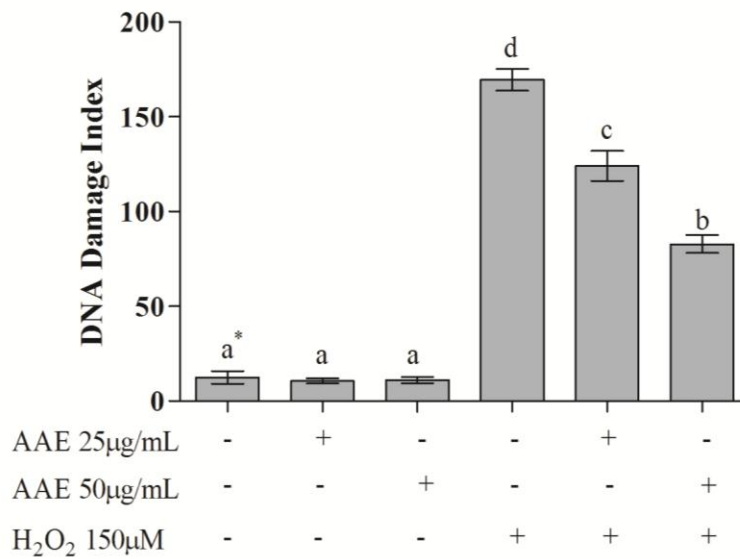
According to the alkaline comet assay, AAE alone did not cause DNA damage in MRC5 in the studied concentrations (Figure 3A). Additionally, the extract (25 and 50 µg/mL) was able to reduce DNA damage induced by H₂O₂ by 30% and 56%, respectively

(Figure 3A). H₂O₂ administration induces high levels of genotoxicity, increasing the frequency of classes 2, 3, and 4 of DNA damage. This damage was reduced by AAE treatment (Figure 3B). The enzymes Endo III and FPG allowed the evaluation of DNA base oxidation. AAE reduced the oxidative damage recognized by repair protein Endo III by 21% (25 µg/mL) and 44% (50 µg/mL). AAE was also able to minimize the oxidative damage recognized by the repair FPG protein by 38% (25 µg/mL) and 60% (50 µg/mL) (Figure 4A). As observed in the alkaline comet assay, AAE treatment reduced the frequency of classes 2, 3, and 4 of DNA damage (Figure 4B). The antigenotoxic effect of AAE could be important to preventing the DNA damage associated with carcinogenesis.

Correlation analysis showed a strong negative relationship between lipid, protein, and DNA damage with SOD and CAT activities (Table 3). In addition, a strong positive correlation was found between cell viability and SOD and CAT activities, suggesting a critical detoxification by these antioxidant enzymes with a cytoprotective effect. This data suggests that SOD and CAT play an important role against lipid, protein, and DNA damage, apparently through a concerted effort that includes the dismutation of superoxide, inactivation of H₂O₂, and maintenance of a cellular reducing environment.

Figure 3. (A) DNA damage index by the alkaline Comet assay in MRC5 cells after treatment with AAE and exposure to H₂O₂. * Different letters indicate significant differences by analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post-hoc test ($p \leq 0.05$). (B) Frequency (%) of different classes of DNA damage in control and AAE-treated groups. The cells were assessed visually and received scores from 0 (no injury) to 4 (maximally damaged), according to the size and shape of the tail. Data are mean \pm SD values.

(A)



(B)

	Undamaged cell	Class one	Class two	Class three	Class four
Cell control	94.00 \pm 2.65	5.00 \pm 1.00	2.00 \pm 0.58	1.00 \pm 0.50	0.00 \pm 0.00
H ₂ O ₂ 150µM	24.00 \pm 1.15	22.00 \pm 1.15	27.0 \pm 1.00	32.00 \pm 1.73	3.00 \pm 0.58
AAE 25µg/mL +H ₂ O ₂	18.00 \pm 1.73	57.00 \pm 2.89	14.00 \pm 0.58	17.00 \pm 1.53	0.00 \pm 0.00
AAE 50µg/mL +H ₂ O ₂	36.00 \pm 2.52	52.00 \pm 0.58	14.00 \pm 1.15	2.00 \pm 0.60	0.00 \pm 0.00

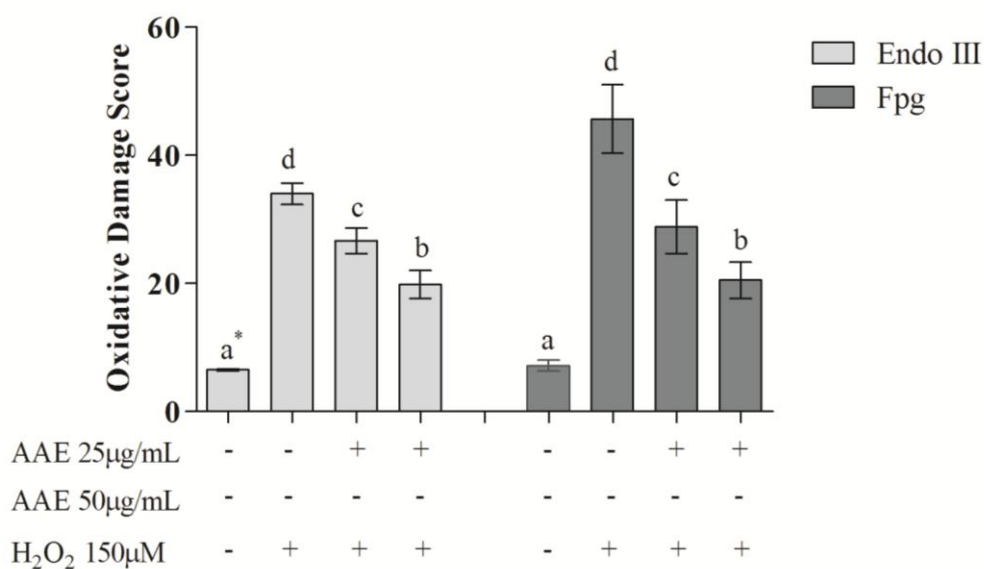
Table 3. Pearson correlations between cellular antioxidant enzymes activities, lipid and protein oxidative damage, DNA damage index, and cell viability assays.

