

FIOCRUZ

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

FACULDADE DE MEDICINA

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO GONÇALO MONIZ



UFBA

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

**EFEITO PROTETOR DO FLAVONOIDE RUTINA CONTRA A CITOTOXICIDADE
DO SULFATO FERROSO EM CULTURA DE CÉLULAS C6 DE GLIOMA DE RATO**

PRISCILA CORREIA PINHEIRO DE MATOS

Salvador – Bahia

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

Efeito protetor do flavonoide rutina contra a citotoxicidade do sulfato ferroso em Cultura de células C6 de glioma de rato

Priscila Correia Pinheiro de Matos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental como parte dos requisitos para a obtenção do grau de mestra em patologia humana.

Orientador: Prof. Dr. Ramon dos Santos El-Bachá

Salvador – Bahia
2022

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ – Bahia - Salvador

M433e Matos, Priscila Correia Pinheiro de

Efeito protetor do flavonoide rutina contra a citotoxicidade do sulfato ferroso em Cultura de células C6 de glioma de rato/ Priscila Correia Pinheiro de Matos. _ Salvador, 2021.

66f.: il.: 30 cm

Orientador: Prof. Dr. Ramon dos Santos El-Bachá

Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

1. Ferro. 2. Rutina. 3. Biologia celular. 4. Flavonoide. 5. Ácido ascórbico. I. Título.

CDU 576

“EFEITO PROTETOR DO FLAVONOIDE RUTINA CONTRA A CITOTOXICIDADE DO SULFATO FERROSO EM CULTURA DE CÉLULAS C6 DE GLIOMA DE RATO”.

Priscila Correia Pinheiro de Matos

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 12 de janeiro de 2022.

COMISSÃO EXAMINADORA

Daniel Pereira Bezerra

RG 2127396383 / CPF: 05229592451
Nome do Pesquisador: Diogo Rodrigo M. Moreira
Professor em Saúde Pública
IGM - Floresta Bahia
SAPE: 2173247
<i>Diogo Moreira</i>
Assinatura:

Dr. Daniel Pereira Bezerra
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

Dr. Diogo Rodrigo de Magalhães Moreira
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

Ramon dos Santos El-Bachá

Dr. Ramon dos Santos El-Bachá
Professor
UFBA

FONTES DE FINANCIAMENTO

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”.
À CAPES pelo fomento, apoio financeiro e consolidação do programa de pós-graduação em Patologia Humana.

À Universidade Federal da Bahia (UFBA).
Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina (UFBA)

Aos meus pais,

Luzia Alzira C. Pinheiro de Matos e Ruy Pinheiro de Matos

AGRADECIMENTOS

A Deus, eu agradeço pela determinação que tenho e por todas as surpresas boas diante situações complicadas que surgiram com o decorrer deste trabalho.

Aos meus pais Luzia e Ruy, pela vida e apoio em todas as decisões que tomei em minha vida acadêmica (obrigada por sempre torcerem por minha felicidade).

A Jônatas pela companhia constante e por me ensinar a usar o Adobe Photoshop, a Alexandre e meus amigos por acreditarem em meu potencial e me proporcionarem agradáveis momentos de descanso. A Maria pelo alto astral de sempre e por ter me ajudado tanto com coisas que ocupam muito tempo.

Aos professores do LabNQ a quem dedico admiração e respeito, mas principalmente ao meu orientador prof. Dr. Ramon El-Bachá, que muito ensinou e me acolheu em momentos findouros de suas atividades de orientação acadêmica (saiba que considero uma honra enorme ter sido sua última mestranda, obrigada pela oportunidade e por sua disponibilidade).

Aos colegas de equipe Jamile, Florisvaldo mas também Alana, Julita (que foram da equipe e de certa forma continuaram pertinho), meus sinceros agradecimentos por todos os ensinamentos, pelos sorrisos e o bom humor constante. Vocês me ensinaram muito sobre vivência de laboratório, sobre a vida e fizeram meus dias muito divertidos.

Aos outros colegas do laboratório: Janaína, Jéssica Telles, Erica Novais, Lívia e aos demais LABNquímicos por tudo que me ensinaram.

A Verônica e Lúcia pelo auxílio.

Aos colegas de pós-graduação da Fiocruz que ajudaram muito com trocas de materiais quando necessário, especialmente Bianca Mesquita, que também me socorreu com problemas de formatação.

A Liliane Lins Kusterer pelos conselhos.

A Yasmin Figueiredo por todas palavras de ânimo.

Aos demais professores de graduação e pós-graduação e os funcionários da UFBA e FIOCRUZ.

À banca examinadora que, gentilmente, aceitou o convite para participar da defesa.

À todas as pessoas que verdadeiramente torceram por mim e me incentivaram, eu sou eternamente grata.

“São as perguntas que não sabemos responder que mais nos ensinam. Elas nos ensinam a pensar. Se você dá uma resposta a um homem, tudo o que ele ganha é um fato qualquer. Mas, se você lhe der uma pergunta, ele procurará suas próprias respostas.

Assim, quando ele encontrar as respostas, elas lhe serão preciosas. Quanto mais difícil a pergunta, com mais empenho procuramos a resposta. Quanto mais a procuramos, mais aprendemos”

(O Temor do Sábio - Patrick Rothfuss)

MATOS, Priscila Correia Pinheiro de. **Efeito protetor do flavonoide rutina contra a citotoxicidade do sulfato ferroso em cultura de células C6 de glioma de rato**. 2021. 66f. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O estresse oxidativo está relacionado com o envelhecimento e com vários distúrbios neurodegenerativos. Os flavonoides, por sua vez, exibem ação importante nos sistemas biológicos, como a eliminação de radicais livres, atuando como agentes antioxidantes, seja isoladamente ou em conjunto com moléculas como por exemplo o ácido ascórbico. Flavonoides como a rutina se destacam por sua capacidade antioxidante e citoprotetora, sendo assim, promissores nesse âmbito. **OBJETIVO:** Investigar o efeito protetor do flavonoide rutina contra a citotoxicidade do sulfato ferroso em modelos *in vitro* de linhagem C6 de glioma de rato, e avaliar se o ácido ascórbico interfere nesta atividade farmacológica. **MÉTODOS:** As células C6 foram cultivadas em condições estéreis, a 37° C em atmosfera com 5 % de CO₂ até atingirem confluência. Foram feitas modulações específicas para cada etapa; para determinação da mínima concentração citotóxica do sulfato ferroso, a diluição ocorreu entre 0,07 mM e 22 mM. Foi feito teste de citotoxicidade do sulfato ferroso após 24 h de tratamento através de teste de MTT. Para determinar a mínima concentração protetora da rutina foi feita diluição (entre 5 e 500 µM por 24 h), seguida de tratamento com sulfato ferroso (a 13 mM por 24 h), assim como teste de análise da proteção de células pela rutina através de teste de MTT. Para verificar interferência do ácido ascórbico foi feito experimento em que as células C6 foram pré-tratadas com rutina na mínima concentração protetora (5 µM por 24 h), sendo em seguida tratadas com sulfato ferroso (a 13,7 mM), variando-se a concentração de ácido ascórbico (entre 6 e 300 µM por 24 h de tratamento) através de teste de MTT. **RESULTADOS:** A mediana da mínima concentração citotóxica do sulfato ferroso para células C6 foi 0,7 mM (variação: 0,7 e 1,3 mM, n= 3) após 24 h. A rutina exibiu um efeito protetor parcial em testes de viabilidade celular. A mediana da mínima concentração protetora da rutina foi 5 µM (variação: 5 – 50 µM, n= 9) e preveniu uma porcentagem significativa de morte celular induzida pelo sulfato ferroso a 13 mM após 24 h. O ácido ascórbico não interferiu no efeito protetor da rutina. **CONCLUSÕES:** A rutina tem ação citoprotetora frente aos danos oriundos do sulfato ferroso, em células C6, o ácido ascórbico não apresentou interferência nessa proteção.

Palavras-chave: Ferro. Rutina. Biologia celular. Flavonoide. Ácido ascórbico. Células C6.

MATOS, Priscila Correia Pinheiro de. **Protective effect of the flavonoid rutin against ferrous sulphate cytotoxicity to rat glioma C6 cells**. 2021. 66 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Oxidative stress is related to aging and several neurodegenerative disorders. Flavonoids, on the other hand, have an important action in biological systems, for example as scavenging free radicals, acting as antioxidant agents, either alone or together with molecules such as ascorbic acid. Flavonoids like rutin stand out for their antioxidant and cytoprotective capacity, therefore, they are promising in this field. **AIM:** To investigate the protective effect of the flavonoid rutin against the cytotoxicity of ferrous sulphate in *in vitro* models of the C6 strain of rat glioma cells, and to assess whether ascorbic acid interferes with this pharmacological activity. **METHODS:** C6 cells were cultured under sterile conditions at 37° C in an atmosphere with 5 % CO₂ until reaching confluence. Specific modulations were made for each step; in order to determine the minimum cytotoxic concentration of ferrous sulphate, the dilution occurred between 0.07 mM and 22 mM. The ferrous sulphate cytotoxicity test was performed after 24 h of treatment by using MTT. In order to determine the minimum protective concentration of rutin, a dilution was made (between 5 and 500 µM for 24 h), followed by treatment with ferrous sulphate (at 13 mM for 24 h), as well as an analysis test of the protection of rutin cells by the MTT test. To verify interference from ascorbic acid, an experiment was carried out in which C6 cells were pretreated with rutin at the minimum protective concentration (5 µM for 24 h), being then treated with ferrous sulphate (at 13.7 mM), varying the concentration of ascorbic acid (between 6 - 300 µM for 24 h) using the MTT test. **RESULTS:** The minimum cytotoxic concentration of ferrous sulphate for C6 cells was 0.7 mM (range: 0.7 and 1.3 mM n= 3) after 24 h. Rutin exhibited a partial protective effect in cell viability tests. The median of the minimum protective concentration of rutin was 5 µM (range: 5 – 50 µM, n= 9) and it prevented a significant percentage of cell death induced by ferrous sulphate at 13 mM after 24 h. Ascorbic acid did not interfere with the protective effect of rutin. **CONCLUSIONS:** Rutin has a cytoprotective action against damages induced by ferrous sulphate, in C6 cells, ascorbic acid did not interfere in this protection.

Keywords: Iron. Rutin. Cell biology. Flavonoid. Ascorbic acid. C6 cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura geral dos flavonoides.	16
Figura 2 - <i>Dimorphandra mollis</i> Benth.	17
Figura 3 - Estrutura química da rutina (C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆)	18
Figura 4 - Estrutura química do ácido ascórbico (C ₆ H ₈ O ₆)	20
Figura 5 - Desequilíbrio do sistema antioxidante.....	26
Figura 6 - Esquema representativo da modulação do sulfato ferroso com concentrações finais para cada coluna em desenho da placa de 96 poços.	33
Figura 7 - Esquema representativo das etapas percorridas para obtenção dos resultados dos testes de viabilidade celular da triplicata de C6 com sulfato ferroso.	34
Figura 8 - Esquema representativo da modulação do pré-tratamento de rutina com concentrações finais para cada coluna (24 h) e posterior tratamento com sulfato ferroso na concentração constante a 13 mM (24 h), desenho da placa de 96 poços.....	35
Figura 9 - Esquema representativo das etapas percorridas para obtenção dos resultados dos testes de viabilidade celular para verificar proteção da rutina em triplicatas de C6 com sulfato ferroso.	36
Figura 10 - Esquema representativo da modulação do pré-tratamento de rutina a 5 µM (24 h) e posterior tratamento com sulfato ferroso em concentrações constantes (13,7 mM) e AA com concentrações finais para cada coluna e desenho da placa de 96 poços.....	37
Figura 11 - Esquema representativo das etapas percorridas para obtenção dos resultados dos testes de viabilidade celular para verificar proteção da rutina em triplicatas de C6 com sulfato ferroso em interação com AA.....	38
Figura 12 - Reação de redução do MTT a formazan através do nível de atividade das desidrogenases mitocondriais.....	39
Figura 13 - Fotografias de uma triplicata após modulação antes e depois do teste colorimétrico de MTT.....	39
Figura 14 - Determinação da mínima concentração citotóxica do sulfato ferroso em culturas de células C6..	41

Figura 15 - Este de citotoxicidade do sulfato ferroso após 24 h de tratamento através de teste de MTT, o gráfico mostra um dos experimentos correspondentes à mediana.	42
Figura 16 - Concentração protetora da rutina contra a citotoxicidade do sulfato ferroso a 13 mM em células C6.	43
Figura 17 - Teste de análise da proteção de células pela rutina através de teste de MTT, após 24 h de pré-tratamento com rutina seguido de 24 h de indução de danos com sulfato ferroso a 13 mM.	44
Figura 18 - Imagens obtidas por fotografias de microscopia de contraste de fase de células C6 na presença de dano oxidativo induzido por sulfato ferroso com pré-tratamento de rutina em objetiva de 10×.	45
Figura 19 - Experimento representativo entre nove realizados em que as células C6 foram pré-tratadas com rutina a 5 µM seguidas de 24 h de dano com sulfato ferroso a 13,7 mM moduladas juntamente com concentrações de AA entre 6 -300µM.....	47
Figura 20 - Imagens obtidas por fotografias de microscopia de contraste de fase em objetiva de 10× nos experimentos de pré-tratamento com rutina a 5 µM por 24 h, seguido de tratamento com sulfato ferroso a 13 mM e AA por 24 h.....	48

ABREVIATURAS

AA – ácido ascórbico

AGPI – ácidos graxos poli-insaturados

BHE – barreira hematoencefálica

C6 – linhagem celular de glioma de rato

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EROs - espécies reativas de oxigênio

LPO – lipoperoxidação

MC – Meio condicionado

MTT – ((3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)

P – Probabilidade de significância

PBS – Tampão fosfato-salino

pH – Potencial hidrogeniônico ou potencial hidrogênio iônico

RL – radicais livres

RNA – Ácido ribonucleico

RUT – Rutina

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SFB – Soro Fetal Bovino

Sigma – Sigma-Aldrich

SNC – Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OS ANTIOXIDANTES EXÓGENOS - ESTRUTURA, CLASSIFICAÇÃO E BIOATIVIDADE	14
1.2	O ENVELHECIMENTO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E AS DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS	22
1.3	CULTURA DE CÉLULAS DE GLIOMA COMO MODELO DE ESTUDO	28
2	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	29
2.1	OBJETIVOS	30
2.1.1	OBJETIVO GERAL	30
2.1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	PRODUTOS QUÍMICOS E REAGENTES	31
3.2	CULTURA DE LINHAGEM DE GLIOMA DE RATO C6	31
3.3	TRIPSINIZAÇÃO, PLAQUEAMENTO E MODULAÇÃO	32
3.3.1	SULFATO FERROSO	33
3.3.2	PRÉ-TRATAMENTO COM RUTINA SEGUIDO DE TRATAMENTO COM SULFATO FERROSO	34
3.3.3	PRÉ-TRATAMENTO COM RUTINA SEGUIDO DE TRATAMENTO COM SULFATO FERROSO E AA	36
3.4	TESTE DE VIABILIDADE CELULAR POR MTT	38
3.5	FOTOGRAFIAS EM MICROSCÓPIO DE CONTRASTE DE FASE	40
3.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	40
4	RESULTADOS	41
5	DISCUSSÃO	50
6	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

Plantas medicinais são utilizadas desde os tempos pré-históricos. Suas aplicações têm os primeiros registros em Nagpur (Índia), onde foi descoberta uma placa de argila da Suméria com aproximadamente 5.000 anos de idade, que abrangia 12 receitas para a preparação de medicamentos referentes a mais de 250 plantas distintas (KELLY, 2009).

Ao longo do processo evolutivo da humanidade, muitos povos passaram a dominar o conhecimento do uso de plantas medicinais, buscando soluções para os males que lhes afligiam em cascas, sementes, corpos de frutas, raízes, e partes aéreas das plantas. A cada século as propriedades curativas de certas plantas medicinais eram identificadas, anotadas e transmitidas às gerações sucessivas (PETROVSKA, 2012). Com o decorrer do tempo a ciência contemporânea reconheceu a importância dos saberes populares e vem concedendo cada vez mais atenção a uma variedade de compostos com origem vegetal, conhecidos pelas civilizações antigas e utilizados ao longo dos milênios.

A OMS (1998) definiu planta medicinal como sendo "todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos". As indústrias farmacêuticas foram amplamente beneficiadas pelos conhecimentos populares sobre o uso medicinal das plantas e diversos medicamentos atuais são originários do reino vegetal.

Dentre os metabólitos secundários de origem vegetal investigados na atualidade para fins medicinais, estão os flavonoides que são qualitativa e quantitativamente um dos maiores grupos de produtos naturais conhecidos (HAVSTEEN, 2002) e se destacam por sua relevância quanto à atividade biológica. Estes se encontram amplamente distribuídos, mas sua maior concentração está no grupo das angiospermas (SIMÕES *et al.*, 2001).

1.1 OS ANTIOXIDANTES EXÓGENOS - ESTRUTURA, CLASSIFICAÇÃO E BIOATIVIDADE

Antioxidantes são substâncias (que podem ser vitaminas, minerais, compostos vegetais, enzimas originadas das reações metabólicas ou fatores exógenos), que minimizam, retardam e inibem o efeito lesivo dos radicais livres ao organismo. O equilíbrio antioxidante depende dessas substâncias endógenas e exógenas (OU *et al.*, 2002). Dentre os antioxidantes exógenos os

flavonoides se destacam por suas características e por serem amplamente encontrados em uma diversa variedade de alimentos de origem vegetal, como frutas, verduras, sementes e folhas. São responsáveis por uma grande parcela do sabor, aroma e coloração de diversos vegetais, sendo incluídos de maneira bem significativa na dieta humana (GILBERT; COOKE, 2001). Tais aspectos justificam a sua denominação flavonoides, derivada do vocábulo inglês *flavor* (que significa sabor).

Existe uma dificuldade em considerar com exatidão a ingestão de flavonoides entre diferentes populações e países. A média de consumo de flavonoides pelo brasileiro é de 74,4 mg por dia (ARABBI; GENOVESE; LAJOLO, 2004). A maior ingestão mundial registrada é no Irã, acompanhado pelo Reino Unido (com um consumo maior que 1000 mg por dia). A menor ingestão é no Brasil e no México (com menos de 150 mg diários). As populações que mais consomem flavonoides totais na dieta são aquelas com alto consumo de chá, principalmente chá preto (ESCOBAR-CÉVOLI *et al.*, 2017).

