

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**EFEITO DO *HARPAGOPHYTUM PROCUMBENS*
SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E
A VIABILIDADE CELULAR *IN VITRO***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Larissa Finger Schaffer

Santa Maria, RS, Brasil.

2013

**EFEITO DO *Harpagophytum procumbens* SOBRE
PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E A
VIABILIDADE CELULAR *IN VITRO***

Larissa Finger Schaffer

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia.**

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Caroline Wagner
Co-orientador: Prof. Dr. Sydney Hartz Alves**

Santa Maria, RS, Brasil.

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Schaffer, Larissa Finger

Efeito do Harpagophytum procumbens sobre parâmetros de estresse oxidativo e a viabilidade celular in vitro / Larissa Finger Schaffer.-2013.

61 p.; 30cm

Orientadora: Caroline Wagner

Coorientador: Sydney Hartz Alves

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, RS, 2013

1. Garra do diabo 2. Antioxidante 3. Peroxidação lipídica 4. Catalase 5. Níveis de tióis. Viabilidade celular. I. Wagner, Caroline II. Alves, Sydney Hartz III. Título.

© 2013

Todos os direitos autorais reservados a Larissa Finger Schaffer. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.
E-mail: lari_biomedica@yahoo.com.br

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITO DO *Harpagophytum procumbens* SOBRE PARÂMETROS
DE ESTRESSE OXIDATIVO E A VIABILIDADE CELULAR *IN VITRO***

elaborada por
Larissa Finger Schaffer

como requisito parcial para a obtenção de grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA

Caroline Wagner, Dr^a. (UNIPAMPA)
(Presidente/Orientadora)

Margareth Linde Athayde, Dr^a. (UFSM)

Jéssie Haigert Sudati, Dr^a. (UNIPAMPA)

Santa Maria, 04 de outubro de 2013.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre guiar meus passos.

Aos meus pais, que me ensinaram a ousar, questionar e, acima de tudo, ser curiosa. Muito curiosa! Obrigada por sempre me incentivarem a alcançar caminhos cada vez mais distantes. Dedico a vocês essa conquista. Amo vocês!

Ao meu namorado Thiago Moura que fez do meu sonho o nosso sonho. Agradeço pelo incentivo e paciência sabendo me ouvir nos momentos de angústia e medo. Obrigado pelo teu carinho, tua alegria, tua atenção, tua vibração com as minhas conquistas e teu ombro em cada momento difícil que você me ajudou a atravessar. Te amo!

A minha orientadora Prof^a Caroline Wagner pela oportunidade, confiança disponibilidade e atenção. Por ter apostado neste trabalho e guiado meus passos durante esse período, mesmo estando em outra cidade. Minha admiração e gratidão.

A Prof^a Roselei Fachinetto por abrir as portas do seu laboratório pra mim, pelo apoio, pelos ensinamentos, pela amizade e carinho com que atendeu todas as minhas incertezas e inseguranças. Meus sinceros agradecimentos por ter me ensinado a pesquisar.

Ao meu co-orientador Prof. Sydney Hartz Alves que acreditou no quanto queria seguir na carreira da pesquisa e docência e me encaminhou aqui na Universidade Federal de Santa Maria.

À minha avó Brígida, à Tia Marlene, aos meus dindos (Ademar e Paulo), dindas (Marta e Leda) e primos, que vibraram comigo, desde a aprovação na prova. Obrigada pela força!

Ao irmão que encontrei durante o Mestrado Luis Ricardo Peroza. Obrigada pelos incentivos na parte experimental seja durante o dia ou noite, com chuva ou sol. Por acreditar que tudo daria certo no final, mesmo quando a esperança era quase nula. Pelo ouvido que escutou tantas alegrias e angustias, mas principalmente pelas risadas que amenizavam qualquer obstáculo que tínhamos que passar.

À equipe de pesquisa do Laboratório 5209 (Luis, Bárbara, Caroline Leal, Alcindo, Catiúscia, Elizete, Mayara, Caroline Pilecco, Patrícia, Getúlio, Naiane, Guilherme, Dayanne) que foi um grande diferencial durante o mestrado.

Oportunidade única e privilegiada para a troca de ensinamentos, principalmente devido ao espírito questionador, seu comprometimento e carinho. Obrigada pela amizade e apoio.

Ao LAPEMI, em especial às minhas amigas Débora Alves, Laíssa Bandeira e Laura Denardi, pela grande amizade que construímos, pelo carinho e apoio.

Aos amigos, Fernanda, Carla, Éverton, Taiane e Gerlânia, pela amizade, apoio e incentivo.

A todos os colegas e professores da pós-graduação em Farmacologia pelo convívio e aprendizado.

A secretária Zeli do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, pela dedicação, apoio e carinho no qual presta o seu serviço.

Aos animais, parte fundamental desse trabalho, obrigada por suas contribuições à ciência.

A CAPES pela bolsa concedida.

À Universidade Federal de Santa Maria.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução dessa Dissertação de Mestrado.

*“A mente que se abre a uma nova idéia,
jamais volta ao seu tamanho original”
(Albert Einstein)*

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

EFEITO DO *Harpagophytum procumbens* SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E A VIABILIDADE CELULAR *IN VITRO*

AUTORA: Larissa Finger Schaffer

ORIENTADORA: Caroline Wagner

CO-ORIENTADORA: Sydney Hartz Alves

LOCAL E DATA DA DEFESA: Santa Maria, 04 de outubro de 2013.

O *Harpagophytum procumbens*, conhecido como garra do diabo, é uma planta de origem africana com inúmeros efeitos terapêuticos, entre os quais se destaca a sua potente ação anti-inflamatória, porém o mecanismo pelo qual exerce o seu efeito não está bem elucidado. Sabe-se que espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio são geradas em doenças inflamatórias agudas e crônicas causando grande citotoxicidade, levando a danos teciduais. Substâncias com ação antioxidante podem contribuir para o controle e/ou tratamento de processos inflamatórios. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da infusão, extrato bruto e frações de *H. procumbens* sobre a peroxidação lipídica induzida por diferentes agentes pró-oxidantes (Ferro ou Nitroprussiato de Sódio). Além disso, os efeitos da fração acetato de etila também foram testados sobre as defesas antioxidantes (atividade da catalase e níveis de tióis protéicos e não protéicos) e sobre o dano celular (fatias de córtex cerebral) induzido pelos diferentes agentes pró-oxidantes. Todos os extratos preveniram a peroxidação lipídica induzida pelo ferro e nitroprussiato de sódio. A fração acetato de etila de *H. procumbens* demonstrou maior potência em proteger contra a peroxidação lipídica, prevenir contra a morte celular, além de conseguir manter os níveis de tióis e da enzima catalase nos níveis basais. Em conclusão, este trabalho demonstra que um dos possíveis mecanismos de ação terapêutica apresentado pelo *H. procumbens*, pode estar relacionando a sua ação antioxidante, sendo este, capaz de proteger contra o estresse oxidativo e a perda da viabilidade celular. Uma vez que a relação do processo inflamatório com o estresse oxidativo já está bem descrita na literatura, o efeito antioxidante aqui encontrado pode estar também relacionado com o potente efeito anti-inflamatório exercido pelo *H. procumbens*. Porém mais estudos devem ser realizados acerca dos mecanismos pelo qual o *H. procumbens* exerce os seus efeitos terapêuticos.

Palavras-chave: Garra do diabo. Antioxidante. Peroxidação lipídica. Catalase. Níveis de tióis. Viabilidade celular.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Graduate Course in Pharmacology
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

EFFECT OF *Harpagophytum procumbens* ON OXIDATIVE STRESS PARAMETERS AND CELL VIABILITY IN VITRO

AUTHOR: Larissa Finger Schaffer

ADVISOR: Caroline Wagner

CO-ADVISOR: Sydney Hartz Alves

PLACE AND DATE OF THE DEFENSE: Santa Maria, October 4th 2013

Harpagophytum procumbens, known as devil's claw, is an African plant with numerous therapeutic effects, among which stands out for its powerful anti-inflammatory action, but the mechanism by which exerts its effect is not well elucidated. It is known that reactive oxygen species and / or nitrogen are generated in acute and chronic inflammatory diseases causing high cytotoxicity that leads to tissue damage. Substances with antioxidant action can contribute to control and/or treat the inflammatory process. Thus, the goal of this study was to evaluate the effect of the infusion, the crude extract and fractions of *H. procumbens* on lipid peroxidation induced by different pro-oxidant agents (Iron or sodium nitroprusside). Furthermore, the effects of the ethyl acetate fraction was also tested on the antioxidant defenses (catalase activity and thiol protein and non-protein levels) and on cellular damage (cerebral cortex slices) induced by different pro-oxidant agents. All extracts prevented lipid peroxidation induced by Fe²⁺ and sodium nitroprusside. Ethyl acetate fraction of *H. procumbens* showed great power to protect against lipid peroxidation, prevention of cellular death, and shows ability to maintain the thiol levels and catalase activity in basal standards. In conclusion, this study demonstrates that one of the possible mechanisms for therapeutic action presented by *H. procumbens* may be related to its antioxidant action, being able to protect against oxidative stress and loss of cell viability. Once the relationship of inflammation process with oxidative stress is already well described in the literature, the antioxidant effect can also be found here related to potent anti-inflammatory effect exerted by *H. procumbens*. However more studies are needed on the mechanisms by which *H. procumbens* exerts its therapeutic effects.

Keywords: Devil's claw. Antioxidant. Lipid peroxidation. Catalase. Thiol levels. Cell viability.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Etapas da peroxidação lipídica.....	16
Figura 2: Esquema do mecanismo antioxidante da glutathiona	19
Figura 3: Esquema da reação da enzima catalase.....	20
Figura 4: Fruto (A), Flores e folhas(B) do <i>Harpagophytum procumbens</i>	23
Figura 5: Estrutura química do harpagosídeo.....	24

Resultados

Figura 1: Representative high performance liquid chromatography profile of <i>H. procumbens</i>	33
Figura 2: Effects of infusion, crude extract and fractions of <i>H. procumbens</i> on basal (control) or Fe ²⁺ (100 µM)-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates.....	35
Figura 3: Effects of infusion, crude extract and fractions of <i>H. procumbens</i> on basal (control) or SNP (5 µM)-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates.....	37
Figura 4: Effects of <i>H. procumbens</i> ethyl acetate fraction on catalase levels of rat brain homogenates submitted to the action of different pro-oxidant agents.....	38
Figura 5: Effects of <i>H. procumbens</i> ethyl acetate fraction on thiols content (protein and non-protein) of rat brain homogenates submitted to the action of different pro-oxidant agents	38
Figura 6: Effects of <i>H. procumbens</i> ethyl acetate fraction on cell viability of rat brain cortical slices submitted to the action of different pro-oxidant agents.....	39

Dados adicionais

Figura 7: Cromatogramas a 278 nm do harpadosídeo (pico 1), glicosídeo iridóide do <i>Harpagophytum procumbens</i>	44
---	----

LISTA DE TABELAS

Resultados

- Tabela 1: Composition of infusion, crude extract and fractions of *H.procumbens*....34
- Tabela 2: Determination of phenolic compounds in infusion, crude extract and fractions of *H. procumbens*.....34
- Tabela 3: IC50 ($\mu\text{g/ml}$) values for inhibition by infusion, crude extract and fractions of *H. procumbens* of TBARS production induced by different pro-oxidants in rat brain preparations36

Dados adicionais

- Tabela 4: Determinação do harpagosídeo no extrato bruto e frações de *Harpagophytum procumbens*45

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C	– Antes de Cristo
ANVISA	– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP-1	– Proteína Ativadora 1
ATP	– Adenosina trifosfato
COX 2	– Cicloxigenase 2
EO	– Estresse Oxidativo
ERN	– Espécies Reativas de Nitrogênio
ERRO	– Espécies Reativas de Oxigênio
GPx	– Glutaciona Peroxidase
GR	– Glutaciona Redutase
GSH	– Glutaciona
GSSG	– Glutaciona Oxidada
iNOS	– Síntese do Óxido Nítrico Induzível
MDA	– Malondialdeído
MTT	– 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólico brometo
NADPH	– Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NF-κB	– Fator Nuclear kappa B
NPS	– Nitroprussiato de Sódio
ON	– Óxido Nítrico
ON	– Radical óxido nítrico
-SH	– Grupo tiol
TBA	– Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	– Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TNF	– α Fator de Necrose Tumoral Alfa

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	13
1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Estresse Oxidativo e Defesas antioxidantes	14
1.1.1 Espécies reativas de Oxigênio e / ou Nitrogênio	14
1.1.2 Peroxidação lipídica	15
1.1.3 Morte celular.....	17
1.1.4 Marcadores de defesa antioxidante analisados	18
1.2 Ferro e Nitroprussiato de Sódio.....	20
1.3 Produtos naturais.....	21
1.4 <i>Harpagophytum procumbens</i>	23
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo Geral.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3 RESULTADOS.....	28
3.1 – <i>Harpagophytum procumbens</i> PREVINE O ESTRESSE OXIDATIVO E A PERDA DA VIABILIDADE CELULAR IN VITRO	29
3.2 Dados adicionais.....	42
3.2.1 Métodos.....	42
3.2.1.1 Materiais e Equipamentos	42
3.2.1.2 Quantificação de harpagosídeo por CLAE	42
3.2.1.3 Análise Estatística	43
3.2.2 Resultados	43
3.2.3 Discussão	45
4 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS	47
5 CONCLUSÕES FINAIS	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO**, está descrita uma revisão sucinta sobre os temas trabalhados nesta dissertação.

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito que está publicado na revista *Neurochemical Research*, o qual se encontra no item **RESULTADO**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no manuscrito e nos resultados complementares presentes como dados adicionais.

O item **CONCLUSÃO** se encontra no final desta dissertação e apresenta os comentários gerais sobre este trabalho.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem no item **INTRODUÇÃO** desta dissertação.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Estresse Oxidativo e Defesas antioxidantes

1.1.1 Espécies reativas de Oxigênio e / ou Nitrogênio

Espécies reativas são moléculas que apresentam um elétron desemparelhado na sua órbita externa. Estas moléculas também chamadas de radicais livres caracterizam-se por serem instáveis e por terem um tempo de vida muito curto, o que as tornam altamente oxidantes. Todos os organismos aeróbicos produzem continuamente espécies reativas de oxigênio (ERO) e/ ou espécies reativas de nitrogênio (ERN) durante os seus processos metabólicos. Entre as espécies químicas geradas, se destacam o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio, o óxido nítrico e o radical hidroxila (FREI, 1994; FINKEL; HOLBROOK, 2000). Em condições fisiológicas, tais espécies são detoxificadas, por um sistema antioxidante complexo presente nas células, composto por antioxidantes enzimáticos (ex: catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase) e antioxidantes não-enzimáticos (ex: Vitamina A, C, E e Glutathione) (NORDBERG; ARNER, 2001; KOHEN; NYSKA, 2002)

O estado de estresse oxidativo (EO) pode ser definido como o desequilíbrio entre a formação e remoção de agentes oxidantes no organismo, decorrente da geração excessiva de ERO/ERN e/ou diminuição de antioxidantes endógenos (HALLIWELL, 1992; DAWSON; DAWSON, 1996; KOHEN; NYSKA, 2002; BERG, 2004; VALKO, 2007). Desta forma, o acúmulo de ERO e/ou ERN decorrente do EO podem causar danos à estrutura de lipídios, proteínas e DNA (DUFFY et al., 1998; FINKEL; HOLBROOK, 2000; KOHEN; NYSKA, 2002; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; SILVA; COUTINHO, 2010) com conseqüente alteração funcional e prejuízo das funções vitais em diversos tecidos e órgãos (HALLIWELL, 1992), sendo relacionado com diversas patologias, entre elas, os distúrbios neurológicos e inflamatórios (YUTING et al., 1991; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; HAYASHI,

2009). Relacionado a isto, existe um interesse crescente pelos efeitos antioxidantes dos produtos naturais, uma vez que estes têm demonstrado a capacidade de auxiliar o sistema de defesa antioxidante, atenuando o dano provocado pelo excesso na geração de ERO e/ou ERN ou deficiências nos sistemas antioxidantes endógenos (HANISH SINGH et al., 2011; LIN et al., 2011; MAHDY et al., 2012; PARK et al., 2012).

É importante salientar que o cérebro é um órgão conhecido por ser vulnerável ao EO devido a sua elevada quantidade de ácidos graxos poliinsaturados, do seu alto consumo de oxigênio e por conter maior quantidade de metais de transição como o ferro, do que outros órgãos. Além disso, o cérebro tem baixos níveis de enzimas antioxidantes como a catalase e a glutationala peroxidase, o que facilita ainda mais o estabelecimento de um estado de estresse oxidativo nas células do cérebro (REITER, 1995; DUFFY; MURPHY, 1998; SMITH et al., 2013).

1.1.2 Peroxidação lipídica

As membranas celulares consistem em um envoltório composto por fosfolipídios e proteínas, as quais são encontradas em todas as células vivas. Esta membrana é composta por uma dupla camada de fosfolipídios, que apresentam uma cabeça polar e duas caudas hidrofóbicas compostas por ácidos graxos, que podem apresentar uma ou mais dupla ligação (insaturação) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

A peroxidação lipídica, também conhecida como lipoperoxidação, é o processo através do qual as ERO/ERN reagem com os ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídios das membranas celulares, os quais são altamente suscetíveis ao dano oxidativo, podendo levar a modificações físicas nas membranas celulares devido a esta oxidação, tornado-as mais firmes e menos flexíveis, criando fendas iônicas que alteram sua semipermeabilidade, o que favorece o trânsito indiscriminado de metabólitos e detritos celulares, provocando sua ruptura e lise (JOSEPHY, 1997; TIMBRELL, 2000; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A peroxidação lipídica ocorre por meio de uma série de reações em cadeia que são divididas em três etapas: iniciação, propagação e terminação. Decorrente

da peroxidação lipídica ocorre a formação de hidroperóxidos lipídicos e produtos secundários da oxidação, incluindo peróxidos cíclicos como o malondialdeído (MDA) (Figura 1) (JANERO, 1990). O MDA por sua vez pode ser detectado e analisado em amostras biológicas através do método de TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico) descrito por Okawa e colaboradores (1979), onde o MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar um complexo colorido (TBA-MDA), o qual pode ser quantificado espectrofotometricamente, sendo este teste bastante utilizado para quantificar a peroxidação lipídica, que é um dos principais marcadores de EO.