ASSAYS	SOD	CAT	TBARS	Carbonyl protein	DNA damage
TBARS	-0.866 *	-0.945 **	-	0.959 **	0.816 *
Carbonyl protein	-0.933 **	-0.992 **	0.959 **	-	0.940 **
DNA damage	-0.892 *	-0.933 **	0.816 *	0.940 **	-
Cell viability	0.943 **	0.977 **	-0.923 **	-0.985 **	-0.927 **

Statistically significant * for $p \leq 0.05$ and ** for $p \leq 0.01$.

Figure 4. (A) Content of DNA damage oxidative by the Comet assay modified. * Different letters indicate significant differences by analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post-hoc test ($p \leq 0.05$). (B) Frequency (%) of different classes of DNA damage (Comet assay). Cells were evaluated visually and were given scores of 0 (no injury) to 4 (maximally damaged) according to the size and shape of the tail. Data are mean \pm SD values.

(A)



(B)

	Undamaged cell	Class one	Class two	Class three	Class four
Endo III					
Cell control	89.00 \pm 1.00	8.00 \pm 1.15	2.00 \pm 1.20	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
H ₂ O ₂ 150 μ M	8.00 \pm 0.58	22.00 \pm 0.60	31.0 \pm 1.00	39.00 \pm 1.00	4.00 \pm 0.50
AAE 25 μ g/mL+H ₂ O ₂	3.00 \pm 1.15	43.00 \pm 1.00	49.00 \pm 2.08	5.00 \pm 0.82	1.00 \pm 0.01
AAE 50 μ g/mL+H ₂ O ₂	20.50 \pm 0.71	51.00 \pm 1.20	24.00 \pm 1.15	1.00 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00
Fpg					
Cell control	88.50 \pm 1.41	9.50 \pm 1.89	2.00 \pm 0.55	1.00 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00
H ₂ O ₂ 150 μ M	8.00 \pm 0.60	17.50 \pm 0.96	30.5 \pm 1.00	38.00 \pm 1.30	7.50 \pm 0.58
AAE 25 μ g/mL+H ₂ O ₂	3.00 \pm 1.15	42.00 \pm 1.50	50.00 \pm 1.15	5.00 \pm 0.58	1.00 \pm 0.01
AAE 50 μ g/mL+H ₂ O ₂	30.00 \pm 1.53	45.00 \pm 1.73	25.00 \pm 1.15	1.00 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00

It is possible that phenolic compounds found in AAE could be responsible for the important antioxidant and antigenotoxic effects observed in this study, as already reported for this [9] and other plants [36–38]. However, no statistically significant correlations were found between the amount of polyphenols and the prevention of oxidative damage. This may be because we analyzed only two close concentrations (25 and 50 µg/mL) of the AAE. Assays with a wide range of concentrations as well as the evaluation of the isolated polyphenols could be helpful to identify the molecules that are responsible for the biological effects of AAE.

4. Conclusions

We found that AAE has an important protective effect against oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in human lung fibroblast cells. Moreover, this extract is rich in polyphenols and is a good source of antioxidant natural compounds, mainly catechin, epicatechin, quercetin and apigenin, which present great importance in inhibiting oxidative mechanisms associate to degenerative diseases and cancer. The properties presented by the *A. angustifolia* can be used to explore new resources for pharmacological structures and/or to improve natural medicine.

Acknowledgments

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and the Coordenação de Apoio de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Franco, I.J.; Fontana, V.L. *Ervas & Plantas: A Medicina dos Simples*; Imprimax, 177 p.: Erechim, Brasil, 1997.
2. Marquesini, N.R. Medicinal plants used by the Indians as the Parana and Santa Catarina, southern Brazil: Guarani, kaingang, xokleng, ava-guarani, kraô e cayuá. Dissertação (Mestrado), 361 p. University Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, 1995.