O primeiro relato de atividade biológica foi realizado na década de 1930 pelos pesquisadores Rusznyák e Szent-Gygyi (1936), que descreveram a capacidade de reparo da resistência capilar com a utilização de flavonoides. Foi proposta então a classificação como Vitamina P (posteriormente descobriu-se que este composto era o flavonoide rutina). Essa nomenclatura se mostrou imprópria e foi abandonada, haja vista que em 1950 a Federação das Sociedades Americanas de Biologia Experimental recomendou descontinuação do termo, pois os flavonoides não se enquadram na definição clássica de vitaminas (não são nutrientes indispensáveis que induzem a síndromes de deficiência que se resolvem com a administração de doses da substância em questão) (VICKERY *et al.*, 1950).

É importante ressaltar que flavonoides estão sendo extensivamente estudados porque exibem uma grande ação sobre os sistemas biológicos: destacam-se atividade anti-inflamatória, antineoplásica, anti-hepatotóxica e anti-hipertensiva, apresentam a capacidade de induzir diferenciação celular e ainda algumas propriedades antioxidantes, como eliminação de radicais livres (RL) (PELZER *et al.*, 1998).

O preparo dos alimentos para consumo pode, eventualmente, resultar em perdas parciais destes compostos, variando de acordo com o tipo de alimento e o tipo de preparo empregado. Todavia, os flavonoides são compostos relativamente estáveis, pois resistem à oxidação, altas temperaturas e moderadas variações de acidez (PETERSON; DWYER, 1998).

Os flavonoides impressionam mais pela grande variedade do que pela complexidade estrutural. Eles têm uma estrutura comum que consiste em dois anéis aromáticos (A e B) ligados por três átomos de carbono que formam um heterociclo oxigenado (C) e podem ser divididos em pelo menos nove subclasses em função do heterociclo envolvido (ASENSI; ORTEGA; MENA; FEDDI *et al.*, 2011), a estrutura geral pode ser observada na figura 1:

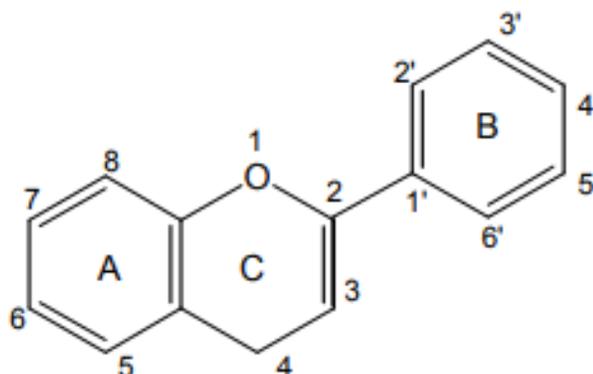


Figura 1- Estrutura geral dos flavonoides.

Fonte: < encurtador.com.br/dhrH0> Acesso em 29/05/2019.

Vários padrões de glicosilação aumentam ainda mais o número possível dos flavonoides. Nas células vegetais, os flavonoides ocorrem como agliconas e glicosídeos, principalmente como glicosídeos (o que promove uma melhor absorção), refletindo um possível objetivo de aumentar sua solubilidade em água, especificando sua localização sub-celular e diminuindo sua propensão a interagir com macromoléculas (PASSAMONTI *et al.*, 2009).

Os tipos diferentes de flavonoides podem ser classificados segundo o grau de oxidação do segmento central. Em ordem crescente (menor para a maior oxidação), os flavonoides podem ser nomeados catequinas, chalconas, isoflavonas, flavan-3,4-dióis, flavonas, auronas, flavonóis e antocianinas (HAVSTEEN, 2002; RUIZ-RODRIGUEZ *et al.* 2008). As atividades bioquímicas dos flavonoides e de seus metabólitos dependem de sua estrutura química, que podem variar com substituições incluindo hidrogenação, hidroxilações, metilações, malonilações, sulfatações e glicosilações (MACHADO *et al.* 2008).

Os flavonóis são os compostos fenólicos mais abundantes em alimentos, sendo as principais classes: quercetina, rutina, caempferol, isohamnetina e miricetina (RUIZ-

RODRIGUEZ *et al.* 2008). Dentre estes, a 3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona-3-rutinosídeo (rutina) é um flavonol glicosídico importante que pode ser encontrado no fruto do faveiro (na figura 2: *Dimorphandra mollis* Benth., uma espécie brasileira), em vinho, frutas, chocolates e chás (BECHO *et al.*, 2009).



Figura 2 - *Dimorphandra mollis* Benth

Fonte: < encurtador.com.br/kmnqO > e < encurtador.com.br/auJW0 >, adaptadas em uma só imagem. Acesso em 25/10/2019

A rutina apresenta um dissacarídeo (ramnose + glicose) ligado à posição 3 do anel pirano e um peso molecular de 610.53 g/mol. A porção glicosídica aumenta a hidrofiliabilidade da molécula, o que reduz a possibilidade de transporte passivo através da barreira hematoencefálica (BHE). Isso leva à teoria de que os flavonoides são absorvidos pelo transporte ativo e ultrapassam a BHE (CAZAROLLI, *et al.*, 2008) (YOUUDIM *et al.*, 2004). A estrutura química da rutina pode ser visualizada na figura 3:

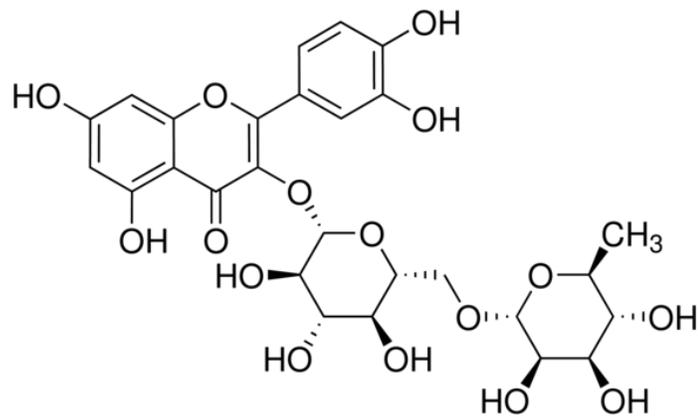


Figura 3 - Estrutura química da rutina ($C_{27}H_{30}O_{16}$)

Fonte: <encurtador.com.br/tzI25>. Acesso em 29/05/2019

São diversos os atributos de interesse farmacológico da rutina, dentre estes, estão descritos na literatura: capacidade antioxidante, anticarcinogênica, citoprotetora, anti-plaquetária, antitrombótica e vasoprotetora (KATSUBE *et al.*, 2006). Além da associação com melhora da resistência e permeabilidade dos vasos capilares, sequestro e inibição de processos de formação de RL em várias etapas, inibindo peroxidação lipídica (YANG; GUO; YUAN, 2008) confere um potencial neurofarmacológico promissor, em decorrência da sua ação direta sobre as células do sistema nervoso.

Embora a maioria dos benefícios fisiológicos dos flavonoides seja atribuída a seus efeitos sequestradores de RL, seu mecanismo de ação pode se estender além dessas propriedades. A alta capacidade de resposta dos astrócitos a vários flavonoides suporta a hipótese de que essas células possam ser mediadoras de suas ações no cérebro maduro (NONES; NONES, 2010).

Abrangentes são os efeitos benéficos dos flavonoides em relação à saúde (HALLIWELL *et al.*, 1995), podendo apresentar potencial para uso no tratamento ou prevenção de distúrbios neurodegenerativos. Como consequência de sua capacidade de inibir a peroxidação lipídica e eliminar os RL, é possível que os flavonoides apresentem uma ação protetora neuronal.

Embora as dificuldades para que a rutina atravessasse a BHE devido à sua baixa lipofilicidade sejam mencionadas na literatura (DAJAS *et al.*, 2015), os mecanismos de transporte dos flavonoides através desta têm sido estudados e demonstraram capacidade em permear a BHE através da quantificação destas substâncias no SNC.

A BHE apresenta seletividade em relação à passagem de moléculas polares e também de moléculas grandes (YOU DIM, SHUKITT-HALE, JOSEPH, 2004), mas a quercetina (molécula aglicona da qual a rutina deriva) pode ser captada por culturas celulares que mimetizaram a BHE, *in vitro*, e encontrada em todas as regiões cerebrais analisadas após perfusão *in situ* (DOVICH I; LAJOLO, 2011). A rutina é mais estável do que a quercetina na presença de baixas concentrações alcalinas. Em soluções ácidas, rutina é hidrolisada em quercetina, que é relativamente estável sob estas condições (KHALIFA; MUHTADI; HASSAN, 1983). Já foi registrada também a presença de catequinas, antocianidinas, naringeninas, hesperetina, rutina, dentre outros flavonoides no encéfalo de roedores os quais ingeriram oralmente as substâncias em questão (YOU DIM *et al.*, 2003; 2004).

Algumas moléculas podem possuir mais doadores de ligações de hidrogênio (o que tem influência em um maior peso molecular), dificultando a passagem através da BHE, pois restringe a capacidade de difusão passiva através de uma barreira hidrofóbica, isso sugere a necessidade de um transportador específico (ZAMEK-GLISZCZYNSKI, *et al.*, 2006). Existe uma preferência estereoespecífica por algumas moléculas que facilitam transporte através da BHE; contudo, estes têm sido pouco estudados (VELÁSQUEZ-JIMÉNEZ, *et al.*, 2021).

Por si próprios ou por clivagem em tecidos, os flavonoides colaboram para a capacidade geral de redução, como agentes antioxidantes, podendo agir em conjunto com outras moléculas, como o ácido ascórbico ou o tocoferol. As ações de eliminação e quelação nas células cooperam para o perfil redutor. A ação sobre glutathion (GSH) e a formação de conjugados flavonoides-GSH mantém o status redox em um nível estável. Existe também uma modulação do estado de fosforilação de componentes das cascatas de sinalização intracelular o que faz com que os flavonoides sejam destaque antioxidante em desequilíbrios oxidativos (DAJAS, 2005).

A vitamina C (estrutura química demonstrada na figura 4), identificada quimicamente como ácido ascórbico (AA) é um nutriente hidrossolúvel essencial na dieta humana e que se faz presente em diversas funções biológicas. Trata-se de um composto de seis carbonos, semelhante à glicose, que contém dois grupos acidionizantes (BALLAZ; REBEC, 2019).

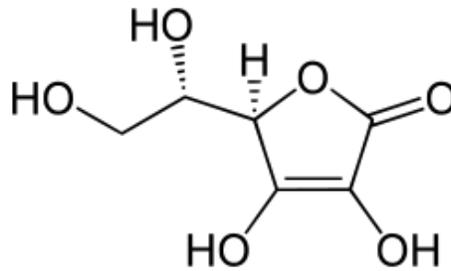


Figura 4 - Estrutura química do ácido ascórbico (C₆H₈O₆)
Fonte: < encurtador.com.br/fAGQS>. Acesso em 02/11/2021

Sabe-se que a privação prolongada de AA pode ocasionar uma patologia letal denominada escorbuto, caracterizada por inchaço, sangramento nas gengivas e abertura de feridas que dificilmente cicatrizam (WOODRUFF, 1975). Isso pode ser evitado pelo consumo diário de 10 mg de AA, embora doses mais elevadas sejam indicadas para manutenção de uma vida mais saudável (PAULING, 1970).

As plantas e a maioria dos animais sintetizam ascorbato a partir da glicose. Porém, é considerado uma vitamina porque os humanos (além de outros vertebrados) perderam a capacidade de sintetizá-la através da enzima L-gulono-1,4-lactona oxidase, responsável pela última etapa na biossíntese de AA (CHATTERJEE *et al.* 1960). Tendo em vista que a via endógena de síntese é fonte de espécies reativas de oxigênio (EROs); do ponto de vista evolutivo, podemos inferir que a perda da capacidade de sintetizar ácido ascórbico é favorável e econômica, considerando que a dieta é capaz de suprir deficiências endógenas (ARRIGONI; DE TULLIO, 2002).

O AA é cofator de enzimas que participam da hidroxilação pós-tradução do colágeno, na biossíntese de carnitina, na conversão de dopamina a norepinefrina, na amidação peptídica e no metabolismo da tirosina. Apresenta considerável relevância na absorção do ferro, haja vista que reduz a forma férrica (Fe³⁺) a ferrosa (Fe²⁺), possibilitando a absorção do ferro não-heme no trato gastrointestinal (LOUREIRO; DI MASCIO; MEDEIROS, 2002; KAGAN, *et al.* 1990; HALLIWELL, 2001).

O AA atua fornecendo elétrons para reações enzimáticas cruciais nas células como um antioxidante primário capaz de eliminar os radicais gerados nas células ou no plasma. A principal função antioxidante de AA está associada a eliminação direta de espécies reativas de oxigênio (EROs) antes que possam danificar o DNA, proteínas ou lipídios (MAY, 2012); mas também

funciona reciclando outros antioxidantes (como por exemplo, regenerando o α -tocoferol e contribuindo para a homeostase) (TRABER, 2007).

A absorção de AA ocorre no trato gastrointestinal e os níveis plasmáticos se mantêm associados a uma dieta rica em frutas e legumes ou adequada suplementação prolongada (SZETO *et al.*, 2004; CHOI *et al.*, 2004). Depois de distribuída por todo o corpo, pode atingir a concentração mais alta no cérebro (SMYTHIES, 1996). A concentração de AA no líquido cefalorraquidiano chega a ser entre duas a quatro vezes maior do que no plasma sanguíneo, sendo que em todo o cérebro é possível detectar entre 1 a 2 mM, enquanto as concentrações neuronais intracelulares são até maiores (atingindo até 10 mM) (RICE, 2000; QUINN *et al.*, 2003). Inesperadamente, o cérebro mantém níveis elevados de AA, mesmo em casos de carência nos tecidos periféricos (RICE, 2000; LYKKESFELDT *et al.*, 2007).

No sistema nervoso central (SNC), podem ser identificadas altas concentrações de AA durante os processos intracelulares e extracelulares de remoção de EROs, interferindo em diversos mecanismos fisiopatológicos (AGUS *et al.*, 1997).

Dentre as características gerais de AA, o que mais desperta atenção científica é a sua necessidade no cérebro e no SNC, além de sua capacidade de reduzir a maioria das EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERN) fisiologicamente relevantes. O AA se faz presente em diversos processos neuronais como amidação de peptídeos, mielinização e síntese de catecolaminas (MAY, 2012). Funciona também como um neuromodulador da transmissão glutamatérgica no SNC, contribuindo para a redução da excitotoxicidade mediada pelo glutamato nas terminações nervosas (JOPE; MORRISETT; SNEAD, 1986).

A oxidação do AA por perda de um elétron ou por dois elétrons tem como produtos, respectivamente, o radical ascorbil (que devido a uma estabilização molecular, não é muito reativo em comparação com outros RL) e o ácido desidroascórbico ou dehidroascorbato (DHA) (DU; CULLEN; BUETTNER, 2012). Isso evidencia a capacidade redutora do ácido ascórbico em eliminar espécies altamente reativas e formar um radical de reatividade baixa (MONSEN, 2000).

Paradoxalmente, mesmo com a eficácia antioxidante demonstrada, o AA pode atuar como pró-oxidante *in vitro*, em soluções oxidativas de ferro com AA por exemplo, que são utilizadas em estudos para induzir dano oxidativo em lipídios, proteínas e DNA através da reação de Fenton

(HALLIWELL *et al.*, 2015). Reação esta, que é potencializada na presença do AA, aumentando assim a capacidade de reduzir os metais de transição.

Estudos em humanos se apresentam contraditórios, uma vez que alguns relacionam suplementação com AA e lesões oxidativas em DNA (em bases nitrogenadas e quebra de fita), nos quais foi verificado tanto diminuição (GREEN *et al.*, 1994), quanto aumento (PODMORE *et al.*, 1998). Mas apesar dessas informações discrepantes o AA é bem estabelecido como antioxidante, tendo em vista as doses recomendadas a serem ingeridas através da alimentação. Além da atuação como captadores de RL, estudos em cultura de células informam que o AA pode alterar a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória (BERNOTTI *et al.*, 2003), apoptose (CATANI *et al.*, 2002) e diferenciação celular (ALCAÍN, BURÓN, 1994).

As taxas mais elevadas de AA no cérebro se encontram em determinadas áreas do cérebro como o hipocampo, o córtex occipital e frontal. Em contrapartida, a deficiência de AA pode levar a anormalidades cerebrais, a exemplo de uma diminuição de 10-15% do volume do hipocampo e dificuldades de aprendizagem e memória (RICE, 2000; LYKKESFELDT *et al.*, 2007). Um suprimento adequado de AA pode estar relacionado ao atraso no início da neurodegeneração, uma vez que a capacidade redox do AA pode atuar prevenindo o estresse oxidativo resultante do envelhecimento.

Os medicamentos fitoterápicos são uma estratégia terapêutica particularmente interessante para muitas doenças da atualidade, em especial os transtornos psiquiátricos e neurológicos, por receio da população com os efeitos colaterais envolvidos e insatisfação com tratamentos convencionais ou até mesmo congruência com valores e crenças filosóficas (AKHONDZADEH, 2007). O envelhecimento da população global tem contribuído para que a comunidade científica busque cada vez mais por novos compostos que possuam efeitos modulatórios e atuem reduzindo ou prevenindo processos de neurodegeneração, estresse oxidativo e neuroinflamação.

1.2 O ENVELHECIMENTO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E AS DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

De todos os sistemas, o cérebro humano compõe o sistema biológico mais complexo. Ramón y Cajal o classificou como “obra prima da vida”. O sistema nervoso é responsável por controlar ações voluntárias e involuntárias do corpo humano, todas as funções sensoriais, funções motoras e integradoras, sendo assim de suma importância (LOW, 1993).

Formado por cerca de 300 bilhões de células, as duas classes principais são os neurônios e as células neurogлияis. O neurônio é a principal unidade de comunicação dentro do sistema nervoso, suportado por células gлияis, que desempenham diversas funções essenciais como controlar nutrição, atividade funcional e a morte dos circuitos neuronais (VERKHRATSKY; BUTT, 2007).

As doenças neurológicas podem ser diretas (por uma doença primária do sistema nervoso), ou indiretas (decorrentes de outros processos de adoecimento). Mas muitas vezes estão relacionadas com o envelhecimento do cérebro e conseqüente declínio cognitivo. O ritmo de envelhecimento da população vem aumentando gradativamente em comparação com os anos anteriores, segundo a ONU; estima-se que entre 2015 e 2050 a proporção da população mundial com mais de 60 anos passará de 12% para 22%. A Assembleia Geral das Nações Unidas declarou 2021–2030 a Década do Envelhecimento Saudável e pediu à OMS para liderar a implementação, com diversas ações com o intuito de promover vidas mais longas e saudáveis (ONU, 2021).