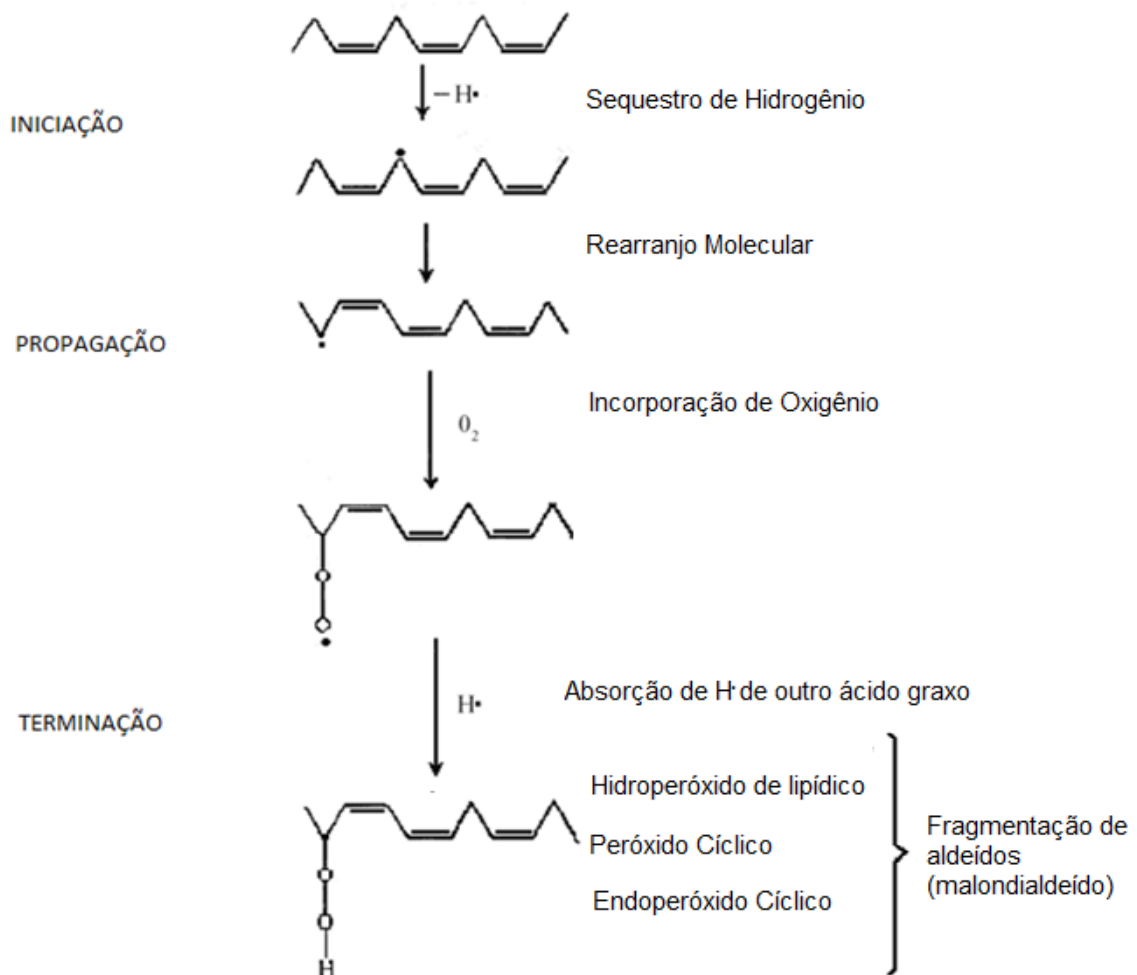


Figura 1: Etapas da peroxidação lipídica (adaptado de HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

1.1.3 Morte celular

As mitocôndrias são organelas fundamentais que desempenham inúmeras funções celulares, incluindo a síntese de ATP, a homeostase celular do cálcio, bem como a manutenção e morte celular. Entretanto, a cadeia respiratória mitocondrial é o principal local onde são geradas ERO na célula, tornando-as particularmente vulneráveis ao EO (TAN et al., 1998). Desta forma, o estabelecimento do desequilíbrio do estado redox intracelular pela elevação nos níveis de ERO acima da capacidade de tamponamento das defesas antioxidantes, pode gerar inúmeras alterações celulares com potencial citotóxico, podendo assim, levar a morte celular por apoptose e até necrose dependendo da intensidade do estímulo danoso (FERNANDEZ; COTTER, 1994). Vários estudos demonstram a relação entre a morte celular por apoptose com a diminuição de níveis de marcadores antioxidantes, como a glutatona (GSH), bem como o aumento de ERO (MCCONKEY, 1998; ODA et al., 1998; XU; TORNALLEY, 2001; AKSENOVA et al., 2013).

A morte celular programada, apoptose, é uma resposta protetora central para o excesso de dano oxidativo presente no tecido, servindo como um mecanismo de proteção contra as inúmeras lesões à nível de material genético celular que o EO pode causar (PAYNE et al., 1995; HAMPTON et al., 1998; AKSENOVA et al., 2013). A apoptose, por sua vez, se caracteriza por uma série de alterações morfológicas, pela participação das caspases, liberação de citocromo c mitocondrial e fragmentação nuclear, onde essa sinalização que resultará na morte da célula pode ser induzida por um desequilíbrio do estado redox celular. Sendo que, nos diferentes processos de morte celular a participação das mitocôndrias é fundamental, pois esta organela age como um eixo central de decisão de muitos tipos de respostas apoptóticas, liberando diversos fatores letais de seu espaço intramembranoso para o citoplasma, bem como produzindo ATP para o processo apoptótico (HAMPTON et al., 1998; UEDA et al., 2002).

A busca de compostos capazes de manter o bom funcionamento celular e impedir a extensa apoptose e necrose, devido ao aumento na geração de ERO e/ou ERN, se torna cada vez mais importante, visto que, o aumento da morte celular devido ao EO está relacionado com o surgimento e mau-prognóstico de desordens patológicas, incluindo processos neurodegenerativos e inflamatórios (KUSIAK et al.,

1996; DEIGNER et al., 2000; SHELDON et al., 2004; ANSELMINI et al., 2004; EVAN; VOUSDEN, 2001; AKSENOVA et al., 2013). O teste do 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólico brometo (MTT) é um ensaio colorimétrico bastante utilizado para a verificação da viabilidade celular. Este teste é baseado na redução do sal de tetrazólico MTT (amarelo), formando assim cristais de formazan (púrpura) por células metabolicamente ativas, onde esta clivagem acontece pela succinato desidrogenase mitocondrial. Desta forma, a intensidade da cor do formazan está correlacionada com o número de células viáveis (VISTICA et al., 1991; LIU et al., 1998).

1.1.4 Marcadores de defesa antioxidante analisados

O excesso de ERO e/ou ERN pode dar início à inúmeras reações celulares, que podem levar a morte celular. A elevada produção dessas espécies induz nas células a expressão de genes ligados ao sistema de defesa antioxidante, assim os produtos da expressão destes genes interrompem as reações em cadeia e eliminam as ERO e/ou ERN, restabelecendo o estado redox intracelular inibindo as reações de oxidação (DROGE, 2002).

A GSH é um dos mais importantes antioxidantes celulares devido ao seu papel central na manutenção do estado redox das células (MEISTER; ANDERSON, 1983). Esta molécula é um tripeptídeo linear constituído por três aminoácidos: a glicina, o ácido glutâmico e a cisteína. Suas propriedades antioxidantes devem-se à presença do grupo tiol (-SH) na sua porção cisteína, sendo os tióis potentes agentes redutores, que podem ser reversamente oxidados e reduzidos, servindo como doadores de elétrons (MEISTER, 1988). No mecanismo antioxidante, a GSH reduz as espécies reativas, através de reação catalizada pela enzima glutathione peroxidase (GPx), gerando glutathione na forma oxidada (GSSG). Para evitar a depleção da GSH e desta forma diminuir a atividade antioxidante celular, a glutathione reductase (GR) reduz a GSSG à custa de NADPH, regenerando a GSH e mantendo desta forma o estado redox intracelular (Figura 2) (CHAUDIÈRE; FERRARI-ILIOU, 1999; PASTORE et al., 2003; HALLIWELL. GUTTERIDGE, 2007).

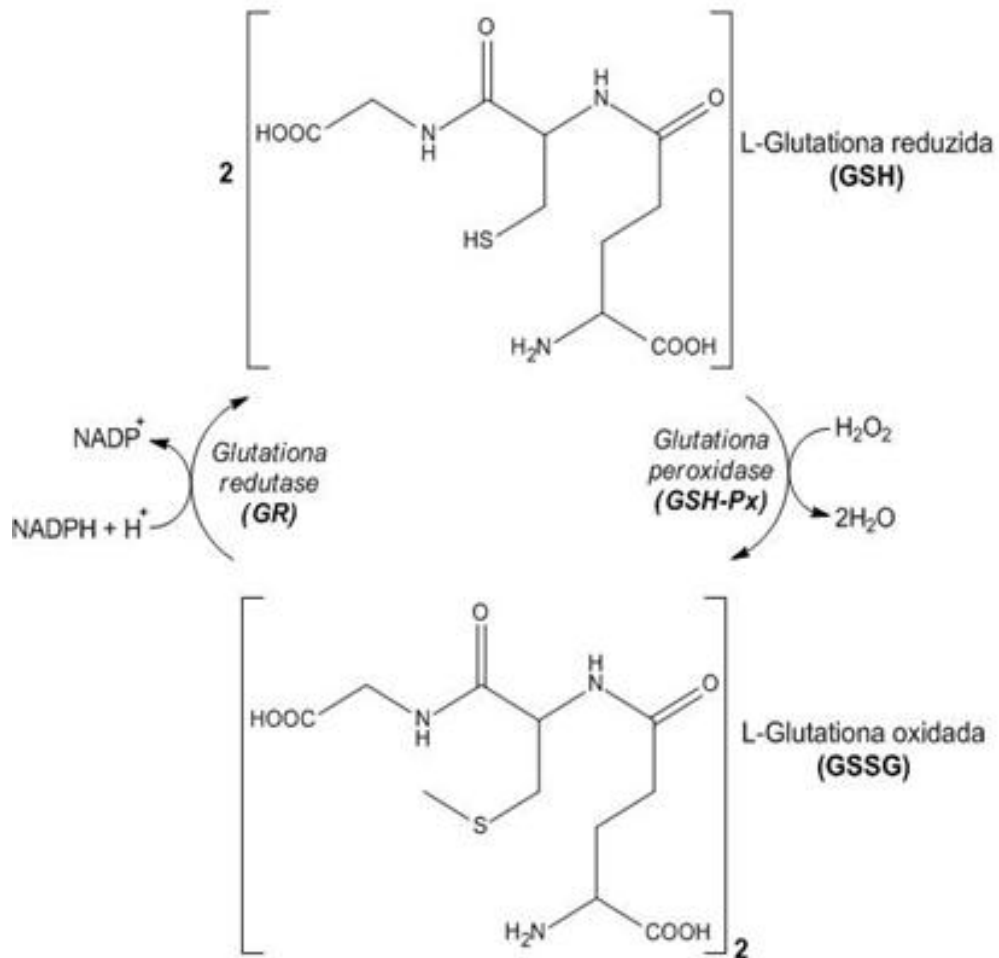


Figura 2: Esquema do mecanismo antioxidante da glutatona. (Adaptado de ROVER JUNIOR et al., 2001).

A catalase é uma enzima tetramérica que contém grupos hemes e está presente na maior parte das células eucarióticas, sendo capaz de catalisar de forma extremamente rápida a degradação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Figura 3) (CHAUDIÈRE; FERRARI-ILIOU, 1999). O peróxido de hidrogênio acumula-se na célula como subproduto de várias reações químicas, sendo gerado principalmente a partir da dismutação do ânion superóxido pela enzima superóxido dismutase e pela oxidação de ácidos graxos. Como o peróxido de hidrogênio é potencialmente tóxico para a célula, a modulação da catalase é um dos métodos que a célula usa para diminuir a toxicidade potencial desta espécie oxidante. A redução na atividade da enzima catalase em um sistema orgânico acometido pelo EO predispõe esse órgão à toxicidade do peróxido de hidrogênio (CALABRESE; CANADA, 1989).

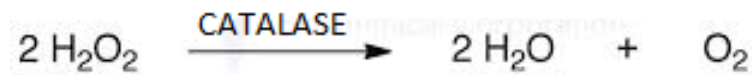


Figura 3: Esquema da reação da enzima catalase.

1.2 Ferro e Nitroprussiato de Sódio

Dados na literatura demonstram a relação entre EO e a patogênese de inúmeras doenças (GRISHAM, 1994; HEO; LEE, 2004; QUINE; RAGHU, 2005; WU et al., 2013; RODRIGO et al., 2013; CAROCHO; FERREIRA, 2013). Deste modo, a busca por novas substâncias com propriedades antioxidantes se torna cada vez mais relevante, sendo que vários métodos vêm sendo desenvolvidos para este fim. O método de TBARS tem sido extensamente utilizado em várias pesquisas, onde substâncias são testadas frente a diferentes agentes pró-oxidantes, que induzem peroxidação lipídica por mecanismos diversos (PUNTEL et al., 2005; PUNTEL et al., 2007). O ferro e o nitroprussiato de sódio (NPS) são bastante utilizados como agentes pró-oxidantes nestes modelos *in vitro*, devido a sua capacidade de induzir a produção de ERO e/ou ERN e conseqüentemente levar ao EO (WAGNER et al., 2006; COLPO et al., 2007; PEREIRA et al., 2008; KADE et al 2008; SUDATI et al., 2009; BONFANTI et al., 2013; PEROZA et al., 2013).

O ferro desempenha um papel importante nos processos metabólicos dos animais, sendo essencial para a maioria dos organismos vivos. Ele participa de múltiplos processos vitais variando desde mecanismos celulares oxidativos até transporte de oxigênio nos tecidos. Este elemento trata-se de um componente fundamental de moléculas como hemoglobina, mioglobina, citocromos, enzimas antioxidantes como a catalase, além das proteínas próprias de seu metabolismo. A capacidade do ferro para sofrer oxidação e redução cíclica é um aspecto importante da sua função. No entanto, tal atividade redox é capaz de gerar espécies reativas, sendo estas capazes de causarem inúmeras lesões em sistemas biológicos (MINOTTI; AUST, 1992; WINTERBOURN, 1995).

Os efeitos citotóxicos do ferro se dão principalmente pelo excesso deste metal de transição, sendo este capaz de doar elétrons ao peróxido de hidrogênio,

formando assim o radical hidroxila e outras espécies reativas através da reação de Fenton (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; FARINA et al., 2013). O radical hidroxila, sendo o radical mais excitotóxico das ERO, pode subsequentemente iniciar a peroxidação lipídica ou oxidar grande parte das moléculas presentes nos sistemas biológicos propagando reações induzida por radicais livres. Devido ao excesso de espécies reativas liberadas pela reação de Fenton ocorre então um desequilíbrio entre espécies reativas/sistema antioxidante, promovendo assim o estabelecimento do estresse oxidativo (HALLIWELL, 1984, 1992; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; FARINA et al., 2013).

O NPS da mesma forma que o ferro, provoca um desequilíbrio entre a geração de espécies reativas/ sistema antioxidante, sendo que seus efeitos citotóxicos estão relacionados com a liberação de cianeto e /ou óxido nítrico (ON) pelo NPS (BATES et al., 1991; CHEN et al., 1991; DAWSON et al., 1991). Desta forma, o NPS é considerado um bom indutor químico de peroxidação lipídica (WAGNER et al., 2006), uma vez que rapidamente consegue induzir a liberação de ON[•] nos tecidos (BATES et al., 1991). Este radical por sua vez produz peroxinitrito em conjunto com o radical ânion superóxido, levando à peroxidação lipídica e produzindo outros radicais livres (BECKMAN et al., 1990). Além disso, o ON tem a capacidade de inibir a atividade de algumas enzimas tais como a catalase, sendo que essa inibição se dá pela ligação do ON ao sítio ativo da enzima, diminuindo assim as defesas antioxidantes (COOPER, 1999; BROWN, 1995). Apesar de, o ON ser considerado um neurotransmissor, em condições patológicas a sua superprodução pode iniciar inúmeros eventos neurotóxicos (DAWSON; DAWSON, 1996), levando ao desencadeamento do processo apoptótico (BRÜNE et al., 1998).

1.3 Produtos naturais

Há séculos, os seres humanos têm encontrado na natureza auxílio para atender a suas necessidades básicas, entre as quais se encontram o uso de produtos naturais para o tratamento de um amplo espectro de patologias (CRAGG; NEWMAN, 2013). Os primeiros registros da utilização de plantas de forma medicinal

são de cerca de 2600 anos a.C, sendo documentado o uso de aproximadamente 1.000 substâncias derivadas de plantas na Mesopotâmia (BORCHARDT, 2002).

O uso terapêutico de produtos naturais por diferentes culturas tem sido extensivamente documentado nas últimas décadas, sendo que em 1985 a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que 65% da população do mundo contaram com medicamentos tradicionais derivados de plantas para os seus cuidados primários de saúde (FARNSWORTH et al., 1985). Além disso, 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam práticas tradicionais na atenção primária, e desse total, 85% dessas práticas utilizam as plantas medicinais ou preparações destas, para os cuidados com a saúde, demonstrando assim a grande utilização dos produtos naturais pela população mundial. Vale salientar, que se encontra em expansão o uso de plantas medicinais, bem como medicamentos fitoterápicos no mundo inteiro (WHO, 2002).

As propriedades terapêuticas das plantas medicinais são atribuídas a diferentes constituintes químicos isolados de seus extratos. Sendo a atividade antioxidante uma das propriedades bastante buscada, pois tem mostrado efeito benéfico em várias doenças degenerativas, câncer, *Diabetes mellitus*, doenças cardiovasculares, doenças neurológicas e doenças inflamatórias, como por exemplo, na artrite reumatóide (HEO; LEE, 2004; QUINE; RAGHU, 2005; KAMALAKKANNAN; PRINCE, 2006; DUARTE et al., 2010; RODRIGO et al., 2010; PARK et al., 2012; RODRIGO et al., 2013; JAYASENA et al., 2013; CAROCHO; FERREIRA, 2013).