3. Seccon, A.; Rosa, D.W.; Freitas, R.A.; Biavatti, M.W.; Creczynsky-Pasa, T.B. Antioxidant activity and low cytotoxicity of extracts and isolated compounds from *Araucaria angustifolia* dead bark. *Redox Rep.* **2010**, *15*, 1–8.
4. Yamaguchi, L.F.; Giddings, D.V.; Kato, M.J.; Di Mascio, P. Biflavonoids from Brazilian pine *Araucaria angustifolia* as potential protective agents against DNA damage and lipoperoxidation. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 2238–2247.
5. Yamaguchi, L.F.; Kato, M.J.; Di Mascio, P. Biflavonoids from *Araucaria angustifolia* protect against DNA UV-induced damage. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 615–620.
6. Freitas, A.M.; Almeida, M.T.R.; Andrighetti-Fröhner, C.R.; Cardozo, F.T.G.S.; Barardi, C.R.M.; Farias, M.R.; Simões, C.M.O. Antiviral activity-guided fractionation from *Araucaria angustifolia* leaves extract. *J. Ethnopharmacol.* **2009**, *126*, 512–517.
7. Yamamoto, S.; Otto, A.; Simoneit, B.R.T. Lignans in resin of *Araucaria angustifolia* by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2004**, *39*, 1337–1347.
8. Santi-Gadelha, T.; Gadelha, C.A.A.; Aragão, K.S.; Oliveira, C.C.; Mota, M.R.L.; Gomes, R.C.; Pires, A.F.; Toyama, M.H.; Toyama, D.O.; Alencar, N.M.; *et al.* Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. *Biochem Biophys Res Commun.* **2006**, *350*, 1050–1055.
9. Michelon, F.; Branco, C.S.; Calloni, C.; Giazzon, I.; Agostini, F.; Spada, P.K.W.; Salvador, M. *Araucaria Angustifolia*: A potential nutraceutical with antioxidant and antimutagenic activities. *Curr. Nutr. Food Sci.* **2012**, *8*, 155–159.
10. Branco, C.S.; Scola, G.; Rodrigues, A.; Cesio, V.; Heinzen, H.; Godoy, A.; Funchal, C.; Coitinho, A.; Salvador, M. Organic and conventional yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) improves metabolic redox status of liver and serum in Wistar rats. *Antioxidants* **2013**, *2*, 100–109.
11. Halliwell, B. Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovasc. Res.* **2007**, *73*, 341–347.
12. Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R.M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. In *Methods in Enzymology, Oxidant and Antioxidant (Part A)*; Packer, L., Ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 1999; pp. 152–178.
13. Yamaguchi, T.; Takamura, M.; Matoba, T.; Terao, J. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1998**, *62*, 1201–1204.

14. Bannister, J.V.; Calabrese, L. Assays for SOD. *Methods Biochem. Anal.* **1987**, *32*, 279–312.
15. Aebi, H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* **1984**, *105*, 121–126.
16. Denizot, F.; Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* **1986**, *2*, 271–277.
17. Salgo, M.G.; Pryor, W.A. Trolox inhibits peroxynitrite-mediated oxidative stress and apoptosis in rat thymocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *333*, 482–488.
18. Levine, R.L.; Garland, D.; Oliver, C.N.; Amici, A.; Climent, I.; Lenz, A.G.; Ahn, B.W.; Stadtman, E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* **1990**, *186*, 464–478.
19. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–275.
20. Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.; Schneider, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **1988**, *175*, 184–191.
21. Collins, A.R.; Oscoz, A.A.; Brunborg, G.; Gaivão, I.; Giovannelli, L.; Kruszewski, M.; Smith, C.C.; Stetina, R. The comet assay: Topical issues. *Mutagenesis* **2008**, *23*, 143–151.
22. Koehnlein, E.A.; Carvajal, A.E.S.; Koehnlein, E.M.; Coelho-Moreira, J.S.; Inácio, F.D.; Castoldi, R.; Bracht, A.; Peralta, R.M. Antioxidant activities and phenolic compounds of raw and cooked Brazilian pinhão (*Araucaria angustifolia*) seeds. *Afr. J. Food Sci.* **2012**, *6*, 512–518.
23. Lopez, M.; Martinez, F.; Del Valle, C.; Orte, C.; Miro, M. Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2001**, *922*, 359–363.
24. Wu, X.; Beecher, G.R.; Holden, J.M.; Haytowitz, D.B.; Gebhardt, S.E.; Prior, R.L. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4026–4037.
25. Sellappan, S.; Akoh, C.C.; Krewer, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-Grown Blueberries and Blackberries. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2432–2438.
26. Del Rio, D.; Rodriguez-Mateos, A.; Spencer, J.P.E.; Tognolini, M.; Borges, G.; Crozier, A. Dietary (Poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *18*, 1818–1892.

27. Asensi, M.; Ortega, A.; Mena, S.; Feddi, F.; Estrela, J.M. Natural polyphenols in cancer therapy. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2011**, *48*, 197–216.
28. Obrenovich, M.E.; Li, Y.; Parvathaneni, K.; Yendluri, B.B.; Palacios, H.H.; Leszek, J.; Aliev, G. Antioxidants in health, disease and aging. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **2011**, *10*, 192–207.
29. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed.; Oxford University Press: Oxford, UK and New York, NY, USA, 2007.
30. Dias, A.S.; Lima, A.C.; Santos, A.L.; Rabelo, T.K.; Serafini, M.R.; Andrade, C.R.; Fernandes, X.A.; Moreira, J.C.; Gelain, D.P.; Estevam, C.S.; *et al.* Redox properties of *Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & Grime (Fabaceae) stem bark ethanol extract and fractions. *Nat. Prod. Res.* **2012**, *27*, 1479–1483.
31. Farrar, J.L.; Hartle, D.K.; Hargrove, J.L.; Greenspan, P. Inhibition of protein glycation by skins and seeds of the muscadine grape. *Biofactors* **2007**, *30*, 193–200.
32. Halliwell, B. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutr. Rev.* **1994**, *52*, 253–265.
33. Butterfield, D.A.; Castenga, A.; Pocernich, C.B.; Drake, J.; Scapagnini, G.; Calabrese, V. Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13*, 444–461.
34. Feng, B.; Fang, Y.; Wei, S.M. Effect and mechanism of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) against the hydrogen peroxide-induced oxidative damage in human dermal fibroblasts. *J. Cosmet. Sci.* **2013**, *64*, 35–44.
35. Cumaoglu, A.; Rackova, L.; Stefek, M.; Kartal, M.; Maechler, P.; Karasu, C. Effects of olive leaf polyphenols against H₂O₂ toxicity in insulin secreting β -cells. *Acta Biochem. Pol.* **2011**, *58*, 45–50.
36. Chies, C.E.; Branco, C.S.; Scola, G.; Agostini, F.; Gower, A.E.; Salvador, M. Antioxidant effect of *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown. *Antioxidants* **2013**, *2*, 194–205.
37. Chaabane, F.; Boubaker, J.; Loussaif, A.; Aicha, N.; Kilani-Jaziri, S.G.; Chekir-Ghedira, L. Antioxidant, genotoxic and antigenotoxic activities of daphne gnidium leaf extracts. *BMC Complement. Altern. Med.* **2012**, *12*, 153.
38. Dassprakash, M.V.; Arun, R.; Abraham, S.K.; Premkumar, K. *In vitro* and *in vivo* evaluation of antioxidant and antigenotoxic potential of *Punica granatum* leaf extract. *Pharm. Biol.* **2012**, *50*, 1523–1530.

