

***In vitro* antioxidant properties of the diterpenes Parvifloron D and 7 α -acetoxy-6 β -hydroxyrooleanone**

Propriedades antioxidantes in vitro dos diterpenos Parviflorona D e 7 α -acetoxy-6 β -hidroxiroileanona

Sara Rosa¹, V. Correia¹, I. Ribeiro¹, P. Rijo^{1,2}, F. Simões^{1,2}, N. Saraiva^{1*} and A. Fernandes^{1,2*}

¹CBIOS, Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences & Health Technologies, Lisboa, Portugal

²iMed. ULisboa - Research Institute for Medicines, Faculty of Pharmacy, University of Lisbon, Lisboa, Portugal

Email: nuno.saraiva@ulusofona.pt

*Shared senior authorship

Abstract

The involvement of oxidative stress in several pathological and toxicological phenomena supports the quest for novel antioxidants. Plants from the *Plectranthus* genus contain bioactive components, including antioxidant compounds. In this work, the antioxidant activity of two diterpene compounds extracted from *Plectranthus* plants, Parvifloron D (ParvD) and 7 α -acetoxy-6 β -hydroxyrooleanone (Roy) was evaluated. First, the DPPH assay was used to assess the reducing capacity of these compounds. ParvD was shown to have a much stronger antioxidant activity than Roy and was therefore selected for further studies. The ability of ParvD to degrade H₂O₂ was evaluated, but no activity was found. To assess if ParvD is able to protect DNA from ROS-induced DNA breaks, a plasmid cleavage assay was conducted. Treatment with H₂O₂ + Fe(II) altered the plasmid DNA conformation. In contrast, plasmid DNA treated with ParvD + H₂O₂ + Fe(II) retained its supercoiled conformation, suggesting that ParvD protects DNA from oxidative breakage. These findings support that ParvD has antioxidant activity. Further work is planned to assess the antioxidant and DNA protective effects in cell based assays in order to validate the results found in these *in vitro* tests.

Keywords: *Plectranthus*, 7 α -acetoxy-6 β -hydroxyrooleanone, Parvifloron D, antioxidant activity, oxidative DNA damage

Resumo

O envolvimento do stress oxidativo em diversos fenómenos patológicos e toxicológicos justifica a procura de novos antioxidantes. As plantas do género *Plectranthus*, contêm componentes bioativos, incluindo compostos antioxidantes. Neste trabalho, avaliou-se a atividade antioxidante de dois diterpenos extraídos de plantas deste género, a Parviflorona D (ParvD) e 7 α -acetoxy-6 β -hidroxiroileanona (Roy). Inicialmente utilizou-se o ensaio do DPPH para avaliar a capacidade redutora destes compostos. A ParvD revelou uma atividade antioxidante muito superior à da Roy, pelo que foi selecionada para estudos mais detalhados. A capacidade da ParvD para degradar H₂O₂ foi avaliada, mas não se encontrou atividade a este nível. Para avaliar se a ParvD consegue proteger o ADN de quebras induzidas por espécies reativas de oxigénio (ROS - Reactive Oxygen Species), realizou-se o ensaio de clivagem de ADN plasmídico. O tratamento com H₂O₂+Fe(II) alterou a conformação do ADN plasmídico. Pelo contrário, o ADN tratado com ParvD+H₂O₂+Fe(II) manteve a estrutura superenrolada, o que sugere que a ParvD protege o ADN de lesões oxidativas. Estes resultados demonstram que a ParvD tem atividade antioxidante. Estão planeados trabalhos futuros para caracterizar a atividade antioxidante e o efeito protetor do ADN em modelos celulares, de modo a validar os resultados encontrados nestes estudos *in vitro*.

Palavras-chave: *Plectranthus*, 7 α -acetoxy-6 β -hidroxiroileanona, Parviflorona D, atividade antioxidante, lesão oxidativa do ADN.

Introduction

The involvement of oxidative stress in cancer, inflammatory, cardiovascular, respiratory, ocular, neurodegenerative and cancer pathologies has recently increased interest in antioxidant molecules. Oxidative events are also partially responsible for the toxic effects caused by many xenobiotics and for some events involved in the ageing process^{1,2}.

Oxidative stress is the imbalance in a system's redox status in which the oxidative potential is higher than the antioxidant potential of antioxidant molecules. This condition leads to an increased level of reactive oxygen species (ROS).

ROS are transient species that contain oxygen and have a high chemical reactivity. These species can be free radicals, *i.e.* chemical species with one or more unpaired electrons, or non-radical species. The ROS include the superoxide anion, the hydroxyl radical, the hydrogen peroxide, oxygen singlet, alkoxyl and peroxy radicals¹⁻³.