Um dos principais constituintes responsáveis pela ação antioxidante presentes nas plantas medicinais, são os compostos fenólicos, tais como flavonóides, que são compostos químicos presentes em diversas plantas, frutos, sementes, grãos e em algumas bebidas como vinho e cerveja, sendo mais de 8000 diferentes estruturas já identificadas e descritas (PIETTA, 2000). Vale salientar, que a potente atividade antioxidante realizada pelos flavonóides se dá principalmente pela atividade de scavenger de radicais livres, diminuindo assim o dano oxidativo e conseqüentemente a morte celular (DUGAS et al., 2000). Devido à crescente compreensão do potencial benéfico destes compostos fenólicos, tanto na manutenção da saúde quanto na doença humana, o número de pesquisas utilizando plantas medicinais que tenham na sua composição compostos fenólicos, tem aumentado nos últimos anos (COLPO et al., 2007; PEREIRA et al., 2008; SUDATI et

al., 2009; BOLIGON et al., 2009; KADE et al., 2009; BONFANTI et al., 2013; PEROZA et al., 2013).

Desta forma, considerando as informações acima expostas acerca dos efeitos benéficos obtidos através de produtos naturais, percebemos a necessidade de mais pesquisas acerca dos mecanismos farmacológicos das plantas medicinais como propósito de elucidar seus potenciais efeitos, podendo ajudar na melhora da saúde humana.

1.4 *Harpagophytum procumbens*

O *Harpagophytum procumbens* (Figura 3) é uma planta perene pertencente à família Pedaliceae, nativa do sul da África, comumente encontrada no deserto do Kalahari e estepes da Namíbia (GERICKE, 2002; ANDERSEN et al, 2004; GRANT et al, 2007; MNCWANGI et al., 2012). Essa planta é popularmente conhecida como garra do diabo devido às características semelhantes a uma garra na extremidade do seu fruto (Figura 3A) (GERICKE, 2002; MAHOMED; OJEWOLE, 2004). Porém é nas raízes tuberosas onde são encontrados os principais componentes bio-ativos, que são responsáveis pela sua ação terapêutica (WEGENER, 2000; GERICKE, 2002; GRANT et al., 2007).



Figura 4: Fruto (A), Flores e folhas(B) do *Harpagophytum procumbens* (MNCWANGI et al., 2012).

Os constituintes característicos do *H. procumbens* são os glicosídeos iridóides principalmente o harpagosídeo, harpagogídeo, procumbídeo, 8-coumaroil harpagídeo, e o verbascosídeo (GERICKE, 2002; ABDELOUAHAB; HEARD, 2007; ABDELOUAHAB; HEARD, 2008; GEORGIEV et al., 2013). Sendo que o principal constituinte da planta para a ação farmacológica é o harpagosídeo (Figura 5), podendo ser encontrado em cerca de 3% de todos constituintes. No entanto, sabe-se que a ação do *H. procumbens* não se dá exclusivamente devido a presença deste constituinte, podendo estar associada também à outros glicosídeos iridóides e demais componentes presentes na planta como os flavonóides (KASZKIN et al., 2004; BRIEN et al., 2006), os quais poderão antagonizar ou potencializar sua ação terapêutica (FIEBICH et al., 2001; ANUATE; TORRES; MELLO, 2010; MNCWANGI et al., 2012; GEORGIEV et al., 2013).

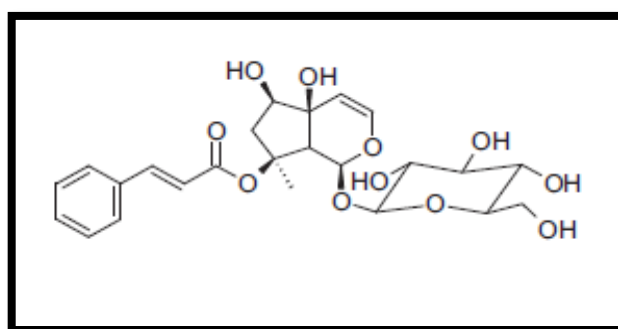


Figura 5: Estrutura química do harpagosídeo (MNCWANGI et al., 2012).

O potencial medicinal desta planta vem sendo estudado desde a década de 1920 na Namíbia, onde começou a ser utilizado no tratamento auxiliar de doenças degenerativas das articulações e dores em geral (WEGENER, 2000; STEWART; COLE, 2005; GRANT et al., 2007). Inúmeras pesquisas vêm comprovando a atividade anti-inflamatória e analgésica da planta tanto *in vitro* (FIEBICH et al., 2001; SCHULCE-TANZIL et al., 2004; HUANG et al., 2006; ABDELOUAHAB; HEARD, 2007; ANUATE et al., 2010; FIEBICH et al., 2011;) como *in vivo* (ANDERSEN et al., 2004, MAHOMED; OJEWOLE, 2004; NA et al., 2004; KUNDU et al., 2005; CATELAN et al., 2006; UCHIDA et al., 2008; INABA et al., 2010; WACHSMUTH et al., 2011) podendo até mesmo ser comparada com a ação de fármacos amplamente

utilizados na diminuição da dor e inflamação. Além disso, pesquisas clínicas também comprovam o seu efeito medicinal (LAUDAHN; WALPER, 2001; WEGENER; LUPKE, 2003; WARNOCK et al., 2007). Devido a sua ação terapêutica, o *H. procumbens* foi então liberado como medicamento fitoterápico em 2011 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) MS: 1.1860.0035, sendo então indicado para o tratamento da artrite, artrose, tendinites, e como tratamento auxiliar da gota.

Muitos estudos têm sido realizados para investigar o mecanismo exato pelo qual o *H. procumbens* exerce principalmente a sua ação anti-inflamatória, que é seu principal alvo terapêutico, no entanto, pouco se sabe até o momento a respeito do mecanismo de ação farmacológica desta planta, apesar da ampla utilização da mesma em humanos.

Investigações *in vitro* com o principal constituinte da planta, o harpagosídeo, sugeriram que a supressão da ciclooxigenase 2 (COX 2) e da síntese de óxido nítrico induzível (iNOS) seria o principal mecanismo de ação anti-inflamatório do *H. procumbens*, sendo que essa ação se daria através da inibição da ativação do Fator Nuclear κ B (NF- κ B) (HUANG et al., 2006). Porém, mais recentemente, um estudo *in vitro* utilizando outro modelo celular e testando o extrato hidroalcoólico da planta, foi observado que o mesmo não teve ação via inibição da ativação de NF- κ B e sim através do bloqueio da Proteína Ativadora 1 (AP-1), diminuindo a liberação de interleucinas e do Fator de necrose Tumoral α (TNF- α) (FIEBICH et al., 2011). Ocorrem várias divergências nos resultados encontrados relacionando o possível mecanismo de inibição inflamatória desta planta, sendo que, essas divergências são justificadas na maioria das vezes pela insuficiência na caracterização química da planta e pelo uso de modelos de estudo e métodos de extração diferentes (CLARKSON et al., 2006; FIEBICH et al., 2011).

Além da ação anti-inflamatória e analgésica outros efeitos vêm sendo atribuídos ao *H. procumbens* podendo o mesmo desempenhar um papel terapêutico numa série de condições, incluindo atividade anticonvulsivante em camundongos (MAHOMED; OJEWOLE, 2006), propriedades antidiabéticas em ratos (MAHOMED; OJEWOLE, 2004), efeito uterotônico e espasmogênico em musculatura uterina de mamíferos (MAHOMED; OJEWOLE, 2009), inibição da colinesterase *in vitro* (GEORGIEV et al., 2012) e efeito antiplasmodial *in vitro* de alguns componentes extraídos da planta (CLARKSON et al., 2003). Porém as pesquisas realizadas

acerca desses outros efeitos da planta são escassas, pois a grande utilização do *H. procumbens* se dá para fins inflamatórios.

Sabe-se que o excesso na formação de ERO e/ou ERN pode contribuir para o aumento da lesão do tecido no qual está ocorrendo um processo inflamatório (HARRIS, 1992; SIMMONDS; RAMPTON, 1993; GRISHAM, 1994; BARBIOR et al., 2000). Por sua vez, agentes que são capazes de interferir com a geração e/ou ação dos radicais livres em tecidos biológicos são, portanto, de interesse terapêutico (GRANT et al., 2009).

Em estudo realizado por Bhattacharya e Bhattacharya (1998) o *H. procumbens* foi capaz de aumentar a atividade da catalase e da glutathione peroxidase, além de diminuir a peroxidação lipídica já existente no córtex e estriado de ratos. Em outro estudo realizado por Grant e colaboradores (2009) utilizando extrato adquirido de forma comercial e tintura de *H. procumbens*, foi demonstrado um aumento na atividade de scavenger do radical DPPH e também uma diminuição nos níveis de nitrito em linhagem celular estimulada por lipopolissacarídeos, sugerindo que essa inibição poderia contribuir para o efeitos anti-inflamatórios e analgésicos da planta. No entanto, ainda é questionável essa contribuição do possível efeito antioxidante para a ação anti-inflamatória do *H. procumbens* (GRANT et al., 2009).

Desta forma, considerando que o *H. procumbens* é uma planta liberada para comercialização aqui no Brasil e vem sendo amplamente utilizado principalmente para tratamento auxiliar das desordens de origem inflamatória e analgésicas e que existem poucos estudos em relação a outras ações desta planta, bem como o seu mecanismo de ação, se torna importante investigar outros benefícios que esta planta possa apresentar, como a sua possível ação antioxidante, o qual pode estar envolvida com o sua potente ação anti-inflamatória. Além disso, a utilização de diferentes modos de extração possibilitará a comparação dos possíveis efeitos apresentado pelos diferentes extratos com os componentes extraídos destas frações.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do *H. procumbens* sobre parâmetros de estresse oxidativo e viabilidade celular *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

Na infusão, extrato bruto e frações do *H. procumbens*;

- Determinar os componentes através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Quantificar os compostos fenólicos totais;
- Avaliar *in vitro* o possível efeito do *H. procumbens* sobre a peroxidação lipídica;
- Comparar o efeito das diferentes extrações, relacionando as mesmas, sobre os parâmetros encontrados *in vitro*.

No extrato de *H. procumbens* que apresentar melhor atividade sobre os parâmetros analisados acima, avaliar em modelo *in vitro*:

- A atividade da enzima catalase e os níveis de grupos tióis (protéico e não-protéico);
- O possível efeito sobre a viabilidade celular;
- O efeito do extrato comparado com o ácido gálico (controle positivo), sobre os parâmetros encontrados *in vitro*.
- Se neste extrato o harpagosídeo, principal constituinte do *H. procumbens*, estaria presente em maiores quantidades que nos demais.

3 RESULTADOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico, o qual se encontra aqui organizado. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio artigo. O **artigo** está disposto na forma em que foi publicado na edição da revista científica ***Neurochemical Research***. Além do artigo, resultados complementares se encontram no item dados adicionais.

3.1 – *Harpagophytum procumbens* PREVINE O ESTRESSE OXIDATIVO E A PERDA DA VIABILIDADE CELULAR IN VITRO

Artigo

Harpagophytum procumbens* PREVENTS OXIDATIVE STRESS AND LOSS OF CELL VIABILITY *IN VITRO

LARISSA FINGER SCHAFFER; LUIS RICARDO PEROZA; ALINE AUGUSTI BOLIGON; MARGARETH LINDE ATHAYDE; SYDNEY HARTZ ALVES; ROSELEI FACHINETTO; CAROLINE WAGNER.

Neurochemical Research - DOI 10.1007/s11064-013-1133-x- (2013).

Harpagophytum procumbens Prevents Oxidative Stress and Loss of Cell Viability In Vitro

Larissa Finger Schaffer · Luis Ricardo Peroza ·
Aline Augusti Boligon · Margareth Linde Athayde ·
Sydney Hartz Alves · Roselei Fachinnetto · Caroline Wagner

Received: 31 May 2013 / Revised: 10 August 2013 / Accepted: 14 August 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract *Harpagophytum procumbens*, popularly known as devil's claw, is a plant commonly used in the treatment of diseases of inflammatory origin. The anti-inflammatory effects of *H. procumbens* have been studied; however, the mechanism of action is not elucidated. It is known that excess of reactive oxygen and nitrogen species may contribute to increasing tissue damage due to inflammation. In the present study, we examined the effects of *H. procumbens* infusion, crude extract and fractions on lipid peroxidation (brain

homogenates) induced by different pro-oxidants (Fe^{2+} or sodium nitroprusside) and the effects of ethyl acetate fraction (rich in phenolic compounds) on antioxidant defenses (catalase activity and thiol levels) and cell damage (brain cortical slices) induced by different pro-oxidants. All tested extracts of *H. procumbens* inhibited lipid peroxidation in a concentration-dependent manner. Furthermore, the ethyl acetate fraction had the highest antioxidant effects either by decreasing lipid peroxidation and cellular damage or restoring thiols levels and catalase activity. Taken together, our results showed that *H. procumbens* acts either by preventing oxidative stress or loss of cell viability. Thus, the previously reported anti-inflammatory effect of *H. procumbens* could also be attributed to its antioxidant activity.

L. F. Schaffer · R. Fachinnetto · C. Wagner
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil
e-mail: lari_biomedica@yahoo.com.br

R. Fachinnetto
e-mail: roseleifachinnetto@yahoo.com.br

L. R. Peroza · R. Fachinnetto
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria,
Santa Maria, RS 97105-900, Brazil
e-mail: luisricardoperoza@gmail.com

A. A. Boligon · M. L. Athayde · S. H. Alves
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,
Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria,
RS 97105-900, Brazil
e-mail: alineboligon@hotmail.com

M. L. Athayde
e-mail: margathayde@gmail.com

S. H. Alves
e-mail: sydneyalves.ufsm@gmail.com

C. Wagner (✉)
Universidade Federal do Pampa, Campus Caçapava do Sul,
Caçapava do Sul, RS 96570-000, Brazil
e-mail: carolwagner@ibest.com.br;
carolinewagner@unipampa.edu.br

Keywords Antioxidant · Devil's claw · Cerebral cortex · Catalase · Thiol levels · Lipid peroxidation

Introduction

Oxidative stress is a biological condition that occurs due to an imbalance between production of reactive oxygen species (ROS) and/or reactive nitrogen species (RNS) and antioxidant defenses. This condition has been related to numerous pathologies where ROS can contribute to their worsening by causing alterations in the cell membrane (lipid peroxidation and protein oxidation) and DNA mutations [1–3].

It is known that inflammatory process may lead to an over production of ROS and RNS, which in turn can contribute to increase tissue damage [4, 5]. Literature data have shown the relationship between the inflammation process and oxidative stress in various physiological disorders [5–9]. Agents capable of interfering with free radical generation and/or blockage of their effects in biological tissues have

therapeutic importance [10, 11]. In this context, alternative ways have been considered as adjuvant treatment of numerous diseases, mainly those associated with oxidative stress [12–15]. Thus, medicinal plants and other natural compounds have been largely studied as alternative or adjuvant treatment [16–21] with low side effects.

Nature has been a source of medical products for millennia, with many useful drugs developed from plant sources [22, 23]. According to the World Health Organization, developing countries still use traditional medicine as a primary care in treatment of many diseases [24]. Therefore, studies of medicinal plants concerning their therapeutic potential as well as possible side effects have high clinical relevance.

Harpagophytum procumbens, popularly known as devil's claw, is a perennial plant belonging to the family Pedaliaceae and originating from Southern Africa [21, 25, 26]. *H. procumbens* extracts are mainly used because of their potent anti-inflammatory and analgesic effect demonstrated in numerous studies [20, 27–32]. Recently, the National Agency for Health Surveillance (ANVISA) [33], organ that oversees and regulates the sale of drugs in Brazil, approved the use of *H. procumbens* (MS: 1.1860.0035). Due to its therapeutic action, *H. procumbens* has been indicated for the treatment of arthritis, osteoarthritis, tendonitis, and as an adjunct treatment of gout in humans.

Besides the action in inflammation and pain, other effects have been attributed to *H. procumbens*. It has been demonstrated that *H. procumbens* showed anticonvulsant activity in mice [34], antidiabetic properties in rats [31], uterotonic effect on uterine musculature of mammals [35], cholinesterase inhibition in vitro [36] and in vitro antiplasmodial effects of some components extracted from the plant [37]. Many of the pharmacological actions of *H. procumbens* have been attributed to the presence of iridoid glycosides, Harpagoside. However, another studies show the effects of *H. procumbens* are not exclusively due to the presence of harpagoside and, instead of this, their effects have been associated with the presence of other compounds present in plants, such as flavonoids [38–40]. Besides, there are few studies investigating the mechanisms by which *H. procumbens* exerts its effects, despite the wide use of this plant in humans.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of the infusion, crude extract and fractions of *H. procumbens* on oxidative stress parameters and cell viability in vitro.

Materials and Methods

Animals

Male Wistar rats (± 2 months old), weighing between 200 and 250 g, from our own breeding colony (Animal House, UFSM, Brazil) were kept in cages with free access to food and water in

a room with controlled temperature (22 ± 2 °C) and in 12 h light/dark cycle with lights on at 7:00 am. All experiments were performed in accordance to the guidelines of the National Council of Control of Animal Experimentation (CONCEA).

Drugs

Tris–HCl, thiobarbituric acid, malonaldehydebis-(dimethyl acetal)(MDA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid L-Glutathione reduced, Folin and Ciocalteu's phenol reagent, catechin, quercetin and rutin were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Hydrogen peroxide and trichloroacetic acid (TCA), sodium nitroprusside, ferrous sulfate, and hydrochloric acid were obtained from Merck (Brazil). *H. procumbens* powder was obtained commercially from Quimer Comercial LTD (São Paulo, Brazil). Methanol, acetic acid, gallic acid (GA), rosmarinic acid and caffeic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Ethyl alcohol, chloroform, *n*-butanol, ethyl acetate were acquired from Nuclear (São Paulo, Brazil).

Preparation of Infusion and Fractions

The powdered roots of *H. procumbens* were added to boiling distilled water (5 g/l), where they were packed in a closed flask protected from light. After 10 min, the infusion was filtered.

To obtain the different fractions, the powdered roots of *H. procumbens* were added to 70 % ethanol and allowed to stand at room temperature for a week with daily shaking. After filtration, the extract was evaporated under reduced pressure to remove the ethanol. The extract was then re-suspended in water and partitioned successively with chloroform, ethyl acetate and *n*-butanol (3 × 200 ml for each solvent) [41].