© 2014 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

5. DISCUSSÃO GERAL

O uso de plantas com propriedades terapêuticas é uma prática milenar, constituindo-se uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos. Foi através da observação e da experimentação pelos povos primitivos que as propriedades terapêuticas das plantas foram sendo descobertas e propagadas de geração a geração, fazendo parte da cultura popular (Fakim, 2006).

Popularmente, diferentes partes da *A. angustifolia*, como as folhas, o nó-de-pinho e a casca do caule têm sido utilizadas para o tratamento de inúmeras doenças (Marquesini, 1995; Franco, 1997). Nos entanto, existem poucos estudos científicos que comprovam atividade biológica de extratos obtidos a partir de diferentes partes da *A. angustifolia*.

Em um estudo anterior realizado por nosso grupo, identificou-se que o extrato aquoso de brácteas de *A. angustifolia* apresenta elevado teor de polifenóis com importante atividade antioxidante e antimutagênica em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (Michelon, *et al.*, 2012). Neste trabalho, avaliou-se o efeito do extrato de brácteas de *A. angustifolia* em células de fibroblasto de pulmão humano (MRC5), uma linhagem bastante empregada em estudos na área do estresse oxidativo e genotoxicidade (Maziere *et al.*, 2000; Konget *et al.*, 2012, Bourton *et al.*, 2012).

Para os ensaios de viabilidade celular, as células foram tratadas durante uma hora com o extrato aquoso de brácteas de *A. angustifolia* e, após, expostas por mais uma hora ao agente oxidante H₂O₂. No ensaio de redução do MTT, observou-se que o extrato preveniu, de maneira significativa, a morte celular induzida pelo H₂O₂. Nesse sentido, cabe ressaltar que o extrato de brilhantina (*Pilea microphylla*), rico em polifenóis, também apresenta efeito citoprotetor em células de mamíferos tratadas com agentes oxidantes (Paul *et al.*, 2012). Além de prevenir o efeito citotóxico, o pré-tratamento das células MRC5 com o extrato de *A. angustifolia* preveniu de forma significativa a oxidação induzida pelo H₂O₂ a lipídios e

proteínas, demonstrando, assim, importante propriedade antioxidante.

A determinação dos produtos de reação com TBA vem sendo extensivamente utilizada como biomarcador para detectar a peroxidação lipídica (Le-Donne *et al.*, 2006). As membranas celulares e intracelulares possuem grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados, e, por isso, são susceptíveis à peroxidação lipídica por espécies reativas. Modificações oxidativas causam mudança nas propriedades físicas e químicas das membranas, alterando sua fluidez e permeabilidade. O aumento da peroxidação lipídica induzido por peróxido de hidrogênio é característico em diversos modelos experimentais (Sitte *et al.*, 1998; Kong *et al.*, 2012).

Danos oxidativos a proteínas podem, também, refletir o estresse oxidativo celular, sendo a carbonilação de proteínas característica do dano oxidativo. A exposição de proteínas à ER pode causar grandes alterações em sua estrutura com consequente perda da função. As proteínas são os maiores alvos de ER por causa da sua alta abundância em sistemas biológicos, uma vez que estas participam da maioria dos processos funcionais celulares (Davies *et al.*, 2001).

Em nosso estudo, o tratamento das células com extrato de brácteas de *A. angustifolia* (25 e 50 µg/mL) minimizou a depleção das defesas antioxidantes enzimáticas, induzida pelo peróxido de hidrogênio. Resultados semelhantes foram descritos para células β do pâncreas e fibroblastos dérmicos tratadas com aleuropeína e epigallocatequina-3-galato respectivamente (Cumaoglu *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2013).

Uma grande variedade de métodos vem sendo atualmente utilizados para a detecção de efeitos biológicos de agentes que danificam o DNA. A eletroforese em gel de célula única ou Ensaio Cometa tem provado ser um método sensível para investigar danos ao DNA. A versão alcalina deste ensaio detecta quebras no DNA, sítios álcali-lábeis, reticulação do DNA e reparo excisão incompleta (Singh *et al.*, 1988; Collins *et al.*, 2008). Para verificar se o dano ao

DNA é devido a lesões oxidativas, é possível utilizar a versão enzimática do teste, realizada com ENDO III e FPG (Collins *et al.*, 2008). Os resultados do ensaio cometa alcalino mostraram que o extrato de *A. angustifolia*, nas condições estudadas, não é genotóxico e, além disso, minimiza a genotoxicidade induzida por peróxido de hidrogênio. O efeito antígeno-tóxico observado pode ser importante para diminuir o risco de carcinogênese. Nossos resultados corroboram estudos anteriores que mostraram que os polifenóis protegem contra danos ao DNA associados ao estresse oxidativo em culturas de células de rato e humana (Wätjen *et al.*, 2005; Min & Ebeler, 2009).