De acordo com o Instituto de Geografia e Estatística no ano de 2021 a porcentagem de idosos no Brasil com mais de 65 anos foi de 10,15%, a projeção para o ano de 2058 chega a 24,85% (IBGE, 2021), evidenciando ainda mais uma necessidade de atenção ao estudo das doenças inerentes aos processos envolvidos desta população. O envelhecimento é um fenômeno natural dos seres vivos e envolve um acúmulo de danos em diversos órgãos e tecidos, inclusive celular e molecular. São diversas as condições de saúde associadas ao envelhecimento e estas geram declínio das funções físicas e mentais (AVERSI-FERREIRA; RODRIGUES; PAIVA, 2008)

A velhice saudável, envolve aspectos multifatoriais como bons hábitos alimentares, atividades físicas regulares, conexões psicossociais significativas e alta tolerância ao estresse diário. O cérebro enfrenta, naturalmente, modificações morfológicas e funcionais que interferem nas árvores dendríticas e sinapses, nas formas de neurotransmissão, circulação e metabolismo que se refletem na alteração dos sistemas motor e sensorial, assim como sono, memória e aprendizagem (TIMIRAS, 2003). Porém, inevitavelmente, com o aumento da média de expectativa de vida da população, é mais comum também o aparecimento de doenças neurodegenerativas, o que torna imprescindível a busca por maior compreensão sobre o sistema nervoso e seu funcionamento tanto fisiológico quanto patológico.

Dentre os mecanismos mais estudados sobre o envelhecimento, o estresse oxidativo é a explicação mais convincente para vários distúrbios neurodegenerativos (FUKUGAWA, 1999). Formulada pela primeira vez por Harman (1956), a teoria do envelhecimento pelos radicais livres (RL) considera que o dano oxidativo que ocorre em ácidos nucleicos, lipídios, proteínas ou carboidratos é devido a um desbalanceamento entre a produção de oxigênio reativo em detrimento da velocidade da capacidade de desintoxicação do organismo através de mecanismos ágeis para reparação de danos, o que torna este desequilíbrio um risco para células e tecidos (HARMAN, 1956).

A teoria de Harman indicava que o envelhecimento poderia ser secundário ao estresse oxidativo e que desencadearia alterações lentas e progressivas dos órgãos, além do código genético. Mas deveríamos considerar o envelhecimento como causa ou consequência destas doenças? Talvez o processo ocorra concomitantemente (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Os RL são moléculas ou fragmentos moleculares que possuem elétrons desemparelhados, o que lhes confere reatividade (HALLIWELL, 1987). Os mais importantes radicais formados nas células de organismos aeróbios são EROs. Surgem através de processos metabólicos ou em decorrência da "ativação" do oxigênio por irradiação física. Alterações no estado redox esperado das células desencadeiam efeitos tóxicos que destroem componentes celulares (JOMOVA *et al.*, 2010). É importante ressaltar que nem todas EROs são RL e nem todo RL é EROs, mas ambos, RL e EROs, participam de processos fisiopatológicos redox do corpo humano (VELLOSA *et al.*, 2021).

O oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), o peroxinitrito (ONOO^-), o ácido hipocloroso (HOCl), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e o ozônio (O_3) são considerados como espécies reativas, em decorrência das suas propriedades, embora não sejam RL (PORTER, 1984; BENZIE, 1996; PATEL *et al.*, 1999). Dentre as EROs estão incluídos os radicais do oxigênio, como por exemplo o radical hidroxil (HO^\bullet), ânion radical superóxido (O_2^-), radical alquil (L^\bullet), alcóxil (LO^\bullet), e peróxil (LOO^\bullet) (BARBER; BERNHEIM, 1967; CHANGE, SIES, BOVERIS, 1979). Já entre as ERN estão incluídos além do ONOO^- , o óxido nítrico ($^\bullet\text{NO}$) e o radical dióxido de nitrogênio ($^\bullet\text{NO}_2$) (EISERICH, PATEL, O'DONNELL, 1998; HOGG, KALYANARAMAN, 1999).

A produção de RL, em proporções adequadas, está associada a geração de ATP (energia), ativação de genes, por meio da cadeia transportadora de elétrons, fertilização do óvulo, participação em mecanismos de defesa durante processo de infecção ou em outros processos

metabólicos necessários para o funcionamento do organismo (BARBOSA *et al.*, 2010). Uma infinidade de eventos pode desencadear ou aumentar a geração de RL a longo prazo. O surgimento exacerbado dos RL pode ser influenciado por uma ativação de fagócitos, alteração da transferência normal de elétrons na cadeia respiratória, concentração acentuada de íons de transição metálicos em doenças metabólicas ou prejuízos e redução da proteção antioxidante (FILIPPIN *et al.*, 2008). A geração dos RL pode acontecer de maneira endógena através de NADPH oxidase, peroxissomos, citocromo p-450, xantina oxidase, metabolismo mitocondrial, na inflamação, no processo de isquemia e até mesmo na prática de exercícios físicos (FILIPPIN *et al.*, 2008). Fatores externos como solventes e substâncias tóxicas, pesticidas, poluição em geral, contato com radiação, medicamentos também podem exercer influência sobre os níveis desses RL (VELLOSA *et al.*, 2021).

Entretanto, a produção demasiada pode levar a danos mais preocupantes, conduzindo à oxidação de biomoléculas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A interação entre os RL e os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) das membranas celulares e lipoproteínas faz com que estes radicais atuem como iniciadores de um processo em cadeia denominado peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO), um evidente indicador do estresse oxidativo celular (LIMA; ABDALLA, 2001). É necessário enfatizar que deve ser considerada a natureza dinâmica dos processos, haja vista que todos os organismos aeróbicos vivenciam os processos de estresse oxidativo uma vez que os subprodutos de EROs são produzidos majoritariamente durante o metabolismo do oxigênio (FLOYD, 1999).

Para manter a homeostase, os organismos aeróbicos metabolizam 85% a 90% do oxigênio (O₂) consumido na mitocôndria em condições fisiológicas, por meio da cadeia transportadora de elétrons. Os restantes 10% a 15% são utilizados por enzimas oxidases e oxigenases e também através de reações de oxidação direta (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

O cérebro utiliza quase exclusivamente glicose como fonte de energia e isso possivelmente explica por que consome níveis muito altos de oxigênio. Sabe-se que a maior parte (cerca de 95-98%) das EROs produzidas durante o metabolismo aeróbio vem de subprodutos da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria (HENSLEY *et al.*, 1999). É amplamente aceito que os níveis de estresse oxidativo aumentam no cérebro durante o envelhecimento, o que torna a idade um fator de risco para várias doenças.

Existem antioxidantes endógenos, dentre os quais se destacam a catalase, superóxido dismutase (SOD), glutathion peroxidase, glutathion redutase (GR), além de outros compostos encontrados no plasma sanguíneo como por exemplo transferrina, ácido úrico, ácido lipoico, albumina, hemopexina transferrina, ubiquinona, ceruloplasmina terem a capacidade de dar assistência antioxidante. Por outro lado, existe uma variada gama de antioxidantes exógenos. Dentre estes, destacam-se a Vitamina E, os carotenoides, os polifenóis e a vitamina C (AA) (PIETTA, 2000, SHAHIDI, HO, 2007).

Sabe-se que o sistema nervoso é particularmente suscetível aos efeitos deletérios das EROs. Em primeiro lugar, o cérebro contém altas concentrações de AGPI que são altamente suscetíveis à peroxidação lipídica. Utiliza, em comparação com outros tecidos, uma quantidade bem maior de oxigênio com a finalidade de produzir energia (cerca de 20% da quantidade total do consumo de O₂ do organismo em humanos). Além disso, tem um alto teor de Fe e AA (que são os principais ingredientes para causar a peroxidação de lipídios da membrana) (FLOYD, 1999); porém o tópico mais relevante a ser mencionado é que o cérebro é relativamente deficiente em sistemas antioxidantes e possui menor atividade de glutathion peroxidase (GPx) e catalase (CAT) se comparado com outros órgãos, o que aumenta sua predisposição natural ao dano oxidativo (KEDAR, 2003). É possível visualizar na figura 5 um esquema demonstrativo de desequilíbrio do sistema antioxidante:

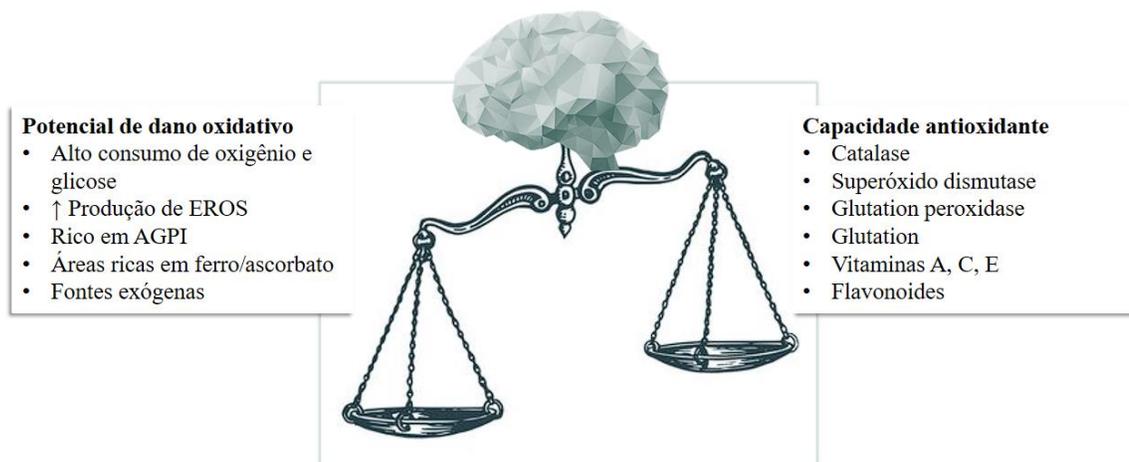


Figura 5 - Desequilíbrio do sistema antioxidante.

Fonte: Elaborado pela autora a partir de imagens disponíveis em <encurtador.com.br/hikwI> e <encurtador.com.br/chkmC>, editadas e adaptadas em uma só imagem. Acesso em 25/10/2019

Os íons ferro e cobre são muito ativos em reações de óxido-redução. Dessa forma, são considerados potentes catalisadores das reações de geração de RL. Uma das maneiras de graduar os níveis aumentados de estresse oxidativo no cérebro é através do aumento do conteúdo de ferro na região, substância capaz de estimular formação de RL via reação de Fenton, por exemplo (H_2O_2 em presença de metais como íon ferroso (Fe_{2+}) pode ser convertido ao radical hidroxil $\cdot\text{OH}$) (BUSH; CURTAIN, 2008).

A participação do ferro ocorre também na reação de Haber-Weiss, na qual estes íons catalisam a reação entre o H_2O_2 e o radical O_2^- gerando $\cdot\text{OH}$ (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). O cobre também pode atuar desta maneira nas reações, porém o metal pesado mais abundante no organismo e que está biologicamente mais capacitado para catalisar as reações de oxidação de biomoléculas é o ferro (AUST; MILLER, 1991).

O radical $\cdot\text{OH}$ possui alto potencial reativo devido a sua alta instabilidade, o que o caracteriza como principal iniciador do processo de peroxidação lipídica; contra o qual não há sistema enzimático de defesa (BARBOSA *et al.*, 2010). Esta relação entre as alterações neurológicas e o aumento do estresse oxidativo ocorre considerando-se que cadeias laterais das proteínas são modificadas diretamente por EROs, ou através de produtos da peroxidação lipídica (JOMOVA *et al.*, 2010). A cronicidade do processo em questão tem relevantes implicações sobre a etiologia de enfermidades crônicas não transmissíveis, entre elas aterosclerose, diabetes, obesidade, transtornos neurodegenerativos e câncer (GREEN; BRAND; MURPHY, 2004).

A oxidação ao DNA ocorre o tempo todo, acarretando diversos danos, inclusive muitas bases danificadas e quebras de fita (FLOYD; HENSLEY, 2002). Os mecanismos moleculares envolvidos em todas as mudanças cerebrais acometidas no decorrer do envelhecimento ainda não foram completamente elucidados, porém evidências crescentes, implicam no aumento da suscetibilidade aos efeitos de longo prazo do estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e acometimentos inflamatórios como os fatores mais relevantes (CUTLER; RODRIGUEZ, 2003).

Os efeitos deletérios do oxigênio sobre componentes biológicos se tornaram objetos de grande relevância para investigação científica no decorrer dos últimos anos (HALLIWELL, 2000). Ainda não existe consenso na literatura se o estresse oxidativo é o evento inicial primário associado à neurodegeneração ou um efeito secundário relacionado a outras vias patológicas (ANDERSEN, 2004), porém cada vez mais evidências implicam que é uma circunstância

indelevelmente envolvida na propagação de lesão celular, o que acarreta diferentes danos evidenciados em doenças neurodegenerativas (EMERIT; EDEAS; BRICAIRE, 2004).

1.3 CULTURA DE CÉLULAS DE GLIOMA COMO MODELO DE ESTUDO

Os modelos de estudos de células são essenciais para a pesquisa por permitirem o estudo *in vitro* da viabilidade celular em um ambiente isolado. São utilizadas em experimentos preliminares, antecedendo testes *in vivo*, apresentam vantagens por serem de fácil manuseio, baixo custo, seguro, de rápido crescimento e podem proporcionar estimada equivalência aos resultados em estudo de modelo animal; levando em consideração o aspecto ético, pois não se faz necessário o sacrifício de animais, como no uso de culturas primárias.

A linhagem C6 é uma linhagem celular glial ainda indiferenciada com potencial para expressar propriedades de astrócitos (BISSELL *et al.*, 1974). Foi identificada e desenvolvida pela primeira vez a partir de um tumor induzido por *N-nitrosometilureia* em ratos e tornou-se um modelo conveniente para o estudo da composição e função da glia (BENDA *et al.*, 1968).

Embora a linhagem de células descrita seja mais utilizada em pesquisas de glioblastoma (para testar uma ampla diversidade de agentes quanto à sua atividade tumoricida), esta oferece também uma ampla variedade de possibilidades em estudos terapêuticos. Dentre estes, estudos de padrões invasivos, de crescimento, modelos angiogênicos e imunológicos e uma infinidade de alvos moleculares e genéticos para novos agentes farmacológicos (GIAKOUMETTIS; KRITIS; FOROGLU, 2018).

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Tendo em vista a explanação sobre a literatura e pesquisas preliminares acerca do efeito neuroprotetor da rutina e considerando o envelhecimento da população mundial, a hipótese desse trabalho é que o flavonoide rutina tem ação citoprotetora frente ao dano oxidativo oriundo do sulfato ferroso, em culturas de células C6. Pode-se conjecturar também que o AA influencia essa proteção.

2.1 OBJETIVOS

2.1.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo geral investigar o efeito protetor do flavonoide rutina contra a citotoxicidade do sulfato ferroso em modelos *in vitro* de linhagem C6 de glioma de rato bem como avaliar se o ácido ascórbico interfere nesta atividade farmacológica.

2.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a mínima concentração citotóxica do sulfato ferroso em cultura de células C6;
- Identificar a mínima concentração protetora da rutina, capaz de prevenir uma porcentagem significativa de morte celular induzida pelo sulfato ferroso;
- Avaliar se o AA interfere na ação da rutina e verificar se aumenta uma possível capacidade antioxidante desta droga ou se existe uma associação do AA com o sulfato ferroso, aumentando o dano oxidativo;
- Caracterizar a morfologia das células C6 na presença de dano oxidativo induzido por sulfato ferroso e na interação com rutina e com rutina e AA.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PRODUTOS QUÍMICOS E REAGENTES

A Rutina foi adquirida na Merck/ Sigma- Aldrich (Rua Torre Eiffel, 100nG.2 Pq Rincão 06705-481 Cotia-SP Brasil) e apresentava a maior pureza disponível (95%). O meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) foi adquirido de GIBCO Thermofisher e importado através da TecLab, assim também como penicilina, estreptomina, soro bovino fetal (SFB), tripsina-EDTA, L-glutamina e piruvato de sódio. O brometo de metiltiazolildifenil-tetrazólio (MTT) foi importado da Thermofisher através da Life Technologies do Brasil Com. Ind. Prod. Biote. Ltda (Av Portugal, 1100 Parte C 38 CEP 06696060 Itapevi SP). O duodecil sulfato de sódio (SDS), o AA e o sulfato ferroso 7 H₂O P.A.-A.C.S. foram adquiridos da marca: Synth, Av. Dr. Ulysses Guimarães, Nº 3857 - Vila Nogueira CEP 09990-080 - Diadema - SP.

3.2 CULTURA DE LINHAGEM C6 DE GLIOMA DE RATO

As células de glioma de rato C6 foram obtidas do Banco de Células do Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular (LabNq), onde se mantêm estocadas em 90% de Soro fetal bovino (SFB) e 10% de Dimetilsulfóxido ou Sulfóxido de Dimetilo (DMSO) em nitrogênio líquido. Quando necessário, as células foram descongeladas, centrifugadas e cultivadas a uma densidade de $2,5 \times 10^3$ células/ cm² em condições estéreis, em meio DMEM suplementado com L-(+)-glutamina (2mM), NaHCO₃ (44mM), 10 % (v/v) de SFB, penicilina (100 UI/mL) e estreptomina (100 µg/mL), distribuídas em garrafas de 250 mL (Kasvi Tissue Culture Flasks K11- 1250) e placas plásticas de 10 cm de diâmetro (Kasvi) (ambas específicas para cultivo celular), incubadas em estufa com 5% de CO₂, a 37°C. O meio de cultivo foi trocado a cada 48 horas até a confluência, o subcultivo foi realizado com intervalo máximo até 18 passagens.