Quantification of Phenolic and Flavonoid Compounds by HPLC–DAD

Reverse-phase chromatographic analyses were carried out under gradient conditions using a C18 column (4.6 mm × 250 mm) packed with 5 µm diameter particles; the mobile phase was water containing 2 % acetic acid (A) and methanol (B), and the composition of the gradient was: 5 % B until 2 min and changed to obtain 25, 40, 50, 60, 70 and 100 % B at 10, 20, 30, 40, 50 and 60 min, respectively, following the method described by Laghari [42] with slight modifications. Fractions and infusion were tested at concentrations of 5 mg/ml. The flow rate was 0.8 ml/min and injection volume 40 µl, and the detection wavelengths were 254 nm for GA, 280 nm for catechin, 325 nm for caffeic and rosmarinic acids, and 365 nm for quercetin and rutin. All samples and mobile phase were

filtered through a 0.45- μm membrane filter (Millipore) and then degassed in an ultrasonic bath prior to use. Stock solutions of reference standards were prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range of 0.031–0.250 mg/ml for catechin, quercetin and rutin and 0.006–0.250 mg/ml for gallic, rosmarinic and caffeic acids. The chromatography peaks were confirmed by comparing their retention time with those of reference standards and by DAD spectra (200–500 nm). Calibration curves for the standards were: GA: $Y = 48179x + 1236.5$ ($r = 0.9989$); catechin: $Y = 32741x + 1178.3$ ($r = 0.9995$); caffeic acid: $Y = 52055x + 1178.1$ ($r = 0.9997$); rosmarinic acid: $Y = 15534x + 1284.1$ ($r = 0.9993$); rutin: $Y = 55073x + 1327.4$ ($r = 0.9998$); and quercetin: $Y = 51704x + 1265.2$ ($r = 0.9996$). All chromatography operations were carried out at ambient temperature and in triplicate. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated based on the standard deviation of the responses and the slope using three independent analytical curves, as defined by ICH (2005). LOD and LOQ were calculated as 3.3 and $10 \sigma/S$, respectively, where σ is the standard deviation of the response and S is the slope of the calibration curve. High performance liquid chromatography (HPLC–DAD) was performed with an HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) and Prominence Auto Sampler (SIL-20A), equipped with Shimadzu LC-20AT reciprocating pumps connected to the degasser DGU 20A5 with integrator CBM 20A, UV–VIS detector DAD (diode) SPD-M20A and Software LC solution 1.22 SP1.

Determination of Total Phenolic Compounds

The total phenolic content was determined by mixing the extracts with 1.25 ml of 10 % Folin-Ciocalteu's reagent (v/v), which was followed by the addition of 1.0 ml of 7.5 % sodium carbonate. The reaction mixture was incubated at 45 °C for 15 min, and the absorbance was measured at 765 nm. GA was used as standard for phenolic compounds [43].

Tissue Preparation

Rats were decapitated and cerebral (whole brain) tissue was rapidly dissected, placed on ice and weighed. Tissue was immediately homogenized in 10 Mm Tris–HCl, pH 7.4 (1:10, w:v). The homogenate was centrifuged for 10 min at $4,000 \times g$ to yield a pellet, which was discarded, and the low-speed supernatant (S1) was used for in vitro analysis.

TBARS Production

The potential to prevent lipid peroxidation in vitro by *H. procumbens* was determined pre-incubating a 200- μl

aliquot of S1 for 1 h at 37 °C, with pro-oxidant agents (SNP 5 μM and Fe^{2+} 100 μM) in the presence or absence of *H. procumbens* or GA as positive control. TBARS production was determined as described by Ohkawa [44].

Catalase

The activity of antioxidant enzyme Catalase was evaluated after pre-incubation of S1 at 37 °C for 1 h with pro-oxidant agents (Fe^{2+} or SNP) in the presence or absence of *H. procumbens* or GA. The reaction mixture was centrifuged at 3,000 rpm for 10 min and an aliquot of supernatant was used for measuring catalase activity by the method of Aebi [45], which monitors the disappearance of H_2O_2 in the presence of the brain homogenate (phosphate buffer pH 7.0 at 25 °C) at 240 nm. The enzymatic activity was expressed in $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min/g}$ tissue.

Thiol Oxidation

In this experiment, an aliquot of S1 was pre-incubated at same experimental condition of catalase (describe above) and after 1 h, the protein and non-protein thiol levels were determined according to Ellman [46]. For non-protein thiol levels, 10 % TCA was added to an aliquot of the pre-incubation, centrifuged at 3,000 rpm for 10 min and the supernatants were then used. Ellman's reagent [5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid), DTNB] was added to the samples and the formed chromogen was measured spectrophotometrically at 412 nm. Results of protein and non-protein thiols levels were expressed as $\mu\text{mol protein thiol/g}$ tissue and $\mu\text{mol non-protein thiol/g}$ tissue, respectively.

Preparation of Cortex Slices

Rats were killed by decapitation, and the cortex was dissected on ice and placed in cold saline buffer medium containing (in mM) 120 NaCl, 2 KCl, 1 CaCl_2 , 1 MgSO_4 , 25 HEPES, 1 KH_2PO_4 and 10 glucose, which was adjusted to pH 7.4 and previously aerated with O_2 [47]. Cross-sectional slices (0.4 mm thickness) were obtained using a McIlwain Tissue Chopper.

Cell Viability

Cell viability was measured using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Five cortical slices were then transferred immediately to 24-well culture plates, each well containing saline medium and pre-incubated with different pro-oxidant agents, SNP (10 μM) or Fe^{2+} (200 μM), in the presence or absence of *H. procumbens* (100, 200 or 400 $\mu\text{g/ml}$) for 60 min at 37 °C in a

water bath. GA was used as positive control (1, 5 or 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Afterwards, the slices were washed three times with cold saline medium and maintained in the last. MTT (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was added and the slices incubated for 30 min at 37 $^{\circ}\text{C}$. MTT was converted into a purple formazan after cleavage of the tetrazolium ring by mitochondrial dehydrogenases. After the incubation period, formazan crystals were dissolved by the addition of 250 μl of DMSO, and the absorbance was measured at 570 and 630 nm [48].

The total protein content in slices was determined by the method of Lowry [49], using bovine serum albumin as standard. Protein content was used to normalize MTT score.

Statistical Analysis

Data were statistically analyzed by one-way ANOVA, followed by a post hoc test when appropriate. The results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Results

HPLC Fingerprint and Determination of Total Phenolic Compounds of *H. procumbens* Infusion, Crude Extract and Fractions

HPLC fingerprinting of *H. procumbens* infusion, crude extract and fractions revealed the presence of GA (retention time- $t_R = 14.19$ min; peak 1), catechin ($t_R = 21.07$ min; peak 2), caffeic acid ($t_R = 25.37$ min; peak 3), rosmarinic acid ($t_R = 30.85$ min; peak 4), phenol glycoside ($t_R = 33.97$ min; peak 5), rutin ($t_R = 38.23$ min; peak 6) and quercetin ($t_R = 50.11$ min; peak 7), (Fig. 1; Table 1). The ethyl acetate fraction displayed the highest percentage of the main constituents identified in comparison to other fractions.

Corroborating the HPLC analysis, the quantification of phenolic compounds showed that the ethyl acetate fraction

Fig. 1 Representative high performance liquid chromatography profile of *H. procumbens* a crude extract, b chloroform fraction, c ethyl acetate fraction, d butanolic fraction and e infusion. GA (peak 1), catechin (peak 2), caffeic acid (peak 3), rosmarinic acid (peak 4), phenol glycoside (peak 5), rutin (peak 6) and quercetin (peak 7)

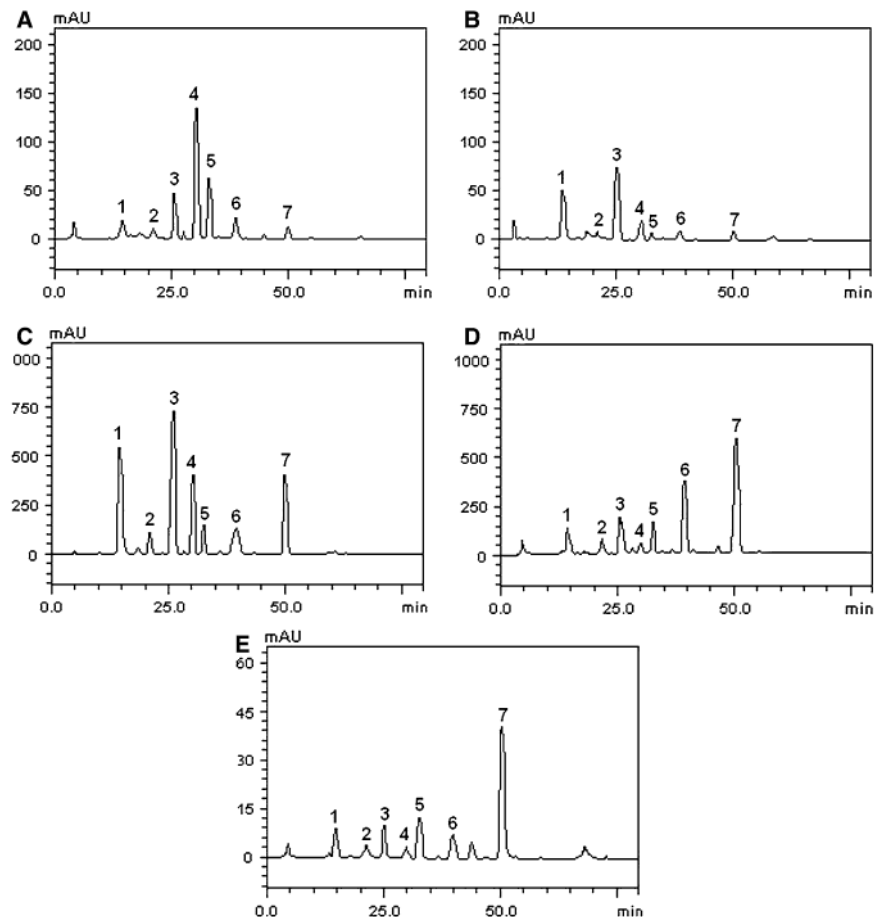


Table 1 Composition of infusion, crude extract and fractions of *H. procumbens*

HP	Gallic acid (%)	Catechin (%)	Caffeic acid (%)	Rosmarinic acid (%)	Phenol glycoside (%)*	Rutin (%)	Quercetin (%)
CE	0.35 ± 0.03 ^a	0.18 ± 0.01 ^a	1.50 ± 0.06 ^a	4.43 ± 0.05 ^a	1.78 ± 0.01 ^a	0.58 ± 0.01 ^a	0.31 ± 0.02 ^a
CF	1.62 ± 0.01 ^b	0.07 ± 0.04 ^a	2.76 ± 0.02 ^b	0.56 ± 0.01 ^b	0.10 ± 0.05 ^b	0.19 ± 0.07 ^b	0.18 ± 0.04 ^a
EAF	10.63 ± 0.08 ^c	2.59 ± 0.02 ^b	17.51 ± 0.03 ^c	8.23 ± 0.01 ^c	3.62 ± 0.05 ^c	4.94 ± 0.02 ^c	8.70 ± 0.01 ^b
BF	2.16 ± 0.09 ^d	1.19 ± 0.02 ^c	3.86 ± 0.01 ^d	0.94 ± 0.03 ^d	2.87 ± 0.06 ^d	7.31 ± 0.04 ^d	11.40 ± 0.01 ^c
I	0.72 ± 0.04 ^e	0.29 ± 0.01 ^a	0.61 ± 0.05 ^e	0.25 ± 0.04 ^b	1.46 ± 0.07 ^a	0.81 ± 0.02 ^a	3.56 ± 0.07 ^d
LOD	0.045	0.026	0.031	0.018	–	0.009	0.007
LOQ	0.148	0.085	0.102	0.060	–	0.030	0.023

Results are expressed as mean ± standard deviations (SD) of three determinations. Means followed by different letters, on each column, differ statistically by Tukey's test at $p < 0.05$

* Quantified was GA

CE crude extract, CF chloroform fraction, EAF ethyl acetate fraction, BF butanolic fraction, I infusion

Table 2 Determination of phenolic compounds in infusion, crude extract and fractions of *H. procumbens*

Method of extraction	phenol (µg GAE/mg plant) mean ± SEM
Infusion	2.37 ± 0.21 ^a
Crude extract	5.13 ± 0.44 ^b
Ethyl acetate	13.17 ± 0.50 ^c
<i>n</i> -Butanol	5.62 ± 0.09 ^b
Chloroform	4.95 ± 0.50 ^b

Results are expressed as mean ± SEM from three to four independent experiments performed in duplicate. Means followed by different letters differ by Tukey's test at $p < 0.05$

of *H. procumbens* had the highest amount of total phenolic compounds, which was statistically different when compared to the other extracts tested. In contrast, *H. procumbens* infusion showed the least amount of these compounds in relation to the other extracts (Table 2).

Effects of *H. procumbens* on Oxidative Stress Parameters

Iron induced a significant increase in brain lipid peroxidation as demonstrated by the increase in TBARS formation ($p < 0.001$) when compared to basal level. Crude extract, fractions and infusion of *H. procumbens* significantly inhibited Fe²⁺-induced TBARS formation in brain homogenate preparations in a concentration-dependent manner ($p < 0.001$). However, the inhibitory potency varied according to extract preparation. The potency order was ethyl acetate > chloroform > *n*-butanol > crude extract > infusion (Fig. 2; Table 3).

SNP induced an increase in TBARS production ($p < 0.001$) in brain preparations when compared to basal level, which was significantly inhibited by the crude extract, fractions and infusion of *H. procumbens* in a concentration dependent manner. The order of inhibitory potency between fractions was ethyl acetate > crude extract =

n-butanol > chloroform > infusion (Fig. 3; Table 3). GA was able to protect against lipid peroxidation induced by both pro oxidants (Figs. 2, 3). In comparison, the IC50 values obtained with GA were similar to those obtained with the ethyl acetate fraction (Table 3).

Statistical analyses revealed that pro oxidant agents used were able to decrease catalase activity (Fig. 4a, $p < 0.001$ and Fig. 4b, $p < 0.05$) and both protein (Fig. 5a, $p < 0.001$ and Fig. 5b, $p < 0.05$) and non-protein thiol levels (Fig. 5c, $p < 0.001$ and Fig. 5d, $p < 0.01$) when compared to basal level. Ethyl acetate fraction prevented the consumption of catalase, induced by Fe²⁺ (Fig. 4a, $p < 0.01$) or SNP (Fig. 4b, $p < 0.05$). Similarly to catalase, ethyl acetate fraction was effective in preventing the oxidation of thiols induced by both pro-oxidant tested (Fig. 5a and 5c, $p < 0.001$; Fig. 5b and 5d, $p < 0.01$). GA has also been able to protect against the consumption of catalase and thiol content.

Effects of *H. procumbens* Ethyl Acetate Fraction on Cell Viability of Cortex Slices Submitted to Different Pro-oxidants

Since the ethyl acetate fraction had the highest phenolic content and antioxidant effects, we tested its effect on cell viability. The MTT assay showed that the pro-oxidants used caused a significant decrease in cell viability (Fig. 6). The ethyl acetate fraction significantly prevented cell damage induced by Fe²⁺ (Fig. 6a) and SNP (Fig. 6b) in slices of rat cerebral cortex. GA was also able to prevent cell damage induced by both pro-oxidants.

Discussion

Harpagophytum procumbens is a plant widely used by population due to its anti-inflammatory and analgesic

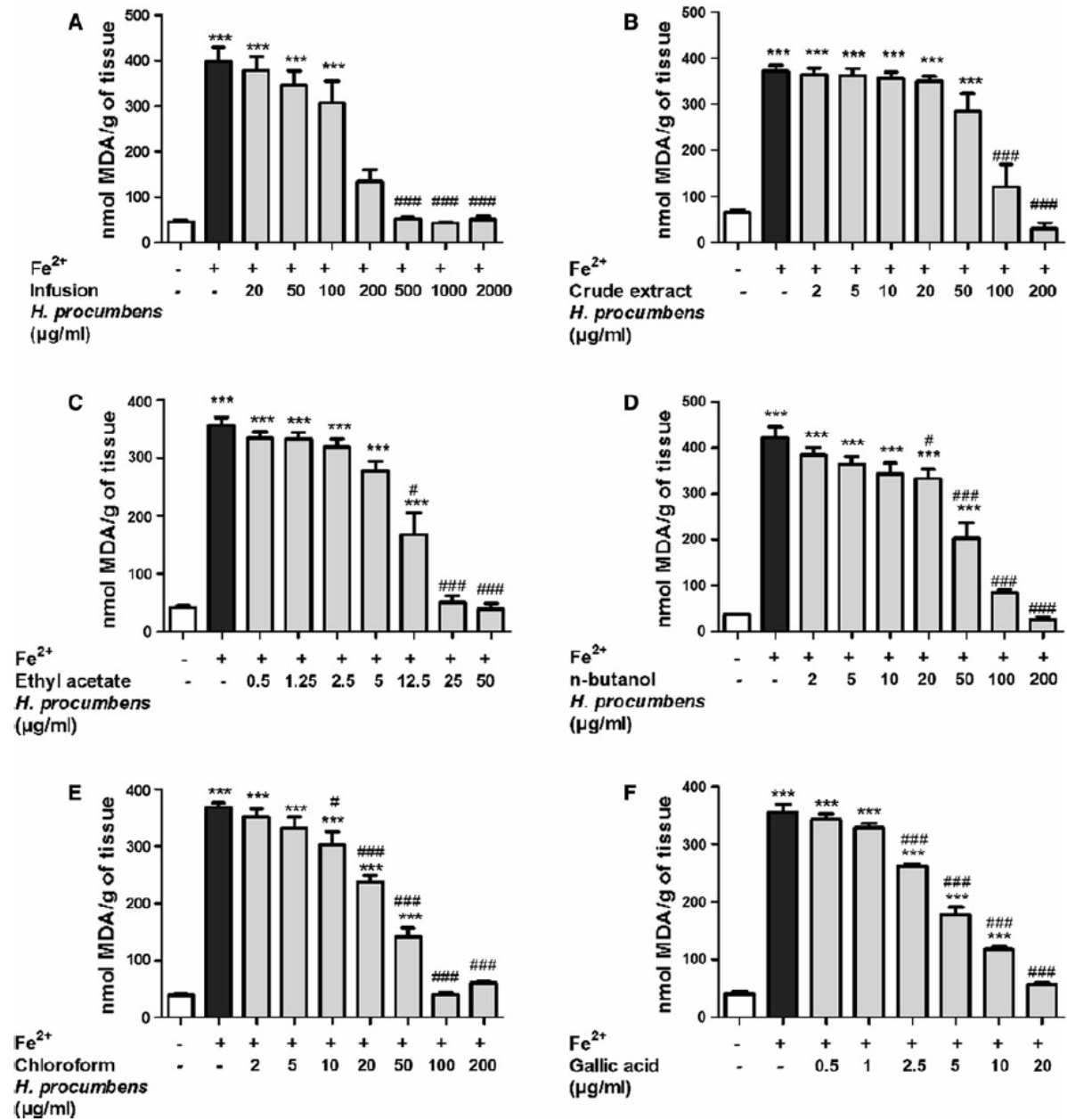


Fig. 2 Effects of infusion (a), crude extract (b) and fractions (c ethyl acetate, d *n*-butanol, e chloroform) of *H. procumbens* on basal (control) or Fe²⁺ (100 µM)-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates. GA was used as a control antioxidant (f). Data show

mean ± SEM from three to four independent experiments performed in duplicate. One-way ANOVA followed by Dunnett's test. *, **, *** Significant differences compared to basal and #, ##, ### Significant differences in relation to that induced by Fe²⁺

action [50]. However, little is known about the mechanism of its pharmacological action. It is demonstrated that there is a strong relationship between inflammation and oxidative stress in the affected site [4, 5, 51]. It is known that brain is particularly vulnerable to oxidative stress due to its high content of polyunsaturated fatty acids and high

oxygen consumption. Furthermore, the brain has low levels of antioxidant enzymes (e.g., catalase and glutathione peroxidase), which further facilitates the establishment of an oxidative state in brain cells [1, 52]. Here, GA was used as a positive control because it is a phytochemical compound well known in the literature, due to their antioxidant

Table 3 IC₅₀ (µg/ml) values for inhibition by infusion, crude extract and fractions of *H. procumbens* of TBARS production induced by different pro-oxidants in rat brain preparations

Method of extraction	Pro-oxidants	
	Fe ²⁺	SNP
Infusion	158.40 ± 4.23 ^a	37.20 ± 4.37 ^a
Crude extract	87.33 ± 10.39 ^b	5.15 ± 0.27 ^b
Ethyl acetate	11.07 ± 1.32 ^c	0.95 ± 0.005 ^c
<i>n</i> -Butanol	49.92 ± 3.56 ^d	6.41 ± 1.43 ^b
Chroform	37.81 ± 4.44 ^d	10.41 ± 0.40 ^b
Gallic acid	5.02 ± 0.59 ^e	0.61 ± 0.13 ^c

Results are expressed as mean ± SEM from three to four independent experiments performed in duplicate. Means followed by different letters, on each column, differ statistically by Tukey's test at $p < 0.05$

characteristics. Furthermore, it is present in all of our extracts, being in greater quantity in the ethyl acetate fraction.