ROS can be generated through cell metabolism, primarily from mitochondrial respiration. They can also be produced as a result of intra and extracellular oxidases, cellular defence mechanisms, peroxisomes and lipid peroxidation. In addition to endogenous sources, ROS can be generated by exposure to xenobiotics or radiation^{1,3}.

Organisms have developed several mechanisms to deal with oxidative stress. Antioxidants can prevent the oxidation of different oxidizable substrates and can be exogenous (e.g. food) or endogenous³. In homeostatic conditions, the antioxidant system can neutralize ROS and the products of its biochemical reactions into less toxic molecules. The antioxidant system is very complex and includes a series of intra- and extra-cellular antioxidant molecules and enzymes. The main antioxidant enzymes are the superoxide dismutases, catalase and glutathione peroxidases². The non-enzymatic defences include proteins capable of chelating pro-oxidant ions such as copper or iron, and electron donor molecules such as glutathione, Vitamins E and C, bilirubin and uric acid^{1,3}.

The involvement of ROS in many pathological and toxicological events supports research for new antioxidant molecules with potential therapeutic applications. Plants play an important role in the search for such molecules because they can produce a high number of bioactive compounds. The genus *Plectranthus* from the *Lamiaceae* family is widespread in tropical and subtropical Africa, Asia and Australia. This genus includes around 300 species⁴ and is frequently referred for its

Introdução

Nos últimos anos, tem-se verificado um aumento do interesse pelos antioxidantes devido ao envolvimento do stress oxidativo em diversas patologias como doenças inflamatórias, cardiovasculares, respiratórias, oculares, neurodegenerativas e cancro. Os fenómenos oxidativos estão também na base dos efeitos tóxicos provocados por muitos xenobióticos, assim como no processo de envelhecimento (1).

O stress oxidativo pode descrever-se como um desequilíbrio que ocorre no estado redox de um determinado sistema, no qual o potencial oxidante prevalece sobre as moléculas antioxidantes, determinando assim um aumento da disponibilidade de espécies reativas de oxigénio (ROS).

As ROS são espécies transientes que contêm oxigénio e que têm elevada reatividade química. Podem ser radicais livres, isto é, espécies químicas com um ou mais eletrões desemparelhados, ou espécies não radicalares. Entre as ROS incluem-se o radical anião superóxido, o radical hidroxilo, o peróxido de hidrogénio, o singlete de oxigénio, radicais alcóxido e peróxido (1, 3).

As ROS podem ter origem no metabolismo celular, sendo produzidas maioritariamente na respiração mitocondrial. Podem também ser formadas como resultado da ação de oxidases intra e extracelulares, processos de defesa celular, peroxissomas e lipoperoxidação. Para além das fontes endógenas, muitos fatores externos tais como a radiação ou a exposição a xenobióticos, podem também levar a um aumento de ROS nos organismos expostos (1, 3).

Ao longo da evolução, os seres vivos foram desenvolvendo mecanismos de defesa no que diz respeito ao stress oxidativo. Estes mecanismos antioxidantes podem ter origem endógena ou exógenas (ex: alimentação) e atrasam ou previnem de modo significativo a oxidação de um substrato oxidável (3). Assim, este sistema de defesa permite, em condições normais, que as ROS e os produtos que resultam das suas reações bioquímicas sejam neutralizados em moléculas menos tóxicas para o organismo. O sistema antioxidante natural possui uma organização bioquímica complexa da qual fazem parte uma muitas enzimas e moléculas antioxidantes intra e extracelulares. As principais enzimas antioxidantes são as superóxido dismutases, a catalase e as glutathione peroxidases. Dentro das defesas não enzimáticas estão incluídas proteínas com capacidade de quelar iões pró-oxidantes como o ferro ou cobre, ou moléculas eletrodadoras como a glutathione, Vitaminas E e C, bilirrubina e ácido úrico (1, 3).

O envolvimento do stress oxidativo em inúmeros fenómenos patológicos e toxicológicos justifica o interesse generalizado pela procura de novos antioxidantes com potencial ação terapêutica. Nesta busca por novos antioxidantes, as plantas revestem-se de grande valor pelo elevado número de compostos bioativos que possuem.

medicinal properties. Many compounds from these plants were already isolated and identified. Some of these compounds revealed interesting pharmacological properties, including antimicrobial⁵, antitumour⁶ and antioxidant⁷ activities.

This work aims to characterize the antioxidant properties of two compounds, Parvifloron D (ParvD; Figure 1A) and 7 α -acetoxy-6 β -hydroxyroyleanone (Roy; Figure 1B), extracted from *Plectranthus ecklonii* and *Plectranthus grandidentatus*, respectively.