3.3 TRIPSINIZAÇÃO, PLAQUEAMENTO E MODULAÇÃO

Quando a placa atingiu a confluência, as células foram tripsinizadas. O meio de cultivo foi sugado pela bomba de vácuo, a placa foi lavada três vezes com 3 mL de solução salina de tampão fosfato de sódio (PBS), pH a 7,4, inserido 3 mL de tripsina (50 mg de tripsina em pó, 20 mg de EDTA em 100 mL de PBS), Sigma – E.U.A. e mantida por três minutos na estufa de cultivo à temperatura de 37°C e atmosfera com 5% de CO₂. Após confirmação no microscópio invertido do descolamento das células por ação da tripsina, foi introduzido 3 mL de meio suplementado com 10% de SFB com a finalidade de pausar a ação da tripsina. O conteúdo da placa foi então transferido para o tubo Falcon de 15 mL e centrifugado a 3000 RPM em centrífuga com raio de 10 cm por 3 minutos. Após isso, o sobrenadante foi descartado e foi colocado mais 3 mL do meio de cultura no sedimento que restou no tubo. As células foram homogeneizadas com o pipetador de 1000 µL.

Foi retirado, então, 10 µL da solução, transferidos para o microtubo Eppendorf de 500 µL e adicionados mais 10 µL de azul tripan. A solução foi homogeneizada, e recolheu-se 10 µL e inseriu-se em cada lado da câmara de Neubauer para se efetuar a contagem das células.

Uma alíquota da solução foi transferida para placa Petri de 10 mL e complementada com meio DMEM suplementado com SFB, de forma que uma alíquota de 100 µL contivesse $8,135 \times 10^3$ células. As células foram semeadas em placas com 96 poços na densidade de $2,5 \times 10^3$ células/ cm². Um poço com apenas meio de cultivo sem células foi utilizado como branco primário; a primeira linha de cada coluna também não recebeu células, mas recebeu todo tratamento, para que fossem reduzidos os vieses no que tange interferência das substâncias utilizadas previamente com o MTT, conseqüentemente a análise não foi paramétrica, já que cada grupo experimental teve um n de 7 poços.

Após o plaqueamento as placas foram mantidas em estufa por 48 h e depois do tempo de incubação e confirmação acerca da confluência das células, as placas foram encaminhadas para o processo de modulação. O desenho de cada grupo de experimentos ocorreu segundo as seguintes distribuições: Para a triplicata de sulfato ferroso ver figura 6, para triplicatas com pré-tratamento de rutina e tratamento com sulfato ferroso ver figura 8, para triplicatas com pré-tratamento de rutina e tratamento com sulfato ferroso e AA ver figura 10.

3.3.1 SULFATO FERROSO

Os testes preliminares apontaram que concentrações do sulfato ferroso a partir de 22 mM poderiam ser utilizadas para a finalidade proposta no experimento. Então foi feita modulação em concentrações variáveis para descobrir a mínima concentração citotóxica (MCC). Um experimento em triplicata foi realizado para avaliar a citotoxicidade do sulfato ferroso após 24 h de tratamento. O desenho das placas é especificado abaixo:

- Coluna 1: controle só com meio – poço 1 vazio, os demais com meio + células;
- Coluna 2 a 12 – poço 1 sem células, mas com meio e sulfato ferroso, os demais receberam meio + células + sulfato ferroso.

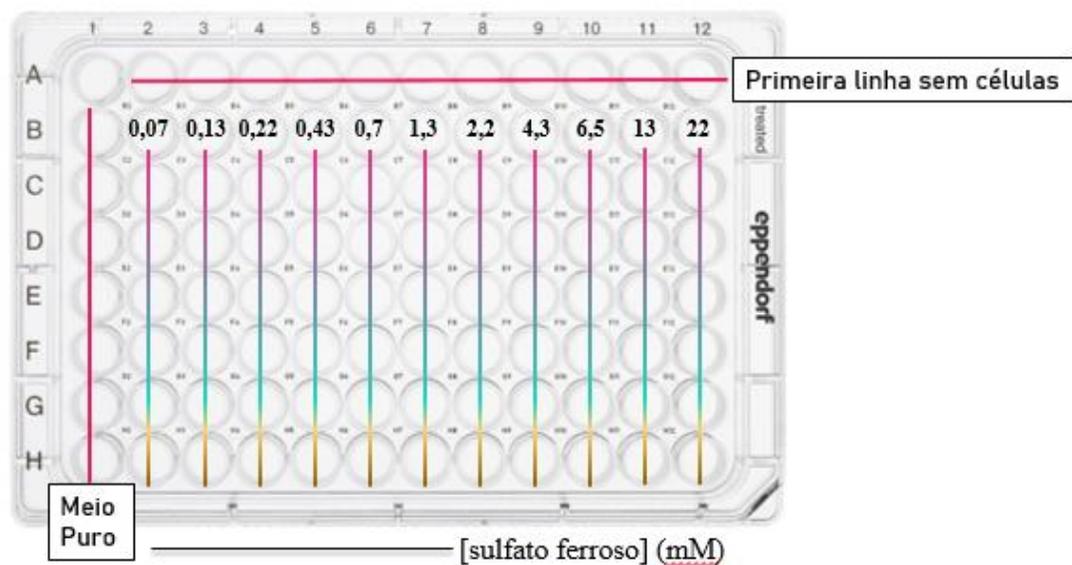


Figura 6 - Esquema representativo da modulação do sulfato ferroso com concentrações finais para cada coluna em desenho da placa de 96 poços.

Fonte: Elaborado pela autora

Para diluição e fracionamento dos grupos experimentais a substância em questão foi pesada de acordo com o experimental e a solução mãe foi filtrada (Millipore 0,22 μm , Merck). Após a administração das diferentes concentrações em cada coluna do grupo experimental as células foram incubadas por 24 h a 37 °C e atmosfera de CO₂ a 5 %. Após o tempo de incubação

de 24 h as células foram encaminhadas à cabine de fluxo laminar para a realização do teste com MTT. A Figura 7 ilustra a ordem sequencial dos procedimentos realizados:

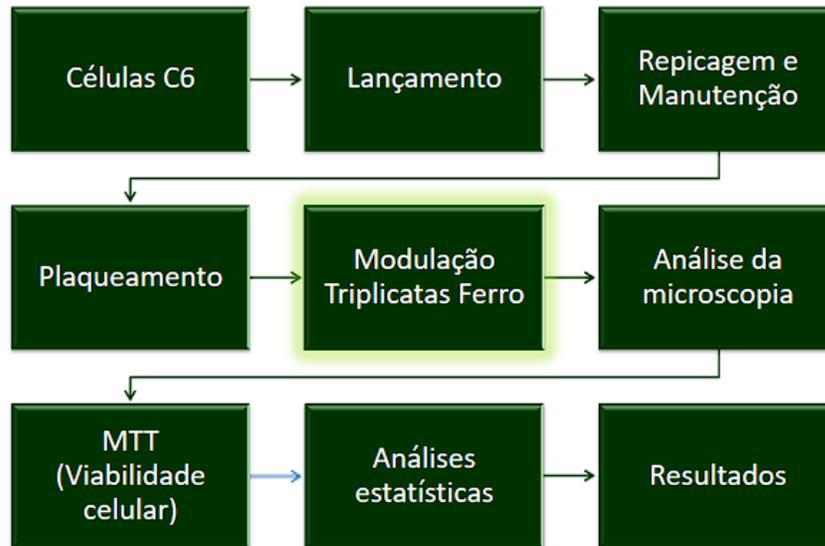


Figura 7 - Esquema representativo das etapas percorridas para obtenção dos resultados dos testes de viabilidade celular da triplicata de C6 com sulfato ferroso.

Fonte: Elaborado pela autora

3.3.2 PRÉ-TRATAMENTO COM RUTINA SEGUIDO DE TRATAMENTO COM SULFATO FERROSO

Os testes preliminares apontaram que concentrações de Rutina poderiam ser feitas a partir de 500 μM ; então, após as células entrarem em confluência, foi feito pré-tratamento com rutina por 24 h variando-se a concentração, seguido de tratamento com sulfato ferroso a 13 mM por mais 24 h, para encontrar a menor concentração da rutina com efeito protetor. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata ($n = 9$) (as concentrações finais de rutina em cada coluna são especificadas na Figura 8). O desenho experimental das placas é explicitado a seguir:

- Coluna 1 controle só com meio – poço 1 vazio, os demais com meio + células;
- Coluna 2 controle para o DMSO (solvente da rutina) – poço 1 sem células, mas com meio + DMSO a 0,5 % (v/v), e os demais com meio + DMSO a 0,5 % e células;
- Coluna 3 controle para o sulfato ferroso a 13 mM – poço 1 sem células e os demais com meio + DMSO a 0,5 % + células + sulfato ferroso a 13 mM por 24 h;

- Colunas 4 a 12 – grupos experimentais poço 1 sem células, mas pré-tratado com rutina por 24 h, seguido de tratamento com sulfato ferroso a 13 mM por mais 24 h; os demais poços receberam meio com DMSO a 0,5 % + células + pré-tratamento com Rutina + tratamento com Sulfato Ferroso.

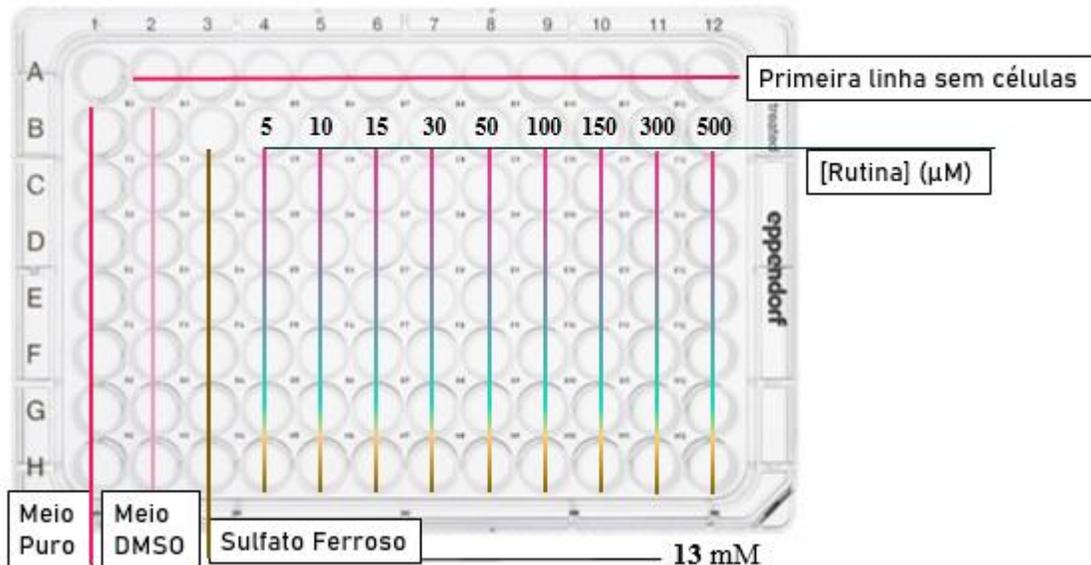


Figura 8 - Esquema representativo da modulação do pré-tratamento de rutina com concentrações finais para cada coluna (24 h) e posterior tratamento com sulfato ferroso na concentração constante a 13 mM (24 h), desenho da placa de 96 poços.

Fonte: Elaborado pela autora

Para diluição e fracionamento dos grupos experimentais a substância em questão foi pesada de acordo com o experimental, homogeneizada e filtrada (Millipore 0,22 μm , Merck). A partir daí o fracionamento ocorreu. Após a administração das diferentes concentrações em cada coluna do grupo experimental as células foram incubadas por 24 h a 37 °C em atmosfera de CO₂ a 5 %. Decorrido o tempo descrito, as células foram encaminhadas à cabine de fluxo laminar para a realização do teste com MTT. A figura 9 ilustra a ordem sequencial dos procedimentos realizados:

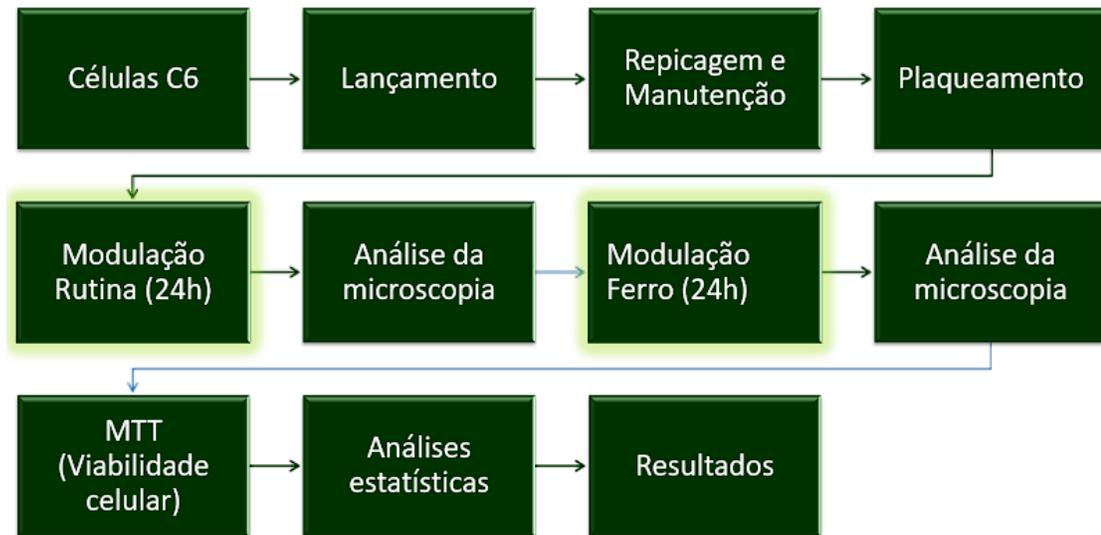


Figura 9: Esquema representativo das etapas percorridas para obtenção dos resultados dos testes de viabilidade celular para verificar proteção da rotina em triplicatas de C6 com sulfato ferroso.

Fonte: Elaborado pela autora.

3.3.3 PRÉ-TRATAMENTO COM RUTINA SEGUIDO DE TRATAMENTO COM SULFATO FERROSO E AA

Realizou-se três experimentos independentes em triplicata ($n = 9$) em que as células foram pré-tratadas com rutina na mínima concentração protetora $5 \mu\text{M}$ por 24 h, quando as células atingiram a confluência, sendo em seguida tratadas com sulfato ferroso a $13,7 \text{ mM}$, variando-se a concentração de AA por mais 24 h. Cada placa de 96 poços consistiu de 12 grupos experimentais dispostos em colunas, cada qual com sete poços experimentais ($n = 7$), conforme discriminados a seguir.

- Coluna 1 Controle apenas com meio – poço 1 vazio sem células, apenas com meio (branco) e os sete demais com meio + células;
- Coluna 2 Controle para o DMSO – poço 1 sem células, apenas com meio + DMSO a 0,5 % e os demais com meio + DMSO a 0,5 % e células;
- Coluna 3 Controle positivo tratado apenas com sulfato ferroso – poço 1 sem células, mas com meio, DMSO a 0,5 % e sulfato ferroso a $13,7 \text{ mM}$. Nos demais poços, células com meio + DMSO a 0,5 % + sulfato ferroso a $13,7 \text{ mM}$.

- Coluna 4 a 12 – grupos experimentais. Os primeiros poços sem células, mas recebendo os mesmos conteúdos dos demais poços de seus respectivos grupos. Os demais poços receberam células que foram pré-tratadas com meio com DMSO a 0,5 % e rutina a 5 μ M por 24 h e em seguida tratadas com sulfato ferroso a 13,7 mM com AA em concentrações que variaram em cada grupo conforme descrito a seguir e evidenciado na figura 10:

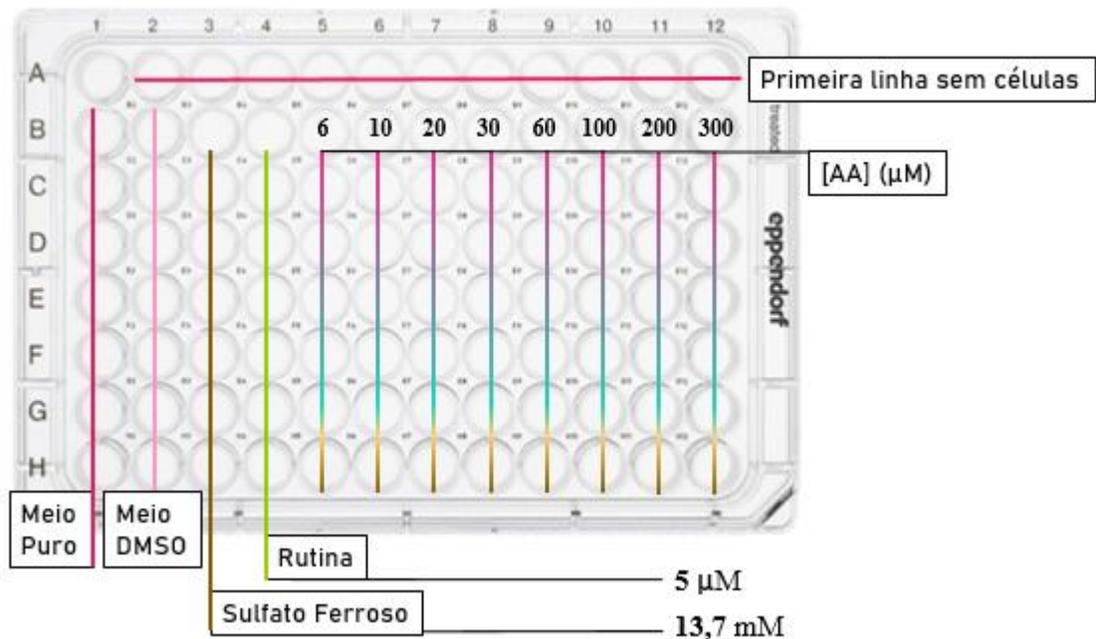


Figura 10 - Esquema representativo da modulação do pré-tratamento de rutina a 5 μ M (24 h) e posterior tratamento com sulfato ferroso em concentrações constantes (13,7 mM) e AA com concentrações finais para cada coluna e desenho da placa de 96 poços.

Fonte: Elaborado pela autora

Para diluição e fracionamento dos grupos experimentais as substâncias em questão foram pesadas de acordo com o experimental, da mesma forma que as triplicatas anteriores, homogeneizadas e filtradas (Millipore 0,22 μ m, Merck).