Thus, our first aim in the present study was to evaluate the effects of *H. procumbens* on brain lipid peroxidation induced by different pro-oxidants and compare its effects with GA. All *H. procumbens* extracts were able to prevent lipid peroxidation induced by SNP or iron in brain homogenates.

Lipid peroxidation caused by different pro-oxidant agents was easily prevented by *H. procumbens* crude extract, infusion or its fractions, indicating that the plant has a good antioxidant activity in vitro. In the present study, *H. procumbens* demonstrated a higher capacity to protect against lipid peroxidation induced by SNP than by iron, as showed by the IC₅₀ results (Table 3). These result is in agreement with Wagner [53], that showed the highest effect of quercitrin to protect against lipid peroxidation induced by SNP than by other pro-oxidants.

Corroborating the findings on the TBARS test, the fingerprint of the extracts by HPLC showed different amounts of phenolic and flavonoid compounds in different extracts. Ethyl acetate fraction had the highest quantity of these compounds followed by butanolic fraction. This result has been demonstrated in other studies since these solvents can extract a greater amount of antioxidant compounds [41, 54, 55]. In addition, the ethyl acetate fraction showed a high index of total phenolic compounds, and its IC₅₀ value was significantly lower than the other extracts. Also, the ethyl acetate fraction exhibited the highest activity against lipid peroxidation induced by both pro-oxidants used compared with other extracts. This relationship between phenolic compounds and antioxidant activity has already been described by several authors [12, 13, 53, 55].

Considering that the ethyl acetate fraction showed the highest capability against lipid peroxidation and the highest quantity and variety of antioxidants compounds, our second

objective was to investigate whether it would be able to protect against possible damage in antioxidants defenses induced by Fe²⁺ or SNP, we decided to analyze the catalase activity and thiol levels (protein and non-protein).

The ethyl acetate fraction was also able to protect against a decrease of catalase activity and thiol levels. These markers are consumed in response to cellular oxidative stress. These results are in agreement with Bhattacharya and Bhattacharya [56], which demonstrated a dose-dependent increase in the activity of catalase and glutathione peroxidase in brain of rats treated with *H. procumbens* extract for 14 days. Another study showed that flavonoids such as quercetin and genistein were able to prevent the loss of reduced glutathione induced by copper and iron in U937 cells in vitro [57]. Furthermore, it is noteworthy that the results obtained from the ethyl acetate fraction were similar to those obtained with GA, demonstrating its high potential to protect against oxidative damage (Figs. 2, 3, 4, 5).

To check if the ethyl acetate fraction would act on a system with viable cells, we decided to investigate a possible protection against decrease in cell viability induced by iron or SNP in rat brain cortical slices.

In our study, the MTT assay showed that the *H. procumbens* ethyl acetate fraction had the ability to prevent the loss in cell viability induced by both pro-oxidants used (iron or SNP), which are able to generate reactive species, establishing the oxidative process and leading to cell death [2]. Therefore, *H. procumbens* acts either by preventing oxidative stress or loss of cell viability.

It is known that SNP causes cytotoxicity via either release of cyanide and/or nitric oxide (NO) [58–61]. Indeed, SNP is a good chemical inducer of lipid peroxidation [53], since it rapidly releases NO• in tissue preparations [58]. This radical easily produces peroxynitrite (ONOO⁻) and superoxide anion radical (O₂•⁻), thus leading to lipid peroxidation and production of additional free radicals [62].

Similar to the SNP, iron can cause cytotoxic effects, such as by catalyzing the decomposition of H₂O₂ with the formation of hydroxyl radical (OH) [63], which is normally considered the most reactive and damaging intermediate produced during cellular metabolism [63–66]. Besides, free iron is found in increased levels in some degenerative diseases [67, 68]. However, in a non-hazardous way, iron plays an important function in the respiratory chain, where its oxidation and reduction transports the electrons derived from food oxidation to molecular oxygen (O₂) [69].

There are literature data showing that flavonoids naturally present in plants have chelating capacity, thereby preventing oxidative cellular damage [53, 70, 71]. In this study the iron-induced oxidative damage on lipids and different extracts of *H. procumbens* were able to prevent

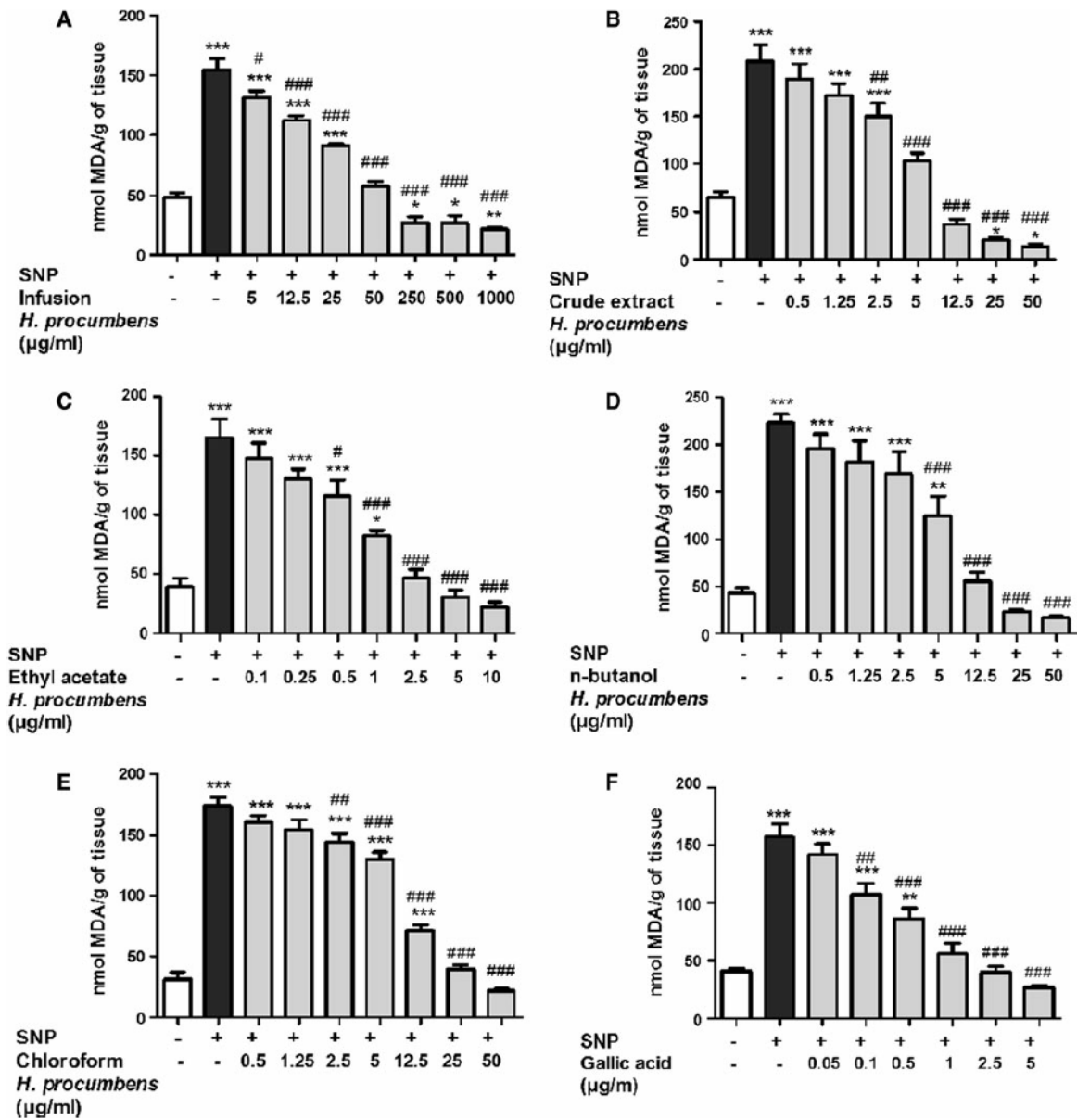


Fig. 3 Effects of infusion (a), crude extract (b) and fractions (c Ethyl acetate, d *n*-butanol, e Chloroform) of *H. procumbens* on basal (control) or SNP (5 µM)-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates. GA was used as control antioxidant (f). Data show

mean ± SEM from three to four independent experiments performed in duplicate. One way ANOVA followed by Dunnett's test. *, **, *** Significant differences compared to basal and #, ##, ### Significant differences in relation to induced by SNP

lipid peroxidation. In all extracts, flavonoids such as rutin and quercetin were found. A possible protection mechanism of *H. procumbens* could be through chelation of iron by flavonoids, preventing the formation of (OH) in Fenton reactions.

Previously published data have shown that the efficacy of *H. procumbens* is dependent on the mixture of a variety

and amount of compounds present in plants and not just a single active component, such as harpagoside [39, 40, 72]. Kaszkin and collaborators [39], evaluated the anti-inflammatory and antioxidant activity by testing extracts containing high and low concentrations of harpagoside as well as harpagoside alone. As result, they showed that the best effect occurs in the presence of extracts with high

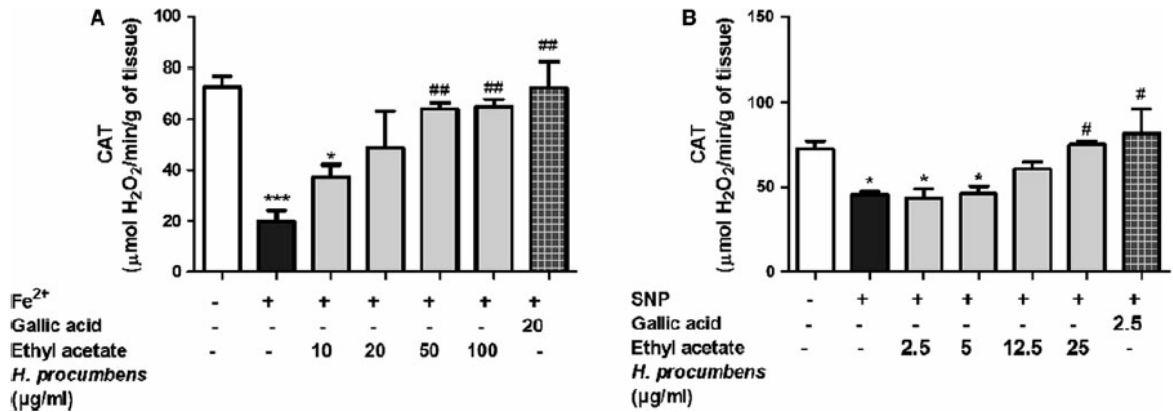


Fig. 4 Effects of *H. procumbens* ethyl acetate fraction on catalase levels of rat brain homogenates submitted to the action of different pro-oxidant agents: a Fe²⁺ (100 µM) and b SNP (5 µM). GA was used as control antioxidant. Data show mean ± SEM from three to four

independent experiments performed in duplicate. One way ANOVA followed by Dunnett's test. *, **, *** Significant differences compared to basal and #, ##, ### Significant differences in relation to pro-oxidant agent

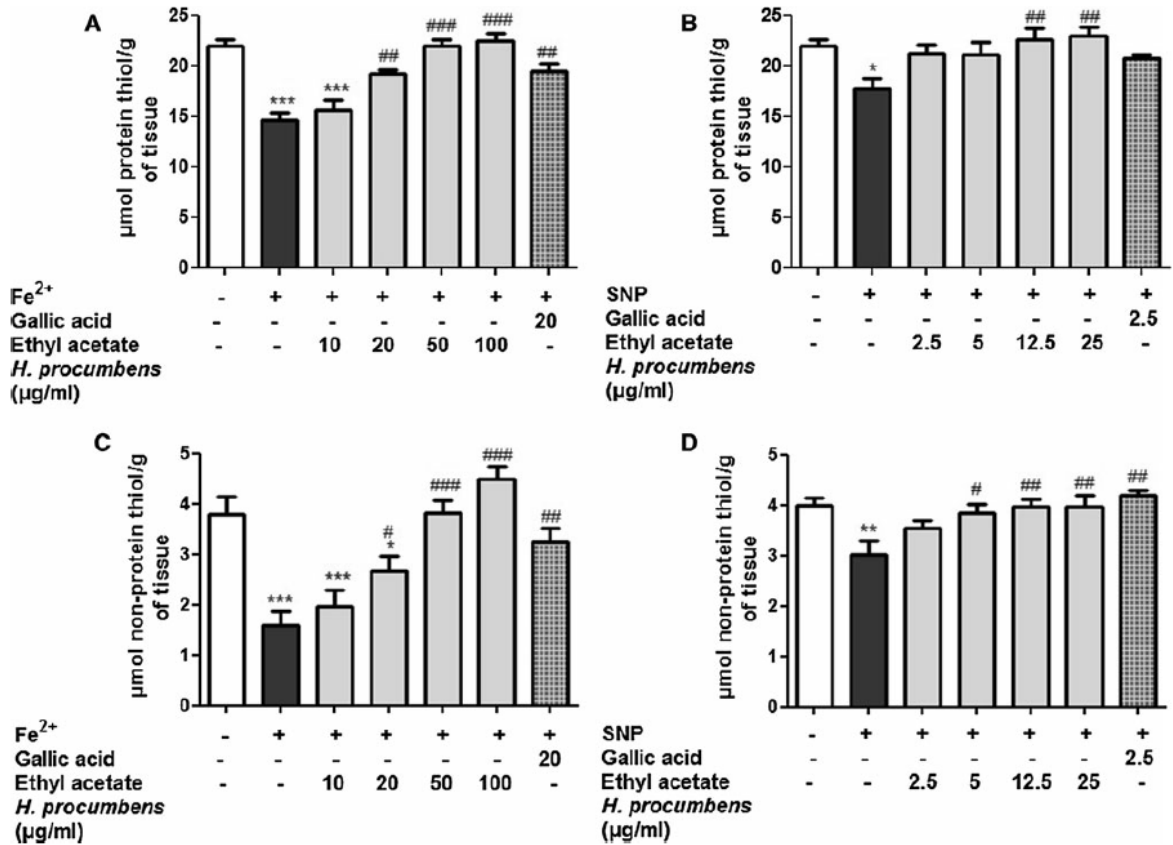


Fig. 5 Effects of *H. procumbens* ethyl acetate fraction on thiols content (protein and non-protein) of rat brain homogenates submitted to the action of different pro-oxidant agents. Protein thiol oxidation induced by Fe²⁺ (a) and induced by SNP(b). Non-protein thiol: Induced by Fe²⁺ (c) + and induced by SNP (d). GA was used as

control antioxidant. Data show mean ± SEM from three to four independent experiments performed in duplicate. One way ANOVA followed by Dunnett's test. *, **, *** Significant differences compared to basal and #, ##, ### Significant differences in relation to pro-oxidant agent

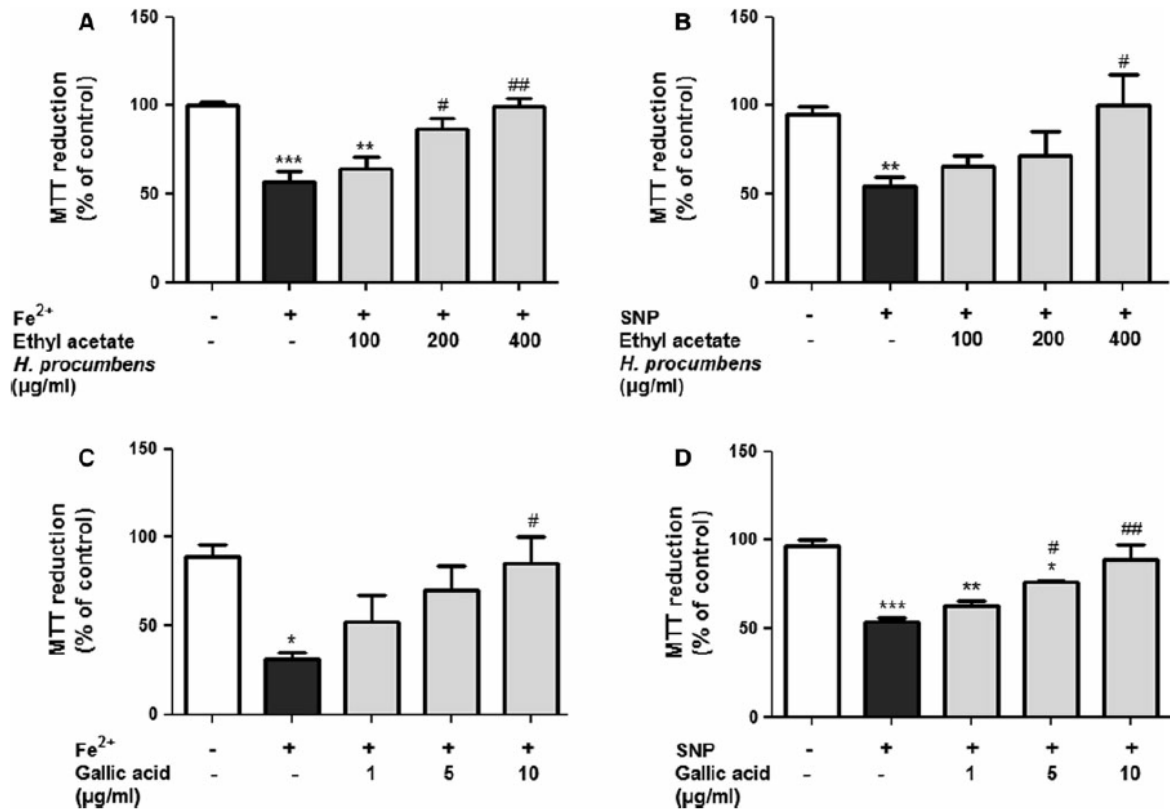


Fig. 6 Effects of *H. procumbens* ethyl acetate fraction on cell viability of rat brain cortical slices submitted to the action of different pro-oxidant agents: **a** Fe²⁺ (200 μM) and **b** SNP (10 μM). Cell viability was analyzed by quantification of MTT reduction. The data were corrected for the total amount of protein contained in the slices and were expressed as percentage of the control (considered as

100 %). GA was used as control antioxidant (c and d). Data show mean ± SEM from three to four independent experiments performed in duplicate. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Dunnett's test. *, **, *** compared to basal and #, ##, ### represent differences in relation to that induced with pro-oxidant agents

concentrations of harpagoside. However, when harpagoside was tested alone, there was no effect, showing that the effectiveness of *H. procumbens* is due to the presence of several compounds.