O género *Plectranthus* pertence à família *Lamiaceae* e encontra-se largamente distribuído na África tropical e subtropical, Ásia e Austrália, incluindo cerca de 300 espécies (4). Este género é frequentemente citado pelas suas propriedades medicinais. Vários dos seus componentes foram já isolados e identificados, e revelaram possuir diferentes atividades farmacológicas incluindo ação antimicrobiana (5), antitumoral (6) e antioxidante (7). Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo a caracterização das propriedades antioxidantes de dois compostos, a Parviflorona D (ParvD; Fig. 1A) e a 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona (Roy; Fig. 1B), que são diterpenos abietânicos extraídos de *Plectranthus ecklonii* *Plectranthus grandidentatus*, respetivamente.

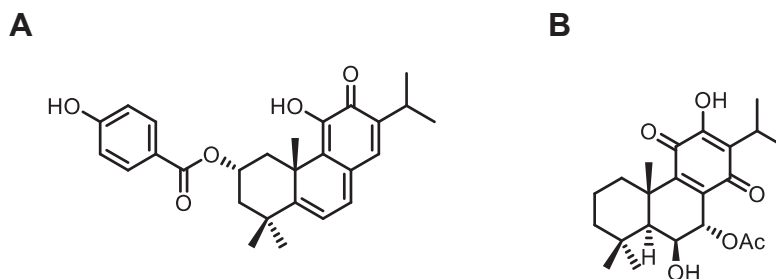


Figure 1/ Figura 1. Chemical structure of Parvifloron D (A) and 7 α -acetoxy-6 β -hydroxyroyleanone (B).

Estrutura química da Parviflorona D (A) e da 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona (B).

Materials and Methods

Reagents

All reagents were purchased from Sigma-Aldrich. ParvD and Roy were extracted from *Plectranthus ecklonii* and *Plectranthus grandidentatus*, respectively, according to the previously described method of Rijo *et al*^{5,8}.

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay

The free radical scavenging activity of ParvD and Roy was evaluated using the DPPH assay according to the method used by Martins *et al* (9). ParvD and Roy were dissolved in ethanol, mixed with DPPH solution (75 μ M in ethanol) and incubated at room temperature for 30 minutes. The absorbance was monitored at 517 nm against a blank containing the same concentration of ParvD or Roy. Two independent experiments were conducted, each comprising duplicate tests per sample.

H₂O₂ degradation assay

The ability of ParvD (5 μ M and 50 μ M) to degrade

Materiais e Métodos

Compostos utilizados

Os reagentes foram adquiridos à Sigma-Aldrich. Os compostos utilizados no estudo, ParvD e Roy foram extraídos respetivamente das espécies *Plectranthus ecklonii* e *Plectranthus grandidentatus*, de acordo com os procedimentos previamente descritos por Rijo *et al* (5, 8).

Ensaio 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

A atividade antioxidante da ParvD e da Roy foi primeiramente avaliada pelo ensaio DPPH. O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Martins *et al* (9). Os compostos em estudo foram dissolvidos em etanol absoluto. A estas soluções adicionou-se a solução etanólica de DPPH, cuja concentração final foi de 75 μ M. A mistura incubou 30 minutos no escuro, à temperatura ambiente. Após esta incubação mediu-se a absorvância a 517 nm, utilizando como branco as mesmas concentrações dos compostos em estudo, dissolvidas em etanol absoluto. Foram realizados dois ensaios independentes, cada um deles contendo duplicados para cada amostra.

Ensaio da degradação de H₂O₂

A possível capacidade da ParvD (5 μ M e 50 μ M) para degra-

H_2O_2 was assessed by a spectrophotometric assay. The percentage of H_2O_2 degradation was determined by the variation in $\text{Abs}_{240\text{nm}}$ in phosphate buffer (5 mM, pH 7.4) between 0 and 2 minutes. Catalase (5 U/mL) was used as a positive control. Two or three independent assays at each concentration were conducted.

Plasmid DNA cleavage assay

The ability of ParvD to protect double stranded DNA from oxidative cleavage was assessed with a plasmid DNA (pUC18) cleavage assay. The method was adapted from *Fernandes et al* (10). Oxidative cleavage of pUC18 was induced by the H_2O_2 (1 mM) / FeSO_4 10 μM system. ParvD was used to a final concentration of 1 μM and 50 μM . Catalase (5 U/mL) was added as a protection positive control. Plasmid DNA was incubated with the samples described above in phosphate buffer (5 mM, pH 7.4) at 37 °C, for 2 hours in the dark. Sample buffer was added and the samples were analysed by agarose gel (0.8 %) electrophoresis (135 V) in TBE. DNA was stained with GelRed and images were acquired using the software AlphaEase FC (AlphaDigidoc1000). Five independent experiments were conducted, each comprising duplicate tests per sample.