Após a administração das diferentes concentrações em cada coluna do grupo experimental as células foram incubadas por 24 h a 37 °C e atmosfera de CO₂ a 5 %. Decorrido o tempo de incubação as células foram encaminhadas à cabine de fluxo laminar para a realização do teste com MTT. A figura 11 ilustra a ordem sequencial dos procedimentos realizados:

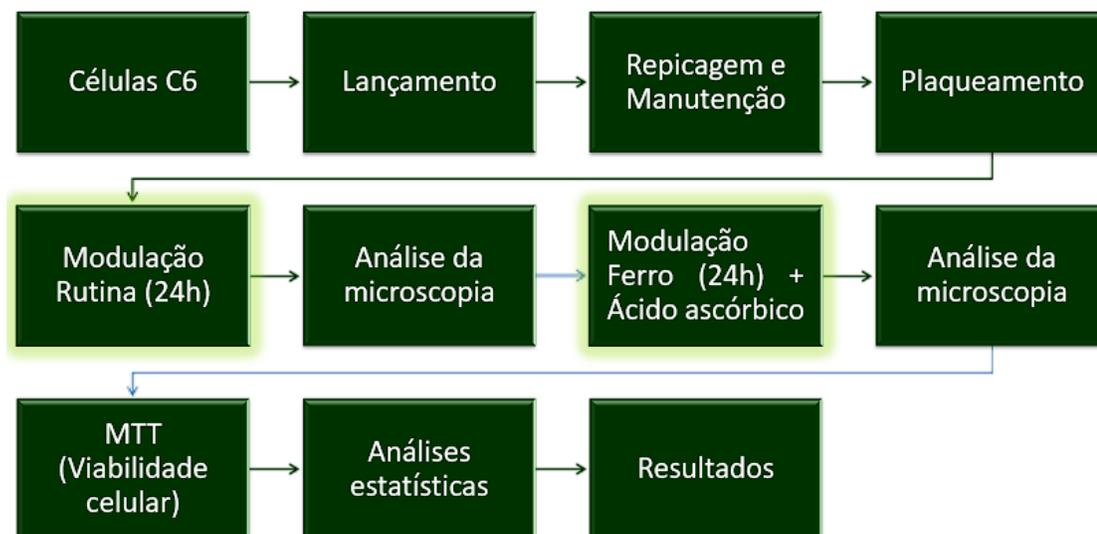


Figura 11- Esquema representativo das etapas percorridas para obtenção dos resultados dos testes de viabilidade celular para verificar proteção da rutina em triplicatas de C6 com sulfato ferroso em interação com AA.

Fonte: Elaborado pela autora

3.4 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR POR MTT

Para averiguar a determinação da viabilidade celular pela formação de cristais de formazan, foi feito o teste de viabilidade celular por MTT, o qual verifica, através de alterações colorimétricas, o nível de atividade das desidrogenases mitocondriais que são diretamente proporcionais à viabilidade celular (pode-se observar a reação de redução do MTT a formazan na Figura 12). O plaqueamento e modulação foram feitas como descritas anteriormente, o processo foi interrompido com a substituição do meio de cultivo por outro contendo MTT (a 1mg/mL no fluxo sem luminosidade). As placas foram incubadas em 5% de CO₂, a 37°C, por duas horas.

Após esse intervalo, foi adicionado 100 µL de solução de lise (para tal, utilizou-se duodecil sulfato de sódio a 200 g/L em dimetilformamida (DMF) a 30% (v/v). O pH da solução foi ajustado para 4,7 com solução ácida (Ácido acético 80% (v/v), HCl 1 M a 2,5% (v/v)). Através da ação das desidrogenases mitocondriais presentes em células viáveis, ocorre redução do MTT que possui coloração amarela, em formazan que é um sal violeta/roxo, de acordo com a capacidade de metabolização das células e a concentração utilizada da substância protetora e do indutor de dano. As placas foram incubadas por um período de 10 – 12 horas em temperatura

ambiente protegidas de luz em papel alumínio para lisar as células e dissolver o formazan precipitado. Para averiguar os resultados, foi realizada a medida da absorbância no comprimento de onda de 580 nm, em leitor de microplacas (Varioskan Flash Thermo Scientific). A figura 13 expõe fotografias de uma triplicata após modulação antes e depois do teste colorimétrico de MTT:

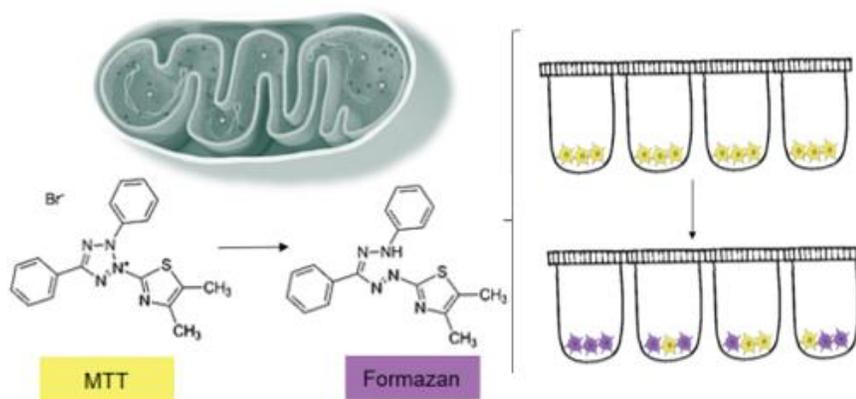


Figura 12 - Reação de redução do MTT a formazan através do nível de atividade das desidrogenases mitocondriais.

Fonte: Elaborado pela autora a partir de imagens disponíveis em <encurtador.com.br/cwLQT> e <encurtador.com.br/prsX8>editadas e adaptadas em uma só imagem. Acesso em 02/10/2021

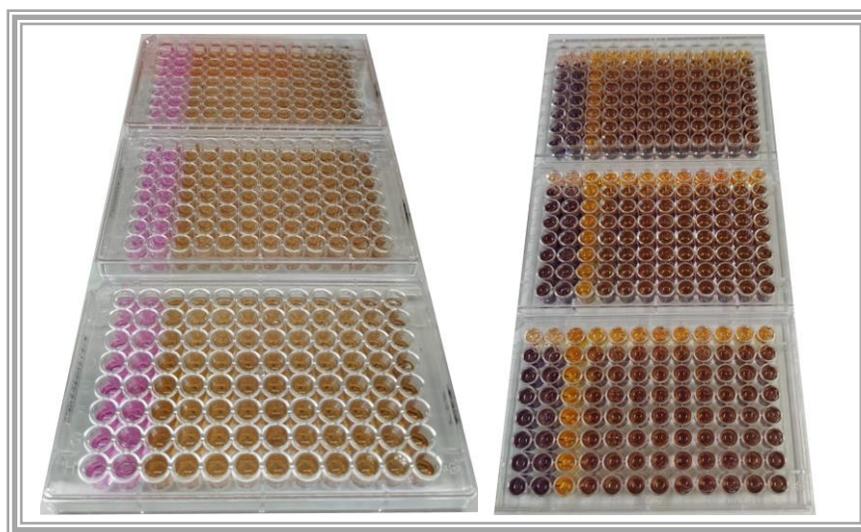


Figura 13 - Fotografias de uma triplicata após modulação antes e depois do teste colorimétrico de MTT. Arquivo pessoal.

Fonte: Elaborado pela autora

3.5 FOTOGRAFIAS EM MICROSCÓPIO DE CONTRASTE DE FASE

As placas foram fotografadas em microscópio TCM 400 Phase Tissue Culture Microscope iVu 5000 em objetiva de 10×, 24 h e 48 h após qualquer modulação. Posteriormente as imagens foram editadas no Adobe Photoshop 2020 para ajuste padrão para coloração em escala de cinza, com brilho adequado em 156 e contraste em 160. Uma fotografia de cada grupo foi selecionada por um observador cego quanto aos tratamentos dos grupos.

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os dados gerados receberam tratamento estatístico adequado, sendo expressos como mediana e percentil. Foi utilizado o programa *GraphPad Prism* versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA) para que os dados obtidos fossem submetidos às análises estatísticas. O “n” de todos os grupos experimentais em cada placa foi “7” e, portanto, as análises foram consideradas não paramétricas.

Os resultados de cada grupo experimental foram expressos por suas medianas, percentis e variações. Testes não paramétricos foram usados para aqueles representados por mediana (com distribuição não-normal). O teste usado para cada análise está especificado na apresentação dos resultados; os mais utilizados foram os não paramétricos de Mann-Whitney para análise binária ou de Kruskal-Wallis (seguido do teste de Dunns) para múltipla comparação.

Os valores de p adotados como estatisticamente significantes estão demonstrados em cada resultado.

4 RESULTADOS

A abordagem experimental adotada consistiu em testes de MTT com diferentes modulações por grupos de placas como foi descrito em material e métodos. O experimento em triplicata evidenciou a capacidade citotóxica do sulfato ferroso em culturas de células C6, a Figura 14 mostra a mediana da mínima concentração citotóxica, que foi 0,7 mM (variação: 0,7-1,3).

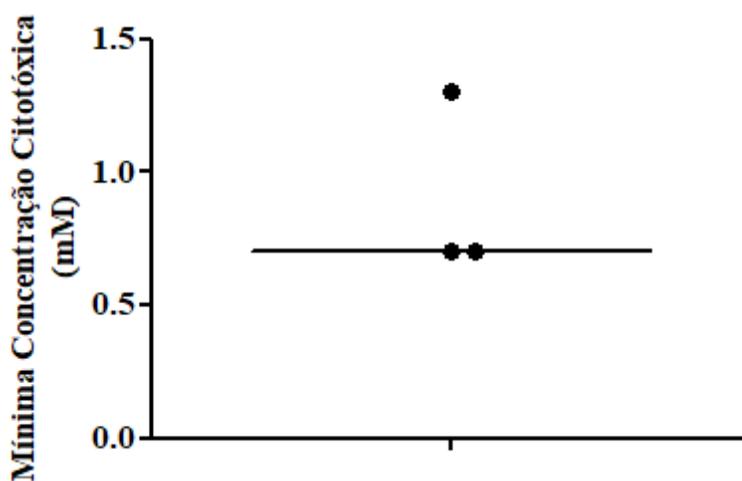


Figura 14 - Determinação da mínima concentração citotóxica do sulfato ferroso em culturas de células C6. O gráfico representa as mínimas concentrações citotóxicas em três experimentos após 24 h de tratamento através de teste de MTT. A mediana encontrada foi de 0,7 mM (variação: 0,7- 1,3).

Fonte: Elaborado pela autora

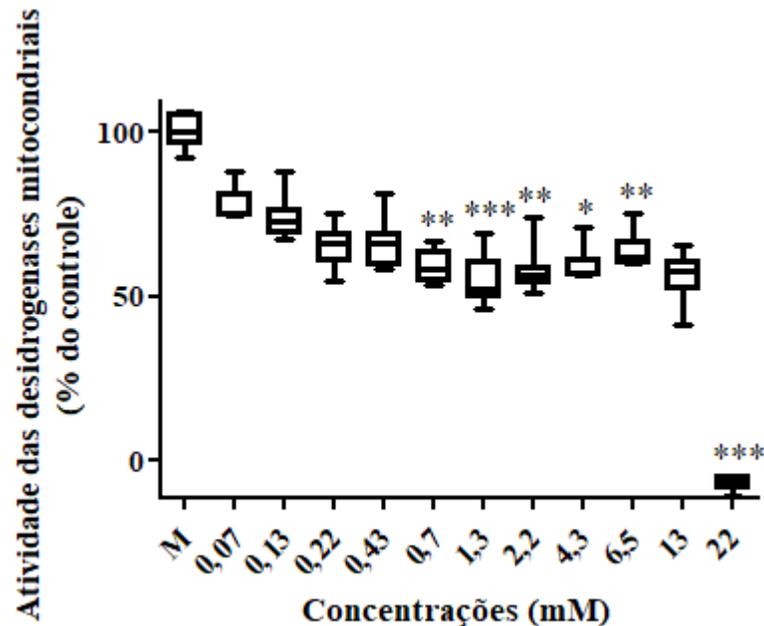


Figura 15 - Teste de citotoxicidade do sulfato ferroso após 24 h de tratamento através de teste de MTT, o gráfico mostra um dos experimentos correspondentes à mediana. Os dados foram normalizados para a mediana das densidades óticas do grupo controle, medidas em 580 nanômetros (1,346; variação 1,2 – 1,426; n = 7). Os dados foram analisados por teste de Kruskal Wallis seguido por pós teste de Dunn (7 poços para cada concentração). *, p < 0,05; **, p < 0,005 ;***, p < 0,0001 em comparação com o controle apenas com meio (M).

Fonte: Elaborado pela autora

A Figura 15 demonstra a atividade das desidrogenases mitocondriais no experimento correspondente à mediana, sendo que no meio, a totalidade das células plaqueadas se mantiveram vivas, porém conforme o tratamento foi sendo feito houve redução da viabilidade celular. A partir de 0,7 mM houve redução significativa em relação ao grupo controle, mostrando que nessa concentração essa substância foi capaz de promover morte celular. Entre três experimentos independentes após 24 h de tratamento foi evidenciado que a partir da mínima concentração citotóxica existiu atividade citotóxica, porém não suficientemente satisfatória para os testes de proteção propostos a seguir. A concentração de 22 mM apresentou citotoxicidade de 100%, então, baseando-se nesses resultados, decidiu-se por utilizar a concentração de 13 mM para os experimentos seguintes, por ser 18 × maior do que a mínima citotóxica.

Para determinar se a rutina apresenta efeito protetor contra a citotoxicidade do sulfato ferroso a 13 mM foram feitos três experimentos independentes em triplicatas (n= 9) com concentrações variáveis de rutina. Uma concentração mínima protetora foi encontrada para cada

experimento. A figura 16 mostra a mediana e a variação dessas concentrações. Como dados não apresentaram distribuição normal, esses valores foram expressos por sua mediana e variação (5 μM ; variação 5 – 50 μM).

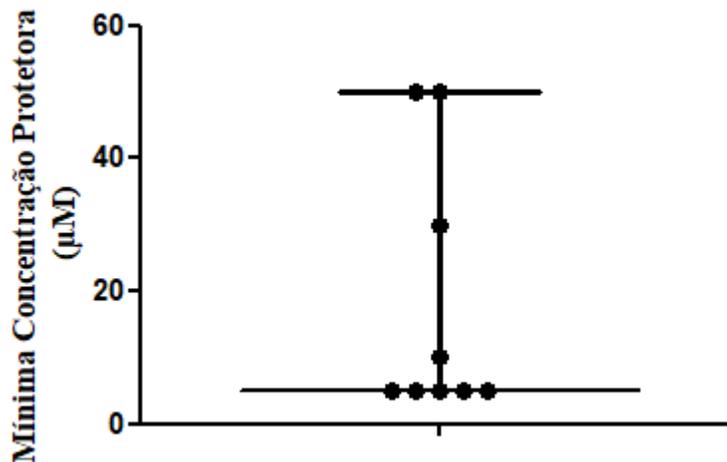


Figura 16 - Concentração protetora da rutina contra a citotoxicidade do sulfato ferroso a 13 mM em células C6. Nove experimentos independentes foram realizados para determinação da menor concentração protetora com pré-tratamento de rutina entre 5 - 500 μM por 24 h seguido por 24 h de tratamento de sulfato ferroso a 13 mM. A mediana foi 5 μM , sua variação entre 5 – 50 μM .

Fonte: Elaborado pela autora

A Figura 17 exibe um experimento representativo da mediana do efeito protetor da rutina em relação a citotoxicidade do sulfato ferroso a 13 mM em células C6. As colunas do gráfico que representam meio e meio com DMSO evidenciam preservação das células plaqueadas, enquanto o controle positivo com sulfato ferroso exibe uma drástica queda de viabilidade celular, confirmando dano oxidativo já esperado. A partir da menor concentração do flavonoide rutina (5 μM) já é possível observar uma proteção parcial, porém significativa, das células.

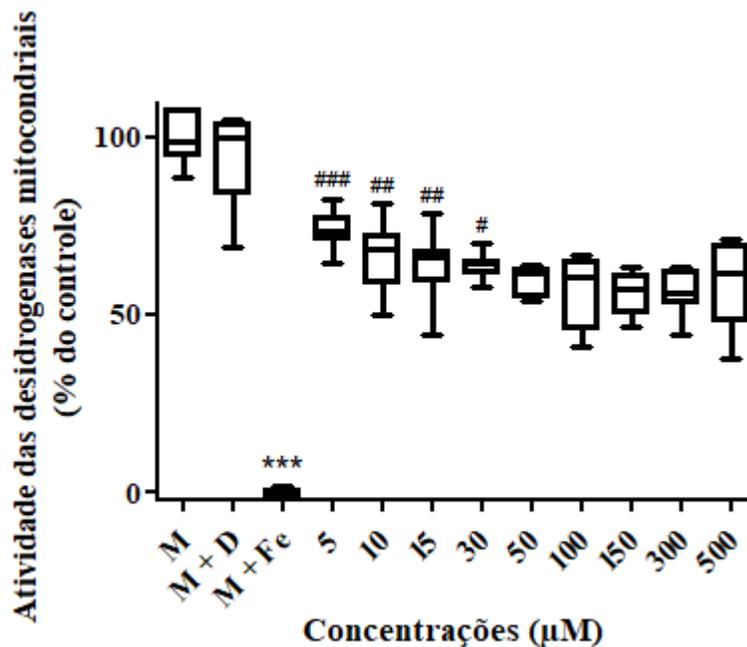


Figura 17 - Teste de análise da proteção de células pela rutina através de teste de MTT, após 24 h de pré-tratamento com rutina seguido de 24 h de indução de danos com sulfato ferroso a 13 mM. Os dados foram normalizados para mediana das densidades óticas do grupo controle com solvente da rutina (DMSO) medidas em 580 nanômetros ($n = 7$ poços para todos os grupos). Mediana da densidade ótica do controle: 1,087 (variação 0,497 – 1,142). ***, $p < 0,001$ comparado com controle negativo de meio com DMSO comparado por teste de Mann Whitney; Os grupos tratados com sulfato ferroso e rutina foram analisados por teste de Kruskal Wallis ($p < 0,001$), seguido do pós teste de Dunn (###, $p < 0,001$; ##, $p < 0,01$; #, $p < 0,05$, comparando com controle positivo tratado com sulfato ferroso. M = grupo controle negativo tratado apenas com meio, M + D = grupo controle negativo tratado com meio e DMSO a 0,5%, M + Fe = grupo controle positivo tratado com meio, DMSO e sulfato ferroso. **Fonte:** Elaborado pela autora