Conclusion

In conclusion, all extracts of *H. procumbens* tested in this study were able to prevent either oxidative stress and loss of cell viability induced by well known pro-oxidant agents. These results are interesting, because this plant is widely used for the treatment of diseases related to inflammatory processes that generate painful stimuli, and the exact mechanism by which it exerts its therapeutic effect is not well elucidated. Our findings showed the high antioxidant capacity of *H. procumbens* through in vitro tests, and this effect can thus be related to the therapeutic effect of this plant. However, more studies must be performed to

investigate its mechanism of action with the aim of exploring the whole therapeutic potential of *H. procumbens*.

Acknowledgments Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Foundation for Research of the State of Rio Grande do Sul (FAPERGS-PRONEM #11/2029-1), Department of Science and Technology (DECIT), Secretariat of Science and Technology and Strategic Inputs.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Duffy S, So A, Murphy TH (1998) Activation of endogenous antioxidant defenses in neuronal cells prevents free radical-mediated damage. *J Neurochem* 71:69–78
- Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408:239–247

3. Silva JP, Coutinho OP (2010) Free radicals in the regulation of damage and cell death—basic mechanisms and prevention. *Drug Discov Ther* 4:144–167
4. Guzik TJ, Korbut R, Adamek-Guzik T (2003) Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 54:469–487
5. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB (2010) Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med* 49:1603–1616
6. Chen BT, Li WX, He RR, Li YF, Tsoi B, Zhai YJ, Kurihara H (2012) Anti-inflammatory effects of a polyphenols-rich extract from tea (*Camellia sinensis*) flowers in acute and chronic mice models. *Oxid Med Cell Longev* (In press)
7. De Sanctis S, Marcovecchio ML, Gaspari S, Del Torto M, Mohn A, Chiarelli F, Breda L (2013). Etanercept Improves Lipid Profile and Oxidative Stress Measures in Patients with Juvenile Idiopathic Arthritis. *J Rheumatol* (In press)
8. Kim YW, West XZ, Byzova TV (2013) Inflammation and oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *J Mol Med* 91:323–328
9. Popolo A, Autore G, Pinto A, Marzocco S (2013) Oxidative stress in patients with cardiovascular disease and chronic renal failure. *Free Rad Res* 47:346–356
10. Babior BM (2000) Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 109:33–44
11. Grant L, McBean DE, Fyfe L, Warnock AM (2009) The Inhibition of free radical generation by preparations of *Harpagophytum procumbens* In Vitro. *Phytother Res* 23:104–110
12. Pereira RP, Fachineto R, de Souza Prestes A, Puntel RL, da Santos Silva GN, Heinzmann BM, Boschetti TK, Athayde ML, Bürger ME, Morel AF, Morsch VM, Rocha JB (2008) Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citrates*. *Neurochem Res* 34:973–983
13. Peroza LR, Busanello A, Leal CQ, Röpke J, Boligon AA, Meinerz D, Libardoni M, Athayde ML, Fachineto R (2013) *Bauhinia forficata* prevents vacuuous chewing movements induced by haloperidol in rats and has antioxidant potential In Vitro. *Neurochem Res* 38:789–796
14. Tripathi UN, Chandra D (2009) The plant extracts of *Momordica charantia* and *Trigonella foenum-graecum* have anti-oxidant and anti-hyperglycemic properties for cardiac tissue during diabetes mellitus. *Oxid Med Cell Longev* 2:290–296
15. Yadav SK, Prakash J, Chouhan S, Singh SP (2013) *Mucuna pruriens* seed extract reduces oxidative stress in nigrostriatal tissue and improves neurobehavioral activity in paraquat-induced Parkinsonian mouse model. *Neurochem Int* 62:1039–1047
16. Busanello A, Peroza LR, Wagner C, Sudati JH, Pereira RP, de Prestes AS, Rocha JB, Fachineto R, Barbosa NB (2012) Resveratrol reduces vacuuous chewing movements induced by acute treatment with fluphenazine. *Pharmacol Biochem Behav* 101:307–310
17. Elmann A, Teleman A, Mordechay S, Erlank H, Ofir R (2012) Antioxidant and astroprotective effects of a *Pulicaria incisa* infusion. *Oxid Med Cell Longev* (In press)
18. Sudati JH, Fachineto R, Pereira RP, Boligon AA, Athayde ML, Soares FA, de Vargas Barbosa NB, Rocha JB (2009) In vitro antioxidant activity of valeriana officinalis against different neurotoxic agents. *Neurochem Res* 34:1372–1379
19. Reckziegel P, Peroza LR, Schaffer LF, Ferrari MC, de Freitas CM, Bürger ME, Fachineto R (2013) Gallic acid decreases vacuuous chewing movements induced by reserpine in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 104:132–137
20. Warnock M, McBean D, Suter A, Tan J, Whittaker P (2007) Effectiveness and safety of devil's claw tablets in patients with general rheumatic disorders. *Phytother Res* 21:1228–1233
21. van Wyk BE (2008) A broad review of commercially important southern African medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 119:342–355
22. Cragg GM, Newman DJ (2013) Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta* 1830:3670–3695
23. Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarto DD, Guo Z (1985) Medicinal plants in therapy. *Bull World Health Organ* 63:965–981
24. World Health Organization (1998) Regulatory situation of herbal medicines: a worldwide review. Geneva, p 45
25. Gericke N (2002) Plants, products and people” Southern African perspectives. *Ethnomed. and Drug Discov* 13:155–162
26. Wegener T (2000) Devil's claw: from African traditional remedy to modern analgesic and antiinflammatory. *Herbal Gram* 50:47–54
27. Andersen ML, Santos EH, Seabra Mde L, da Silva AA, Tufik S (2004) Evaluation of acute and chronic treatments with *Harpagophytum procumbens* on Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *J Ethnopharmacol* 91:325–330
28. Anauate MC, Torres LM, de Mello SB (2010) Effect of isolated fractions of *Harpagophytum procumbens* D.C. (Devil's Claw) on COX-1, COX-2 activity and nitric oxide production on whole-blood assay. *Phytother Res* 24:1365–1369
29. Fiebich BL, Muñoz E, Rose T, Weiss G, McGregor GP (2012) Molecular targets of the antiinflammatory *Harpagophytum procumbens* (Devil's claw): inhibition of TNF α and COX-2 gene expression by preventing activation of AP-1. *Phytother Res* 26:806–811
30. Laudahn D, Walper A (2001) Efficacy and tolerance of *Harpagophytum* extract LI 174 in patients with chronic non-radicular back pain. *Phytother Res* 15:621–624
31. Mahomed IM, Ojewole JAO (2004) Analgesic, antiinflammatory and antidiabetic properties of *Harpagophytum procumbens* DC (Pedaliaceae) secondary root aqueous extract. *Phytother Res* 18:982–989
32. Uchida S, Hirai K, Hatanaka J, Hanato J, Umegaki K, Yamada S (2008) Antinociceptive effects of St. John's Wort, *Harpagophytum Procumbens* extract and grape seed Proanthocyanidins extract in mice. *Biol Pharm Bull* 31:240–245
33. ANVISA—National Agency for Health Surveillance. Available in: [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM\[34661-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[34661-1-0].PDF). Accessed 26 Jun 2012
34. Mahomed IM, Ojewole JAO (2006) Anticonvulsant activity of *Harpagophytum procumbens* DC [Pedaliaceae] secondary root aqueous extract in mice. *Brain Res Bull* 69:57–62
35. Mahomed IM, Ojewole JAO (2009) Uterotonic effect of *Harpagophytum procumbens* DC (Pedaliaceae) secondary root aqueous extract on rat isolated uterine horns. *J Smooth Muscle Res* 45:231–239
36. Georgiev MI, Alipieva K, Orhan IE (2012) Cholinesterases inhibitory and antioxidant activities of *Harpagophytum procumbens* from In Vitro systems. *Phytother Res* 26:313–316
37. Clarkson C, Campbell WE, Smith P (2003) In vitro Antiplasmodial activity of abietane and totarane diterpenes Isolated from *Harpagophytum procumbens* (Devil's Claw). *Planta Med* 69:720–724
38. Brien S, Lewith GT, McGregor G (2006) Devil's claw (*Harpagophytum procumbens*) as a treatment for osteoarthritis: a review of efficacy and safety. *J Altern Complem Med* 12:981–993
39. Kaszkin M, Beck KF, Koch E, Erdelmeir C, Kusch S, Pfeilschifter J, Loew D (2004) Downregulation of iNOS expression in rat mesangial cells by special extracts of *Harpagophytum procumbens* derives from harpagoside-dependent and independent effects. *Phytomedicine* 11:585–595

40. Mncwangi N, Chen W, Vermaak I, Viljoen AM, Gericke N (2012) Devil's Claw—A review of the ethnobotany, phytochemistry and biological activity of *Harpagophytum procumbens*. *J Ethnopharm.* 143:755–771
41. Boligon AA, Pereira RP, Feltrin AC, Machado MM, Janovic V, Rocha JB, Athayde ML (2009) Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. *Bior Tech* 100:6592–6598
42. Laghari AH, Memon S, Nelofar A, Khan KM, Yasmin A (2011) Determination of free phenolic acids and antioxidant activity of methanolic extracts obtained from fruits and leaves of *Chenopodium album*. *Food Chem* 126:1850–1855
43. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Meth Enzymol* 299:152–178
44. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351–358
45. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126
46. Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82:70–77
47. Almeida LMV, Leite MC, Thomazi AP, Battu C, Nardin P, Tortorelli LS, Zanotto C, Posse T, Wofchuk ST, Leal RB, Gonçalves CA, Gottfried C (2008) Resveratrol protects against oxidative injury induced by H₂O₂ in acute hippocampal slice preparations from Wistar rats. *Arch Biochem Biophys* 480:27–32
48. Rigon AP, Cordova FM, Oliveira CS, Posser T, Silva IG, Costa AP, Santos DA, Rossi FM, Rocha JB, Leal RB (2008) Neurotoxicity of cadmium on immature hippocampus and a neuroprotective role for p38^{MAPK}. *Neurotoxicology* 29:727–734
49. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
50. Grant L, McBean DE, Fyfe L, Warnock AM (2007) A Review of the biological and potential therapeutic actions of *Harpagophytum procumbens*. *Phytother Res* 21:199–209
51. Yadav UC, Ramana KV (2013) Regulation of NF-κB-induced inflammatory signaling by lipid peroxidation-derived aldehydes. *Oxid Med Cell Longev* (In press)
52. Smith JA, Park S, Krause JS, Banik NL (2013) Oxidative stress, DNA damage, and the telomeric complex as therapeutic targets in acute neurodegeneration. *Neurochem Int* 62:764–775
53. Wagner C, Fachinotto R, Dalla Corte CL, Brito VB, Severo D, de Oliveira Costa Dias G, Morel AF, Nogueira CW, Rocha JB (2006) Quercitrin, a glycoside form of quercetin, prevents lipid peroxidation in vitro. *Brain Res* 1107:192–198
54. Schubert A, Pereira DF, Zanin FF, Alves SH, Beck RC, Athayde ML (2007) Comparison of antioxidant activities and total polyphenolic and methylxanthine contents between the unripe fruit and leaves of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. *Pharmazie* 62:876–880
55. Tung YT, Wu JH, Huang CY, Kuo YH, Chang ST (2009) Antioxidant activities and phytochemical characteristics of extracts from *Acacia confusa* bark. *Bioresour Technol* 100:509–514
56. Bhattacharya A, Bhattacharya S (1998) Anti-oxidant activity of *Harpagophytum procumbens*. *British J Phytother* 5:2
57. Boadi WY, Iyere PA, Adunyah SE (2005) In vitro exposure to quercetin and genistein alters lipid peroxides and prevents the loss of glutathione in human progenitor mononuclear (U937) cells. *J Appl Toxicol* 25:82–88
58. Bates JN, Baker MT, Guerra R, Harrison DG (1991) Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. *Biochem Pharmacol* 42:157–165
59. Chen J, Chang B, Williams M, Murad F (1991) Sodium nitroprusside degenerates cultured rat striatal neurons. *Neuro Report* 2:121–123
60. Dawson VL, Dawson TM, London ED, Brecht DS, Snyder SH (1991) Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci U SA* 88:6368–6371
61. Rauhala P, Khaldi A, Mohanakumar KP, Chiueh CC (1998) Apparent role of hydroxyl radicals in oxidative brain injury induced by sodium nitroprusside. *Free Radical Biol Med* 24:1065–1073
62. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci* 87:1620–1624
63. Farina M, Avila DS, da Rocha JB, Aschner M (2013) Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. *Neurochem Int* 62:575–594
64. Gutteridge JM (1984) Reactivity of hydroxyl and hydroxyl-like radicals discriminated by release of thiobarbituric acid-reactive material from deoxy sugars, nucleosides and benzoate. *Biochem J* 224:761–767
65. Halliwell B (1984) Oxygen radicals: a commonsense look at their nature and medical importance. *Med Biol* 62:71–77
66. Halliwell B (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59:1609–1623
67. Aisen P, Wessling-Resnick M, Leibold EA (1999) Iron metabolism. *Curr Opin Chem Biol* 3:200–206
68. Swaiman KF (1991) Hallervorden-Spatz and brain iron metabolism. *Arch Neurol* 48:1285–1293
69. Levi S, Rovida E (2009) The role of iron in mitochondrial function. *Biochim Biophys Acta* 1790:629–636
70. Harris ML, Shiller HJ, Reilly PM, Donowitz M, Grisham MB, Bulkley GB (1992) Free-radicals and other reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel-disease—cause, consequence or epiphenomenon. *Pharma Ther* 53:375–408
71. Omololu PA, Rocha JB, Kade IJ (2011) Attachment of rhamnosyl glucoside on quercetin confers potent iron-chelating ability on its antioxidant properties. *Exp Toxicol Pathol* 63:249–255
72. Abdelouahab N, Heard C (2008) Effect of the major glycosides of *Harpagophytum procumbens* (Devil's Claw) on epidermal cyclooxygenase-2 (COX-2) in Vitro. *J Nat Prod* 71:746–749

3.2 Dados adicionais

3.2.1 Métodos

3.2.1.1 Materiais e equipamentos

Os produtos químicos utilizados eram de grau analítico. O metanol foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha) e o Harpagosídeo ($\geq 95,0\%$ para HPLC) foi adquirido da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) foi realizada com um Shimadzu Prominence com auto injetor (Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com bombas alternativas Shimadzu LC-20AT conectadas a um desgaseificador DGU 20A5 com a CBM 20A integrador, SPD-M20A detector diodo de arranjo e solução de software SP1 LC 1,22.

3.2.1.2 Quantificação de harpagosídeo por CLAE

As análises cromatográficas foram realizados em fase reversa utilizando uma coluna C18 (4,6 mm x 250 milímetros) empacotada com partículas de 5 μm de diâmetro. A eluição foi isocrática utilizando uma fase móvel composta por água destilada: metanol (50:50, v/v), seguindo o método descrito por Babili et al. (2012), com algumas modificações. O extrato bruto e as frações de *H. procumbens* foram testadas em concentrações de 10 mg/mL. O volume de injeção foi de 50 μl e o comprimento de onda utilizado foi 278 nm. As amostras e a fase móvel foram filtradas através de um filtro de membrana de 0,45 μm (Millipore), e em seguida desgaseificada por banho ultrasônico antes da utilização. Uma solução com o padrão de referencia harpagosídeo foi usada na fase móvel de HPLC em várias concentrações de 0,010-0,250 mg/ml. Curva de calibração para harpagosídeo: $Y =$

$23719x + 1248,3$ ($r = 0,9995$). Todas as operações de cromatografia foram realizadas a temperatura ambiente e em triplicata. O limite de detecção (LOD) e do limite de quantificação (LOQ) foram calculados com base no desvio padrão das amostras e na inclinação por meio de três curvas analíticas independentes, tal como definidos pela Boligon et al. (2013). LOD e LOQ foram calculados como $\sigma 3,3$ e $10\sigma/S$, respectivamente, onde σ é o desvio padrão da resposta e S é o declive da curva de calibração.