Results

ParvD has a higher DPPH radical sequestering capacity than Roy

The antioxidant activity as measured by the capacity of ParvD and Roy to scavenge the DPPH radical is shown in Figure 2. Although both compounds can scavenge the radical, ParvD is more efficient. This difference can be translated in the IC_{50} values for these compounds: $(28.16 \pm 4.28) \mu\text{M}$ for ParvD and $(1.27 \pm 0.07) \text{mM}$ for Roy. Because Roy presented a very modest antioxidant activity, only ParvD antioxidant activity was further studied.

ParvD cannot degrade H_2O_2

To further characterise the antioxidant properties of ParvD, the ability to degrade H_2O_2 was evaluated. ParvD (5 μM and 50 μM) cannot efficiently degrade H_2O_2 (Figure 3), as the degradation percentages were lower than 5 %. The assay was validated by the addition of catalase; in this case the H_2O_2 degradation was $54.77 \% \pm 5.97 \%$ under the conditions tested.

ParvD can protect plasmid DNA from oxidative cleavage

dar o H_2O_2 foi avaliada por um método espectrofotométrico. A percentagem de degradação de H_2O_2 determinou-se através da variação de absorvância a 240 nm de uma solução a 20 mM de H_2O_2 em tampão fosfato 5 mM, pH 7,4, na presença da ParvD, entre os tempo 0 e 2 min. Como controlo positivo, utilizou-se catalase a 5 U/mL. Foram realizados dois a três ensaios independentes.

Ensaio da clivagem do DNA plasmídico

A capacidade da ParvD para proteger o ADN de lesões oxidativas foi avaliada através do ensaio da clivagem do ADN do plasmídeo pUC18. As condições experimentais foram adaptadas do protocolo previamente descrito por *Fernandes et al* (10). A ParvD foi testada nas concentrações finais de 1 μM e 50 μM . A clivagem oxidativa do ADN foi induzida pelo sistema H_2O_2 (1 mM) / FeSO_4 10 μM . Como controlo de proteção antioxidante, foi adicionada Catalase 5 U/mL ao sistema H_2O_2 / FeSO_4 . O ADN plasmídico foi incubado com as amostras em tampão fosfato 5 mM, pH 7,4, a 37 °C, no escuro, durante 2 h. Após esta incubação, adicionou-se tampão de aplicação e as amostras foram analisadas por eletroforese a 135 V em 0,8 % agarose em tampão TBE. Os géis foram corados com GelRed e as imagens captadas utilizando o software AlphaEase FC (AlphaDigidoc1000). Foram realizados cinco ensaios independentes, cada um deles em duplicado para a amostra em estudo.

Resultados

A ParvD apresenta maior capacidade de sequestrar o radical DPPH que a Roy

A Fig. 2 mostra os resultados da análise da atividade antioxidante da ParvD (Fig. 2 A) e da Roy (Fig. 2 B), relativamente à sua capacidade de redução do radical DPPH. Ambos os compostos têm capacidade de sequestrar este radical. No entanto, esta capacidade é bastante mais acentuada no caso da ParvD, pois a descoloração do radical DPPH ocorre a concentrações mais baixas. Esta diferença no potencial antioxidante traduz-se nos valores de CI_{50} obtidos neste ensaio, que foram de $(28,16 \pm 4,28) \mu\text{M}$ para a ParvD e de $(1,27 \pm 0,07) \text{mM}$ para a Roy. Pelo fato de a Roy apresentar uma atividade antioxidante modesta, o estudo prosseguiu apenas focado na ParvD.

A ParvD não apresenta capacidade de degradação do H_2O_2

No sentido de caracterizar as propriedades antioxidantes da ParvD, foi avaliada a possibilidade deste composto degradar o H_2O_2 . Tal como se observa na Fig. 3, a ParvD (5 μM e 50 μM) não tem capacidade de degradar eficientemente o H_2O_2 , tendo apresentado percentagens de degradação de H_2O_2 muito baixas (inferiores a 5 %).