Os polifenóis são os principais componentes fitoquímicos encontrados no reino vegetal. Muitos polifenóis dietéticos apresentam atividade antioxidante, que é atribuída a sua capacidade de neutralizar diretamente espécies reativas pró-oxidantes. Além disso, dados experimentais indicam que polifenóis podem oferecer proteção indireta contra o estresse oxidativo através da ativação da transcrição gênica de enzimas do sistema de defesa antioxidante endógeno (Masella *et al.*, 2005; Myhrstad *et al.*, 2002, Yeh *et al.*, 2009).

O teor de polifenóis totais do extrato de brácteas de *A. angustifolia* (670.93 ± 17.79 mg equivalente de catequina /100g de brácteas) foi superior ao encontrado por Michelon *et al.* (2012), o que pode ser devido a diferentes épocas e locais de coleta das pinhas. Os compostos majoritários identificados em nosso estudo foram a catequina, epicatequina, quercitina e apigenina, sendo os dois últimos identificados pela primeira vez em brácteas *A. angustifolia*.

Os polifenóis são associados à capacidade antioxidante de extratos vegetais. Neste trabalho, a capacidade antioxidante do extrato aquoso de *A. angustifolia in vitro* foi determinada através da capacidade de redução do radical livre DPPH[•]. Além disso, também foi avaliada a capacidade do extrato em mimetizar as enzimas antioxidantes SOD e CAT. O extrato apresentou importante capacidade de doar átomos de hidrogênio para o radical DPPH[•] e atividade SOD e CAT-like superior à da catequina, principal constituinte do extrato de *A.*

angustifolia. A superóxido dismutase catalisa a dismutação do superóxido através da produção de H₂O₂, que pode ser eliminado pela ação de catalase (Halliwell & Gutteridge, 2007). Como esperado, o extrato foi capaz de reduzir o radical DPPH[•] e eliminar o O₂^{•-} e H₂O₂, duas espécies reativas que podem danificar diferentes biomoléculas. Já foi demonstrado que polifenóis, tais como quercetina e catequina, encontrados em nosso extrato, são capazes de reagir com estas mesmas ER (Dias *et al.*, 2012; Farrar *et al.*, 2007). Embora outros estudos sejam necessários, é possível que esta atividade tenha contribuído, pelo menos em parte, para os efeitos observados em células MRC5.

Diversos estudos têm demonstrado correlação positiva entre a presença de polifenóis e a atividade antioxidante (Michelon *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2012; Dassprakash *et al.*, 2012); no entanto, em nosso trabalho, não foi observada correlação estatisticamente significativa entre a quantidade de polifenóis e a prevenção de danos oxidativos. Isto pode ser devido ao fato de que foram analisadas apenas duas concentrações próximas (25 e 50 µg / mL) de extrato de *A. angustifolia*. Ensaio com outras concentrações bem como a avaliação dos polifenóis isoladamente poderiam ser úteis para identificar os compostos responsáveis pelos efeitos biológicos observados em nosso trabalho.

Apesar de não ter sido observada correlação entre polifenóis e marcadores de dano oxidativo, verificou-se uma correlação negativa entre o dano a lipídios, proteínas e DNA com a atividade das enzimas SOD e CAT. Além disso, verificou-se que há correlação positiva entre a viabilidade celular e a atividade de SOD e CAT, sugerindo que essas enzimas desempenham um importante papel na regulação do metabolismo redox celular.

Em resumo, o extrato de brácteas de *A. angustifolia* mostrou importante atividade antioxidante e antígeno-tóxica, sugerindo perspectivas de compostos com potencialidade para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

6. CONCLUSÃO

Os dados obtidos nesse estudo permitem concluir que:

- ✓ O extrato aquoso de brácteas de *A. angustifolia* é rico em polifenóis (670.93 ± 17.79 mg equivalente de catequina/100g de brácteas), sendo a catequina, epicatequina, quercitina e apigenina os seus compostos majoritários.
- ✓ Ensaios *in vitro* demonstraram que este extrato apresenta capacidade de varredura do radical livre DPPH[•] e atividade SOD e CAT-like.
- ✓ O extrato de *Araucaria angustifolia* não apresentou efeito citotóxico em células de mamífero MRC5 nas concentrações estudadas e preveniu a morte celular induzida pelo peróxido de hidrogênio.
- ✓ O pré-tratamento com extrato de *A. angustifolia* foi capaz de prevenir a oxidação a lipídios e proteínas e minimizar a depleção das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase induzida por peróxido de hidrogênio em células MRC5.
- ✓ O extrato *A. angustifolia*, apresentou atividade antígeno-tóxica, prevenindo danos ao DNA.