3.2.1.3 Análise estatística

Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida de teste post hoc de Tukey. As análises foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3.2.2 Resultados

A análise por HPLC do extrato bruto e frações de *H. procumbens* revelou a presença de harpagosídeo (Tempo de retenção – $t_R = 7.93$ min; pico 1) (Figura 7 e Tabela 4). Porém, foi na fração acetato de etila de *H. procumbens* seguida da fração butanólica que encontramos maiores concentrações do desde constituinte (Tabela 4).

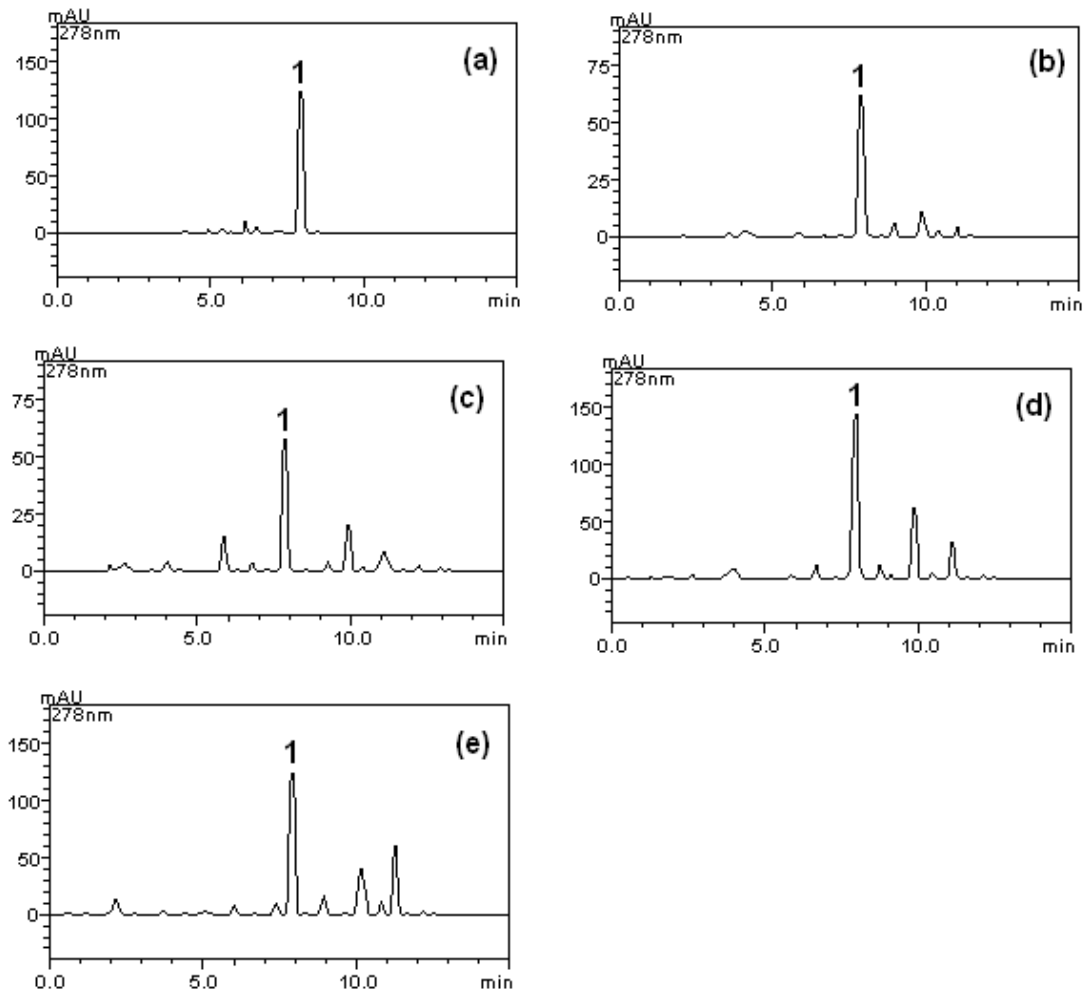


Figura 7: Cromatogramas a 278 nm do harpagosídeo (pico 1), glicosídeo iridóide do *Harpagophytum procumbens*. (a) harpagosídeo padrão, (b) extrato bruto, (c), fração clorofórmio, (d) A fração acetato de etila e (e) fração butanólica.

Tabela 4 – Determinação do harpagosídeo no extrato bruto e frações de *Harpagophytum procumbens*.

<i>H. procumbens</i>	Harpagosídeo	
	mg/g da fração seca	%
Extrato bruto	16.07 ± 0.02 a	1.60
Fração clorofórmio	15.89 ± 0.03 a	1.58
Fração acetate de etila	35.73 ± 0.04 b	3.57
Fração butanólica	30.16 ± 0.09 c	3.01
LOD (µg/mL)	0.013	
LOQ (µg/mL)	0.042	

Os resultados foram expressos como média ± desvio-padrão (SD) de três determinações. Médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey considerando $p < 0,05$. LOD: Limite de detecção e LOQ: limite de quantificação

3.2.3 Discussão

O harpagosídeo tem sido proposto como principal constituinte do *H. procumbens*, sendo que este, por sua vez teria ação central na atividade terapêutica desta planta. A quantidade de harpagosídeo presente na raiz da planta é usada para determinar a qualidade dos tubérculos secos fornecidos para a comercialização, sendo reconhecido pela Farmacopéia Européia (2004) não menos que 1.2% de harpagosídeo presente nos tubérculos de *H. procumbens*, calculado com referência à planta seca (STEWART; COLE, 2005; BRIEN et al., 2006; ABDELOUAHAB; HEARD, 2007; MNCWANGI et al., 2012; GEORGIEV et al., 2013). Contudo, existem estudos que vem demonstrando que outros componentes presentes no *H. procumbens* teriam grandes influencias em sua ação terapêutica. De fato, a presença do harpagosídeo no *H. procumbens* é importante para a obtenção dos efeitos anti-inflamatórios desta planta, porém este constituinte possivelmente estaria

agindo de forma sinérgica com demais componentes presente no *H. procumbens* para conseguir induzir o seu efeito inibitório máximo contra principalmente a inflamação (LOEW et al., 2001; KASZKIN et al., 2004; GEORGIEV et al., 2013). Além disso, foi demonstrado que extratos sem a presença do harpagosídeo também foram capazes de inibir a indução da iNOS porém em menor proporção do que quando testado com a presença do harpagosídeo, demonstrando mais uma vez o possível sinergismo realizado pelos constituintes do *H. procumbens*. Vale salientar que neste mesmo estudo o harpagosídeo foi testado isoladamente e não obteve resultados inibitórios na indução da iNOS (KASZKIN et al., 2004).

Deste modo, sabendo que o harpagosídeo é descrito como principal iridóide presente no *H. procumbens*, a quantificação deste componente bioativo, no extrato bruto e frações da espécie se tornam importantes. Aqui, nós obtivemos bons resultados com a fração acetato de etila de *H. procumbens* com relação à diminuição do estresse oxidativo induzido bem como prevenção da perda da viabilidade celular *in vitro*. Nesse contexto, a análise por HPLC dos extratos, demonstraram que foi nesta fração que continha maior quantidade de harpagosídeo, além de altas quantidades de compostos fenólicos, podendo estes serem os responsáveis pelos bons resultados obtidos por esta fração neste estudo. Nossos resultados estão de acordo com outros autores que realizaram a quantificação do harpagosídeo em extratos de *H. procumbens* (SCHMIDT, 2005; ABDELOUAHAB; HEARD, 2008).

4 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

De acordo com os resultados apresentados nesta dissertação podemos concluir que:

- As análises da infusão, extrato bruto e frações de *H. procumbens* por CLAE e por dosagens de compostos fenólicos totais apresentaram grande quantidade de compostos fenólicos, sendo que a fração acetato de etila seguida da fração *n*-butanólica foram as que mais apresentaram esses compostos, sugerindo uma promissora atividade antioxidante do *H. procumbens*.
- O *H. procumbens*, conhecido pela sua ação anti-inflamatória, protegeu contra a peroxidação lipídica cerebral induzida pelos agentes pró-oxidantes, porém a potência antioxidante variou entre os diferentes extratos, sendo que a fração acetato de etila de *H. procumbens* foi a que obteve maior potência em prevenir contra a peroxidação lipídica.
- A fração acetato de etila do *H. procumbens* foi capaz de proteger contra a diminuição da atividade da enzima catalase e do conteúdo de tióis (protéico e não-protéico) induzido por ambos agentes pró-oxidantes (Ferro e NPS), demonstrando ser efetiva *in vitro* na manutenção nos níveis de dois marcadores importantes do sistema antioxidante.
- A perda da viabilidade celular induzida pelo Ferro ou NPS também foi protegida pela fração acetato de etila de *H. procumbens*, sendo capaz assim de prevenir contra a possível morte celular devido ao EO *in vitro*.
- Os resultados obtidos com a fração acetato de etila foram similares aos encontrados com o ácido gálico, demonstrando que compostos fenólicos como o ácido gálico são as possíveis moléculas com ação antioxidantes presente no na fração.
- A fração acetato de etila também apresentou maiores quantidades de harpagosídeo, principal constituinte do *H. procumbens*, podendo este estar relacionado com os bons resultados encontrado por esta fração de *H. procumbens*.

5 CONCLUSÕES FINAIS

Este estudo demonstrou o grande potencial antioxidante do *H. procumbens*, pois este se mostrou eficiente em prevenir o EO induzido pelo Ferro ou pelo NPS, sendo que a fração acetato de etila de *H. procumbens* foi a fração mais rica em compostos fenólicos e harpagosídeo obtendo maior potencia contra o EO induzido. Além disso, esta fração mostrou ser eficaz contra a perda da viabilidade celular induzida por agentes pró-oxidantes. Este trabalho demonstrou que a atividade antioxidante apresentada pelo *H. procumbens* pode estar relacionada com o mecanismo pelo qual esta planta exerce seu potente efeito anti-inflamatório. Todavia, é preciso mais estudos para elucidar os mecanismos de ação dessa planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELOUAHAD, N.; HEAD, C. Effect of the Major Glycosides of *Harpagophytum procumbens* (Devil's Claw) on Epidermal Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Vitro. *J Nat Prod*, 71: 746-749, 2007.

ABDELOUAHAD, N.; HEAD, C. Dermal and Transcutaneous Delivery of the Major Glycoside Constituents of *Harpagophytum procumbens* (Devil's Claw) in vitro. *Planta Med*, 74: 527-531, 2008.

AKSENOVA, V. I.; BYLINO, O. V.; ZHIVOTYSLII, B. D.; LAYRIK, I. N. Caspase-2: what do we know today? *Mol Biol (Mosk)*, 47(2):187-204, 2013.

ANDERSON, M. L.; SANTOS, E. H.; SEABRA, M. de L.; da SILVA, A. A.; TUFIK, S. Evaluation of acute and chronic treatments with *Harpagophytum procumbens* on Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *J Ethnopharmacol*, 91: 325-330, 2004.

ANSELMINI, A.; ABBATE, A.; GIROLA, F.; NASSO, G.; BIONDI-ZOCCAI, G. G.; POSSATI, G.; GAUDINO, M. Myocardial ischemia, stunning, inflammation and apoptosis during cardiac surgery: a review of evidence. *Eur J Cardiothorac Surg*, 25:304-311, 2004.

ANVISA- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Disponível em: < [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM\[34661-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[34661-1-0].PDF) >. Acesso em: 03 abr. 2013.

ANUATE, M. C.; TORRES, L. M.; MELLO, S. B. V. Effect of Isolated Fractions of *Harpagophytum procumbens* D.C. (Devil's Claw) on COX-1, COX-2 Activity and Nitric Oxide Production on Whole-Blood Assay. *Phytother Res*, 24:1365-1369, 2010.

BABILI, F. E.; FOURASTE, I.; ROUGAIGNON, C.; MOULIS, C.; CHATELAIN, C. Anatomical study of secondary tuberized roots of *Harpagophytum procumbens* DC and quantification of harpagoside by high-performance liquid chromatography method. *Pharmacogn Mag*, 8 (30): 175-180., 2012

BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med*, 109:33-44, 2000.

- BATES, J. N.; BAKER, M. T.; GUERRA, R.; HARRISON, D. G. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. *Biochem Pharmacol*, 42: 157–165, 1991.
- BECKMAN, J. S.; BECKMAN, T. W.; CHEN, J.; MARSHALL, P. A.; FREEMAN, B. A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci*, 87: 1620–1624, 1990.
- BERG, D.; YOUDIM, M. B.; RIEDERER, P. Redox imbalance. *Cell Tissue Res*, 318:201-13, 2004.
- BHATTACHARYA, A.; BHATTACHARYA, S. Anti-oxidant activity of *Harpagophytum procumbens*. *British J Phytother* 5: 2, 1998.
- BOLIGON, A. A.; KUBIÇA, T. F.; MARIO, D. N.; BRUM, T. F.; PIANA, M.; WEIBLEN, R.; LOVATO, L.; ALVES, S. H.; SANTOS, R. C. V.; ALVES, C. F. S.; ATHAYDE, M. L. Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extracts. *Acta Physiol Plant*, 35: 2229-2239, 2013.
- BOLIGON, A. A.; PEREIRA, R. P.; FELTRIN, A. C.; MACHADO, M. M.; JANOVIK, V.; ROCHA, J. B.; ATHAYDE, M. L. Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. *Bioresour Technol*, 100(24):6592-8, 2009.
- BONFANTI, G.; BITENCOURT, P. R.; BONA, K. S.; Silva, P. S.; JANTSCH, L. B.; PIGATTO, A. S.; BOLIGON, A.; ATHAYDE, M. L.; GONÇALVES, T. L.; MORETTO, M.B. *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* Show Similar Antioxidant Properties but Induce Different Enzymatic Activities in the Brain of Rats. *Molecules*. 18(8):9179-94, 2013.
- BORCHARDT, J. K. *The Beginnings of Drug Therapy: Ancient Mesopotamian Medicine*, 2002.
- BRIEN, S.; LEWITH, G. T.; MCGREGOR, G. Devil's Claw (*Harpagophytum procumbens*) as a Treatment for Osteoarthritis: A Review of Efficacy and Safety. *J Altern Complem Med*, 12(10): 981-993, 2006.
- BROWN, G. C. Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide. *Eur J Biochem*, 232: 188-191, 1995.

BRÜNE, B.; Von Knethen, A.; SANDAU, K.B. Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur J Pharmacol*. 26;351(3):261-72, 1998.

CALABRESE, E. J.; CANADA, A. T. Catalase: its role in xenobiotic detoxification. *Pharmac Ther*, 44: 297-307, 1989.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. The Role of Phenolic Compounds in the Fight against Cancer - A Review. *Anticancer Agents Med Chem*, 2013. *In press*

CATELAN, S. C.; BELENTANI, R. M.; MARQUES, L. C.; SILVA, E. R.; SILVA, M. A.; CAPARROZ-ASSEF, S. M.; CUMAN, R. K.; BERSANI-AMADO, C. A. The role of adrenal corticosteroids in the anti-inflammatory effect of the whole extract of *Harpagophytum procumbens* in rats. *Phytomedicine*,13: 446-451, 2006.

CHAUDIÈRE, J.; FERRARI-ILIOU, R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol*, 37: 949-62, 1999.

CHEN, J.; CHANG, B.; WILLIAMS, M.; MURAD, F. Sodium nitroprusside degenerates cultured rat striatal neurons. *Neuro Report*, 2:121–123, 1991.

CLARKSON, C.; CAMPBELL, W. E.; SMITH, P. In vitro Antiplasmodial Activity of Abietane and Totarane Diterpenes Isolated from *Harpagophytum procumbens* (Devil's Claw). *Planta Med*, 69: 720-724, 2003.

CLARKSON, C.; STAERK, D.; HANSEN, S. H.; SMITH, P. J.; JAROSZEWSKI, J. W. Identification of Major and Minor Constituents of *Harpagophytum procumbens* (Devil's Claw) Using HPLC-SPE-NMR and HPLC-ESIMS/APCIMS. *J Nat Prod*, 69:1280-1288, 2006.

COLPO, G.; TREVISOL, F.; TEIXEIRA, A. M.; FACHINETTO, R.; PEREIRA, R.P.; ATHAYDE, M. L.; ROCHA, J. B.; BURGER, M. E. *Ilex paraguariensis* has Antioxidant Potential and Attenuates Haloperidol-induced Orofacial Dyskinesia and Memory Dysfunction in Rats. *Neurotoxicity Research*, 12(3): 1-10, 2007.

COOPER, C. E. Nitric oxide and iron proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1411:290-309,1999.

CRAGG, G. M; NEWMAN, D. J. Natural products a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta*, 2013. *In press*

DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M.; LONDON, E. D.; BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci*, 88: 6368–6371, 1991.

DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Nitric oxide neurotoxicity. *J Chem Neuroanat*, 10:179–190, 1996.

DEIGNER, H. P.; HABERKOM, V.; KINSCHERF, R. Apoptosis modulation in the therapy of neurodegenerative diseases. *Expert Opin Investing Drugs*, 9: 747-764, 2000.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82(1):47-95, 2002.

DUARTE, N.; LAGE, H.; ABRANTES, M.; FERREIRA, M. J.; Phenolic compounds as selective antineoplastic agents against multidrug-resistant human cancer cells. *Planta Med*, 76(10):975-80, 2010.

DUFFY, S.; SO, A.; MURPHY, T. H. Activation of Endogenous Antioxidant Defenses in Neuronal Cells Prevents Free Radical-Mediated Damage. *J Neurochem*, 71: 69-78, 1998.

DUGAS, Jr. A. J.; CASTANEDA-ACOSTA, J.; BONIN, G. C.; PRICE, K. L.; FISCHER, N. H.; WINSTON, G. Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: structure–activity relationships. *J Nat Prod*, 63: 327–331, 2000.

EVAN, G. I.; VOUSDEN, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411:342-348, 2001.

FARINA, M.; AVILA, D. S.; da ROCHA, J. B.; ASCHNER, M. Metals, oxidative stress and neurodegeneration: A focus on iron, manganese and mercury. *Neurochem Int*, 62: 575-94, 2013.

FARMACOPÉIA EUROPÉIA - Direção Europeia da Qualidade dos Medicamentos: Strasbourg, Vols. I e II, 5ª Ed, 2004.