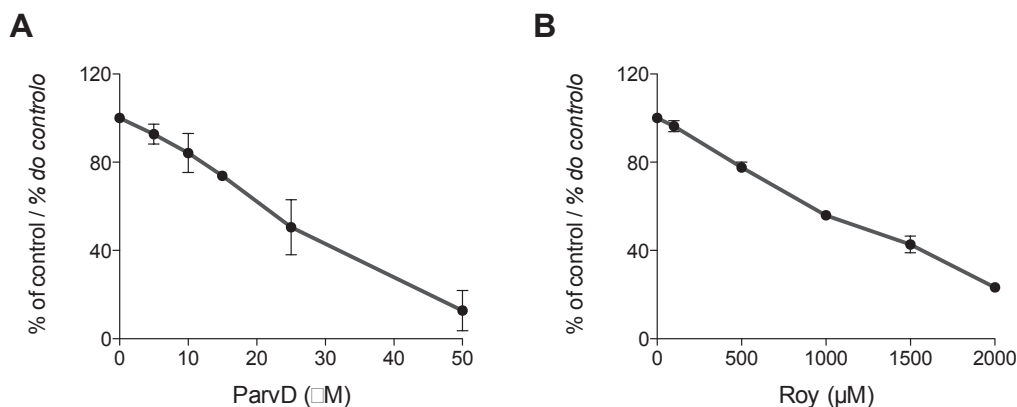


Figure 2/ Figura 2. *In vitro* antioxidant properties of ParvD (A) and Roy (B). The ability to reduce the DPPH radical was measured and results are presented as mean percentage values, considering the absorbance of the negative control (DPPH 75 μM in ethanol) as 100%. Data correspond to means $\pm$ SD from 2-3 independent assays.

Capacidade antioxidante *in vitro* da ParvD (A) e Roy (B), relativamente à capacidade de redução do radical DPPH. Os resultados estão apresentados como médias $\pm$ DP (n=2-3) e foram calculados considerando como 100% a absorbância do controlo negativo (DPPH 75 μM em etanol absoluto).

To assess if ParvD can protect DNA from oxidation-induced DNA cleavage, a plasmid DNA (pUC18) was used (Figure 4). The H_2O_2 (1 mM) + $FeSO_4$ (10 μM) system was used to induce DNA cleavage. The oxidation-induced plasmid DNA cleavage leads to a reduction in the percentage of plasmid DNA in supercoiled structure (Figure 4, lane 3). This effect was reversed by addition of catalase (Figure 4, lane 4) or ParvD (Figure 4 lanes 6, 8, 10 and 12). Although the protection provided by ParvD was higher when at 50 μM, it was also protective at 1 μM. ParvD alone had no effect on DNA structure (Figure 4, lanes 5, 7, 9 and 11).

Pelo contrário, o controlo positivo (5 U/mL Catalase - CAT) degradou $54,77\% \pm 5,97\%$ da quantidade inicial de H_2O_2 nas condições do ensaio.

A ParvD protege o DNA plasmídico da clivagem oxidativa

A Fig. 4 mostra os resultados obtidos no ensaio de clivagem do ADN plasmídico, o qual foi utilizado com a finalidade de avaliar se a ParvD consegue proteger o ADN plasmídico de clivagens induzidas por mecanismo oxidativo. O sistema H_2O_2 (1 mM) + $FeSO_4$ (10 μM) originou clivagens no ADN, as quais justificam a redução nítida da proporção de ADN na forma superenrolada que se observa na linha 3. Este efeito foi revertido pela adição de catalase ao sistema (linha 4) assim como pela presença de ParvD (linhas 6, 8, 10 e 12). Esta proteção verificou-se em ambas as concentrações testadas (1 μM e 50 μM), mas foi mais acentuada para a concentração 50 μM. A ParvD isoladamente não teve impacto na estrutura do ADN (linhas 5, 7, 9 e 11).

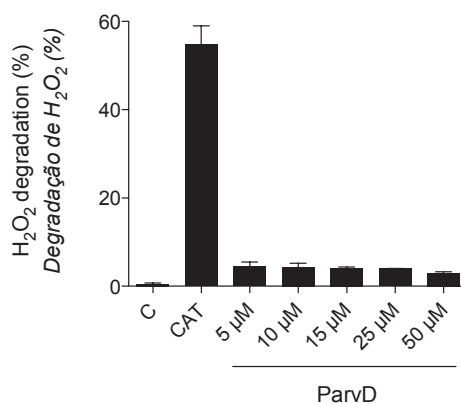


Figure 3/ Figura 3. Analysis of ParvD induced H₂O₂ degradation. Data is shown as mean percentage of H₂O₂ degradation $\pm$ SD (n=2-3) after incubation with catalase (CAT) or with different concentrations of ParvD. C – negative control.

Análise da capacidade de degradação do H₂O₂ pela ParvD. As barras representam as percentagens de degradação do H₂O₂ obtidas após incubação com catalase (controlo positivo) ou com diferentes concentrações de ParvD. Os resultados estão apresentados como médias $\pm$ DP (n=2-3). C – controlo negativo.