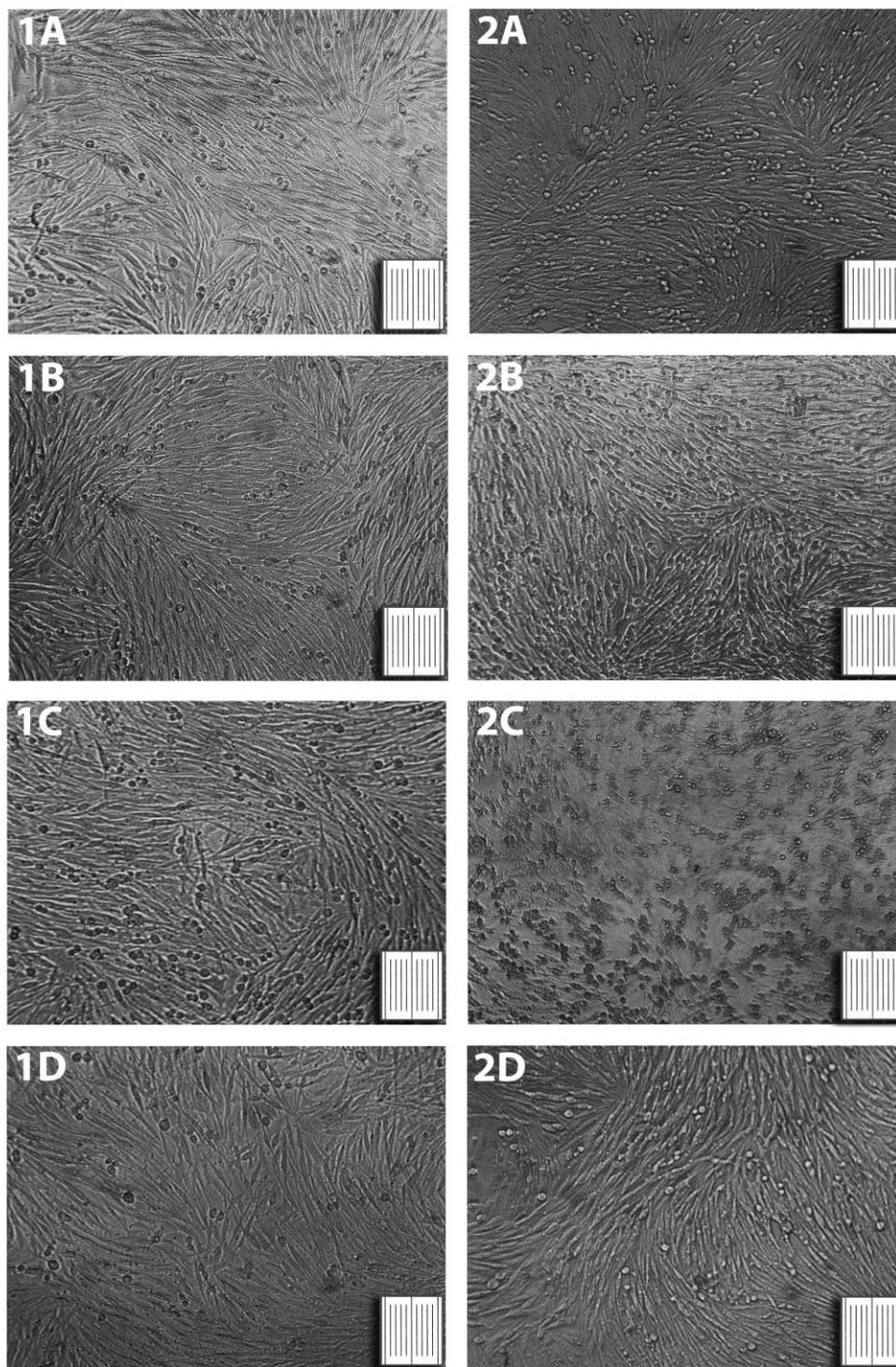


Figura 18 - Imagens obtidas por fotografias de microscopia de contraste de fase de células C6 na presença de dano oxidativo induzido por sulfato ferroso com pré-tratamento de rutina em objetiva de 10 \times . A régua mede 100 μ m. 1A Células com meio após 24 h, 2A Células com meio após 48 h. 1B Células em meio com DMSO a 0,5% (v:v) após 24 h, 2B Células em meio com DMSO após 48 h. 1C Células C6 apenas com meio e DMSO após 24h, 2C Células em meio já com sulfato ferroso na concentração de 13 mM após

tratamento de 24 h. **1D** Células após pré-tratamento com rutina a 5 μ M por 24 h, **2D** Células pré-tratadas com rutina seguidas de tratamento com sulfato ferroso na concentração de 13 mM por 24 h. A imagem evidencia as células aparentemente preservadas do dano ocasionado pelo sulfato ferroso.

Fonte: Elaborado pela autora

A Figura 18 demonstra morfologicamente células C6 na presença de dano oxidativo induzido por sulfato ferroso com pré-tratamento de rutina. O Controle com meio (**1A** em 24 h e **2A** em 48 h) apresentou tapete celular íntegro, confluyente, com comunicação entre células. Nestas imagens as células se mantiveram predominantemente fusiformes, principal característica desta linhagem; características também apresentadas no controle negativo de meio com DMSO (que pode ser observado em **1B** a 24 h e **2B** em 48 h), o que demonstra que a adição com o DMSO (veículo de diluição), não apresentou grandes alterações na morfologia celular.

O grupo controle positivo com ferro só foi modulado após 24 h de tratamento dos outros grupos experimentais com a rutina, então a foto **1C** representa apenas células em meio no qual será inserido o sulfato ferroso, que não apresentou grandes alterações em comparação ao grupo controle. Em **2C** foi possível observar o aumento do número de células que apresentam morfologia ameboide e esférica quando comparados com os grupos controle negativo e controle. Podemos inferir que a adição do sulfato ferroso causou essas alterações.

Os grupos com pré-tratamento de rutina (24 h) e posterior modulação sulfato ferroso (24h) (**1D** em 24 h e **2D** em 48 h) apresentaram características morfológicas semelhante aos controles, pois o tapete celular se mostra confluyente e íntegro tanto nas primeiras 24 h quanto nas 48 h de modulação, com células de morfologia predominantemente fusiformes, assim podemos deduzir que o pré-tratamento de rutina foi capaz de prevenir as alterações morfológicas provocadas pelo sulfato ferroso. Embora a morfologia demonstre plena proteção das células, os testes de citotoxicidade através de atividade das desidrogenases mitocondriais demonstraram proteção parcial, porém significativa.

Foi utilizada a concentração de 13,7 mM de sulfato ferroso para as triplicatas de pré-tratamento da rutina com posterior tratamento com sulfato ferroso e AA em concentrações variáveis para manutenção da mesma concentração do controle positivo de dano. Em nove experimentos independentes o ácido ascórbico não alterou a resposta protetora da rutina, o que é demonstrado na figura 19. Pode-se observar que houve preservação das células nos controles de meio e meio com DMSO e novamente há uma drástica redução de viabilidade celular no controle positivo tratado com sulfato ferroso, assim como uma proteção parcial de todos os experimentais

pré- tratados com a mínima concentração da rutina. Os experimentais tratados com AA não sofreram alterações estatisticamente significantes.

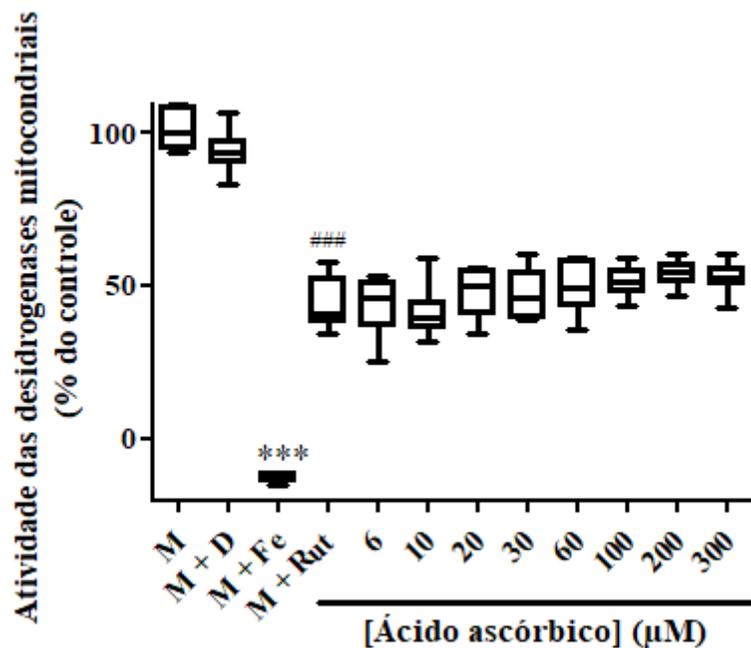


Figura 19 - Experimento representativo entre nove realizados em que as células C6 foram pré-tratadas com rutina a 5 µM seguidas de 24 h de dano com sulfato ferroso a 13,7 mM moduladas juntamente com concentrações de AA entre 6 -300 µM. ***, $p < 0,001$ em comparação com o grupo tratado apenas com meio com DMSO. Análise feita por teste de Mann Whitney. ###, $p < 0,001$ em relação ao controle positivo tratado com sulfato ferroso através de teste de Mann Whitney, reforçando os dados encontrados anteriormente. Kruskal Wallis não mostrou diferença significativa do AA, sendo assim a substância não modificou o efeito da rutina.

Fonte: Elaborado pela autora

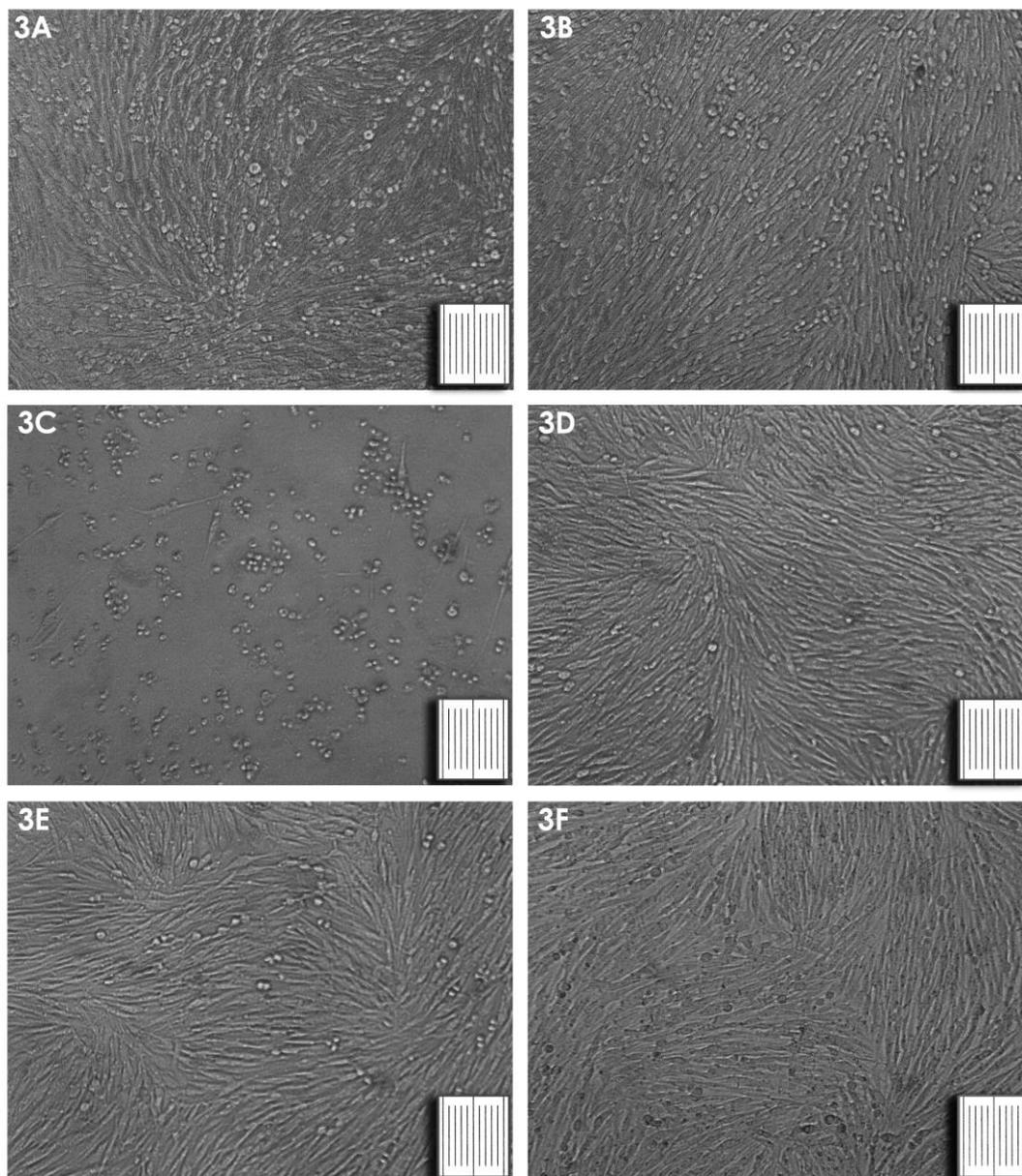


Figura 20 - Imagens obtidas por fotografias de microscopia de contraste de fase em objetiva de 10 \times nos experimentos de pré-tratamento com rutina a 5 μ M por 24 h, seguido de tratamento com sulfato ferroso a 13 mM e AA por 24 h. A régua mede 100 μ m. **3A** Células com meio, **3B** Células em meio com DMSO a 0,5% (v/v), **3C** Células após tratamento com sulfato ferroso a 13 mM por 24 h, **3D** Células após pré-tratamento com rutina a 5 μ M por 24 h, seguido de tratamento com sulfato ferroso a 13 mM por 24 h; **3E** Células após pré-tratamento com rutina a 5 μ M por 24 h seguido de tratamento com sulfato ferroso a 13,7 mM + AA a 6 μ M por 24 h **3F** Células após pré-tratamento de rutina em 5 μ M por 24 h seguido de tratamento com sulfato ferroso a 13,7 mM + AA a 300 μ M por 24 h, evidenciando que o AA não interfere no efeito protetor da rutina.

Fonte: Elaborado pela autora

A figura 20 retrata morfológicamente as células C6 na presença de dano induzido por sulfato ferroso e interação de ácido ascórbico com pré-tratamento de rutina, na qual, **3A** é o controle (meio) que apresentou tapete celular íntegro, confluyente e com células de morfologia fusiforme, assim como no grupo **3B** (meio com DMSO). Em contrapartida o grupo controle positivo modulado com sulfato ferroso (**3C**) apresentou desorganização e desestruturação do tapete celular, com pouca comunicação célula a célula e redução visível do número de células, que por sua vez apresentaram alteração da morfologia cuja forma predominante foi a forma esférica e ameboide.

O grupo com pré-tratamento de rutina (24 h) e posterior modulação com sulfato ferroso (**3D**) apresentou tapete celular íntegro, confluyente e a predominância da morfologia fusiforme assim como nos grupos controles, o que sugere que a rutina apresenta a capacidade de prevenir o dano celular ocasionado pelo sulfato ferroso; os grupos com pré-tratamento de rutina (24 h) e subsequente modulação com ferro e ácido ascórbico (24 h) (**3E e 3F**) assim como o observado no grupo pré-tratamento da rutina com sulfato ferroso, apresentaram características semelhantes, o que nos leva a supor que o pré-tratamento da rutina teve grande influência na proteção frente ao dano causado pelo sulfato ferroso, mas não é possível identificar através das imagens se o AA trouxe alterações significativas. **3E** demonstra pré-tratamento de rutina e tratamento com sulfato ferroso e AA na menor concentração utilizada e **3F** exhibe células com pré-tratamento de rutina e tratamento com sulfato ferroso e AA na maior concentração, evidenciando que não houve alteração de proteção ou dano apesar das concentrações diferentes.

5 DISCUSSÃO

O desequilíbrio entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes com a potencialidade de exercer efeitos deletérios caracteriza estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999), sendo muitas das EROs resultantes desse processo, originadas através de reações como a de Fenton e de Haber-Weiss, mediadas por íons metálicos. O acúmulo de ferro no cérebro tem sido relacionado com doenças neurodegenerativas por influenciar na produção de EROs por diferentes vias (EMERIT; BEAUMONT; TRIVIN, 2001; GURZAU; NEAGU; GURZAU, 2003). Portanto, escolheu-se sulfato ferroso como indutor de dano oxidativo através da peroxidação lipídica.

A concentração escolhida para o controle positivo de dano foi 18× maior do que a mínima citotóxica em triplicata feita com sulfato ferroso, sendo estabelecida a concentração de 13 mM para os testes de proteção.

Esses resultados vêm em concordância ao previsto na literatura em outros trabalhos que relatam a capacidade do ferro em potencializar reações de oxidação. No artigo de KIM *et al.*, (2007) a holotransferrina, por transportar ferro, aumentou a radiosensibilidade induzida pela diidroartemisina em células U373MG, outro tipo de glioblastoma; no qual, as células foram pré-tratadas com 100 mg / ml de holotransferrina por 1 h antes da administração de diidroartemisina e irradiação e mostraram sobrevida clonogênica significativamente reduzida, em comparação com células tratadas com diidroartemisina, o que sugere que o ferro potencializou significativamente o efeito de radiosensibilização da diidroartemisina em células de glioma humano, assim como o dano oxidativo aqui demonstrado no presente estudo.

O teste escolhido para as análises se baseia na capacidade de conversão das desidrogenases mitocondriais em cristais de formazan insolúveis, de coloração roxa. A quantificação destes cristais foi aferida através de espectrofotometria e o teste pode ser utilizado para avaliação de viabilidade e proliferação celular (HANSEN; NIELSEN; BERG, 1989). Foi possível demonstrar através de testes de viabilidade MTT, que o pré-tratamento de 24 h com a rutina em células C6 apresentou uma proteção significativa desde a menor concentração (5 µM) frente ao dano oxidativo induzido por sulfato ferroso.

Flavonoides são conhecidos como exímios antioxidantes. O presente trabalho consiste em um estudo preliminar original desenvolvido em culturas de células C6 no qual a Rutina foi avaliada quanto à sua capacidade antioxidante. Evidências indicam que o estresse oxidativo

desempenha papel decisivo no envelhecimento e nas doenças neurodegenerativas. No modelo de pesquisa descrito foram confirmados efeitos deletérios do acúmulo de sulfato ferroso em sistema *in vitro*; e também foi possível constatar a interferência positiva da rutina como antioxidante.

Após às 48 h (duas modulações com intervalo de 24 h cada) houve grande diferença na quantidade e morfologia das células com os diferentes tratamentos. A rutina protegeu consideravelmente as células o que pode ser observado na morfologia, porém os testes de MTT logo mostraram que o efeito protetor foi parcial, apesar de significativo.