FARNSWORTH, N. R.; AKERELE, O.; BINGEL, A. S.; SOEJARTO, D. D.; GUO, Z. Medicinal plants in therapy. *Bull WHO*, 63:965–981, 1985.

FERNANDEZ, R. S.; COTTER, T. G. Apoptosis or necrosis: intracellular levels of glutathione influence mode of cell death. *Biochem Pharmacol*, 48: 675-681, 1994.

FIEBICH, B. L.; HEINRICH, M.; HILLER, K. O.; KAMMERER, N. Inhibition of TNF- α synthesis in LPS-stimulated primary human monocytes by *Harpagophytum* extract Stei Hap 69. *Phytomedicine*, 8: 28–30, 2001.

FIEBICH, B. L.; MUNÓZ, E.; ROSE, T.; WEISS, G.; MCGREGOR, G. P. Molecular Targets of the Antiinflammatory *Harpagophytum procumbens* (Devil's claw): Inhibition of TNF α and COX-2 Gene Expression by Preventing Activation of AP-1. *Phytother Res*, 26(6): 806-811, 2011.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408:239-247, 2000.

FREI, B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med*, 97(3A):5S-13S, 1994.

GEORGIEV, M. I.; ALIPIEVA, K.; ORHAN, I. E. Cholinesterases Inhibitory and Antioxidant Activities of *Harpagophytum procumbens* from In Vitro Systems. *Phytother Res*, 26: 313-316, 2012.

GEORGIEV, M. I.; IVANOVSKA, N.; ALIPIEVA, K.; DIMITROVA, P.; VERPOORTE, R. Harpagoside: from Kalahari Desert to pharmacy shelf. *Phytochemistry*, 2013. *In press*.

GERICKE, N. Plants, products and people" Southern African perspectives. *Ethnomed and Drug Discov*, 13: 155-162, 2002.

GRANT, L.; McBEAN, D. E.; FYFE, L.; WARNOCK, A. M. A Review of the Biological and Potential Therapeutic Actions of *Harpagophytum procumbens*. *Phytother Res*, 21: 199-209, 2007.

GRANT, L. McBEAN, D. E.; FYFE, L.; WARNOCK, A. M. The Inhibition of Free Radical Generation by Preparations of *Harpagophytum procumbens* *In Vitro*. *Phytother Res*, 23: 104-110, 2009.

GRISHAM, M. B. Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet*; 344: 859-61, 1994.

HALLIWELL, B. Oxygen radicals: a commonsense look at their nature and medical importance. *Med Biol*, 62: 71–77, 1984.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*, 59: 1609–1623, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free radicals in Biology and Medicine*, 2^a ed, New York: Clarendon Press, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford UK:Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4^a ed., Oxford University Press, Oxford, 2007.

HAMPTON, M. B.; ZHIVOTOVSKY, B.; SLATER, A. F.; BURGESS, D. H.; ORRENIUS, S. Importance of the redox state of cytochrome c during caspase activation in cytosolic extracts. *Biochem J*, 329:95-9, 1998.

HANISH SINGH, J. C.; ALAGARSAMT, V.; SATHESH KUMAR, S.; NARSIMHA REDDY, Y. Neurotransmitter metabolic enzymes and antioxidant status on Alzheimer's disease induced mice treated with *Alpinia galanga* (L.) Willd. *Phytother Res*, 25(7):1061-7, 2011.

HARRIS, M. L.; SCHILLER, H. J.; REILLY, P. M.; DONOWITZ, M.; GRISHAM, M. B.; BULKLEY, G. B. Free radicals and other reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease: cause, consequence or epiphenomenon? *Pharmacol Ther*, 53(3): 375-408, 1992.

HAYASHI, M. Oxidative stress in developmental brain disorders. *Neuropathology*, 29(1):1-8, 2009.

HEO, H. J.; LEE, C. Y. Protective effects of quercetin and vitamin C against oxidative stress-induced neurodegeneration. *J Agric Food Chem*, 52(25):7514-7, 2004.

HUANG, T. H. -W.; TRAN, V. H.; DUKE, R. K.; TAN, S.; CHRUBASIK, S.; ROUFOGALIS, B. D.; DUKE, C. C. Harpagoside suppresses lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 expression through inhibition of NF- κ B activation. *J Ethnopharmacol*, 104: 149-155, 2006.

INABA, K.; MURATA, K.; NARUTO, S.; MATSUDA, H. Inhibitory effects of devil's claw (secondary root of *Harpagophytum procumbens*) extract and harpagoside on cytokine production in mouse macrophages. *J Nat Prod*, 64: 219-222, 2010.

JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med*, 9: 515-40, 1990.

JAYASENA, T.; POLJAK, A.; SMYTHE, G.; BRAIDY, N.; MÜNCH, G.; SACHDEV, P. The role of polyphenols in the modulation of sirtuins and other pathways involved in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*, 12(4):867-883, 2013.

JOSEPHY, P. D. *Molecular Toxicology*, New York: Oxford University Press, 1997.

KADE, I. J.; IBUKUNA, E. O.; NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. Sun-drying diminishes the antioxidative potentials of leaves of *Eugenia uniflora* against formation of thiobarbituric acid reactive substances induced in homogenates of rat brain and liver. *Exp Toxicol Pathol*, 60:365–371, 2008.

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

KASZKIN, M.; BECK, K. F.; KOCH, E.; ERDELMEIR, C.; KUSCH, S.; PFEILSCHIFTER, J.; LOEW, D. Downregulation of iNOS expression in rat mesangial cells by special extracts of *Harpagophytum procumbens* derives from harpagoside-dependent and independent effects. *Phytomedicine*, 11:585-95, 2004.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, anti-oxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*, 30:620-50, 2002.

KUNDU, J. -K.; MOSSANDA, K. -S.; NA, H. -K.; SURH, Y. -J. Inhibitory effects of the extracts of *Sutherlandia frutescens* (L.) R.Br. and *Harpagophytum procumbens* DC. On phorbol ester-induced COX-2 expression in mouse skin: AP-1 and CREB as potential upstream targets. *Cancer Lett*, 218:21–31, 2005.

KUSIAK, J. W., IZZO, J. A., ZHAO, B. Neurodegeneration in Alzheimer disease. Is apoptosis involved? *Mol Chem Neuropathol*, 28: 153-162, 1996.

LAUDAHN, D.; WALPER, A. Efficacy and Tolerance of *Harpagophytum* Extract LI 174 in Patients with Chronic Non-radicular Back Pain. *Phytother Res*, 15: 621-624, 2001.

LIN, A. M.; PING, Y. H.; CHANG, G. F.; WANG, J. Y.; CHIU, J. H.; KUO, C. D.; CHI, C. W. Neuroprotective effect of oral S/B remedy (*Scutellaria baicalensis* Georgi and *Bupleurum scorzonerifolium* Willd) on iron-induced neurodegeneration in the nigrostriatal dopaminergic system of rat brain. *J Ethnopharmacol*, 134(3):884-91, 2011.

LIU, Y.; PETERSON, D. A.; KIMURA, H.; SCHUBERT, D. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *J Neurochem*, 69: 581-93, 1997.

LOEW, D.; MOLLERFELD, J.; KOCH, E.; BIBER, A.; SCHRODTER, A.; PUTTKAMMER, S.; KASZKIN, M. Investigation on the pharmacokinetic properties of *Harpagophytum* extracts and their effects on eicosanoid biosynthesis in vitro and ex vivo. *Clin Pharmacol Ther*, 69: 356–364, 2001.

MAHDY, K.; SHAKER, O.; WAFAY, H.; NASSAR, Y.; HASSAN, H.; HUSSEIN A. Effect of some medicinal plant extracts on the oxidative stress status in Alzheimer's disease induced in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 3:31-42, 2012.

MAHOMED, I. M.; OJEWOLE, J. A. O. Analgesic, Antiinflammatory and Antidiabetic Properties of *Harpagophytum procumbens* DC (Pedaliaceae) Secondary Root Aqueous Extract. *Phytother Res*, 18: 982-989, 2004.

MAHOMED, I. M.; OJEWOLE, J. A. O. Anticonvulsant activity of *Harpagophytum procumbens* DC [Pedaliaceae] secondary root aqueous extract in mice. *Brain Res Bull*, 69: 57-62, 2006.

MAHOMED, I. M.; OJEWOLE, J. A. O. Uterotonic effect of *Harpagophytum procumbens* DC (Pedaliaceae) secondary root aqueous extract on rat isolated uterine horns. *J Smooth Muscle Res*, 45: 231-239, 2009.

MCCONKEY, D. J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett*, 99: 157-168, 1998.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. *Annu Rev Biochem*, 52:711-60, 1983.

MEISTER, A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem*, 263(33):17205-8, 1988.

MINOTTI, G.; AUST, S. D. Redox cycling of iron and lipid peroxidation. *Lipids*, 27: 219-226, 1992.

MNCWANGI, N.; CHEN, W.; VERMAAK, I.; VILJOEN, A. M.; GERICKE, N. Devil's Claw—A review of the ethnobotany, phytochemistry and biological activity of *Harpagophytum procumbens*. *J Ethnopharm*, 143: 755-71, 2012.

NA, H. K.; MOSSANDA, K. S.; LEE, J. Y.; SURTH, Y. J. Inhibition of phorbol ester-induced COX-2 expression by some edible African plants. *Biofactors*, 21: 149–153, 2004.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*, 31:1287-312, 2001.

ODA, T.; SADAKATA, N.; KOMATSU, N.; MURATSU, T. Specific efflux of glutathione from the basolateral membrane domain in polarized MDCK cells during ricin-induced apoptosis. *J Biochem*, 126: 715-721, 1999.

OHKAWA, H.; OHISHI, H.; YAGI, K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 95:351-358, 1979.

PARK, J. S.; PARK, M. K.; OH, H. J.; WOO, Y. J.; LIM, M. A.; LEE, J. H.; JU, J. H.; JUNG, Y. O.; LEE, Z. H.; PARK, S. H.; KIM, H. Y.; CHO, M. L.; MIN, J. K. Grape-seed proanthocyanidin extract as suppressors of bone destruction in inflammatory autoimmune arthritis. *PLoS One*, 7(12), 2012.

PASTORE, A.; PIEMONTE, F.; LOCATELLI, M.; RUSSO, A. L.; GAETA, L. M.; TOZZI, G.; FEDERICI, G. Determination of blood total, reduced, and oxidized glutathione in pediatric subjects. *Clin Chem*, 47 (8): 1467–9, 2003.

PAYNE, C. M.; BERNSTEIN, C.; BERNSTEIN, H. Apoptosis overview emphasizing the role of oxidative stress, DNA damage and signal-transduction pathways. *Leuk Lymphoma*, 19(1-2):43-93, 1995.

PEREIRA, R. P.; FACHINETTO, R.; de SOUZA PRESTES, A.; PUNTEL, R. L.; SANTOS da SILVA, G. N.; HEINZMANN, B. M.; BOSCHETTI, T. K.; ATHAYDE, M. L.; BURGER, M. E.; MOREL, A. F.; MORSCH, V. M.; ROCHA, J. B. Antioxidant

Effects of Different Extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citrates*. *Neurochem Res*, 34: 973-983, 2008.

PEROZA, L. R.; BUSANELLO, A.; LEAL, C. Q.; ROPKE, J.; BOLIGON, A.A.; MEINERZ, D.; LIBARDONI, M.; ATHAYDE, M. L.; FACHINETTO, R. *Bauhinia forficata* Prevents Vacuous Chewing Movements Induced by Haloperidol in Rats and Has Antioxidant Potential In Vitro. *Neurochem Res*, 38:789-96, 2013.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*, 63(7):1035-42, 2000.

PUNTEL, R. L.; NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. Krebs cycle intermediates modulate thiobarbituric acid reactive species (TBARS) production in rat brain in vitro. *Neurochem Res*, 30(2):225-35, 2005.

PUNTEL, R. L.; ROOS, D. H.; PAIXÃO, M. W.; BRAGA, A. L.; ZENI, G.; NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. Oxalate modulates thiobarbituric acid reactive species (TBARS) production in supernatants of homogenates from rat brain, liver and kidney: effect of diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride. *Chem Biol Interact*, 165(2):87-98, 2007.

QUINE, S. D.; RAGHU, P. S. Effects of (-)-epicatechin, a flavonoid on lipid peroxidation and antioxidants in streptozotocin induced diabetic liver, kidney and heart. *Pharmacol Rep*, 57(5):610-5, 2005.

REITER, R. J. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms the aging brain. *FASEB J*, 9:526–533, 1995.

RODRIGO, R.; VINAY, J.; CASTILLO, R.; CERECEDA, M.; ASENIO, R.; ZAMORANO, J.; ARAYA, J.; CASTILLO-KOCH, R.; ESPINOZA, J.; LARRAÍN, E. Use of vitamins C and E as a prophylactic therapy to prevent postoperative atrial fibrillation. *Int J Cardiol*, 138(3):221-8, 2010.

RODRIGO, R.; KORANTZOPOULOS, P.; CERECEDA, M.; ASENJO, R.; ZAMORANO, J.; VILLALABEITIA, E.; BAEZA, C.; AQUAYO, R.; CASTILLO, R.; CARRASCO, R.; GORMAZ, J.G. A Randomized Controlled Trial to Prevent Postoperative Atrial Fibrillation by Antioxidant Reinforcement. *J Am Coll Cardiol*. 2013. *In press*.

ROVER JUNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Química Nova*, 24: 112-119, 2001.

SCHMIDT, A. H. Fast HPLC for quality control of *Harpagophytum procumbens* by using a monolithic silica column: method transfer from conventional particle-based silica column. *J Chromatoqr A*, 1073: 377-381, 2005.

SCHULZE-TANZIL, G.; HANSEN, C.; SHAKIBAEI, M. Effect of a *Harpagophytum procumbens* DC extract on matric metalloproteinases in human chondrocytes in vitro. *Arzneimittelforschung*, 54: 213–220, 2004.

SHELTON, S. B.; KRISHNAMURTHY, P.; JOHNSON, G. V. W. Effects of cyclin-dependent kinase-5 activity on apoptosis and tau phosphorylation in immortalized mouse brain cortical cells. *J Neurosci Res*, 76: 110-120, 2004.

SIMMONDS, N. J.; RAMPTON, D.S. Inflammatory bowel disease a radical view. *Gut*, 34(7): 865-8, 1993.

SILVA, J. P.; COUTINHO, O. P. Free radicals in the regulation of damage and cell death – basic mechanisms and prevention. *Drug Discov Ther*, 4:144-167, 2010.

SMITH, J. A.; PARK, S.; KRAUSE, J. S.; BANIK, N. L. Oxidative stress, DNA damage, and the telomeric complex as therapeutic targets in acute neurodegeneration. *Neurochem Int*, 62: 764-775, 2013.

STEWART, K. M.; COLE, D. The commercial harvest of Devil's Claw (*Harpagophytum* spp.) in southern Africa: the devil's in the details. *J Ethnopharmacol*, 100, 225–236, 2005

SUDATI, J. H.; FACHINETTO, R.; PEREIRA, R. P.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; SOARES, F. A.; de VARGAS BARBOSA, N. B.; ROCHA, J. B. In vitro Antioxidant Activity of *Valeriana officinalis* Against Different Neurotoxic Agents. *Neurochem Res*, 34: 1372-9, 2009.

TAN, S.; SAGARA, Y.; LIU, Y.; MAHER, P.; SCHUBERT, D. The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *J Cell Biol*, 141(6):1423-32, 1998.

TIMBRELL, J. *Principles of Biochemical Toxicology*, 3^a ed, London: Taylor & Francis, 2000.

- UCHIDA, S.; HIRAI, K.; HATANAKA, J.; HANATO, J.; UMEGAKI, K.; YAMADA, S. Antinociceptive Effects of St. John's Wort, *Harpagophytum Procumbens* Extract and Grape Seed Proanthocyanidins Extract in Mice. *Biol Pharm Bull*, 31: 240-245, 2008.
- UEDA, S.; MASUTANI, H.; NAKAMURA, H.; TANAKA, T.; UENO, M.; YODOI, J. Redox control of cell death. *Antioxid Redox Signal*, 4(3):405-14, 2002.
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(1):44-84, 2007.
- VISTICA, D. T. Tetrazolium-based Assays for Cellular Viability: A Critical Examination of Selected Parameters Affecting Formazan Production. *Cancer Res*, 51: 2515-252, 1991.
- WACHSMUTH, L.; LINDHORST, E.; WRUBEL, S.; HADZHIYSKI, H.; HUDELMAIER, M.; ECKSTEIN, F.; CHRUBASIK, S. Micro-morphometrical assessment of the effect of *Harpagophytum procumbens* extract on articular cartilage in rabbits with experimental osteoarthritis using magnetic resonance imaging. *Phytother Res*. 25(8): 1133-40, 2011.
- WAGNER, C.; FACHINETTO, R.; DALLA CORTE, C. L.; BRITO, V. B.; SEVERO, D.; de OLIVEIRA COSTA DIAS, G.; MOREL, A. F.; NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. Quercitrin, a glycoside form of quercetin, prevents lipid peroxidation in vitro. *Brain Res*, 1107: 192-8, 2006.
- WARNOCK, M.; MCBEAN, D.; SUTER, A.; TAN, J.; WHITTAKER, P. Effectiveness and Safety of Devil's Claw Tablets in Patients with General Rheumatic Disorders. *Phytother Res*, 21: 1228-1233, 2007.
- WEGENER, T. Devil's Claw: from African traditional remedy to modern analgesic and antiinflammatory. *Herbal Gram*, 50: 47-54, 2000.
- WEGENER, T.; LUPKE, N. P. Treatment of patients with arthrosis of hip or knee with an aqueous extract of devil's claw (*Harpagophytum procumbens* DC). *Phytother Res*, 17(10):1165-72, 2003.
- WINTERBOURN, C. C. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett*, 83:969-74, 1995.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Traditional medicine strategy 2002-2005. Geneva: World Health Organization; 2002.

WU, J. Q.; KOSTEN, T. R.; ZHANG, X. Y. Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2013. *In press*.

XU, K.; THORNALLEY, P. J. Involvement of glutathione metabolism in the cytotoxicity of the phenethyl isothiocyanate and its cysteine conjugate to human leukaemia cells in vitro. *Biochem Pharmacol*, 61: 165-177, 2001.

YUTING, C.; RONGLIANG, Z.; ZHONJIAN, J. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Rad Biol Med*, 9: 19-21, 1991.