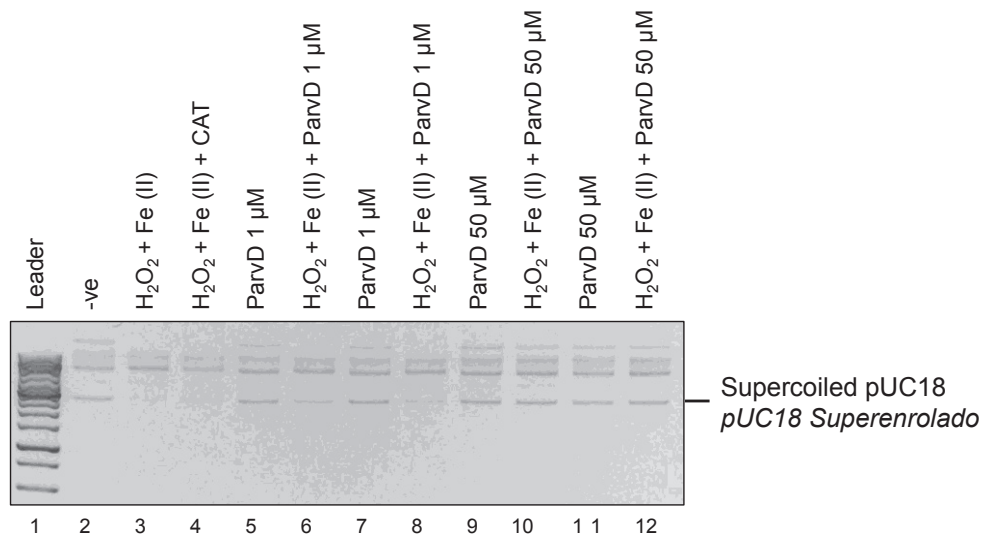


Figure 4/ Figura 4. ParvD can protect plasmid DNA from oxidative cleavage. Agarose gel electrophoresis image showing the different plasmid DNA (pUC18) structures after incubation with the indicated compounds. –ve – negative control.

Avaliação do efeito da ParvD na clivagem oxidativa de ADN plasmídico. Imagem representativa de uma electroforese em gel de agarose mostrando as diferentes estruturas do DNA plasmídico (pUC18) após incubação com os tratamentos indicados.

Leader - Marcador de pesos moleculares; -ve - controlo negativo.

Discussion

Many scientific studies suggest that oxidative stress is involved in several pathological phenomena, supporting the quest for novel products with antioxidant properties. Plants from *Plectranthus* genus are used in traditional medicine and have different constituents with biological activities, including antioxidant activity. In this regard, this study aimed to evaluate the *in vitro* antioxidant activity of two diterpenes extracted from plants of this genus. The initial approach consisted in the evaluation of the ability to scavenge the DPPH radical. Among the methodologies to assess antioxidant activity, the DPPH assay is one of the most widely used and documented¹¹. This technique allows the estimation of the ability of a given antioxidant molecule to donate hydrogen to DPPH, reducing this radical^{11,12}. The results of the DPPH assay demonstrate a weak reducing activity for Roy. Although we cannot exclude other antioxidant mechanisms for this diterpene, our study proceeded only with ParvD, which showed higher antioxidant potency in the DPPH assay. The difference between the reducing activities of these two compounds, as well as between ParvD and other abietane-type diterpens such as ferruginol¹³, may be ascribed to the fact that ParvD, upon reducing DPPH, generates a compound with greater resonance stabilization. Despite the antioxidant potency of ParvD shown by the DPPH technique, it is important to mention that *in vitro* chemical assays bear no similarity to biological systems and do not take into account the compound bioavailability¹⁴. Hence, *in vivo* studies should be performed in the future to claim the bioactivity of ParvD.

Regarding ParvD, a deeper characterization of its antioxidant activity, assessing other aspects beyond reducing capacity, was sought. The ability of ParvD to degrade H_2O_2 was thus evaluated. This ROS has a high biological relevance, especially in cell signalling cascades¹. Hydrogen peroxide is formed *in vivo*, during several metabolic processes, namely by the action of enzymes such as glucose oxidase or superoxide dismutases. Despite its weak oxidant potency, H_2O_2 has an important role in oxidative stress due to its ability to transpose cell membranes and to originate the highly toxic and reactive hydroxyl radical ($HO\bullet$)³. Under our experimental conditions, ParvD did not show significant effects on H_2O_2 degradation, indicating absence of antioxidant action upon this ROS.