As substâncias antioxidantes atuam em diferentes níveis na proteção do organismo. Um dos principais mecanismos de defesa contra os radicais livres dos antioxidantes é ao impedir a sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro. Os antioxidantes podem interceptar os radicais livres prevenindo agressão aos lipídeos, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases do DNA, impedindo a formação de lesões e a perda da integridade celular (ABRAHÃO *et al.*, 2010).

São muitos e diversos os efeitos benéficos que a literatura descreve acerca dos flavonoides em relação à saúde, haja vista que esses compostos apresentam potencial para uso no tratamento ou prevenção de distúrbios neurodegenerativos, já que têm a capacidade de inibir a peroxidação lipídica e eliminar os radicais livres, protegendo assim os neurônios do dano oxidativo (HALLIWELL *et al.*, 1995).

Os flavonoides têm capacidade de atuarem na captura e neutralização de espécies oxidantes, por sinergismo com outros antioxidantes como as vitaminas C e E, sendo que existe uma habilidade de alguns flavonoides para se ligar a íons metálicos, impedindo-os de atuarem como catalisadores na produção de radicais livres. Esta característica resulta de propriedades como atividade quelante de ferro, inibição das enzimas cicloxigenase, lipoxigenase, atividade sequestradora de radicais livres, NADPH-oxidase, xantina-oxidase e fosfolipase, e estimulação de enzimas com atividade antioxidante como a catalase e a superóxido-dismutase, interferindo na formação e propagação de radicais livres (TRUEBA; SANCHEZ, 2001). Uma possível explicação para a inclinação ao se ligar a metais, como por exemplo o ferro, pode estar associada com o número de grupos hidroxila no anel B (HUSAIN; CILLARD; CILLARD, 1987). Essa característica pode afetar várias propriedades dos flavonoides, dentre estas, a hidrofobicidade das moléculas e atividade antioxidante (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001).

No cérebro, a principal função dos flavonoides deve-se a sua atividade antioxidante, pois como já foi dito, trata-se de um órgão extremamente susceptível ao dano oxidativo (por conta da alta utilização de oxigênio, altos níveis de lipídio não saturados e dos metais de transição, como ferro). Além disso, possui mecanismos deficientes de defesa antioxidante (REITER, 1995). Dessa forma, flavonoides (a exemplo da rutina), são capazes de eliminar radicais livres e/ou inibir a peroxidação lipídica, protegendo os neurônios da morte celular (YANG; GUO; YUAN, 2008).

Em nossos resultados das placas de MTT com rutina e sulfato ferroso, a rutina diminuiu a citotoxicidade celular ocasionada pelo sulfato ferroso. Indicativos de proteção celular em flavonoides foram também observados por SHI *et al.*, (2010), no qual a *Artemisia selengensis* (espécie rica em flavonoides), apresentou alta capacidade antioxidante redutora de ferro através de ensaios FRAP (Ensaio de poder antioxidante redutor férrico). Outros resultados através de DPPH (ensaio de eliminação radical) e ABTS (ensaio de cátion radical) demonstraram que os extratos possuem não apenas atividades antioxidantes, mas também uma potente capacidade de eliminação de radicais livres. Outros estudos legitimam a intensa atividade antioxidante de flavonoides contra lipoperoxidação induzida por ferro (REBELLO, 2005).

Mais um artigo (ARORA *et al.*, 2005) demonstrou que o extrato alcoólico do rizoma de *Rhodiola imbricata* (uma planta nativa das regiões mais altas do Himalaya), é rico em quercetina (aglicona da rutina) e ao ser avaliada, diminuiu a peroxidação lipídica do ácido linoleico. Entre quatro diferentes concentrações testadas, observou-se que doses mais baixas (8 e 80 µg / mL) tendem a inibir significativamente a oxidação lipídica, e exibiram citoproteção com maior probabilidade de significância, com máxima nas primeiras 24 h. Houve proteção assim como nesse estudo aqui realizado com rutina, porém diferenças devem ser evidenciadas haja vista que a proteção exibida foi parcial.

Outros estudos de neurotoxicidade feitos através de técnica de MTT encontrados na literatura, que também utilizaram rutina, demonstram que concentrações de até 100 µM não induziram citotoxicidade em culturas primárias corticais de astrócitos, culturas mistas de células gliais e células SHSY-5Y, após 24 h de tratamento (SILVA *et al.*, 2008; PARK *et al.*, 2014).

Diante disso, outro estudo (PITANGA, 2013) demonstrou que a viabilidade celular com ação da rutina foi igualmente determinada pelo teste do MTT em culturas primárias de microglia, em culturas de células de glioblastoma C6 submetidas ao meio condicionado (MC) de culturas de microglia tratadas indiretamente e durante a interação direta entre microglia/glioma em sistema

de co-cultivo e não houve alteração significativa no metabolismo mitocondrial das células da microglia após a exposição à rutina (50 e 100 μM). Foi verificado até aumento significativo na viabilidade das células C6 após 48 h de cultivo na presença de MC proveniente de culturas de microglia tratadas previamente com rutina a 50 μM .

A proteção da rutina se manteve nas triplicatas que se sucederam, mas a diferença da modulação com sulfato ferroso e ácido ascórbico não manifestou grandes alterações, então não é possível inferir que o ácido ascórbico tenha tido influência no aumento do dano oxidativo através de reação de Fenton ou interação intracelular com as células que já haviam sido tratadas com a rutina.

As concentrações de ácido ascórbico variaram entre 6 μM e 300 μM e ainda assim nenhum efeito foi demonstrado. Em consonância com os resultados de um artigo (GRANGEIRO, 2009), utilizando a técnica de MTT, o AA não apresentou toxicidade para células GL-15 nas concentrações testadas variando de 20 μM a 3000 μM , muita informação permanece inexplorada para que possamos afirmar que o AA atue com uma função adjuvante.

Utilizando a mesma técnica com células endoteliais (NÈGRE-SALVAYRE, 1995) um estudo confirmou que ácido ascórbico e a rutina exibiram um potente efeito protetor contra o efeito citotóxico exibido pelo sulfato ferroso, mas não protegeram completamente as células por causa de um efeito bifásico observado em altas concentrações (maiores que 1 e 10 $\mu\text{mol} / \text{L}$ para ácido ascórbico e rutina, respectivamente), sendo que a rutina exibiu um efeito citotóxico a 100 $\mu\text{mol/L}$, o que não ocorreu no presente trabalho em células C6.

Os achados indicam que a rutina pode se revelar potencial como agente terapêutico para desenvolvimento de novos estudos para esclarecimento de mecanismos de doenças neurodegenerativas, considerando a importância dos efeitos antioxidantes na prevenção e tratamento de diversos distúrbios originados pelo estresse oxidativo. São limitações deste trabalho a restrição a uma única técnica e um único tipo celular, mesmo tendo sido feito em três triplicatas independentes em cada etapa. Portanto, mais estudos são necessários para que novas informações e mecanismos de proteção induzida por rutina sejam elucidados contra danos causados por radicais livres, principalmente em outros tipos de culturas celulares de astrócitos e glia ou até mesmo em modelos *in vivo*.

É provável que um maior fornecimento de flavonoides em dieta ou suplementação contribuam para modular os processos oxidativos diários e para recuperar o equilíbrio redox ou

retardar o início do estresse oxidativo nas fases iniciais dos processos neurodegenerativos (DAJAS *et al*, 2005) mas afirmar isso a partir de um trabalho como este é uma especulação pois há muita pesquisa a ser conduzida em vários domínios (da toxicidade à biodisponibilidade, do experimental à clínica, tais pesquisas deverão avaliar com maior rigor, pois mais técnicas devem ser desenvolvidas) para o estudo de flavonoides como antioxidantes e neuroprotetores.

Os dados na literatura sobre o potencial pró-oxidante do ácido ascórbico na presença de ferro são controversos. Quando o ácido ascórbico é usado como antioxidante, a função dele é ser oxidado. Deste modo, na presença de níveis elevados de EROs, não permanece ácido ascórbico suficiente disponível para modular o metabolismo neuronal. Portanto, o estresse oxidativo, a produção elevada de RL e EROs e a falha dos sistemas homeostáticos para a reciclagem do ácido ascórbico são aspectos fundamentais na progressão da neurodegeneração (COVARRUBIAS-PINTO *et al*, 2015).

A pré-incubação com quercetina e vitamina C protegeu a toxicidade induzida por H₂O₂ em células PC12 de uma maneira dependente da dose (HEO; LEE, 2004). Neste mesmo artigo, eles compararam o efeito do flavonoide quercetina em relação ao efeito do AA, mostrando que a primeira substância demonstrou muito mais proteção do cérebro contra o estresse oxidativo induzido por neurotoxicidade, em relação à segunda.

O AA é rapidamente oxidado em soluções e quando em contato com o ar. As doenças neurodegenerativas que apresentam alto estresse oxidativo consomem invariavelmente o ácido ascórbico disponível no cérebro (COVARRUBIAS-PINTO *et al*, 2015). Algo que também poderia ter acontecido (mas não foi confirmado em nossos testes) seria que o ferro iniciasse a peroxidação lipídica através da reação de Fenton, enquanto o AA amplificasse o potencial oxidativo do ferro, potencializando a peroxidação lipídica induzida por íons metálicos (BERNOTTI *et al*, 2003).

Nos experimentos neste trabalho realizados e descritos não houve alteração de proteção ou dano apesar das concentrações diferentes de AA. Só é possível afirmar que não houve interferência no efeito protetor da rutina, todavia, é possível que a dose utilizada tenha sido muito baixa ou o tempo de tratamento muito curto para produzir mudanças significantes. Portanto, é importante continuar os esforços para avaliar os papéis da rutina e do ácido ascórbico como antioxidantes contra o dano oxidativo.

6 CONCLUSÃO

Considerando o conjunto de resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

A mínima concentração citotóxica do sulfato ferroso para células C6 foi 0,7 mM (variação: 0,7- 1,3 mM) após 24 h.

Verificamos que a rutina exibiu um efeito protetor parcial, mas significativo em testes de viabilidade celular. Nossos resultados de citotoxicidade realizados pelo método de MTT revelaram que este flavonoide não apresentou um perfil citotóxico em modelos de cultura de células C6 nas concentrações utilizadas.

A mínima concentração protetora da rutina, equivalente a 5 μ M, foi capaz de prevenir uma porcentagem significativa de morte celular induzida pelo sulfato ferroso a 13 mM após 24 h.

No que tange à interação do ácido ascórbico em concentrações pré-determinadas com a rutina, não foi possível verificar se aumenta uma possível capacidade antioxidante desta droga ou se existe uma associação do AA com o sulfato ferroso, potencializando o dano oxidativo. Pode-se afirmar que o AA não interferiu no efeito protetor da rutina.

Em relação à caracterização da morfologia das células C6 na presença de dano oxidativo induzido por sulfato, foi perceptível uma morfologia atípica arredondada no controle positivo de dano, perfil diferente do fenótipo natural destas células, que foi prevenida com o pré-tratamento.

Tendo em vista os resultados discutidos nas seções anteriores, é possível afirmar que o flavonoide rutina tem ação citoprotetora frente ao dano oxidativo oriundo do sulfato ferroso, em culturas de células C6, todavia, o AA não apresentou interferência nessa proteção.

REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, S. A. *et al.* Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e agrotecnologia**, v. 34, p. 414-420, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1413-70542010000200020>>.

AGUS, D. B. *et al.* Vitamin C crosses the blood-brain barrier in the oxidized form through the glucose transporters. **The journal of clinical investigation**, v. 100, n. 11, p. 2842-2848, 1997. Disponível em: <10.1172/JCI119832>

AKHONDZADEH, S. Herbal medicines in the treatment of psychiatric and neurological disorders. In: **Low-cost approaches to promote physical and mental health**. Springer, New York, NY, 2007. p. 119-138. Disponível em: <10.1002/ptr.2187>

ALCAÍN, F. J.; BURÓN, M. Isabel. Ascorbate on cell growth and differentiation. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 26, n. 4, p. 393-398, 1994.

ANDERSEN, J. K. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?. **Nature medicine**, v. 10, n. 7, p. S18-S25, 2004. Disponível em: <10.1038/nrn1434>

ARABBI, P. R.; GENOVESE, Maria Inés; LAJOLO, Franco M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1124-1131, 2004. Disponível em: <10.1021/jf0499525.>

ARORA, R. *et al.* Evaluation of radioprotective activities of *Rhodiola imbricata* Edgew—A high altitude plant. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 273, n. 1, p. 209-223, 2005.

ARRIGONI, O.; DE TULLIO, M. C. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. **Biochimica et biophysica acta (BBA)-General subjects**, v. 1569, n. 1-3, p. 1-9, 2002. Disponível em: <10.1016/s0304-4165(01)00235-5.>

AUST, S. D.; MILLER, D. M. Role of iron in oxygen radical generation and reactions. In: **New horizons in molecular toxicology: a symposium**. Lilly research laboratories symposium/molecular toxicology. 1991. p. 29-34.

AVERSI-FERREIRA, T. A.; RODRIGUES, H. G.; PAIVA, L. R. Efeitos do envelhecimento sobre o encéfalo. **Revista brasileira de ciências do envelhecimento humano**, v. 5, n. 2, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.5335/rbceh.2012.128>>

BALLAZ, S. J.; REBEC, G. V. Neurobiology of vitamin C: Expanding the focus from antioxidant to endogenous neuromodulator. **Pharmacological research**, v. 146, p. 104321, 2019. Disponível em: <10.1016/j.phrs.2019.104321>

BARBER, A.A., BERNHEIM, F. Lipid peroxidation: Its measurement, occurrence and significance in animal tissues. **Adv. Gerontol. Res.**, v.2, p.355-403, 1967.

BARBOSA, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010. Disponível em: <10.1590/S1415-52732010000400013>

BECHO, J. R. M.; MACHADO, H.; DE OLIVEIRA GUERRA, M. Rutina—estrutura, metabolismo e potencial farmacológico. **Revista interdisciplinar de estudos experimentais-animais e humanos (Interdisciplinary journal of experimental studies)**, v. 1, n. 1, 2009.

BENDA, P. *et al.* Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. **Science**, v. 161, n. 3839, p. 370-371, 1968. Disponível em: <10.1126/science.161.3839.370>

BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **Int.j. Food sci. Nut**, v.47, p.233-261, 1996.

BERNOTTI, S. *et al.* Inflammatory reaction without endogenous antioxidant response in Caco-2 cells exposed to iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. **American journal of physiology-gastrointestinal and liver physiology**, v. 285, p. G898-G906, 2003. Disponível em: <10.1152/ajpgi.00042.2003>

BISSELL, M. G. *et al.* Characteristics of the rat C-6 glioma maintained in organ culture systems. Production of glial fibrillary acidic protein in the absence of gliofibrillogenesis. **Brain research**, v. 82, n. 1, p. 77-89, 1974. Disponível em: <doi: 10.1016/0006-8993(74)90894-4>

BLAYLOCK, R. L. Neurodegeneration and aging of the central nervous system: Prevention and treatment by phytochemicals and metabolic nutrients. **Integrative medicine**, v. 1, n. 3, p. 117-133, 1998. Disponível em: <10.1038/nature20411>

BUSH, A. I.; CURTAIN, C. C. Twenty years of metallo-neurobiology: where to now?. **European biophysics journal**, v. 37, n. 3, p. 241-245, 2008. Disponível em: <10.1007/s00249-007-0228-1.>

CAO, W. *et al.* Oxygen free radical involvement in ischemia and reperfusion injury to brain. **Neuroscience letters**, v. 88, n. 2, p. 233-238, 1988. Disponível em: < 10.1016/0304-3940(88)90132-2.>

CATANI, M. V. *et al.* Ascorbate up-regulates MLH1 (Mut L homologue-1) and p73: implications for the cellular response to DNA damage. **Biochemical journal**, v. 364, n. 2, p. 441-447, 2002. Disponível em: <10.1042/BJ20011713>

CAZAROLLI, L. H. *et al.* Flavonoids: prospective drug candidates. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 8, n. 13, p. 1429-1440, 2008. Disponível em: <10.2174/138955708786369564.>

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological reviews**, v. 59, n. 3, p. 527-605, 1979. Disponível em: <0.1152/physrev.1979.59.3.527>

CHANGE, B., SIES, H., BOVERIS, A. Hydroperoxidemetabolism in mammalian organs. **Physiol. Rev.**, v.59, n.3, p. 527-605, 1979

CHATTERJEE, I. B. et al. Biological synthesis of L-ascorbic acid in animal tissues: conversion of L-gulonolactone into L-ascorbic acid. **Biochemical journal**, v. 74, n. 1, p. 193, 1960 Disponível em: <10.1042/bj0740193.>

CHOI, W. et al. Vitamins C and E: acute interactive effects on biomarkers of antioxidant defence and oxidative stress. **Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis**, v. 551, n. 1-2, p. 109-117, 2004. Disponível em: <10.1016/j.mrfmmm.2004.03.006.>

COLLIS, C. S. *et al.* Effects of co-supplementation of iron with ascorbic acid on antioxidant—Pro-oxidant balance in the guinea pig. **Free radical research**, v. 27, n. 1, p. 113-121, 1997.

COLLIS, C. S. *et al.* The effects of ascorbic acid and iron co-supplementation on the proliferation of 3T3 fibroblasts. **Free radical research**, v. 25, n. 1, p. 87-93, 1996.

COVARRUBIAS-PINTO, A. et al. Beyond the redox imbalance: oxidative stress contributes to an impaired GLUT3 modulation in Huntington's disease. **Free radical biology and medicine**, v. 89, p. 1085-1096, 2015.

CUTLER, R. G.; RODRIGUEZ, H. **Critical reviews of oxidative stress and aging: advances in basic science, diagnostics and intervention.** World scientific, 2003.

DAJAS, F. *et al.* Flavonoids and the brain: Evidences and putative mechanisms for a protective capacity. **Current neuropharmacology**, v. 3, n. 3, p. 193-205, 2005. Disponível em: <10.2174/1570159054368303>

DAJAS, F. *et al.* Quercetin in brain diseases: Potential and limits. **Neurochemistry international**, v. 89, p. 140-148, 2015. Disponível em: <doi: 10.1016/j.neuint.2015.07.002.>

DOVICH, S. S.; LAJOLO, F. M. Flavonoides e sua relação com doenças do Sistema Nervoso Central. **Nutrire rev. soc. bras. aliment. nutr.**, 2011.

