

## RESUMO

Há crescentes evidências que mostram que a modificação da LDL tem um papel potencial na aterogênese. No presente estudo, o floranol (3,5,7,2'-tetrahydroxi-6-methoxy-8-prenilflavanona), um flavonóide isolado das raízes de *Dioclea grandiflora*, inibiu, com sucesso, a oxidação da LDL na presença de íons cobre avaliada pela formação de dieno conjugado e pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Como o mecanismo antioxidante pode envolver a coordenação com metais, tentamos compreender em detalhes as interações do floranol com Cu(II) e Fe(III) pela combinação de espectrofotometria UV-Visível (UV-Vis), espectrometria de massa, voltametria cíclica. As constantes de acidez do ligante, bem como, as constantes de estabilidade dos complexos metálicos foram calculadas. Os valores de pKa foram determinados 6.58, 11.97 e 13.87 e a ordem das constantes de acidez proposta foi 7-OH > 5-OH > 2°OH. O melhor ajuste entre os espectros experimentais e calculados foi obtido assumindo a formação de dois complexos de Cu(II):  $[CuL] \log \beta = 19.34 \pm 0.05$  e  $[CuL_2]^{2-} \log \beta = 26.4 \pm 0.10$  e três complexos de Fe(III):  $[FeL_3]^{3-} \log \beta = 44.72 \pm 0.09$ ,  $[FeL_2]^{\ddagger} \log \beta = 35.32 \pm 0.08$  e  $[FeL]^+ \log \beta = 19.51 \pm 0.04$ . Além disso, a redução de cobre e ferro é menos favorável na presença de floranol. Esses resultados indicam que o floranol pode eficientemente ligar-se ao Cu(II) e ao Fe(III) prevenindo a oxidação da LDL por tais metais. Outro mecanismo antioxidante dos flavonóides é sua capacidade de seqüestrar radicais livres. Avaliamos, por quimioluminescência, o efeito antioxidante do floranol em macrófagos de camundongos ativados de camundongos deficientes para o gene da apolipoproteína E (ApoE<sup>-/-</sup>), da óxido nítrico sintase indutível (iNOS<sup>-/-</sup>) e da linhagem selvagem C57Bl/6. Nós demonstramos o efeito atenuador do floranol no surto oxidativo de macrófagos das três linhagens experimentais estudadas, ativados com zymosan, que receberam diferentes concentrações de floranol. Em conjunto, os dados obtidos neste estudo mostram que o floranol atua com um antioxidante pela capacidade de quelar íons Cu(II) e Fe(III) e através da interação direta com radicais livres.

## ABSTRACT

Increasing evidences support the oxidative modification of LDL as playing a potential role in atherosclerosis. In the present study, floranol (3,5,7,2'-tetrahydroxy-6-methoxy-8-prenylflavanone), a flavonoid isolated from the roots of *Dioclea grandiflora*, successfully inhibited the oxidation of LDL in the presence of copper ions as measured by conjugated diene formation and thiobarbituric acid-reacting substances (TBARS). As the antioxidant mechanism may involve metal coordination, we have undertaken a detailed study of floranol interactions with Cu(II) and Fe(III) by combination of UV-visible (UV-Vis) and mass spectrometry and cyclic voltammetry measurements. The acidity constants of the ligand, as well as the stability constants of the metal complexes, were calculated. The pKa values of 6.58, 11.97 and 13.87 were determined and the following acidity order is proposed 7-OH > 5-OH > 2'-OH. The best fit between experimental and calculated spectra was obtained assuming the formation of two Cu(II) complexes:  $[\text{CuL}] \log \beta = 19.34 \pm 0.05$  and  $[\text{CuL}_2]^{2-} \log \beta = 26.4 \pm 0.10$  and three Fe(III) complexes:  $[\text{FeL}_3]^{3-} \log \beta = 44.72 \pm 0.09$ ,  $[\text{FeL}_2]^{-} \log \beta = 35.32 \pm 0.08$  and  $[\text{FeL}]^+ \log \beta = 19.51 \pm 0.04$ . In addition, copper and iron reduction is less favorable in the presence of floranol. These results indicate that floranol can efficiently bind Cu(II) and Fe(III) ions thus preventing their effect on LDL oxidation. Another antioxidant mechanism of flavonoids is its ability to scavenge free radicals. We evaluated the antioxidant effect of floranol on activated murine macrophages in apolipoprotein E (ApoE<sup>-/-</sup>) and inducible nitric synthase (iNOS<sup>-/-</sup>) knockout mice comparing to the wild-type strain C57Bl/6 by chemiluminescence. It was demonstrated the attenuating effect of different concentrations of floranol on zymosan elicited murine macrophage oxidative burst from three experimental strains of mice. Altogether the data obtained in this study showed that floranol act as an antioxidant on capacity to chelate iron and copper ions and through a direct interaction with free radicals.