The ability of ParvD to protect plasmid DNA from oxidative cleavage was also evaluated. This assay constitutes a first approach to study the effects of antioxidants on the protection of the genome against oxidative damage. The study of agents that protect DNA from oxidative lesions is relevant due to the association of this type

Discussão

Muitas evidências científicas indicam que o stress oxidativo está envolvido em diversos fenómenos patológicos, o que justifica a procura de novos produtos com propriedades antioxidantes. As plantas do género *Plectranthus* são utilizadas em medicina tradicional e vários dos seus constituintes possuem atividades biológicas, incluindo atividade antioxidante. Neste contexto, o presente estudo visou avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de dois diterpenos extraídos de plantas deste género. A abordagem inicial consistiu na avaliação da capacidade sequestradora do radical DPPH. Dos métodos para avaliar a capacidade antioxidante, o ensaio DPPH é dos mais usados e documentados (11). Esta técnica permite estimar a capacidade de um dado antioxidante em doar hidrogénios ao DPPH, reduzindo este radical (11, 12). Os resultados do ensaio DPPH indicam uma fraca atividade redutora para a Roy. Apesar de não podermos excluir a hipótese deste diterpeno ter outros mecanismos de ação antioxidante, este resultado pouco promissor levou-nos a prosseguir o estudo apenas com a ParvD, que se revelou bastante mais potente no ensaio DPPH. A diferença na atividade redutora dos dois compostos, assim como a diferença entre a ParvD e outros diterpenos do tipo abietano, como o ferruginol (13), pode atribuir-se ao fato de, aquando da redução do DPPH, a ParvD poder originar um composto com maior estabilização por ressonância. Apesar da potência antioxidante demonstrada pela ParvD no método DPPH, é importante referir que os ensaios químicos *in vitro* não se assemelham aos sistemas biológicos e não contemplam a biodisponibilidade dos compostos (14). Assim, estudos *in vivo* deverão ser realizados futuramente para que se possa alegar a bioatividade da ParvD. Relativamente à ParvD, pretendeu caracterizar-se melhor a sua ação antioxidante, avaliando outros aspetos para além da capacidade redutora. Neste contexto, foi avaliada a possibilidade da ParvD degradar o H_2O_2 . Esta ROS destaca-se pela sua relevância biológica, nomeadamente ao nível das cascatas de sinalização celular (1). O peróxido de hidrogénio forma-se *in vivo*, no decurso de diversos processos metabólicos, nomeadamente através da ação de diversas enzimas como a glucose oxidase ou as superóxido dismutases (1). Apesar de ter um fraco poder oxidante, exerce um papel importante no stress oxidativo por ser capaz de transpor as membranas celulares e por poder originar radical hidroxilo ($HO\bullet$), o qual é altamente tóxico e reativo (3). Nas nossas condições experimentais, a Parv D não exerceu efeitos significativos na degradação do H_2O_2 , o que indica uma ausência de ação antioxidante ao nível desta ROS.

Neste estudo avaliou-se ainda a capacidade da ParvD

of damage with carcinogenesis (15). In fact, oxidative DNA damage is a major source of the mutation load in living organisms (15). The attack of DNA by ROS can result in the formation of adducts, single- or double-strand breakage, base modifications, deoxyribose modification, and DNA cross-linking. If these lesions are not efficiently repaired, mutations, replication errors, genomic instability and cell death can occur (15). Due to its high reactivity, hydroxyl radical is the predominant ROS that targets DNA (15). Therefore, in the assay used, DNA lesion was also induced by hydroxyl radical, generated by Fenton chemistry from H_2O_2 and Fe(II). ParvD clearly protected plasmid DNA from the cleavages induced by hydroxyl radical. Considering the absence of H_2O_2 degrading activity shown by ParvD, this protection could be due to the ability of this compound to scavenge $HO^\bullet$. Alternatively, taking into account that the structure of ParvD includes different donor atoms, the observed protection could be ascribed to Fe(II) chelation, precluding the formation of $HO^\bullet$ by Fenton chemistry. The DNA protection by ParvD is a very interesting result that, in future work, should be confirmed in models with higher complexity and closer to human cells.

Acknowledgments

Sara Rosa acknowledges her project Grant PADDIC 2012-2013 awarded by ALIES / CBIOS / ULHT.

Conflict of Interests

The author declares that there are no financial or personal relationships that could be viewed as a potential conflict of interest.

proteger o D ADN plasmídico da clivagem oxidativa. Este ensaio é uma primeira abordagem para estudar o efeito de antioxidantes na proteção do genoma face a lesões oxidativas. O estudo de agentes que protejam o ADN de lesões oxidativas é relevante pela associação deste tipo de lesões com o processo de cancerigénese (15). De fato, as lesões oxidativas de ADN constituem um contributo importante para a carga global de mutações dos organismos (15). O ataque do ADN por ROS pode resultar na formação de aductos, quebras de cadeia simples ou dupla, modificações nas bases ou na desoxirribose e ligações cruzadas. Se estas lesões não forem reparadas eficientemente, podem ocorrer mutações, erros de replicação, instabilidade genética, e morte celular (15).