7. PERSPECTIVAS

Como continuidade desse trabalho, seria importante:

- ✓ Identificar e quantificar os demais compostos fitoquímicos presentes no extrato de *A. angustifolia*, a fim de identificar outros compostos com possível atividade biológica;
- ✓ Quantificar, por HPLC, os constituintes fenólicos no interior das células de mamífero tratadas com extrato de brácteas de *A. angustifolia*;
- ✓ Determinar a atividade e expressão (*immunoblot*) das enzimas antioxidantes tais como SOD, CAT e o complexo glutaciona (GSSG, GSH, GPx e GST) em células de mamífero tratadas com os extratos de brácteas de *A. angustifolia* e expostas ao peróxido de hidrogênio;
- ✓ Avaliar o efeito antimutagênico do extrato pelo ensaio de micronúcleos;
- ✓ Avaliar a expressão de proteínas envolvidas na sinalização celular;
- ✓ Analisar o efeito biológico dos compostos presentes no extrato isoladamente.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. **Methods Enzymol.** 105: 121-126.
- Aron, P.M.; Kennedy, J.A. (2008). Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. **Mol Nutr Food Res.** 52: 79-104.
- Azqueta, A.; Shaposhnikov, S.; Collins, A.R. (2009). DNA oxidation: investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. **Mutat Res.** 674(1-2):101-108.
- Bannister, J.V.; Calabrese, L. (1987). Assays for Sod. **Methods Biochem Anal.** 32: 279-312.
- Bourton, E.C.; Plowman, P.N.; Zahir, S.A.; Senguloglu, G.U.; Serrai, H.; Bottley, G.; Parris, C.N. (2012). Multispectral imaging flow cytometry reveals distinct frequencies of γ -H2AX foci induction in DNA double strand break repair defective human cell lines. **Cytometry A.** 81(2):130-7.
- BRDE (2005). Banco Regional de Desenvolvimento do Extremo Sul. Cultivo da *Araucaria angustifolia*: análise de viabilidade econômico-financeira. Florianópolis. p.53.
- Capella, A.C.V.; Penteado, P.T.P.S.; Balbi, M.W. (2009). Semente de *Araucaria angustifolia*: aspectos morfológicos e composição química da farinha. **B.Ceppa**, Curitiba.27: 135-142.
- Capella, C.; Beltejar, M.J.; Brown, C.; Fong, V.; Daddacha, W.; Kim, B.; Dewhurst, S. (2012). Selective modification of adenovirus replication can be achieved through rational mutagenesis of the adenovirus type 5 DNA polymerase. **J Virol.** 86(19):10484-10493.
- Carocho, M.; Ferreira, I.C.F.R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future Perspectives. **Food and Chemical Toxicology.** 51:15–25.
- Carvalho, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidade e uso da madeira.** Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 640 p.

- Chakravarti, B.; Chakravarti, D.N. (2007). Oxidative modification of proteins: age-related changes. **Gerontology**. 53:128-139.
- Cheng, Z.; Moore, J.; Yu, L. (2006). High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. **J. Agric. Food. Chem.** 54: 7429-7436.
- Collins, A.R.; Oscoz, A.A.; Brunborg, G.; Gaivão, I.; Giovannelli, L.; Kruszewski, M.; Smith, C.C.; Stetina, R. (2008) The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**.23:143–151.
- Cordenunsi, B. R.; Menezes, E. W.; Genovese, M. I.; Colli, C.; Souza DE, A. G.; Lajolo, F. M. (2004). Chemical composition and glycemic index of Brazilian pine (*araucaria angustifolia*) seeds. **J. Agric. Food. Chem.** 52:3412-3416.
- Craft, B.D.; Kerrihard, A.L.; Amarowicz, R.; Pegg, R.B. (2012). Phenol-based antioxidants and the in vitro methods used for their assessment. **Compr. Rev. Food Sci. F.** 1:148–173.
- Cumaoglu A.; Rackova L.; Stefek M.; Kartal M.; Maechler P.; Karasu C. (2011) Effects of olive leaf polyphenols against H₂O₂ toxicity in insulin secreting β-cells. **Acta Biochem Pol.** 58 (1):45–50
- Dani, C.; Oliboni, L.S.;Vanderlinde, R.; Bonatto, D.; Salvador, M. (2007). Phenolic content and antioxidant activities of White and purple juices manufactured with organically or conventionally-produced grapes. **Food Chem. Toxicol.** 45(12):2574-2580.
- Dassprakash, M.V.; Arun, R.; Abraham, S.K.; Premkumar, K. (2012). *In vitro* and *in vivo* evaluation of antioxidant and antigenotoxic potential of *Punica granatum* leaf extract. **Pharm Biol** 50(12):1523–30.
- Davis, K.L.; Martin, E.; Turko, I.; Murad, F. (2001) Novel effects of nitric oxid. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**41:203-236.
- Denicola, A.; Radi, R. (2005). Peroxynitrite and drug-depending toxicity. **Toxicology**, 208:273-288.

- Denizot, F.; Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J Immunol Methods**. 89:271.
- Dias, A.S.; Lima, A.C.; Santos, A.L.; Rabelo, T.K.; Serafini, M.R.; Andrade, C.R.; Fernandes, X.A.; Moreira, J.C.; Gelain, D.P.; Estevam, C.S.; Araujo, B.S. (2012). Redox properties of *Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & Grime (Fabaceae) stem bark ethanol extract and fractions. **Nat Prod Res**. doi:10.1080/14786419.2012.722083.
- Doyle, A.; Griffiths, J. B. (1999). **Cell e Tissue Culture: laboratory procedures in biotechnology**, New York: Wiley, 352p.
- Falkenberg, M.B.; dos Santos, R.I.; Simões, C.M.O. (2001). **Introdução à Análise Fitoquímica**. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; de Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick. (Ed.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/ UFSC. pp 165-181.
- Farrar, J.L.; Hartle, D.K.; Hargrove, J.L.; Greenspan, P. (2007). Inhibition of protein glycation by skins and seeds of the muscadine grape. **Biofactors**. 30 (3):193–200.
- Fakim, A.G. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**. 27:1-93.
- Feng, B.; Fang, Y.; Wei, S.M. (2013). Effect and mechanism of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) against the hydrogen peroxide-induced oxidative damage in human dermal fibroblasts. **J Cosmet Sci**. 64(1):35–44
- Franco, I. J. (1997). **Ervas & plantas: a medicina dos simples**. Erexim: Imprimax, p. 177.
- Freitas, A.M.; Almeida, M.T.R.; Andrighetti-Fröhner, C.R.; Cardozo, F.T.G.S.; Barardic, C.R.M.; Farias, M.R.; Simões, C.M.O.(2009). Antiviral activity-guided fractionation from *Araucaria angustifolia* leaves extract. **Journal of Ethnopharmacology**. 126 (3): 512-517.