DU, J.; CULLEN, J. J.; BUETTNER, G. R. Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. **Biochimica et biophysica acta (BBA)-Reviews on cancer**, v. 1826, n. 2, p. 443-457, 2012. Disponível em: <10.1016/j.bbcan.2012.06.003.>

EISERICH, J. P.; PATEL, R. P.; O'DONNELL, Valerie B. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. **Molecular aspects of medicine**, v. 19, n. 4-5, p. 221-357, 1998. Disponível em: < 10.1016/s0098-2997(99)00002-3>

EMERIT, J.; BEAUMONT, C.; TRIVIN, F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 55, n. 6, p. 333-339, 2001.

EMERIT, J.; EDEAS, M.; BRICAIRE, F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 58, n. 1, p. 39-46, 2004. Disponível em: < 10.1016/j.biopha.2003.11.004.>

ESCOBAR-CÉVOLI, R. et al. An overview of global flavonoid intake and its food sources. **Flavonoids-from biosynthesis to human health**, 2017. Disponível em: < 10.5772/67655>

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da associação médica brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997. Disponível em: < 10.1590/S0104-42301997000100014>

FILIPPIN, L. I. *et al.* Influência de processos redox na resposta inflamatória da artrite reumatóide. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 48, p. 17-24, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0482-50042008000100005>

FLOYD, R. A. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. **Proceedings of the society for experimental biology and medicine**, v. 222, n. 3, p. 236-245, 1999. Disponível em: < 10.1046/j.1525-1373.1999.d01-140.x.>

FLOYD, R. A.; HENSLEY, Kenneth. Oxidative stress in brain aging: implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. **Neurobiology of aging**, v. 23, n. 5, p. 795-807, 2002. Disponível em: < 10.1016/s0197-4580(02)00019-2.>

FUKAGAWA, Naomi K. Aging: is oxidative stress a marker or is it causal?. **proceedings of the society for experimental biology and medicine**, v. 222, n. 3, p. 293-298, 1999. Disponível em: < 10.1046/j.1525-1373.1999.d01-146.x>

GIAKOUMETTIS, D.; KRITIS, A.; FOROGLOU, N. C6 cell line: the gold standard in glioma research. **Hippokratia**, v. 22, n. 3, p. 105, 2018. Disponível em: <PMID: 31641331>

GILBERT, K. G.; COOKE, David T. Dyes from plants: Past usage, present understanding and potential. **Plant growth regulation**, v. 34, n. 1, p. 57, 2001.

GRANGEIRO, M. S. Dissertação (Pós-graduação em Biotecnologia), Universidade Estadual de Feira de Santana-, Bioprospecção de ação antioxidante de flavonóides em culturas de células gliais tratadas com catecol, 2009

GREEN, K.; BRAND, M. D.; MURPHY, Michael P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v. 53, n. suppl 1, p. S110-S118, 2004. Disponível em: 10.2337/diabetes.53.2007.s110.

GREEN, M. HL *et al.* Effect of diet and vitamin C on DNA strand breakage in freshly-isolated human white blood cells. **Mutation research/DNAging**, v. 316, n. 2, p. 91-102, 1994. Disponível em : < 10.1016/0921-8734(94)90011-6>

GURZAU, E. S.; NEAGU, C.; GURZAU, A. E. Essential metals—case study on iron. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 56, n. 1, p. 190-200, 2003.

HALLIWELL, B. *et al.* The characterization on antioxidants. **food and chemical toxicology**. 1995. Disponível em : < 10.1016/0278-6915(95)00024-v>

HALLIWELL, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward?. **Cardiovascular research**, v. 47, n. 3, p. 410-418, 2000. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(00\)00097-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(00)00097-3)>

HALLIWELL, B. Oxidants and human disease: some new concepts 1. **The FASEB journal**, v. 1, n. 5, p. 358-364, 1987. Disponível em: < <https://doi.org/10.1177/0748233793009001-203>>

HALLIWELL, B. Vitamin C and genomic stability. **Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis**, v. 475, n. 1-2, p. 29-35, 2001. Disponível em: < doi: 10.1016/s0027-5107(01)00072-0>

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE. JMC. **Free radicals in biology and medicine**, 1999.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John MC. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford university press, USA, 2015. Disponível em: <DOI:10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>

HANSEN, M. B.; NIELSEN, S. E.; BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **Journal of immunological methods**, v. 119, n. 2, p. 203-210, 1989.

HARMAN, D. Free radical theory of aging suggests that free radicals produced during normal metabolic process later react with and damage important molecules. **Antioxid redox signal**. v. 11, p. 298-300, 1956. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/0921-8734\(92\)90030-S](https://doi.org/10.1016/0921-8734(92)90030-S)>

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & therapeutics**, v. 96, n. 2-3, p. 67-202, 2002. Disponível em: <doi: 10.1016/s0163-7258(02)00298-x.>

HENSLEY, K. *et al.* Mitochondrial alteration in aging and inflammation: a possible site of action of nitron-based free radical traps. **Oxidative stress and disease**, v. 2, p. 311-326, 1999. Disponível em: < doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.033>

HEO, H. J.; LEE, C. Y. Protective effects of quercetin and vitamin C against oxidative stress-induced neurodegeneration. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 25, p. 7514-7517, 2004.

HOGG, N.; KALYANARAMAN, B. Nitric oxide and lipid peroxidation. **Biochimica et biophysica acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1411, n. 2-3, p. 378-384, 1999. Disponível em: <doi: 10.1016/s0005-2728(99)00027-4.>

HUSAIN, S. R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**, v. 26, n. 9, p. 2489-2491, 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83860-1>

INSTITUTO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Projeções e estimativas da população do Brasil e das Unidades da Federação**. Disponível em: <ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/index.html.> Acesso em 10/07/2021

JOMOVA, K. *et al.* Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 345, n. 1, p. 91-104, 2010. Disponível em: <DOI: 10.1007/s11010-010-0563-x>

JOPE, R. S.; MORRISETT, R. A.; SNEAD, O. C. Characterization of lithium potentiation of pilocarpine-induced status epilepticus in rats. **Experimental neurology**, v. 91, n. 3, p. 471-480, 1986. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/0014-4886(86)90045-2>

KAGAN, V. E. *et al.* Intermembrane transfer and antioxidant action of α -tocopherol in liposomes. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 280, n. 1, p. 147-152, 1990. Disponível em: <doi: 10.1016/0003-9861(90)90529-8>

KATSUBE, T. *et al.* Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity. **Food chemistry**, v. 97, n. 1, p. 25-31, 2006. Disponível em: <DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.03.019>

KEDAR, N. P. Can we prevent Parkinson's and Alzheimer's disease? **Journal of postgraduate medicine**, v. 49, n. 3, p. 236, 2003. Disponível em: PMID: 14597787

KELLY, K. History of medicine. New York: Facts on file; 2009. p. 29-50. Disponível em: <https://archive.org/details/HystoryOfMedicine/page/n111/mode/2up>

KHALIFA, T. I.; MUHTADI, F. J.; HASSAN, M. MA. Rutin. In: **Analytical profiles of drug substances**. Academic Press, 1983. p. 623-681. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/S0099-5428(08)60177-X>

KIM, S. J. *et al.* Dihydroartemisinin enhances radiosensitivity of human glioma cells in vitro. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 132, n. 2, p. 129-135, 2006.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian journal of pharmaceutical sciences**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LOUREIRO, A. P. M.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M. HG. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. **Química Nova**, v. 25, p. 777-793, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000500014>>

LOW, P. A. Autonomic nervous system function. **Journal of clinical neurophysiology: official publication of the american electroencephalographic society**, v. 10, n. 1, p. 14-27, 1993.

LYKKESFELDT, J. *et al.* Vitamin C deficiency in weanling guinea pigs: differential expression of oxidative stress and DNA repair in liver and brain. **British journal of nutrition**, v. 98, n. 6, p. 1116-1119, 2007. Disponível em: <doi: 10.1017/s0007114507787457>

MACHADO, H. *et al.* Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do centro de biologia da reprodução (Descontinuada)**, v. 27, n. 1/2, 2008.

MANACH, C. *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American journal of clinical nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MAY, J. M. Vitamin C transport and its role in the central nervous system. **Water soluble vitamins**, p. 85-103, O. Stanger (ed.), Water Soluble Vitamins, Subcellular Biochemistry 56 Springer Science+Business Media B.V. 2012 Disponível em : PMID: 22116696

MINETTI, M. *et al.* Iron-induced ascorbate oxidation in plasma as monitored by ascorbate free radical formation. No spin-trapping evidence for the hydroxyl radical in iron-overloaded plasma. **Biochemical journal**, v. 282, n. 2, p. 459-465, 1992.

MONSEN, E. R. Dietary reference intakes for the antioxidant nutrients: vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. **Journal of the american dietetic association**, v. 100, n. 6, p. 637-640, 2000. Disponível em : <doi: 10.1016/S0002-8223(00)00189-9>

NÈGRE-SALVAYRE, A. *et al.* α -Tocopherol, ascorbic acid, and rutin inhibit synergistically the copper-promoted LDL oxidation and the cytotoxicity of oxidized LDL to cultured endothelial cells. **Biological trace element research**, v. 47, n. 1, p. 81-91, 1995.

NONES, J.; NONES, J.. Flavonóides no cérebro: Afinal, o que eles fazem por lá?. **PUBVET**, v. 4, p. Art. 905-910, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Bulletin of the World Health Organization**. Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review, Geneva, 1998.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. **Ageing and health**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health>> Acesso em 10/07/2021

OU, B. *et al.* Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 11, p. 3122-3128, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jf0116606>>

PARK, Se-Eun et al. Rutin from *Dendropanax morbifera* Leveille protects human dopaminergic cells against rotenone induced cell injury through inhibiting JNK and p38 MAPK signaling. **Neurochemical research**, v. 39, n. 4, p. 707-718, 2014.

PASSAMONTI, S. *et al.* Bioavailability of flavonoids: a review of their membrane transport and the function of bilitranslocase in animal and plant organisms. **Current drug metabolism**, v. 10, n. 4, p. 369-394, 2009. Disponível em: <doi: 10.2174/138920009788498950>

PATEL, R.P., MCANDREW, J., SELLAKE, H., WHITE, C.R., JO, H., FREEMAN, B.A., DARLEY-USMAR, V.M. Biological aspects of reactive nitrogen species. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1411, p.385-400, 1999

PAULING, L. Evolution and the need for ascorbic acid. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 67, n. 4, p. 1643-1648, 1970. Disponível em: <doi: 10.1073/pnas.67.4.1643>

PELZER, L. Eugenia *et al.* Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. **II Farmaco**, v. 53, n. 6, p. 421-424, 1998. Disponível em: <10.1016/s0014-827x(98)00046-9>

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition research**, v. 18, n. 12, p. 1995-2018, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/S0271-5317(98)00169-9>

PETROVSKA, B. B.. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy reviews**, v. 6, n. 11, p. 1, 2012. Disponível em: <doi: 10.4103/0973-7847.95849.>

PIETTA, Pier-Giorgio. Flavonoids as antioxidants. **Journal of natural products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000. Disponível em : < doi: 10.1021/np9904509.>

PITANGA, B. P. S. Tese (Programa de Pós-Graduação em Imunologia - (PPGIM) UFBA, Instituto de Ciências da Saúde (ICS)-, Efeitos de flavonoides sobre a ativação microglial e viabilidade de células de glioblastoma, 2013.

PODMORE, I. D. *et al.* Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. **Nature**, v. 392, n. 6676, p. 559-559, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/33308>

PORTER, N.A. Chemistry of Lipid peroxidation. **Method.enzymols.**, v.105, p.273-282, 1984.

QUINN, J. *et al.* Antioxidants in Alzheimer's disease-vitamin C delivery to a demanding brain. **Journal of alzheimer's disease**, v. 5, n. 4, p. 309-313, 2003. Disponível em: <doi: 10.3233/jad-2003-5406>

RAJALAKSHMI, R.; PATEL, A. J. Effect of tranquilizers on regional distribution of ascorbic acid in the rat brain. **Journal of neurochemistry**, v. 15, n. 3, p. 195-199, 1968. Disponível em: < https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1968.tb06195.x>

REBELLO, J.M. (2005) “Avaliação da atividade antioxidante e antifúngica de análogos sintéticos da acetofenona e pró-oxidantes e antitumoral de chalconas sintéticas”, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, pág. 26.

REHMAN, A. *et al.* The effects of iron and vitamin C co-supplementation on oxidative damage to DNA in healthy volunteers. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 246, n. 1, p. 293-298, 1998.

REITER, R. J. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain
1. **The FASEB journal**, v. 9, n. 7, p. 526-533, 1995. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1096/fasebj.9.7.7737461>>

RICE, M. E. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. **Trends in neurosciences**, v. 23, n. 5, p. 209-216, 2000. Disponível em: <doi: 10.1016/s0166-2236(99)01543-x.>

RUIZ-RODRIGUEZ, A. *et al.* Effect of domestic processing on bioactive compounds. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 2, p. 345-384, 2008. Disponível em:
<DOI: 10.1007/s11101-007-9073-1>

RUSZNYAK, S. T. *et al.* Vitamin P: flavonols as vitamins. **Nature**, v. 138, 1936. Disponível em:
<https://doi.org/10.1038/138027a0>

SANTOS, B. L. *et al.* Antiproliferative, proapoptotic and morphogenic effects of the flavonoid rutin on human glioblastoma cells. **Food chemistry**, v. 127, n. 2, p. 404-411, 2011. Disponível em: <ISSN:0308-8146>

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista brasileira de medicina do esporte**, v. 10, p. 308-313, 2004. Disponível em: < <https://doi.org/10.1590/S1517-86922004000400008>>

SEMWAL, R. *et al.* Health benefits and limitations of rutin-A natural flavonoid with high nutraceutical value. **Phytochemistry letters**, v. 46, p. 119-128, 2021. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1016/j.phytol.2021.10.006>>

SHAHIDI, F.; HO, Chi-Tang. Antioxidant measurement and applications: an overview. 2007. Disponível em: 10.1021/bk-2007-0956.ch001

SHI, F. *et al.* Antioxidant activities of various extracts from *Artemisia selengensis* Turcz (LuHao). **Molecules**, v. 15, n. 7, p. 4934-4946, 2010.

SILVA, A. R. *et al.* The flavonoid rutin induces astrocyte and microglia activation and regulates TNF-alpha and NO release in primary glial cell cultures. **Cell biology and toxicology**, v. 24, n. 1, p. 75-86, 2008.

SIMÕES, C. M. O. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC 2001.3. ed, 2001.

SMYTHIES, J. R. The role of ascorbate in brain: therapeutic implications. **Journal of the royal society of medicine**. 1996. Disponível em: <DOI: 10.1177/014107689608900501>

SONG, K. et al. Rutin attenuates ethanol-induced neurotoxicity in hippocampal neuronal cells by increasing aldehyde dehydrogenase 2. **Food and chemical toxicology**, v. 72, p. 228-233, 2014. Disponível em: <doi: 10.1016/j.fct.2014.07.028.>

STHIJNS, M. MJPE *et al.* Rutin protects against H₂O₂-triggered impaired relaxation of placental arterioles and induces Nrf2-mediated adaptation in human umbilical vein endothelial cells exposed to oxidative stress. **Biochimica et biophysica acta (BBA)-General subjects**, v. 1861, n. 5, p. 1177-1189, 2017. Disponível em: <doi: 10.1016/j.bbagen.2017.03.004.>

SZETO, Y. T.; KWOK, T. CY; BENZIE, I. FF. Effects of a long-term vegetarian diet on biomarkers of antioxidant status and cardiovascular disease risk. **Nutrition**, v. 20, n. 10, p. 863-866, 2004. Disponível em: <doi: 10.1016/j.nut.2004.06.006.>

TIMIRAS, P. S. Comparative and differential aging, geriatric functional assessment, aging and disease. **Physiological basis of aging and geriatrics**, p. 25-46, 2003. Disponível em: <9780429124945>

TRABER, M. G. Vitamin E regulatory mechanisms. **Annual review of nutrition**, v. 27, p. 347-362, 2007. Disponível em: <doi: 10.1146/annurev.nutr.27.061406.093819.>

TRUEBA, G. PÉREZ; SANCHEZ, G. MARTÍNEZ. Los flavonoides como antioxidantes naturales. **Acta farm. bonaerense**, v. 20, n. 4, p. 297-306, 2001.

VELÁSQUEZ-JIMÉNEZ, Dafne et al. Phenolic compounds that cross the blood–brain barrier exert positive health effects as central nervous system antioxidants. **Food & Function**, v. 12, n. 21, p. 10356-10369, 2021. Disponível em <doi: 10.1039/d1fo02017j.>

VELLOSA, J. C. R. *et al.* Estresse oxidativo: uma introdução ao estado da arte. **Brazilian journal of development**, v. 7, n. 1, p. 10152-10168, 2021.

VERKHRATSKY, A.; BUTT, A. **Glial neurobiology: a textbook**. John Wiley & Sons, 2007.

VICKERY H. B.; N., E. M.; ALMQUIST, H. J.; ELVEHJEM, C. A. Term" vitamin P" recommended to be discontinued. **Science**, v. 112, n. 2917, p. 628-628, 1950. Disponível em: <doi: 10.1126/science.112.2917.628.>

WINTERBOURN, C. C. Hydroxyl radical production in body fluids Roles of metal ions, ascorbate and superoxide. **Biochemical journal**, v. 198, n. 1, p. 125-131, 1981.

WOODRUFF, C. W. Ascorbic acid--scurvy. **Progress in food & nutrition science**, v. 1, n. 7-8, p. 493-506, 1975. Disponível em: < PMID: 772754 >

YANG, J.; GUO, J.; YUAN, J. In vitro antioxidant properties of rutin. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, n. 6, p. 1060-1066, 2008. Disponível em: <DOI: 10.1016/j.lwt.2007.06.010>

YOUDIM, K. A. *et al.* Interaction between flavonoids and the blood–brain barrier: in vitro studies. **Journal of neurochemistry**, v. 85, n. 1, p. 180-192, 2003. Disponível em: <doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01652.x.>

YOUDIM, K. A.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J. A. Flavonoids and the brain: interactions at the blood–brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. **Free radical biology and medicine**, v. 37, n. 11, p. 1683-1693, 2004. Disponível em: <doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.08.002>

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química nova**, v. 24, p. 147-152, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422001000100025>>

ZAMEK-GLISZCZYNSKI, Maciej J. *et al.* Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 27, n. 5, p. 447-486, 2006. Disponível em <doi: 10.1016/j.ejps.2005.12.007>.