Pela sua elevada reatividade, o radical hidroxilo é a ROS mais relevante na indução de lesões oxidativas no ADN (15). Por este motivo, na metodologia utilizada, a lesão no ADN foi também induzida por radicais hidroxilo, gerados por reação de fenton a partir de H_2O_2 e Fe(II). A ParvD originou uma clara proteção do ADN plasmídico face às quebras induzidas pelo radical hidroxilo. Dado que a ParvD não demonstrou ter capacidade para degradar o peróxido de hidrogénio, este efeito protetor poderá dever-se à capacidade deste composto para sequestrar $HO^\bullet$. Em alternativa, considerando que a estrutura da ParvD inclui vários átomos doadores, a proteção observada pode dever-se à quelatação do Fe(II), impedindo a formação de $HO^\bullet$ por reação de fenton. O efeito protetor do ADN demonstrado pela ParvD é um resultado muito interessante, que deverá futuramente ser confirmado em modelos mais complexos e mais próximos das células humanas.

Agradecimentos

Sara Rosa agradece a bolsa de projeto PADDIC 2012-2013 atribuída pelas instituições ALIES / CBIOS / ULHT.

Conflito de Interesses

O autor declara que não existem relações financeiras ou pessoais que pudessem ser vistas como potenciais conflitos de interesse.

References/ Referências

1. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*. 2002 Jan;82(1):47-95.
2. Fernandes ASC, M.; O., Oliveira, N. . Oxidative stress and antioxidant defences - a pedagogical review. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*. 2011;8(1):97-108.
3. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 4th ed. Oxford University Press: New York; 2007.
4. Harley RMR, T. *Advances in Labiatae Science*: Royal Botanic Gardens Kew: Great Britain; 1992.
5. Rijo P, Duarte A, Francisco AP, Semedo-Lemsaddek T, Simoes MF. In vitro antimicrobial activity of royleanone derivatives against Gram-positive bacterial pathogens. *Phytotherapy research: PTR*. 2014 Jan;28(1):76-81.
6. Coutinho I, Pereira G, Simoes MF, Corte-Real M, Goncalves J, Saraiva L. Selective activation of protein kinase C-delta and -epsilon by 6,11,12,14-tetrahydroxy-abieta-5,8,11,13-tetraene-7-one (coleon U). *Biochemical pharmacology*. 2009 Sep 1;78(5):449-59. PubMed PMID: 19413996.
7. P. Rijo MB, M. Matos, H. Rocha, S. Jesus, M. F. Simões. Screening of antioxidant and antimicrobial activities on *Plectranthus* spp. extracts. *Biomed Biopharm Res*. 2012;9(2):225-35.
8. Simoes MF, Rijo P, Duarte A, Matias D, Rodriguez B. An easy and stereoselective rearrangement of an abietane diterpenoid into a bioactive microstegiol derivative. *Phytochem Lett*. 2010 Dec 17;3(4):234-7.
9. Martins IL, Miranda JP, Oliveira NG, Fernandes AS, Goncalves S, Antunes AM. Synthesis and biological activity of 6-selenocaffeine: potential modulator of chemotherapeutic drugs in breast cancer cells. *Molecules*. 2013;18(5):5251-64.
10. Fernandes AS, Costa J, Gaspar J, Rueff J, Cabral MF, Cipriano M, et al. Development of pyridine-containing macrocyclic copper(II) complexes: potential role in the redox modulation of oxaliplatin toxicity in human breast cells. *Free radical research*. 2012 Sep;46(9):1157-66.
11. Charles RE, Ponrasu T, Sivakumar R, Divakar S. Angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of enzymatically synthesized phenolic and vitamin glycosides. *Biotechnology and applied biochemistry*. 2009 Mar;52(Pt 3):177-84.
12. Sahgal G, Ramanathan S, Sasidharan S, Mordi MN, Ismail S, Mansor SM. In Vitro antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities of methanolic *Swietenia mahagoni* seed extracts. *Molecules*. 2009;14(11):4476-85.
13. Saijo H, Kofujita H, Takahashi K, Ashitani T. Antioxidant activity and mechanism of the abietane-type diterpene ferruginol. *Natural product research*. 2015 Jan 14;1-5. 14. Tan JB, Lim YY. Critical analysis of current methods for assessing the in vitro antioxidant and antibacterial activity of plant extracts. *Food chemistry*. 2015 Apr 1;172:814-22.
15. Klaunig JE, Kamendulis LM, Hocevar BA. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicologic pathology*. 2010 Jan;38(1):96-109.