- Fridovich, I. (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. **J Exp Biol.** 201: 1203-1209.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2007). **Free Radicals in Biology and Medicine**, third ed. Oxford, New York.
- Hallmann, E.; Lipowski, J.; Marszałek, K.; Rembiałkowska, E. (2013). The seasonal variation in bioactive compounds content in juice from organic and non-organic tomatoes. **Plant Foods Hum Nutr.** 68:171–176.
- Hartmann, A., Speit, G. (1994). Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister-chromatid exchanges (SCE). **Mutat. Res.** 346:49-56.
- Heuser, V.D.; Erdtmann, B.; Kvitko, K.; da Silva, J. (2007). Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: biomarkers of exposure, effect, and susceptibility. **Toxicology**, 232: 235-247.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2013). **Disponível (on line):** <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/extveg/default.asp?t=2&z=t&o=18&u1=1&u3=1&u2=34>. Acesso em: junho, 2013.
- Inoue, M. (1994). Protective mechanism against reactive oxygen species. In: **The Liver. Biology and Pathology.** Ed. Arias, I. M., Boyer, J.L.; Fausto, N., Jacoby, W.B., Schachter, D. A. & Shafritz, D. A. Raven Press, New York. 443-460.
- Koch, Z.; Corrêa, M. C. **Araucária: A Floresta do Brasil Meridional.** Curitiba: Olhar Brasileiro, 2002, 148 p.
- Kong, B.; Peng, X.; Xiong, Y.L.; Zhao, X. (2012). Protection of lung fibroblast MRC-5 cells against hydrogen peroxide-induced oxidative damage by 0.1–2.8 kDa antioxidative peptides isolated from whey protein hydrolysate. **Food Chemistry.** 135:540–547.
- Le-Donne, I.; Rossi, R.; Colombo, R.; Giustarini, D.; Milzani, A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clin. Chem.** 52:601-623.

- Leite, D.M.; Jong, E.V.; Noreñ, C.P.Z.; brandelli, A. (2008). Nutritional evaluation of *araucaria Angustifolia* seed flour as a protein Complement for growing rats. **J sci food agric.**88:1166–1171.
- Levine, R.L.; Garland, D.; Oliver, C.N.; Amici, A.; Climent, I.; Lenz, A.G.; Ahn, B.W.; Stadtman, E.R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol.** 186:464-478.
- Lorenzi, H.(1992). **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** Nova Odessa – SP: Editora Plantarum. 352 p.
- Lu, J.; Lin, P.H.; Yao, Q.; Chen, C. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **J. Cell Mod. Med.**14: 840–860.
- Marquesini, N.R. (1995). **Plantas usadas como medicinais pelos índios do Paraná e Santa Catarina, sul do Brasil: guarani, kaingang, xokleng, ava-guarani, kraô e cayuá.** Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Masella,R.; Di, B.R.; Filise, C.; Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione related enzymes. **J. Nutr. Biochem.** 16:577-586.
- Mattos, J. R. (1994). **O pinheiro brasileiro.** 2º ed. Lages: Artes Gráficas Princesa LTDA. v.5, 225p.
- Maziere, C.; Meignotte, A.; Dantin,F.; Conte, M.A.; Maziere, J.C. (2000). Oxidized LDL Induces an Oxidative Stress and Activates the Tumor Suppressor p53 in MRC5 Human Fibroblasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** 276: 718–723.
- Michelon, F.; Branco, C. S.; Calloni, C.; Giazson, I.; Agostini, F.; Spada, P.K.W.; Salvador, M. (2012). *Araucaria Angustifolia*: a Potential Nutraceutical with Antioxidant and Antimutagenic Activities. **Current Nutrition & Food Science.** 8(3):1-5.

- Min, K.; Ebeler, S.E. (2009). Quercetin inhibits hydrogen peroxide-induced DNA damage and enhances DNA repair in Caco-2 cells. **Food Chem. Toxicol.** 47(11):2716-2722.
- Myhrstad, M.C.; Carlsen, H.; Nordstrom, O.; Blomhoff, R.; Moskaug, J.O. (2002). Flavanoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of gamma-glutamylcysteine synthetase catalytic subunit promoter. **Free Radic. Biol. Med.** 32:386-393.
- Olive, P. L.; Banáth, J. P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. **Nat Protoc.** 1(1):23-9.
- Östling, O.; Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 123:291-298.
- Paul, P.; Bansal, P.; Nayak, P. G.; Pannakal, S. T.; Priyadarsini, K. I.; Unnikrishnan, M. K. (2012). Polyphenolic fraction of *Pilea microphylla* (L.) protects Chinese hamster lung fibroblasts against γ -radiation-induced cytotoxicity and genotoxicity. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** 33 (1):107-119.
- Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. **Clin. Interv. Aging.** 2:219–236.
- Reitz, R.; Klein, R. M. (1966). **Araucariceae: flora ilustrada catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues.
- Reitz, R.; Klein, R. M.; Reis, A. (1979). **Madeiras do Brasil: Santa Catarina**. Florianópolis: Editora Lunardelli. 320 p.
- Reitz, P.; Klein, R. M.; Reis, A.P. (1983) **Projeto madeira do Rio Grande do Sul. Superintendência do Desenvolvimento da Região Sul – SUDESUL**. Governo do Estado do Rio Grande do Sul. Herbário Barbosa Rodrigues – HBR.

- Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Bolwell, P. G.; Bramley, P. M.; Pridham, J. B. (1995). The relative antioxidants activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Res.** 22(4): 375-383.
- Sanquetta, C. R.; Netto, A. F.(2000). **Pinheiro-do-Paraná: Lendas & realidades**. Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná: Curitiba p. 112.
- Silva, C.G.; Carvalho, C.D.; Hamerski, L.; Castro, F.A.; Alves, R.J.; Kaiser, C.R.; Eleutherio, E.C.; Rezende, C.M. (2012). Protective effects of flavonoids and extract from *Vellozia kolbekii* Alves against oxidative stress induced by hydrogen peroxide in yeast. **J Nat Med.** 66(2):367–72.
- Schaffer, S.; Halliwell. (2012). Do polyphenols enter the brain and does it matter? Some theoretical and practical considerations. **Genes Nutr.** 11:255-5.
- Seccon, A.; Rosa, D.W.; Freitas, R. A.; Biavatti, M.W., Creczynski-Pasa, T.B. (2010). Antioxidant activity and low cytotoxicity of extracts and isolated compounds from *Araucaria angustifolia* dead bark. **Redox Report.** 15(6):234-242.
- Singh, N. P.; McCoy, M. T.; Tice, R. R.; Schneider, E. L.(1988) A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell. Res.** 175:184-191.
- Singh, M.; Arsenault, M.; Sanderson, T.; Murthy, V.; Ramassamy, C. (2008). Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. **J. Agric. Food. Chem.** 56(13):4855-4873.
- Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology.** 299:152-178.

- Sitte, N.; Merker, K.; Grune, T. (1998). Proteasome-dependent degradation of oxidized proteins in MRC-5 fibroblasts. **FEBS Letters**. 440: 399-402.
- Simões, L.L.; Lino, C.F. (2002). Sustentável Mata Atlântica: a exploração dos seus recursos florestais. São Paulo: SENAC.p3.
- Spada, P. D. S.; de Souza, G. G. N.; Bortolini, G. V.; Henriques, J. A. P.; Salvador, M. (2008). Antioxidant, Mutagenic and Antimutagenic activity of frozen fruits.**J. Med. Food**.11(1):144-151.
- Tomé, A.R., Feng, D., Freitas, R.M. (2010). The effects of alpha-tocopherol on hippocampal oxidative stress prior to in pilocarpine-induced seizures. **Neurochem. Res**. 35, 580-587.
- Thomé, N.(1995). **Ciclo da madeira: História da devastação da Floresta de Araucária e do desenvolvimento da indústria da madeira em Caçador e na Região do Contestado no século XX**. Caçador: Universal. 212p.
- Trueba, G. P.; Sánchez, M. (2001). Los flavonóides como antioxidantes naturales. **Acta Farm.Bonaer**. 20(4):297-306.
- Tsao,R. (2010).Chemistry and Biochemistry of Dietary polyphenols. **Nutrients** 2:1231-1246.
- Ursini, M.V.; Parrella, A.; Rosa, G.; Salzano, Martini, G. (1997). Enhanced expression of glucose-6 phosphatase dehydrogenase in human cells sustaining oxidative stress. **Biochem J**. 323: 801-806.
- Wätjen,W.; Michels,.G.; Steffan,B.; Niering,P.; Chovolou,Y.; Kampkötter,A.; tran-thi,Q.H.; Proksch,P.; Kahl,R. (2005). Low concentrations of flavonoids are protective in rat h4iie cells whereas high concentrations cause dna damage and apoptosis. **J. Nutr.L**.35(3),525-531.
- Valko, M.; Morris, H.; Cronin, M. T. D.(2005). Metals, toxicity and oxidative stress. **Current. Med. Chem**. 12:1161-1208.

- Yamaguchi, L.F.; Vassão, D.G.; Kato, M.J.; Mascio, P.(2005). Biflavonoids from Brazilian pine *Araucaria angustifolia* as potentials protective agents against DNA damage and lipoperoxidation. **Phytochemistry**. 66:2238–2247.
- Yamaguchi, L.F.; Kato, M.J.; Mascio, P. (2009). Biflavonoids from *Araucaria angustifolia* protect against DNA UV-induced damage. **Phytochemistry**. 70:615–620.
- Yamamoto,S.; Otto, A.; Simoneit, B.R.T. (2004). Lignans in resin of *Araucaria angustifolia* by gas chromatography/mass spectrometry. **J. Mass Spectrom**. 39:1337–1347.
- Yeh, C.T.; Ching, L.; Yen, G.C. (2009). Inducing gene expression of cardiac antioxidant enzymes by dietary phenolic acids in rats. **J.Nutr. Biochem**. 20:163-171.
- Zelko, I.N.; Mariani, T.J.; Folz, R.J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CU-Zn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2) and EC-SOD (SOD3) gene structure, evolution and expression. **Free Radic Biol Med**. 33(3): 337-49.
- Zucco, F.; De Angelis, I.; Testai, E.; Stammati, A. (2004). Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. **Toxicol In vitro**. 18(2):153-163.